

Université des Sciences et Technologies de Lille

N° d'ordre : 2330

Thèse

présentée par

Marie-Ange RECCHI

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé



Utilisation de la Multiplex RT-PCR pour l'étude de l'expression des Sialyltransférases humaines : application aux cancers épithéliaux

Présentée le 2 octobre 1998 devant la commission d'examen

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Professeur Marc MAREEL

Docteur Jacques LE PENDU

Examineurs : Docteur Jean-Philippe PEYRAT

Professeur Philippe DELANNOY

A Fred,

A mes parents,
en gage de mon affection et de ma reconnaissance.

A toute ma famille,

A mes amis,
pour votre présence.

A tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.

A monsieur le Professeur André VERBERT,

Pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, pour vos nombreux encouragements et pour présider le jury de cette thèse, je vous prie de croire en l'expression de mes plus vifs remerciements.

A monsieur le Professeur Marc MAREEL,

Vous avez accepté avec bienveillance de juger ce travail et d'en prendre la responsabilité de rapporteur. Soyez assuré de mes plus profonds remerciements. Un merci particulier pour l'accueil chaleureux que vous nous avez réservé lors de notre visite dans votre laboratoire.

A monsieur le Docteur Jacques LEPENDU,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en prendre la responsabilité de rapporteur malgré votre éloignement. Recevez mes sincères remerciements.

A monsieur le Docteur Jean-Philippe PEYRAT,

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de votre équipe. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A monsieur le Professeur Philippe DELANNOY,

Voilà près de cinq ans que j'ai intégré ton équipe. Ton encadrement, ta rigueur scientifique, et la liberté de la réalisation d'idées dont tu as fait preuve, ont permis d'aboutir à cette thèse. Merci du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens à remercier plus particulièrement,

Toutes les personnes du 017 :

Anne HARDUIN-LEPERS, Isabelle KIM, Michel LOPEZ, Vincent VAN MIEGEM, Ulrike GAMBERT, Bénédicte PETIT, David STOCKES.

Pour leur aide et les agréables moments passés en leur compagnie.

Wim STEELANT,

Au belge du laboratoire,
Pour ton soutien et ta sympathie.

Carine, Sandrine, Danielle et Isabelle

Vous êtes mes complices depuis votre arrivée au C9. Vous avez su m'aider et me supporter durant toutes ces années. Je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble.

Toutes les personnes de l'ex-210 :

Annick PIERCE, Monique BENAÏSSA,
Valérie SALMON, Dominique LEGRAND

Pour la chaleureuse ambiance qui régnait dans ce laboratoire lors de mon arrivé en DEA. Et pour les discussions scientifiques, ainsi que l'aide technique.

Toutes les personnes du 207
Eliane AÏSSI, Colette BRASSART,
Myriam LECOCQ et Stéphane BOUQUELET

Pour votre gentillesse et votre
soutien.

Toutes les personnes du 020 :
René CACAN, Odette LABIAU, Daniel KMIECICK
Anne-Marie MIR, Ingrid MARCHAL,

Pour leur agréable voisinage
et leurs conseils précieux.

Je tiens à remercier tous les
membres du laboratoire de Chimie Biologique,
pour leur soutien technique, leurs conseils et la
sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire
d'Oncologie Moléculaire du centre Oscar Lambret, pour
leur chaleureux accueil et en particulier Mohamed Hebbar
et Louis Hornez pour leurs précieux conseils.

Ce travail a été réalisé sous la direction de monsieur le Professeur Philippe DELANNOY dans le laboratoire de Chimie Biologique (unité Mixte de Recherche n°111 du CNRS, Directeur : Professeur André VERBERT) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi qu'une bourse de l'Association pour la Recherche Contre le Cancer, nous ont permis de réaliser ce travail.

L'ensemble des travaux menés au laboratoire a fait l'objet des communications et des publications suivantes :

Publications :

Marie-Ange RECCHI, Valérie VANDAMME-FELDHAUS, Anne HARDUIN-LEPERS, et Philippe DELANNOY

"La sialylation chez les mammifères : spécificité et régulation des sialyltransférases."

Regard sur la Biochimie, n°3, Septembre 1995, 22-32.

Anne HARDUIN-LEPERS, **Marie-Ange RECCHI** and Philippe DELANNOY

"1994, the year of sialyltransferases."

Glycobiology, (1995), 8, 741-758.

Marie-Ange RECCHI, Anne HARDUIN-LEPERS, Yolande BOILLY-MARER, André VERBERT et Philippe DELANNOY.

"Multiplex RT-PCR Method for the analysis of the expression of Human Sialyltransferases : Application to Breast Cancer Cells."

Glycoconjugate Journal, (1998), 15, 19-27.

Sylviane HENNEBICQ-REIG, Thécla LESUFFLEUR, Calliope CAPON, Carmen de LOBOS, Isabelle KIM, Odile MOREAU, Colette RICHEL, Brigitte HEMON, **Marie-Ange RECCHI**, Emmanuel MAES, Jean-Pierre AUBERT, Francisco X. REAL, Alain ZWEIBAUM, Philippe DELANNOY, Pierre DEGAND et Guillemette HUET.

"Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-a-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC mucin secretion."

Biochemical Journal, (1998), 334, 283-295.

Marie-Ange RECCHI, Mohamed HEBBAR, Louis HORNEZ, Anne HARDUIN-LEPERS, Jean-Philippe PEYRAT et Philippe DELANNOY.

"Multiplex Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction assessment of sialyltransferases' expression in human breast cancer."

Cancer Research, (1998), **58**, 4066-4070.

Communications par affiches :

Marie-Ange RECCHI, Anne HARDUIN-LEPERS, Yolande BOILLY-MARER, André VERBERT et Philippe DELANNOY.

"Mise au point d'une technique de RT-PCR permettant d'étudier la spécificité d'expression des sialyltransférases humaines."

XVIèmes Journées Méditerranéennes des Glucides. L'Isle-sur-la-Sorgue, 20-24 mai 1996.

Anne HARDUIN-LEPERS, **Marie-Ange RECCHI**, André VERBERT et Philippe DELANNOY.

"Sialyltransferases : enzymatic and genetic regulation.

2^{ième} colloque U.L.B.-Lille, Campus Erasme Bruxelles, 9 janvier 1997.

Communications orales :

Philippe DELANNOY, Anne HARDUIN-LEPERS, **Marie-Ange RECCHI** & André VERBERT.

"Régulation de l'expression génique et enzymatique des sialyltransferases."

XVIèmes Journées Méditerranéennes des Glucides. L'Isle-sur-la-Sorgue, 20-24 mai 1996.

Marie-Ange RECCHI, Anne HARDUIN-LEPERS, Yolande BOILLY-MARER, André VERBERT et Philippe DELANNOY.

"Perfecting of RT-PCR-based method for the study of the specific expression of human sialyltransferases."

XVIII International Carbohydrate Symposium. Milan, Italie, 21-26 Juillet 1996.

Marie-Ange RECCHI, Anne HARDUIN-LEPERS, Yolande BOILLY-MARER, André VERBERT et Philippe DELANNOY.

"Analysis of the specific expression of human sialyltransferases by Multiplex RT-PCR."

8th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the groupe Lillois de Glycobiologie and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie. University of Giessen, Germany, Schloss Rauischolzhausen 9-10 decembre 1996.

Philippe DELANNOY, Anne HARDUIN-LEPERS, **Marie-Ange RECCHI**, Roberto A. GEREMIA et André VERBERT.

"Genetic regulation of the expression of sialyltransferases."

First. Intern. Symp. On Glycosyltransferases and Cellular communications, Osaka, Japon, 26-28 mars 1997.

Sommaire

INTRODUCTION	1
GENERALITES	7
I- Les changements de glycosylation dans les cancers : Peut-on les associer à des marqueurs pronostiques ?	7
A- La glycosylation, les glycoconjugués.	7
1- Eléments structuraux.	8
2- Biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines.	8
a- Biosynthèse des N-glycannes.	8
a-1- première étape dans le RER.	8
a-2- deuxième étape : l'appareil de Golgi.	9
b- la O-glycosylation.	12
B- Les changements de glycosylation dans les cellules cancéreuses.	15
1- Les structures oligosaccharidiques spécifiquement impliquées dans la biologie cancéreuse.	16
a- les séries "lacto"	16
b- le branchement en b1-6.	18
b-1 - dans les N-glycannes.	18
b-2 - Dans les O-glycannes.	19
c- les antigènes de groupe sanguin A, B, H.	20
d- les antigènes Lewis.	22
e- les antigènes T, Tn et sialyl-Tn.	25
e-1- les antigènes T et Tn.	26
e-2- l'antigène sialyl-Tn.	27
f- l'acide sialique en α2-6 au galactose.	30
g- les Polysialiques Acides : PSA.	31
2- Comment les structures oligosaccharidiques sialylées sont elles impliquées dans la biologie cancéreuse ?.	32
a- la E-selectine.	32
b- la P-selectine.	35
c- la L-selectine.	36
d- la protéine H.	36
e- la lectine de type I fixant l'acide sialique.	36
C- Conclusions.	37
II- Les Sialyltransférases.	38
A- Les acides sialiques.	38
B- Les Sialyltransférases.	41

1- Spécificité des sialyltransférases.	41
2-Expression tissulaire	45
3- Structures comparées des sialyltransférases.	46
4- Localisation des sialyltransférases.	49
5- Régulation de l'expression des sialyltransférases.	53
a- Structure du gène codant pour ST6Gal I de rat.	53
b- Structure du gène codant pour ST6Gal I humaine.	54
c- régulation transcriptionnelle.	56
<i>c-1- Régulation transcriptionnelle de la forme hépatique chez le Rat.</i>	56
<i>c-2- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I de rat dans les autres tissus</i>	57
<i>c-3- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I humaine.</i>	58
<i>c-4- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I au niveau du foie chez la Souris.</i>	59
d- Les autres sialyltransférases humaines : la famille des ST3Gal	59
C- Les sialyltransférases et le cancer.	63
1- Modifications de la sialylation des N-glycannes : le rôle de ST6Gal I.	64
2- Modifications de la sialylation spécifique des O-glycannes	66
3- Les sialyltransférases intervenant dans la synthèse des déterminants Sialyl-Le ^a et Sialyl-Le ^X .	67
4- Sialylation spécifique des gangliosides.	68
D- Conclusion	69
RESULTATS	70
I- Les sialyltransférases dans le cancer du sein.	70
A- Les modèles cellulaires	72
B- Les capacités d'agrégation des cellules	73
C- Analyse des glycoconjugués à l'aide de lectines dans les lignées du cancer du sein.	75
D- Mesure des activités sialyltransférasiques.	78
II- Mise au point d'une technique de Multiplex RT-PCR des sialyltransférases humaines.	82
A- Choix des conditions d'amplification.	82

B- Publication : Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases : application to breast cancer cells.	84
C- Compléments expérimentaux de l'article :	94
1- Amplification du fragment spécifique de ST6Gal I à partir des ARN totaux de cellules HepG2.	94
2- Optimisation des conditions d'amplification pour la Multiplex RT-PCR.	94
<i>a- influence de la concentration en Taq polymérase.</i>	94
<i>b- influence du nombre de cycles.</i>	96
D- Conclusions de la première partie :	96
E- Extension de la technique de Multiplex RT-PCR à une 5^{ème} sialyltransférase humaine.	98
F- Choix d'un nouveau couple d'amorces pour l'amplification d'un fragment spécifique de la GAPDH.	101
G- Conclusion :	101
III- Application de la technique de Multiplex RT-PCR à d'autres lignées cellulaires épithéliales en culture provenant de cancers du colon et de la peau.	105
A- Application aux lignées cellulaires de cancer du colon : HT29-MTX.	105
B- Etude de l'expression des Sialyltransférases dans les kératinocytes et les mélanocytes humains.	110
1- les kératinocytes "normaux".	110
<i>a- Introduction.</i>	110
<i>b- Amplification par Multiplex RT-PCR des Sialyltransférases impliquées dans la sialylation du disaccharide Galβ1-3GalNAc dans des kératinocytes humains.</i>	112
<i>c- Discussion.</i>	115
2-Cellules issues de mélanomes.	116
<i>a- Introduction.</i>	116
<i>b- Expression des Sialyltransférases impliquées dans la sialylation du disaccharide Galβ1-3GalNAc dans les clones de cellules de mélanome humain IC8 et TIC3.</i>	117
<i>c- Résultats et discussion.</i>	117
3-Conclusion sur les lignées cellulaires de la peau.	119
C- Conclusion générale.	119
IV- Analyse de l'expression des sialyltransférases par Multiplex	

RT-PCR dans des biopsies de cancer du sein.	120
A- Augmentation de la sensibilité de la technique de Mutiplex RT-PCR de 5 sialyltransférases en utilisant des amorces fluorescentes.	120
B- Publication : Multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assessment of sialyltransferases expression in human breast cancer.	125
C- Conclusion.	131
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	133
ANNEXES THECHNIQUES	139
BIBLIOGRAPHIE	148

Introduction

Le mot "cancer" désigne plus d'une centaine de maladies. La quasi-totalité des tissus de l'organisme peuvent être atteints et même pour certains, plusieurs types de cancers sont possibles. Depuis ces 20 dernières années de nombreux progrès scientifiques ont permis de comprendre la naissance d'un cancer et d'identifier plusieurs mécanismes fondamentaux de formation des tumeurs. En fait, chaque cancer présente des mécanismes qui lui sont propres, mais les mécanismes qui engendrent les tumeurs sont communs.

Les trente mille milliards de cellules d'un organisme sain forment une communauté complexe, où chaque groupe de cellules règle la prolifération des autres. Les cellules normales ne se divisent que sur ordre des cellules environnantes. Cette collaboration incessante garantit à chaque tissu une taille et une architecture adaptée aux besoins de l'organisme. Au contraire, les cellules cancéreuses échappent au contrôle des autres cellules : elles ignorent les signaux qui limitent la prolifération et n'obéissent qu'à leur propre programme de réplication. Elles ont, de surcroît, une propriété encore plus menaçante, elles s'échappent de leur site d'origine et migrent vers d'autres tissus. Les tumeurs issues de telles cellules malignes deviennent de plus en plus agressives jusqu'à en être mortelles quand elles se développent dans les organes indispensables à la survie.

Toutes les cellules d'une tumeur sont issues d'une cellule unique dont la division est devenue anormale bien avant que la tumeur ne soit détectée. La transformation maligne de cette cellule responsable de la tumeur survient en raison de l'accumulation de mutations de certains de ses gènes. Ces gènes sont la clé des mécanismes responsables du cancer humain.

La naissance d'un cancer (Weinberg, 1996).

Deux classes de gènes, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, ont un rôle fondamental dans l'apparition d'un cancer. Normalement, ils coordonnent l'ensemble des réactions biochimiques du cycle cellulaire, c'est-à-dire du développement et de la division des cellules : les proto-oncogènes stimulent la croissance, tandis que les gènes suppresseurs de tumeurs l'inhibent. Des mutations de ces deux classes de gènes sont responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée à l'origine des cancers. Ainsi, les tissus normaux "évitent le cancer" en privant les cellules des facteurs de croissance ou en les inondant de facteurs qui inhibent leur prolifération. Par contre, les cellules en voie de cancérisation échappent souvent à ces contrôles, et s'autostimulent en devenant insensibles aux signaux inhibiteurs. Cependant, les cellules ont d'autres moyens de contrôle, elles sont équipées de systèmes de sécurité qui les protègent contre les divisions incontrôlées. En général, les lésions de l'ADN, l'activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs déclenchent l'apoptose. Bien que la cellule endommagée disparaisse, cette destruction ne nuit pas à l'organisme et élimine les menaces potentielles que représentent ces mutations cancérogènes. Les tumeurs, qui apparaissent dans les tissus, naissent des rares cellules génétiquement modifiées qui échappent à ce mécanisme. Des travaux récents ont montré que les cellules sont pourvues d'un deuxième mécanisme de défense contre la prolifération, distinct de l'apoptose, et basé sur le raccourcissement des télomères, segments d'ADN, localisés aux extrémités des chromosomes. Dans la plupart des cellules humaines, les télomères raccourcissent peu à peu à chaque réplication des chromosomes et lorsqu'ils sont devenus trop courts, ils envoient un message d'alarme qui ordonne aux cellules d'entrer en sénescence. Les cellules cancéreuses pallient ce phénomène par la production d'une enzyme, la télomérase qui permet le remplacement de ces segments, ainsi les cellules se répliquent sans fin.

La transformation cancéreuse, résultant de l'accumulation des mutations causant la malignité, dure généralement plusieurs dizaines d'années. Néanmoins, certains gènes mutés sont transmis à la descendance. Cette transmission héréditaire peut provoquer l'apparition de cancer précoce. Des mutations dans d'autres types de gènes participent

aussi à certains cancers familiaux précoces. En effet, certains défauts hérités accélèrent le développement tumoral, en empêchant les protéines qui réparent l'ADN endommagé d'agir. Les mutations qui devraient s'accumuler lentement dans l'ADN, se multiplient de façon inquiétante.

La formation de métastases (Ruoslahti, 1996).

Beaucoup de tumeurs solides apparaissent quand plus d'une demi-douzaine de gènes participants au contrôle de la croissance cellulaire sont mutés. Des anomalies d'autres classes de gènes participeraient également à l'apparition de la malignité, en conférant un caractère invasif aux cellules tumorales, capables de migrer, elles envahissent alors tout l'organisme et fondent des métastases à distance de la tumeur initiale. Bien que les connaissances sur les bases génétiques de la prolifération cellulaire aient beaucoup avancé, on ignore encore presque tout des gènes qui contribuent aux étapes ultérieures du développement tumoral, la prolifération des vaisseaux sanguins qui nourrissent la tumeur, l'invasion des tissus environnants et la formation de métastases.

L'acquisition de la capacité de migrer vers d'autres tissus est un événement indispensable à l'acquisition de la malignité. Pour métastaser, les cellules cancéreuses doivent se détacher de leur site d'origine, envahir un vaisseau sanguin ou lymphatique, se laisser transporter par le sang jusqu'à un site éloigné et y établir une nouvelle colonie cellulaire. A chacune de ces étapes, elles doivent échapper à de nombreux contrôles.

1^{ère} étape : la perte d'adhérence intercellulaire.

Dans les tissus normaux, les cellules adhèrent les unes aux autres et à une trame insoluble de protéines, la matrice extracellulaire, présente dans l'espace intercellulaire. Les deux types d'adhérence jouent des rôles différents lors de l'invasion des tissus et de la formation des métastases.

Les molécules, assurant l'adhérence intercellulaire, maintiennent les cellules à leur place, et sont absentes ou endommagées dans les cellules cancéreuses. Ainsi, dans divers types de cancers, la E-Cadhérine, molécule d'adhérence cellulaire, est partiellement ou totalement absente. La perte de l'adhérence intercellulaire est probablement une des premières étapes des mécanismes invasifs.

L'adhérence à la matrice extracellulaire, d'autre part, permet aux cellules de survivre et de proliférer. Normalement, si une cellule normale s'échapperait d'un tissu pour s'établir ailleurs, elle meurt en chemin. Au contraire, les cellules cancéreuses se disséminent, car elles n'ont pas besoin d'être ancrées pour survivre.

2^{ème} étape : la destruction du soutien.

Les cellules cancéreuses ne doivent pas seulement résister à l'absence d'ancrage, elles ont également d'autres obstacles à éviter. Les cellules épithéliales, à l'origine de nombreux cancers, sont séparées du reste de l'organisme par une membrane basale, une mince couche d'une matrice extracellulaire spécialisée. Celle-ci forme une barrière infranchissable pour la plupart des cellules normales. Les globules blancs sont des exceptions, car même normaux, ils pénètrent dans les tissus et traversent les membranes basales. Comme les globules blancs, les cellules cancéreuses se font un chemin en libérant des métalloprotéases qui dissolvent les membranes basales et diverses matrices extracellulaires. Les cellules normales produisent peu de métalloprotéases et beaucoup d'inhibiteurs de ces enzymes. Après avoir traversé la seconde membrane basale d'un vaisseau sanguin et la couche de cellules endothéliales qui forment le revêtement interne du vaisseau, la cellule cancéreuse atteint le sang et migre ainsi vers d'autres sites de l'organisme.

3^{ème} étape : les cellules circulent dans le sang.

Même quand des cellules cancéreuses pénètrent dans le sang, elles ne forment pas nécessairement des tumeurs secondaires. Parmi les cellules cancéreuses présentes dans le sang, moins d'une sur dix mille survit et fonde une nouvelle tumeur éloignée.

Dans le sang, les cellules cancéreuses semblent vulnérables : elles doivent échapper à la vigilance du système immunitaire. Pour survivre, les cellules devraient s'ancrer très rapidement à l'endothélium d'un petit vaisseau sanguin.

4^{ème} étape : adhérence et formation d'une tumeur secondaire.

Les cellules cancéreuses métastasent préférentiellement dans certains tissus. Elles sont généralement piégées dans le premier lit vasculaire qu'elles rencontrent en aval de leur site d'origine. Les cellules cancéreuses, souvent de grande taille, s'accrochent aux capillaires les plus fins. Le piégeage des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins n'explique pas toutes les formations de métastases. Le système d'adressage moléculaire présent à la surface des cellules semble déterminer les sites de métastase, certaines cellules cancéreuses migreraient préférentiellement dans certains sites, car leurs molécules d'adhérence auraient une forte affinité pour celles que porte le revêtement interne des vaisseaux sanguins des tissus cibles.

Ainsi, l'hypothèse, que les cellules cancéreuses emprunteraient le même mécanisme d'extravasation qui permet aux globules blancs d'atteindre le lieu de l'inflammation, est souvent évoquée. Ce mécanisme fait intervenir un signal de reconnaissance porté par la partie glycanique à la surface extracellulaire des leucocytes, les motifs sialyl-Lewis^X et/ou sialyl-Lewis^a. Les cellules cancéreuses imitent peut-être naturellement le comportement des globules blancs, car elles fabriquent souvent ces motifs.

On connaît encore mal les détails moléculaires du mécanisme qui transforme une cellule cancéreuse localisée, en une cellule métastatique. Les modifications génétiques qui permettent aux cellules de se multiplier sans restriction et de résister à l'apoptose sont indispensables à la diffusion métastatique, car elles permettent aux cellules de survivre sans ancrage. Toutefois, on ignore encore ce qui confère la capacité invasive et métastatique aux cellules cancéreuses. L'hypothèse que les déterminants glycaniques présents à la surface cellulaire et modifiés au cours de la transformation cancéreuse des cellules, participeraient activement à la formation des métastases, nous a conduit à analyser les changements de glycosylation observés dans les cancers. De plus, la participation de la sialylation dans ce mécanisme est très importante, puisque l'augmentation de sialylation est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Ainsi, l'étude des sialyltransférases impliquées dans cette augmentation et dans la formation des déterminants sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a, pourrait nous apporter des informations sur leur participation dans l'apparition des métastases.

Généralités

I- LES CHANGEMENTS DE GLYCOSYLATION DANS LES CANCERS : PEUT-ON LES ASSOCIER A DES MARQUEURS PRONOSTIQUES ?

A- La glycosylation, les glycoconjugués.

La glycosylation est l'une des modifications post-traductionnelles des protéines les plus importantes. Les glycoconjugués possédant une partie oligosaccharidique liée à une protéine ou à un lipide (nommés respectivement glycoprotéine et glycolipide), composent une couche appelée "le glycocalix" ancré sur la membrane à la surface extracellulaire. Ils peuvent également se retrouver libres dans les milieux biologiques. Les glycoprotéines jouent un rôle important dans de nombreux phénomènes biologiques. La présence d'oligosaccharides associés à des protéines solubles ou liés à la membrane extracellulaire permet d'augmenter la solubilité dans l'eau de ces composés, contribue à une bonne orientation de ces molécules, permet une protection contre les protéases, etc...(Varki, 1993).

Parallèlement à ces modifications des propriétés physico-chimiques des glycoconjugués et du fait de cette position à la surface cellulaire, ces glycannes interviennent dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. Généralement, ces oligosaccharides sont caractéristiques d'un type cellulaire. Il est maintenant établi que les variations structurales de ces composés sont contrôlées durant le développement et la différenciation cellulaire. De plus, dans des conditions pathologiques, des changements de ces parties saccharidiques sont observés.

Ainsi, depuis plusieurs décennies, de nombreux auteurs ont observé des glycosylations "aberrantes" au niveau de cellules cancéreuses. Plus récemment, les structures saccharidiques exprimées à la surface des cellules tumorales ont été associées au potentiel métastatique de ces cellules, et pourraient ainsi être utilisées comme marqueur pronostique.

1- Eléments structuraux.

La grande diversité des glycoprotéines résulte d'une part, dans la variabilité de la partie protéique, mais également, dans la variabilité de la liaison de la partie glycanique à la protéine, ainsi que dans l'enchaînement des monosaccharides composant cette chaîne. Enfin, le nombre et la longueur des chaînes saccharidiques varient selon la protéine.

La partie glycanique est composée d'un nombre variable d'oses neutres : D-galactose (Gal), D-glucose (Glc), D-mannose (Man) et L-fucose (Fuc); d'osamines sous forme N-acétylée telles la N-Acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et la N-Acétyl-D-galactosamine (GalNAc) ; et d'oses chargés tels que les acides sialiques (acide N-AcétylNeuraminique, NeuAc; acide N-GlycolylNeuraminique, NeuGc).

La nature de la liaison covalente de la chaîne oligosaccharidique à la chaîne polypeptidique permet de distinguer :

- les N-glycosylprotéines : la liaison s'effectuant entre un résidu de GlcNAc et le groupement NH₂ d'un résidu asparagine (Asn) de la chaîne protéique.
- les O-glycosylprotéines : la liaison s'effectuant entre un résidu de GalNAc et le groupement OH d'un résidu de sérine (Ser) ou de thréonine (Thr) de la protéine.
- les glycoprotéines mixtes comportant à la fois des liaisons de type N- et O-glycosidique.

2- Biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines.

a- Biosynthèse des N-glycannes.

a-1- première étape dans le RER.

La biosynthèse des N-glycannes débute au niveau de la surface cytoplasmique du RER (*reticulum endoplasmique rugueux*), par un assemblage de résidus de GlcNAc sur un résidu polyisoprénique particulier, le dolichol (Dol) aboutissant à la structure GlcNAc₂-

P-P-Dol (Figure 1, page 10). Par la suite, neuf résidus de Man sont ajoutés, les cinq premiers à partir de GDP-Man sur la face cytoplasmique, les quatre derniers sont ajoutés sur la face luminale après retournement de l'intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ vers la face interne du RER. Le donneur pour les réactions localisées dans la couche lipidique interne est le Man-P-Dol synthétisé face cytoplasmique à partir de GDP-Man. C'est par un mécanisme identique que sont additionnés les trois derniers résidus de Glc. L'intermédiaire lipidique ainsi formé $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ a une forte affinité pour l'oligosaccharyltransférase qui catalyse le transfert en bloc de la fraction glycanique sur la protéine. La liaison N-glycannique s'effectue sur un résidu asparaginyll d'un triplet consensus Asn-X-Thr/Ser (X étant un acide aminé quelconque, sauf la proline). Par la suite, l'action successive de glucosidases I et II et de la mannosidase du RER aboutit à la structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-protéine}$ et permet ainsi son transfert dans le compartiment golgien.

α -2- deuxième étape : l'appareil de Golgi.

Dans les premières saccules golgiennes (Figure 2, page 11), la maturation se poursuit par l'action de mannosidases spécifiques et de la N-acétylglucosaminyltransférase I pour aboutir à la structure $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-protéine}$. A partir de cette structure c'est l'action séquentielle de la mannosidase II suivie de toute une série de glycosyltransférases : N-acétylglucosaminyl-, galactosyl-, fucosyl- et sialyltransférases, qui aboutit à la multiplicité des structures. L'activité catalytique des glycosyltransférases s'exerce sur un accepteur spécifique par addition de monosaccharides (Glc, Man, Gal, GlcNAc, Fuc, NeuAc) à partir d'un donneur activé, un glycosyl-nucléotide.

Ces enzymes présentent toutes une spécificité très étroite vis-à-vis de la structure acceptrice, vis-à-vis du donneur de monosaccharide à transférer, et vis-à-vis du type de liaison formée. A la vue des différentes structures glycaniques qui ont pu être déterminées à ce jour, il existerait plus d'une centaine de glycosyltransférases différentes. Une étape charnière impliquant une famille d'enzymes, les N-acétylglucosaminyltransférases, contrôle la substitution des résidus α -Man du noyau par un à cinq résidus de GlcNAc ou, par l'expression d'un résidu GlcNAc intercalaire lié

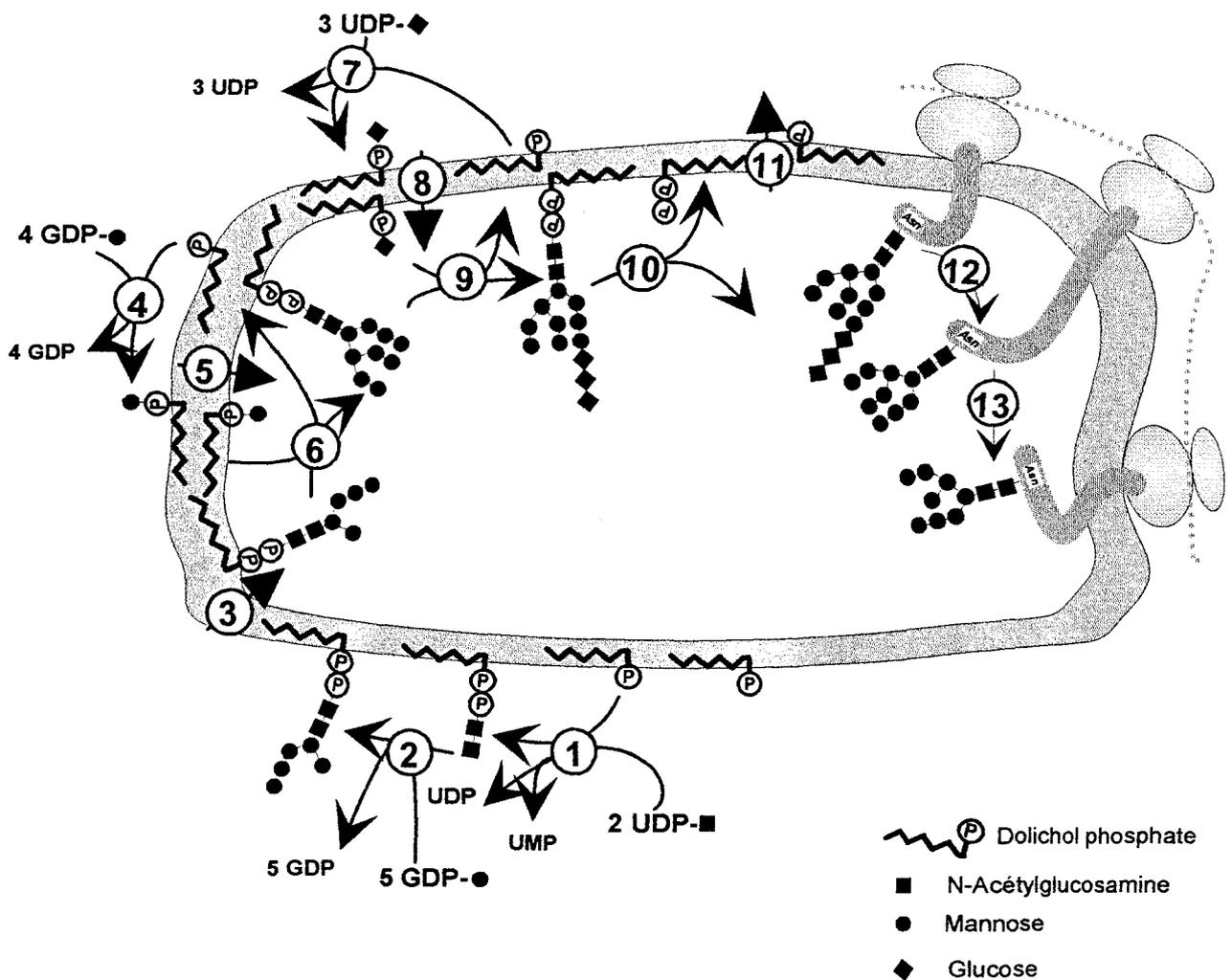


Figure 1 : Topographie du cycle des dolichols (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992).

Les enzymes impliquées à chaque étape du cycle sont : 1 : N-acétylglucosaminyl-1-P-transférase et N-acétylglucosaminyltransférase; 2 : cinq mannosyltransférases (GDP-Man dépendantes); 3 : "flipase"; 4 et 5 : Man-P-Dol synthétase; 6 : quatre mannosyltransférases (Man-P-Dol dépendantes); 7 et 8 : Glc-P-Dol synthétase; 9 : glucosyltransférases; 10 : oligosaccharyltransférase; 11 : Dol-pyrophosphatase; 12 : α -glucosidase I et II; 13 : RE α 1,2-mannosidase.

RETICULUM ENDOPLASMIQUE

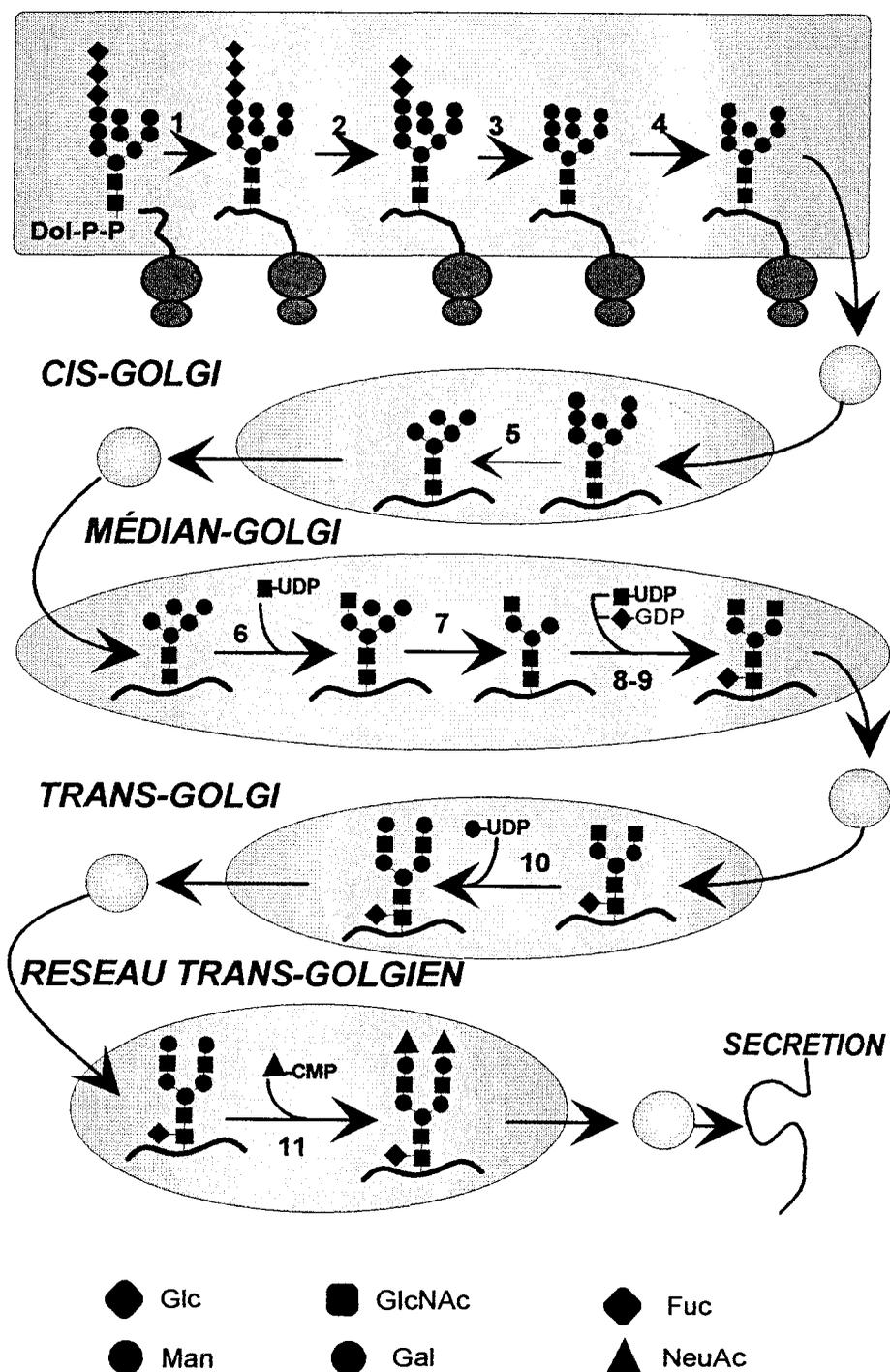


Figure 2 : Schéma simplifié de la biosynthèse des N-glycoprotéines

Les enzymes impliquées à chaque étape sont : 1 : oligosaccharyltransférase; 2 : α -glucosidase I; 3 : α -glucosidase II; 4 : RE α 1,2-mannosidase; 5 : α -mannosidase I; 6 : N-acétylglucosaminyltransférase I; 7 : α -mannosidase II; 8 : N-acétylglucosaminyltransférase II; 9 : α 1,6-fucosyltransférase; 10 : β 1,4-galactosyltransférase; 11 : α 2,3/6-sialyltransférases.

directement au β -Man. Six activités N-acétylglucosaminyltransférases (Figure 3, page 13) génèrent des structures de type N-acétyllactosaminique de mono- jusqu'à penta-antennées avec ou sans résidu intercalaire. Les trois types de N-glycannes rencontrés les plus fréquemment sont : les types oligomannosidiques, hybrides et N-acétylpolylectosaminiques (Figure 4, page 13).

Les N-glycannes portés par une glycoprotéine produite par un même tissu ne subissent pas tous une maturation identique. Une même glycoprotéine aura donc des N-oligosaccharides différents, bien qu'ils aient tous effectué le même cheminement intracellulaire. Cependant, la structure glycoprotéique obtenue est toujours fonction des glycosyltransférases présentes dans un tissu donné. Celles-ci agissant séquentiellement, le produit particulier de l'action de l'une étant le substrat spécifique de la suivante, qu'une glycosyltransférase soit absente ou mal localisée, la structure finale sera différente.

b- la O-glycosylation.

Alors que la N-glycosylation débute dans le RER par le préassemblage d'un oligosaccharide qui sera transféré en bloc sur un résidu Asn de la protéine naissante, la O-glycosylation repose exclusivement sur l'addition séquentielle de monosaccharides à partir de glycosylnucléotides donneurs. La O-glycosylation est initiée par l'addition d'un résidu de GalNAc sur un résidu séryl ou thréonyl de la glycoprotéine. Les chaînes O-glycanniques (Figure 5, page 14) comportent trois régions :

- le noyau (ou core) incluant le résidu de GalNAc de la liaison à l'axe peptidique et le ou les deux monosaccharides substituant cette GalNAc.
- le squelette formé par l'addition alternée de résidus de Gal et de GlcNAc, formant les structures disaccharides de base : de type 1 ou lacto ($\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$) et de type 2 ou néolacto ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$).
- la périphérie représentée par les monosaccharides substituant ce squelette : acide sialique ($\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$), Fuc ($\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$), GalNAc ($\beta 1,4$), GlcNAc ($\alpha 1,4$), galactose ($\alpha 1,3$), et groupements sulfates.

Les régions périphériques les mieux caractérisées sont celles qui possèdent les activités de groupe sanguin A, B, H et Lewis.

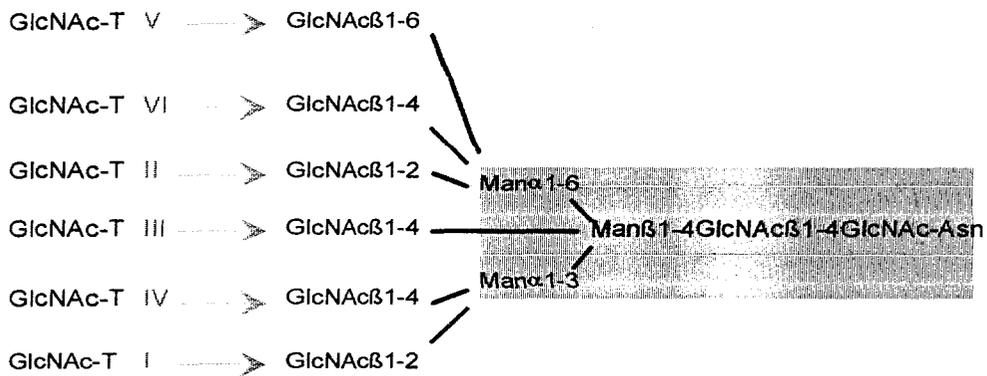
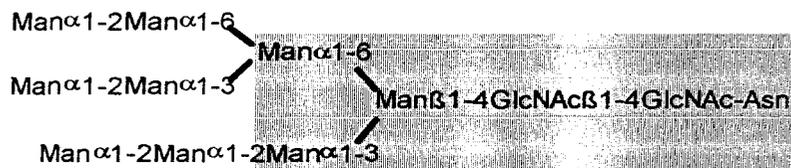
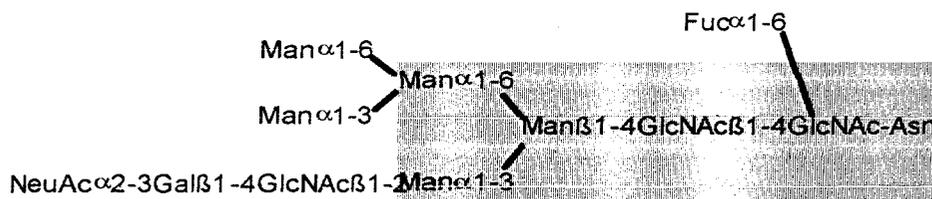


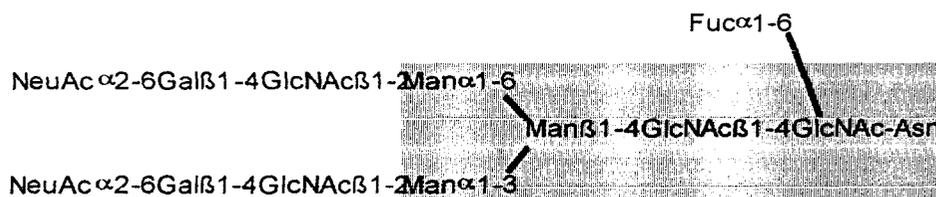
Figure 3 : Les six N-acétylglucosaminyltransférases (GlcNAc-T I à VI) impliquées dans la synthèse des N-glycannes penta-antennés et dans l'addition d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire.



Type Oligomannosidique



Type Hybride



Type N-acétyllactosaminique

Figure 4 : Les trois types de structures glycaniques retrouvées sur les N-glycoprotéines.

Le noyau pentasaccharidique commun à toutes les structures glycaniques est indiqué par un cadre gris.

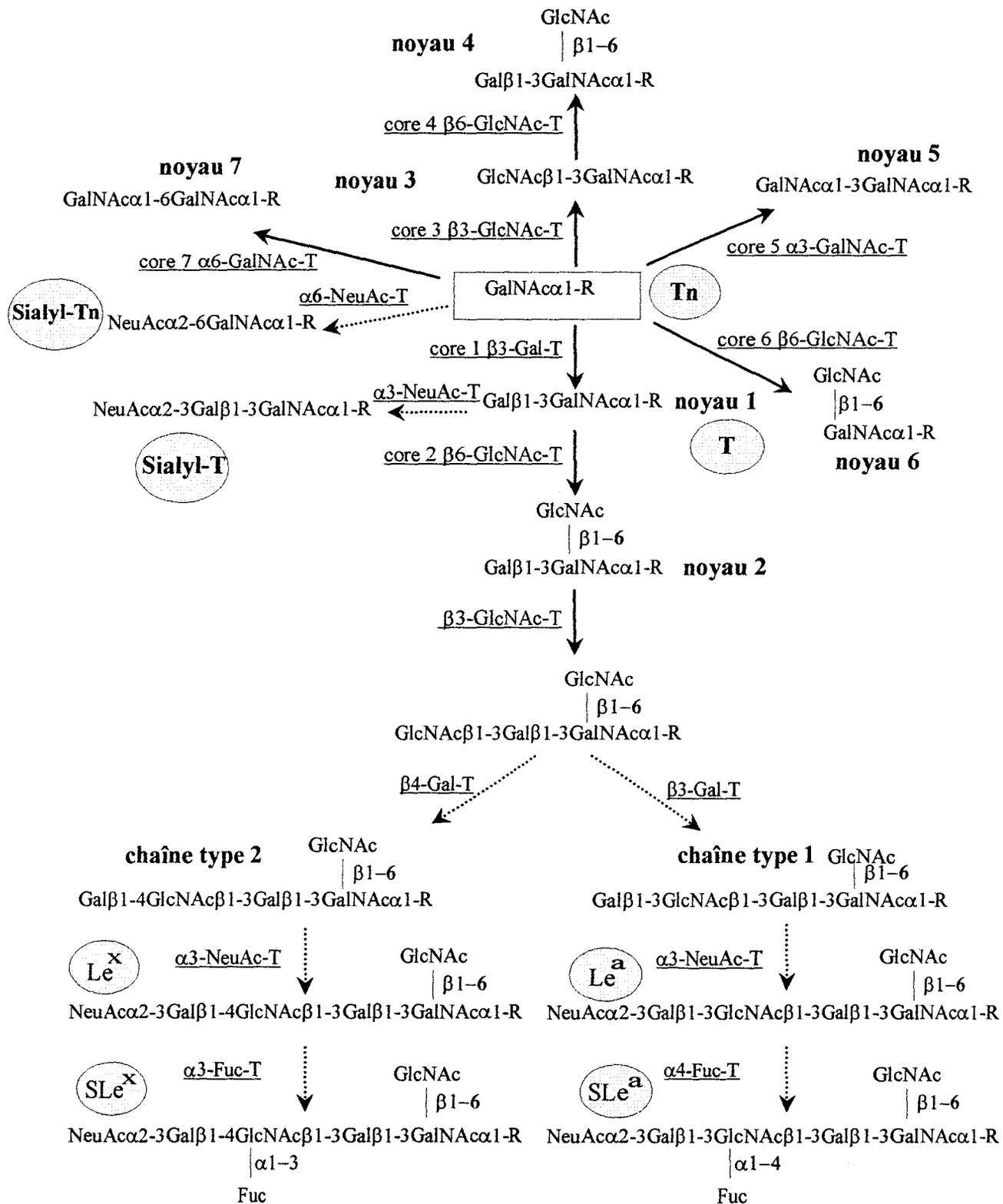


Figure 5 : Voies de biosynthèse des chaînes O-glycanniques (revue de Brockhausen, 1995)

- synthèse des noyaux (→), exemples d'élongation et de terminaison (·····→)

- R = Ser/Thr , T = transférase

Bien que les lieux où se déroule la biosynthèse des O-glycannes ne soit pas bien définis, celle-ci apparaît comme un processus régulé par la spécificité de substrat des glycosyltransférases. En effet, la spécificité des différentes enzymes oriente la direction prise par la structure glycanique en formation. Ainsi, plusieurs activités glycosyltransférales peuvent être en compétition pour un même O-glycane accepteur. D'autres facteurs participent également à la conduite des processus de O-glycosylation : l'addition de signaux de terminaison sur les chaînes O-glycanniques en cours de formation comme, par exemple, la substitution de la structure par un acide sialique ou par un monosaccharide lié en anomérie α , stoppe définitivement toute évolution du O-glycane.

A la vue de ces données, nous pouvons donc conclure que les structures des O- et des N-glycoprotéines présentes dans un type cellulaire donné dépendent en grande partie des glycosyltransférases exprimées dans cette cellule.

B- Les changements de glycosylation dans les cellules cancéreuses.

Généralement, les changements les plus fréquemment décrits dans les cancers au niveau de la glycosylation sont :

- ◇ l'augmentation de la synthèse de glycannes branchés et sialylés.
- ◇ la terminaison prématurée de la biosynthèse résultant d'une expression de formes incomplètes des O-glycannes principalement.
- ◇ la ré-expression d'antigènes glycosidiques oncofœtaux.

Dans de nombreux cas, la formation de ces structures "aberrantes" est due à l'altération de la régulation d'une ou plusieurs glycosyltransférases clés.

Dans de nombreux systèmes expérimentaux, la relation entre une glycosylation "aberrante" et la biologie du cancer a été étudiée par deux approches principales :

- la première explore la modification de glycosylation par des inhibiteurs de la

biosynthèse ou par traitement à l'aide de glycosidases (Humphries *et al.*, 1986; Kijima-Suda *et al.*, 1986; Dennis *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1990).

- la seconde est basée sur l'étude de sous-populations de cellules cancéreuses sélectionnées pour un phénotype donné ; par exemple, une augmentation ou une diminution du potentiel métastatique, ou une résistance à une lectine donnée (Dennis *et al.*, 1984; 1986; Ishikawa *et al.*, 1989; Irimura *et al.* 1986; Benedetto *et al.*, 1989).

Cependant, il ne faut pas oublier que les inhibiteurs de glycosylation sont souvent cytotoxiques et que leurs effets sont réversibles. De plus, ils ne sont pas spécifiques d'une structure oligosaccharidique particulière. D'un autre côté, les cellules sélectionnées pour un phénotype particulier peuvent diverger de la population cellulaire originelle non seulement au niveau du phénotype mais aussi par de nombreuses autres propriétés. Il faut donc examiner avec précaution une éventuelle relation de causalité entre une glycosylation altérée et le phénotype cancéreux de ces cellules.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux changements structuraux des glycoconjugués observés dans les cancers.

1- Les structures oligosaccharidiques spécifiquement impliquées dans la biologie cancéreuse.

Les changements des structures oligosaccharidiques détaillés ci-après, sont souvent associés aux cancers humains. Leur importance est soulignée par le fait qu'ils sont souvent reliés à un stade précis de la maladie. Leur détection par des lectines ou des anticorps monoclonaux peut aider à obtenir des informations à des fins diagnostiques et/ou pronostiques. Dans tous les cas, ils semblent intervenir directement dans la progression des cancers.

a- les séries "lacto"

Comme le montre la figure 6 (page 17), le Gal peut être lié au GlcNAc par une liaison β 1-3 ou β 1-4 formant ainsi les 2 unités de bases : le type 1 et le type 2 respectivement; ces unités étant trouvées linéairement dans les séries "lacto". La

unité de base de **Type 1** : Gal β 1-3GlcNAc

unité de base de **Type 2** : Gal β 1-4GlcNAc

Antigènes

"**I**" : (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4GlcNAc)_n-R

"**I**" : GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4GlcNAc-R
/
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6

H : Gal β 1-3(4)GlcNAc-R
/
Fuc α 1-2

A : GalNAc α 1-3Gal β 1-3(4)GlcNAc-R
/
Fuc α 1-2

B : Gal α 1-3Gal β 1-3(4)GlcNAc
/
Fuc α 1-2

Lewis^a : Gal β 1-3GlcNAc-R
/
Fuc α 1-4

Lewis^X : Gal β 1-4GlcNAc-R
/
Fuc α 1-3

sialyl-Lewis^a : NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc-R
/
Fuc α 1-4

sialyl-Lewis^X : NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-R
/
Fuc α 1-3

dimère-sialyl-Lewis^X : NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R
/ /
Fuc α 1-3 Fuc α 1-3

Lewis^Y : Gal β 1-4GlcNAc-R
/ /
Fuc α 1-2 Fuc α 1-3

Figure 6 : Exemples de structures de bases et de déterminants antigéniques glycaniques (Dall'Olio, 1996).

répétition de ces deux unités est fréquemment trouvée dans les N- et O-glycannes des glycoprotéines et des glycolipides. Quand il y a extension linéaire des chaînes de type 2 (motif polylactosaminique), ceci conduit à la formation de l'antigène "i". La présence de GlcNAc branché en β 1-6 sur le Gal (conférant un point de branchement) forme l'antigène "I". Les enzymes-clés contrôlant l'élongation (antigène i) ou le branchement (antigène I) des chaînes polylactosaminiques sont respectivement la β 1-3GlcNAc transférase et la β 1-6GlcNAc transférase (Van den Eijden *et al.*, 1988; Piller *et al.*, 1984; Gu *et al.*, 1992, Fukuda *et al.*, 1985). Plusieurs observations indiquent que l'expression des antigènes "I", "i" est régulée pendant le développement embryonnaire. Les érythrocytes de fœtus humain expriment l'antigène "i", tandis qu'après la naissance, la biosynthèse se déplace vers la production d'antigène "I" (Fukuda *et al.*, 1985). L'altération dans l'expression des antigènes "I" et "i" a été notée au niveau des cancers du pancréas et du poumon (Schuessler *et al.*, 1991; Itai *et al.*, 1990).

L'extension des chaînes "lacto" est importante non seulement parce que ces chaînes sont considérées comme des antigènes associés aux cancers, mais aussi parce qu'elles fournissent la structure de base pour des substitutions par des résidus de fucose, (ce qui donne les antigènes A, B, H et Lewis), et par des résidus d'acide sialique. Les séquences polylactosaminiques des O- et des N-glycannes sont branchées préférentiellement en β 1-6 sur un résidu de GlcNAc (Pierce & Arango, 1986; Yousefi *et al.*, 1991; Van den Eijden *et al.*, 1988). L'expression, des chaînes polylactosaminiques semble contrôlée par le degré de branchements en β 1-6.

b- le branchement en β 1-6.

b-1 - dans les N-glycannes.

L'un des plus importants changements de glycosylation associé au cancer est l'augmentation du branchement en β 1-6 sur les N-glycannes. Cette modification implique la présence d'un résidu de GlcNAc branché en β 1-6 au noyau mannosidique (Figure 3, page 13). Une association directe entre l'augmentation du branchement en β 1-6 et le potentiel métastatique est suggérée par de nombreuses études. Ainsi, des mutants de cellules de souris MDAY-D2 sélectionnés pour leur résistance à la L-PHA

(lectine spécifique des N-glycannes contenant des branchements en β 1-6) ont le même potentiel tumorigène que les cellules parentales, mais leur pouvoir métastatique est spectaculairement réduit (Dennis *et al.*, 1987). De plus, l'activité GlcNAc transférase V, enzyme responsable du branchement en β 1-6, est réduite. Il a été suggéré que la présence des branchements en β 1-6 sur les N-glycannes facilite l'invasion à travers la membrane basale (Yagel *et al.* 1989).

Des études cliniques ont révélé une augmentation du niveau de réactivité de la L-PHA dans les sections de tissus issus de cancer humain. Pour les carcinomes de l'oesophage, les cellules L-PHA positives sont réparties de façon prédominante à la surface externe des tumeurs près des tissus adjacents (Takano *et al.*, 1990). Tous les carcinomes du sein et les hyperplasies épithéliales avec atypie, montrent une augmentation de la fixation de la L-PHA comparée aux fibroadénocarcinomes et aux hyperplasies sans atypie. Dans les carcinomes du côlon au stade C de la classification de Duke, les métastases présentes dans les ganglions lymphatiques périphériques expriment plus de sites fixant la L-PHA que les tumeurs au stade A (qui sont confinées au site primaire de croissance) (Fernandes *et al.*, 1991). Ainsi, la corrélation entre l'augmentation du branchement en β 1-6 et l'augmentation du potentiel métastatique trouvée chez la souris (Dennis *et al.*, 1987) semble applicable à l'homme.

La transformation de cellules BHK par l'oncogène src induit une augmentation du branchement en β 1-6 et de l'activité GlcNAc transférase V, résultant de l'augmentation du taux de transcription et donc du nombre d'enzymes actives, plutôt que de l'altération des propriétés cinétiques de l'enzyme par des modifications post-traductionnelles (Palcic *et al.*, 1990; Buckhauslts *et al.*, 1997).

b-2 - Dans les O-glycannes.

Pour les O-glycannes, la présence de GlcNAc branché en β 1-6 (core de type 2, Figure 5, page 14) est aussi associée au potentiel métastatique. L'activité enzymatique responsable de ce branchement : la core 2 β 1-6GlcNAc transférase est augmentée dans des lignées cellulaires tumorales murines (Yousefi *et al.*, 1991) ainsi que dans les myoblastomes humains et dans les cellules issues de leucémie (Brockhausen *et al.*, 1991). Ces O-glycannes contenant des structures de core 2 sont retrouvés

majoritairement liés à la leukosialine, glycoprotéine présente à la surface des lymphocytes T et dans les cellules leucémiques (Saitoh *et al.*, 1991; Fukuda, 1991). A l'inverse, au niveau du côlon humain, l'activité core 2 β 1-6 GlcNAc transférase diminue durant la progression du cancer (Vavasseur *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). Cependant, l'ARNm de cette enzyme est détecté dans les tumeurs coliques et cette expression est corrélée à la profondeur de l'invasion tumorale (Shimodaira *et al.*, 1997).

c- les antigènes de groupe sanguin A, B, H.

Les antigènes A, B, H (Figure 6, page 17) sont portés par les glycoprotéines et les glycolipides des globules rouges, des cellules endothéliales et épithéliales de nombreux tissus, et sont présents dans les sécrétions.

La description détaillée des altérations de ces groupes sanguins associés au cancer a fait l'objet de plusieurs publications (Watkins, 1980; Hakamori, 1989, Stenersen & Debelsteen 1992; Itzkowitz, 1992; Orntoft, 1992).

L'expression aberrante des antigènes A, B, H au niveau des tumeurs s'exprime par :

- une délétion des antigènes normalement présents dans les tissus adultes, accompagnée d'une accumulation des précurseurs saccharidiques,
- une ré-expression d'antigènes fœtaux, normalement absents dans les tissus adultes,
- l'expression d'antigènes "incompatibles" avec le groupe sanguin de l'individu. Par exemple, un individu possédant des érythrocytes exprimant un phénotype antigénique B ou O peut exprimer l'antigène A sur des cellules cancéreuses de côlon.

Cependant, si on peut expliquer les 2 premiers points par une dérégulation de l'expression d'une ou plusieurs des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse de ces antigènes, le troisième point demande plus d'explications. En effet les allèles A et B sont exprimés de façon codominante et l'allèle A, codant la GalNAc transférase, n'est pas présent chez les individus B ou O. La génétique et les bases biochimiques de ces phénomènes restent encore inconnues. Cependant, il ne faut pas oublier que les "A et B transférases" ne diffèrent l'une de l'autre que par la substitution de 4 acides aminés (Yamamoto *et al.*, 1990) et que dans certaines circonstances la B galactosyltransférase peut transférer de la GalNAc (Greenwell *et al.*, 1986). Une recherche de patients atteints de cancer gastrique, de groupe sanguin O, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la "A-transférase", révèle sa présence ainsi que son activité enzymatique

dans 10 % des cas (David *et al.*, 1993).

Les antigènes A, B, H sont exprimés au niveau du côlon de fœtus humain selon le groupe sanguin de l'individu. Après la naissance, l'expression des antigènes A, B, H est restreinte au niveau du côlon proximal. Dans le cas de cancer du côlon, ce gradient proximal-distal est perdu car le côlon distal exprime également ces antigènes (Yuan *et al.*, 1985). L'expression aberrante des antigènes A, B, H a été rapportée dans les cancers du pancréas (Itzkowitz *et al.*, 1987), dans les hépatocarcinomes (Okada *et al.*, 1987), dans les carcinomes de la vessie (Aprikian *et al.*, 1993; Sheinfeld *et al.*, 1992, Orntoft 1990) et dans les carcinomes de l'ovaire (Metoki *et al.*, 1989). Dans les cancers du poumon, la perte des antigènes A, B, H a été positivement corrélée au potentiel métastatique et par conséquent à un "mauvais pronostic" (Matsumoto *et al.*, 1993). Cependant, cette relation n'a pas été confirmée dans une autre étude (Gwin *et al.*, 1994).

Orntoft (1990) a relaté les changements dans l'expression de ces antigènes dans les cancers de la vessie et les a associés au grade de dysplasie et à l'invasion (Tableau I, page 21). Une délétion graduelle des antigènes A, B, H est retrouvée dans les lésions non-invasives, alors que cette délétion est toujours totale dans les tumeurs invasives. La perte des antigènes de groupe sanguin A, B, H semble aussi associé au pronostic tumoral des carcinomes de la tête et du cou (Carey *et al.*, 1993). Ainsi, la perte d'expression des antigènes A, B, H semble être associée à une rechute précoce.

Tableau I : Changements dans l'expression des antigènes de groupe sanguin A, B, H associé à l'augmentation dans le grade de dysplasie et l'invasion dans les cancers de la vessie (Orntoft, 1990).

Carcinome non-invasif

1 - interruption dans la stratification des antigènes.

2 - changements dans la localisation cellulaire des antigènes

3 - délétion graduel dans l'expression des antigènes A, B, H.

Carcinome invasif

4 - toujours une perte total des antigènes A, B, H

5 - expression uniforme des précurseurs des structures A, B, H.

L'un des problèmes inhérent à l'étude des groupes sanguins (A B O), est que leur expression dans un tissu particulier peut varier chez les individus d'un même groupe sanguin (Dabelsteen *et al.*, 1991; Orntoft, 1992; Oriol *et al.*, 1992). Ces variations sont,

en partie, régulées par les gènes sécréteurs (Se/se) qui contrôlent l'expression des antigènes A et B par la présence du précurseur chimique l'antigène H (Orntoft, 1992; Oriol *et al.*, 1992). Les individus non-sécréteurs (se/se) constituent 20 % de la population, et une connaissance approfondie des patients au niveau de leurs groupes sanguins et leurs statuts sécréteurs est nécessaire avant de conclure sur les changements des antigènes de groupes sanguins observés dans les tumeurs (Coon & Weinstein, 1986; Dabelsteen *et al.*, 1991; Feizi, 1985).

d- les antigènes Lewis.

Dans certaines tumeurs, la synthèse incomplète des sucres de la surface cellulaire conduit à une augmentation de l'expression des antigènes Le^X et sialyl-Lewis^X et de leurs isomères Le^a et sialyl-Lewis^a (Figure 6, page 17) (Coon & Weinstein, 1986; Singhal, 1991; Hakamori, 1989; Muramatsu, 1993; Ishikawa *et al.*, 1997; Renkonen *et al.*, 1997). Comme la synthèse de ces antigènes est indépendante du groupe sanguin et du statut sécréteur des patients, ces antigènes semblent plus indiqués pour les études cliniques.

Les antigènes Lewis sont générés par la mono ou di-fucosylation des chaînes de type 1 ou 2. La terminaison des chaînes ainsi formées par l'acide sialique conduit aux antigènes sialyl-Lewis.

L'expression aberrante des antigènes de type Lewis a été rapportée dans nombreux cancers tels que les cancers du poumon (Jordon *et al.*, 1989), du côlon (Hanish *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1995), de l'estomac (Sakamoto *et al.*, 1989, Ura *et al.*, 1997), du rein (Cordon-cardo *et al.*, 1989) du sein (Ura *et al.*, 1992; Narita *et al.*, 1993; Renkonen *et al.*, 1997) et dans les mélanomes (Ravindranath *et al.*, 1997). Ces antigènes se retrouvent couramment dans la circulation sanguine (Singhal *et al.*, 1990). Les antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a trouvés dans les sérums sont utilisés comme marqueur pronostique. Plusieurs études cliniques statistiques ont été réalisées sur leur distribution et leur fréquence dans différents tissus cancéreux humains (Kannagi *et al.*, 1986, 1988; Itai *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 1988, Zenita *et al.*, 1988; Renkonen *et al.*, 1997). L'antigène sialyl-Lewis^X serait exprimé préférentiellement dans les cancers du poumon, de l'ovaire, du foie, du rein et du sein, tandis que l'antigène

sialyl-Lewis^a serait plutôt exprimé (plus que l'antigène sialyl-Lewis^X) dans les cancers du côlon, du pancréas et de la vésicule biliaire.

Des études sur les cancers colorectaux ont montré que l'expression de ces deux antigènes est plus importante dans les lésions métastatiques que dans les tumeurs primaires (Hasegawa *et al.*, 1993). De plus, deux études cliniques, chacune impliquant plus de 100 patients exprimant le sialyl-Lewis^X au niveau de carcinomes colorectaux, ont corrélé cette expression à une survie de 5 ans (Nagkagoe *et al.*, 1993; Nakamori *et al.*, 1993). Même si l'expression de sialyl-Lewis^X a été détectée par immunohistochimie à l'aide de 2 anticorps monoclonaux légèrement différents, les résultats sont identiques. Dans les deux études, l'expression de sialyl-Lewis^X semble être un facteur important pour prévoir la survie des malades (Figure 7, page 24) (Nagkagoe *et al.*, 1993; Nakamori *et al.*, 1993) et le stade tumoral. Pour les patients au stade II et III de la maladie (présence ou absence de métastases dans les nodules lymphatiques), la survie est plus importante dans les groupes sialyl-Lewis^X négatifs par rapport aux groupes sialyl-Lewis^X positifs. De plus, la récurrence de ces cancers colorectaux semble associée à l'expression de cet antigène (Nakamori *et al.*, 1997a). Une étude portant sur 300 patientes atteintes de cancer du sein, montre une survie de 2 ans supérieure pour le groupe dont les tumeurs sont sialyl-Lewis^X négatives comparé au groupe où les tumeurs sont sialyl-Lewis^X positives (Narita *et al.*, 1993). Pour le cancer de la prostate, l'augmentation de l'expression de sialyl-Lewis^X au niveau de tumeur invasive a été significativement associée à un "mauvais pronostic" (Jorgensen *et al.*, 1995).

L'antigène sialyl-Lewis^a, détecté par l'anticorps monoclonal N19-9 (CA19-9), est un marqueur usuel du cancer du pancréas (Magnani *et al.*, 1982 a). De plus, le taux de CA19-9 détecté dans le sérum est corrélé à l'expression de sialyl-Lewis^a dans les tissus cancéreux pancréatiques (Hamanaka *et al.*, 1996). Des études, décrivant les pronostics des patients atteints du cancer du côlon, montrent que les patients dont les tissus cancéreux expriment fortement ou modérément le sialyl-Lewis^a, ont une survie postopératoire très réduite par rapport aux patients dont les cellules cancéreuses expriment peu ou pas le sialyl-Lewis^a (Kiryama *et al.*, 1991, Shimono *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés par des études plus détaillées de Shimono *et al.* (1994) et de Nakayama *et al.* (1995a) qui rapportent une corrélation similaire observée chez deux séries de patients atteints de cancer du côlon. Dans les mélanomes, l'expression de

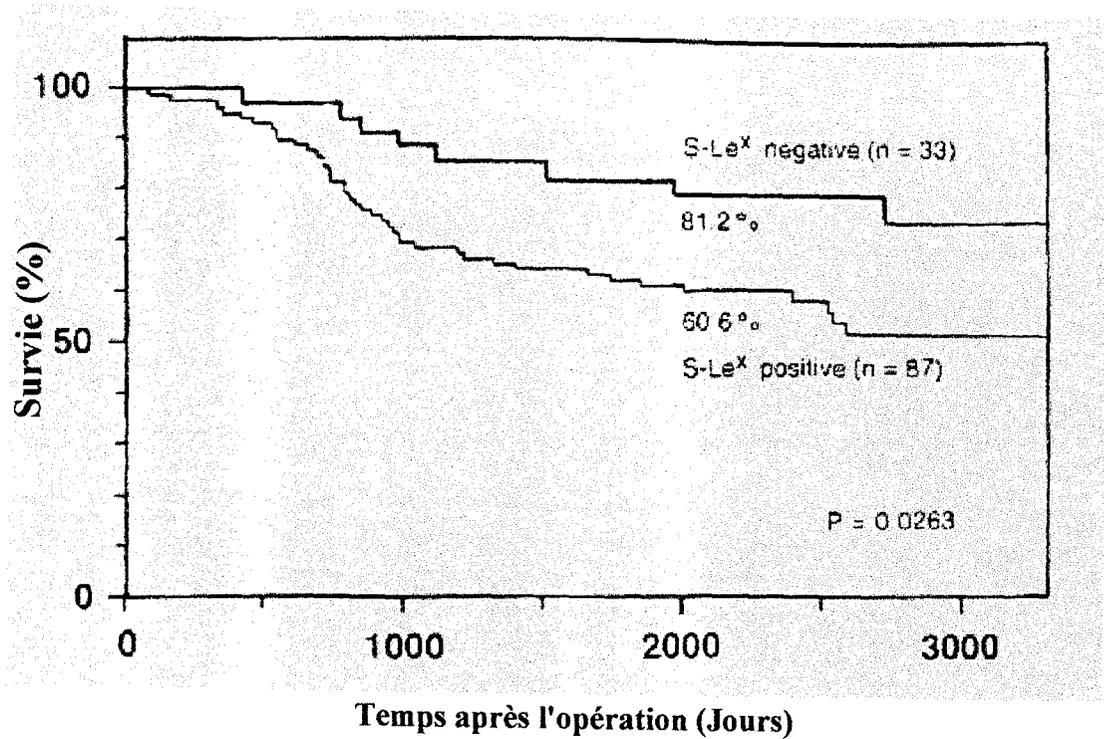


Figure 7 : Survie de patients atteints de cancers colorectaux en relation avec l'expression tissulaire de l'antigène Sialyl Lewis^X(S-LeX) (Nakagoe *et al.*, 1993).

sialyl-Lewis^a est corrélée à la progression tumorale (Kageshita *et al.*, 1995). Dans les cancers gastriques, elle est également utilisée comme facteur pronostique (Nakamori *et al.*, 1997b). Une étude récente montre que la concentration en CA19-9 dans les urines de patients atteints de cancer de la vessie est plus importante par rapport aux patients sains (Verstergaard *et al.*, 1998).

Dans le cancer du poumon, l'expression de l'antigène sialyl-Lewis^Y est corrélée à un pronostic de survie très court (Ogawa *et al.*, 1994). Ainsi, la survie postopératoire est plus courte pour les patients exprimant les antigènes sialyl-Lewis^a, Lewis^X et Lewis^Y (Ogawa *et al.*, 1995).

Le dimère sialyl-Lewis^X, un variant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal FH6, est généré par difucosylation d'une chaîne de type 2 (Figure 6, page 17) et semble associé à la progression des cancers. L'expression de cet antigène est restreinte aux tissus peu différenciés dans les tumeurs primaires du côlon (Nakasaki *et al.*, 1989) et dans les métastases avancées du foie (Hoff *et al.*, 1989). Des cellules du cancer du côlon sélectionnées pour leur forte ou faible expression du dimère sialyl-Lewis^X, montrent respectivement une forte et faible capacité à envahir des membranes reconstituées *in vitro* (Matsushita *et al.*, 1991). Une corrélation entre l'expression du dimère-sialyl-Lewis^X et la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques a été décrite pour les cancers de la vessie (Matsusako *et al.*, 1991). L'expression de cet antigène est également associée dans les cancers gastriques à "un mauvais diagnostic" (Amado *et al.*, 1998).

e- les antigènes T, Tn et sialyl-Tn.

Si les déterminants Lewis sont portés aussi bien par les N- et les O-glycannes, les antigènes T, Tn et sialyl-Tn (dont les structures sont indiquées dans la Figure 5, page 14), représentent uniquement des formes tronquées des O-glycannes. Ceux-ci sont détectés à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de lectines (*Arachis Hypogea*, PNA pour l'antigène T; *Vicia villosa*, VVA ou *Helix pomatia*, HPA pour l'antigène Tn). Dans les tissus normaux ces antigènes sont souvent retrouvés de "manière cryptique",

- qu'ils soient masqués par la présence de résidus monosaccharidiques, constitués majoritairement d'acide sialique,

- ou qu'ils soient inclus dans des structures glycaniques plus élaborées.

e-1- les antigènes T et Tn.

Dans les tissus normaux des voies urinaires, l'antigène T est substitué par de l'acide sialique (antigène sialyl-T) et n'est pas directement détectable (Orntoft *et al.*, 1990; Blasco *et al.*, 1988; Coon *et al.*, 1982; Limas & Lange, 1986). En fait, cette détection n'est possible que si ces tissus sont traités par une sialidase. Des métastases dans les nodules lymphatiques pelviens sont détectées chez des patients atteints de carcinomes primaires de la vessie exprimant l'antigène T (Limas & Lange, 1986). Pour des tumeurs de la vessie, l'expression d'antigène T est augmentée et est corrélée, pour des tumeurs non invasive, à une invasion ultérieure (Summers *et al.*, 1983). D'autres études proposent l'utilisation de l'expression des antigènes T et Tn pour l'estimation du degré de malignité de carcinome de la vessie (Nishiyama *et al.*, 1987). L'expression de l'antigène T a été, également, associée au phénotype invasif de carcinome gastrique. Dans une étude de 87 tumeurs, l'antigène T a été repéré dans 18 cas, tous étaient des carcinomes avancés avec métastases. Cependant, les auteurs font remarquer qu'un pourcentage important des tumeurs avancées n'exprime pas l'antigène T et la valeur prédictive de l'expression (ou l'absence d'expression) de l'antigène T reste à déterminer (David *et al.*, 1992).

L'expression de l'épitope Tn, détectée grâce à la lectine HPA, est un marqueur pronostique de l'agressivité des cancers du sein (Fenlon *et al.*, 1987; Leathem & Brooks, 1987; Springer, 1989). Une étude sur l'expression de l'antigène Tn dans les cellules squameuses du col de l'utérus montre que son degré d'expression est plus élevé dans les métastases que dans les lésions primaires (Hamada *et al.*, 1993). Dans une étude suivie sur 5 ans, il a été démontré que l'antigène Tn est un indicateur du potentiel métastatique du cancer du col de l'utérus. (Hirao *et al.*, 1993).

Les tumeurs coliques sont probablement le modèle le plus étudié au niveau de l'expression des antigènes T et Tn. En principe, aucun de ces antigènes n'est exprimé dans les épithéliums adultes normaux mais ils sont révélés dans les cancers du côlon : Tn, 81%; T, 71%; sialyl-Tn, 89% (Itzkowitz *et al.*, 1989; 1992). Les antigènes T et Tn sont faiblement retrouvés au niveau des polypes hyperplasiques alors que les antigènes T et Tn et sialyl-Tn sont exprimés dans les polypes adénomateux et dans les carcinomes

(Itzkowitz, 1992; Nakasaki *et al.*, 1989; Itzkowitz *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 1986; Orntof *et al.*, 1990).

La base biochimique de l'expression aberrante des antigènes T, Tn et sialyl-Tn dans les cancers du côlon est complexe et mal connue. Par exemple, l'activité de l' α 2,6-sialyltransférase (ST6GalNAc I; voir chapitre II- Sialyltransférases, B- 1, Tableau IV page 42 et 43) synthétisant l'antigène sialyl-Tn semble diminuée plutôt qu'augmentée dans les tissus tumoraux (Vavasseur *et al.*, 1995). La réduction de l'activité core 3 GlcNAc transférase, qui normalement entre en compétition avec la core 1 galactosyltransférase, a été rapportée dans les tissus coliques cancéreux (Yang *et al.*, 1994) et dans les lignées cellulaires (Vavasseur *et al.*, 1994) contribuant ainsi à l'augmentation de l'expression de l'antigène T.

e-2- l'antigène sialyl-Tn.

De ces trois antigènes associés aux mucines, l'antigène sialyl-Tn semble le marqueur tumoral le plus fiable. Dans les cancers colorectaux, l'antigène sialyl-Tn est exprimé dans 87 % des cas, indépendamment de l'âge, du genre, de la localisation, du stade (classification selon Duke), du degré de différenciation et de ploïdie. En général, les tumeurs négatives pour l'antigène sialyl-Tn, quelque soit leur stade, ont un pronostic meilleur que les tumeurs positives (Figure 8, page 28). 118 patients atteints de tumeurs coliques, classifiées B ou C selon Duke, ont respectivement une survie de 82 et 60 %, dans ce groupe 13 patients, ayant des tumeurs sialyl-Tn négatives, ont survécu au delà de 6 ans. Ainsi, la survie à 5 ans est de 100 % pour les patients sialyl-Tn négatif, alors qu'elle n'est que de 73 % pour les patients sialyl-Tn positifs (Itzkowitz *et al.*, 1990). Cependant, l'antigène sialyl-Tn est préférentiellement exprimé par les lésions dysplasiques plutôt que dans les polypes hyperplasiques (Itzkowitz, 1992). Une étude récente suggère que les muqueuses coliques normales expriment des épitopes sialyl-Tn monomériques tandis que lors de la transformation maligne, il y a apparition de regroupements d'épitopes sialyl-Tn (Ogata *et al.*, 1998). L'expression de sialyl-Tn associée aux tumeurs coliques a été proposée comme la variation la plus importante pour prédire l'évolution de la maladie ainsi que la survie à celle-ci (Itzkowitz *et al.*, 1990).

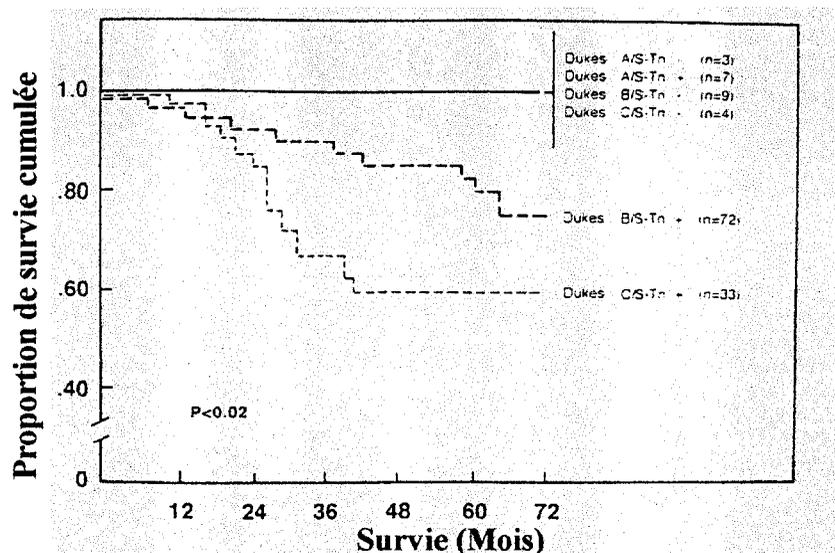


Figure 8 : Survie des patients atteints de cancers colorectaux en fonction du stade (classification de Duke) et de l'expression de l'antigène sialyl-Tn (S-Tn).

Les patients aux stades B et C ont une survie plus courte que les patients au stade A. En général, les patients S-Tn négatifs ont une survie plus importante que les patients S-Tn positifs (Itkowitz *et al.*, 1990).

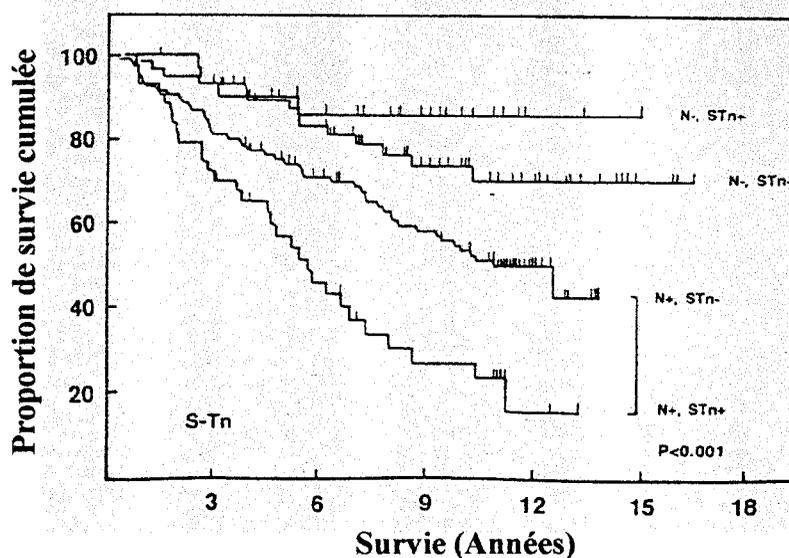


Figure 9 : Survie de patientes atteintes de cancers du sein en relation avec le statut nodal et l'expression de sialyl-Tn (S-Tn).

Dans le groupe ayant des nodules (N+), la survie est plus importante pour les tumeurs S-Tn négatives par rapport aux tumeurs S-Tn positives (Miles *et al.*, 1994).

Des expériences récentes ont montré que la réactivité au niveau des sections cancéreuses de côlon de l'anticorps monoclonal TKH2 spécifique du sialyl-Tn, est augmentée lors de traitement permettant le relargage des groupements O-acétyl des acides sialiques par rapport au niveau habituel caractéristique des cancers (Ogata *et al.*, 1995; Jass *et al.*, 1994). Comme la O-acétylation est une modification fréquente de l'acide sialique, qui existe plus fréquemment dans les côlons normaux par rapport aux côlons cancéreux, il est possible que la réactivité différente observée avec l'anticorps TKH2 reflète la perte de substituants O-acétylés plutôt qu'une accumulation de ce disaccharide. Ce mécanisme ne semble pas être opérant dans les cancers de l'estomac et du pancréas (Ogata *et al.*, 1995).

L'expression de l'antigène sialyl-Tn est un marqueur de malignité et est sert à poser le diagnostic de cancers (Kjeldsen *et al.*, 1988), incluant ceux du pancréas (Schuessler *et al.*, 1991; Itzkowitz *et al.*, 1991; Osako *et al.*, 1993; Siddiki *et al.*, 1993), de l'estomac, de l'oesophage (Siddiki *et al.*, 1993, Ikeda *et al.*, 1993; Werther *et al.*, 1994), de l'ovaire (Inoue *et al.*, 1991a; Ghazizadeh *et al.*, 1997), du sein (Cho *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 1996; Kinney *et al.*, 1997) et de l'endomètre (Inoue *et al.*, 1991b).

L'étude portant sur les carcinomes gastriques montre une expression de sialyl-Tn dans 20% des tumeurs, indépendamment de leur type histologique (Werther *et al.*, 1994; David *et al.*, 1992). La mort ou la récurrence de la maladie se produit pour 17 des 21 patients qui ont des tumeurs sialyl-Tn positives, comparée à seulement 2 des 10 patients qui ont des tumeurs sialyl-Tn négatives. Ces études mettent en avant le fait que l'expression de sialyl-Tn n'a pu être corrélée à des caractéristiques histopathologiques et ainsi servir de marqueur pour le pronostic tumoral (Ikeda *et al.*, 1993). Dans les carcinomes gastriques Borrmann de type IV, l'expression de sialyl-Tn est corrélée aux nodules lymphatiques, à la dissémination péritoneale et à un niveau de prolifération supérieure (Kakeji *et al.*, 1995). La relation entre l'expression de l'antigène sialyl-Tn et le pronostic pour 86 carcinomes de l'oesophage a été étudiée par Ikeda *et al.* (1993). L'antigène sialyl-Tn est exprimé dans au moins 50 % des lésions; la survie à 3 ans pour les patients ayant une tumeur sialyl-Tn positive est de 29%, alors qu'elle est de 42% pour les patients ayant une tumeur sialyl-Tn négative. Même si ces résultats montrent une tendance équivalente à celle observée pour les patients atteints de carcinomes gastriques, ces résultats ne sont cependant pas statistiquement significatifs. D'autres auteurs montrent que l'antigène sialyl-Tn exprimé dans l'oesophage et les muqueuses

orales peut être détecté seulement dans les muqueuses apparemment normales adjacentes au carcinome et dans les lésions hyperplasiques non malignes, suggérant une relation entre une augmentation de la prolifération et l'expression de ces structures (Fukutomi *et al.*, 1991). L'expression de sialyl-Tn a été observée dans 50% des carcinomes de cancers du sein. Les patientes ayant des tumeurs sialyl-Tn positives ont une survie plus courte (Fukutomi *et al.*, 1991). Dans des sous groupes définis par leur statut nodal, l'expression de sialyl-Tn est significativement associée à un mauvais pronostic dans le groupe formant des nodules (Figure 9, page 28) (Miles *et al.*, 1994).

La possibilité que les mucines portant l'épitope sialyl-Tn jouent un rôle important dans la progression des cancers est appuyée par le fait que la lyse cellulaire médiée par les cellules NK ("Natural Killer" sur sa cible K562) est inhibée par la mucine sous-maxillaire bovine (OSM) qui porte l'antigène Tn (Ogata *et al.*, 1992). L'association entre les antigènes T, Tn et la transformation néoplasique a incité à utiliser ces antigènes en immunothérapie. Des souris immunisées avec de l'OSM désialylée donc portant l'antigène Tn, sont protégées quand on les met en présence de cellules hautement invasives exprimant l'antigène Tn (Singhal *et al.*, 1991). Des études réalisées sur l'Homme indiquent que le traitement par de l'OSM désialylée ou de sialyl-Tn chimiquement associé à un adjuvant, peut induire une réponse humorale contre ces antigènes (O'Boyle *et al.*, 1992; MacLean *et al.*, 1993). Cependant, la positivité du sialyl-Tn est reliée directement ou indirectement à la résistance à la chimiothérapie chez les patientes atteintes du cancer du sein (Miles *et al.*, 1994).

f- l'acide sialique en α 2-6 au galactose.

Dans à peu près 90% des cancers du côlon, l'activité de l'enzyme catalysant l'addition d'acide sialique en α 2,6 sur le galactose porté par les N-glycannes (ST6Gal I) est augmentée (voir Chapitre II - C Les sialyltransférases et le cancer, page 63). Ceci conduit à l'augmentation de la fixation de la lectine SNA (*Sambucus Nigra*), spécifique des acides sialiques liés en α 2-6, au niveau des sections histologiques dans la majorité des carcinomes du côlon de grade I et II (Sata *et al.*, 1991; Dall'Olio & Tréré, 1993). Les nombreux cas de carcinome de grade III examinés se sont révélés peu ou non réactifs (Dall'Olio & Tréré, 1993). Au niveau de lésions bénignes, une réactivité

importante avec la SNA est exprimée seulement au niveau de polypes avec de sévères dysplasies (Sata *et al.*, 1991; Dall'Olio & Tréré, 1993). Un profil d'une grande similarité a été observé dans des études histochimiques utilisant la lectine de *Trichosanthes japonica*, spécifique de l'acide sialique $\alpha 2,6$ lié sur le motif Gal $\beta 1-4$ GlcNAc (Yamashita *et al.*, 1995). Une augmentation de sialylation en $\alpha 2,6$ sur le galactose a été également associée aux glycolipides dans les cancers du côlon (Hakamori *et al.*, 1983; Nilsson *et al.*, 1985). (La suite sera traitée au chapitre II- C Les sialyltransférases et le cancer, page 63).

g- les Polysialiques Acides : PSA.

Ce sont des polymères formés par des acides sialiques liés en $\alpha 2-8$. Chez les mammifères, les PSA se trouvent sur des N-glycannes des N-CAM (neural cell adhesion molecule) et sur la sous-unité α du canal à sodium dans le cerveau. Leur expression est régulée pendant le développement : le nombre d'acides sialiques sur les PSA des N-CAM est à peu près de 10 dans le cerveau embryonnaire de Rat et de 2 à 3 chez l'adulte (Finne & Makela, 1985). Cette maturation d'une forme lourde vers une forme légère de PSA porté par les N-CAM joue un rôle important dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Rutishauser *et al.*, 1988, Acheson *et al.*, 1991). Les formes lourdes des PSA sont exprimées dans plusieurs tissus foetaux humains et ré-exprimées dans les néoplasmes correspondants. Ainsi, leur présence a été notée dans les tumeurs malignes d'origine neuroectodermale tels les méduloblastomes et les neuroblastomes (Figarella-Branger *et al.*, 1990), ainsi que dans les lignées cellulaires issues de neuroblastomes (Moolenaar *et al.*, 1990; Livingston *et al.*, 1988). L'expression de PSA "lourds" est corrélée à une diminution de l'adhérence cellule-cellule, ce qui augmente significativement la capacité métastatique chez les souris SCID (Scheidegger *et al.*, 1994). La présence de PSA de type lourd dans les mésodermes dérivant des tumeurs de Wilms (Roth *et al.*, 1988) indique que l'expression de ces structures n'est pas restreinte aux tissus d'origine neuroectodermale. Les tumeurs de Wilms sont des tumeurs primaires rénales apparaissant pendant l'enfance et caractérisées par la présence d'éléments structuraux qui sont trouvés durant le développement embryonnaire du rein chez l'homme. Les PSA des N-CAM semblent jouer un rôle lors de la migration et de

l'adhésion des cellules tumorales à certains tissus. Les cellules NK (Natural Killer) dérivant de lymphomes expriment des N-CAM polysialylés, et leur caractéristique métastatique implique des tissus inusuels tel que le système nerveux central, le pharynx, le tractus gastro-intestinal, les muscles et le foie (Kern *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1992).

2- Comment les structures oligosaccharidiques sialylées sont - elles impliquées dans la biologie cancéreuse ?

Les nombreux exemples précédemment cités indiquent qu'une glycosylation "aberrante" joue un rôle dans la biologie du cancer. Ces variations de glycosylation des structures oligosaccharidiques peuvent être assimilées à des marqueurs pronostiques. Les changements les plus fréquemment rencontrés sont résumés dans le tableau II (page 33).

Comment cette glycosylation altérée et plus particulièrement les variations de sialylation interviennent-elles dans la biologie des cancers ?

La localisation à la surface cellulaire des sialoglycoconjugués permet de les considérer comme des molécules jouant un rôle dans l'adhésion intercellulaire, entre les cellules tumorales elles-mêmes ou, entre les cellules tumorales et les cellules normales des endothéliums, rencontrés durant l'invasion et la formation de métastases. La plupart de ces interactions font intervenir des lectines qui pourraient ainsi potentialiser la reconnaissance des cellules cancéreuses ayant une glycosylation "altérée".

Le chapitre suivant rassemble les données concernant le rôle probable des principales lectines membranaires dans la biologie cancéreuse.

a- la E-sélectine.

La signification d'une augmentation de l'expression de sialyl-Lewis^X sur certains types de tumeurs a pu être mis en rapport avec la présence de récepteurs du sialyl-Lewis^X sur les endothéliums vasculaires (Sawada *et al.*, 1993; Waltz *et al.*, 1990; Lowe *et al.*, 1990; Bergh *et al.*, 1991; Kannagi, 1997). Les structures sialyl-Lewis^X et sialyl-

Tableau II : Principales altération de glycosylation observées dans les cancers. (Kim & Varki, 1997)

Changements structuraux	Polypeptides porteurs	Base biosynthétique des changements structuraux	Conséquences structurales	Profil potentiel de lectines endogènes	Pronostique et corrélations cliniques
Augmentation du branchement en β 1-6 (N-liés)	Nombreux, incluant LAMPs	Augmentation de l'expression transcriptionnelle ainsi que de l'activité GlcNAc transférase V	Augmentation de la taille, du branchement, des polylactosamines et des structures Lewis ^X	Galectines Selectines	Corré à au grade, à l'invasion et aux métastases
Augmentation des antigènes Lewis ^X et Lewis ^a	Nombreux, incluant les mucines	Augmentation/altération de l'expression de l'expression des enzymes : fucosyltransférases et/ou des sialyltransférases	Augmentation de sialyl Lewis ^X et Lewis ^a	Sélectines	Corré à un "mauvais" pronostic
Perte des structures A/B et/ou H/Lewis ^Y	Nombreux, incluant les mucines	Diminution/altération de l'expression des enzymes A/a ou Fucosyltransférases	Perte des antigènes A ou B. Accumulation des antigènes H et Lewis ^Y	Inconnu.	Cette perte est corré à un "mauvais" pronostic
Augmentation générale de la sialylation	Nombreux	Inconnu dans beaucoup de cas	Augmentation de la charge négative à la surface cellulaire. Masque d'autres molécules ?	Selectines Protéine H CD22, CD33, Sialoadhésine	Corré à au grade, à l'invasion et aux métastases
Augmentation de la sialylation en α 2-6	Inconnu	augmentation de l'expression de ST6Gal I	Augmentation sur Gal β 1-4GlcNAc. Diminution d'acides sialiques liés en α 2-3	Protéine H CD22	inconnu
Augmentation de l'expression de sialyl-Tn	Mucines	Perte de O-acétylation ? Autres ? Augmentation de ST6GalNAc I ?	Les chaînes O-liées sont tronquées ?	Protéine H CD22	Corré à un "mauvais pronostic"
Augmentation de l'antigène Tn	Mucines	Altération des activités sialyltransférasiques ? Altération des fonctions golgiennes ?	Perte de la charge négative. Exposition de polypeptides des mucines	Récepteur Gal Galéctines.	Corré à un "mauvais pronostic"
Augmentation de l'antigène T	Mucines	Diminution des activités sialyltransférasiques ? Altération des fonctions golgiennes ?	Perte de la charge négative. Exposition de polypeptides des mucines	Récepteur Gal Galéctines.	Inconnu
Perte de sulfatation des oligosaccharides	Mucines	Inconnu	Permet l'augmentation de la sialylation ?	E-sélectine Perte de ligands des sélectine E et P	Corré à au grade, à l'invasion et aux métastases
Perte de O-acétylation	Mucines	Inconnu	Augmente le taux de chaînes contenant des acides sialiques pouvant être reconnus	Protéine H CD22, CD33, Sialoadhésine	Corré à au grade et à l'invasion

Lewis^a sont reconnues spécifiquement par la E-sélectine. Les sélectines sont des molécules transmembranaires contenant un domaine terminal, permettant la fixation des sucres (Springer & Lasky, 1991). Quand les cellules endothéliales sont traitées par IL-1 ou TNF α , elles expriment la E-sélectine. Ainsi, des médiateurs solubles relargués par les cellules de l'inflammation ou les cellules tumorales peuvent induire l'expression de E-sélectine sur les cellules endothéliales. La E-sélectine a été identifiée comme une molécule d'adhésion inductible à la surface cellulaire des neutrophiles et on pense qu'elle joue un rôle-clé dans l'extravasation de ces cellules aux sites d'inflammation aiguë (Springer & Lasky, 1991). On associe la métastase tumorale à un phénomène similaire à celui permettant d'amener les leucocytes sur les lieux de l'inflammation. Les cellules tumorales et les leucocytes circulent dans le sang et sont capables du phénomène d'extravasation et d'atteindre ainsi de nouveaux tissus utilisant les mêmes molécules d'adhésion (Brandley *et al.*, 1990; Varki, 1994).

La présence de ligand calcium-dépendant de la E-sélectine, sur les cellules cancéreuses a été directement démontrée en utilisant plusieurs tissus et lignées cellulaires, grâce à des expériences de compétition entre des oligosaccharides et des anticorps anti-E-sélectine (Takada *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1995; Majuri *et al.*, 1995, Allen *et al.*, 1996, Daneker *et al.*, 1996). Plusieurs études indiquent que les cellules tumorales, exprimant le sialyl-Lewis^X et son isomère de position le sialyl-Lewis^a, adhèrent à des cellules endothéliales cultivées et activées par l'interleukine (Takada *et al.*, 1993; Dejana *et al.*, 1991; Iwai *et al.*, 1993; Magnani, 1991). Takada *et al.* (1993) ont observé que l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium est corrélée au degré d'expression de sialyl-Lewis^X et/ou de sialyl-Lewis^a. Ces auteurs ont également montré que l'adhésion des cellules tumorales peut être inhibée par addition préalable à celle des cellules cancéreuses, de liposomes contenant des motifs sialyl-Lewis^X. L'inhibition de l'adhésion de cellules tumorales aux cellules endothéliales activées a été également obtenue en bloquant la glycosylation des protéines de la surface cellulaire (Kojima *et al.*, 1992). Rice et Bevilacqua (1989) suggèrent que les cellules tumorales produisent des cytokines qui induisent l'expression de E-sélectine et ainsi facilitent l'adhésion des cellules malignes arrêtées près des vaisseaux sanguins. Une surexpression de la E-sélectine dans le foie de souris transgénique induit une ré-orientation des métastases du carcinome qui normalement colonisent le poumon (Biancone *et al.*, 1996). Les

antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a sont relargués des cellules tumorales dans le sang. Ils sont présents à un niveau important dans le sang de nombreux patients atteints de cancer. La présence d'antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a dans le sérum peut théoriquement modifier l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium en bloquant le site récepteur de la E-sélectine. Sawada *et al.* (1994) montrent que l'adhésion de lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique humain qui expriment un niveau élevé de sialyl-Lewis^X et de sialyl-Lewis^a, peut être inhibée par le sérum de patients atteints de cancer du pancréas mais non par le sérum d'individus normaux. De plus, l'importance de cette inhibition a été mise en relation avec la teneur en antigène sialyl-Lewis^X. Ces résultats indiquent que le niveau élevé d'antigène sialyl-Lewis^X dans le sang peut réduire l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales par un mécanisme faisant intervenir la E-sélectine. L'administration de liposomes contenant des oligosaccharides portant les antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a a été suggérée en thérapie cancéreuse (Phillips *et al.*, 1990). Un traitement anticancéreux qui bloquerait l'expression de sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a à la surface des cellules cibles, peut être également envisagé (Fukuda, 1994; Hakomori, 1992).

b- la P-sélectine.

Les antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a sont également des ligands potentiels de la P-sélectine. Comme la P-sélectine est exprimée sur les endothéliums activés, elle peut agir également comme un récepteur pour l'extravasation des cellules cancéreuses en conjonction avec la E-sélectine. Les cellules cancéreuses peuvent également adhérer aux plaquettes activées qui expriment la P-sélectine (Mannori *et al.*, 1995). Comme les lymphocytes recouverts de plaquettes peuvent rouler sur l'endothélium (Diacovo *et al.*, 1996), cette interaction peut aussi en théorie faciliter l'extravasation des cellules tumorales. D'un point de vue mécanique, les cellules cancéreuses entrant dans le courant sanguin peuvent former des complexes thrombo-emboliques avec les plaquettes et les leucocytes. Ces complexes facilitent le transport des cellules cancéreuses aux sites ectopiques et aident les cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire (Honn *et al.*, 1992 a et b; Gasic, 1984; Karpatkins & Pearlstein, 1981). Cependant, il n'est pas clairement établi que cette interaction soit

médiée par la P-sélectine.

c- la L-sélectine.

La présence de ligands de la L-sélectine devrait être théoriquement un désavantage pour la survie des cellules de carcinome, car cela peut attirer l'attention des leucocytes participant à la défense immunitaire. Cependant, la perte d'expression de ligand de la L-sélectine au niveau vasculaire a été inversement corrélée à l'infiltration lymphatique dans les tumeurs évoluées (Onrust *et al.*, 1996). Ainsi, un scénario avantageux peut être envisagé si l'interaction cellules tumorales-leucocytes augmente la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine. Dans des embolies tumorales, des leucocytes ont été retrouvés associés à des cellules tumorales, pouvant ainsi protéger les cellules issues de carcinome des autres composants du système immunitaire.

d- la protéine H.

Comme nous l'avons vu précédemment une surexpression d'acide sialique est souvent associée à la progression tumorale (Yogeeswaran & Tao, 1980). De ce point de vue, on peut s'intéresser au Facteur H, qui est une lectine fixant l'acide sialique et qui bloque l'activation de la voie "alterne" du complément sur des cellules normales, en reconnaissant la chaîne exocyclique non substituée de l'acide sialique (Michalek *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 1996). Donc, un haut niveau de sialylation des cellules tumorales circulantes peut potentiellement conférer le même effet biologique protecteur.

e- la lectine de type I fixant l'acide sialique.

Récemment, des lectines endogènes fixant l'acide sialique, différentes des autres lectines et de la protéine H, ont été identifiées. Les lectines de type I sont des membres de la superfamille des immunoglobulines et incluent plusieurs membres qui peuvent spécifiquement reconnaître et différencier les liaisons $\alpha 2-6$ et $\alpha 2-3$ des acides sialiques (Magnani *et al.*, 1982b, Crocker & Feizi, 1996, Varki, 1997a). Le CD22 (qui est strictement restreint aux cellules B-immatures) est spécifique des liaisons $\alpha 2-6$, tandis

que la sialoadhésine et le CD33 (qui sont spécifiquement exprimés sur les macrophages) fixent les acides sialiques liés en α 2-3 (Powell & Varki, 1995). De plus, la O-acétylation sur le carbone 9 de l'acide sialique, abroge la reconnaissance par ces lectines (Varki, 1997b). Comme l'expression d'acide sialique en α 2-6 et en α 2-3 existe à la surface des cellules tumorales, on peut émettre l'hypothèse que les lectines de type I retrouvées au niveau vasculaire reconnaissent certains des glycoconjugués associés aux cancers. Cela peut être d'un grand intérêt dans la modulation de la réponse immune humorale (via le CD22) ou la reconnaissance par le macrophage (via le CD33 ou la sialoadhésine). Cependant, cette théorie n'a pas encore fait le sujet d'expérimentation.

C- Conclusion.

Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, une glycosylation "aberrante" existe au niveau des cellules tumorales. Ces changements semblent être impliqués dans la cascade des phénomènes biologiques aboutissant à la formation des métastases. Cette glycosylation "aberrante" peut être utilisée en vue d'un pronostic et/ou d'un diagnostic de la maladie. Un des plus importants changements au niveau de la glycosylation est une surexpression d'acide sialique, ainsi que l'apparition des antigènes sialyl-Lewis^X, sialyl-Lewis^a, et sialyl-Tn. Ceux-ci sont utilisés comme marqueurs pronostiques et/ou diagnostiques de certains cancers. Les antigènes sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a interviennent vraisemblablement dans les phénomènes métastatiques en permettant l'extravasation, et donc la formation de métastases par la reconnaissance de ces antigènes glycaniques avec des lectines présentes sur les endothéliums, essentiellement les sélectines.

Ces altérations de glycosylation seraient majoritairement dues à des altérations dans l'expression des glycosyltransférases, et dans le cas de la sialylation, des Sialyltransférases. Celle-ci étant en grande partie régulée au niveau transcriptionnel, il apparaît indispensable d'obtenir des informations sur le contrôle de cette expression dans les tissus cancéreux.

II- LES SIALYLTRANSFERASES.

A- Les acides sialiques.

Les acides sialiques constituent une famille de monosaccharides acides qui dérivent tous de l'acide neuraminique (acide 5-amino-3,5-didésoxy-D-glycero-D-galactononulosique). Au sein de cette famille, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc). Les structures sialylées (Tableau III, page 39) se retrouvent : (i) au niveau des glycannes des N-glycosylprotéines de type N-acétyllactosaminique ou de type hybride, dans ce cas, les résidus d'acide sialique se trouvent en position terminale non réductrice des "antennes" qui substituent le noyau pentasaccharidique, (ii) au niveau des glycannes des O-glycosylprotéines la sialylation peut intervenir au tout début de la biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques conduisant à la synthèse de structures "courtes" sialylées telles que l'antigène Sialyl-Tn : NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr ou les antigènes Sialyl-T : NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr ou Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc α 1-O-Ser/Thr; ou disialyl-T : NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc α 1-O-Ser/Thr. (iii) enfin, au niveau de la classe des gangliosides des glycosphingolipides.

Chez les mammifères, les acides sialiques se trouvent essentiellement en position terminale non réductrice, liés par une liaison α -2,3 ou α -2,6 sur des résidus de galactose ou de N-acétylgalactosamine ou de N-acétylglucosamine (Corfield & Schauer, 1982). Par ailleurs, les acides sialiques forment des structures linéaires oligomériques dans lesquelles les résidus sont associés par des liaisons α -2,8. On trouve de telles structures chez les bactéries (Jennings & Smith, 1978), chez les poissons (Iwasaki & Inoue, 1985) ainsi que sur certaines molécules d'adhésion cellulaire, les N-CAM (Finne, 1982).

Les acides sialiques participent à la définition de déterminants structuraux

Tableau III : Principales séquences oligosaccharidiques sialylées des glycoprotéines et des glycolipides de mammifères. (Recchi *et al.*, 1995)

Structure	Origine	Références
NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β	Ubiquiste	Montreuil, 1980
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	Ubiquiste	Montreuil, 1980
NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β	Ubiquiste	Montreuil, 1980
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β / NeuAc α 2-6	Glycoprotéines bovines et de Rat	Mizuochi <i>et al.</i> , 1979 Yoshima <i>et al.</i> , 1981
NeuAc α 2-6GalNAc β 1-4GlcNAc β	Hormones pituitaires Activateur tissulaire du plasminogène humain Lactotransferrine bovine CD 36	Weisshaar <i>et al.</i> , 1991 Chan <i>et al.</i> , 1991 Coddeville <i>et al.</i> , 1992 Nakata <i>et al.</i> , 1991
(NeuAc α 2-8) _n ^a NeuAc α 2-3Gal β 1-3/4GlcNAc β	N-CAM, cerveau, muscle et rein de Rat nouveau-né	Troy, 1992
NeuAc α 2-9NeuAc α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc β	Cellules carcino-embryonnaires humaines	Fukuda <i>et al.</i> , 1985
NeuAc α 2-6GalNAc α 1-Ser/Thr	Ubiquiste	Schachter et Brockhausen, 1989
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr ^b	Ubiquiste	Schachter et Brockhausen, 1989
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr / NeuAc α 2-6	Ubiquiste	Schachter et Brockhausen, 1989
NeuAc α 2-3Gal-Cer (GM ₄)	Cerveau humain	Ledeen, 1978; Kundu, 1992
NeuAc α 2-3[R ₁] ^c Gal β 1-4Glc-Cer	Erythrocytes, plasma, tissu extra-neuronal	Ledeen, 1978; Kundu, 1992
NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3[R ₁]Gal β 1-4Glc-Cer	Erythrocytes, plasma, tissu extra-neuronal, cerveau humain	Ledeen, 1978; Wiegandt, 1982; Kundu, 1992
NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3[R ₁]Gal β 1-4Glc-Cer	Tissu adipeux de porc	Ledeen, 1978; Kundu, 1992
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-R ₂ ^d	Cerveau humain	Ledeen, 1978; Wiegandt, 1982; Kundu, 1992
NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-R ₂	Cerveau humain et bovin	Ledeen, 1978; Wiegandt, 1982; Kundu, 1992

^a n compris entre 1 et 55

^b peut être sulfatée en position 6 du résidu de GalNAc

^c R₁ = H (GM₃), ou GalNAc β 1-4 (GM₂), ou Gal β 1-3GalNAc β 1-4 (GM_{1a})

^d R₂ = LacCer, ou GM₃, ou GD₃, ou GT₃

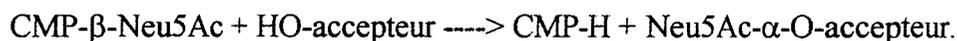
glycanniques. Ils sont considérés depuis longtemps comme des signaux de reconnaissance : ils sont déterminants pour la spécificité antigénique des groupes sanguins M et N (Sadler, *et al.*, 1979; Blumenfeld, *et al.*, 1981). Ils sont responsables de l'interaction entre cellules cibles et certains agents pathogènes tels que le virus de la grippe, les mycoplasmes, ou encore sont la cible de certaines toxines bactériennes (Corfield & Schauer, 1982). Ils peuvent également être des signaux d'anti-reconnaissance : la sialylation des résidus de galactose des glycoprotéines circulantes interdit leur reconnaissance par le récepteur d'Ashwell et empêche ainsi leur catabolisme par les hépatocytes (Ashwell, & Morell, 1974). Ce phénomène est d'une importance capitale pour les glycoprotéines recombinantes; en effet, si celles-ci ne possèdent pas d'acide sialique sur les résidus de galactose de leurs parties glycanniques, leur "clearance" par le foie se fera rapidement. On peut citer comme exemple la production d'IgG recombinante dans une lignée de cellules CHO (Lec 1) incapable de procéder à une maturation normale des N-glycannes, ces IgG injectées à un rat seront rapidement éliminées par le récepteur à galactose des hépatocytes (Wright & Morrison, 1994).

Au cours des dernières années, de nombreux travaux sont venus étayer l'hypothèse selon laquelle la présence d'acide sialique en position terminale sur les glycannes intervenait dans de nombreux phénomènes biologiques. Ainsi, par exemple, la sialoadhésine, un récepteur "lectine-like" des macrophages, qui reconnaît indifféremment les structures NeuAc α 2-3Gal β 1-3(4)GlcNAc et NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc des sialoglycoprotéines ou des gangliosides semble être impliquée dans les interactions entre les macrophages et les neutrophiles (Crocker, *et al.*, 1991; Kelm, *et al.*, 1994). Il apparaît, en outre, que l'acide sialique est capable de moduler les propriétés d'adhésion de la N-CAM, exprimée par les cellules nerveuses au cours de la mise en place du système nerveux : plus la N-CAM est sialylée, plus ces propriétés d'adhésion sont diminuées (Rutishauser, *et al.*, 1988).

Nous avons vu précédemment que les acides sialiques joueraient un rôle très important dans les phénomènes conduisant à la formation de métastases. Les fonctions biologiques portées et modulées par les glycannes, et en particulier par les glycannes sialylés, montrent l'importance d'une régulation fine de l'expression des enzymes responsables de leur biosynthèse.

B- Les Sialyltransférases.

Le terme de "sialyltransférase" définit indifféremment toutes les enzymes catalysant le transfert d'acide sialique à partir de sa forme activée, l'acide cytidyl-monophospho-N-acétylneuramique sur un accepteur glycoprotéinique ou glycolipidique et la réaction peut se schématiser de la façon suivante :



A la différence des autres glycosyltransférases, elles n'ont pas besoin de cations divalents, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , pour être actives. On estime à plus de 15 le nombre de sialyltransférases différentes nécessaires à la synthèse des séquences oligosaccharidiques sialylées connues. Les sialyltransférases présentent un spectre d'action et d'expression variable en fonction des espèces. On retrouve des activités sialyltransférasiques chez les animaux supérieurs des Oiseaux à l'Homme, mais la quasi-totalité des recherches menées sur ces enzymes ont été effectuées chez les mammifères.

1- Spécificité des sialyltransférases.

La spécificité d'action des différentes sialyltransférases de mammifères est résumée dans le tableau IV (page 42 et 43). Celle-ci se situe à deux niveaux distincts. L'un est strict et concerne le type de liaison formée entre le résidu d'acide sialique et le monosaccharide accepteur. La liaison s'effectue toujours en anomérie α sur le C_3 ou le C_6 d'un hexose ou d'une hexosamine ou encore sur le C_8 d'un autre résidu d'acide sialique dans le cas de la biosynthèse des structures polysialylées. Le deuxième niveau de spécificité implique la structure acceptrice. En règle générale, cette spécificité dépasse le seul monosaccharide sur lequel l'acide sialique va se lier et englobe le ou les monosaccharides voisins. Toutefois, la spécificité des sialyltransférases est encore plus étroite car il peut exister plusieurs enzymes reconnaissant le même monosaccharide terminal et possédant la même spécificité de liaison mais agissant sur des glycannes de

Tableau IV . La famille des sialyltransférases de mammifères et de poulet.

La nomenclature utilisée est celle de Tsuji *et al.*, (1996). D'après Recchi *et al.*, 1995.

Enzyme	Liaison formée Produit synthétisé	E. C.	Espèce Clonée	Chromosome Humain
Neu5Acα2,6				
ST6Gal I (ST6(N), SiaT-1,ST-1)	NeuAcα2,6 Galβ1,4GlcNAc.. Agit essentiellement sur les N-glycannes, possibilité d'action sur les néo-lacto-glycolipides.	2.4.99.1	Rat (Wienstein, <i>et al.</i> , 1987) Homme (Grundmann <i>et al.</i> , 1990) Souris (Hamamoto <i>et al.</i> , 1993) Poulet (Kurosawa <i>et al.</i> , 1994a)	3(q27-q28)
ST6GlcNAc I	NeuAcα2 6 NeuAcα2,3Galβ1,3GlcNAc .. Agit sur la GlcNAc seulement après galactosylation et sialylation	2.4.99.-		
ST6GalNAc I (ST6(O)-I)	NeuAcα2,6 GalNAcα-Ser/Thr Agit sur la GalNAc qu'elle soit galactosylée ou non, sialylée ou non et requiert une protéine comme aglycone	2.4.99.3	Poulet (Kurosawa <i>et al.</i> , 1994b)	
ST6GalNAc II	NeuAcα2 6 (NeuAcα2,3) ₀₋₁ Galβ1,3GalNAcα-Ser/Thr Agit sur une structure sialylée ou non.	3.4.99.-	Poulet (Kurosawa <i>et al.</i> , 1994c) Homme (Sotiropoulou <i>et al.</i> , 1994) Souris (Kurosawa <i>et al.</i> , 1996)	
ST6GalNAc III (ST6(O)-II, STY)	NeuAcα2 6 NeuAcα2,3Galβ1,3GalNAcα-Ser/Thr Requiert strictement cette structure trisaccharidique mais tolère une structure aglycone hydrophobe.	2.4.99.7.	Rat (Sjoberg <i>et al.</i> , 1996)	
Neu5Acα2,3Gal				
ST3Gal I (ST3(O), ST3GalA-1, ST-2)	NeuAcα2,3 Galβ1,3GalNAcα ou β Agit sur les O-glycannes	2.4.99.2/4	Cochon (Gillespie <i>et al.</i> , 1992) Souris (Lee <i>et al.</i> , 1993) Poulet (Kurosawa <i>et al.</i> , 1995) Homme (Chang <i>et al.</i> , 1995) (Kitagawa & Paulson, 1994a)	8
ST3Gal II (ST3GalA.2, SAT-IV)	NeuAcα2,3 Galβ1,3GalNAc Agit les O-glycannes et les glycolipides		Souris (Lee <i>et al.</i> , 1994) Rat (Lee <i>et al.</i> , 1994) Homme (Kim <i>et al.</i> , 1996a) (Giordanengo <i>et al.</i> , 1997)	1(p21-p34)
ST3Gal III (ST3(N), ST-3)	NeuAcα2,3 Galβ1,3(4)GlcNAc.. Agit préférentiellement sur les chaînes de type 1.	2.4.99.6	Rat (Wen <i>et al.</i> , 1992a) Homme (Kitagawa & Paulson, 1993) Souris (Kono <i>et al.</i> , 1997)	1(p34-p33)
ST3Gal IV (STZ, SAT-3, ST-4)	NeuAcα2,3 Galβ1,4(3)GlcNAc.. NeuAcα2,3 Galβ1,3GalNAc Agit préférentiellement sur les N-glycannes au niveau des chaînes de type 2 mais aussi sur les O-glycannes.	2.4.99.-	Homme (Sasaki <i>et al.</i> , 1993, Kitagawa & Paulson, 1994b) Souris (Kono <i>et al.</i> , 1997)	11(q23-q24)
GM3 Synthase ST3Gal V	NeuAcα2,3 Galβ1,4Glcβ-Cer.. Spécifique du lactosylcéramide.	2.4.99.9		

Tableau IV . La famille des sialyltransférases de mammifères et de poulet (suite).

La nomenclature utilisée est celle de Tsuji *et al.*, (1996). D'après Recchi *et al.*, 1995.

Enzyme	Liaison	E.C.	Clonage	Chromosome Humain
Neu5Acα2,8				
ST8Sia I (SAT-II, SAT-III)	NeuAcα2,8 NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc β -Cer [GD3] NeuAcα2,8 NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc β -Cer [GT3]	2.4.99.8	Homme (Sasaki <i>et al.</i> ,1994; Nara <i>et al.</i> , 1994; Haraguchi <i>et al.</i> , 1994) Souris (Yoshida <i>et al.</i> , 1995a) Rat (Watanabe <i>et al.</i> ,1996)	12(p12)
ST8Sia II (STX)	NeuAcα2,8 (NeuAc α 2,8NeuAc α -N-Glycanne	2.4.99.-	Rat (Livingston & Paulson, 1993) Souris (Kojima <i>et al.</i> , 1995 a et b) Homme (Angata <i>et al.</i> , 1997)	
ST8Sia III	NeuAcα2,8 NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc		Souris (Yoshida <i>et al.</i> , 1995a)	
ST8Sia IV (PST-I)	NeuAcα2,8 NeuAc α 2,8NeuAc α -N-Glycanne	2.4.99.-	Hamster (Eckhardt <i>et al.</i> ,1995) Souris (Yoshida <i>et al.</i> , 1995b) Homme (Nakayama <i>et al.</i> ,1995b)	
ST8Sia V (SAT-V, SAT-III)	[GT1a] NeuAc α 2  NeuAcα2,8 NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc-Cer	2.4.99.-	Souris (Kono <i>et al.</i> , 1996) Homme (Kim <i>et al.</i> , 1997) Poulet (Daniotti <i>et al.</i> , 1997)	
	[GQ1b] NeuAc α 2.8NeuAc α 2  NeuAcα2,8 NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc-Cer			
	[GT3] NeuAcα2,8 NeuAc α 2.8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer			

- : le résidu d'acide sialique ajouté est indiqué en lettres grasses.

type différent. Ainsi, dans le groupe des ST3Gal, on peut distinguer :

- ST3Gal I (EC 2.4.99.4) qui reconnaît les structures de type Gal β 1-3GalNAc α -R ou β des O-glycannes,
- ST3Gal II (EC 2.4.99.-) qui reconnaît également les structures de type Gal β 1-3GalNAc α -R ou β des O-glycannes et des glycolipides.
- ST3Gal III (EC 2.4.99.6), qui transfère un résidu d'acide sialique sur le galactose en position terminale du motif Gal β 1-3(4)GlcNAc β -R des N-glycannes,
- ST3Gal IV qui reconnaît à la fois les structures Gal β 1-3GalNAc α -R ou β des O-glycannes et Gal β 1-4(3)GlcNAc β -R des N-glycannes,
- et enfin la GM₃ Synthase (ST3Gal V) qui reconnaît les structures Gal β 1-4Glc-Cer des glycolipides.

Le tableau V, page 44 permet de comparer la spécificité de 4 de ces enzymes sur différents substrats accepteurs.

Tableau V : Comparaison de la spécificité de substrat *in vitro* de la famille des ST3Gal chez la souris.

Les valeurs relatives de V_{\max} / K_m sont indiquées, la plus grande valeur de V_{\max} / K_m pour chaque oligosaccharide et chaque enzyme étant prise comme référence. * indique des valeurs inférieure à 0,1. ND indique qu'aucune activité n'a été détectée (Tsujii, 1996).

	Oligosaccharide			Glycolipides		
	Gal β 1-3GlcNAc (Type I)	Gal β 1-4GlcNAc (Type II)	Gal β 1-3GalNAc (Type III)	Gal β 1,4Glc β -Cer Lac-Cer (G _{A3})	Gg ⁴ Cer (G _{A1})	nLe ⁴ Cer
ST3Gal I	0.4	ND	100	ND	4.3	ND
ST3Gal II	0.76	ND	100	ND	109	ND
ST3Gal III	100	5.6	3.3	ND	*	*
ST3Gal IV	10.5	100	1.5	ND	*	*

Gg⁴Cer : Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'-Cer; nLe⁴Cer : Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'-Cer.

D'autre part, l'affinité de certaines enzymes dépend également de la partie aglycone de la structure acceptrice. Bergh & van den Eijnden (1983) ont pu montrer que la ST6GalNAc III des O-glycannes (EC 2.4.99.7) (Tableau IV, page 42 et 43) extraite de microsomes de foie de Veau foetal reconnaissait les structures Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc- greffées sur une protéine ou sur le *p*-nitrophénol (*p*Np) alors que la ST6GalNAc I des O-glycannes (EC 2.4.99.3), extraite de microsomes de glandes sous-maxillaires ovines ou porcines, reconnaissait les structures Gal β 1-3GalNAc- et

GalNAc- lorsqu'elles étaient greffées sur une protéine mais ne transférait pas l'acide sialique quand ces structures étaient liées au pNp.

2- Expression tissulaire.

La comparaison de l'activité enzymatique de différentes ST3Gal dans les tissus de Rat (Paulson, *et al.*, 1989), ainsi que la comparaison du taux d'ARNm codant pour ces enzymes (Wen *et al.*, 1992b; Gillepsie *et al.*, 1992), ont permis de montrer que :

- ST3Gal IV n'est pratiquement pas exprimée dans le coeur, la rate, les glandes sous-maxillaires et l'intestin mais est active dans le tissu hépatique, les ovaires, les poumons et les reins.

- ST3Gal I est faiblement exprimée dans le cerveau, les testicules, les reins et le coeur mais est active dans les poumons, le côlon, le foie et les glandes salivaires.

Chez la souris, la spécificité d'expression des ARNm des ST3Gal est résumée dans le tableau VI, page 45.

Tableau VI : Spécificité d'expression tissulaire chez la souris des ST3Gal (Tsuji, 1996).

Tissus	ST3Gal I	ST3Gal II	ST3Gal III	ST3Gal IV
cerveau (foetal)	+/-	++	+++	++
cerveau (adulte)	+/-	++	+++	++
foie (foetal)	++	++	++	++
foie (adulte)	+	+/-	+++	++
cœur	+	+	+++	++
rein	+/-	+	+++	++
rate	+++	++	+++	++
thymus	++	+/-	+	++
côlon	-	+/-	++	+
testicule	-	+/-	+	+
glande sous-maxillaire	++++	+/-	+/-	++

Dans l'intestin de rat nouveau-né, ST6Gal I est fortement exprimé dans l'iléon alors que son expression est très faible dans le jéjunum. Au cours du développement

postnatal l'activité décroît dans l'iléon pour tomber au même niveau que dans le jéjunum au moment du sevrage (Vertino-Bell *et al.*, 1994). D'autre part, il est clairement établi actuellement que les sialyltransférases peuvent être considérées comme des marqueurs de différenciation. Ainsi, par exemple, il a été montré que l'expression de ST6Gal I permet de réguler la production de différents antigènes de différenciation (HB-6, CDw75, CD76) à la surface des cellules de lignées B et des érythrocytes, antigènes d'ailleurs nécessaires à la fonction des lymphocytes (Guy & Andrew, 1991; Bast *et al.*, 1992).

Ces observations montrent que les sialyltransférases sont exprimées de manière tissu spécifique.

3- Structures comparées des sialyltransférases.

Actuellement, les ADNc de sialyltransférases clonées et publiées (Tableau IV, page 42 et 43) sont au nombre de 35 provenant de différentes espèces animales et de différents tissus. L'analyse des séquences en acides aminés déduites des ADNc des sialyltransférases clonées permet de montrer qu'elles présentent toutes une structure transmembranaire de type II, commune aux autres glycosyltransférases : elles sont constituées d'une courte région N-terminale de 3 à 11 résidus d'acides aminés située du côté cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire de 13 à 23 résidus d'acides aminés, d'une région "tige" de longueur variable (20-200 acides aminés) et d'une grande région C-terminale de 300 à 350 acides aminés contenant le domaine catalytique (Figure 10, page 47). La comparaison des séquences nucléiques des premières sialyltransférases clonées a permis de révéler une région présentant une forte homologie entre les différentes sialyltransférases. Cette région appelée "sialylmotif" est située dans le domaine catalytique, elle se compose de deux sous motifs les sialylmotifs L (pour "large") de 45 acides aminés et S (pour "small") de 23 acides aminés (Drickamer, 1993; Livingston Paulson, 1993)(Figure 11, page 48). Datta et Paulson (1994) ont montré par mutagenèse dirigée des acides aminés conservés dans le sialylmotif L, que celui-ci participe à la fixation du CMP-NeuAc. De plus, ces séquences n'ayant pas été retrouvées chez les autres glycosyltransférases actuellement clonées, il est logique de

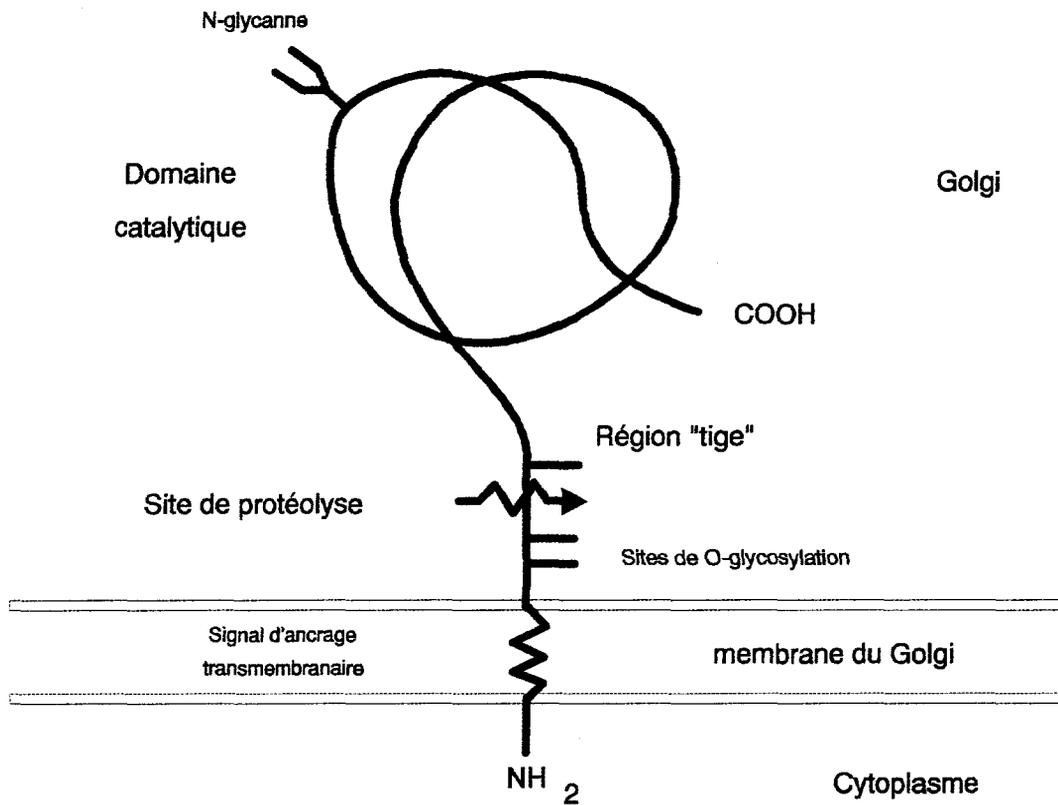


Figure 10. Organisation structurale des glycosyltransférases (d'après Clausen *et al.*, 1992).

Elles sont constituées d'une courte région N-terminale située du côté cytoplasmique, de 13 à 23 résidus d'acides aminés pour le domaine transmembranaire, d'une région "tige" de longueur variable et d'une grande région C-terminale contenant le domaine catalytique.

Sialylmotif L

ST6Gal I	rat	178	WQRC	AVYSSAGSLKNSQLGREIDNHDAVLR	FN	GAPT	DN	-FQ	QDV	GSK	TT	225													
	homme	181	WGRCA	VYSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLR	FN	GAPT	TAN	-FQ	QDV	G	TK	TT	228												
	poulet	189	RC	AVYSSAGSLKSSHLGPEINSHDAVLR	FN	GAP	VKG	-FQ	ED	V	GQ	K	TT	234											
ST6GalNAc I	poulet	339	SC	AVYGNNGGILNNSGMGQEIDSHDYVFR	V	S	GAVIKG	-Y	E	K	D	V	G	T	K	TT	383								
ST6GalNAc II	poulet	179	RC	AVYGNNGGILNNSRQGRAIDAHDLVFR	L	N	GAI	T	K	-F	E	E	D	V	G	S	K	V	224						
ST3Gal III	rat	156	CRRC	IIVGNNGVLANKSLGSRIDDDYDIVIR	L	N	SAPVKG	-F	E	K	D	V	G	S	K	T	204								
	homme	157	CI	IIVGNNGVLANKSLGSRIDDDYDIVV	R	L	N	SAPVKG	-F	E	K	D	V	G	S	K	T	203							
ST3Gal I	porc	142	CRRC	AVYGNNSGNLKESSYGPQIDSHDFVL	R	M	N	KAP	T	E	G	-F	E	A	D	V	G	S	K	T	189				
	souris	136	CRRC	AVYGNNSGNLKDSSYGPQIDSHDFVL	R	M	N	KAP	T	V	G	-F	E	A	D	V	G	S	R	T	183				
	homme	141	RC	AVYGNNSGNLRESSYGPQIDSHDFVL	R	M	N	KAP	T	A	G	-F	E	A	D	V	G	T	K	T	185				
ST3Gal II	souris	149	CRRC	AVYGNNSGNLRGSGYGQEVDSHNF	I	M	R	M	N	Q	A	P	T	V	G	-F	E	K	D	V	G	S	R	T	196
	rat	149	CRRC	AVYGNNSGNLRGSGYGQEVDSHNF	I	M	R	M	N	Q	A	P	T	V	G	-F	E	K	D	V	G	S	R	T	196
ST3Gal IV	homme	116	CRRC	VVYGNNGHRLRNSSLGDAINKYDVVIR	L	N	N	A	P	V	A	G	-Y	E	G	D	V	G	S	K	T	163			
ST8Sia II	rat	154	FQ	TCAIYGNNSGVLLNSGCGQEIDTHSFVIR	C	N	LAPVQE	-Y	A	R	D	V	G	L	K	T	201								
	homme	1	FQ	TCAIYGNNSGVLLNSGCGREIDAHSFVIR	C	N	LAPVQE	-Y	A	R	D	V	G	L	K	T	48								
ST8Sia III	souris	159	YNV	CAVYGNNSGILTGSQYGPQIDKSDFVSR	C	N	FAPTEA	-F	H	K	D	V	G	R	K	T	215								
ST8Sia IV	hamster	139	FKT	CAVYGNNSGILLDSGCGKEIDSHNFVIR	C	N	LAPVVE	-F	A	A	D	V	G	T	K	S	186								
ST8Sia I	homme	120	LKK	CAVYGNNGGILKKSQCGRQIDEANFVM	R	C	N	L	P	L	S	S	E	Y	T	K	D	V	G	S	K	S	Q	168	

Sialylmotif S

ST6Gal I	rat	318	PSS	G	M	L	G	I	I	M	M	T	L	C	D	Q	V	D	I	Y	E	F	340	
	homme	321	PSS	G	M	L	G	I	I	M	M	T	L	C	D	Q	V	D	I	Y	E	F	343	
	poulet	328	PSS	G	M	L	G	I	V	I	M	M	T	L	C	D	E	V	D	V	T	E	F	350
ST6GalNAc I	poulet	494	PTT	G	A	L	L	L	L	T	A	L	H	L	C	D	R	V	S	A	Y	G	Y	516
ST6GalNAc II	poulet	332	PST	G	A	L	M	L	L	T	A	L	H	T	C	D	Q	V	S	A	Y	G	F	354
ST3Gal III	rat	299	PTL	G	S	V	A	V	I	M	A	L	D	G	C	D	E	V	A	V	A	G	F	321
	homme	300	PTL	G	S	V	A	V	I	M	A	L	H	G	C	D	E	V	A	V	A	G	F	322
ST3Gal I	porc	270	PST	G	I	L	S	V	I	F	S	L	H	I	C	D	E	V	D	L	Y	G	F	292
	souris	264	PST	G	I	L	S	I	I	F	S	I	H	I	C	D	E	V	D	L	Y	G	F	286
	homme	267	PST	G	I	L	S	V	I	F	S	M	H	V	C	D	E	V	D	L	Y	G	F	289
ST3Gal II	souris	277	PST	G	M	L	V	L	F	F	A	L	H	V	C	D	E	V	N	V	Y	G	F	299
	rat	277	PST	G	M	L	V	L	F	F	A	L	H	V	C	P	E	V	N	V	I	G	F	299
ST3Gal IV	homme	258	PTT	G	L	L	A	I	T	A	L	H	L	C	D	L	V	H	I	A	G	F	280	
ST8Sia II	rat	293	PTT	G	L	M	Y	L	A	T	R	F	C	N	Q	I	Y	L	Y	G	F	315		
	homme	140	PTT	G	L	M	Y	L	A	T	R	F	C	K	Q	I	Y	L	Y	G	F	162		
ST8Sia III	souris	299	LST	G	I	L	M	Y	L	A	S	A	I	C	E	E	I	H	L	Y	G	F	321	
ST8Sia IV	hamster	278	PST	G	L	M	Y	L	A	T	R	F	C	D	E	I	H	L	Y	G	F	300		
ST8Sia I	homme	258	LST	G	L	F	L	V	S	A	A	L	G	L	C	E	E	V	A	I	Y	G	F	280

Figure 11 : Séquence des acides aminés présents dans les sialylmotif L et S de 18 sialyltransférases clonées (Harduin *et al.*, 1995).

Les acides aminés les plus conservés sont indiqués en gras et soulignés. Les chiffres indiqués à droite ou à gauche indique la position des acides aminés dans la séquence codante.

penser qu'elles soient spécifiques à la famille des gènes des sialyltransférases. En conséquence, c'est le sialylmotif L qui a été choisi pour cloner les autres membres de cette famille et ceci avec de très nombreux succès. Les sialylmotifs ont été retrouvés dans toutes les sialyltransférases clonées à ce jour. Les grands progrès réalisés au niveau de clonage des sialyltransférases ont permis la réalisation d'un dendrogramme (Figure 12, page 50) des sialyltransférases. Celui-ci montre une similarité de séquence pour une même enzyme dans différentes espèces. Toutefois, au sein d'une même espèce, les séquences nucléiques des différentes sialyltransférases présentent peu de similitude.

Une autre approche, qui s'appuie sur la comparaison des zones hydrophobes des protéines appelée HCA (Hydrophobic Clusters Analysis), a permis de montrer la présence de deux acides aminés, une glutamine (E) séparées par 4 acides aminés d'une histidine (H) présents dans le domaine catalytique de toutes les sialyltransférases (Tableau VII, page 51). Cette région a été appelée sialylmotif VS (pour "Very Small") (Geremia *et al.*, 1997). Vu les propriétés intrinsèques des résidus de Glu et His, on peut penser raisonnablement que ces résidus conservés soient impliqués dans l'activité catalytique des sialyltransférases.

4- Localisation des sialyltransférases.

Concernant la localisation intracellulaire, le cas le plus documenté est celui de ST6Gal I. Cette enzyme intervenant au niveau de la maturation finale des N-glycannes, celle-ci est logiquement localisée dans le trans-Golgi et le réseau trans-golgien, bien que dans les vésicules golgiennes des entérocytes, sa répartition soit plus diffuse (Roth, 1987). Ainsi, il a été observé que ST6Gal I et la β 1,4-galactosyltransférase étaient localisées dans des sous-compartiments différents du trans-Golgi (Berger *et al.*, 1993). Cette localisation golgienne dépend de la présence d'un peptide signal dans la partie N-terminale du polypeptide et nécessite la présence de deux résidus de lysine dans la séquence luminale flanquant ce peptide signal (Dahdal & Colley, 1993). Des analyses de protéines chimériques de ST6Gal I et de protéines retrouvées à la surface cellulaire révèlent que la région transmembranaire joue un rôle clé dans la rétention golgienne, ainsi que les régions flanquantes qui interviennent en augmentant l'efficacité de cette

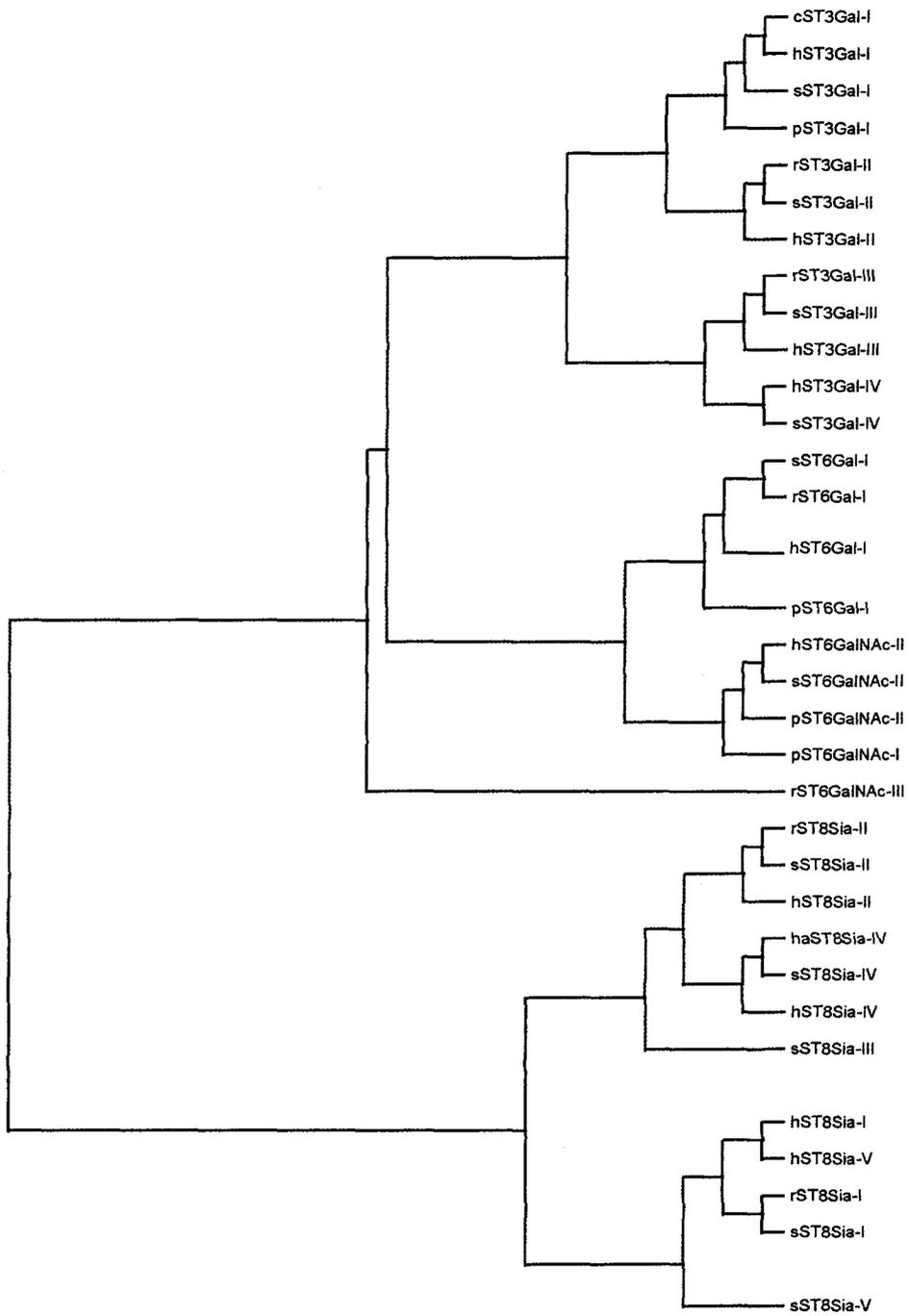


Figure 12 : Dendrogramme reliant les différentes séquences nucléiques des sialyltransférases clonées chez plusieurs espèces.

c : Cochon, h : Homme, s : Souris, p : Poulet, r : Rat, ha : Hamster.

Tableau VII : Comparaison des séquences en acides aminés au niveau C-terminal de douze sialyltransférases montrant le sialylmotif VS. (Geremia *et al.*, 1997)

Les acides aminés conservés sont indiqués en gras. Les chiffres indiquent la position de l'acide aminé dans la séquence de la protéine.

sialyltransférase	Espèce	Séquence d'Acide Aminé
ST6Gal I	Rat	K ₃₄₆ TDVCYYHQKFFDSACTMGAYDPLLF E KNMVKHLNEGTDDEDIYL ₃₈₉
	Homme	K ₃₄₉ TDVCYYYQKFFDSACTMGAY H PLLY E KNLVKHLNQGTDEDIYL ₃₉₂
	Souris	K ₃₄₆ TDVCYYHQKFFDSACTMGAY H PLLF E KNMVKHLNEGTDDEDIYL ₃₈₉
	Poulet	Q ₃₅₆ TDICHYYQKFHDHACTMGAY H PLLF E KNLVKHLNQGTDEDIYL ₃₉₉
ST3Gal I	Porc	G ₃₉₆ NWHHYWENNPSAGAFRKTGV H DGDF E SNVTTILASINKIRIFK ₃₄₁
	Souris	G ₂₉₂ NWHHYWENNPSAGAFRKTGV H DGDF E YNIITTTLAAINKIRIFK ₃₃₅
	Homme	G ₂₉₅ NWHHYWENNPSAGAFRKTGV H DAD F ESNVTATLASINKIRIFK ₃₃₈
	Poulet	G ₂₉₇ HWHHYWENNASAGAFRQTGV H DAD F EFNVTTLTASIEKIKFFK ₃₄₀
ST3Gal II	Rat	G ₃₀₅ NWHHYWENNRYAGEFRKTGV H DAD F E AHIIDILAKASKIEVYR ₃₄₈
	Souris	G ₃₀₄ NWHRHWENNRYAGEFRKTGV H DAD F E AHIIDMLAKASKIEVYR ₃₄₇
ST3Gal III	Rat	P ₃₂₈ NAPLHYYETVRMAAIKESW T HNIQ R E KEFLRKLVKARVITDLS ₃₇₁
	Homme	P ₃₂₉ NAPLHYYETVRMAAIKESW T HNIQ R E KEFLRKLVKARVITDLS ₃₇₂
ST3Gal IV	Homme	N ₂₈₇ KKQTIHYYEQITLKSMA ^G SG H NV S Q E ALAIKRMLEMGAIKNLT ₃₃₀
ST6GalNAc I	Poulet	H ₅₂₀ QKYS DHYYDK ^E WKRLV F YV N HDFN L E KQVWKR L HDENIMKLYQ ₅₆₃
ST6GalNAc II	Poulet	Y ₃₅₉ EQFSDHYYE P EKKPLV F YAN H DML L E AELWRS L HRAGIMELYQ ₄₀₂
ST6GalNAc III	Rat	Y ₂₅₆ EQGDECNEYLLHEHAPYGG H RFIT E KKV F AKWAKK H RIV F TH ₂₉₉
ST8Sia I	Homme	N ₃₀₁ MHEQPI S HYYDNVLP F SG F H AM P E F FLQ L WY L H K I G AL R M Q L ₃₄₄
ST8Sia II	Rat	N ₃₂₅ PVKYHYYDSLKYGYTSQAS P H T M P L E F kAL K SLHEQGALKLTV ₃₆₈
	Homme	N ₁₇₂ PVKYHYYDSLKYGYTSQAS P H T M P L E F kAL K SLHEQGALKLTV ₂₁₅
	Souris	N ₃₂₅ PVKYHYYDSLKYGYTSQAS P H T M P L E F kAL K SLHEQGALKLTV ₃₆₈
ST8Sia III	Souris	D ₃₃₃ LPYHYYDKK G T K F T TK W Q S H Q L P A E F Q L LY R M H G E GL T K L T V ₃₇₆
ST8Sia IV	Hamster	K ₃₁₀ AVKYHYYDDLKYRYF S NAS P H R M P L E F kTL N VL H N R GAL K L T T ₃₅₃
	Homme	K ₃₁₀ AVKYHYYDDLKYRYF S NAS P H R M P L E F kTL N VL H N R GAL K L T T ₃₅₃
	Souris	K ₃₁₀ AVKYHYYDDLKYRYF S NAS P H R M P L E F kTL N VL H N R GAL K L T T ₃₅₃

réretention (Gleeson *et al.*, 1994). D'un autre côté, des altérations de la région transmembranaire ou des délétions dans les régions flanquantes de ST6Gal I ne perturbent pas sa localisation golgienne indiquant que le domaine luminal catalytique contribue également à la rétention golgienne.

L'hypothèse émise est que la rétention des glycosyltransférases serait médiée par la formation d'un complexe entre leur partie transmembranaire et leur partie catalytique. En outre, Munro (1995) a démontré que l'efficacité de rétention de ST6Gal I est associée à la longueur du domaine transmembranaire. ST6Gal I se retrouve également sous une forme soluble dans les liquides biologiques tels que le lait ou le sérum. Cette enzyme soluble n'est en réalité qu'une forme tronquée de l'enzyme membranaire de laquelle a été éliminée par coupure protéolytique, la partie hydrophobe transmembranaire renfermant le peptide signal. Lors de la phase inflammatoire, on peut observer une libération importante de ST6Gal I hépatique dans le sérum (Kaplan *et al.*, 1983). Cette libération proviendrait d'une altération du trafic lysosomal de la cathepsine D provoquant une coupure protéolytique de la forme membranaire de ST6Gal I, la convertissant de ce fait en une forme soluble catalytiquement active (Jamieson *et al.*, 1993). Pour le moment, aucune signification biologique à la présence de sialyltransférases dans les liquides biologiques n'a pu être avancée et il en va de même en ce qui concerne l'augmentation du taux sérique lors de la réponse inflammatoire.

Récemment, Ma *et al.* (1997) ont montré qu'il existe deux formes protéiques de ST6Gal I ne différant que d'un seul acide aminé dans le domaine catalytique à la position 123, une tyrosine provenant du codon TAC pour la forme appelée ST Tyr, ou une cystéine provenant du codon TGC pour la forme appelée ST Cys. La forme ST Tyr est conforme à la séquence de l'ADN génomique. Les deux formes sont issues de deux séquences existant au niveau des ARNm. Cette seule modification conduit à une différence d'activité enzymatique: la forme ST Tyr étant plus active que la forme ST Cys, et à une différence de localisation subcellulaire : la forme ST Cys est retenue longuement dans le Golgi, tandis que la forme ST Tyr est clivée et sécrétée rapidement, avec une demi-vie de 3 à 6 heures. Cette forme sécrétée de la ST Tyr a le même poids moléculaire que la forme sécrétée retrouvée dans les milieux biologiques.

5- Régulation de l'expression des sialyltransférases.

La régulation de l'expression des activités sialyltransférasiques se fait principalement au niveau transcriptionnel, même si les aspects de compétition entre les sialyltransférases agissant sur les mêmes substrats accepteurs, une localisation différente des enzymes dans l'appareil de Golgi, des variations dans la concentration des substrats et des donneurs saccharidiques sous leur forme activée CMP-NeuAc, ne peuvent être écartées.

La régulation la plus étudiée est celle de ST6Gal I de Rat (nous n'aborderons pas dans ce chapitre la régulation de la famille des ST8Sia).

a- Structure du gène codant pour ST6Gal I de rat.

L'organisation du gène de ST6Gal I de Rat a été décrite par Wen *et al.* (1992b). Comme le montre la figure 13 (page 55), ce gène renferme au moins 11 exons répartis sur 80 kb. Les 3 premiers exons E₋₁, E₀ et E₁ sont non codants. L'exon E₂ contient l'ATG et possède l'information pour la séquence N-terminale cytoplasmique de la protéine ainsi que pour le domaine transmembranaire et la région "tige" alors que les exons E₃ à E₆ codent pour le site catalytique de l'enzyme. L'exon E₆ contient également le signal de fin de traduction ainsi qu'une importante région 3' non traduite de 2,8 kb. Ce gène donne naissance à différents transcrits par l'utilisation de plusieurs régions promotrices ainsi que par des mécanismes d'épissage alternatif. Schématiquement, on peut distinguer trois familles de transcrits de tailles différentes :

- une famille d'ARNm de 4,7 kb qui s'exprime dans la majorité des types cellulaires;
- un ARNm de 4,3 kb exprimé uniquement dans le foie;
- trois ARNm de 3,6 kb, formes prédominantes observées uniquement dans le rein.

Les ARNm de 4,7 kb et 4,3 kb sont identiques dans leur séquence nucléotidique et codent tous deux pour une seule et même protéine. Ils diffèrent uniquement par leur extrémité 5' non traduite. L'ARNm de 4,7 kb décrit par Wen *et al.* (1992b) et cloné à

partir d'une banque d'ADN complémentaire aux ARNm de rein de Rat, contient deux exons additionnels, E₀ et E₁, situés respectivement à 15 et 40 kb en amont du site d'initiation de transcription de l'ARNm hépatique. Ceci suggère l'existence d'au moins deux régions promotrices distinctes qui permettent l'expression de ces deux transcrits. Les transcrits de 3,6 kb diffèrent entre-eux également par leur extrémité 5'. Ils seraient générés par épissage différentiel et par l'utilisation de deux promoteurs alternatifs. Ils coderaient pour des protéines dont les fonctions ne sont pas évidentes. En outre, l'analyse quantitative de ces ARNm dans les différents tissus a permis de mettre en évidence un spectre d'expression tissulaire des ARN messagers avec le plus faible taux observé dans le cerveau, des taux intermédiaires dans l'ovaire, la rate, le rein et le poumon et un taux de l'ordre de 10 à 50 fois plus élevé dans le foie. Le même type de résultats, obtenus en comparant les activités sialyltransférases (Paulson *et al.*, 1989), suggère que la variation de l'activité spécifique de ST6Gal I (de plus de 100 fois, avec la plus forte activité détectée dans le foie et la plus faible dans le cerveau et le coeur) résulte d'une variation du taux d'expression des ARNm par un contrôle du taux de transcription du gène codant pour l'enzyme.

b- Structure du gène codant pour ST6Gal I humaine.

La comparaison du gène codant pour ST6Gal I humaine et de Rat montre une conservation précise des frontières entre les exons et les introns dans la séquence codante des deux enzymes. De plus, tout comme chez le Rat, il existe plusieurs transcrits différents par leur partie 5' (Wang *et al.*, 1993). Des lignées lymphoblastoïdes de type B différenciées expriment un transcrit contenant les exons Y et Z (Figure 14, page 55) alors que les cellules présentant le phénotype de cellules B matures expriment un transcrit de plus petite taille, dans lequel les exons Y et Z sont remplacés par un exon alternatif X.

Le transcrit contenant les exons Y et Z dont l'ADNc a été isolé du placenta humain (Grundmann *et al.*, 1990) est présent dans un grand nombre de cellules et de tissus. La similitude entre les exons Y et Z et les exons E₁ et E₀ de Rat suggère que ce transcrit est l'homologue humain du transcrit de 4,7 kb de Rat.

ECHELLE (kb)

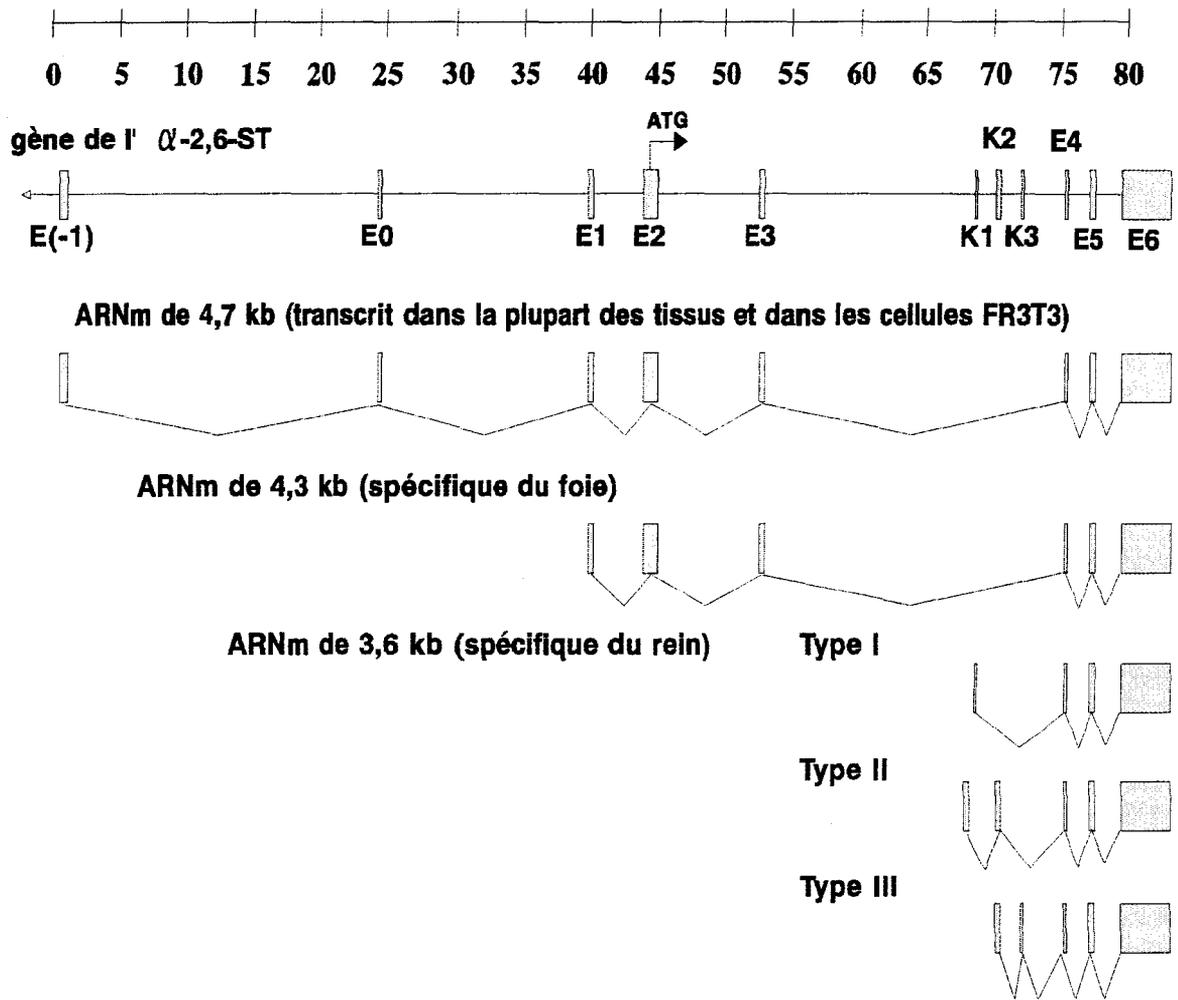


Figure 13 : Organisation génomique de ST6Gal I de rat.

Le gène de ST6Gal I contient au moins 11 exons et s'étend sur environ 80 kb. Les mécanismes d'épissage de chacun des ARNm sont décrits dans le texte (Wen *et al.*, 1992b)

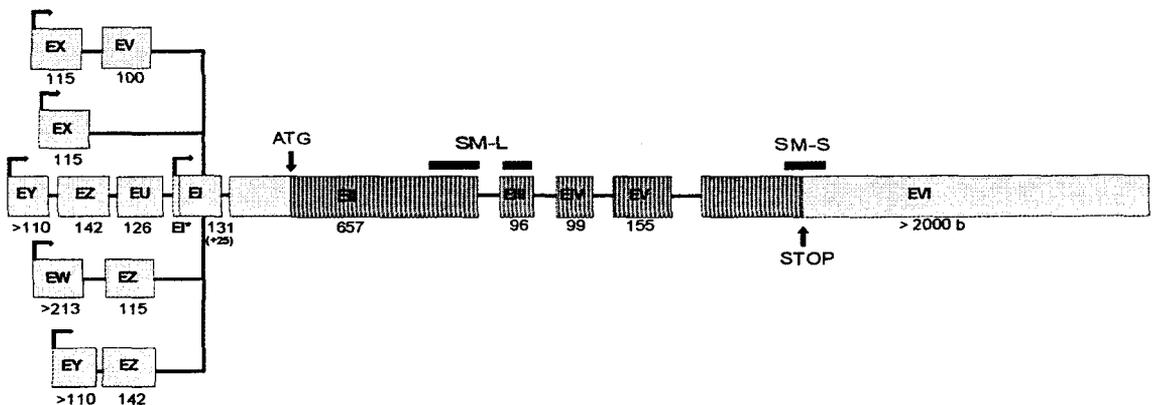


Figure 14 : Représentation schématique du gène de ST6Gal I

Les zones hachurées représentent les régions codantes, les zones grises les régions non codantes. Les sialylmotifs L et S sont indiqués par des traits épais au dessus des régions codantes. La taille en pb est en dessous de chaque exon, \square indique les sites d'initiation de la transcription (Grundmann *et al.*, 1990; Aas-Eng *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996).

Pour les cellules d'hépatocarcinome HepG2, il existe un autre type d'ARNm ne contenant pas les exons X, Y ou Z, celui-ci commencerait par un autre exon dont l'initiation de la transcription se ferait à 25 nucléotides en amont de l'exon I, cet exon I étendu a été appelé I* (Aas-Eng *et al.*, 1995).

Dans une étude récente de Lo *et al.* (1996) portant sur des lignées lymphoblastoïdes de type B matures de Louckes, d'autres exons ont été découverts, l'exon V associé à l'exon X, l'exon U associé aux exons Y+Z, et l'exon W associé à l'exon Z. (Figure 14, page 55). Sur 491 clones obtenus à partir des produits d'extension en 5', 57 contiennent l'exon X, 17 les exons Y+Z, 38 l'exon U, et un de chaque contenant les exons V et W. L'hypothèse que les exons U, V, W soit sous le contrôle de promoteurs propres à chacun ne peut être exclue. Les isoformes commençant par les exons Y+Z+U+I et les exons X+V+I sont sûrement le résultat d'un épissage alternatif des formes précédemment décrites commençant par les exons Y+Z+I et les exons X+I respectivement.

c- régulation transcriptionnelle.

La variété des transcrits issus du gène de ST6Gal I, aussi bien chez le Rat que chez l'Homme, suggère qu'il existe une régulation fine tant au niveau quantitatif que qualitatif de ces différents transcrits en fonction du type cellulaire considéré et nous possédons actuellement quelques éléments permettant d'étayer cette hypothèse.

c-1- Régulation transcriptionnelle de la forme hépatique chez le Rat.

A ce jour, seul le promoteur hépatique a été étudié. Celui-ci contrôle la synthèse d'un transcrit de 4,3 kb qui ne s'exprime que dans les hépatocytes de Rat. Comme le montre la figure 15 (page 57), la transcription de ST6Gal I est contrôlée par différents facteurs de transcription ubiquistes tels que MLTF et ϕ NF1, ou spécifiques du tissu hépatique tels que HNF1, DBP et LAP (Svensson *et al.*, 1992). D'autre part, il a été démontré que l'expression de ce transcrit était contrôlé par les glucocorticoïdes. En effet, l'addition de dexaméthasone dans des cultures d'hépatocytes de Rat provoque une forte augmentation de la transcription du gène de ST6Gal I (Wang *et al.*, 1989).

Cependant, en utilisant des constructions chimériques contenant le gène CAT sous le contrôle de délétants de ce promoteur, aucun site consensus GRE n'a pu être identifié dans une région de 1 kb en amont du site d'initiation de transcription (Wang *et al.*, 1990). De plus, l'expression de ce transcrite est, également, augmentée dans la muqueuse de Rat nouveau-né, ce qui induirait une répartition plus large de ce promoteur qui ne serait donc pas exclusivement hépatique (Vertino-Bell *et al.*, 1994).

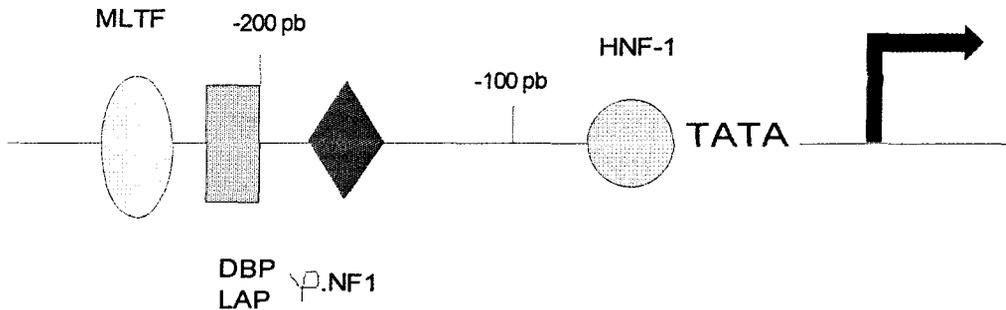


Figure 15. Représentation schématique du promoteur contrôlant l'expression de l'ARNm de 4,3 kb de ST6Gal I dans les hépatocytes de rat (Svensson *et al.*, 1992).

La flèche représente le site d'initiation de la transcription.

MLTF : "Adenovirus major late transcription factor"; DBP : "D-binding protein";
 LAP: "Liver enriched transcriptional activator protein; ϕ NF1 : "Nucleor factor 1";
 HNF-1 : "Hepatocyte nuclear factor 1".

c-2- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I de rat dans les autres tissus

Dans les cellules thyroïdiennes de Rat FRTL-5, le taux d'ARNm (4,7 kb) de ST6Gal I est abaissé par la thyrotrophine et ceci par un mécanisme faisant ici intervenir l'AMPC (Grollman *et al.*, 1993). Dans les fibroblastes de Rat, la transcription de cette enzyme est régulée au moins à deux niveaux distincts : la transformation de fibroblastes de Rat FR3T3 par l'oncogène *ras* provoque une augmentation de la transcription d'un messenger de 4,7 kb (Le Marer *et al.*, 1992). Bien que les régions promotrices contrôlant l'expression de ce transcrite ne soient pas encore connues, il est vraisemblable que cette induction fasse intervenir un site consensus permettant la fixation d'un complexe AP-1 (Medema & Bos, 1993). D'autre part, ce même transcrite de 4,7 kb peut être lui aussi

induit par la dexaméthasone (Vandamme *et al.*, 1993) ce qui suggère qu'il existe au moins deux sites consensus GRE dans le gène de ST6Gal I.

Par ailleurs, ST6Gal I voit son activité augmentée lors de la phase aiguë de l'inflammation, ceci étant due à la sécrétion par les hépatocytes d'une forme soluble et catalytiquement active de l'enzyme. On peut donc considérer que ST6Gal I comme faisant partie des "acute-phase reactant" (Jamieson *et al.*, 1993). Ceci est confirmé par le fait que le taux de transcription des ARNm de 4,7 kb et 4,3 kb est fortement augmenté sous l'effet des glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone.

c-3- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I humaine.

Pour les cellules endothéliales humaines, le TNF- α , l'interleukine-1, les lipopolysaccharides augmentent le taux de transcription et donc l'expression de ST6Gal I (Hanasaki *et al.*, 1994). On peut également signaler que le traitement de cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 par le n-butyrate réduit de 90 % le taux d'ARNm de ST6Gal I en affectant la stabilité des messagers, leur durée de vie passant de 30 à 5 h dans les cellules traitées (Shah *et al.*, 1992).

La région promotrice gouvernant le transcrit commençant par l'exon I* est la seule à avoir été étudiée chez l'Homme (Aas-Eng *et al.*, 1995). Des sites consensus pour les facteurs de transcription : HNF-4, APRF/IL-6 RE-BP, NF-IL6, HNF-5, C/EBP, HNF-1, APRF, INR ont été retrouvés dans la région génomique de 420 pb en amont de l'exon I*. La région 5' contient donc deux sites candidats pour la fixation de facteurs de transcription inductibles par l'interleukine 6. Le gène de l'IL6 a été identifié comme l'un des gènes majeurs induit spécifiquement lors de l'inflammation. NF-IL6 est l'homologue humain du facteur de transcription LAP/DBP déjà trouvé au niveau du promoteur contrôlant l'expression du transcrit hépatique chez le Rat. De plus, la position du site de fixation du facteur HNF-1 est conservée par rapport au promoteur hépatique du Rat. Les facteurs HNF-5, HNF-4 et C/EBP sont des facteurs contrôlant l'expression de plusieurs gènes spécifiques du foie.

Comme l'organisation du transcrit de 4,3 kb du foie de Rat et du transcrit retrouvé dans les HepG2 est très similaire et que l'homologie entre leur partie 5' non codante est de 54 %, il est vraisemblable que le transcrit présent dans les HepG2 représente

l'homologue humain du transcrit hépatique spécifique du foie de Rat.

c-4- Régulation transcriptionnelle de ST6Gal I au niveau du foie chez la Souris.

Très récemment une étude portant sur ST6Gal I chez la Souris montre que la similitude entre les transcrits hépatiques du Rat et de l'Homme n'est pas conservée dans ce cas (Hu *et al.*, 1997). En effet, ce transcrit hépatique possède en plus de l'exon I (présent chez le Rat et l'Homme) un exon additionnel en amont nommé exon H. La région génomique située en amont de cet exon a été analysée et des sites consensus pour les facteurs de transcription AP-1, AP-2, HNF5, C/EBP et NF-IL6 ont été trouvés. Par rapport aux promoteurs hépatiques de ST6Gal I décrit chez le Rat et l'Homme, on ne retrouve pas le facteur HNF-1 commun à ces deux promoteurs. On retrouve le facteur NF-IL6 et C/EBP trouvé chez l'homme, mais à des positions différentes tandis que la position du facteur HNF5 semble plus conservée. Il existe très peu d'homologie entre les facteurs existant au niveau des promoteurs hépatiques chez le Rat et la Souris.

d- Les autres sialyltransférases humaines : la famille des ST3Gal.

Seuls les gènes de ST3Gal I et IV (Figure 16, page 60) ont été analysés (Chang *et al.*, 1995; Kitagawa *et al.*, 1996).

Chez l'homme, le gène de ST3Gal IV comprend 14 exons répartis sur au moins 25 kb (Kitagawa *et al.*, 1996). La transcription de ce gène résulte en la production de 5 ARNm différents (type A1, A2, B1, B2 et B3) dans le placenta humain, chacun ayant une taille d'environ 2 kb. Ils sont générés par la combinaison d'épissages alternatifs et l'utilisation de promoteurs alternatifs. La traduction de chaque ARNm aboutit à la synthèse de 3 isoformes de ST3Gal IV, la forme longue A (provenant de l'isoforme A1), la forme longue B (provenant des isoformes B1, B2 et B3), et la forme courte (provenant de l'isoforme A2) possédant chacune respectivement 332, 333, et 322 acides aminés. Ces isoformes ne diffèrent l'une de l'autre que dans leur partie N-terminale

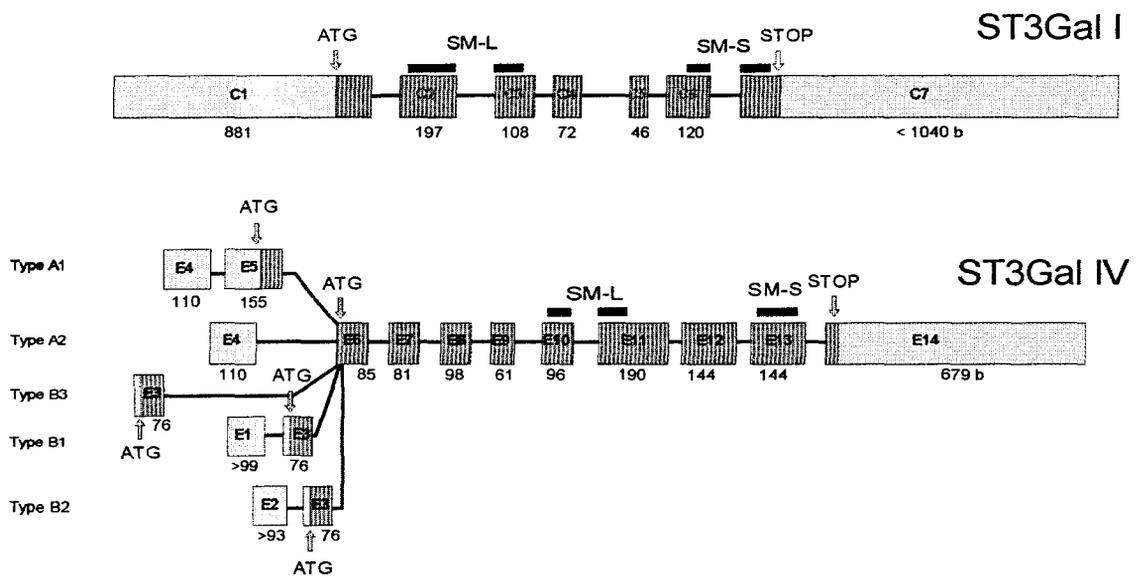


Figure 16. Représentation schématique des gènes de ST3Gal I et de ST3Gal IV.

Les zones hachurées représentent les régions codantes, les zones grises les régions non codantes, les sialymotifs L et sont indiqués par des traits épais au dessus des régions codantes. La taille en pb est en dessous de chaque exon (Chang *et al.*, 1995; Kitagawa *et al.*, 1996).

cytoplasmique, ainsi que dans leur domaine transmembranaire. Actuellement, la signification biologique de cette variabilité reste encore à éclaircir (Kitagawa *et al.*, 1996). Cependant, l'analyse de la distribution de ces ARNm par la technique de Northern-Blot révèle que l'ARNm de type A1 est spécifiquement exprimé dans le placenta, les testicules et les ovaires humains, alors que les autres formes sont constitutivement exprimées dans tous les autres tissus examinés.

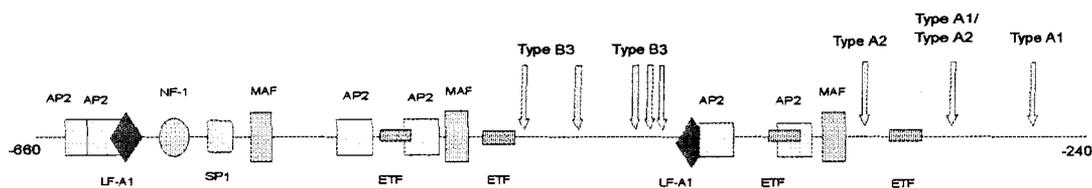
L'analyse des régions génomiques en amont du site d'initiation de la transcription de ST3Gal IV (Figure 17, page 62) révèle une hétérogénéité des sites d'initiation de transcription ainsi qu'une absence des sites consensus TATA et CCAAT et la présence de "boîtes" GC. Ces traits structuraux sont caractéristiques des gènes domestiques, qui sont exprimés à un faible taux dans tous les tissus essentiels.

L'organisation génomique de ST3Gal I montre que le cadre ouvert de lecture s'étend sur sept exons (Figure 16, page 62) (Chang *et al.*, 1995). Des expériences permettant l'analyse de la partie 5' non traduite (5'-RACE) montrent que celle-ci est inhabituellement longue, elle mesure plus d'1 kb. Actuellement, on ne connaît qu'un seul type d'ARNm issu de ce gène, dont le promoteur n'a pas été caractérisé.

On sait que les gènes de la famille des ST3Gal sont dispersés dans le génome humain. ST3Gal I est localisée au niveau du chromosome 8, ST3Gal II au niveau du chromosome 1 (p21-34), ST3Gal III au niveau du chromosome 1 (p34-33), ST3Gal IV au niveau du chromosome 11 (q23-24) (Chang *et al.*, 1995).

En conclusion, la régulation transcriptionnelle des sialyltransférases apparaît très complexe. Elle fait intervenir des mécanismes d'épissage alternatif ainsi que l'utilisation de nombreux promoteurs. Les promoteurs contrôlant la transcription de ces enzymes possèdent des sites de fixation pour un grand nombre de facteurs de transcription. Ceci est parfois tissu-spécifique, par exemple HNF-5, HNF-4 et C/EBP, spécifiques du foie. Ils peuvent être dans certains cas conservés au cours de l'évolution. Chez l'Homme et le Rat, le site de fixation du facteur HNF-1 est retrouvé à la même position dans les promoteurs des transcrits hépatiques.

Région promotrice gouvernant les ARNm de types A1, A2 et B3 de ST3Gal IV



Région promotrice gouvernant l'ARNm de type B2 de ST3Gal IV

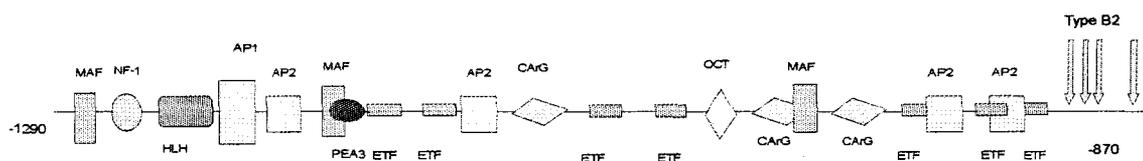


Figure 17 : Les deux régions promotrices connues de ST3Gal IV.

La région promotrice gouvernant le transcrit de type A1, A2 et B3 contient 6 séquences similaires reconnues par le facteur de transcription AP2. De plus, 3 séquences consensus pour le facteur de transcription MAF (mammary cell activateur factor), ainsi qu'une pour le facteur de transcription Sp1, et aussi 4 pour le facteur de transcription ETF (qui stimule la transcription des promoteurs ne portant pas la séquence TATA) ont été identifiées. Il existe, également, 2 séquences consensus pour les facteurs de transcription LF-A1, 1 pour HLH (helix-loop-helix proteins) et 1 pour NF-1.

La région promotrice gouvernant la transcription de la forme B2 contient également des séquences de motifs similaires : trois MAF, un AP1, quatre AP2, sept ETF, un HLH, un NF-1 et un PEA3. Trois séquences CArG, fixant un facteur de transcription nécessaire pour l'expression de gènes spécifiques des muscles lisses, ont été trouvés, ainsi qu'une séquence consensus OCT (octamer binding transcription factor) qui est reconnue par une protéine octamérique impliquée dans le contrôle du gène de l'histone 2b, ainsi que dans celui d'un gène codant la protéine TRP1 protéine liée à une "tyrosinase" spécifique des mélanocytes (Kitagawa *et al.*, 1996).

C- Les sialyltransférases et le cancer.

Depuis plus de 20 ans, de nombreuses études ont été réalisées sur les activités sialyltransférasiques dans les cancers afin de déterminer si l'augmentation de la sialylation observée au niveau des cancers et en particulier des motifs sialyl-Lewis^X, sialyl-Lewis^a et sialyl-Tn, utilisés comme facteurs pronostiques, était le résultat d'une modification de ces activités.

Il y a 20 ans, les connaissances sur les sialyltransférases étaient très sommaires et la mesure de ces activités se faisait essentiellement en utilisant l'asialofétuine comme substrat accepteur. On sait aujourd'hui que le transfert d'acide sialique sur ce substrat est le résultat de l'action de nombreuses sialyltransférases.

Les études basées sur cette mesure des activités à l'aide de l'asialofétuine, ont montré une augmentation des activités sialyltransférasiques dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. Ainsi, des patients atteints d'adénocarcinomes épithéliaux de l'ovaire, ont des activités sialyltransférasiques augmentées dans 100% des cas par rapport à des tissus normaux (Chatterjee *et al.*, 1979). Une autre étude portant sur des tumeurs du sein et du côlon montre que les activités sialyltransférasiques sont augmentées dans les tissus humains malins et néoplasiques par rapport aux tissus normaux, bénins ou pré-néoplasiques (Bosmann & Hall, 1974). L'étude générale de plusieurs tumeurs de différents tissus (carcinome bronchique, colique et hépatocarcinome) comparées aux tissus sains correspondants pour un même individu confirme ces observations (Berge *et al.*, 1984). Les activités sialyltransférasiques ont été étudiées dans les tumeurs humaines mammaires à l'aide de trois accepteurs différents l'asialofétuine, le lactose et asialo-BSM (Bovine submaxillary mucin), une augmentation de ces activités a été observée à l'aide de ces trois accepteurs dans les tumeurs par rapport aux tissus adjacents normaux (Kishore *et al.*, 1985). Au niveau des cellules lymphoblastiques leucémiques, les activités sialyltransférasiques sont également plus fortes par rapport aux lymphocytes de patients normaux (Rosswski & Srivastava, 1983).

D'autres études, par contre, ont montré plutôt une diminution de ces activités dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. En effet, ces activités seraient

diminuées dans les tumeurs métastatiques du foie par rapport aux tissus humains hépatiques normaux (Alhadeff & Holzinger, 1982), ainsi que dans les leucémies, où l'étude de Sasaki *et al.* (1982) est en contradiction avec celle de Rosswski & Srivastava en 1983.

Toutes ces études montrent que les activités sialyltransférasiques sont modifiées dans les processus de cancérisation.

Par la suite, les connaissances sur les activités sialyltransférasiques ayant évoluées, des accepteurs plus spécifiques ont été utilisés pour déterminer la ou les sialyltransférases responsables de ces variations. Grâce au développement du clonage des ADNc de ces enzymes dans les années 1993-98, de nouvelles sialyltransférases ont été identifiées. Ceci a permis de montrer que certaines enzymes pouvaient agir sur le même substrat accepteur. Les mesures d'activités ne permettant plus de les différencier, l'analyse de leur expression transcriptionnelle a été entreprise.

1 - Modifications de la sialylation des N-glycannes : le rôle de ST6Gal I.

Les sialyltransférases agissent à la fin de la biosynthèse des N-glycannes. Ces modifications d'activités sialyltransférasiques concernent essentiellement l'activité ST6Gal I.

Les activités sialyltransférasiques détectées en utilisant comme accepteur l'asialio-orosomucoïde, portant uniquement des N-glycannes, sont augmentées dans les tumeurs du côlon, au stade D de la classification de Duke, par rapport à la muqueuse normale. De plus, ces tumeurs fixent plus la SNA, lectine spécifique de la liaison d'acide sialique en $\alpha 2,6$, ce qui semble montrer que ST6Gal I est augmentée dans les tumeurs du côlon (Kemmer *et al.*, 1994). Une autre étude montre que l'augmentation de la fixation de la SNA au niveau des carcinomes du côlon par rapport aux tissus adjacents sains, n'est pas due à une augmentation de l'antigène sialyl-Tn. En effet, les protéines détectées par la SNA ne sont pas détectées par un anticorps anti-sialyl-Tn. De plus, cette augmentation de sialylation en $\alpha 2,6$ est corrélée à une augmentation de l'activité et du taux d'ARNm de ST6Gal I (Murayama *et al.*, 1997). Une autre étude

réalisée directement sur des tissus issus de 6 patients ayant subi une colostomie pour un adénocarcinome colique, montre une augmentation de 2,6 fois du taux d'ARNm de ST6Gal I par rapport aux tissus sains adjacents (Li *et al.*, 1995). Cette augmentation d'activité et du taux d'ARNm de ST6Gal I semble donc en rapport avec une augmentation de la sialylation en $\alpha 2,6$ et l'apparition de cancers dans le côlon.

Au niveau cellulaire, la transfection de fibroblastes de Rat par l'oncogène *ras* induit une augmentation de la sialylation en $\alpha 2,6$ qui résulte d'une augmentation du taux de transcription de ST6Gal I. Et cette augmentation de sialylation est associée à un potentiel invasif augmenté des cellules transfectées (Le Marer *et al.*, 1992; Le Marer & Stéhelin, 1995). Au niveau des cellules de mélanomes BL6, la transfection par un ADNc de l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase ou de l' $\alpha 1,2$ -fucosyltransférase, qui concurrence l'action de ST6Gal I pour le substrat Gal $\beta 1-4$ GlcNAc-R, diminue le taux de sialylation et aboutit à l'obtention d'un phénotype moins métastatique (Gorelik *et al.*, 1997).

Cependant, la corrélation d'une augmentation de ST6Gal I à un phénotype tumoral ou métastatique n'est pas toujours évidente. Ainsi, dans les tumeurs du cerveau, l'expression de l'activité ainsi que du taux d'ARNm de ST6Gal I, est plus faible au niveau des tissus malins par rapport aux tissus bénins (Yamamoto *et al.*, 1995). Une étude histochimique complémentaire, à l'aide d'un anticorps dirigé contre ST6Gal I de Rat, mais également à l'aide d'une sonde d'ADNc de ST6Gal I, indique que l'expression de cette enzyme est importante au niveau de différents sous-types de méningiomes, alors que toutes les tumeurs originaires de gliomes ou de méduloblastomes en sont dénuées. (Kaneko *et al.*, 1996). Au niveau cellulaire, un mutant WGA résistant de cellules lymphoblastiques MDAY-D2 montre une augmentation de l'activité enzymatique ainsi que du taux d'ARNm de ST6Gal I par rapport à la lignée parentale non résistante, mais correspond à un phénotype moins métastatique (Takano *et al.*, 1994).

Une augmentation de l'activité et du taux d'ARNm de ST6Gal I peut donc être associée soit à une augmentation, soit à une diminution du caractère tumoral ou métastatique des cellules.

2- Modifications de la sialylation spécifique des O-glycannes

La sialylation peut intervenir dès le début de la biosynthèse des O-glycannes. Cette sialylation précoce empêche l'élongation des chaînes O-glycanniques. Dans les cancers, une augmentation de sialylation est associée à des chaînes O-glycanniques courtes.

Une altération dans la synthèse des O-glycannes et notamment une augmentation de 4 fois de l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase (ST3Gal I, ST3Gal II ou ST3Gal IV) ainsi qu'une diminution de l'activité GalNAc-peptide α 2,6-sialyltransférase (ST6GalNAc I), responsable de la formation de l'antigène sialyl-Tn, ont été observées dans les tissus cancéreux du côlon par rapport aux tissus normaux adjacents aux tumeurs (Yang *et al.*, 1994). Une autre étude montre également que l'activité ST6GalNAc I est de plus en plus faible dans des lignées humaines coliques issues de polypes, qui ont des phénotypes de plus en plus agressifs (Vavasseur *et al.*, 1994).

Les cellules de patients atteints de leucémie chronique présentent une activité α 2,3-sialyltransférase élevée vis à vis de l'accepteur Gal β 1-3GalNAc dans leurs granulocytes matures, par rapport à des patients normaux (Kanani *et al.*, 1990). Au niveau du cancer du sein, une étude publiée en 1995 par Brockhausen *et al.* montre une augmentation importante de l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase dans les cellules MCF-7 par rapport aux cellules épithéliales mammaires normales immortalisées MTSV1-7, se traduisant par une augmentation de la sialylation de la mucine membranaire MUC1. On sait maintenant que cette activité est le résultat de deux enzymes, ST3Gal I et ST3Gal II, ayant une spécificité de substrats très voisine mais codées par des gènes différents (Tableau IV, page 42 et 43). L'étude par Northern-Blot à l'aide d'une sonde spécifique de ST3Gal I n'a cependant pas révélé de variation du taux de transcription pouvant expliquer cette augmentation d'activité. De plus, la transfection par l'ADNc de ST3Gal I dans les cellules épithéliales malignes de cancer du sein T47D, est corrélée à une augmentation de l'activité, ainsi qu'à une augmentation de la sialylation de la O-glycosylation de la mucine épithéliale MUC1. La même expérience réalisée sur les cellules MTSV1-7, non tumorales donne le même résultat : une augmentation de la sialylation des structures Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr,

accompagnée d'une réduction du rapport GlcNAc/GalNAc des O-Glycannes de MUC1, indiquant une diminution du degré de branchement (Whitehouse *et al.*, 1997).

En conclusion, une augmentation de l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase semble aboutir à une diminution de la longueur des chaînes O-glycanniques, observées dans les cancers. Toutefois, cette diminution ne semble pas être associée, dans les cancers du côlon, à l'augmentation de l'activité ST6GalNAc I, qui permet la synthèse de sialyl-Tn, marqueur pronostique de ces cancers.

3- Les sialyltransférases intervenant dans la synthèse des déterminants sialyl-Lewis^a et sialyl-Lewis^X.

Les déterminants sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a peuvent être portés par les chaînes O- et N- glycanniques, ainsi que par les glycolipides.

La synthèse de l'antigène sialyl-Lewis^a nécessite l'intervention de l'activité ST3Gal III suivies par les activités α 1,4 fucosyltransférases. Une étude sur des tumeurs du côlon montre une activité ST3Gal III augmentée en relation avec l'augmentation de la reconnaissance de l'antigène sialyl-Lewis^a par l'anticorps CA 19-9 alors que l'activité α 1,4 fucosyltransférase ne varie pas (Akamatsu *et al.*, 1997). Une autre étude montre également que les tissus cancéreux issus de patients atteints de cancer du côlon expriment plus de sialyl-Lewis^a. De plus, les taux d'ARNm de ST3Gal I et de FUT IV (synthétisant les motifs Lewis^Y et Lewis^X), étudiés par Northern-Blot et RT-PCR, sont plus élevés par rapport aux tissus sains adjacents. Par contre, il n'y a pas de variation pour les taux d'ARNm de ST3Gal III et IV, ainsi que de Fut III (synthétisant le motif sialyl-Lewis^a), V, VI, et VII, dans les deux types de tissus, cancéreux ou sains. De plus, la transfection dans les cellules Cos-7 de l'ADNc de ST3Gal I, montre que l'activité résultante s'exerce sur des structures de type 1, précurseurs du sialyl-Lewis^a (Ito *et al.*, 1997).

Le traitement par le GalNAc- α -O-benzyl, inhibiteur de la O-glycosylation, des cellules humaines HM7 de cancer de côlon induit une diminution de l'adhésion de ces cellules aux E-selectines, ainsi qu'une diminution de la fixation des anticorps SNH-3 et 19-9 spécifiques respectivement des structures sialyl-Lewis^X et sialyl-Le^a, par rapport

aux cellules non traitées (Yoon *et al.*, 1996). Une augmentation de l'expression de l'antigène sialyl-Lewis^a a été observée dans des lignées LM-H3 et LM-H5 provenant de la lignée parentale, OCUC-LM1 (LM), établie à partir de métastases hépatiques du cancer du côlon. Les lignées filles possèdent un phénotype plus métastatiques que la lignée parentale. L'adhésion de ces cellules est inhibée à la fois par l'anticorps anti-sialyl-Lewis^a et par l'anticorps anti-E-selectine. Mais cette augmentation de l'expression de l'antigène sialyl-Lewis^a n'a pu être corrélée à une augmentation de l'activité ST3Gal III, seule une activité α 1,4 fucosyltransférase paraît augmentée (Yamada *et al.*, 1997). Cependant, l'adhésion entre les cellules du côlon HT-29, COLO 205 et les E-selectines, par l'intermédiaire des motifs sialyl-Lewis^a et sialyl-Lewis^x, augmente par induction par le TNF. De plus, le TNF induit une augmentation du taux des ARNm de ST3Gal III et des α 1,4/ α 1,3 fucosyltransférases (Majuri *et al.*, 1995). Au niveau de cancer du cerveau, l'augmentation de la sialylation en α 2,3 est corrélée à une augmentation du taux d'ARNm de ST3Gal III (Yamamoto *et al.*, 1997).

Ainsi, la synthèse du déterminant sialyl-Lewis^a serait associée dans les cancers à l'augmentation des activités ST3Gal III, ST3Gal I et/ou à l'augmentation des α 1,4 fucosyltransférases.

4- Sialylation spécifique des gangliosides.

L'activité CMP-NeuAc : LacCer α 2,3-sialyltransférase (EC 2.4.99.9, G_{M3} synthase) est déficiente dans les cellules humaines de mélanome T1C3 provoquant des métastases dans le poumon, ces cellules accumulent du lactosylceramide par rapport à la lignée non métastatique IC8 (Zebda *et al.*, 1995). L'expression de la G_{D3} Synthase (EC 2.4.99.8, ST8Sia I) a été analysée dans les mélanomes par Northern blot et par RT-PCR, et est corrélée à l'expression de l'activité enzymatique et des gangliosides correspondants (Yamashiro *et al.*, 1995).

Ainsi, l'expression des sialyltransférases intervenant dans la synthèse des gangliosides semblent également dérégulées dans les cancers.

D- Conclusion

Les activités sialyltransférasiques semblent donc subir des variations au cours du processus de cancérisation, en relation avec les modifications de glycosylation à la surface cellulaire. Les causes de ces variations observées depuis de nombreuses années, commencent seulement à être éclaircies par la précision de la ou des sialyltransférases particulières impliquées dans ces mécanismes. En effet, les dosages d'activités ne permettent pas de différencier les sialyltransférases agissant sur les mêmes substrats. Aujourd'hui, l'obtention des ADNc de nombreuses sialyltransférases permet de définir clairement les enzymes exprimées dans un tissu ou dans une cellule. Les études de l'expression transcriptionnelle des sialyltransférases dans les cancers n'ont en fait débuté que depuis quelques années et nous avons voulu apporter notre contribution à ces travaux, en étudiant les sialyltransférases exprimées dans les cancers épithéliaux et notamment dans le cancer du sein.

Résultats

I- LES SIALYLTRANSFERASES DANS LE CANCER DU SEIN.

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité chez la femme. En 1994, les cancers du sein ont provoqué 10 910 décès (dont 120 hommes) en France. Ramené à l'ensemble de la population, ce chiffre reste inférieur aux décès provoqués par les cancers du poumon et les cancers colorectaux, mais est cependant supérieur à ceux des décès provoqués par les autres types de cancers (Tableau VIII, page 70).

Tableau VIII: Nombre de décès du aux douze principaux type de cancer, en 1994, en France. (Statistiques INSERM sur les causes de décès en France)

Type de cancer	Nombre de décès en France en 1994
Cancer de la prostate	9270
Cancer du sein	10 910 (dont 120 hommes)
Cancer du poumon	23 115 (dont 19 784 hommes)
Cancer colorectal	16 020 (dont 8 280 hommes)
Cancer de la vessie	4 340 (dont 3 296 hommes)
Lymphomes non Hodgkiniens	6 026 (dont 3 054 hommes)
Cancer de l'utérus	3 083
Mélanome	1 523 (dont 782 hommes)
Cancer du rein	3 303 (dont 2 077 hommes)
Leucémie	4 683 (dont 2 541 hommes)
Cancer de l'ovaire	3 212
Cancer du pancréas	6 280 (dont 3 343)

La mortalité liée aux cancers du sein a progressé de 15,3 % entre 1983 et 1993, bien qu'une chute de plus de 5% se soit produite entre 1989 et 1993.

Le risque d'apparition du cancer du sein est augmenté en cas d'antécédent familial. Un premier gène dont l'altération est à l'origine d'une prédisposition à ce cancer : BRCA1 (Breast Cancer 1) a été localisé, sur le chromosome 17 (Tableau IX, page 71) (Stoppa-Lyonnet *et al.*, 1997). Un autre gène de susceptibilité, BRCA2 a été localisé sur le chromosome 13. Les fonctions de ses protéines sont encore mal connues.

Tableau IX : Risque cumulé (0-75 ans) d'apparition de cancer du sein en fonction de la présence de mutation du gène BRCA1.

	Absence de mutation du gène BRCA1	Présence de mutation du gène BRCA1
Incidence cumulée (0-75 ans) de cancer du sein	7-10 %	80-90 %

A l'heure actuelle, la meilleure stratégie pour limiter le risque d'apparition des tumeurs du sein est la prévention. Plus de 80 % des cancers traités au stade où la taille de la tumeur est inférieure à 2 cm, peuvent prétendre à la guérison.

L'autopalpation et la mammographie permettent de détecter des tumeurs assez petites. Mais, dans le meilleur des cas, le diagnostic reste relativement tardif. Il est rare de diagnostiquer des tumeurs de moins d'un centimètre, et dans 30 % des cas, le cancer est agressif dès le diagnostic, avec des métastases ganglionnaires.

MUC 1, une sialomucine membranaire épithéliale, est relarguée des cellules et apparaît dans le sérum des patientes atteintes de cancer du sein. Cette mucine circulante, connue sous le terme d'antigène CA 15-3, est détectée par une méthode immuno-radiométrique qui combine deux anticorps monoclonaux (115D8 et DF3). Un grand nombre de patientes atteintes à des stades avancés de cancers du sein, ont un taux élevé de MUC1 circulante. Au moment de la découverte de la première métastase, le CA 15-3 est retrouvé à un taux élevé dans 80 % des cas et des taux supérieurs à quatre fois au seuil de normalité sont presque exclusivement associés à des métastases. Cette méthode n'est cependant pas adaptée à la détection précoce des cancers du sein (Hayes *et al.*, 1992).

En plus de ce marqueur biologique glycoprotéinique, de nombreux changements de glycosylation sont associés aux cancers du sein. Ainsi, l'épitope Tn détecté grâce à la lectine HPA, les antigènes Sialyl-Tn et Sialyl-Le^x sont des marqueurs pronostiques de l'agressivité des cancers du sein (Généralités, Chap. I-B-1, page 16). Les augmentations d'antigènes sialylés seraient associées à des variations d'activités sialyltransférasiques. Ainsi dans les tumeurs du sein, les activités sialyltransférasiques sont, en général, augmentées par rapport aux tissus adjacents normaux (Généralités, Chap. II-C, page 63). Cependant, très peu de travaux ont été effectués sur l'expression des Sialyltransférases dans les cancers du sein, et la majorité de ces études reste très fragmentaire. Seule, une étude publiée en 1995 par Brockhausen *et al.* montre une

augmentation importante de l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase dans les cellules MCF-7 par rapport aux cellules épithéliales mammaires normales immortalisées MTSV1-7, se traduisant par une augmentation de la sialylation de MUC 1.

Le peu d'information concernant les activités sialyltransférasiques dans les cancers du sein, et les progrès considérables effectués au cours des années 1994-95 dans le domaine du clonage des ADNc des sialyltransférases humaines (7 sialyltransférases humaines étaient clonées au début de ce travail (Tableau X, page 72), alors qu'une seule l'était en 1993), nous ont conduit à nous intéresser aux modifications de l'expression de ces enzymes sur différents modèles cellulaires mammaires, les cellules HBL100, MCF7/6, MCF7/AZ et MDA-MB-231. Pour cela, nous avons utilisé tout d'abord des techniques classiques : étude de la sialylation à l'aide de lectines spécifiques et dosages des activités enzymatiques.

Tableau X : Sialyltransférases humaines dont l'ADNc était cloné en 1995.

Nom systématique	N° EC	Accepteur (s)	origine, tissulaire	N° d'accès à GenBank
ST6Gal I	2.4.99.1	Gal β 1-4GlcNAc	placenta	X17247
ST3Gal I	2.4.99.4	Gal β 1-3GalNAc	placenta	L29555
ST3Gal III	2.4.99.6	Gal β 1-3(4)GlcNAc	placenta	L23768
ST3Gal IV	2.4.99.-	Gal β 1-4GlcNAc et Gal β 1-3GalNAc	placenta	L23767; X74570
ST8Sia I	2.4.99.8	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc-Cer	cellules de mélanome	X77922; D26360; L32867; L43494
ST8Sia II	2.4.99.-	(NeuAc α 2-8) _n NeuAc α 2-3-N-Glycans	placenta	L29556
ST8Sia IV	2.4.99.-	(NeuAc α 2-8) _n NeuAc α 2-3-N-Glycans	cerveau d'embryon	L41680

A- Les modèles cellulaires

Dans un premier temps, nous avons choisi quatre lignées cellulaires épithéliales mammaires, se différenciant par leurs caractères tumoral et métastatique, de manière à

tenter de corrélérer ces caractéristiques à une différence d'expression de sialyltransférases:

- HBL-100 : Il s'agit de cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées par intégration du génome du virus SV40, isolées par Gaffney et ses collaborateurs à partir du lait de femme (Gaffney *et al.*, 1979).
- MCF-7/AZ : C'est une lignée épithéliale mammaire isolée d'une effusion pleurale (Soule *et al.*, 1973). Cette lignée a conservé quelques caractéristiques d'épithélium mammaire différencié telle que la réponse à l'oestradiol *via* des récepteurs aux oestrogènes.
- MCF-7/6 : Ce sont des cellules dérivant des MCF-7/AZ par traitement d'un agent anti-mycoplasmique. Contrairement aux précédentes, ces cellules sont invasives (Bracke *et al.*, 1991) et le traitement par une sialidase abolit l'agrégation de ces cellules par la E-cadherine (Deman *et al.*, 1995).
- MDA-MB-231 : C'est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'adénocarcinome de sein (Cailleau *et al.*, 1974). Cette lignée se caractérise par une absence de récepteurs aux oestrogènes. Les cellules MDA-MB-231 sont métastatiques et tumorigènes dans les souris BALB/c immunodéprimées.

B- Les capacités d'agrégation des cellules

Nous avons utilisé une approche cellulaire *in vitro* de manière à confirmer les caractéristiques invasives de ces cellules mammaires, au travers d'une collaboration avec le Pr. MAREEL et le Pr. BRUYNEEL (Laboratory of Experimental Cancerology, University Hospital, Gand, Belgique). Nous avons déterminé les capacités d'agrégation des cellules en suspension par la méthode de Kadmon *et al.* (1990) modifiée. Les propriétés d'agrégation des cellules sont inversement reliées à la capacité de celles-ci à s'échapper et à former des métastases *in vivo* (Van Roy & Mareel, 1992; Mareel *et al.*, 1993).

Au temps 0, les cellules ont été individualisées (Figure 18, page 74). Le diamètre moyen des particules est calculé en μm (Tableau XI, page 75). Après 30 min, les

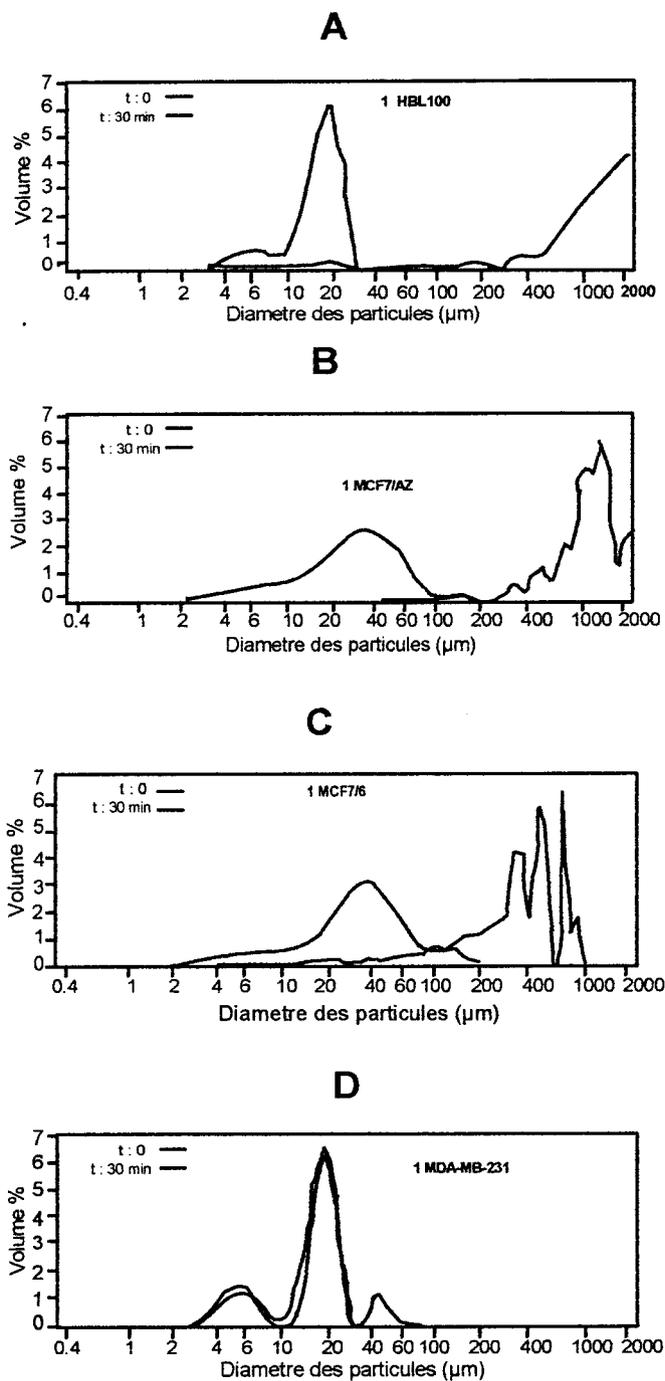


Figure 18 : Analyse de l'agrégation des cellules HBL100 (A), MCF7/AZ (B), MCF7/6 (C), MDA-MB-231 (D) au temps zéro (courbe en bleu), et au temps 30 min (courbe en rouge). En abscisse est indiqué le diamètre moyen des particules, en ordonnée le volume (en %) occupé par ces particules.

contacts intercellulaires ont pu s'effectuer et le diamètre moyen des particules formées est le reflet de la force de l'agrégation cellulaire.

Tableau XI : Comparaison du diamètre moyen des particules avant et après formation d'agrégats.

lignée cellulaire	Diamètre moyen des particules au temps 0 (μm)	Diamètre moyen des agrégats formés après 30 min (μm)
HBL100	17,30	1175
MCF7/AZ	30	1117
MCF7/6	32	402,5.
MDA-MB-213	18,3	19,1

La comparaison du diamètre moyen des agrégats (Tableau XI, page 75) formés par les différentes lignées cellulaires permet d'observer une capacité d'agrégation différente de ces cellules. Les cellules HBL100 et MCF7/AZ ont un diamètre moyen des agrégats formés élevé, tandis que celui des cellules MCF7/6 est plus faible. Ceci traduit une agrégation de moins en moins importante. Enfin, les cellules MDA-MB-231 ont un diamètre moyen non modifié au cours du temps, elles ne sont donc pas capables de s'agréger. Comme une agrégation faible se traduit par un potentiel fortement métastatique de la cellule, on peut dire que les cellules HBL100 et MCF7/AZ ne sont pas invasives, alors que les cellules MDA-MB-231 sont plus fortement invasives que les cellules MCF7/6. Les données de la littérature sont donc confirmées par ces résultats.

C- Analyse des glycoconjugués à l'aide de lectines dans les lignées cellulaires du cancer du sein.

Dans un premier temps, nous avons tenté de caractériser d'éventuelles différences de glycosylation, et en particulier de sialylation, des glycoprotéines exprimées par ces quatre lignées cellulaires à l'aide de lectines.

L'analyse de la sialylation des glycoprotéines des homogénats cellulaires des différentes lignées mammaires, HBL100, MCF7/AZ, MCF7/6 et MDA-MB-231, a été réalisée, après séparation sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, en milieu

réducteur, et électro-transfert sur membrane de nitrocellulose. La révélation des glycoprotéines sialylées a été effectuée par fixation de la lectine marquée à la digoxygénine. La spécificité de ces lectines est indiquée dans le tableau XII (page 76).

Tableau XII : Spécificité des lectines utilisées dans cette étude.

Lectine	Structure reconnue	origine	Référence bibliographique
SNA	Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>	Shibuya <i>et al.</i> , 1987
MAA	Neu5Ac α 2-3Gal	<i>Maackia amurensis</i>	Wang <i>et al.</i> , 1988
PNA	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr	<i>Arachis Hypogaea</i>	Lotan <i>at al.</i> , 1975

Quelque soit la lignée cellulaire, il n'y a pas de fixation de la lectine PNA, témoignant de l'absence d'antigène T non sialylé, alors que l'asialofétuine porteuse de ce motif, fixe la lectine PNA (Figure 19, page 77). Après action de la sialidase de *clostridium perfringens*, plusieurs glycoprotéines des quatre lignées cellulaires fixent la lectine PNA montrant le démasquage de l'antigène T. L'antigène T sialylé est fortement exprimé dans les cellules MDA-MB-231 et plus faiblement dans les cellules HBL100 et MCF7. Nous pouvons noter une présence légèrement supérieure de ce motif dans les lignées MCF7/6 par rapport aux cellules MCF7/AZ.

La révélation par la MAA suit le même profil et témoigne de la présence de l'antigène T sialylé.

La révélation par la SNA est plus intense pour les cellules HBL100 et MCF7/6 que pour les cellules MCF7/AZ et MDA-MB-231. Il semble donc y avoir plus de glycoprotéines sialylées en α 2,6 dans les cellules HBL100 et MCF7/6 que dans les cellules MCF7/AZ et MDA-MB-231. Il existe donc bien des variations de la sialylation des glycoprotéines de ces différentes lignées cellulaires mammaires.

Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec ceux décrivant la glycosylation de ces cellules. Deux études de Schumacher *et al.* (1995), et de Mitchell *et al.* (1995) avaient montré que les cellules HBL100 fixent moins la lectine HPA (*Helix Pomatia Agglutinine*) que les cellules MCF7. Il semblerait donc que les cellules HBL100 possèdent moins de structures Tn que les cellules MCF7. D'autre part, la MAA se fixe plus sur les cellules MCF7 que sur les cellules HBL100, tandis que la SNA se fixe moins sur les cellules MCF7 (Schumacher *et al.*, 1996). Ceci semble indiquer que les cellules MCF7 porteraient plus d'acide sialique lié en α 2,3 et les cellules HBL100

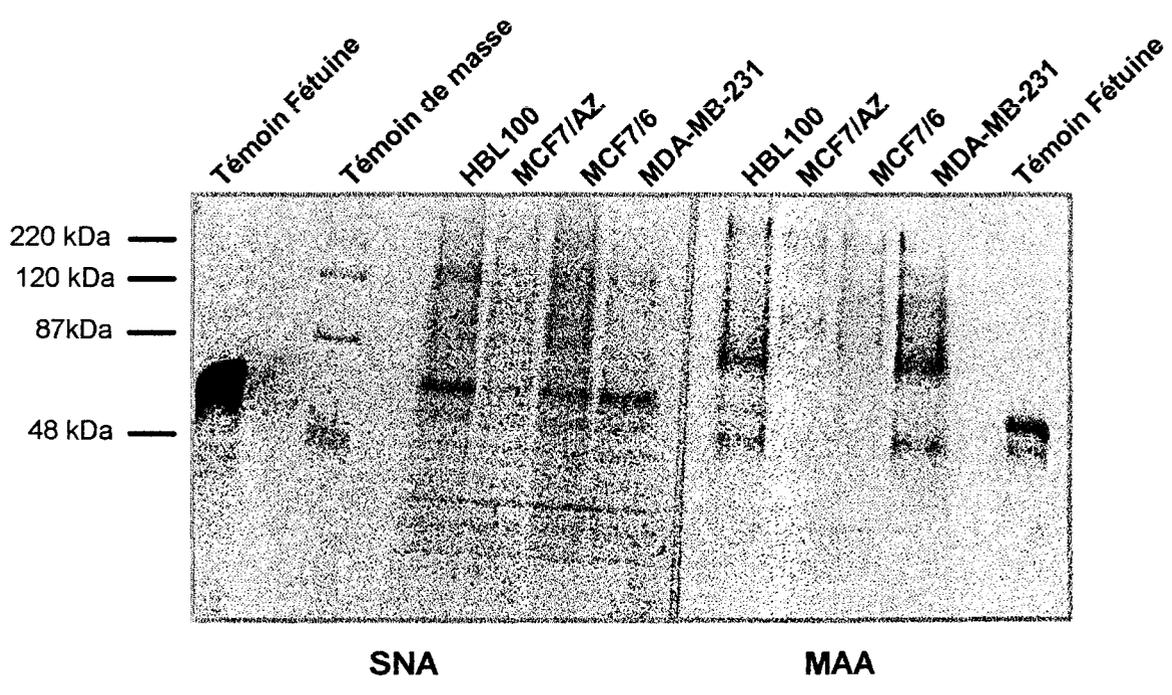
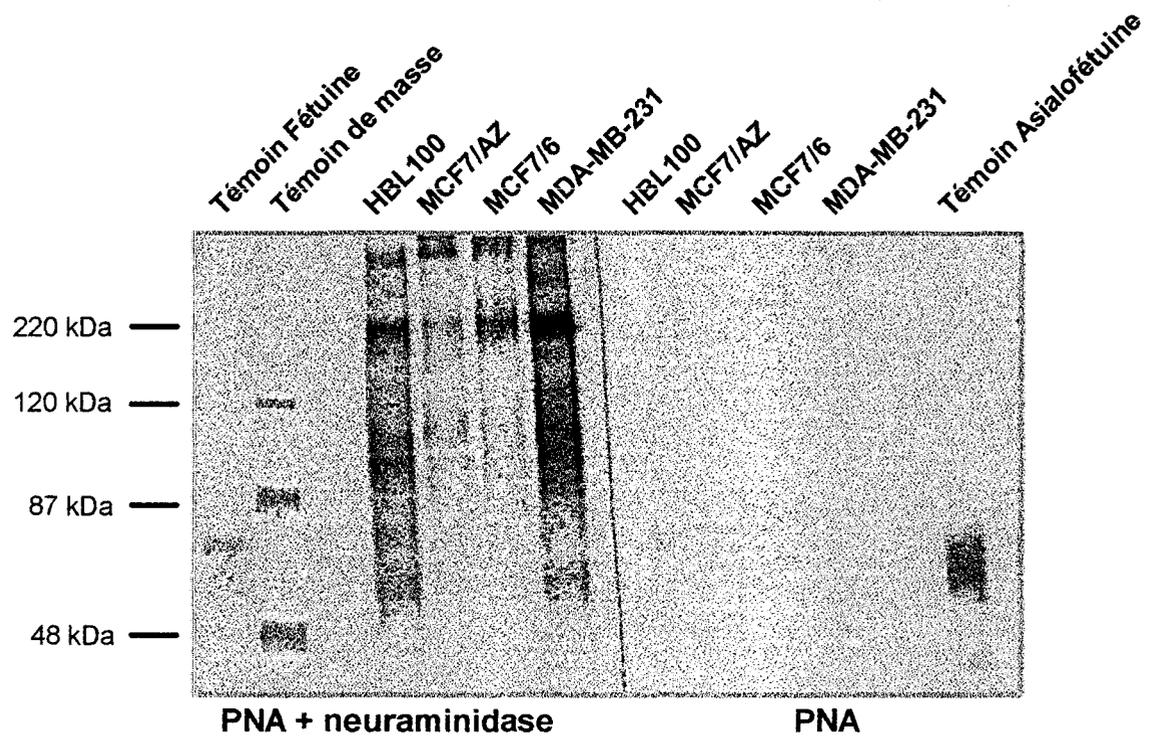


Figure 19 : Western-Blots révélés par les lectines marquées à la digoxigénine des glycoprotéines des lignées cellulaires mammaires.

seraient plus sialylées en $\alpha 2,6$. Enfin, les cellules MCF7 semblent exprimer un taux plus élevé d'antigène T que les cellules HBL100. Dans notre cas, la lectine MAA, montrant la présence d'acide sialique en $\alpha 2,3$ se fixe plus sur les cellules HBL100 que sur les cellules MCF7, ce qui est en opposition avec les résultats de Schumacher *et al.*, (1996). Par contre les résultats obtenus avec la SNA, montrant la présence d'acide sialique en $\alpha 2,6$ semblent plus concordants, en particulier pour les cellules MCF7/AZ qui fixent moins la SNA que les cellules HBL100. Ces différences de profil peuvent s'expliquer par le fait que l'étude de Schumacher *et al.* (1996), a été effectuée sur des cellules entières en utilisant des lectines fluorescentes, alors qu'ici on observe la fixation sur les glycoprotéines de la cellule.

D- Mesure des activités sialyltransférasiques.

Dans un second temps, nous avons voulu savoir si ces différences de sialylation observées au niveau des lignées cellulaires mammaires étaient liées à des variations d'activités des sialyltransférases. Pour cela, nous avons mesuré les activités sialyltransférasiques à partir des différents homogénats cellulaires en utilisant les substrats détaillés dans le tableau XIII (page 78), les cellules étant récoltées juste avant la confluence.

Tableau XIII : Activité de transfert d'acide sialique sur différents accepteurs glycoprotéiniques et oligosaccharidiques. ASFet, asialofétuine; ASOR, asialo-orosomucoïde

Accepteur	Activité (nmol/mg de protéines.h)			
	HBL100	MCF7/AZ	MCF7/6	MDA-MB-231
ASFet	<0,01	0,24	0,20	0,28
ASOR	0,05	0,06	0,13	0,07
Gal β 1-3GalNAc-Benzyl	0,34	1,57	1,12	1,14
Gal β 1-4GlcNAc	0,02	0,05	0,08	<0,01
Fetuine	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

L'asialofétuine (ASFet) contient trois N-glycannes tri-antennés et trois O-glycannes de structure Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr, et peut être utilisée comme accepteur par les différentes sialyltransférases actives sur les N- et O-glycannes. Les premiers résultats obtenus montrent l'existence de variations importantes des activités sialyltransféra-siques dans les différentes lignées cellulaires étudiées. En effet, les lignées cancéreuses montrent toutes une augmentation de ces activités comparées aux cellules HBL100, lignée épithéliale mammaire immortalisée.

L'asialo-orosomucoïde (ASOR) ne possède que des structures N-acétyllactosaminiques tri- et tetra-antennées, et est préférentiellement le substrat de l'activité ST6Gal I, les activités ST3Gal III et ST3Gal IV pouvant agir, mais à un moindre degré. Le transfert sur ce substrat est augmenté d'un facteur 2,6 dans les cellules MCF7/6 par rapport aux cellules HBL100, alors qu'il reste pratiquement identique dans les cellules MCF7/AZ et MDA-MB-231.

Le transfert d'acide sialique en α 2,3 sur le substrat Gal β 1-3GalNAc-benzyl est augmenté de 3,3 à 4,6 fois dans les différentes lignées cancéreuses par rapport aux cellules HBL100. Cette augmentation dans les lignées cancéreuses est en accord avec les résultats déjà publiés en 1995 par Brockhausen *et al.* C'est, en outre, l'activité de transfert d'acide sialique la plus exprimée par ces lignées cellulaires, par rapport aux autres activités que nous avons pu doser.

La N-acétyllactosamine [Gal β 1-4GlcNAc] permet de mesurer les activités de ST6Gal I et de ST3Gal IV, la ST3Gal III étant peu active sur ce type de substrat. Les faibles transferts obtenus n'ont pas permis la séparation des deux isomères de sialylation en α 2,6 et en α 2,3. Néanmoins, la somme de ces activités semble augmentée dans les cellules MCF7, par rapport aux cellules HBL100. C'est en particulier le cas de la lignée MCF7/6 qui présente le taux de transfert le plus élevé, ce qui confirme les résultats obtenus avec l'ASOR.

La fétuine non désialylée permet de mesurer le transfert d'acide sialique en α 2,6 sur la GalNAc du point d'attache des O-glycannes, c'est-à-dire les activités ST6GalNAc I, II, et III. Il semble que ces activités ne soient pas ou très faiblement exprimées dans ces cellules, car aucun transfert n'a pu être détecté dans nos conditions d'incubation.

Nous avons également testé d'autres substrats oligosaccharidiques tel que le

Lacto-N-tétraose [Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc], substrat accepteur de ST3Gal III mais sans succès, aucun transfert significatif n'ayant pu être mesuré.

Les activités sialyltransférasiques exprimées par ces cellules sont très faibles et, il est parfois difficile de les détecter. Ainsi, l'activité ST6GalNAc I responsable de la formation du déterminant Sialyl-Tn, marqueur pronostique des cancers du sein, ainsi que l'activité ST3Gal III, ne sont pas détectables dans nos conditions. Cette absence d'activité de certaines sialyltransférases pourrait être due à des conditions expérimentales inadaptées pour ces différents types cellulaires, ou à des activités trop faibles pour une mesure *in vitro*. De plus, la corrélation entre les activités sialyltransférasiques et la détection des déterminants sialylés à l'aide de lectines n'est pas aisée. Ce problème est lié d'une part à la "faible" spécificité de certaines lectines. La SNA reconnaît l'acide sialique lié en α 2,6 sur le Gal, résultat de l'action de ST6Gal I, mais aussi l'acide sialique lié en α 2,6 sur la GalNAc pouvant résulter de l'action de trois autres sialyltransférases : ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, ST6GalNAc III. De même, la lectine MAA reconnaît l'acide sialique lié en α 2,3 sur du Gal, sans spécificité vis-à-vis du disaccharide accepteur : type 1, Gal β 1-3GlcNAc, type 2, Gal β 1-4GlcNAc ou type 3, Gal β 1-3GalNAc, alors que cette sialylation résulte de l'action de sialyltransférases différentes. Toutefois, la spécificité large des lectines ne permet pas toujours d'expliquer les différences entre les activités sialyltransférasiques et la sialylation observée au niveau des lignées cellulaires. Les cellules MCF7/AZ présentent l'activité de transfert d'acide sialique la plus élevée sur ASFet mais les glycoprotéines de cette lignée ne sont que faiblement reconnues par la SNA et la MAA. Cependant, il faut garder à l'esprit que le résultat d'une activité mesurée *in vitro*, peut être différent de son action *in vivo*. D'autre part, d'autres facteurs peuvent intervenir tels que le nombre de substrats accepteurs présents dans la cellule, l'effet d'inhibiteurs ou d'activateurs potentiels, la concentration en sucre donneur (CMP-NeuAc) présent dans un type cellulaire donné, la co-localisation enzyme-substrat nécessaire pour une action enzymatique, etc... La mesure *in vitro* d'une activité est donc parfois difficile à corréler à une observation de sialylation *in vivo*.

A la vue des problèmes rencontrés lors de la détermination des activités sialyltransférasiques et de la faible spécificité des lectines reconnaissant les structures sialylées, et compte tenu de l'impossibilité d'associer spécifiquement la présence d'un

motif sialylé à l'action d'une sialyltransférase sur la base de la mesure des activités enzymatiques, nous nous sommes orientés vers la détermination du taux d'expression transcriptionnelle de chaque sialyltransférase. Pour cela, plutôt que d'utiliser la technique classique de Northern-Blot, nous avons choisi de mettre au point une méthode de multiplex RT-PCR permettant de visualiser simultanément l'expression de quatre sialyltransférases. En effet, l'ensemble des ADNc des sialyltransférases humaines n'était pas à notre disposition, et d'autre part la technique de Northern-Blot ne permet pas de détecter de faibles quantité d'ARNm. Compte tenu des faibles activités sialyltransférasiques mesurées dans les homogénats des cellules mammaires humaines, il était vraisemblable que les taux d'ARNm de ces enzymes soient également très faibles. La RT-PCR permet la détection de faibles taux d'ARNm, rapidement et sur de faibles quantités de matériels biologiques. Ces différentes raisons nous ont amené à mettre au point une technique de détection de l'expression des ARNm des sialyltransférases humaines basée sur la multiplex RT-PCR, en vue de l'appliquer par la suite à des biopsies de patientes atteintes de cancer du sein.

II- Mise au point d'une technique de Multiplex RT-PCR des sialyltransférases humaines.

A- Choix des conditions d'amplification.

Nous avons choisi de concentrer nos efforts sur quatre sialyltransférases intervenant dans la biosynthèse des glycoprotéines :

- la β -galactoside α 2,6-sialyltransférase (ST6Gal I) qui transfère un résidu d'acide sialique en position terminale du motif Gal β 1-4GlcNAc β -R,
- la β -galactoside α 2,3-sialyltransférase (ST3Gal III) qui transfère un résidu d'acide sialique en position terminale du motif Gal β 1-3(4)GlcNAc β -R et qui est vraisemblablement impliquée dans la biosynthèse de l'antigène sialyl-Le^a,
- la Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase (ST3Gal I) responsable de la sialylation des O-glycoprotéines,
- l' α 2,3-sialyltransférase du placenta humain (ST3Gal IV) qui reconnaît principalement les structures Gal β 1-4GlcNAc-R des N-glycoprotéines et qui semble intervenir dans la synthèse de l'antigène sialyl Le^x.

La première étape de ce travail a été de rechercher des couples d'oligonucléotides pouvant servir d'amorce pour la PCR, dans la région 3' de la partie codante de ces quatre sialyltransférases. Chaque couple d'amorces a été défini en dehors des zones d'homologies entre les sialyltransférases. Les différentes sialyltransférases présentent peu d'homologies de séquences (Figure 20, page 83) à l'exception des deux sites consensus appelés Sialylmotifs L et S (Généralités, chap. II, page 38). Ces oligonucléotides ont été choisis de manière à ce qu'ils s'apparient sur des exons distincts, pour éviter l'amplification de fragments à partir de l'ADN génomique. D'autre part, tous les oligonucléotides ont été soigneusement sélectionnés en fonction de leur température d'hybridation, et de leur incapacité à s'hybrider ensemble, de façon à éviter tout mésappariement et à pouvoir les utiliser dans la même réaction et dans les mêmes conditions expérimentales. Les fragments amplifiés ont été choisis de taille

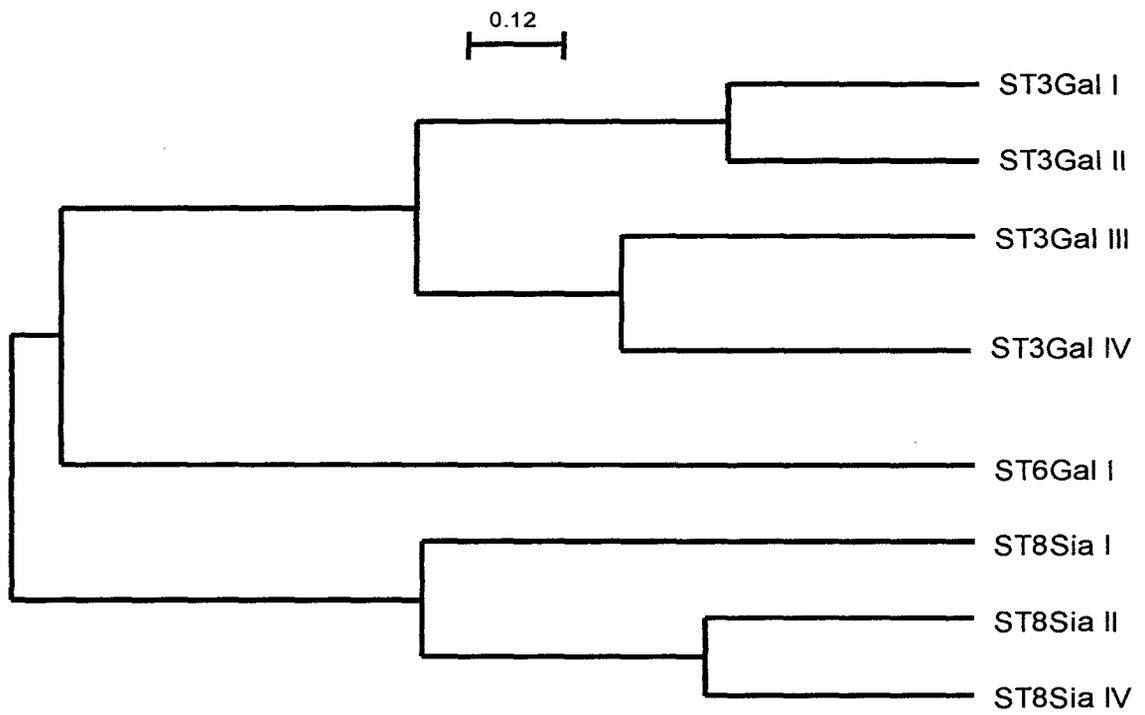


Figure 20 : Dendrogramme reliant les 8 sialyltransférases humaines clonées.

différente afin de pouvoir les différencier sans ambiguïté après séparation électrophorétique.

La deuxième étape a consisté à mettre au point les conditions d'amplification (nombre de cycles, température de dénaturation, d'hybridation et d'amplification) permettant de détecter spécifiquement chacune des sialyltransférases tout en restant en deçà de la saturation.

Enfin, la sélection appliquée lors du choix des couples d'oligonucléotides nous a permis de mettre au point la co-amplification des fragments spécifiques de ces quatre sialyltransférases de manière à obtenir, en une seule réaction, le profil d'expression de ces enzymes, permettant ainsi d'éviter les erreurs inhérentes à la PCR.

Cette technique de Multiplex RT-PCR a été utilisée pour amplifier et détecter l'expression des sialyltransférases dans les cellules épithéliales mammaires décrites précédemment (Recchi *et al.*, 1998).

B- Publication : Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases : application to breast cancer cells.

Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells

Marie-Ange Recchi, Anne Harduin-Lepers, Yolande Boilly-Marer, André Verbert and Philippe Delannoy*

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

In many cases of human cancer, the appearance of hypersialylated glycan structures is related to a precise stage of the disease; this may depend on altered regulation of one or more sialyltransferases genes. Since several distinct sialyltransferase enzymes arising from different unique genes transfer sialic acid residues in the same linkage onto the same acceptor, it is impossible to precisely determine which enzyme is involved in the observed phenotype based on enzymatic assays. We have developed a very sensitive and highly reproducible multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique in order to monitor the expression of four human sialyltransferases genes *ST6Gal I*, *ST3Gal I*, *ST3Gal III* and *ST3Gal IV* in small cell samples. Multiplex PCR amplification using specific primers for each sialyltransferase and detection of amplification products by polyacrylamide gel electrophoresis is a method that is fast and easy to handle and has proven to be useful for establishing sialyltransferase patterns of expression in breast immortalized cell line HBL100 as well as in breast cancer cell lines MCF-7/6, MCF-7/AZ and MDA.

Keywords: sialyltransferases, breast cancer cells, multiplex RT-PCR, glycosyltransferases

Abbreviations: bp, base pair; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; kb, kilobase; PNA, Peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TBE, Tris base 0.13 M, boric acid 45 mM; Na₂EDTA 2.55 mM, pH 8.8 buffer; Tm, melting temperature

Enzymes: the nomenclature of sialyltransferases is based on that of Tsuji *et al.* [36]: ST3Gal I: CMP-NeuAc, Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.4; ST3Gal III: CMP-NeuAc, Gal β 1-3/4GlcNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.6; ST3Gal IV: CMP-NeuAc, Gal β 1-4GlcNAc or Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.-; ST6Gal I: CMP-NeuAc, Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase, EC 2.4.99.1.

Introduction

It is now well established that cell surface glycoconjugates play essential roles in maintaining the function as well as the structure of the living cells. The glycan moiety of glycoconjugates is characteristic of a cell type, and one of the most important findings in the past decade is that the oligosaccharide sequences are strictly controlled during development and differentiation of cells [1–5]. Several examples have shown that these changes in glycan structures result from a fine control of glycosyltransferase expression [6–8]. In pathological states such as cell transformation, the misregulation of glycosyltransferase expression leads to aberrant glycosylated cell surface glycoconjugates [9, 10], and

the higher amount of sialic acids as well as sialyltransferase expression have been associated for a long time with the tumourigenicity and the metastatic potential of tumour cells [11–13].

Sialic acids are a family of sugars found at the non-reducing terminal position of glycan chains of glycoproteins and glycolipids [14]. Because of this terminal position, sialylated oligosaccharide sequences of mammalian cell surface glycoconjugates are involved in many biological processes including cell–cell recognition. The selectin family is the best documented example of cell adhesion molecules at the cell-surface that are able to recognize sialylated ligands such as sialyl-Lewis^x (SLe^x, NeuAc α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-R), and that mediate the adhesion of leukocytes [15–17]. Aberrant expression of Lewis type antigens has been reported for many cancers including those of lung, colon, stomach and kidney [10]. In particular, carcinoma and leukemia cells are enriched in SLe^x structures [10, 18].

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (33).320.43.69.23; Fax: (33).320.43.65.55; E-mail: delannoy@pop.univ-lille1.fr.

Table 1. Human sialyltransferases cDNA cloned.

Systemic name ^a	EC no.	Acceptor(s)	Origin	GenBank accession no.	Reference(s)
ST6Gal I	2.4.99.1	Gal β 1-4GlcNAc	placenta	X17247	26
ST3Gal I	2.4.99.4	Gal β 1-3GalNAc	placenta	L29555	27
ST3Gal III	2.4.99.6	Gal β 1-3(4)GlcNAc	placenta	L23768	28
ST3Gal IV	2.4.99.-	Gal β 1-4GlcNAc and Gal β 1-3GalNAc	placenta	L23767; X74570	29–30
ST8Sia I	2.4.99.8	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc-Cer	melanoma cells	X77922; D26360; L32867; L43494	31–34
ST8Sia II	2.4.99.-	(NeuAc α 2-8) _n , NeuAc α 2-3-N-Glycans	placenta	L29556	27
ST8Sia IV	2.4.99.-	(NeuAc α 2-8) _n , NeuAc α 2-3-N-Glycans	embryonic brain	L41680	35

^aThe abbreviations for sialyltransferases used in this paper are according to the new systematic nomenclature proposed by Tsuji *et al.* [36].

Carcinoma cells are also enriched in sialyl-Lewis^a structures (SLe^a, NeuAc α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-R) [19, 20] which is also a ligand for E-selectin [21, 22]. It is, thus, an attractive hypothesis that tumour cells would use the same selectin-carbohydrate interaction to adhere to endothelial cells during metastasis [23].

The biosynthesis of the sialylated oligosaccharide sequences is catalysed by a family of enzymes named sialyltransferases which use CMP-sialic acid as the activated sugar donor. More than fifteen different sialyltransferases acting on glycoproteins and/or glycolipids have been characterized to date, thirteen of them have been cloned from mammalian and avian sources [24, 25] and seven have been cloned from human tissues or cells (Table 1).

Changes in sialylated structures at the cell surface have been observed during development, differentiation or disease processes. These changes depend on altered regulation of the expression of one or more of the sialyltransferase genes, although other mechanisms such as competition between different enzymes acting on the same acceptor substrate, different enzyme localization in the Golgi apparatus, variations in the concentration of activated sugar donor cannot be excluded. As an example, maturation of thymocytes has been correlated to an increase of the Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal I⁺; EC 2.4.99.4) transcript enhancing sialylation of the T-antigen (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser) and leading to a change from PNA⁺ to PNA⁻ phenotype in medullar thymocytes [37]. Human colon cancer cells have been shown to express higher levels of Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal I; EC 2.4.99.1) when compared to normal mucosa [38] which results in a higher level of sialylated N-glycan structures at the surface of neoplastic mucosa [39]. Finally, fibroblasts transfected with an activated *ras* oncogene result in the enhancement of ST6Gal I enzymatic activity due to higher level of ST6Gal I

mRNA [40], and in an increased invasive potential of the cells [41].

Changes of the glycosylation of O-linked oligosaccharidic chains also occurred in cancer cells in which a higher proportion of short truncated highly sialylated glycans are observed. Sialyl-Tn antigen (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser) which is almost absent from normal cells, is up regulated in tumours and may be considered as a good marker for tumorigenicity [9, 42]. On the other hand, the polymorphic epithelial mucin MUC1, expressed in various breast cancer cells, was shown to be aberrantly glycosylated [43] leading to several abnormally sialylated O-glycoforms [44]. These alterations are due to a several-fold increase of the enzymatic transfer activity of sialic acid residues on to Gal β 1-3GalNAc-R acceptor substrates in breast cancer cells [43]. This sialyltransferase activity may encompass the enzymatic activities of at least three different enzymes: ST3Gal I, ST3Gal II and ST3Gal IV that are encoded by different genes located on separate chromosomes [45]. Thus, these enzymatic activities cannot be distinguished in *in vitro* assays. Northern blot of mRNAs isolated from different breast cancer cell lines hybridized with a bovine ST3Gal I cDNA probe, but the relative levels of expression of ST3Gal I mRNA did not parallel the increased activities observed previously [43].

Human cancer related oligosaccharide structural changes are quite well documented [9] but there is still little information available concerning the regulated expression of sialyltransferase activities in human breast cancer cells. These studies are greatly hindered due to the fact that sialyltransferase proteins are weakly expressed and may have identical transfer activity towards the same acceptor [45].

In this paper, we report for the first time the use of a fast and sensitive multiplex RT-PCR technique in order to monitor the expression of four cloned human sialyltransferases: ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV (Table 1) in the human breast cell lines: HBL-100, MCF-7/AZ, MCF-7/6 and MDA-MB-231.

[†]The abbreviations for sialyltransferases used in this paper are according to the new systematic nomenclature proposed by Tsuji *et al.* [36].

Materials and methods

Materials

All reagents were of analytical or molecular biology grade. dATP-[alpha-³⁵S] (37 TBq mmol⁻¹) was purchased from ICN (USA). First-Strand cDNA Synthesis kit was from Pharmacia Biotech (USA), TA CloningTM kit was obtained from Invitrogen (USA) and SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing kit was from USB (USA). Hi-TaqTM DNA polymerase and acrylamide 2X bis-acrylamide (29/1) was purchased from Bioprobe (France). 1 kb DNA Ladder, culture media, and fetal calf serum were from Gibco-BRL (France). Jet Start kit was obtained from Genomed Inc. (USA).

Cell culture and isolation of cellular RNA

Human breast epithelial cell line HBL 100 (ATCC HTB-124) [46] was a gift from Dr M. Crépin (Paris, France). MCF-7/AZ and MCF-7/6 [47] both derived from the original MCF-7 breast cancer cells (ATCC HTB-22) [48], and MDA-MB-231 cells (ATCC HTB-26) [49] were a generous gift of Professor M.M. Mareel (Laboratory of Experimental Cancerology, University Hospital, Ghent, Belgium). They were grown in Eagle's minimal essential medium Earle's Salt supplemented with 10% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 2 mM glutamine, 5 µg ml⁻¹ insulin, and antibiotics (40 µg ml⁻¹ streptomycin; 40 U ml⁻¹ penicillin). HepG2 cells from Dr B. Laine (Institut Pasteur, Lille, France) were from ATCC (HB 8065) and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 2 mM glutamine, and antibiotics. All cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Total RNA was extracted using the guanidium thiocyanate method described by Sambrook *et al.* [50] and cellular RNA was quantitated by spectrophotometry at 260 nm.

Reverse transcription and polymerase chain reaction

Five µg of total cellular RNA were heated at 65 °C for 10 min and placed on ice for 2 min. Reverse transcription into cDNA was achieved using the First-Strand cDNA Synthesis kit according to the manufacturer protocol with oligo-d(T) as initiation primer in a final reaction volume of 33 µl. Two µl of the retrotranscription reaction were subjected to PCR amplification using sialyltransferases or GAPDH specific primers. cDNA sequences for human sialyltransferases and mouse GAPDH were obtained from the GenbankTM/EMBL Data Bank (Table 1) and used to design primer pairs. The oligonucleotide primers, their combination and amplification product lengths are shown in Table 2. Primer pairs have been carefully selected through computer analysis using *Primer Premier* Version 3.1 software (Biosoft International, Palo Alto, USA). The oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec s.a. (Belgium).

The 23 µl PCR mixture consisted of 0.6 U Hi-Taq DNA polymerase (or 1 U for multiplex PCR), 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP and 0.6 µM of each primer. Samples were overlaid with two drops of mineral oil (Sigma Chem. Corp., St Louis, USA). Reactions were run in a PTC-100TM thermal cycler (MJ Research, Watertown, USA) using the following conditions: 1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C and 1.5 min at 72 °C for 36 cycles. Thirty PCR cycles were performed for specific GAPDH fragment amplification. In all experiments, negative control reactions were done in which cDNA templates were replaced with sterile water, to check the absence of contaminants.

Ten µl aliquots of the PCR reaction were size-separated on a 10% polyacrylamide gel equilibrated in TBE. Gels were stained with ethidium bromide (1 µg ml⁻¹), photographed using Polaroid film under UV light and analysed by computerized densitometric scanning of the image using a Hewlett-Packard ScanJet 4c Scanner, Deskcan II software and Quantiscan program (Biosoft, USA). Sizes of the generated fragments were estimated according to the migration of a 1 kb DNA ladder. Amplification products were subcloned using the TA CloningTM kit, subsequent purification of plasmid DNA obtained was performed using Jet Star kit and sequenced using the Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit and dATP-[alpha-³⁵S].

Results and discussion

The methodological aim of this work was to determine the RT-PCR conditions to monitor the differential expression of sialyltransferase genes simultaneously, in one tube reaction in a small sample of a given cell type. cDNA templates were generated by reverse-transcription of total RNA harvested from various human cell lines.

Primer selection

The first point was to determine a specific primer pair for each sialyltransferase and we have focused on four cloned human sialyltransferase cDNAs ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV (see Table 1). The primer selection was governed by the following considerations: (i) primer pairs should allow discrimination between all sialyltransferases and GAPDH; (ii) they had to be designed such that they could be used under identical PCR conditions; and (iii) amplified products had to be of various lengths in order to be distinguishable in multiplex PCR experiments. To fulfil these criteria, five sets of 22-mer primer pairs have been designed and analysed using the *Primer Premier* Version 3.1 software.

In a first step of selection, the primer GC content was selected to achieve an elevated melting temperature of 69 °C and above (see Table 2) and their T_m values were very close (69–72 °C) to avoid differential yields of the amplified

Table 2. 22-mer oligonucleotide primer pairs used for PCR amplification of sialyltransferases and GAPDH cDNA sequences.

Target cDNA	Primers set ^a	GC content (%)	T _m (°C)	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	PCR product size (bp)
ST6Gal I	5'- ⁸⁴⁹ TATCGTAAGCTGCACCCCAATC-3' 3'- ¹¹⁹⁹ GAAGGCCTGGTAAGTGACGATT-5'	50	69.1	-42.6	371
ST3Gal I	5'- ³⁶¹ TCAGAGTGGTGCCTGGGAATGT-3' 3'- ⁸⁷⁷ CGTTTCCCTTGACCGTGGTGAT-5'	55	71.2	-41.9	537
ST3Gal III	5'- ⁷⁵² CGGATGGCTTCTGGAAATCTGT-3' 3'- ¹⁰³¹ AGTTTCTCAGGACCTGCGTGTT-5'	50	70.3	-42.9	300
ST3Gal IV	5'- ³²² CCCAAGAACATCCAGAGCCTCA-3' 3'- ⁷⁵⁹ CTAATTTCGTCCTCGGGTGGTGC-5'	55	71	-41.3	458
GAPDH	5'- ²⁷⁸ TGGAGTCCACTGGCGTCTTAC-3' 3'- ⁹⁸⁴ GTTGTCCCACCACCTGGAGTAC-5'	59	70	-41.9	698

^a The number on the left side of each sequence indicates the position of the first nucleotide in the coding sequence of each cDNA.

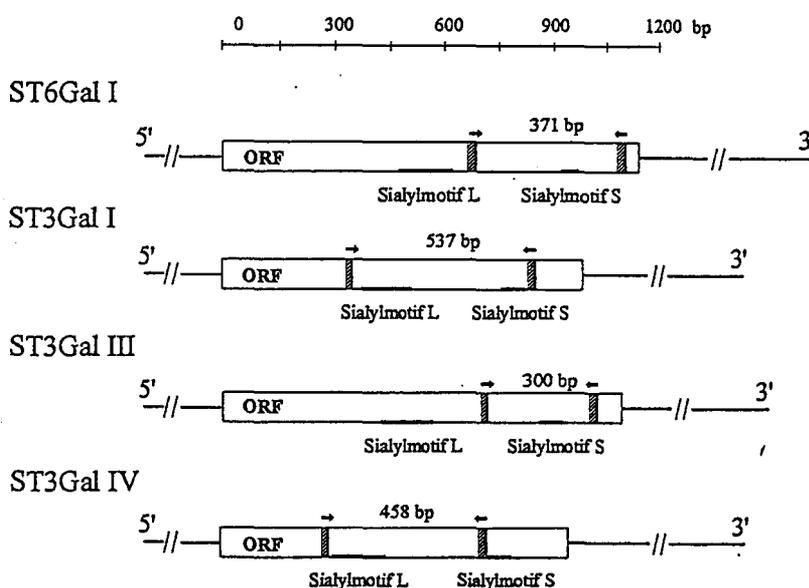


Figure 1. Schematic representation of the four sialyltransferases (ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III and ST3Gal IV) mRNA showing the open reading frame (ORF) and the position of the specific primer sets (hatching and arrows). The size of PCR products obtained are indicated in bp, above the ORF and sialylmotifs L and S are positioned with black lanes.

products. The internal stability (ΔG) for each primer was also chosen in the same range, being less than -41.5 Kcal mol⁻¹. Secondly, primers for which dimerization within and between primers was stabilized by more than three bonds in the 3' end were rejected. We also have discarded primers which folded back on themselves to form secondary structure loops stems stabilized by more than four bonds. Third, the selected pair of primers still had the potential to bind to other regions of the sialyltransferase sequences with high similarities leading to the production of secondary bands. In order to avoid false priming, primers

showing more than three bonds at the 3' end were also rejected.

Despite a very low overall sequence similarity (less than 50%), a comparison of cloned sialyltransferase amino acid sequences has shown highly conserved regions that have been termed sialylmotif L and S [51, 52]. These two regions are implicated in the binding of the sialyltransferase substrate CMP-NeuAc [53]. In order to be highly specific for each sialyltransferase cDNA, primer pairs were designed in the 3' region of the open reading frame, outside these two sialylmotifs and they were located on distinct exons (Figure 1).

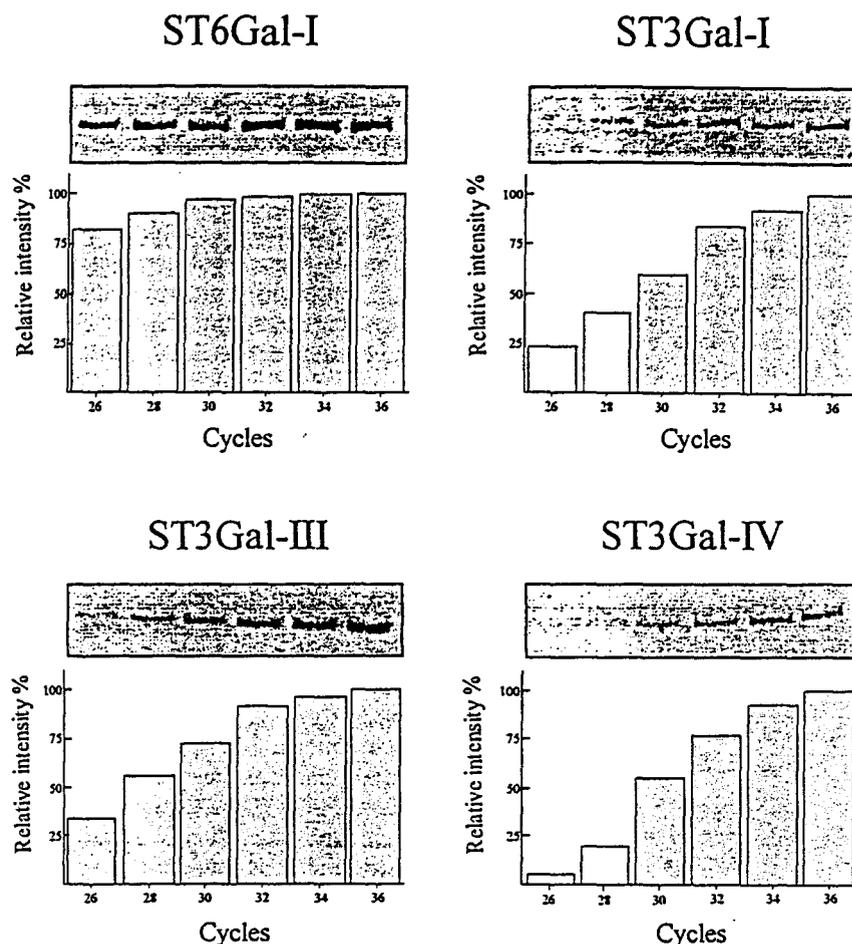


Figure 3. Kinetics of the amplification of the various sialyltransferase mRNAs isolated from the HepG2 cells. PCR products were run in 10% polyacrylamide gel, ethidium bromide stained and signals obtained were integrated by Quantiscan software (Biosoft International, Palo Alto, USA) at cycles 26, 28, 30, 32, 34 and 36.

the amplified products obtained for the simultaneous PCR amplification of the four sialyltransferase mRNA sequences present in HepG2 total RNAs. The initial step of reverse transcription of RNAs from various HepG2 sources could also be a source of variability hampering the standardization of inter-assay results. HepG2 total RNA samples that have undergone reverse transcription separately gave similar results (data not shown).

We chose glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which is a housekeeping gene as an endogenous internal control. Unfortunately, the simultaneous amplification of mRNAs initially present at widely different levels such as GAPDH and sialyltransferase mRNAs cannot provide the optimal condition of PCR linearity. Nevertheless, in experiments where specific fragments were co-amplified together with GAPDH, we observed that the fragments corresponding to the four sialyltransferases were obtained in the same ratio with, as

expected, a large amount of GAPDH amplification fragment. So, this experimental approach in which multiple sialyltransferase cDNAs were simultaneously co-amplified allowed the precise monitoring of changes in mRNA levels relative to one another.

Differential expression of sialyltransferase mRNAs in human breast cancer cells

An extensive literature describes the variations in sialyltransferase activities as one of the biochemical events accompanying physiological modifications such as cancer and invasive properties of cancer cells [9, 41, 43]. Although the exact mechanisms underlying control of sialyltransferase expression have not yet been characterized, there is a large body of evidence that their regulated expression is mainly controlled at the transcriptional level [for review see 24].

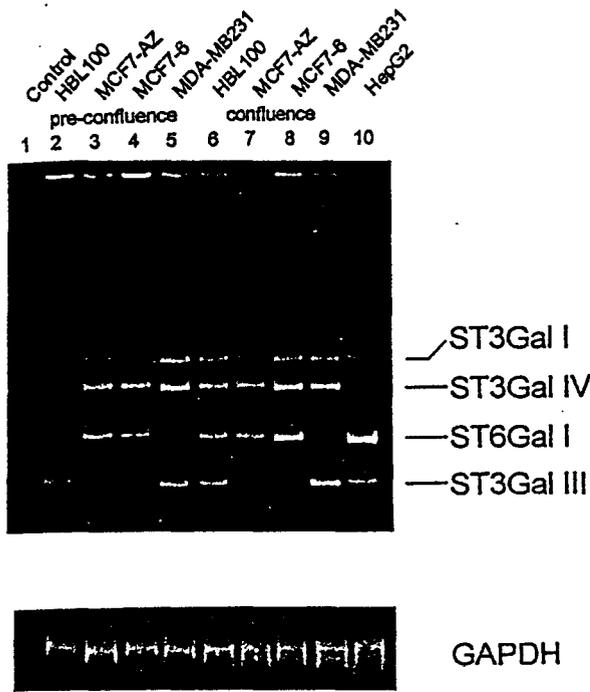


Figure 4. RT-PCR co-amplification of the four sialyltransferase cDNAs: ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV, from the breast cells mRNA: HBL100 (lanes 2 and 6), MCF-7/AZ (lanes 3 and 7), MCF-7/6 (lanes 4 and 8), and MDA-MB-231 (lanes 5 and 9) at pre-confluence (lanes 2–5) and at confluence (lanes 6–9); and from HepG2 cell mRNA (lane 10). The products of 36 cycles of amplification performed according to Materials and Methods were run on 10% polyacrylamide gel and ethidium bromide-stained. The localisation of specific fragments for ST6Gal I (371 bp), ST3Gal III (300 bp), ST3Gal I (537 bp) and ST3Gal IV (458 bp) are indicated on the right side of the figure. Lane 1 corresponds to the negative control. The products of 30 cycles of amplification of the unregulated gene *GAPDH* are shown at the bottom of the Figure.

These changes in the expression of sialyltransferase genes can be detected with multiplex-PCR, a powerful tool providing useful diagnostic or prognostic information and eventually, may be related to a precise stage of the disease. We have thus used this simple, fast and accurate technique to survey sialyltransferase mRNA levels in a panel of human breast cell lines in which only ST6Gal I was barely detected by Northern analysis (data not shown). HBL100 is an epi-

thelial cell line found to contain a tandemly integrated SV40 virus genome. Although there was no evidence of breast lesion in the cell donor, these cells should not be considered as normal cells [46]. MCF-7/AZ and MCF-7/6 clones were both derived from the breast adenocarcinoma cell line MCF-7 obtained from a pleural effusion [48] and differ in their invasiveness [47]. The breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cell line was also isolated from a pleural effusion [49]. We have performed *in vitro* assays for cell-cell aggregation for these four cell lines according to Bracke *et al.* [55] (data not shown) which reflect their order of invasiveness relative to each other. Their invasiveness ranking could be stated as follows: MDA-MB-231 > MCF-7/6 > MCF-7/AZ > HBL100.

The expression pattern of the four sialyltransferases ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III and ST3Gal IV was analysed in total RNA extracted from these cultured cells at pre-confluence (70–80% of cell density) and at confluence. The multiplex PCR assays were performed in triplicate without significant changes in the amplification profiles, which demonstrates also the reliability of the method. One significant profile of the signals obtained after polyacrylamide gel is shown in Figure 4 and the relative intensities obtained after amplification of the transcripts of the different sialyltransferases are summarized in Table 3. The ratio obtained between the different sialyltransferase mRNAs detected are similar before or at confluence in all cell types, with the exception of HBL100 cells (see Figure 4 and Table 3). These latter cells express only ST3Gal III mRNA before confluence and produce equally the four sialyltransferase mRNAs at confluence (Figure 4, lanes 2 and 6). The two clones of MCF-7 (MCF-7/AZ and MCF-7/6) which differ in invasiveness capacity [47] present similar patterns of expression of sialyltransferases (Figure 4 and Table 3) and cannot therefore be distinguished on these criteria. The pattern of expression of sialyltransferases differs greatly between MCF-7 clones and MDA, even if these cell lines are all invasive. Finally, sialyltransferase cDNA levels detected at confluence are higher in MCF-7/AZ, MCF-7/6 and MDA than at pre-confluence.

These cultured breast cancer cells have proven to be a useful *in vitro* model in this study, although it is obvious that surveying larger numbers of different cancer cell lines

Table 3. Relative intensities obtained after multiplex RT-PCR analysis of sialyltransferases in human breast cell lines (Figure 4).

	Pre-confluence				Confluence			
	HBL100	MCF-7/AZ	MCF-7/6	MDA-MB231	HBL100	MCF-7/AZ	MCF-7/6	MDA-MB231
ST3Gal I	–	+	±	+++	++	+	+++	+++
ST3Gal IV	–	+++	+++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
ST6Gal I	–	+++	+++	–	+++	+++	+++++	±
ST3Gal III	+	±	–	+++	+++	±	±	+++++

and breast cancer tissue samples will be necessary to establish good correlation between variations in sialyltransferase mRNA levels and their invasiveness.

In spite of the significant changes of the levels of sialyltransferase mRNA detected in these cells, no good correlation could be established either with sialylation patterns previously observed in these cells, nor with the sialyltransferase enzymatic activities. This is due in part to the fact that available data on the sialylation of breast cancer cell glycans are still fragmentary and based most of the time on the binding of lectins and antibodies [44, 56, 57]. One of the best documented examples is the abnormal occurrence of short sialylated glycan structures (sialyl-Tn, sialyl-T and disialyl-T antigens) on the cell-surface mucin MUC1 in cancer cells [44, 58]. These alterations have been correlated with a higher Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase activity [43]. This unique activity could be supported by at least three different enzymes: ST3Gal I, ST3Gal II and ST3Gal IV, which are not distinguishable based on enzymatic assays. Northern blot analysis showed no increased ST3Gal I mRNA level [43] and our multiplex RT-PCR data showed that, at confluence, ST3Gal I and ST3Gal IV were amplified at similar levels in the different cell lines. ST3Gal II has been recently cloned from different species [59–61] and could also be responsible for that increased activity.

Lewis type antigens SLe^x and SLe^a have been observed in MUC1 isolated from MDA-MB-231 [44]. More generally, SLe^x is considered as a tumour associated antigen in breast cancer [62]. This could be associated with the high level of expression of ST3Gal III and ST3Gal IV observed by RT-PCR in this cell line, enzymes that are implicated in the biosynthesis of SLe^a and SLe^x respectively.

Concluding comments

We have reported in this paper the use of a sensitive RT-PCR method to detect and specifically amplify cDNAs of various cloned α 2,3- and α 2,6-sialyltransferases implicated in the biosynthesis of human cancer related sialylated epitopes found on N- and O-glycosylproteins.

The method we have developed is particularly interesting because: (i) it will provide a new alternative to measure precisely sialyltransferase mRNA levels in very small samples of human breast carcinoma cells or biopsies. These appear as potential early indicators of the changes occurring in human cancers. (ii) It will be easily extended to other human sialyltransferase cDNAs already cloned such as α 2,8-sialyltransferases involved in G_{D3} biosynthesis (ST8Sia I) or in α 2,8-polysialylated chains (ST8Sia II and ST8Sia IV). High levels of expression of the ST8Sia I gene as well as G_{D3} have been described in human melanoma cell lines and melanoma tissues [63], whereas normal melanocytes express G_{D3} at minimal levels [64]. In mammals, polysialic acid (PSA) occurs almost uniquely on N-linked chains of the neuronal cell adhesion molecule

(N-CAM) and on the α -subunit of sodium channels in the brain. However recently, PSA has been observed on proteins in rat basophilic leukemia cells and in MCF-7 human breast cancer cells [65]. α 2,8-sialylation of G_{D3} and/or N-glycosylproteins in these cancer cells, could be due to the oncogenic expression of the α 2,8-sialyltransferases and serve as good markers of malignancy.

Changes in O-glycan sialylation also occur in human pathogenesis. Sialyl-Tn antigen (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr) and Sialyl-T antigen (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) expressions have been shown to be up-regulated in many transformed cells [9, 42], and serve as markers of malignancy in breast cancer [66]. As yet, no human cDNA sequence has been obtained for ST6GalNAc I, the enzyme which has been proposed to be responsible for the synthesis of Sialyl-Tn antigen. On the other hand, three different enzymes could participate in the biosynthesis of sialyl-T antigen: ST3Gal I, ST3Gal II, and to a lesser extent, ST3Gal IV. Previously cloned human ST3Gal I and ST3Gal IV sequences have been used in this study, whereas a human ST3Gal II cDNA clone was not available during the time course of this study. We expect that, in the near future, these human sialyltransferase cDNA sequences will be available and we are currently working on refining this RT-PCR method to allow assessment of mRNA levels for sialyltransferases of interest in clinical samples of breast cancer.

Acknowledgements

The authors are grateful to C. Fillebeen, I. Kim, W. Steelant and Dr A. Pierce for helpful discussions. We also sincerely acknowledge Dr E. Bruynel (Laboratory of Experimental Cancerology, University Hospital, Ghent, Belgium) for providing breast cancer cell lines, M. Lecocq for her excellent technical assistance in cell culture and Dr J.-M. Loguidice (Laboratoire de Pharmacologie Génétique, Hôpital Calmette, CHRU de Lille, France) for his help in the determination of RT-PCR conditions.

References

- 1 Hakomori SI (1981) *Ann Rev Biochem* 50: 733–64.
- 2 Fukuda M, Fukuda MN (1984) In *The Biology of Glycoproteins* (Ivatt RJ ed) pp 183–234. New York: Plenum Publishing Corp.
- 3 Feizi T (1985) *Nature* 314: 53–57.
- 4 Jessell TM, Hynes MA, Dodd J (1990) *Ann Rev Neurosci* 13: 227–55.
- 5 Varki A (1993) *Glycobiology* 3: 97–130.
- 6 Shaper NL, Harduin-Lepers A, Shaper JH (1994) *J Biol Chem* 269: 25165–71.
- 7 Vertino-Bell A, Ren J, Black JD, Lau JTY (1994) *Dev Biol* 165: 126–36.
- 8 Oka S, Brusés JL, Nelson RW, Rutishauser U (1995) *J Biol Chem* 270: 19357–63.

- 9 Dall'Olio F (1996) *Clin Mol Pathol* 49: M126-35.
- 10 Fukuda M (1996) *Cancer Res* 56: 2237-44.
- 11 Warren L, Buck CA, Tuszyński GP (1978) *Biochim Biophys Acta* 516: 97-127.
- 12 Yogeeswaran G, Salk PL (1981) *Science* 212: 1514-16.
- 13 Collard JG, Schijven JF, Bikker A, La Riviere G, Bolscher JGM, Roos E (1986) *Cancer Res* 46: 3521-27.
- 14 Schauer R, Kamerling JP (1997) *Chemistry, Biochemistry and Biology of Sialic acids*. In *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil J, Vliegthart JFG and Schachter H, eds) Vol 29b. Amsterdam, Elsevier (in press).
- 15 Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK (1992) *J Cell Biol* 117: 895-902.
- 16 Lasky LA (1995) *Ann Rev Biochem* 64: 113-39.
- 17 Varki A (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7390-97.
- 18 Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R (1993) *Cancer Res* 53: 354-61.
- 19 Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI, Wakisaka A, Togashi H, Chia D, Suyama N, Fukushi Y, Nudelman E, Hakomori SI (1984) *Cancer Res* 44: 5279-85.
- 20 Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1982) *J Biol Chem* 257: 14365-69.
- 21 Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL (1991) *J Biol Chem* 266: 14869-72.
- 22 Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 179: 713-9.
- 23 Nicolson GL (1989) *Curr Opin Cell Biol* 1: 1009-19.
- 24 Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P (1995) *Glycobiology* 5: 741-758.
- 25 Tsuji S (1996) *J Biochem* 120: 1-23.
- 26 Grundmann U, Nerlich C, Rein T, Zettlmeissl G (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 667.
- 27 Kitagawa H, Paulson JC (1994) *J Biol Chem* 269: 17872-8.
- 28 Kitagawa H, Paulson JC (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 194: 375-82.
- 29 Kitagawa H, Paulson JC (1994) *J Biol Chem* 269: 1394-401.
- 30 Sasaki K, Watanabe E, Kawashima K, Sekine S, Dohi T, Oshima M, Hanai N, Nishi T, Hasegawa M (1993) *J Biol Chem* 268: 22782-87.
- 31 Sasaki K, Kurata K, Kojima N, Kurosawa N, Ohta S, Hanai N, Tsuji S, Nishi T (1994) *J Biol Chem* 269: 15950-56.
- 32 Nara K, Watanabe Y, Maruyama K, Kasahara K, Nagai Y, Sinai Y (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7952-56.
- 33 Haraguchi M, Yamashiro S, Yamamoto A, Furukawa K, Takamiya K, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10455-59.
- 34 Nakayama J, Fukuda MN, Hirabayashi Y, Kanamori A, Sasaki K, Nishi T, Fukuda M (1996) *J Biol Chem* 271: 3684-91.
- 35 Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7031-35.
- 36 Tsuji S, Datta AK, Paulson JC (1996) *Glycobiology* 6: V-VII.
- 37 Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG (1993) *J Biol Chem* 268: 3801-4.
- 38 Dall'Olio F, Malagolini N, di Stefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F (1989) *Int J Cancer* 44: 434-39.
- 39 Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU (1991) *Am J Pathol* 139: 1435-48.
- 40 Le Marer N, Laudet V, Svensson EC, Cazlaris H, Van Hille B, Lagrou C, Stéhelin D, Montreuil J, Verbert A, Delannoy P (1992) *Glycobiology* 2: 49-56.
- 41 Le Marer N, Stéhelin D (1995) *Glycobiology* 5: 219-26.
- 42 Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori SI (1988) *Cancer Res* 48: 2214-20.
- 43 Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J (1995) *Eur J Biochem* 233: 607-17.
- 44 Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J (1996) *Eur J Biochem* 236: 318-27.
- 45 Chang ML, Eddy RL, Shows TB, Lau JTY (1995) *Glycobiology* 5: 319-25.
- 46 Gaffney EV, Pigott DA, Grimaldi MA (1979) *J Natl Cancer Inst* 63: 913-18.
- 47 Bracke ME, Van Larebeke NA, Vyncke BM, Mareel MM (1991) *Br J Cancer* 63: 867-72.
- 48 Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-16.
- 49 Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ (1974) *J Natl Cancer Inst* 53: 661-74.
- 50 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 51 Livingston BD, Paulson JC (1993) *J Biol Chem* 268: 11504-7.
- 52 Drickamer K (1993) *Glycobiology* 3: 2-3.
- 53 Datta AK, Paulson JC (1995) *J Biol Chem* 270: 1497-500.
- 54 Svensson EC, Conley PB, Paulson JC (1992) *J Biol Chem* 267: 3466-72.
- 55 Bracke ME, Vyncke BM, Bruyneel EA, Vermeulen SJ, De Bruyne GK, Van Larebeke NA, Vleminckx K, Van Roy FM, Mareel MM (1993) *Br J Cancer* 68: 282-89.
- 56 Schumacher U, Mukhtar D, Stehling P, Reutter W (1996) *Histochem Cell Biol* 106: 599-604.
- 57 Devine PL, Clark BA, Birrell GW, Layton GT, Ward BG, Alewood PF, McKenzie IF (1991) *Cancer Res* 51: 5826-36.
- 58 Lloyd KO, Burchell J, Kudryashov V, Yin BWT, Taylor-Papadimitriou J (1996) *J Biol Chem* 271: 33325-34.
- 59 Lee YC, Kojima N, Wada E, Kurosawa N, Nakaoka T, Hamamoto T, Tsuji S (1994) *J Biol Chem* 269: 10028-33.
- 60 Kim YJ, Kim KS, Kim SH, Kim CH, Ko JH, Choe IS, Tsuji S, Lee YC (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 228: 324-27.
- 61 Giordanengo V, Bannwarth S, Laffont C, Van Miegem V, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Lefebvre JC (1997) *Eur J Biochem* (in press).
- 62 Nakagoe T, Fukushima K, Hirota M, Kusano H, Kawahara K, Ayabe H, Tomita M, Kamihira S (1991) *Jpn J Cancer Res* 82: 559-68.
- 63 Yamashiro S, Okada M, Haraguchi M, Furukawa K, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K (1995) *Glycoconj J* 12: 894-900.
- 64 Carubia JM, Yu RK, Macala LJ, Kirkwood JM, Varga JM (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 120: 500-4.
- 65 Martersteck CM, Kedersha NL, Drapp DA, Tsui TG, Colley KJ (1996) *Glycobiology* 6: 289-301.
- 66 Cho SH, Sahin A, Hortobagyi GN, Hittelman WN, Dhingra K (1994) *Cancer Res* 54: 6302-5.

Received 30 December 1996, revised 3 March 1997, accepted 5 March 1997

C- Compléments expérimentaux de l'article :

Certaines expériences concernant la mise au point de la méthode de RT-PCR n'ont pas été détaillées dans l'article et vont être décrites dans ce chapitre.

1- Amplification du fragment spécifique de ST6Gal I à partir des ARN totaux de cellules HepG2.

Comme le montre la figure 21 page 95, un début d'amplification du fragment spécifique de ST6Gal I, peut être observé dès le vingtième cycle, à partir d'ARN totaux de cellules HepG2, témoins cellulaires utilisés au cours de l'étude. L'intensité du signal obtenu arrive à saturation à partir du trentième cycle d'amplification, ce qui n'est pas le cas pour les autres sialyltransférases.

2- Optimisation des conditions d'amplification pour la Multiplex RT-PCR.

a- influence de la concentration en Taq polymérase.

A partir d'ARN totaux du témoin HepG2, nous avons déterminé la concentration optimale en Taq polymérase en faisant varier la quantité de Taq DNA polymérase de 0,6 à 2 unités dans le milieu réactionnel. Comme le montre la figure 22 (page 97), l'intensité des produits d'amplification augmente avec la quantité de Taq polymérase (de 0,6 à 1 Unité). Par contre, l'intensité des produits d'amplification ne varie plus lorsque l'on augmente la quantité de Taq polymérase de 1 à 2 Unités. La quantité de Taq polymérase de 1 Unité pour 25 µl de milieu réactionnel permet donc la co-amplification des fragments correspondant aux quatre sialyltransférases avec un ratio identique aux amplifications simples obtenues à 28-30 cycles. Seule ST6Gal I arrive à saturation dans ces conditions. C'est cette quantité de Taq polymérase qui a été utilisée dans les

ST6Gal-I

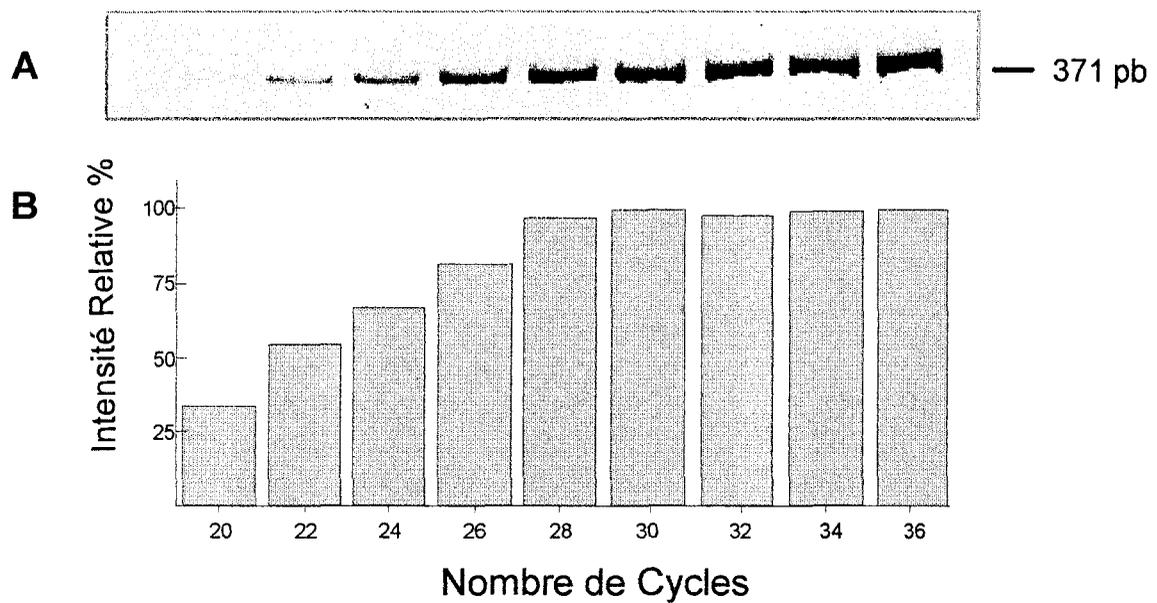


Figure 21 : A; Séparation sur gel de polyacrylamide de l'amplification par RT-PCR à différents nombres de cycle du fragment spécifique de ST6Gal I à partir des ARN totaux des cellules HepG2. B; Intensité relative obtenue par analyse densitométrique après numérisation de la photo du gel.

expériences de co-amplification effectuées par la suite.

b- influence du nombre de cycles.

Nous avons également déterminé le nombre de cycles d'amplification optimum pour la réaction de Multiplex RT-PCR. Des expériences d'amplification dans les conditions mises au point précédemment ont été réalisées à partir d'ARN totaux du témoin HepG2 en faisant varier le nombre de cycles d'amplification de 24 à 40 (Figure 23, page 97). Les intensités des produits d'amplification augmentent avec le nombre de cycles jusqu'à 36 cycles. A 36 cycles, les produits d'amplification des quatre sialyltransférases sont visibles avec un ratio identique aux amplifications simples obtenues à 28-30 cycles. Si le nombre de cycles est augmenté jusqu'à 40, le profil obtenu ne diffère pas de celui obtenu à 36 cycles. L'amplification maximale du système Multiplex RT-PCR est donc atteinte à 36 cycles. D'autres paramètres ont été testés, tels que la concentration en $MgCl_2$, la température d'hybridation, l'origine de la Taq polymérase. Aucune des modifications de ces paramètres n'a apporté d'amélioration du rendement et/ou de la spécificité du système de Multiplex RT-PCR.

D- Conclusions de la première partie :

Les résultats de la mise au point de cette technique de détection et de semi-quantification des ARNm des sialyltransférases humaines par Multiplex RT-PCR sont très attractifs. En effet, cette méthode évite les écueils de la non-spécificité ou des seuils de détection très limités des techniques classiques d'hybridation. De plus, la Multiplex RT-PCR nous apporte des informations sur le taux d'expression relatif de chaque enzyme en très peu de temps par rapport à la technique classique de Northern-blot. Dans de nombreux cas, la régulation des sialyltransférases se fait par le contrôle de leur expression génique, d'où l'intérêt de posséder ce nouvel outil permettant, sur de faibles quantités de matériels biologiques, d'analyser l'expression des différentes sialyltransférases humaines.

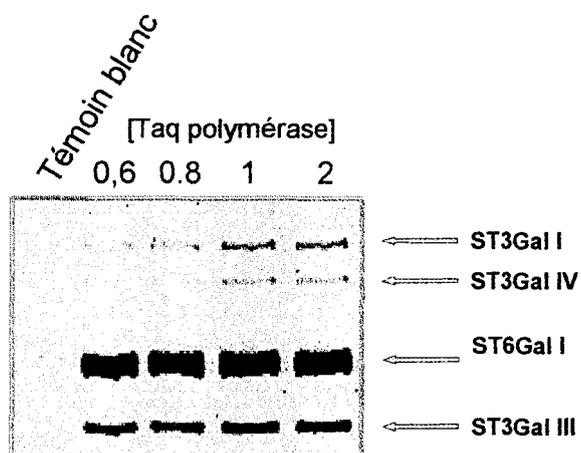


Figure 22 : Co-amplification par RT-PCR des fragments correspondant aux quatre sialyltransférases à partir des ARN totaux de cellules HepG2, avec différentes concentrations en Taq DNA polymérase exprimées en Unité, à 36 cycles.

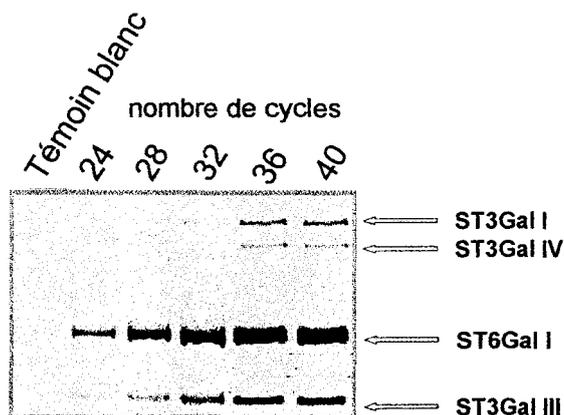


Figure 23 : Co-amplification par RT-PCR des fragments correspondant aux quatre sialyltransférases à partir de ARN totaux de cellules HepG2, en utilisant 1 unité de Taq DNA polymérase, à différents nombres de cycles.

Au niveau des lignées de cellules mammaires analysées, nous obtenons pour chaque cellule un profil spécifique d'expression des quatre sialyltransférases qui diffère suivant le caractère métastatique et la croissance cellulaire. Les lignées MCF7/AZ et MCF7/6 possèdent des profils très proches, la lignée MCF7/6 dérivant de la lignée MCF7/AZ. Si on compare les résultats de Multiplex RT-PCR avec les activités enzymatiques mesurées, il est difficile de faire un lien avec les dosages enzymatiques, ceux-ci faisant intervenir des substrats pouvant être utilisés par plusieurs enzymes. Cependant, cette technique permet de déterminer précisément quelles enzymes sont exprimées dans un type cellulaire donné, et aussi de différencier des enzymes ayant la même activité, ce qui n'est pas possible par un simple dosage d'activité enzymatique. Le nombre trop restreint de lignées cellulaires mammaires utilisées ne nous a cependant pas permis, à ce stade, de conclure quant à l'existence d'une relation entre à l'expression des sialyltransférases et les caractères tumoral ou métastatique de ces cellules.

E- Extension de la technique de Multiplex RT-PCR à une 5^{ème} sialyltransférase humaine.

Comme nous l'avons vu précédemment, le transfert d'acide sialique en $\alpha 2,3$ sur le disaccharide Gal β 1-3GalNAc peut être catalysé par trois enzymes différentes : ST3Gal I, ST3Gal II, deux enzymes qui présentent une spécificité stricte vis-à-vis de ce substrat accepteur, et ST3Gal IV qui transfère de l'acide sialique en $\alpha 2,3$ sur le disaccharide Gal β 1-4GalNAc, mais qui peut également, *in vitro*, utiliser comme substrat accepteur le disaccharide Gal β 1-3GalNAc. Au début de notre étude par Multiplex RT-PCR, l'ADNc de ST3Gal II avait été identifié uniquement chez le Rat et la Souris (Lee *et al.*, 1994). Le clonage de l'ADNc de l'enzyme humaine à partir d'une banque de foie (Kim *et al.*, 1996a) et de lymphocytes en culture (Giordanengo *et al.*, 1997), nous a permis d'étendre cette technique de Multiplex RT-PCR à une 5^{ème} enzyme humaine et ainsi de différencier ces trois enzymes.

Nous avons choisi un couple d'amorces pour ST3Gal II, en tenant compte des conditions déjà appliquées pour le choix des autres couples permettant l'amplification

des quatre premières sialyltransférases (Tableau XIV, page 99).

Tableau XIV : Séquences et caractéristiques des oligonucléotides utilisés pour l'obtention par RT-PCR d'un fragment spécifique de 609 pb de ST3Gal II.

ADNc	Couple d'amorces *	GC (%)	Tm (°C)	ΔG (Kcal / mol)	Taille du produit de PCR (pb)
ST3Gal II	5' - ₉₃₀ TGGTTTGACAGCCACTTTGACG-3'	50	70.5	-41.6	609
N° d'accès à GenBank U63090	3' - ₁₅₁₈ CCCTACGACCACGAAAAGAAAC-5'	50	70.9	-41.3	

* Le nombre inscrit à droite de chaque séquence indique la position du premier nucléotide en 5' de la séquence de l'ADNc.

Par rapport aux conditions précédentes, nous avons augmenté le temps d'élongation de 1 min 30 à 2 min, ce temps d'élongation convenant mieux à l'amplification d'un fragment de 609 pb. L'amplification réalisée dans ces conditions, à partir d'ADNc des cellules HepG2 après 36 cycles est spécifique de ST3Gal II, sans contamination par des fragments non spécifiques (Figure 24, page 100). La bande obtenue a été sous-clonée et séquencée. La séquence obtenue correspond parfaitement à la séquence de 609 pb de l'ADNc de ST3Gal II.

Lors de l'amplification de ST3Gal II, à partir des ADNc des ARN totaux des cellules mammaires utilisées précédemment, seules les cellules MDA-MB-231 récoltées à confluence, ainsi que les cellules témoins HepG2, ont permis d'amplifier cette enzyme.

Par la suite, nous avons également mis au point sa co-amplification avec les quatre autres sialyltransférases à partir des ARN totaux de cellules HepG2 et MDA-MB-231, dans le but de compléter notre étude (Figure 25, page 100). Pour ce faire, nous avons déterminé la quantité d'enzyme à utiliser. Comme le montre la figure 25 (page 100), nous avons amélioré l'amplification en augmentant la quantité de Taq polymérase de 1,5 à 2,5 Unités. De plus, l'amplification réalisée sur 1 µl d'ADNc d'HepG2 mélangé à 1 µl d'ADNc de MDA-MB-231 apparaît bien comme la résultante des deux amplifications réalisées sur 2 µl de ces deux ADNc séparément. Ceci témoigne bien du fait que l'amplification est proportionnelle à la quantité de matrice initialement présente. Une quantité supérieure de Taq polymérase n'a pas permis d'obtenir une amélioration de l'amplification.

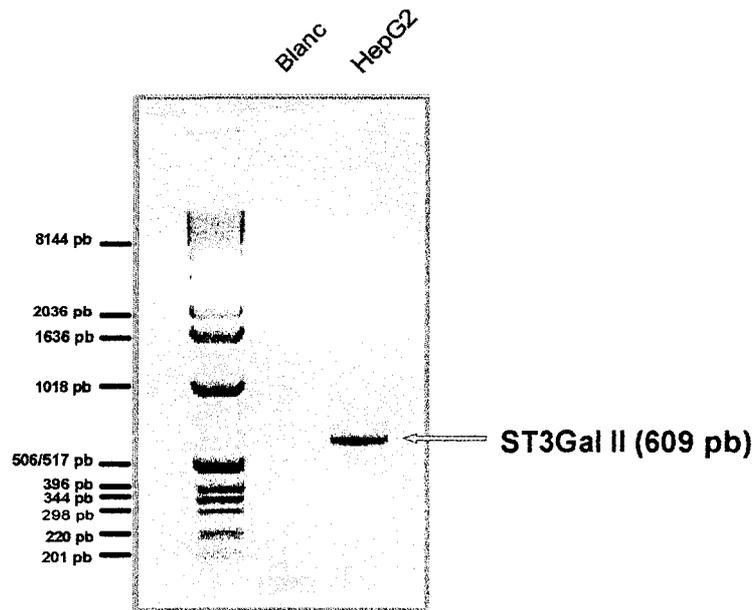


Figure 24 : Visualisation sur gel d'agarose de l'amplification spécifique d'une bande de 609 pb correspondant à ST3Gal II à partir d'ADNc provenant de cellules HepG2 à 36 cycles.

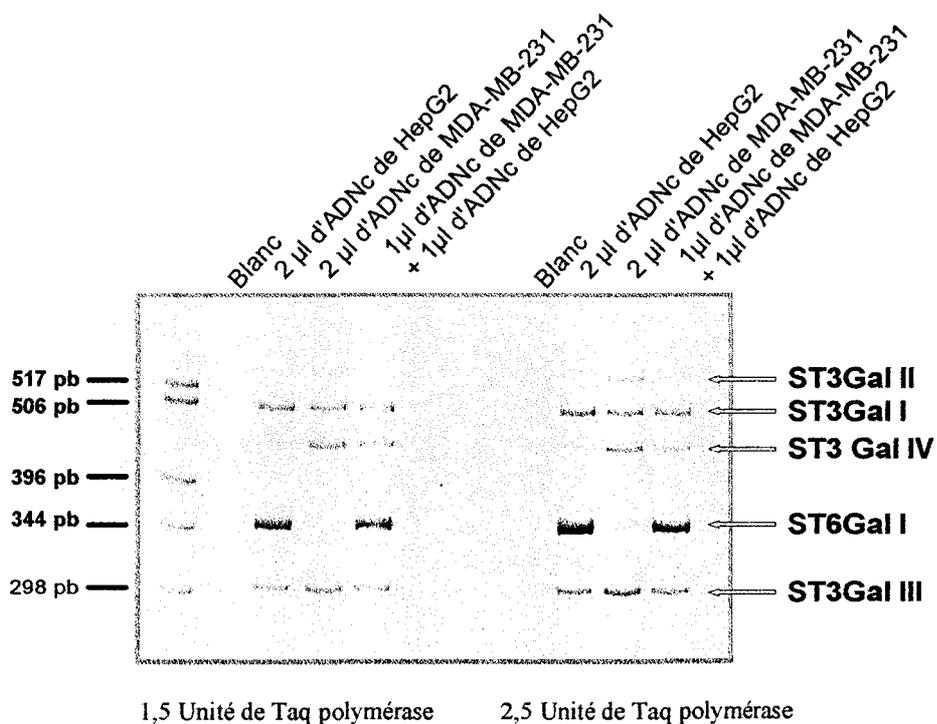


Figure 25 : Amplification des fragments correspondant aux 5 sialyltransférases par multiplex RT-PCR à 36 cycles en utilisant respectivement 1,5 et 2,5 µl de Taq polymérase sur 2 µl de ADNc (300 ng d'ARN totaux) de cellules HepG2 et MDA-MB-231, ainsi que sur le mélange de 1 µl (150 ng d'ARN totaux) d'ADNc de cellules HepG2 et d'1 µl (150 ng d'ARN totaux) de d'ADNc de cellules MDA-MB-231. La séparation a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

F- Choix d'un nouveau couple d'amorces pour l'amplification d'un fragment spécifique de la GAPDH.

Nous avons également choisi de changer d'amorces (Tableau XV et Figure 26, page 102) pour amplifier spécifiquement un fragment correspondant à la GAPDH (Figure 27, page 103). En effet, l'organisation génomique de ST3Gal II et de ST3Gal III n'étant pas connues, il ne nous a pas été possible de choisir avec certitude les couples d'amorces dans des exons distincts. De manière à mettre en évidence toute éventuelle contamination de nos préparations d'ADNc, avec ce nouveau couple d'amorce, le fragment d'amplification obtenu pour la GAPDH à partir de l'ADN génomique à une taille de 359 pb, et peut aussi être facilement distingué du fragment correspondant à l'ADNc dont la taille attendue est de 256 pb.

Nous avons utilisé ce nouveau couple d'amorces pour amplifier le fragment spécifique de la GAPDH à partir d'ARN totaux extraits des cellules mammaires et des cellules HepG2, aucune bande à 359 pb n'a pu être détectée, témoignant effectivement que ces ARN n'étaient pas contaminés par de l'ADN génomique. D'autres préparations d'ARN totaux dans des études réalisées ultérieurement, ont révélé une contamination par de l'ADN génomique, grâce à l'utilisation de ce couple d'amorces. De plus, l'amplification par Multiplex RT-PCR des cinq sialyltransférases de ces échantillons contaminés n'a donné aucun résultat, comme si la présence d'ADN génomique nuisait au système de Multiplex RT-PCR.

G- Conclusion :

Nous avons maintenant la possibilité de différencier les trois enzymes connues possédant l'activité de transfert de l'acide sialique en α 2,3 sur le disaccharide Gal β 1-3GalNAc : ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV. La comparaison des résultats des activités enzymatiques et du taux d'expression de ces trois enzymes dans les cellules mammaires à confluence, ne permet pas d'établir de lien direct. En effet les MDA-MB-

Tableau XV : Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification de la GAPDH permettant de déterminer s'il y a une contamination des préparations d'ARN totaux par de l'ADN génomique.

ADNc	Couple d'amorces *	GC (%)	Tm (°C)	ΔG (Kcal / mol)	Taille du produit de PCR (pb)
GAPDH	5' - ₄₄₀₆ GGTGGACCTGACCTGCCGTCTA-3'	63	73,1	- 43,7	256
Nouveau	3' - ₄₇₆₅ GAGGTCCACCACCCTGTTGCTG-5'	63	73,4	- 43,2	

* Le nombre inscrit à droite de chaque séquence indique la position du premier nucléotide 5' de la séquence du gène (n° d'accès à Genbank, J04038). Un intron de 103 pb est situé entre la position 4619 et 4722.

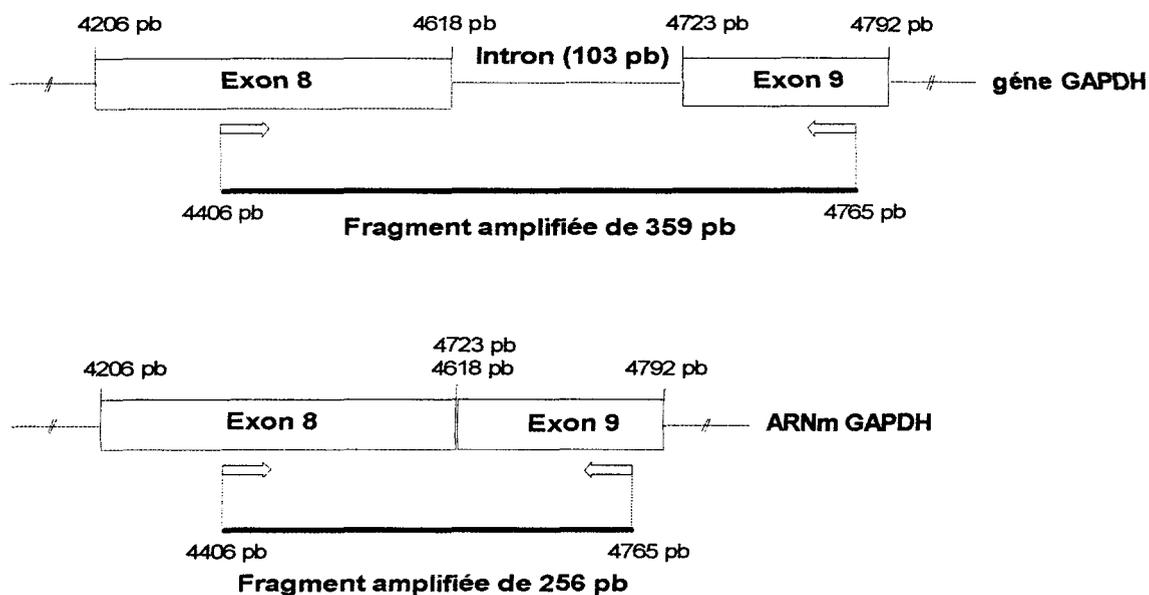


Figure 26 : Représentation schématique des fragments obtenus pour l'amplification de la GAPDH au niveau génomique et ARNm.

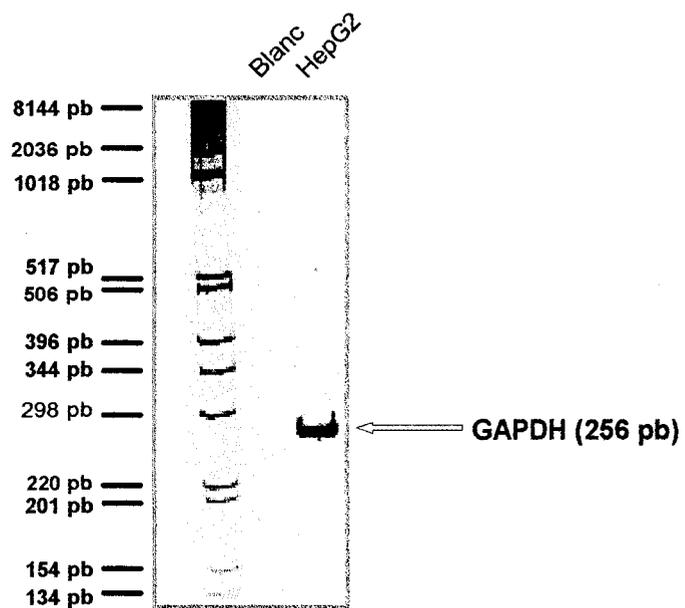


Figure 27 : Résultat de l'amplification d'une bande spécifique à 256 pb correspondant à la GAPDH pour le nouveau couple d'amorces, après 36 cycles d'amplification pour le témoin HepG2, après dépôt sur gel de polyacrylamide.

231 sont les seules cellules à exprimer ST3Gal II. Elles expriment également ST3Gal I et ST3Gal IV. Cependant, l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3 sialyltransférase exprimée par cette lignée cellulaire n'est pas la plus élevée. Les cellules MCF7/AZ exprimant l'activité la plus forte ne présentent pas un taux de transcription de ST3Gal I supérieure aux cellules HBL100, MCF7/6 ou MDA-MB-231. Cette forte activité peut être due à d'autres facteurs de régulation, ou à une enzyme encore inconnue ayant la même activité.

En conclusion, cette étude de l'expression des sialyltransférases humaines par multiplex-RT-PCR, permet de jeter un regard nouveau sur le rôle de la sialylation dans le développement tumoral. Des études réalisées, par ailleurs, à l'aide d'amplification simple par RT-PCR de sialyltransférases ont déjà donné un début de réponse. Ainsi, Ito. *et al.* (1997) ont montré que l'ARNm de ST3Gal I était augmenté dans les tissus coliques cancéreux par rapport aux tissus adjacents non cancéreux. De même, Ogawa *et al.*(1997) ont montré que la sur-expression de ST3Gal III pouvait être un marqueur pronostique pour des patients atteints de cancer du poumon.

III- APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE MULTIPLEX RT-PCR A D'AUTRES LIGNEES CELLULAIRES EPITHELIALES EN CULTURE PROVENANT DE CANCERS DU COLON ET DE LA PEAU.

Avant d'appliquer la technique de Multiplex RT-PCR des cinq sialyltransférases à des biopsies de cancer du sein, nous avons voulu tester ces potentialités sur d'autres types cellulaires. Dans les études qui vont suivre, la question était la suivante : quelles sont les enzymes responsables du transfert d'acide sialique en α 2,3 sur le motif Gal β 1-3GalNAc? Nous avons étudié l'expression transcriptionnelle des trois enzymes potentiellement impliquées dans cette réaction au niveau des cellules du colon HT29-MTX, et au niveau de cellules de l'épiderme : les kératinocytes et les mélanocytes. En effet, des changements de sialylation ont été observés, lors du traitement des cellules HT29 par un inhibiteur de glycosylation, ou lors de la différenciation des kératinocytes et en fonction du caractère métastatique des lignées de mélanome. Et dans ces trois cas, ce sont des variations de cette activité de transfert qui pourraient être impliquées dans ces changements de sialylation.

A- Application aux lignées cellulaires de cancer du colon : HT29-MTX.

Les mucines sont des glycoprotéines, produites par les cellules épithéliales normales et dans les tissus cancéreux. Les mucines sécrétées sont les composants majeurs des mucus respiratoires, gastro-intestinaux et des épithéliums génitaux. Les mucines constituent une famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire, hautement glycosylées (Roussel *et al.*, 1988). De plus, les mucines sont très hétérogènes du point de vue de leur glycosylation, mais aussi du point de vue de leur partie peptidique (Lamblin *et al.*, 1991). La partie glycanique représente 80 % du poids

moléculaire des mucines et elle est principalement composée de O-glycannes liés sur des résidus de sérine ou de thréonine. La transformation maligne des cellules épithéliales est accompagnée de changements dans les caractéristiques biochimiques des mucines (Lesuffleur *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996b). Les mucines produites par les cancers du colon sont caractérisées par une diminution de la longueur des chaînes oligosaccharidiques par rapport aux mucines coliques normales (Boland *et al.*, 1990). Plusieurs altérations dans les structures oligosaccharidiques ainsi que de l'antigénicité des structures O-glycanniques ont été décrites dans les cancers du colon : une augmentation des sialomucines, une diminution du taux de O-acétylation des acides sialiques et des sulfomucines, une surexpression des structures Tn et Sialyl Tn, et une augmentation de l'expression des antigènes Lewis ainsi que l'apparition des groupes sanguins A, B, H dans le colon distal (Lesuffleur *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996b).

Une O-glycosylation anormale des mucines est également retrouvée pour les mucines synthétisées par des cellules de colon en culture ayant un phénotype muco-sécréteur : les cellules HT29-MTX, sélectionnées à partir de la lignée parentale HT29 cultivée en présence de méthotrexate (Lesuffleur *et al.*, 1990). La sous population HT29-MTX sécrète des mucines fortement sialylées et portant des épitopes habituellement présents sur les mucines gastriques normales (Lesuffleur *et al.*, 1991; Maoret *et al.*, 1989). Un inhibiteur de glycosylation, le benzyl-N-acétyl- α -galactosaminide, a été initialement utilisé pour son potentiel d'inhibition *in vitro* de l'UDP-Gal : GalNAc-R β 1,3-galactosyltransférase (core1 β 3-Gal-T, EC 2.4.1.122) (Kuan *et al.*, 1989). Cependant, il a été observé qu'un traitement de 24 heures, des cellules de colon muco-sécrétantes en culture, par le GalNAc α -O-benzyl conduit à une augmentation de l'expression des antigènes T et Tn (Huang *et al.*, 1992, Huet *et al.*, 1995). Des analyses ultérieures ont montré que le GalNAc α -O-benzyl est métabolisé dans la cellule en Gal β 1-3GalNAc α -O-benzyl qui agit comme un inhibiteur de la sialylation de l'antigène T, par compétition avec l'activité CMP-NeuAc : Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase, conduisant à une considérable diminution (13 fois) de la quantité d'acide sialique portée par les mucines. Les résultats du dosage d'activité de transfert d'acide sialique en α 2,3 sur du Gal β 1-3GalNAc α -O-paranitrophénol montre que cette activité est fortement exprimée dans les cellules HT29-MTX par rapport aux activités que nous avons dosées dans les lignées cellulaires mammaires (Huang *et al.*,

1992; Huet *et al.*, 1995, Delannoy *et al.*, 1996) (tableau XVI, page 107). Nous avons vu que cette activité peut être le résultat de l'action de trois enzymes : ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV. Pour les différencier, nous avons étudié l'expression de leurs ARNm.

La Multiplex RT-PCR des cinq sialyltransférases, à 36 cycles d'amplification, réalisée sur les cellules HT29-MTX, révèle que les enzymes les plus exprimées par ces cellules sont ST3Gal I et ST3Gal IV, suivies par ST3Gal III et ST6Gal I qui sont les enzymes les plus faiblement exprimées, ST3Gal II n'est pas détectable. Ces résultats sont donc en accord avec le dosage d'activité sialyltransférase et on peut penser que le transfert d'acide sialique en $\alpha 2,3$ sur du Gal $\beta 1-3$ GalNAc est catalysé essentiellement par ST3Gal I bien qu'on ne puisse exclure l'action de ST3Gal IV, cette dernière ayant cependant une affinité plus faible pour ce substrat.

Les changements de glycosylation observés au niveau des mucines des cellules HT29-MTX lors du traitement par le GalNAc α -O-benzyl, nous ont amené à mesurer l'activité Gal $\beta 1-3$ GalNAc $\alpha 2,3$ Sialyltransférase des cellules traitées. Cette activité a été mesurée par M^{me} Isabelle Kim par transfert de [¹⁴C]-Neu5Ac sur le substrat Gal $\beta 1-3$ GalNAc α -O-paranitrophenol. Tous les essais ont été réalisés sur des fractions microsomales afin de minimiser les interférences dues au GalNAc α -O-benzyl présent ou métabolisé pendant la culture cellulaire. Les résultats obtenus montrent que le traitement par le GalNAc α -O-benzyl augmente de 2,8 fois cette activité (Tableau XVI, page 107).

Tableau XVI: Activité (exprimée en nmol.h⁻¹.mg⁻¹) des fractions microsomales de cellules HT29-MTX traitées ou non par le GalNAc α -O-benzyl.

	Cellules contrôles	Cellules traitées
CMP-NeuAc : Gal $\beta 1-3$ GalNAc $\alpha 2,3$ -Sialyltransférase (substrat Gal $\beta 1-3$ GalNAc α -O-paranitrophenol)	46,7 +/- 2,2	130,0 +/- 7,9

Cette augmentation d'activité observée lors du traitement par un inhibiteur était inattendu. Pour déterminer si cette augmentation d'activité était due à une augmentation transcriptionnelle de ST3Gal I, nous avons réalisé une étude de l'expression relative, par RT-PCR, du taux d'ARNm de ST3Gal I comparé au taux d'ARNm de ST3Gal IV avec les cellules HT29-MTX contrôles ou traitées par le GalNAc α -O-benzyl au 15, 20 et 25^{èmes} jour de traitement. La réversion après 5 et 10 jours de culture en milieu standard

sans GalNAc α -O-benzyl, précédée d'un traitement de 15 jours avec le GalNAc α -O-benzyl, a également été étudiée. ST3Gal IV n'est pas affectée par le traitement par GalNAc α -O-benzyl. La comparaison des intensités relatives des fragments d'amplification de ST3Gal I par rapport à ST3Gal IV (Figure 28, page 109) indique que le traitement par le GalNAc α -O-benzyl, induit une augmentation de 2,7 à 3,2 de l'expression de ST3Gal I comparé à ST3Gal IV. Cette augmentation est bien du même ordre que l'augmentation d'activité enzymatique de transfert d'acide sialique sur le Gal β 1-3GalNAc α -O-paranitrophenol déjà observée. Ainsi, cette activité est, dans ce cas, due essentiellement à ST3Gal I. Après réversion, le niveau d'ARNm diminue et rejoint le niveau des cellules contrôles.

En parallèle, l'étude de l'expression du taux d'ARNm de ST3Gal I a été réalisé par la technique de Northern-Blot (Figure 28, page 109) par le Dr. Lesuffleur. Cette étude par la technique classique a été possible, vue les fortes activités observées. Les résultats montrent, aussi, une augmentation de la transcription de ST3Gal I dans les cellules traitées, cette augmentation étant cependant réversible.

On peut penser que cette augmentation d'activité sous l'effet d'un inhibiteur de glycosylation est due à un effet stimulateur de l'exposition chronique au GalNAc α -O-benzyl sur l'expression de ST3Gal I.

De plus, ces expériences montrent qu'encore une fois la Multiplex RT-PCR est un outil fiable et sensible pour la détection des ARNm des sialytransférases. En effet, cette détection par RT-PCR réalisée à 25 cycles d'amplification seulement, a pu être ainsi confirmée par Northern-Blot. De plus, la quantification de l'augmentation de 2,7 à 3,2 du taux d'ARNm de ST3Gal I correspond à l'augmentation de 2,8 de l'activité enzymatique.

Cette étude fait partie de la publication:

S. HENNEBICQ-REIG, T. LESUFFLEUR, C. CAPON, C. de LOBOS, I. KIM, O. MOREAU, C. RICHEL, B. HEMON, M-A. RECCHI, E. MAES, J-P. AUBERT, F. X. REAL, A. ZWEIBAUM, P. DELANNOY, P. DEGAND et G. HUET. (1998) « **Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl- α -D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC mucin secretion.** » *Biochemical Journal*, 334, 283-295.

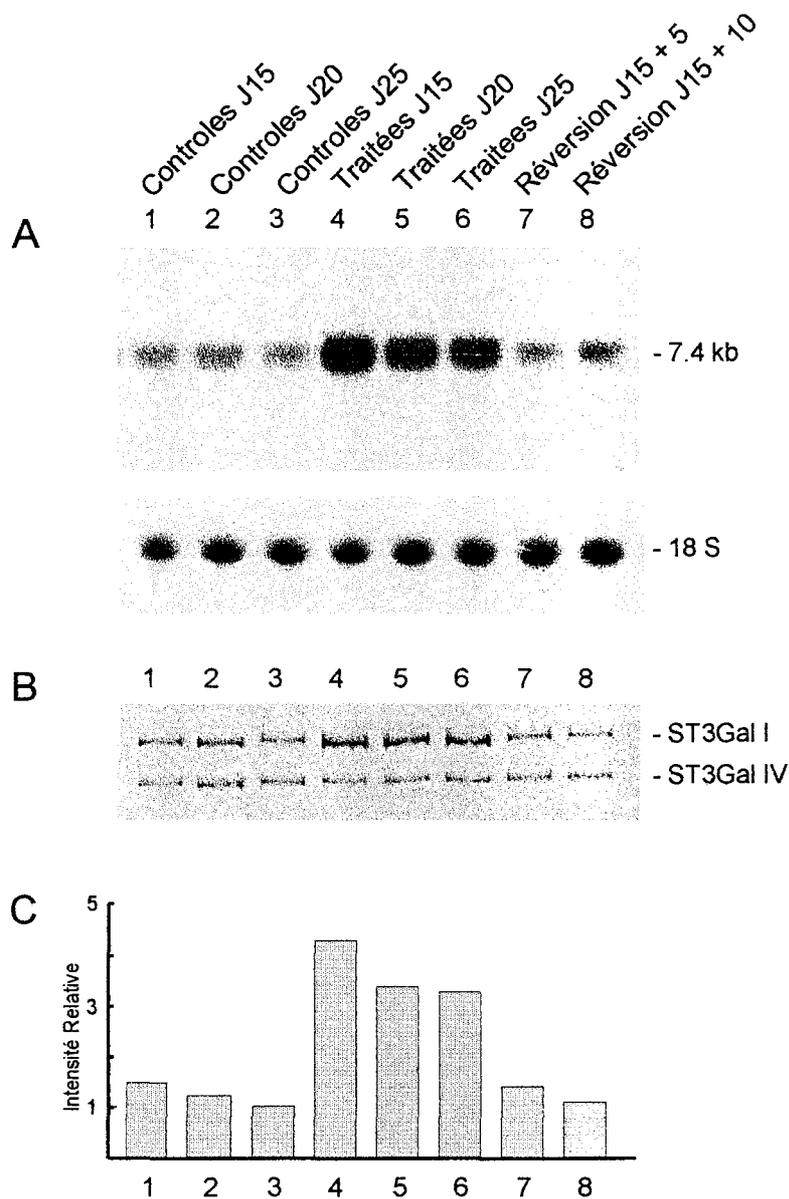


Figure 28 : Analyse de l'expression de l'ARNm de ST3Gal I dans les cellules HT29-MTX contrôles , traitées par le GalNac α -O-benzyl, et la réversion.

A : Analyse par Northern-Blot de l'ARNm de ST3Gal I à partir de 40 μ g d'ARN total. Une sonde d'ADnc de ST3Gal I marquée au $[^{32}\text{P}]$ a permis la révélation.

B : Multiplex RT-PCR de ST3Gal I et ST3Gal IV à 25 cycles d'amplification.

C : Intensité relative de ST3Gal I par rapport à ST3Gal IV.

B- Etude de l'expression des Sialyltransférases dans les kératinocytes et les mélanocytes humains.

1- les kératinocytes "normaux".

a- Introduction.

L'épiderme se compose d'un compartiment germinatif (la couche basale) où s'effectue les mitoses, et d'un compartiment de différenciation (les couches spinuse, granuleuse et cornée), où les kératinocytes subissent un certain nombre de transformations progressives amitotiques pour finalement constituer les cornéocytes, cellules mortes qui desquament à la surface de la peau (Figure 29, page 111).

La différenciation épidermique s'accompagne d'une évolution de l'expression des résidus glucidiques membranaires, qui peut être globalement appréciée en histochimie par l'utilisation de lectines de spécificité différente. Réano *et al.* (1982) ont démontré que des lectines végétales mettent en évidence à la surface des kératinocytes des structures réceptrices au niveau des glycoconjugués. Certaines lectines reconnaissent des structures réceptrices à la surface des cellules au niveau de tout l'épiderme (ConA, HPA, MPA, RCA-120, WGA), alors que d'autres sont spécifiques de certains sous-compartiments épidermiques (LFA, PNA, SBA, UEA-I).

La PNA (spécifique du disaccharide Gal β 1-3GalNAc) est une lectine intéressante par le fait que l'assise basale de l'épiderme humain normal n'est pas marquée en histochimie, mais les cellules du compartiment suprabasale sont PNA positives (avec un gradient positif en direction des assises superficielles). Il semble donc que les molécules PNA-réactives représentent un marqueur de différenciation épidermique. Par ailleurs, après traitement des coupes par une sialidase, des sites PNA-réactifs sont démasqués au niveau des cellules basales de l'épiderme. En pathologie, dans les épithéliomas spinocellulaires, les sites PNA-réactifs sont masqués par de l'acide sialique. La PNA identifie deux glycoprotéines de 167 et 190 kDa. Le traitement des extraits par la sialidase entraîne une diminution de masse moléculaire des glycoprotéines, mais ne

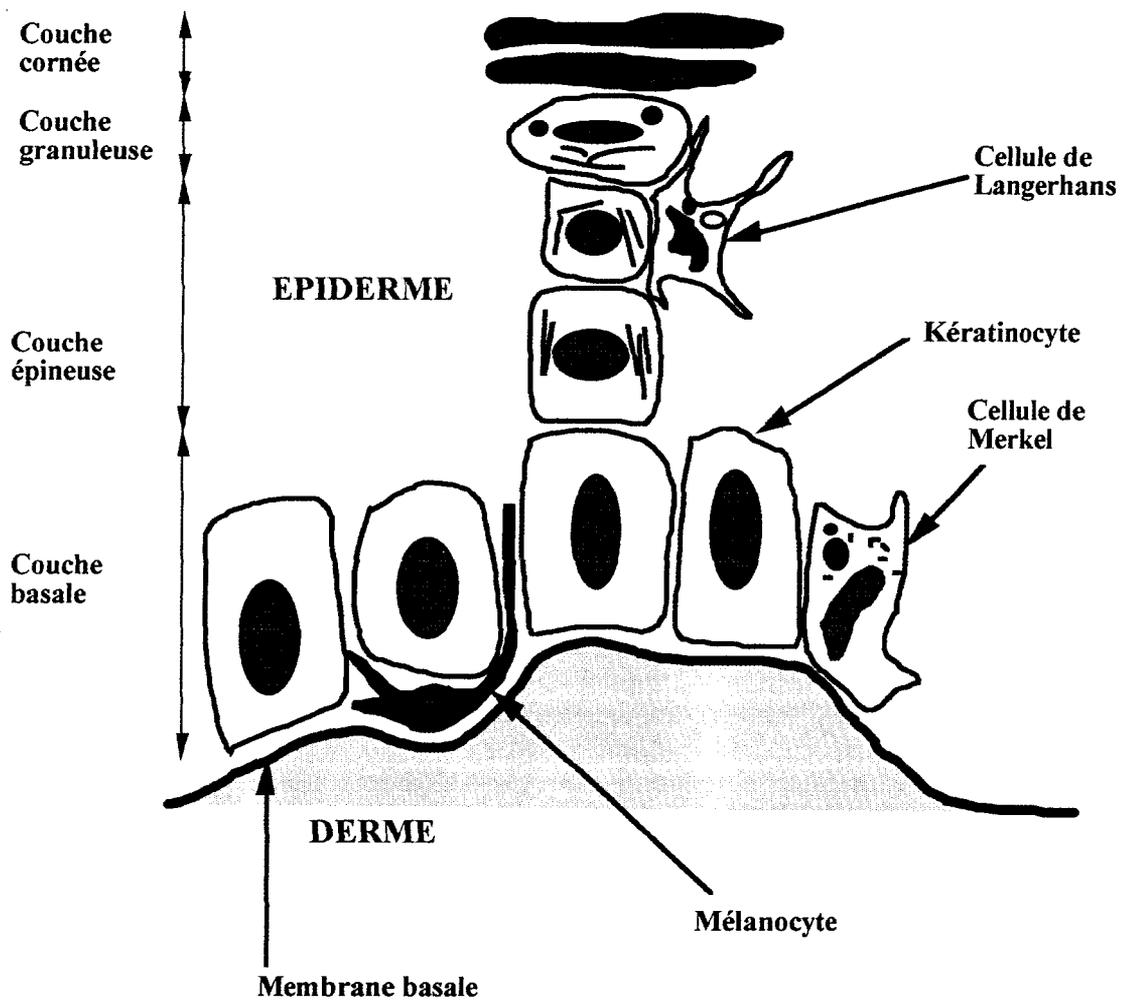


Figure 29 : Représentation schématique de l'épiderme (d'après Réano).

révèle pas de nouvelles molécules. Ces molécules sont très fortement glycosylées et très sensibles à la trypsine (Réano *et al.*, 1984).

In vitro, dans des cultures stratifiées de Kératinocytes (milieu normocalcique) des molécules PNA-réactives sont aussi exprimées par les assises suprabasales. Des glycoprotéines fixant la PNA ont été caractérisées dans des cultures normales traitées par l'interferon- γ , lymphokine qui stimule la différenciation kératinocytaire *in vitro*. Les glycoprotéines PNA-réactives ont été identifiées sous forme d'un ensemble de composés de haut poids moléculaire (300-360 kDa), faiblement reconnus dans les cultures témoins mais très fortement exprimés dans les cultures traitées par l'INF- γ . En outre, après traitement des lysats par la sialidase de *Vibrio cholerae*, une glycoprotéine de 205 kDa fixant la PNA est démasquée dans les cultures témoins mais non retrouvée en présence d'INF- γ . Au niveau des cellules traitées, cette désialylation ne provoque pas de changement de la fixation de la PNA sur les composés de haut poids moléculaire (300-360 kDa) (Réano *et al.*, 1990).

Il semble donc que le système acide sialique/Gal β 1-3GalNAc joue un rôle majeur dans la différenciation normale et néoplasique des kératinocytes humains.

C'est dans ce contexte qu'une collaboration a été établie avec le Dr. Réano (Laboratoire de Recherche «Peau Humaine et Immunité», INSERM U-346, Hôpital Edouard-Herriot, Lyon) dans le but d'étudier l'expression des sialyltransférases pouvant intervenir dans la sialylation du motif Gal β 1-3GalNAc. Comme nous l'avons déjà vu précédemment, les sialyltransférases, pouvant transférer de l'acide sialique en α 2,3 sur ce motif, sont au nombre de 3 : ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés principalement à l'étude de l'expression de ces trois enzymes.

b- Amplification par Multiplex RT-PCR des Sialyltransférases impliquées dans la sialylation du disaccharide Gal β 1-3GalNAc dans des kératinocytes humains.

Cette étude a été réalisée sur des kératinocytes humains normaux cultivés dans un milieu hypocalcique (milieu défini, KSFM, milieu sans sérum, la concentration en Ca²⁺ est de 0,12 mM,) jusqu'à la confluence. L'effet de l'interféron γ a été étudié en

cultivant les cellules pendant 3 jours après la confluence dans un milieu normocalcique (la concentration en Ca^{2+} est de 1,2 mM, concentration habituelle des milieux avec sérum) en présence de concentrations croissantes d'interféron γ , à savoir 0, 20, 50, 100 et 200 U/ml. Dans ce cas, une stratification des kératinocytes est observée, ainsi que la formation de desmosomes. Les kératinocytes cultivés en milieu hypocalcique ont été utilisés comme témoins non différenciés. L'extraction des ARN totaux, la détermination de la concentration en ARN, la synthèse de l'ADNc ont été effectuées comme décrit précédemment. La GAPDH a été utilisée comme témoin d'intégrité et de quantification des ADNc. L'amplification a été effectuée à partir de 150 ng d'ARN totaux. Le résultat obtenu après 20 cycles d'amplification est présenté dans la figure 30, page 114.

L'amplification des fragments correspondants à ST3Gal I, II et IV a été réalisée dans les conditions d'amplification préalablement mises au point pour la Multiplex RT-PCR des cinq Sialyltransférases. L'expérience a été réalisée à partir de 2 μl des différents échantillons à 36 cycles d'amplification. Ces résultats sont rassemblés dans la figure 30 (Les ADNc des cellules HepG2 et MDA-MB-231 ont été utilisés comme témoins positifs).

La quantification des fragments correspondant à ST3Gal I, II et IV par rapport au fragment obtenu pour la GAPDH a été effectuée à l'aide du logiciel Quantiscan (Biosoft International). Les résultats sont exprimés en intensité relative (Figure 31, page 114).

Le profil d'expression des 3 Sialyltransférases obtenu par multiplex RT-PCR montre que ST3Gal IV est l'enzyme dont l'ADNc est le plus amplifié, suivi par ST3Gal I, enfin, on note que ST3Gal II n'est pas exprimée. On remarque nettement que l'augmentation de ST3Gal IV et ST3Gal I après traitement par l'INF- γ est proportionnelle à la quantité INF- γ . Les kératinocytes cultivés pendant trois jours supplémentaires en milieu normocalcique mais en absence d'interféron ont un profil d'expression pratiquement identique au profil obtenu pour les kératinocytes cultivés uniquement en milieu hypocalcique témoin. On peut donc conclure que seul l'INF- γ induit une augmentation de ST3Gal I et surtout de ST3Gal IV.

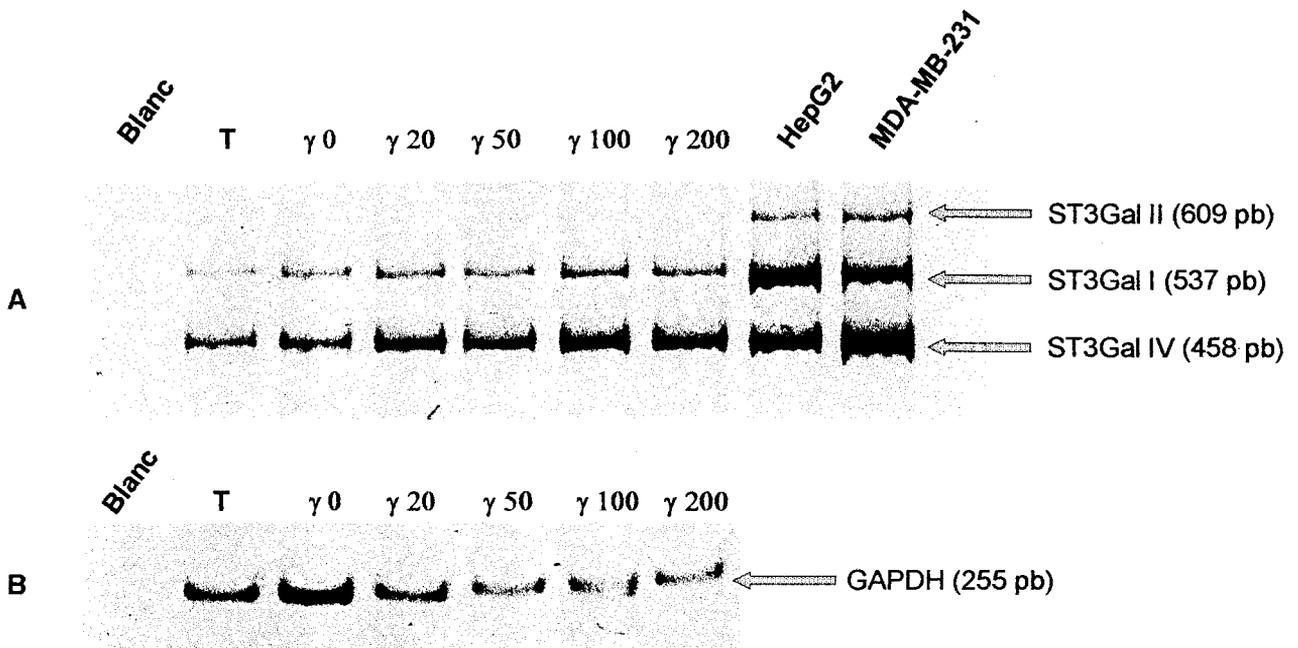


Figure 30 : (A) Expression des fragments spécifiques de ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV à 36 cycles d'amplification et du (B) fragment spécifique de la GAPDH à 20 cycles d'amplification, à partir d'ARN totaux de kératinocytes en milieu hypocalcique (T), et en milieu normocalcique avec différentes concentrations (0 à 200 U/ml) d'interféron γ . Les blancs correspondent à des amplifications réalisées sans ADNc. Les ADNc des cellules HepG2 et MDA-MB-231 ont été utilisés comme témoins d'expression des 3 sialyltransférases étudiées.

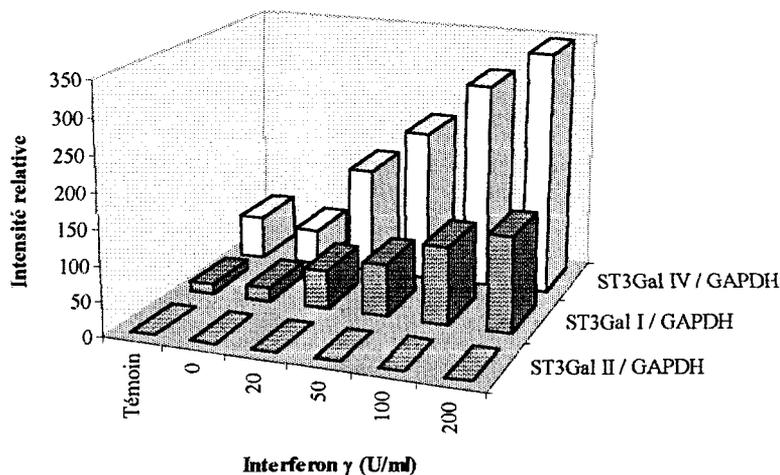


Figure 31 : Effet de l'interféron γ sur l'expression relative des 3 sialyltransférases. L'intensité relative des fragments spécifiques des 3 sialyltransférases ST3Gal I, II et IV est obtenue par rapport au fragment spécifique de la GAPDH.

c- Discussion.

Le rôle du calcium au niveau de la régulation de la transcription de ces 3 enzymes a été abordé récemment par Taniguchi *et al.* (1998). Cette étude a été réalisée sur des kératinocytes humains en culture et démontre que lorsque la concentration en calcium dans le milieu passe de 0,03 mM à 1 mM, cela induit une différenciation cellulaire et un passage d'un phénotype PNA négatif à un phénotype PNA positif, relié à une diminution de la transcription de ST3Gal IV. Ces études ont été réalisées par la technique classique de Northern-Blot, et n'ont pas révélé l'expression de ST3Gal I et de ST3Gal II dans ces cellules.

La technique de multiplex RT-PCR a permis de montrer que l'ARNm de ST3Gal I est bien exprimé dans les kératinocytes mais à un niveau plus faible que l'ARNm de ST3Gal IV, ce qui explique certainement la non détection de ST3Gal I par Taniguchi *et al.* (1998) compte tenu du faible signal obtenu en Northern-blot pour ST3Gal IV. De plus, la concentration en calcium du milieu hypocalcique (0,12 mM) est quatre fois supérieure à celle utilisée dans cette étude (0,03 mM). Dans notre étude, lorsque l'on passe du milieu hypocalcique (0,12 mM) au milieu normocalcique (1,2 mM), on remarque une très faible diminution du taux d'ARNm de ST3Gal IV (Figure 31, page 114).

Quoi qu'il en soit, les résultats concernant l'action de l'INF- γ sur la différenciation des kératinocytes et le passage des cellules d'un phénotype PNA négatif à un phénotype PNA positif, ne peuvent être expliqués par une diminution des ARNm des sialyltransférases impliquées dans la sialylation en α 2,3 du motif Gal β 1-3GalNAc. Ce changement de phénotype fait certainement intervenir d'autres mécanismes que la simple régulation transcriptionnelle des sialyltransférases (Cf. conclusion générale, page 118).

2-Cellules issues de mélanomes.

a- Introduction.

Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Dr. Berthier (Laboratoire de Recherche «Peau Humaine et Immunité», INSERM U-346, Hôpital Edouard-Herriot, Lyon) qui a montré que la fixation de la PNA sur les glycoconjugués de cellules tumorales dans les mélanomes primaires est corrélée avec le degré d'invasion locale qui gouverne le risque de métastases (Berthier & Vergnes, 1993). Un modèle qui mime les événements gouvernant les métastases précoces a été utilisé pour cette étude. Deux clones issus de la lignée cellulaire de mélanome humain M4Be ont été utilisés : le clone T1C3 choisi pour sa capacité à former des métastases pulmonaires après injection sous-cutanée, et le clone IC8 qui ne forme pas de métastases. Les cellules de mélanome T1C3 fixent la PNA. Les sites reconnus par la PNA sont portés par deux glycoprotéines de 140 et 110 kDa (MAGP1 et MAGP2). Ces 2 glycoprotéines sont également présentes au niveau des cellules non métastatiques IC8, mais sous une forme sialylée (Zebda *et al.*, 1994). Ainsi, les cellules métastatiques de mélanome T1C3 semblent exprimer l'antigène T non sialylé, alors que dans les cellules non métastatiques IC8, cet antigène serait sialylé, les deux types cellulaires exprimant en quantité comparable les glycoprotéines MAGP1 et MAGP2.

De plus, une étude réalisée par le Dr. Berthier portant sur l'activité des glycosyltransférases impliquées dans la voie de biosynthèse des O-glycannes, montre que les cellules IC8 ont une activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase 2 fois plus élevée comparée à celle des cellules T1C3. Cependant, les deux types cellulaires expriment une quantité comparable d'acide sialique à leur surface. L'activité des sialidases endogènes est également équivalente dans les deux lignées, ainsi que les activités GalNAc-Ser/Thr α 2,6-sialyltransférase et NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 2,6-sialyltransférase.

Ces résultats suggèrent que le motif Gal β 1-3GalNAc non sialylé exprimé par les cellules métastatiques de mélanome pourrait être le résultat d'une diminution de l'activité Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransférase. Pour déterminer quelle(s) enzyme(s) est (sont) responsable(s) de cette activité et si cette modification d'activité se situe au

niveau transcriptionnel, les trois enzymes ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV ont été co-amplifiées par la technique de Multiplex-RT-PCR.

b- Expression des Sialyltransférases impliquées dans la sialylation du disaccharide Gal β 1-3GalNAc dans les clones de cellules de mélanome humain IC8 et T1C3.

Ces cellules ont été cultivées dans un milieu de McCoy 5A (Gibco) contenant 10% de sérum de veau et récupérées à confluence. L'extraction, la quantification des ARN totaux et la synthèse d'ADNc ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

L'amplification des fragments spécifiques de ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV est présentée dans la figure 32, page 118, après 26, 30 et 36 cycles d'amplification. La GAPDH (utilisée comme témoin d'intégrité des ADNc) a été amplifiée séparément et le résultat obtenu après 25 cycles d'amplification est présenté également dans la figure 32 (page 118).

c- Résultats et discussion.

Le profil d'expression des 3 Sialyltransférases visualisées par Multiplex RT-PCR est pratiquement identique dans les deux lignées cellulaires. Il apparaît que ST3Gal IV est l'enzyme dont l'ADNc est le plus amplifié, suivi par ST3Gal I, et enfin on note une expression faible mais significative de ST3Gal II.

On peut donc conclure qu'il n'existe pas de différence entre les deux lignées cellulaires T1C3 et IC8 au niveau de l'expression transcriptionnelle des trois sialyltransférases impliquées dans la sialylation du motif Gal β 1-3GalNAc. Donc la différence de sialylation de ce motif observée entre ces deux clones est le résultat d'une régulation autre que celle faisant intervenir la transcription de ces trois enzymes

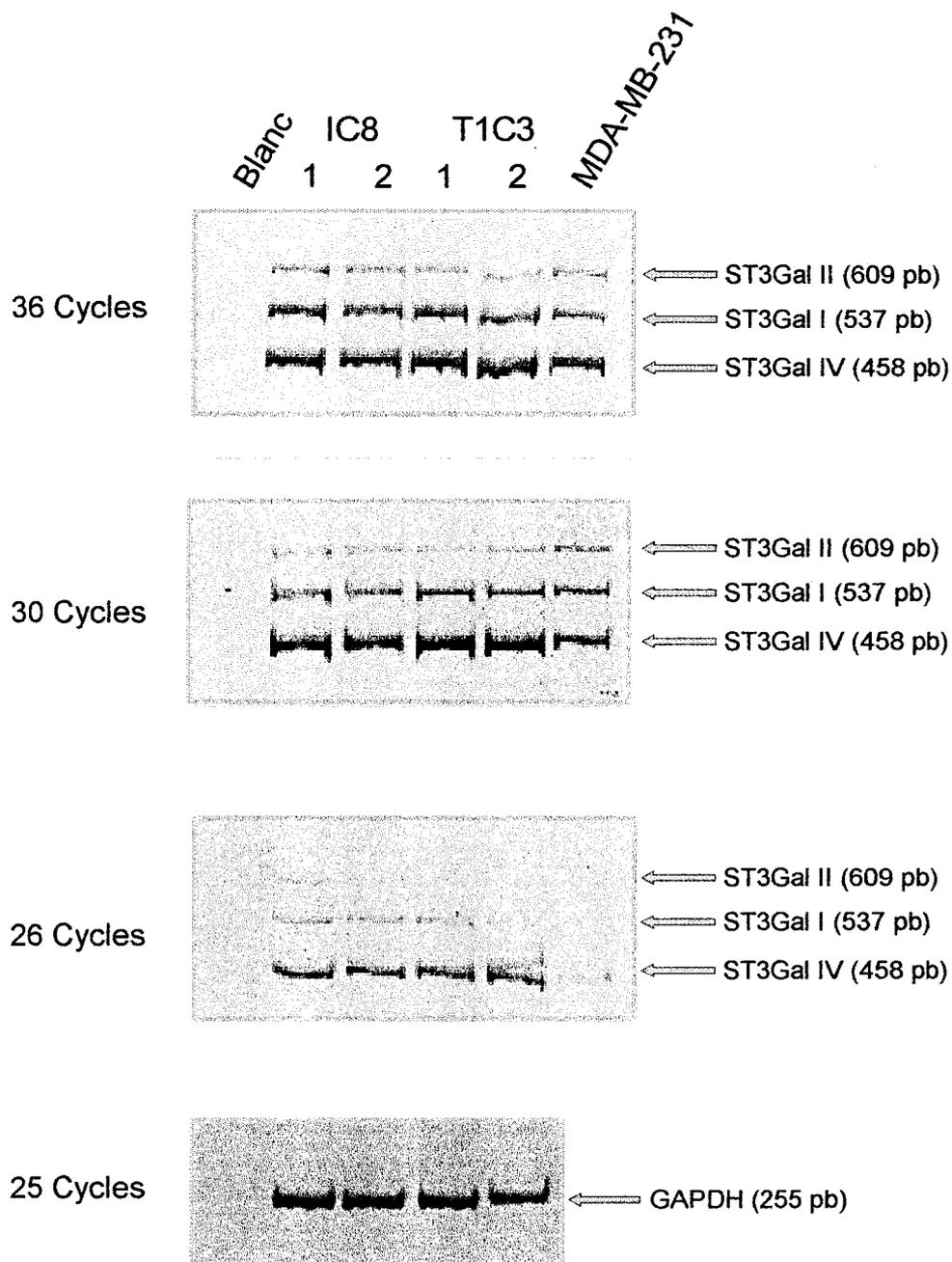


Figure 32 : Co-amplification des fragments spécifiques de ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV, à partir de deux préparations d'ARN totaux de cellules IC8 et T1C3, à 26, 30 et 36 cycles d'amplification. Les cellules MDA-MB-231 ont été utilisées comme témoins positifs.

3-Conclusion sur les lignées cellulaires de la peau.

On retrouve le même rapport entre les sialyltransférases ST3Gal I et IV, à savoir que ST3Gal IV est plus fortement exprimée que ST3Gal I, dans les lignées cellulaires de kératinocytes ou de mélanomes. La différence entre les kératinocytes, cellules "normales" de la peau, et les cellules de mélanomes cancéreuses, réside dans le fait que les premières n'expriment pas ST3Gal II, alors que les deux clones cellulaires cancéreux expriment cette enzyme.

L'utilisation de mélanocytes normaux permettrait de connaître le taux d'expression de ST3Gal II afin d'approfondir cette étude.

C- Conclusion générale.

Les exemples développés dans ce chapitre montrent que les variations de sialylation à la surface cellulaire ne peuvent être expliquées uniquement par des variations de la transcription des sialyltransférases. Celles-ci sont l'un des éléments nécessaires à la formation des structures sialylées, mais d'autres facteurs contrôlent cette synthèse. En effet on ne peut pas exclure une régulation post-traductionnelle des sialyltransférases, une régulation d'activité par des inhibiteurs présents dans un type cellulaire donné, par la concentration en substrat accepteur ou en CMP-NeuAc. La présence d'autres sialyltransférases non encore caractérisées mais ayant la même activité, ou des régulations différentes des glycosyltransférases intervenant en amont de l'action des sialyltransférases, sont des hypothèses qui ne peuvent pas non plus être écartées. En outre, les sialidases présentes dans les différentes lignées cellulaires participent également à la régulation de la formation des structures sialylées.

IV- Analyse de l'expression des sialyltransférases par Multiplex RT-PCR dans des biopsies de cancer du sein.

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de la technique de Multiplex RT-PCR sur des cellules en culture nous ont amené à l'appliquer directement à des tissus tumoraux, dans l'optique de déterminer les variations de l'expression de ces enzymes *in vivo*. Cette étude a été réalisée en une collaboration avec le Dr. Peyrat (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, Lille). Ce dernier a mis à notre disposition une collection d'ARN totaux de biopsies de tumeurs du sein prélevées à différents stades d'évolution. Le but de cette étude était de tenter de mieux comprendre les relations existant entre l'expression des sialyltransférases et le développement tumoral (notamment l'apparition de métastases) et de déterminer si les variations de l'expression de ces enzymes pourraient être un marqueur de l'évolution tumorale. L'application de cette technique au cours du suivi thérapeutique permettrait peut-être de fournir un nouvel outil pronostique de l'évolution de la tumeur, des marqueurs fiables faisant toujours cruellement défaut dans ce type de pathologie.

A- Augmentation de la sensibilité de la technique de Mutiplex-RT-PCR de 5 sialyltransférases en utilisant des amorces fluorescentes.

Afin d'obtenir une meilleure quantification des fragments amplifiés, ce qui était nécessaire pour réaliser une étude systématique de l'expression des sialyltransférases au niveau des différentes tumeurs, nous avons utilisé les potentialités de la fluorescence.

En effet, la méthode d'analyse des fragments d'amplification utilisée au cours des expériences précédentes fait intervenir la coloration du gel de polyacrylamide qui peut varier d'un gel à l'autre. De plus, la coloration au bromure d'éthidium est fonction de la taille des fragments d'amplification et l'intensité de la révélation est d'autant plus faible que le fragment désigné est de petite taille. Les gels sont ensuite photographiés et

numérisés, à l'aide d'appareils qui possèdent des seuils de saturation, faussant ainsi peut être en partie la quantification.

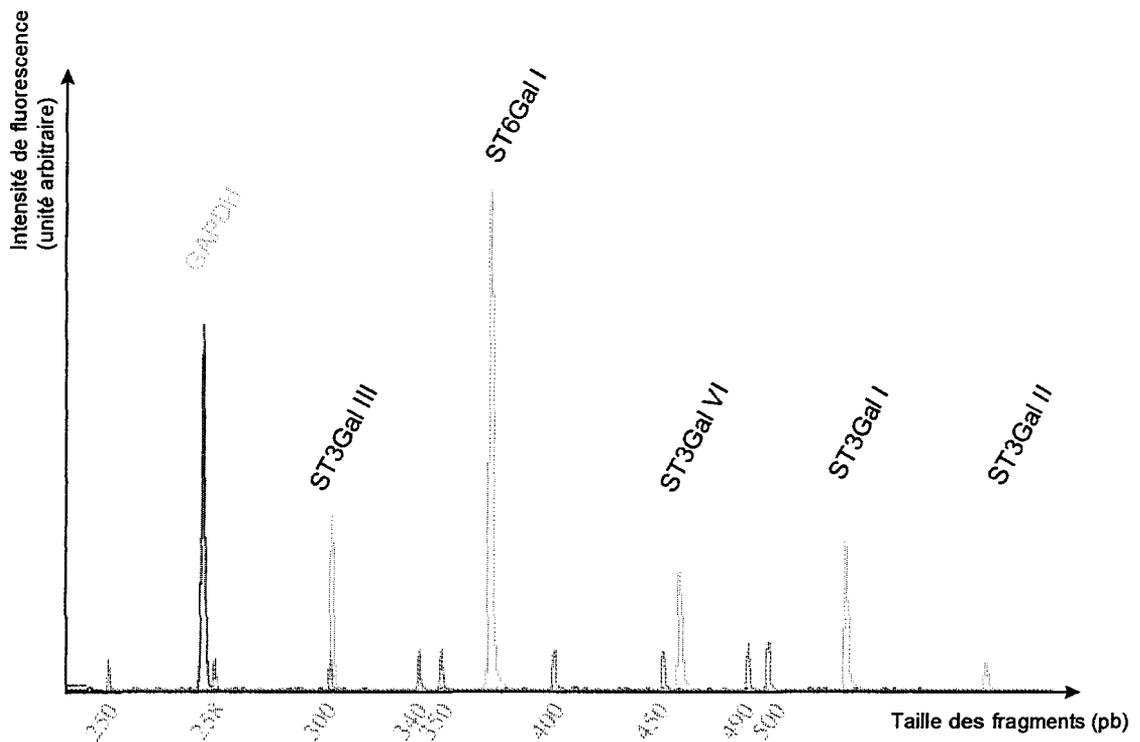
Pour la détection par fluorescence, seules les amorces 5' de chaque couple ont été marquées à l'aide d'un fluorophore. Ainsi, la surface des pics de fluorescence obtenus pour chaque fragment, est proportionnelle à la quantité d'amorce 5' utilisée lors de l'amplification de ce fragment, donc à la quantité de produit formée. La fluorescence permet également d'augmenter le seuil de sensibilité de la technique de Multiplex RT-PCR. En effet, une étude préalable réalisée à l'aide des amorces non fluorescentes montrait une faible expression des sialyltransférases dans les tumeurs du sein.

Nous avons séparé les différents fragments à l'aide du séquenceur automatique 373 (Applied Biosystems) et les résultats ont été analysés par le logiciel Genescan 672. Pour les 5 sialyltransférases, les amorces 5' ont été marquées par la 6-carboxy-2',4',7',4',7 hexachlorofluorescéine (HEX), pour la GAPDH l'amorce 5' a été marquée par la 6-carboxyfluorescéine (6-FAM).

Dans un premier temps, les couples d'amorces fluorescentes ont été testés en Multiplex RT-PCR dans les conditions expérimentales préalablement définies en utilisant l'ADNc de cellules HepG2 comme matrice. 1/60^{ième} des réactions de PCR ont été déposés dans le même puits, ainsi que des marqueurs de masse moléculaire marqué à la 6-carboxy-X-rhodamine.

Le profil obtenu correspond exactement au profil obtenu avec les amorces non fluorescentes : ST6Gal I est la sialyltransférase la plus exprimée dans les cellules HepG2, suivie par ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV, et ST3Gal II est l'enzyme la plus faiblement représentée (Figure 33, page 122).

De manière à déterminer la linéarité de la réaction d'amplification réalisée en Multiplex à l'aide d'amorces fluorescentes, nous avons effectué des dilutions successives de l'ADNc de cellules HepG2 (à partir de 2 µl de la solution d'ADNc correspondant à 300 ng d'ARN totaux de départ) et utilisé ces différentes dilutions comme matrice pour la co-amplification des fragments spécifiques des sialyltransférases. La réaction a été arrêtée après 36 cycles d'amplification. Des séries de dilution (à partir cette fois de 1 µl de la solution d'ADNc) ont été également utilisées pour l'amplification du fragment spécifique de la GAPDH. Dans ce cas, l'analyse a été effectuée après 22 cycles d'amplification. Les résultats de ces deux séries d'expériences sont présentés dans les figures 34 et 36, pages 123 et 124.



- Multiplex RT-PCR des 5 Sialyltransférase sur ARN de cellules HepG2 (2 µl d'ADNc, 36 cycles)
- RT-PCR de la GAPDH (1 µl d'ADNc, 20 cycles)
- ▣ Marqueurs de taille

Figure 33 : Profil de séparation des fragments spécifiques des 5 sialyltransférases et de la GAPDH amplifiés à partir des ADNc de cellules HepG2. Les amorces 5' utilisées pour la co-amplification des sialyltransférases sont marquées par le HEX (6-carboxy-2',4',7',4,7 hexachlorofluorescéine), et l'amorce 5' de la GAPDH par le 6-FAM (6-carboxyfluorescéine). La séparation et la détection ont été effectuées à l'aide d'un séquenceur automatique 373 (Applied Biosystems).

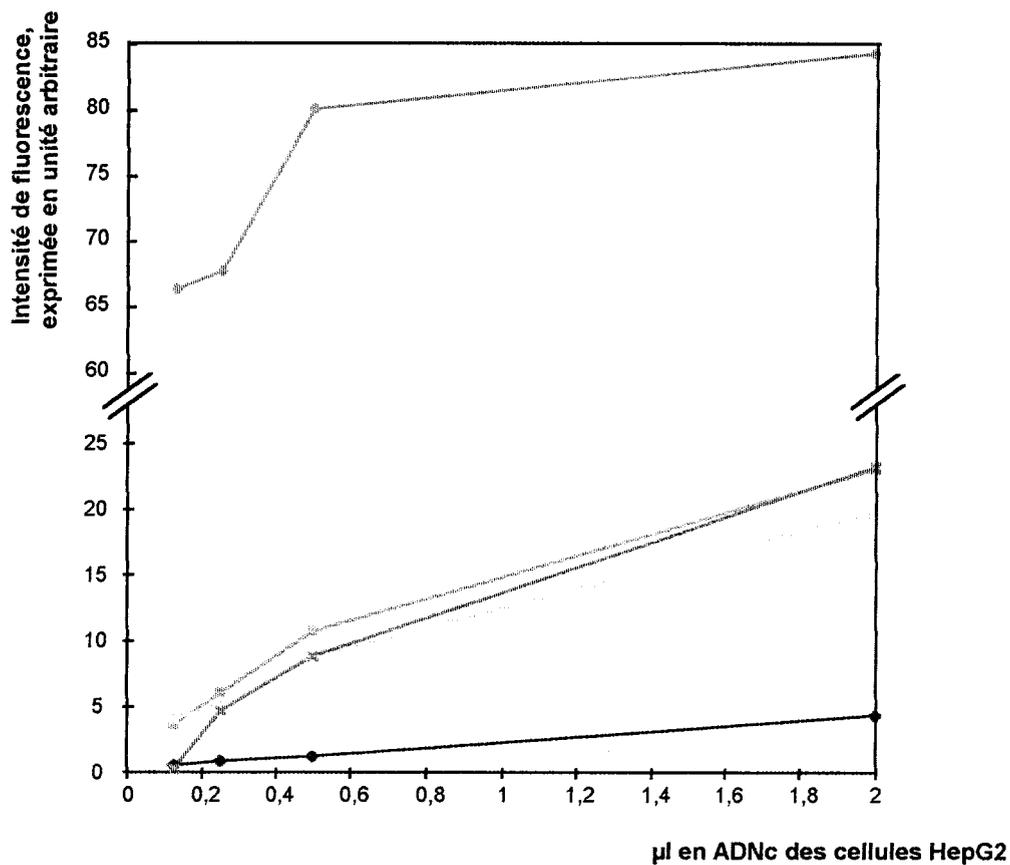


Figure 34 : Intensité des pics de fluorescence obtenue pour chacune des sialyltransférases en Multiplex RT-PCR, à 36 cycles d'amplification, en fonction de la concentration en ADNc de cellules HepG2.

◆ ST6Gal I; ◆ ST3Gal II; ◆ ST3Gal I; ◆ ST3Gal IV; ◆ ST3Gal III

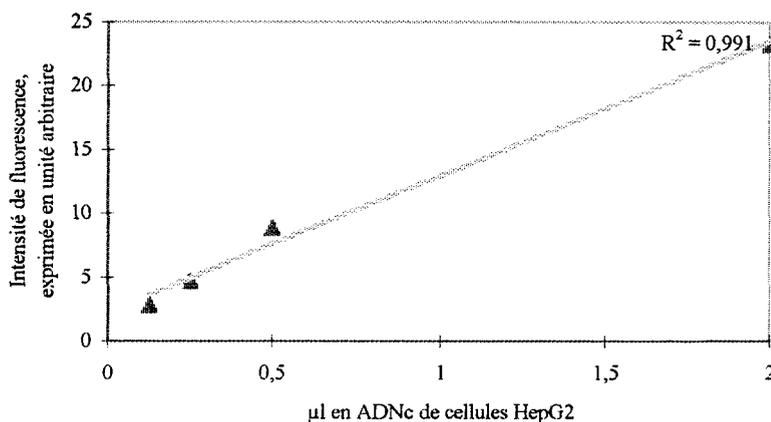


Figure 35 : Régression linéaire de l'intensité des pics de fluorescence obtenue pour ST3Gal III en Multiplex RT-PCR, à 36 cycles d'amplification, en fonction de la concentration en ADNc de cellules HepG2.

Coefficient de corrélation linéaire $R^2 = 0,991$.

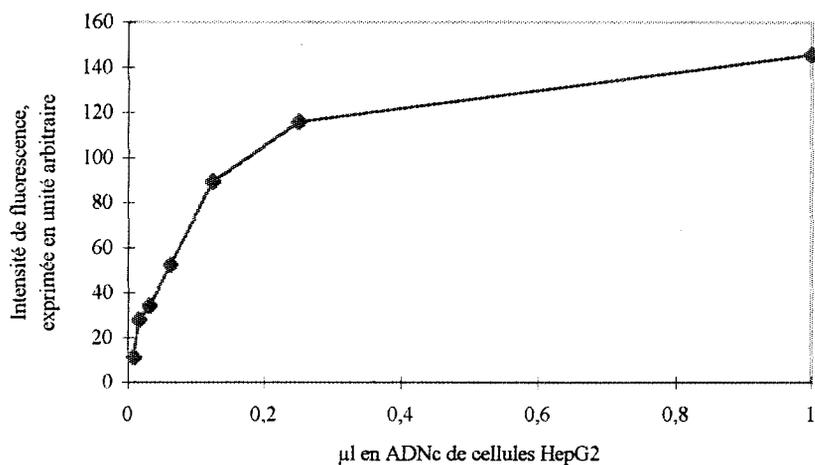


Figure 36 : Influence de la concentration en ADNc des cellules HepG2 sur l'amplification du fragment spécifique de la GAPDH, à 22 cycles d'amplification.

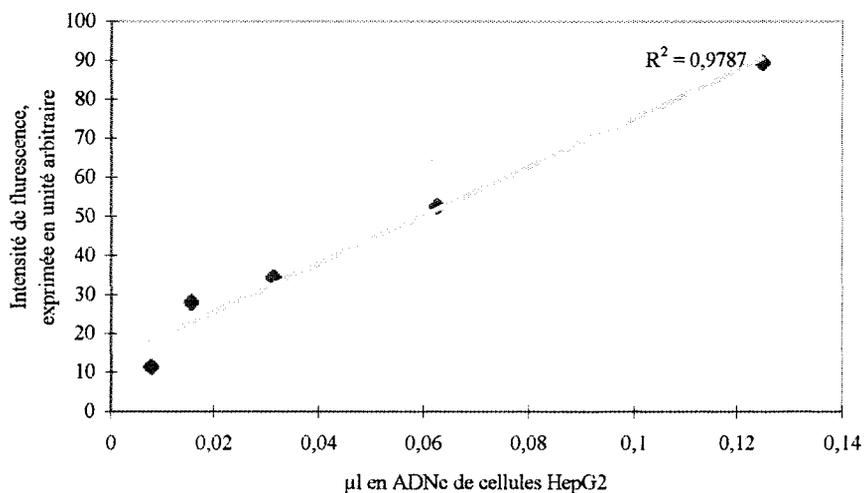


Figure 37 : Régression linéaire de l'intensité des pics de fluorescence obtenus pour le fragment spécifique de la GAPDH, à 22 cycles d'amplification, pour une quantité en ADNc de cellules HepG2 inférieure à 0,125 µl.

Coefficient de corrélation linéaire $R^2 = 0,9787$.

Si on extrait de l'expérience de Multiplex RT-PCR les courbes correspondant à l'amplification de chacune des sialyltransférases, il est possible de tracer une droite de corrélation linéaire, hormis pour ST6Gal I pour laquelle la saturation est atteinte très rapidement. La droite obtenue pour ST3Gal III est présentée à titre d'exemple dans la figure 35, page 123. Les coefficients de corrélation linéaire (R^2) obtenus pour chacune des sialyltransférases sont supérieures à 0,97 (0,9988 pour ST3Gal III; 0,972 pour ST3Gal IV; 0,9872 pour ST3Gal I et 0,991 pour ST3Gal II) et montrent que la linéarité de chacune des réactions est parfaitement respectée en Multiplex RT-PCR, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment.

L'expérience d'amplification de la GAPDH en fonction des dilutions en ADNc des cellules HepG2 montre une saturation qui provient de la fluorescence, la linéarité est obtenue pour une intensité de fluorescence inférieure à 90 unités arbitraires (Figure 37, page 124). Le coefficient de corrélation linéaire ainsi obtenu est de 0,9787. Ainsi, les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues pour l'amplification du fragment spécifique de la GAPDH devront se situer dans cette zone de linéarité.

En conclusion, l'apport de la fluorescence pour la détection des fragments d'amplification est appréciable. En effet, il est possible de quantifier précisément la quantité de produits formés et de diminuer les seuils de détection d'un facteur d'au moins 60.

La technique de Multiplex RT-PCR associée à une détection basée sur la fluorescence est l'outil idéal pour étudier les différences d'expression des sialyltransférases en fonction du stade de cancérisation.

B- Publication : Multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assessment of sialyltransferases expression in human breast cancer.

Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assessment of Sialyltransferase Expression in Human Breast Cancer¹

Marie-Ange Recchi,² Mohamed Hebbar,² Louis Hornez, Anne Harduin-Lepers, Jean-Philippe Peyrat, and Philippe Delanno³

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France [M.-A. R., A. H.-L., P. D.], and Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, BP 307, F-59020 Lille Cédex, France [M. H., L. H., J.-P. P.]

Abstract

Increased sialylation, especially involving the Sialyl-Lewis^x and Sialyl-Lewis^x determinants, has been reported in breast cancer. A multiplex reverse transcription-PCR method was used here to determine the expression of five sialyltransferases (ST3Gal III, ST6Gal I, ST3Gal IV, ST3Gal I, and ST3Gal II) in 49 patients surgically treated for locoregional breast cancer. We assessed the relationship between these expressions and clinical, pathological, and biological features. The most expressed sialyltransferase was ST3Gal III, which is involved in Sialyl-Lewis^x synthesis. ST3Gal III expression was positively correlated to ST6Gal I and ST3Gal IV expressions, to tumor size, and to the number of involved axillary nodes. Patients with high ST3Gal III expression had a shorter overall survival. High ST6Gal I expression was associated with histoprognostic grade III. ST6Gal I expression was negatively correlated to expression of progesterone receptor. In conclusion, high ST3Gal III and ST6Gal I expressions in human breast tumors are associated with poor prognosis markers.

Introduction

Modifications of cellular glycosylation are a common phenotypic change in malignancy. However, only a limited number of biosynthetic pathways are frequently altered in cancer. Increased β 1,6-branching, increased Sialyl-Lewis^x [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] and Sialyl-Lewis^a [NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc] epitopes, or the general increase in sialylation of cell surface glycoproteins are commonly observed in *N*-linked and *O*-linked oligosaccharides of carcinoma cells. These changes in glycosylation are related to grade, invasion, metastasis, and with a poor prognosis (1, 2).

Carbohydrate changes also occur in breast cancer. Sialyl-Lewis^x, Sialyl-Lewis^a, and Sialyl-Tn (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr) are tumor-associated antigens found in breast cancer (3-5). It has been shown that these epitopes are attached to, among other proteins, the MUC1 apoprotein (6). The CA 15₋₃ assay detects the circulating form of a high molecular weight sialomucin MUC1 and is a very powerful marker of advanced stages of breast cancer (7). Moreover, E-selectin, a cell surface adhesion molecule that interacts with Sialyl-Lewis^x and Sialyl-Lewis^a, is secreted as a soluble form (sE-selectin⁴) in breast cancer sera. High concentrations of sE-selectin are associated with reduced overall survival (8).

The biosynthesis of sialylated oligosaccharide sequences are cata-

lyzed by a family of enzymes named sialyltransferases. These enzymes use CMP-sialic acid as the activated sugar donor. More than 15 different sialyltransferases acting on glycoproteins and/or glycolipids have been characterized to date, and 8 different sialyltransferase cDNAs have been cloned from human tissues or cells (9).

Changes in sialyltransferase expression have been observed in cancer tissues or cells, and the regulation of their expression is achieved mainly at the transcriptional level. For example, transfection of rat fibroblasts with the *ras* oncogene leads to an increase of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.1, ST6Gal I) mRNA, and of the invasion potential of these cells (10). Recently, Ito *et al.* (11) demonstrated by quantitative RT-PCR that in human colorectal cancer, the ST3Gal I mRNA was prominently increased in cancer tissues compared with nonmalignant colorectal mucosa.

Very little investigation into the expression of sialyltransferases in human breast cancer has been carried out. However, one study conducted on breast cancer cells showed an elevated activity in the transfer of sialic acid onto Gal β 1-3GalNAc-R acceptor substrates (12). This elevated activity could explain the higher level of sialylation of MUC 1 found in these cells (13).

Recently, we have developed a sensitive multiplex RT-PCR method (14) that can monitor the expression of four human sialyltransferases: ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III, and ST3Gal IV (15);⁵ these are involved in the biosynthesis of the sialylated structures of glycoproteins (Table 1). This method has been extended to a fifth enzyme recently cloned (16). The aim of the present study was to assess the expression of these five sialyltransferases in patients treated for locoregional breast cancer, and to assess the relationship between this expression and the clinical, pathological, and biological features of these patients.

Materials and Methods

Patients and Cells. This retrospective study involved 49 unselected patients undergoing surgery for locoregional breast cancer in the Center Oscar Lambret (the Anticancer Center of the North of France, Lille, France). Patients were included between March 1990 and June 1993. The mean age of the patients was 61.1 \pm 10.5 years (SD; range, 36-80). None of the patients had evidence of distant metastasis. In the studied population, the minimum and the median durations of follow-up of living patients were 9 months and 65 months, respectively. Within this population, the number of deaths was 22 (44.8%) and the number of relapses was 18 (36.7%). HepG2 cells from Dr. B. Laine (Institut Pasteur, Lille, France) were from American Type Culture Collection (HB 8065) and were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% nonessential amino acids, 2 mM glutamine, and antibiotics. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Received 6/12/98; accepted 7/31/98.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by grants from the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Paris, France). M.-A. R. has a fellowship of the "Association pour la Recherche contre le Cancer."

² These authors have contributed equally to this work.

³ To whom requests for reprints should be addressed, at Chimie Biologique, Université des Sciences, F-59655 Villeneuve D'Ascq, Cedex, France. Phone: 33-320-43-69-23; Fax: 33-320-43-65-55; E-mail: pdelanno@chouia.univ-lille1.fr.

⁴ The abbreviations used are: sE-selectin, soluble E-selectin; ER, estradiol receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPG, histoprognostic grading; PgR, progesterone receptor; RT-PCR, reverse transcription-PCR.

⁵ The nomenclature of sialyltransferases: ST3Gal I: CMP-NeuAc: Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.4; ST3Gal II: CMP-NeuAc: Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.-; ST3Gal III: CMP-NeuAc: Gal β 1-3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.6; ST3Gal IV: CMP-NeuAc: Gal β 1-4GlcNAc α 2,3-sialyltransferase, EC 2.4.99.-; ST6Gal I: CMP-NeuAc: Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase, EC 2.4.99.1.

Table 1 Specificity of human sialyltransferases and sequences of the six primer pairs used for PCR amplification

Target ^a cDNA	Acceptor specificity	Primers set ^b	Guanosine and cytidine content (%)	Melting temperature (°C)	PCR product size (bp)
GAPDH (J04038)		5'- ⁴⁴⁰⁶ GGTGGACCTGACCTGCCGTCTA-3' 3'- ⁴⁷⁶⁵ GAGGTCCACCACCCTGTTGCTG-5'	63	73.1	256
ST3Gal III (L23768)	Galβ1-3(4)GlcNAc	5'- ⁷⁵² CGGATGGCTTCTGGAAATCTGT-3' 3'- ¹⁰³¹ AGTTTCTCAGGACCTGCCTGTT-5'	50	70.3	300
ST6Gal I (X17247)	Galβ1-4GlcNAc	5'- ⁸⁴⁹ TATCGTAAGCTGCACCCCAATC-3' 3'- ¹¹⁹⁹ GAAGGCTGGTAAGTGACGATT-5'	50	69.1	371
ST3Gal IV (L23767)	Galβ1-4(3)GlcNAc	5'- ³²² CCCAAGAACATCCAGACCTCA-3' 3'- ⁷⁵⁹ CTAATTCGTCTTCGGGTGGTGC-5'	55	71	458
ST3Gal I (L29555)	Galβ1-3GalNAc	5'- ³⁶¹ TCAGAGTGGTCCCTGGGAATGT-3' 3'- ⁸⁷⁷ CGTTTCCTTGACCGTGGTAT-5'	55	71.2	537
ST3Gal II (U63090)	Galβ1-3GalNAc	5'- ⁹³⁰ TGGTTGACAGCCACTTTGACG-3' 3'- ¹⁵¹⁸ CCCTACGACCACGAAAGAAAC-5'	50	70.5	609
			50	70.9	

^a Genbank accession numbers are shown in brackets.

^b The number on the left side of each sequence indicates the position of the first nucleotide in the coding sequence of each cDNA, except for GAPDH, which indicates the first 5' nucleotide in the gene sequence. The sense primers of sialyltransferases were 5' 6-carboxy-2',4',7',4,7 hexachlorofluorescein-labeled, and the sense primer of GAPDH was 5' 6-carboxyfluorescein-labeled.

Pathology. After surgery, the tumor samples were divided into three parts: two parts were frozen for hormone-receptor and sialyltransferase analyses, and the third part was submitted for histological examination. Tumor samples consisted solely of invasive adenocarcinomas. The HPG was obtained using the Scarff and Bloom's criteria (17). Both ER and PgR were determined by the dextran-coated charcoal method, as described previously (18).

sE-selectin Assay. Serum samples were obtained from the patients before surgery. Blood (5 ml) were collected in EDTA, and were centrifuged at 3,000 × g for 10 min. Sera were stored at -20°C until analysis. Concentrations of sE-selectin were measured in duplicate using a commercial ELISA kit (R&D Systems, Inc., Abingdon, United Kingdom) as described previously (8). To avoid a possible rise in sE-selectin concentration associated with impaired liver or kidney functions, we verified that all patients had normal liver (serum bilirubin ≤ 30 μ mol/l; aspartate transaminase ≤ 25 IU/ml) and renal (serum creatinine ≤ 130 μ mol/l) function.

Isolation of Total RNA. Total RNA was isolated with the use of Tri-Reagent from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The tumor samples were homogenized in 1 ml of Tri-Reagent with a potter homogenizer. Following the supplier's recommendations, to minimize the possibility of DNA contamination when isolated RNA is to be used in RT-PCR, we performed three additional steps in the extraction procedure: (a) the homogenates were centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4°C to remove the insoluble material; (b) we proceeded with a phenol/chloroform extraction; and (c) the precipitation of RNA with isopropanol was performed in two steps. The RNA pellet was then washed with 750 μl of ethanol, centrifuged, and allowed to dry for 5-10 min by air-drying. The amount of the RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm.

RT-PCR. Total cellular RNA (5 μg) was heated at 65°C for 10 min and placed on ice for 2 min. Reverse transcription into cDNA was achieved using the First-Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia Biotech), according to the manufacturer's protocol using oligo-d(T) as initiation primer in a final reaction volume of 33 μl. The retrotranscription reaction (4 μl) was subjected to PCR amplification using sialyltransferase-specific derivated primers (Table 1), or 1 μl of the retrotranscription reaction was subjected to PCR amplification using GAPDH-specific derivated primers (Table 1). The oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec s.a. (Belgium). To visualize any contamination with genomic DNA, GAPDH-specific primers were designed in different exons separated in the genomic DNA by a 103-bp intron.

The 21 μl of PCR mixture for the multiplex PCR of the five sialyltransferase-specific fragments consisted of 2.5 units of Hi-Taq DNA polymerase (Bioprobe, France), 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP, and 0.3 μM of each primer. The 24 μl of PCR mixture for the GAPDH-specific fragment amplification consisted of 0.6 units of Hi-Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTP, and 0.6 μM of each primer. Samples were overlaid with two drops of mineral oil (Sigma Chemical Co.). Reactions were run in a PTC-100 thermal cycler (M. J. Research, Inc., Watertown,) using the following conditions: for specific GAPDH fragment amplification: 1 min at 94°C, 1 min at 69°C and 1.5 min at 72°C, 22 cycles; for multiplex RT-PCR of the fragment of five sialyltransferases: 1 min at 94°C, 1 min at 63°C and 2 min at 72°C, 40 cycles. In all experiments, negative control reactions were

performed by replacing cDNA template with sterile water, and positive controls were performed with HepG2 cDNA, a cell line that expresses the five sialyltransferases (14).

Quantification of Amplification Products. The sense primer of GAPDH was 5' fluorescently labeled with 6-carboxyfluorescein, and the sense primers of the sialyltransferases were 5' fluorescently labeled with 6-carboxy-2',4',7',4,7 hexachlorofluorescein. After completion of the PCR, 1/60 of the GAPDH PCR reaction mixture or 1/6 of the sialyltransferase multiplex PCR reaction mixture were coelectrophoresed through a 6% polyacrylamide-8 M urea gel on a 373 DNA Sequencing System from Applied Biosystem (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). Molecular mass markers fluorescently labeled with 6-carboxy-X-rhodamine (Applied Biosystem) were also coelectrophoresed. The results were analyzed with Genescan 672 Software (Applied Biosystem). Levels of each sialyltransferase expression were presented as the ratio enzyme-related area:GAPDH-related area.

Statistical Analyses. A difference between the expression of the five sialyltransferases was searched using a nonparametric one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test). A relationship between the sialyltransferase expression and other parameters was assessed using the χ² with Yates correction. A positive or negative correlation between the expression of each sialyltransferase was assessed using the Spearman nonparametric test. A linear correlation was also performed after log transformation. Overall survival and relapse-free survival curves were calculated using the Kaplan and Meier method. Comparison between curves was carried out by the log rank test. Graphic representations were performed using the box-plot method (19). In this representation, the box extends from the 25-75th percentile, with a horizontal line at the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Single points are considered outliers.

Results

Clinical and Pathological Features. Tumor size was ≤3 cm in 29 cases (59.1%) and >3 cm in 20 cases (40.8%) of the total 49 cases. An axillary nodal involvement was found in 28 of 49 patients (57.1%). HPG was obtained in 38 of 49 cases (77.5%). It was grade I in 2 cases (5.2%), grade II in 18 cases (47.3%), and grade III in 18 cases (47.3%) of the 38 cases analyzed. ER and PgR were obtained in all cases. A positivity for ER and PgR was found in 42 (85.7%) and 36 (73.4%) of the 49 cases analyzed, respectively. The mean concentration of circulating sE-selectin was 32.6 ng/ml ± 17.3 (SD; range, 9.7-111 ng/ml).

Sialyltransferase Expression. An individual example of the profiles obtained with biopsies is presented in Fig. 1A.

Whereas the fluorescent multiplex RT-PCR technique is 50-fold more sensitive than the previously described ethidium bromide revelation (14), we never detected any unspecific amplification product; this demonstrates the high specificity of the primer pairs used for sialyltransferase amplification. Using serial dilutions of HepG2 cDNA as positive control, we demonstrated the linearity of the multiplex

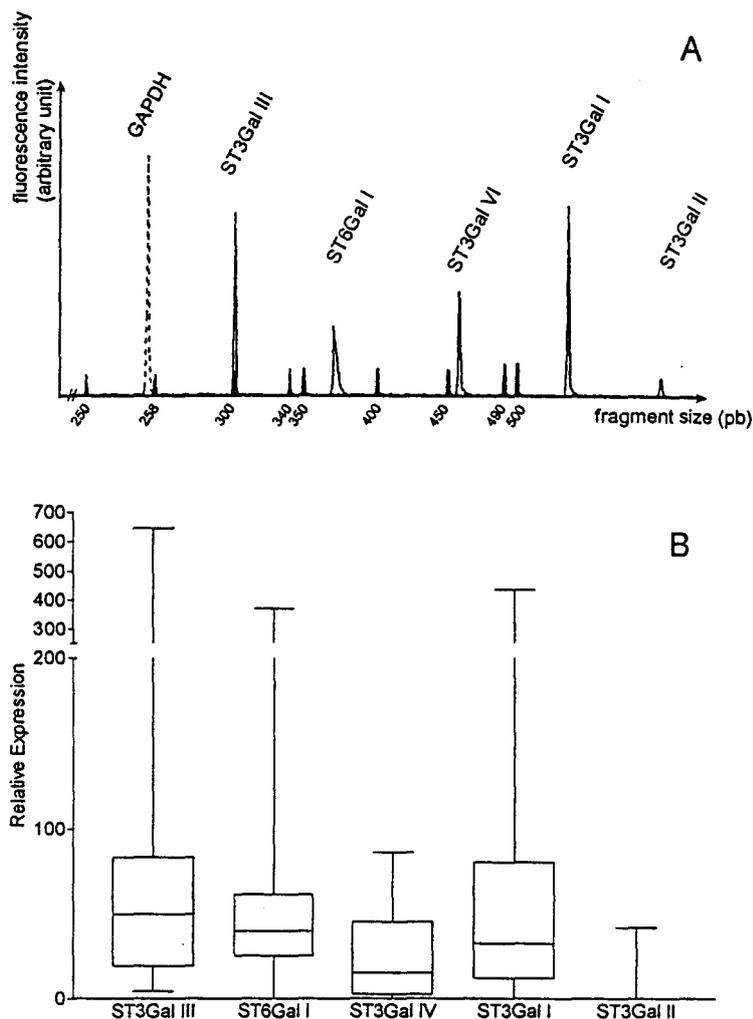


Fig. 1. A, example of a profile of the fluorescent peak corresponding to the five sialyltransferases (full line) and GAPDH (dotted line). The GAPDH PCR reaction mixture (1/60) or the sialyltransferase multiplex PCR reaction mixture (1/6) were coelectrophoresed through a 6% polyacrylamide-8 M urea gel on a 373 DNA Sequencing System and analyzed by Genescan 672 Software (Applied Biosystem). Molecular mass markers fluorescently labeled are indicated (full area). B, box-plot graphic representation (19) of the relative expression of the five sialyltransferases in 49 human tumor biopsies. Levels of each sialyltransferase expression were presented as the ratio enzyme-related area:GAPDH-related area. The expression of the five sialyltransferases were compared using the Kruskal-Wallis test. The expression of ST3Gal III was significantly higher than the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal II ($P < 10^{-3}$ and $P < 10^{-3}$, respectively), the expression of ST6Gal I was significantly higher than the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal II ($P < 0.05$ and $P < 10^{-3}$, respectively), and the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal I were significantly higher than the expression of ST3Gal II ($P < 10^{-3}$ and $P < 10^{-3}$, respectively).

RT-PCR for the five sialyltransferases up to 40 PCR cycles and for the GAPDH amplifications, according to the area peak values obtained with the 5' fluorescently labeled primers (data not shown).

Absence of expression was found in 0, 1, 9, 3, and 39 cases for ST3Gal III, ST6Gal I, ST3Gal IV, ST3Gal I, and ST3Gal II, respectively. The median levels of ST3Gal III, ST6Gal I, and ST3Gal IV expressions were, respectively, 74.8 (range, 4.4–645.2), 63.9 (range, 0–370.6), and 24.5 (range, 0–85.9). The median expression of ST3Gal I was 69.2 (range, 0–436.1). ST3Gal II had a lower expression level (1.9; range, 0–42.0; Fig. 1B). This low level of expression was not due to the experimental procedure because this enzyme expression was always detected in HepG2, the positive control. Using the Kruskal-Wallis test, the expression of ST3Gal III was significantly higher than the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal II ($P < 10^{-3}$ and $P < 10^{-3}$, respectively); the expression of ST6Gal I was significantly higher than the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal II ($P < 0.05$ and $P < 10^{-3}$, respectively); the expressions of ST3Gal IV and ST3Gal I were significantly higher than the expression of ST3Gal II ($P < 10^{-3}$ and $P < 10^{-3}$, respectively).

Correlations. Using the Spearman rank test, the expression of ST3Gal III was positively correlated to the expression of ST6Gal I ($r = 0.45$; $P < 10^{-3}$; Fig. 2), to the expression of ST3Gal IV ($r = 0.36$; $P = 0.01$), and to the expression of ST3Gal I ($r = 0.66$; $P < 10^{-4}$). The expression of ST6Gal I was correlated to the expression of ST3Gal I

($r = 0.31$; $P = 0.03$). The expression of ST3Gal IV was correlated to the expression of ST3Gal I ($r = .46$; $P < 10^{-3}$), and the expression of ST3Gal II ($r = 0.45$; $P = 0.001$).

Using the χ^2 test with Yates correction, the tumors with high ST6Gal I expression (higher than the median value) was more frequently HPG III than the tumors with low ST6Gal I expression (13 of 19 versus 5 of 14; $P = 0.009$).

Using the Mann-Whitney test, patients with HPG III ($n = 18$) had significantly higher median ST6Gal I expression than patients with HPG II ($n = 18$; $P < 0.05$).

Using the Spearman rank test, the expression of ST3Gal III was positively correlated to the tumor size ($r = 0.31$; $P = 0.03$) and to the number of involved axillary nodes ($r = 0.32$; $P = 0.02$). The expression of ST6Gal I was negatively correlated to the PgR expression level ($r = -0.37$; $P = 0.009$). No correlation was found between the expression of sialyltransferases and the expression of ER or the sE-selectin concentration.

For overall survival analyses, the patients with high ST3Gal III expression (higher than the median value) had significantly reduced survival ($P = 0.043$; Fig. 3). No significant difference was found for other sialyltransferases. Especially, the analysis of the Kaplan-Meier survival curves for ST6Gal I and ST3Gal I showed no significant difference when patients with expression lower than the median value were compared with those with expression higher than the median

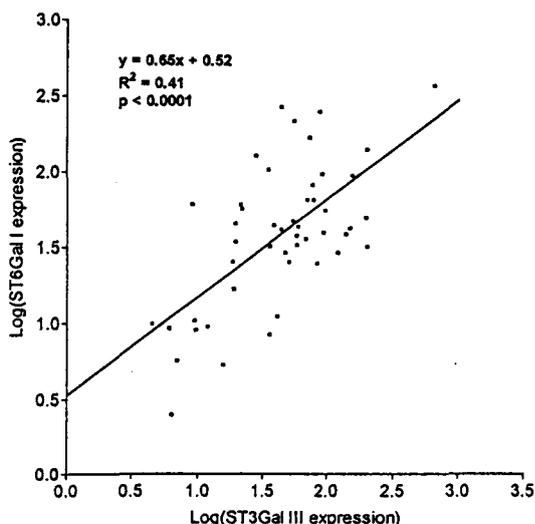


Fig. 2. Spearman rank test correlation between the expression of ST3Gal III and the expression of ST6Gal I in 49 human tumor biopsies. The distribution of the expression of ST3Gal III and ST6Gal I were log normal. The values none-zero were transformed to logarithms, and a linear regression analysis was performed [$R(2) = 0.41$, $P < 10^{-4}$, $y = 0.65X + 0.52$].

value. No more differences were found when other cutoff values were used (first and third quartiles). Finally, for relapse-free survival, no significant difference was found for any sialyltransferase.

Discussion

In this study, we analyzed the tumoral expression of five sialyltransferases in 49 patients treated for locoregional breast cancer by using multiplex RT-PCR. This method allows a simultaneous assessment of all these enzymes in each tumor. We found that most tumors preferentially expressed the ST3Gal III. Moreover, the expression of ST3Gal III was correlated to the expression of three other enzymes (ST6Gal I, ST3Gal IV, and ST3Gal I). Interestingly, we found that ST3Gal II was weakly (or not) expressed in breast tumors. This enzyme shared the same substrate specificity with ST3Gal I. Both enzymes are able to transfer a sialic acid residue onto the 3-OH group of the Gal residue of the type III disaccharide structure (Gal β 1-3GalNAc). Because of this common substrate specificity, both enzymes could be involved in the sialylation of T-antigen (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) currently observed in O-glycoproteins, especially in mucins. Both enzymes exhibit different tissue-specific expressions and our result indicates that the α 2,3-sialylation of T-antigen in breast tumor would be essentially catalyzed by ST3Gal I.

The comparison between the expression of each sialyltransferase and standard prognostic factors showed that the highest expression of ST3Gal III was mainly found in large tumors, which suggests that this expression is not an early phenomenon. In agreement with this result, ST3Gal III expression was associated with axillary nodal involvement. Moreover, despite the relatively small size of the series for survival analyses, we found that a high expression of ST3Gal III was associated with a reduced overall survival. According to the substrate specificity of the sialyltransferases, ST3Gal III, which prefers type I disaccharidic acceptor, is the candidate for the synthesis of Sialyl-Lewis^x epitope *in vivo*. The biosynthesis of Sialyl-Lewis determinants (Sialyl-Lewis^x and Sialyl-Lewis^a) takes place in two steps: (a) the α 2,3-sialylation of the terminal galactose residue of type I (Gal β 1-3GlcNAc) or type II (Gal β 1-4GlcNAc) disaccharide sequences; and (b) the fucosylation of the GlcNAc residue, in α 1-4 in the case of Sialyl-Lewis^a, or in α 1-3 in the case of Sialyl-Lewis^x. In such

biosynthetic pathways involving α 2-3-sialylation before fucosylation, the increased expression of ST3Gal III could lead to the increased expression of Sialyl-Lewis^a. In that context, our result brings further evidence for the participation of the interaction between endothelial selectins and their tumoral counterparts in tumor development and progression. Because the concentration of circulating sE-selectin may be a marker of endothelial cell activation and a reflection of cell-surface E-selectin expression, we compared these concentrations with the tumoral expression of sialyltransferases. We didn't find any correlation that can support this hypothesis. A study performed in a larger series may be useful to determine whether patients with both an important endothelial E-selectin expression (reflected by the sE-selectin concentration) and an important tumoral ST3Gal III expression have a worse outcome.

ST6Gal I expression was also associated with bad prognosis indicators. We observed a positive correlation between ST6Gal I expression and both the grade III HPG, and the lack of hormone receptor expression. ST6Gal I was previously shown to be regulated by steroid hormones at the transcriptional level: ST6Gal I mRNA level is increased in rat hepatocytes and in rat fibroblasts by dexamethasone, leading in both cases to an increased number of NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc sequences at the cell surface (for review see Ref. 9). On the other hand, the progressive loss of sialic acids of the brush-border membrane glycoproteins (one of the major biochemical changes occurring in rat small intestine during the transition from suckling to weaning) is associated with a decreased expression of ST6Gal I mRNA, which is speeded up by injection of hydrocortisone (20). At this stage, we cannot assume that the elevated expression of ST6Gal I is directly associated with the lack of steroid hormone receptors, but this question should be addressed in future experiments. Nevertheless, the expression of ST6Gal I mRNA has been previously associated with malignant transformation. Increased expression of ST6Gal I mRNA has been described in cultured cells transformed by oncogene transfection (10), and the elevated expression of ST6Gal I mRNA in adenocarcinomatous human colon compared with normal tissues has been recently reported (21). In our study, this enzyme is correlated with a poor prognosis, suggesting an important role of ST6Gal I in malignant transformation, and a study performed in a larger series may show a prognostic value of ST6Gal I expression in patients with breast cancer.

In the present study, no clear link could be established between the expression of ST3Gal IV (the enzyme involved in the synthesis of the Sialyl-Lewis^x ligand) and prognostic factors or tumoral characteris-

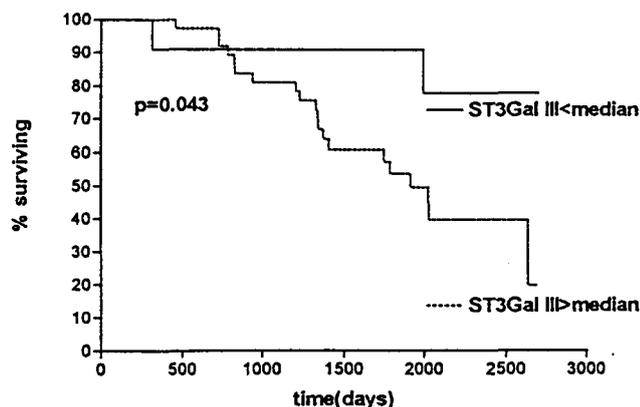


Fig. 3. Overall survival analyses of the patients with high ST3Gal III expression (n = 25) compared with patients with low ST3Gal III expression (n = 24). The cutoff value was the median (74.8). No significant difference was found for any other sialyltransferase.

tics. However, previous studies have indicated an increased expression of Sialyl-Lewis^x in breast cancer. Renkonen *et al.* (22) indicate that epithelial expression levels of Sialyl-Lewis^x are even higher in metastatic tumors compared with primary lesions. Type II disaccharidic sequences (Gal β 1-4GlcNAc β 1-R) are the precursors of Sialyl-Lewis^x epitopes, but can be used as acceptor substrates by different other glycosyltransferases (*i.e.*, the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase, ST6Gal I, the α 1-2-fucosyltransferase leading to Lewis^y antigen), and the over expression of Sialyl-Lewis^x epitopes could also reflect a change in the expression of these competitor enzymes. Nevertheless, in the present study in breast cancer tissues, ST3Gal IV expression is correlated with the expression of ST3Gal III, which synthesizes preferentially Sialyl-Lewis^a. In another model, the study by Ito *et al.* (11) indicates the presence in the same amount of these two enzymes in colorectal cancer tissues compared with nonmalignant colorectal mucosa. In the same way, by the analysis of >300,000 transcripts derived from at least 45,000 different genes, Zhang *et al.* (23) have identified >500 transcripts that were expressed at significantly different levels in normal and neoplastic gastrointestinal cells. Within these transcripts, ST3Gal IV was one of the largest decreases in expression in tumor cells, whereas the expression of ST3Gal III is not affected. These results suggest that if the expression of sialyltransferases is involved in the prognosis of cancer grade or survival, it depends on the type of cancer.

Finally, Sialyl Tn expression is correlated in breast cancer with prognostic parameters (5). The amount of ST6GalNAc I sialyltransferase message, which synthesizes this motif, remains unknown because this enzyme is not already cloned from human source.

In conclusion, the multiplex RT-PCR, which can provide the analysis of the expression of five sialyltransferases in biopsies in one reaction, showed the correlation of the expression of ST3Gal III and ST6Gal I with poor prognosis factors in patients with breast cancer.

Acknowledgments

We are grateful to David Stokes for the English corrections.

References

1. Fukuda, M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.*, 56: 2237-2244, 1996.
2. Hakomori, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingolipid metabolism. *Cancer Res.*, 56: 5309-5318, 1996.
3. Ura, Y., Dion, A. S., Williams, C. J., Olsen, B. D., Redfield, E. S., Ishida, M., Herlyn, M., and Major, P. P. Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int. J. Cancer*, 50: 57-63, 1992.
4. Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y., Watanabe, T., Sakamoto, J., and Takagi, H. Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer (Phila.)*, 71: 3044-3053, 1993.

5. Soares, R., Marinho, A., and Schmitt, F. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.*, 192: 1181-1186, 1996.
6. Sikut, R., Zhang, K., Baeckstrom, D., and Hansson, G. C. Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int. J. Cancer*, 66: 617-623, 1996.
7. Hayes, D. F., Tondini, C., and Kufe, D. W. Clinical applications of CA 15-3. *In: S. Sell (ed.), Serological Cancer Markers*, pp. 281-305. Totowa, NJ: The Humana Press, 1992.
8. Hebbaz, M., Révillon, F., Louchez, M.-M., Vilain, M.-O., Fournier, C., Bonnetterre, J., and Peyrat, J.-P. The relationship between concentrations of circulating soluble E-selectin and clinical, pathological, and biological features in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 373-380, 1998.
9. Harduin-Lepers, A., Recchi, M.-A., and Delannoy, P. The year of sialyltransferases. *Glycobiology*, 5: 741-758, 1995, 1994.
10. Le Marer, N., Laudet, V., Svensson, E. C., Cazlaris, H., Van Hille, B., Lagrou, C., Stéhelin, D., Montreuil, J., Verbert, A., and Delannoy, P. The *c-Ha-ras* oncogene induces increased expression of β -galactoside: α 2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells. *Glycobiology*, 2: 49-56, 1992.
11. Ito, H., Hiraiwa, N., Sawada-Kasugai, M., Akamatsu, S., Tachikawa, T., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., Takagi, H., and Kannagi, R. Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues. *Int. J. Cancer*, 71: 556-564, 1997.
12. Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C., and Taylor-Papadimitriou, J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, 233: 607-617, 1995.
13. Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W. T., and Taylor-Papadimitriou, J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelia cell lines and breast carcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.*, 271: 33325-33334, 1996.
14. Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Boilly-Marer, Y., Verbert, A., and Delannoy, P. Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconj. J.*, 15: 19-27, 1998.
15. Tsuji, S., Datta, A. K., and Paulson, J. C. Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology*, 6: 5-14, 1996.
16. Giordanengo, V., Bannwarth, S., Laffont, C., Van Miegem, V., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Lefebvre, J.-C. Cloning and expression of cDNA for human Gal(β 1-3)GalNAc α 2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem.*, 247: 558-566, 1997.
17. Contesso, G., Mouriessé, H., Friedman, S., Genin, J., Sarrazin, D., and Rouesse, J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients uniformly treated at Institut Gustave Roussy. *J. Clin. Oncol.*, 5: 1378-1386, 1987.
18. Peyrat, J. P., Vanlemmens, L., Fournier, J., Huet, G., Révillon, F., and Bonnetterre, J. Prognostic value of P53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers. *Clin. Cancer Res.*, 4: 189-196, 1998.
19. Williamson, D. F., Parker, R. A., and Kendricks, J. S. The box-plot: a simple visual method to interpret data. *Ann. Intern. Med.*, 110: 916-921, 1989.
20. Hamr, A., Delannoy, P., Verbert, A., and Kolinska, J. The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase in the small intestine of Suckling Rats is suppressed by mifepristone (RU-38486). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 60: 59-66, 1997.
21. Li, M., Andersen, V., and Lance, P. Expression and regulation of glycosyltransferases for N-glycosyl oligosaccharides in fresh human surgical and murine tissues and cultured cell lines. *Clin. Sci. (Lond.)*, 89: 397-404, 1995.
22. Renkonen, J., Paavonen, T., and Renkonen, R. Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis (X) and sialyl Lewis (a) in lesions of breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 74: 296-300, 1997.
23. Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science (Washington DC)*, 276: 1268-1272, 1997.

C- Conclusion.

L'utilisation d'amorces fluorescentes nous a permis d'augmenter les performances de notre méthode de co-amplification des fragments spécifiques de cinq sialyltransférases, et en particulier d'augmenter la sensibilité de la détection tout en conservant la linéarité de la réaction, et ceci tout en facilitant et en améliorant la quantification.

Malgré une augmentation importante de la sensibilité, la spécificité de l'amplification a été préservée, aucune amplification non-spécifique n'ayant été mise en évidence. Cette optimisation de la méthode a été rendu nécessaire par les faibles niveaux d'expression des ARNm des sialyltransférases observés dans les biopsies de tumeurs mammaires.

L'étude effectuée sur 49 biopsies de tumeurs mammaires (3 grade I, 18 grade II, 18 grade III) nous a permis de tirer plusieurs enseignements : tout d'abord, l'expression de ST3Gal III est corrélée à l'expression des autres sialyltransférases (ST6Gal I, ST3Gal IV et ST3Gal I), ST3Gal II n'étant pas ou très peu exprimée dans les tumeurs de sein. Par ailleurs, le taux d'expression de certaines sialyltransférases est associé à des facteurs pronostiques défavorables. Ainsi, l'expression de ST3Gal III est corrélée positivement à la taille de la tumeur et à la formation de nodules périphériques. La surexpression de ST3Gal III a aussi pu être associée à une survie plus courte. De même, la forte expression de ST6Gal I est plutôt associée au grade histopronostique III. Enfin, l'expression de ST6Gal I est inversement corrélée au nombre de récepteurs à la progestérone exprimés par les tumeurs.

Ainsi, l'expression de ST3Gal III et ST6Gal I semble associée à de "mauvais" facteurs pronostiques.

Compte tenu de sa spécificité de substrat, ST3Gal III est la candidate la plus probable pour la synthèse de déterminant sialyl Lewis^a. Une augmentation de l'expression de cette enzyme pourrait être associée à une augmentation de la synthèse de ce déterminant dans les cellules tumorales. La participation de ce déterminant dans la biologie cancéreuse, couplée à la présence de la E-selectine endothéliale, a été suggérée depuis de nombreuses années. Cependant, aucune corrélation entre l'expression de

ST3Gal III et la concentration en E-selectine circulante (reflétant le taux de E-selectine endothéliale) n'a pu être déterminée. Cependant, cette étude n'a été réalisée que sur un nombre limité de cas. Une étude réalisée sur un plus grand nombre d'échantillons pourrait mettre en évidence une telle corrélation.

Le déterminant sialyl Lewis^X est lui aussi suspecté d'intervenir dans l'adhésion des cellules cancéreuses sur les endothéliums par l'intermédiaire de la E-selectine. Cependant, aucune corrélation entre l'expression de ST3Gal IV permettant sa synthèse et des facteurs pronostiques n'a pu être établie. Toutefois, l'expression de cette enzyme est corrélée avec celle de ST3Gal III suggérant que toutes deux participent à un phénomène identique.

Une forte expression de ST6Gal I est également associée à un "mauvais" pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein. L'expression de cette enzyme a déjà été associée à la transformation maligne des cellules, par exemple lors de la transformation de fibroblastes de Rat par l'oncogène ras (Le Marer *et al.*, 1992). Une expression élevée de ST6Gal I a été également observée dans des adénocarcinomes coliques comparés aux tissus normaux (Li *et al.*, 1995). Ici également, une étude élargie à un plus grand nombre de cas pourrait confirmer ce que nous pressentons, à savoir que cette enzyme pourrait être un facteur pronostique du cancer du sein.

La corrélation que nous avons observée entre le taux d'expression de ST6Gal I et la perte des récepteurs à la progestérone nous laisse entrevoir une possible régulation de l'expression de ST6Gal I par cette hormone. Une régulation de l'expression de cette enzyme par des hormones stéroïdes telles que la dexaméthasone et l'hydrocortisone a déjà été observée (Vandamme *et al.*, 1993; Hamr *et al.*, 1997). Nous envisageons dès à présent de tester cette hypothèse sur un modèle de cellules de cancer de sein en culture.

Conclusions et Perspectives

Depuis de nombreuses années des changements de glycosylation et en particulier de sialylation ont été observés lors du processus de cancérisation (Feizi, 1985). L'une des hypothèses actuelles suppose que les motifs sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a portés par les cellules cancéreuses pourraient être reconnus par les sélectines des cellules endothéliales et interviendraient lors de la formation de métastases (Bergh *et al.*, 1991; Takada *et al.*, 1993). Le rôle des sialyltransférases responsables de la formation des structures sialylées commence seulement à être appréhendé. En effet, l'accélération de l'identification des ADNc des sialyltransférases à partir des années 1993-94, a permis de montrer que certaines de ces enzymes pouvaient agir sur les mêmes substrats accepteurs et donc ne pouvaient être différenciées par un test enzymatique *in vitro*. De ce fait, l'étude précise des mécanismes de sialylation passe par la détermination du niveau d'expression des ARNm des sialyltransférases. Les ARNm de ces enzymes étant généralement faiblement exprimés, nous avons choisi de développer une technique de Multiplex RT-PCR permettant de visualiser en une seule réaction le profil d'expression de cinq sialyltransférases dans un type cellulaire donné.

Appliquée aux cellules cancéreuses mammaires, cette technique a démontré son efficacité, sa rapidité d'exécution et sa fiabilité. Elle a, de plus, l'avantage d'être utilisable sur de faibles quantités de matériels biologiques. Les connaissances portant sur l'expression des sialyltransférases dans le cancer du sein étaient très limitées. Le choix de quatre lignées se différenciant par leur caractère tumoral ou métastatique, ne nous a cependant pas permis de tirer une conclusion simple quant aux relations existant entre l'expression des sialyltransférases et un phénotype particulier. De plus, l'étude de l'expression de sialoglycoconjugués à l'aide de lectines et l'étude des activités sialyltransférasiques mesurées *in vitro* n'ont pu être facilement corrélées à l'expression des ARNm des sialyltransférases. En effet, les lectines reconnaissant les structures sialylées ont une spécificité large et il en est de même pour les substrats utilisés pour les mesures d'activités qui peuvent être des substrats accepteurs pour plusieurs activités enzymatiques. Cependant, même si les sialyltransférases sont fortement régulées au niveau transcriptionnel, cette régulation ne peut expliquer qu'en partie l'apparition des déterminants sialylés à la surface cellulaire. D'autres aspects ne peuvent être écartés : une régulation post-traductionnelle, une différence de localisation enzyme - substrat -

nucléotide de transfert, la concentration en substrats accepteurs qui peut être conditionnée par la dérégulation d'autres glycosyltransférases intervenant en amont dans la biosynthèse des glycanes sialylés.

Quoiqu'il en soit, l'étude de l'expression transcriptionnelle des sialyltransférases est l'une des approches permettant d'aborder les mécanismes participant aux variations de sialylation observées dans les cancers.

Par la suite, la technique de Multiplex RT-PCR a également été appliquée à d'autres types de cellules cancéreuses.

Au niveau des cellules coliques cancéreuses HT29-MTX, cette technique a permis de montrer que l'augmentation d'activité de transfert d'acide sialique sur l'accepteur Gal β 1-3GalNAc-*O*-benzyl observée lors du traitement par un inhibiteur de *O*-glycosylation était le résultat d'une augmentation du même ordre de grandeur de la transcription de ST3Gal I, résultat confirmé par Northern-Blot. La Multiplex RT-PCR a, de plus, montré que les deux autres enzymes pouvant être responsables de cette activité : ST3Gal II et ST3Gal IV n'intervenaient pas. En effet, ST3Gal II n'est pas exprimée dans ces cellules, tandis que la transcription de ST3Gal IV ne varie pas sous l'effet de l'inhibiteur.

Au niveau des cellules de la peau, cette technique a montré qu'il n'y avait pas de différence d'expression des trois sialyltransférases (ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal IV) participant à la sialylation du motif Gal β 1-3GalNAc reconnu par la PNA, dans deux clones de mélanomes IC8 non métastatiques et T1C3 métastatiques, se différenciant pourtant au niveau de leur reconnaissance par la PNA. Ces résultats suggèrent que cette différence de phénotype est le reflet d'un mécanisme distinct de la régulation transcriptionnelle des sialyltransférases. De plus, au niveau des kératinocytes, cette technique de Multiplex RT-PCR a également montré que l'induction par l'interféron γ de la différenciation des kératinocytes se traduit par une augmentation de la transcription de deux sialyltransférases exprimées par ces cellules : ST3Gal I et ST3Gal IV. Cette augmentation est de plus proportionnelle à la quantité d'interféron γ ajoutée dans le milieu de culture.

Ces diverses applications au niveau cellulaire nous ont permis d'apprécier les potentialités de la technique et de pouvoir ainsi passer à une étape ultérieure, à savoir son application aux biopsies de tumeurs mammaires.

Pour tenter de comprendre les relations existant entre l'expression des sialyltransférases et la formation de tumeurs, une étude sur l'expression de ces enzymes dans quarante-neuf tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein a été entreprise. Pour cette étude, nous avons utilisé des amorces fluorescentes permettant en outre une diminution des seuils de détection et une meilleure quantification des produits d'amplification. Nous avons tout d'abord révérifié la linéarité des amplifications obtenues par Multiplex RT-PCR ainsi que la spécificité de cette réaction. En effet, l'augmentation de la sensibilité ne fait pas apparaître d'amplification non-spécifique. Les résultats obtenus au niveau des quarante-neuf biopsies montrent que l'expression de ST3Gal III, enzyme impliquée dans la synthèse du motif sialyl-Lewis^a, est corrélée positivement à l'expression de ST6Gal I, ST3Gal I et de ST3Gal IV, à la taille de la tumeur, et au nombre de ganglions. De plus, les patientes ayant une forte expression de ST3Gal III ont une survie plus courte que les patientes ayant une faible expression de cette enzyme. Une expression importante de ST6Gal I est associée au grade histopronostique III. De plus, l'expression de ST6Gal I est corrélée négativement au nombre de récepteurs de la progestérone.

Ainsi, ces résultats semblent montrer que l'expression de ST3Gal III et de ST6Gal I sont des marqueurs de l'évolution des processus de tumorigénèse chez les patientes atteintes de cancer du sein. La progestérone semble aussi être impliquée dans la régulation de ST6Gal I. Ce phénomène pourrait être approfondi en étudiant l'effet d'hormones stéroïdes telles que la progestérone et les hormones oestrogènes sur la transcription des sialyltransférases dans des cellules en culture.

Nos résultats ont montré que l'expression de ST3Gal III est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Cette enzyme synthétise le motif sialyl-Lewis^a. L'implication de ce motif ainsi que du motif sialyl-Lewis^X dans la formation des métastases par le phénomène d'extravasation à l'aide de selectines est suggérée depuis de nombreuses années. Cependant, l'expression de ST3Gal IV, synthétisant le motif sialyl-Lewis^X, ne semble pas être un facteur pronostique de l'évolution des tumeurs du sein. De plus, la forte expression de ST6Gal I qui est en compétition avec ST3Gal IV pour le motif Gal β 1-4GlcNAc précurseur du sialyl-Lewis^X pourrait en partie masquer l'action de ST3Gal IV.

Il ne faut cependant pas oublier que l'expression transcriptionnelle d'une enzyme n'est qu'en partie le reflet de son activité. En effet, les propriétés enzymatiques sont différentes d'une sialyltransférase à une autre. Par exemple, dans la famille des ST3Gal murines, les propriétés cinétiques mesurées *in vitro* dans des conditions comparables par Kono *et al.* (1997) montrent que le rapport V_M/K_M de ST3Gal I est de 61 000 pour le motif de type III (Gal β 1-3GalNAc) alors qu'il est de 250 pour le motif de type I (Gal β 1-3GlcNAc). Cependant le rapport de V_M/K_M de ST3Gal III est de 270 pour le motif de type I alors que pour les motifs de type II (Gal β 1-4GlcNAc) et III, il est respectivement de 15 et de 9. Ainsi ST3Gal III agit majoritairement sur les motifs de type I et ST3Gal I sur les motifs de type III. Cependant, pour un même niveau de transcription de ces deux enzymes, ST3Gal I aura une plus forte activité de transfert d'acide sialique sur les motifs de type III que celle de ST3Gal III sur les motifs de type I. De plus, ces deux enzymes possèdent pratiquement le même rapport V_M/K_M pour le motif de type I et seraient donc susceptibles de participer toutes deux à la biosynthèse du déterminant sialyl-Lewis^a. Ces deux enzymes sont fortement exprimées dans les biopsies de cancer du sein et leurs expressions transcriptionnelles sont corrélées. Pourtant, il ne faut pas oublier non plus que ces activités enzymatiques sont mesurées *in vitro* et qu'elles peuvent différer de celles exercées *in vivo*.

Dans la perspective de la poursuite de ce travail, plusieurs orientations peuvent être envisagées :

Il serait tout d'abord intéressant d'étudier l'expression des sialyltransférases dans des tissus "normaux" de sein, et dans un nombre plus important de tissus au premier stade de tumorigénèse (grade histopronostique I). En effet, dans l'étude que nous avons réalisée, les tumeurs de grade I étaient en nombre trop limité (trois) pour que l'on puisse tirer des enseignements significatifs des résultats obtenus. Une étude parallèle sur des métastases provenant de tumeurs du sein peut être également envisagée. Les résultats de ces études devraient nous permettre de vérifier qu'une variation de transcription de sialyltransférases (ST3Gal III, ST6Gal I, etc...) serait associée à la formation de tumeurs et/ou de métastases et nous permettraient aussi d'obtenir peut-être un marqueur précoce de la formation des tumeurs.

Il est dès à présent envisageable d'étendre ces études à des biopsies issues d'autres types de cancers épithéliaux. En effet, même si le phénomène d'hypersialylation

semble être associé à un grand nombre de types de cancers, il est pour le moment impossible de relier précisément ce phénomène à l'expression d'une ou plusieurs sialyltransférases. En d'autres termes, la surexpression de ST3Gal III et de ST6Gal I est-elle un marqueur pronostique généralisable à d'autres cancers épithéliaux, ou existe-il d'autres enzymes associées à la progression tumorale des cancers coliques (deuxième cause de mortalité par cancer) ou de la peau (l'un des cancers les plus agressifs).

De nombreuses études ont montré qu'un autre déterminant sialylé, le sialyl-Tn, est un marqueur pronostique de certains cancers et notamment du cancer du sein (Itkowitz *et al.*, 1990; Miles *et al.*, 1994). Il serait très intéressant d'obtenir des informations sur l'expression de ST6GalNAc I, enzyme participant à sa biosynthèse (Tableau IV, page 42 et 43). L'expression de ST6GalNAc I pourrait être aussi un marqueur de l'évolution tumorale qui serait d'autant plus fiable que cette enzyme intervient dans les toutes premières phases de la biosynthèse des *O*-glycannes (Figure 5, page 14). Ainsi son action n'est que très peu conditionnée par la dérégulation d'autres glycosyltransférases. Toutefois, l'ADNc de cette enzyme n'a été cloné que chez le Poulet et son clonage chez l'Homme pourrait être envisagé.

La mise en place de modèles cellulaires permettant de vérifier les observations effectuées *in vivo* serait également une autre alternative. La technique de culture primaire de cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses permet d'utiliser ces cellules à faible passage, celles-ci issues de donneuses ayant des caractéristiques différentes, telles que l'âge, le nombre d'enfants, pour les donneuses en bonne santé ou, telles que des caractéristiques tumorales différentes, pour les donneuses atteintes de cancer.

Des agents pharmacologiques tels que l'acide rétinoïque et le butyrate de sodium inhibent la prolifération, et la différenciation des cellules épithéliales normales et cancéreuses du sein (Lambrecht *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été démontré que le butyrate de sodium, ou les hormones stéroïdes modulent l'expression des sialyltransférases et notamment de ST6Gal I (Shah *et al.*, 1992; Vandamme *et al.*, 1993). Il serait donc intéressant de déterminer si l'inhibition de la prolifération cellulaire s'accompagne de modifications d'expression des sialyltransférases dans ces cellules.

La surexpression de sialyltransférases dans des lignées épithéliales mammaires permettrait de déterminer l'évolution des caractéristiques phénotypiques de la cellule.

Par exemple, une surexpression de ST3Gal I conduit-elle à une augmentation des déterminants sialyl-Lewis^a présent au niveau cellulaire ?

Il est également possible que les résultats de futurs clonages d'ADNc de sialyltransférases montrent qu'il existe d'autres enzymes participant à la biosynthèse des déterminants sialylés pouvant avoir la même spécificité de substrats que les sialyltransférases déjà connues. Ainsi, il existerait peut-être par exemple d'autres sialyltransférases que ST3Gal IV qui participeraient à la biosynthèse du déterminant sialyl-Lewis^x.

Aussi, les résultats que nous avons obtenus au cours de ces travaux ne sont que les prémices intéressantes d'études qui permettraient l'utilisation de l'analyse de l'expression des sialyltransférases comme marqueurs pronostiques des cancers. Il reste à déterminer l'implication des sialyltransférases dans les mécanismes conduisant à la formation et à l'évolution des tumeurs jusqu'à la formation des métastases.

Annexes techniques

CULTURE CELLULAIRE.

HBL 100, lignée cellulaire épithéliale humaine de sein (Gaffney et al, 1979), nous a été gracieusement fournie par le Dr. M. Crépin, Paris, France. Les cellules MCF7/AZ et MCF7/6 (Bracke, 1991) dérivent de la lignée originelle MCF7 (Soule et al., 1973), et les cellules MDA-MB-231 (Cailleau et al, 1974) nous ont été gracieusement fournis par le Pr. M.M. Mareel (Laboratory of Experimental Cancerology, University hospital Ghent, Belgium). Les lignées ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco/BRL, France) contenant 10 % de sérum de Veau foetal (Gibco), en présence de 1 % d'acides aminés non essentiels (Eurobio, France), 2 mM de glutamine, 5 µg/ml d'insuline (Organon, France) et d'antibiotiques (40 µg/ml of streptomycine ; 40 UI/ml of Pénicilline).

Les cellules HepG2 (ATCC) ont été obtenues grâce au Dr. B. Laine (Institut Pasteur, Lille, France) et cultivées dans un milieu DMEM contenant 10 % de sérum de Veau foetal (Gibco), en présence de 1 % d'acides aminés non essentiels (Eurobio, France), 2 mM de glutamine (Organon, France) et d'antibiotiques (40 µg/ml of streptomycine ; 40 UI/ml of Pénicilline). Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂.

TECHNIQUE PERMETTANT DE VISUALISER L'AGREGATION DES CELLULES.

Les flacons de 75 cm² de cellules sont rincés 3 fois avec du PBS, et incubés pendant 30 min avec 3 ml/ flacon de 75 cm² de collagenase A (*Clostridium histolyticum*, Boehringer Mannheim) 0,1 U/ml PBS (-CA, Mg). Puis les cellules sont incubées pendant 15 min avec 3 ml/ flacon de 75 cm² de Trypsin/EDTA, dont l'excès a été enlevé par aspiration. Les cellules sont ensuite remises en présence de milieu de culture et incubées toute la nuit.

L'agrégation est mesurée selon le protocole suivant : un flacon de 75 cm² de cellules à confluence sert pour réaliser 3 essais. Les cellules, se détachant, sont centrifugées et resuspendues dans 1,5 ml de CMF-HBSS (Ca, Mg free-Hanks' buffered salt solution) + 1 mg sérum albumine bovine/ml + 0,1 mg de DNase/ml + 40 mM Hepes + 1 g de Glucose/ml, contenant aussi 0,04% EDTA ou 1,25 mM CaCl₂. Deux fois 0,4 ml de cette suspension sont prélevés et placés dans deux plaques de 24 puits (Nunc), coatées à la sérum albumine bovine 10 mg/ml de CMF-HBSS (chauffé à 75°C pendant 1 h) pendant 1 h à température ambiante et rincées trois fois avec du PBS (- Ca²⁺, Mg²⁺). Les plaques sont incubées pendant 30 min sur un agitateur rotatif (85révolutions/min) à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées avec deux fois 1 ml de glutaraldéhyde à 2,5% et 12,6 ml de NaCl à 0,9%.

Le nombre de particules est compté à l'aide d'un compteur Coulter (ZM, Coulter Counter Electronics LTD, Luton, Angleterre) au début de l'expérience et après 30 min (dans les conditions suivantes: Current (334); Full Scale (10 mA); Polarity +; Lower Threshold 5,0 µM Upper Threshold 99,9; Alarm Threshold off; Attenuation 32, Preset Gain 2,). 500 µl sont aspirés et on obtient ensuite les courbes.

Le diamètre moyen des particules est calculé, après 30 min de contact.

MESURE DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES.

A - Préparation des homogénats cellulaires.

Les cellules ont été décollées mécaniquement (par grattage) dans du PBS pH 7,4 (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 153 mM), lavées plusieurs fois dans le PBS et lysées par un tampon cacodylate/HCl 10 mM pH 6,5 contenant 1 % de Triton X-100, 0,5 mM de dithiothréitol, 20 % de glycérol et 5 mM de MnCl₂ à raison de 0,3 ml / flacon de 75 cm². Après 10 min de contact dans la glace et centrifugation 15 min à 10000 g à 4°C, les surnageants sont conservés à -20 °C en vue de leur utilisation pour les mesures d'activités sialyltransférasiques ou pour les électrophorèses en gel de polyacrylamide.

La quantité des protéines présentes dans les différents homogénats cellulaires est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Peterson (1977). La gamme étalon utilisée est une gamme de dilution de la Sérum Albumine Bovine

B - Mesure des activités sialyltransférasiques.

Les incubations ont été réalisées en double. Pour un volume final de 60 µl, le milieu réactionnel contient :

- 20 µl d'homogénat cellulaire
- 25 µl de tampon cacodylate de Na 240 mM pH 6,5; 0,48 mM Gal (inhibiteur des galactosidases); 2,4 mM 2,3-déhydro-2-désoxy-Neu5Ac (inhibiteur des sialidases) et contenant 1,6 % de Triton X-100
- 10 µl d'une solution à 10 mM substrat exogène: asialo-fétuine, asialo-orosomucoïde (ASOR), Galb1-3GalNAc-benzyl etc...
- 125 nCi d'une solution de CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac à 250 mCi / mmol.

L'ensemble a été incubé 1 h, 2 h et 4 h à 37°C et l'incorporation a été déterminée par chromatographie descendante dans le solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5/5/1/3; V/V) sur papier Whatman n°3 et comptage en scintillation liquide (Vandamme *et al.*, 1993).

ELECTROPHORESE ET REVELATION DES GLYCOPROTEINES CELLULAIRES PAR LES LECTINES.

Les glycoprotéines des homogénats cellulaires ont été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (gradient 4 - 20 %) dans des conditions réductrices à raison de 110 µg de protéines par dépôt, 1 µg de fêtuine étant utilisé comme témoin. Après électro-transfert sur membrane de nitrocellulose, les glycoprotéines ont été incubées en présence de lectine couplée à la digoxigénine à raison de 1 µg/ml de TBS pour la SNA, et la MAA et 2 µg/ml pour la PNA. Les lectines ont ensuite été révélées à l'aide d'un fragment Fab anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline en utilisant le protocole préconisé par le fournisseur ("glycan differentiation kit", Boehringer), la coloration est réalisée à l'aide de 5-bromo-4-chloro-3-indolphosphate (X-posphate) et de nitrobleu de tétrazolium (NBT).

L'analyse de la fixation de la PNA est réalisée soit directement, soit après traitement des glycoprotéines par la sialidase de *Clostridium perfringens* (Sigma) pendant 16 h à 37°C, à raison de 50 mU/ml dans un tampon citrate de sodium 50 mM pH 6,0, NaCl 153 mM, CaCl₂ 9 mM.

EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES ARN TOTAUX.

A - Extraction des ARN totaux de cellules en culture.

Les ARN totaux des cellules sont extraits par une méthode au thiocyanate de guanidium et au chlorure de césium (Sambrook et al., 1989). Tous les produits sont autoclavés 1h à 130°C à 1,5 atm pour prévenir l'éventuel présence de toute activité ARNasique. Toutes les manipulations sont effectuées avec des gants.

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées par du PBS. Les cellules d'un flacon de 75 cm² sont ensuite lysées par 3 ml d'un tampon d'homogénéisation au thiocyanate de guanidium. L'ADN nucléaire est coupé par traitement aux ultra-sons (3 . 1 s, intervalles de repos de 20 s). 0,10 g de chlorure de césium sont ajoutés par ml de surnageant. Celui-ci est alors ultracentrifugé sur un coussin d'une solution de chlorure de césium 5,7 M dans 0,01 M d'EDTA pH 7,3 (à raison de 1,2 ml de coussin pour 3,8 ml d'homogénat) à 35 000 rpm pendant 16h.

Les culots d'ARN sont rincés par de l'éthanol à 70 % et homogénéisés par 400 µl de tampon acétate de sodium 3 M pH 5,5 , β-mercaptoéthanol 14,3 M, 20 % sarkosyl pH 6,1; puis extraits par une extraction phénol/tris-chloroforme (V/V). Enfin, les ARN sont précipités 2h à -20°C ou 30 min à -80°C par addition d'1/10 du volume d'acétate de Na 3M, pH 5,2 et 2 à 2,5 volume d'éthanol froid. Après centrifugation, les culots sont lavés à l'éthanol 70 %, séchés, redissous dans de l'eau et la quantité, ainsi que la pureté des ARN sont déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm.

B - Extraction des ARN totaux de Biopsies

Les ARN totaux de biopsies ont été isolés à l'aide du kit Tri-Reagent TM, (Sigma). Les échantillons de tumeurs sont homogénéisés dans 1 ml de Tri-Reagent à l'aide d'un Potter. En suivant les instructions du Kit à fin de minimiser les possibilités de contaminations par de l'ADN génomique, 2 étapes supplémentaires ont été réalisées. La première consiste à la centrifugation de l'homogénat 12000 g pendant 10 min à 4°C, afin d'éliminer le matériel insoluble. Ensuite, l'ARN est précipité à l'aide d'isopropanol en deux étapes. Le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol à 75 % (V/V), centrifugé et séché pendant 5-10 min. sous-vide, puis reprécipité. Les ARN sont conservés à -80°C,

sous forme de précipité ethanolique. Après une nouvelle centrifugation, les culots sont lavés à l'ethanol 70 %, séchés, redissous dans de l'eau et la quantité, ainsi que la pureté de l'ARN sont déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm.

Par la suite une nouvelle étape de purification s'est avérée nécessaire, une extraction phénol/tris-chloroforme (V/V) a été réalisée sur les échantillons comme décrite précédemment.

RT-PCR.

A - Reverse-Transcription.

5 µg d'ARN totaux extraits de cellules sont chauffés à 65° C pendant 10 min et reverse transcrit à l'aide du kit First-Stand cDNA Synthesis (Pharmacia Biotech, USA) dans un volume final de 33 µl contenant 11 µl de Bulk Reaction Mix, 1 µl de 200 mM DTT, 1 µl de Not I d(T)₁₈ bifunctional primer (5 µg/µl) dilué au 1:25 et incubé 1 heure à 37°C. 1 à 2 µl, en générale, de la réaction de reverse-transcription ont été utilisé dans les réactions de PCR permettant l'amplification des sialyltransférases et de la GAPDH en utilisant, à chaque fois les amorces spécifiques.

B - PCR.

Les séquences des Sialyltransférases et de la GAPDH humaines ont été obtenues dans la banque de données GenbankTM/EMBL et ont été utilisées pour la désignation des paires d'amorces à l'aide du logiciel *Primer Premier* Version 3.1 Biosoft International, Palo Alto, USA). Les oligonucleotides ont été synthétisés et purifiés par Eurogentec s.a. (Belgique).

Les 25 µl de mixe réactionnel pour la PCR consiste en 0,6 Unité de Hi-Taq DNA polymerase (ou 1 Unité pour la multiplex PCR des quatre sialyltransférases, ou 2,5 Unité pour la multiplex PCR des cinq sialyltransférases), 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0,1 % Triton X-100; 0,2 mM dNTP et 0,6 µM de chaque amorce. Les échantillons sont recouverts par 2 gouttes d'huile minérale (Sigma Chem. Corp., S^t Louis, USA). Les réactions de PCR se déroulent dans l'appareil PTC-100TM thermal cyler (MJ Research, Watertown , USA). Les contrôles négatifs (témoins blancs) sont réalisés sans ADNc remplacé par de l'eau stérile afin de s'assurer d'une absence de contamination.

Pour les sialyltransférases (amplification simple ou par Multiplex PCR des quatre sialyltransférases) et le premier couple choisie pour la GAPDH, le programme utilisé est le suivant : 1 min de dénaturation à 94 °C, suivi de 1 min à 58 °C pour l'hybridation et de 1,5 min pour l'extension à 72°C, pendant 36 cycles pour les

amplifications simples ou par Multiplex PCR des quatre sialyltransférases et 30 cycles pour la GAPDH.

Pour le deuxième couple choisie pour l'amplification de la GAPDH, le même programme à été utilisé, avec une température d'hybridation de 69°C, le nombre de cycle varie en fonction des expériences suivant le rendement de la retrotranscription .

Pour le couple choisie pour l'amplification de ST3Gal II, ainsi que pour la Multiplex RT-PCR des cinq sialyltransférases, le programme utilisé est le suivant : 1 min de dénaturation à 94 °C, suivi de 1 min à 62 °C pour l'hybridation et de 2 min pour l'extension à 72°C. Le nombre de cycle est variable suivant les expériences.

Chaque réaction de PCR débute par 2 min de dénaturation à 94°C et se termine par 7 min d'élongation à 72°C.

C - Analyses des produits de PCR.

10 µl d'une fraction aliquote des réactions de PCR sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 10 % ou sur gel d'agarose à 1,5% équilibré dans du tampon TBE pH 8,8 (Tris base 0,133 M; acide borique 45 mM; Na₂EDTA 2,55 mM). Les gels sont colorés avec du bromure d'éthidium (1 µg/ml), et photographiés à l'aide des films Polaroid sous lumière UV.

L'intensité du signal obtenu pour chaque bande a été mesurée par numérisation de la photo à l'aide du Hewlett-Packard ScanJet 4c Scanner et du logiciel Deskcan II et par analyse densimétrique (logiciels Quantiscan, Biosoft, USA).

La taille des fragments générés a été estimée grâce à la migration du témoin de taille, 1 kb DNA Ladder (Gibco-BRL, France).

Au niveau des fragments obtenus, après RT-PCR, à l'aide d'amorces fluorescentes, (les amorcess 5' de chaque couple ont été marquées à l'aide d'un fluorophore, la 6-carboxy-2',4',7',4,7 hexachlorofluorescéine, HEX, pour les sialyltransférases et de la, 6-carboxy-hexachlorofluorescénin, 6-FAM, pour la GAPDH), 1/60 ou 1/6 des mixes réactionnels ont été déposés sur gel de polyacrylamide à 6 %, urée 8 M, sur le séquenceur automatique Applied Biosystem (Perkin-Elmer). Des marqueurs de masse moléculaire marqués à l'aide de 6-carboxy-X-rhodamine, provenant d'Applied Biosystem, ont été co-déposés. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Genescan 672 (Applied Biosystem).

D - Vérification des bandes amplifiées.

Les produits d'amplification ont été sous-clonés à l'aide du TA Cloning™ Kit. Après RT-PCR de chacune des bandes séparément, vérification sur gel, l'huile a été enlevée, et le reste de la réaction de RT-PCR après une purification par du Chloroforme/Alcool isoamylique (24/1) et précipitation par l'Éthanol (addition d'1/10 du volume d'acétate de Na 3M, pH 7 et 2 à 2,5 volume d'éthanol froid), les culots sont séchés et redissous dans la quantité d'eau nécessaire pour deux sous clonage.

La préparation de l'ADN plasmidique contenant les inserts a été réalisée à l'aide du kit Jet Star (Genomed Inc., USA). Cet ADN a été séquencé à l'aide du kit Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing kit (USB, USA) et du dATP-[alpha³⁵S] (37 TBq/mmol) (ICN, USA).

Bibliographie

A

Abeijon C & Hirschberg C.B. (1992) "Topography of glycosylation reaction in the endoplasmic reticulum." *Trends in Biochem. Sci.*, **17**, 32-6.

Acheson A., Sunshine J.L. & Rutishauser U. (1991) "NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substratum interactions." *J. Cell. Biol.*, **114**, 143-53.

Aas-Eng D.A. Asheim H.C., Deggerdal A., Smeland E. & Funderud S. (1995) "Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells." *Biochim. Biophys. Acta.*, **1261**, 166-69.

Akamatsu S., Yazawa S., Tachikawa T., Furuta T., Okaichi Y., Nakamura J-I., Asao T. & Nagamachi Y. (1997) " α 2 \rightarrow 3Sialyltransferase associated with the synthesis of CA 19-9 in colorectal tumors." *Cancer Supp.*, **77**, 1694-700.

Alhadeff J.A. & Holzinger R.B. (1982) "Sialyltransferase, sialic acid and sialoglycoconjugates in metastatic tumor and human liver tissue." *Int. J. Biochem.*, **14**, 119-26.

Allen M.H., Robinson M.K., Stephens P.E., MacDonald D.M. & Barker J.N.W.N. (1996) "E-selectin binds to squamous cell carcinoma and keratinocyte cell lines" *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 611-5.

Amado M., Carneiro F., Seixas M., Clausen H., Sobrinho-Simoes M. (1998) "Dimeric sialyl-Le(X) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome." *Gastroenterology*, **114**, 462-70.

Angata K., Nakayama J., Fredette B., Chong K., Ranscht B., Fukuda M. (1997) "Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST." *J. Biol. Chem.*, **272**, 7182-90.

Aprikian A.G., Sarkis A.S., Reuter V.E., Cordon-Cardo C. & Sheinfeld J. (1993) "Biological markers of prognosis in transitional cell carcinoma of the bladder : current concepts." *Semin. Urol.*, **11**, 137-44.

Ashwell, G. & Morell, G.H. (1974). "The role of surface carbohydrate in the hepatic recognition of circulating glycoproteins." *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **41**, 99-128.

B

Bast, B.J.E.G., Zhou, L.J., Freeman, G.J., Colley, K.J., Ernst, T.J., Munro, J.M. & Tedder, T.F. (1992). "The HB-6, CDw75 and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface determinants generated by the β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase." *J. Cell Biol.*, **116**, 423-35.

Benedetto A., Elia G., Sala A. & Belardelli F. (1989) "Hyposialylation of high-molecular-weight membrane glycoproteins parallels the loss of metastatic potential in wheat-germ agglutinin-resistant Friend leukemia cells." *Int. J. Cancer*, **43**, 126-33.

Berge P.G., Wilhelm A. & Schriewer H. (1984) "Sialyltransferase activity in tumor tissues." *Klin Wochenschr*, **62**, 331-6.

Berger, E.G., Grim, K., Bächli, T., Bosshart, H., Kleene, R. & Watzel, M. (1993). "Double immunofluorescent staining of α -2,6 sialyltransferase and β 1,4-galactosyltransferase in monensin-treated cells : Evidence for different Golgi compartments ?" *J. Cell. Biochem.*, **52**, 275-88.

Bergh, M.L.E. & Van den Eijnden, D.K. (1983). "Aglycon specificity of fetal calf liver and ovine and porcine submaxillary gland α -N-acetylgalactosaminide : α 2-6 sialyltransferase." *Eur. J. Biochem.*, **136**, 113-8.

Bergh E.L., Robinson M.K., Mansson O., Butcher E.C. & Magnani J.L. (1991) "A carbohydrate domain common to both sialyl Le^a and sialyl Le^x is recognized by the endothelial cell adhesion molecule ELAM-1." *J. Biol. Chem.*, **266**, 14869-72.

Berthier-Vergnes O., Zebda N., Bailly M., Bailly C., Doré J-F., Thomas L. & Cochran A.J. (1993) "Expression of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in primary melanomas with high risk of metastases." *Lancet*, **341**, 1292.

Biancone L., Araki M., Araki K., Vassalli P. & Stamankovic I. (1996) "Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo" *J. Exp. Med.*, **183**, 581-8.

Blasco E., Torrado J., Belloso L., Arocena F. & Cuadrado E. (1988) "T-antigen : a prognostic indicator of high recurrence index in transitional carcinoma of the bladder." *Cancer*, **61**, 1091-5.

Blumenfeld, O.O., Adamany, A.M., & Puglia, K.V. (1981). "Amino acid and carbohydrate structural variant of glycoprotein products (M-N glycoproteins) of the M-N allelic locus." *Biochemistry*, **78**, 745-51.

Boland C.R., & Deskmukh G.D. (1990) "The carbohydrate composition of mucin colonic cancer." *Gastroenterology*, **98**, 1170-7.

Bosmann H.B. & Hall T.C. (1974) "Enzyme activity in invasive tumors of human breast and colon." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1833-7.

Bracke, M.E., Van Larebeke, N.A., Vyncke, B.M. & Mareel, M.M. (1991). "Retinoic acid modulates both invasion and plasma membrane ruffling of MCF-7 human mammary carcinoma cells." *Br. J. Cancer*, **63**, 867-72.

Brandley B.K., Swiedler S.J. & Robbins P.W. (1990) "Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules." *Cell*, **63**, 861-3.

Brockhausen I., Kuhns W., Schachter H., Matta K.L.; Sutherland D.R. & Baker M.A. (1991) "Biosynthesis of O-glycans in leukocytes from normal donors and from patients with leukemia : increase in O-glycan core 2 UDP-GlcNAc : Gal β 1-3GalNAc α -R (GlcNAc to GalNAc) β (1,6)-N-acetylglucosaminyltransferase in leukemic cells." *Cancer Res.*, **51**, 1257-63.

Brockhausen I. (1995) "Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- α -Ser/Thr linkage type." In " *Glycoproteins - New Comprehensive Biochemistry* ", Montreuil J., Vliegthart J. F. G., Schachter H., Ed. Elsevier Science, Netherlands; **29a**, 201-59.

Brockhausen, I., Yang, J.M., Burchell, J., Whitehouse, C. & Taylor-Papadimitriou, J. (1995). "Mechanism underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells." *Eur. J. Biochem.*, **233**, 607-17.

Buckhaults P., Chen L., Fregien N. & Pierce M. (1997) "Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene." *J. Biol. Chem.*, **272**, 19575-81.

C

Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. & Reeves, W.J. (1974). "Breast Tumor Cell Lines from pleural effusions." *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 661-73.

Carey T.E., Nair T.S., Chern C. Liebert M., Grossman H.B., Wolf G.T. & Van Waes C. (1993) "Blood group antigens and integrins as biomarkers in head and neck cancer : is aberrant tyrosine phosphorylation the cause of altered α 6 β 4 integrin expression ?" *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **17F**, 223-32.

Chan, A., Morris, H.R., Panico, M., Etienne, A.T., Rogers, M.E., Gaffney, P., Creighton-Kempsford, L. & Dell, A. (1991). "A novel sialylated N-acetylgalactosamine-containing oligosaccharide is the major complex-type structure present in Bowes melanoma tissue plasminogen activator." *Glycobiology.*, **1**, 173-85.

Chang, M-L., Eddy, R.L., Shows, T.B. & Lau, J.T.Y. (1995) "Three genes that encode human β -galactoside α 2,3-sialyltransferases. Structural analysis and chromosomal mapping studies." *Glycobiology*, **5**, 319-25.

Chatterjee S.K., Bhattacharya M. & Barlow J.J. (1979) "Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients." *Cancer Research*, **39**, 1943-51.

Cho S.H., Sahin A., Hortobagyi G.N., Hittelman W.N. & Dhingra K. (1994) "Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy." *Cancer Res.*, **54**, 6302-5.

Clausen H., Bennett E.P. et Dabelsteen E. (1992) "Carbohydrates of the cell surface : Molecular aspects of glycosyltransferases and their genes. " *APMIS Suppl.*, 27, 100, 9-17

Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J-M., Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeck, H., Katalinic, J-P., Egge, H. & Spik, G. (1992) "Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of α -D-Galp-(1-3)- β -D-Gal- and α -NeuAc-(2-6)- β -D-GalpNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc- substituted N-linked glycans." *Carbohydr. Res.*, 236, 145-64.

Coon J.S., Weinstein R.S. & Summers J. (1982) "Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma." *Am. J. Clin. Pathol.*, 77, 692-9.

Coon J.S. & Weinstein R.S. (1986) "Blood group-related antigens as markers of malignant potential and heterogeneity in human carcinomas" *Hum. Pathol.*, 17, 1089-106.

Cooper H.S., Malecha M.J., Bass C., Fagel P.L. & Steplewski Z. (1991) "Expression of blood group antigens H-2, Le^Y, and sialylated-Le^a in human colorectal carcinoma." *Am. J. Pathol.*, 138, 103-10.

Cordon-Cardo C., Reuter V.E., Finstadt C.L., Sheinfels J., Lloyd K.O., Fair W.R. & Melamed M.R. (1989) "Blood group-related antigens in human kidney : modulation of Lewis determinants in renal cell carcinoma." *Cancer Res.*, 49, 212-8.

Corfield, A.P. & Schauer, R. (1982). "Occurrence of sialic acids." In *Sialic acids : chemistry, metabolism, functions* (Schauer, R., ed.) Cell Biology Monographs, Springer-Verlag, Wien, N.Y., pp 5-50.

Crocker, P.R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., McWilliam, A.S., Shotton, D.M., Paulson, J.C. & Gordon, S. (1991). "Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophage." *EMBO J.*, 10, 1661-69.

Crocker P.R. & Feizi T. (1996) "Carbohydrate recognition systems : functional triads in cell-cell interactions." *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6, 679-91.

D

Dabelsteen E., Mandel U. & Clausen H. (1991) "Cell surface carbohydrates are markers of differentiation in human oral epithelium." *CRC Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 2, 493-507.

Dahdal, R.Y. & Colley, K.J. (1993). "Specific sequences in the signal anchor of the β -galactoside : α -2,6 Sialyltransferase are not essential for Golgi localization." *J. Biol. Chem.*, 268, 26310-9.

Dall'Olio F. & Treré D. (1993) "Expression of α 2,6-sialylated sugar chains in normal and neoplastic colon tissues. Detection by digoxigenin-conjugated Sambucus nigra agglutinin." *Eur. J. Histochem.*, **37**, 257-65.

Dall'Olio F. (1996) "Protein glycosylation in cancer biology : an overview." *Clinical Molecular pathology*, **49**, M126-M135.

Daneker G.W., Lund S.A., Caughman S.W., Staley C.A. & Wood W.C. (1996) "Anti-metastatic prostacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression." *Clin. Exp. Metastasis*, **14**, 230-8.

Daniotti J.L., Rosales Fritz V., Kunda P., Nishi T. & Maccioni H.J. (1997) "Cloning, characterization and developmental expression of alpha2,8 sialyltransferase (GD3 synthase, ST8Sia I) gene in chick brain and retina." *Int. J. Dev. Neurosci.*, **15**, 767-76.

Datta, A.K. & Paulson, J.C. (1994). "The sialyltransferase « sialylmotif » participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc." *J. Biol. Chem.*, **270**, 1497-500.

David L., Nesland J.M., Clausen H., Carneiro F. & Sobrinho-Simoes M (1992) "Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinoma and metastases." *APMIS*, **100 (Suppl 27)**, 162-72.

David L., Leitao D., Sobrinho-Simoes M., Bennett E.P., White T., Mandel U. Dabelsteen E. & Clausen. (1993) "Biosynthetic basis of incompatible histo-blood group antigen expression : anti-A transferase antibodies reactive with gastric cancer tissue of type O individuals." *Cancer Res.*, **53**, 5494-500.

Dejana E., Martin-Padura I., Lauri D., Bernasconi S., Bani M.R., Garofalo A., Giavazzi R., Magnani J., Mantovani A. & Menard S. (1991) "Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type 1 carbohydrate chain." *Lab. Invest.*, **66**, 324-30.

Delannoy P., Kim I., Emery N., de Lobos C., Verbert A., Degand P. & Huet G. (1996) "Benzyl-N-acetyl-a-D-galactosaminide inhibits the sialylation and the secretion of mucins by a mucin secreting HT-29 cell subpopulation". *Glycoconjugate J.*, **13**, 717-26.

Deman, J.J., Van Larebeke, N.A., Bruyneel, E.A., Bracke, M.E., Vermeulen, S.J., Vennekens, K.M. & Mareel M.M. (1995). "Removal of sialic acid from the surface of human MCF-7 mammary cancer cells abolishes E-cadherin-dependent cell-cell adhesion in aggregation assay." *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **31**, 633-639.

Dennis J.W. , Carver J.P. & Schachter H. (1984) "Asparagine-linked oligosaccharides in murine tumor cells : comparison of a WGA-resistant (WGA^r) nonmetastatic mutant and related WGA-sensitive (WGA^s) metastatic line." *J. Cell Biol.*, **99**, 1034-44.

Dennis J.W. , Lafertè S., Fukuda M., Dell A. & Carver J. (1986) "Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor cell mutants varying metastatic potential." *Eur. J. Biochem.*, **161**, 359-73.

Dennis J.W., Laferté S., Waghorne C, Breitman M.L. & Kerbel R.S. (1987) "β1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis." *Science*, **236**, 582-5.

Dennis J.W., Koch K., Yousefi S. & Van der Elst I. (1990) "Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine." *Cancer Res.*, **50**, 1867-72.

Diacovo T.G., Puri K.D., Warnock R.A., Springer T.A. & Von Andrian U.H. (1996) "Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules" *Science*, **273**, 252-5.

Drickamer, K. (1993) "A Conserved Disulfide Bond in Sialyltransferases." *Glycobiology*, **3**, 2-3.

E

Eckhardt, M., Mühlhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M. & Gerardy-Schahn, R. (1995) "Molecular Characterization of Eukaryotic Polysialyltransferase-1." *Nature*, **373**, 715-718

F

Feizi T. (1985) "Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens." *Nature*, **314**, 53-7.

Fenlon S; Ellis I.O., Bell J., Todd J.H., Elston C.W. & Blamey R.W. (1987) "Helix pomatia and Ulex europaeus lectin binding in human breast cancer." *J. Pathol.*, **152**, 169-76.

Fernandes B., Sagman U., Auger M., Demetrio M. & Dennis J.W. (1991) "β1-6 branched oligosaccharides as markers of tumor progression in human breast and colon neoplasia." *Cancer Res.*, **51**, 718-23.

Figarella-Branger D.F., Durbec P.L. & Rougon G.N. (1990) "Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors." *Cancer Res.*, **50**, 6364-70.

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

Finne J. & Makela P.H. (1985) "Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase." *J. Biol. Chem.*, **260**, 1265-70.

Fukuda M. (1985) "Cell surface glycoconjugates as oncodifferentiation markers in hematopoietic cells." *Biochem. Biophys. Acta*, **780**, 119-50.

Fukuda M.N., Dell A., Oates J.E. & Fukuda M. (1985). "Embryonal lactosaminoglycan. The structure of branched lactosaminoglycans with novel disialosyl (sialyl α 2-9sialyl) terminals isolated from PA1 human embryonal carcinoma cells." *J. Biol. Chem.*, **260**, 6623-31.

Fukuda M. (1991) "Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy." *Glycobiology*, **1**, 347-56.

Fukuda M. (1994) "Cell surface carbohydrates : cell-type specific expression." In : Fukuda M., Hindsgaul O., eds. *Molecular Glycobiology*. New York : Oxford University Press, 1-52.

Fukutomi T., Hirohashi S., Tsuda H. Nanasawa T., Yamamoto H., Itabashi M. & Shimosato Y. (1991) "The prognosis value of tumor-associated carbohydrate structures correlated with gene amplifications in human breast carcinomas." *Jpn. J. Surg.*, **21**, 499-507.

G

Gaffney, E.V., Pigott, D.A. & Grimaldi, M.A. (1979) "Human serum and the growth of human mammary cells." *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 913-8.

Gasic G.J. (1984) "Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis." *Cancer Metastasis Rev.*, **3**, 99-114.

Ghazizadeh M., Ogawa H., Sasaki Y., Araki T. & Aihara K. (1997) "Mucin carbohydrate antigens (T, Tn and sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas : relationship with histopathology and prognosis." *Hum. Pathol.*, **28**, 960-6.

Geremia R. A., Harduin-Lepers A. & Delannoy P. (1997) "Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases : implications for their mechanism of action." *Glycobiology*, **7**, ppv-xi.

Gillepsie, W., Kelm, S. & Paulson, J.C. (1992) "Cloning and Expression of the Gal β 1,3GalNAc : α 2,3-Sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **267**, 21004-10.

Giordanengo V., Bannwarth S., Laffont C., Van Miegem V., Harduin-Lepers A., Delannoy P. and Lefebvre J-C. (1997) "Cloning and expression of cDNA for human Gal(β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line." *Eur. J. Biochem.*, **247**, 558-66.

Gleeson P. A., Teasdale R. D. & Burke J. (1994) "Targeting of proteins to Golgi apparatus." *Glycoconjugate J.*, **11**, 381-94.

Gorelik E., XU F., Henion T., Anaraki F. & Galili U. (1997) "Reduction of metastatic properties of BL6 melanoma cells expressing terminal fucose α 1-2-galactose after α 1,2-fucosyltransferase cDNA transfection." *Cancer Research*, **57**, 332-36.

Greenwell P., Yates A.D. & Watkins W.M. (1986) "UDP-N-acetylgalactosamine as a donor substrate for the glycosyltransferase encoded by the B gene at the human blood group ABO locus." *Carbohydr. Res.*, **149**, 149-70.

Grollman, E.F., Saji, M., Shimura, Y., Lau, J.T.Y. & Ashwell, G. (1993). "Thyrotropin regulation of sialic acid expression in rat thyroid cells." *J. Biol. Chem.*, **268**, 3604-9.

Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. & Zettlmeissl, G. (1990). "Complete cDNA Sequence Encoding Human β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase." *Nucleic Acids Res.*, **18**, 667.

Gu J., Nishikawa A., Fujii S., Gasa S & Tanaguchi (1992) "Biosynthesis of blood group I and i antigens in rat tissues." *J. Biol. Chem.*, **267**, 2994-9.

Guy K. & Andrew J.M. (1991). "Expression of the CDw75 (beta-galactoside : alpha2,6-sialyltransferase) antigen on normal blood cells and in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Immunology*, **74**, 206-14.

Gwin J.L., Klein-Szanto A.J., Zhang S.Y., Argawal P., Rogatko A. & Keller S.M. (1994) "Loss of blood group antigen A in non-small lung cancer." *Ann. Surg. Oncol.*, **1**, 423-7.

H

Hakamori S., Patterson C.M., Nudelman E. & Sekiguchi K.A. (1983) "A monovlonal antibody directed to N-acetylneuraminosyl- α 2-6-galactosyl residue in gangliosides and glycoproteins." *J. Biol. Chem.*, **258**, 11819-22.

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

Hakomori S. (1992) "Le-x and related structures as adhesion molecules." *Histochem. J.*, **24**, 771-6.

Hamada S., Kamada M., Hirao T. & Aono T. (1993) "High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancers." *Cancer Lett.*, **74**, 167-73.

Hamamoto, T., Kawasaki, M., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Lee, Y.C. & Tsuji, S. (1993) "Two Steps Single Primer Mediated Polymerase Chain Reaction; Application to Cloning of Putative Mouse β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase." *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1**, 141-5.

Hamanaka Y., Hamanaka S. & Suzuki M. (1996) "Sialyl Lewis(a) ganglioside in pancreatic cancer tissues correlates with the serum CA 19-9 level." *Pancreas*, **13**, 160-5.

- Hamr A., Delannoy P., Verbert A. and Kolinska J. (1997) "The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase in the small intestine of Sucling Rats is suppressed by mifepristone (RU-38.486)." *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **60**, 59-66.
- Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I. & Bevilacqua, P. (1994). "Cytokine induced β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase in Human endothelial cells mediates α 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands." *J. Biol. Chem.*, **269**, 10637-43.
- Hanish F.G., 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.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A. Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K.O., Shiku, H. & Furukawa, K. (1994) "Isolation of G_{D3} Synthase Gene by Expression Cloning of G_{M3} α 2,8-Sialyltransferase cDNA Using Anti-G_{D2} Monoclonal Antibody." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 10455-9.
- Harduin-Lepers A., Recchi M-A. & Delannoy P. (1995) "1994, the year of sialyltransferases." *Glycobiology*, **5**, 741-58.
- Hasegawa H., Watanabe M., Arisawa Y., Teramoto T., Kodaira S. & Kitajima M. (1993) "Carbohydrate antigens and liver metastasis in colorectal cancer." *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 336-41.
- Hayes, D. F., Tondini, C. and Kufe, D; W. (1992) "Clinical applications of CA 15-3. Serological Cancer Markers", edited by Stewart Sell, the Humana Press, Totowa, NJ, **Chp. 13**, 281-305.
- Hirao , Sakamoto Y., Kamada M., Hamada S. & Aono T. (1993) "Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells." *Cancer*, **72**, 154-9.
- Hoff S.D., Matsushita Y., Ota D.M., Cleary K.R., Yamori T., Hakamori S. & Irimura T. (1989) "Increased expression of sialyl-dimeric Le^X antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma." *Cancer Res.*, **49**, 6883-8.
- Honn K.V., Tang D.G. & Crissman J.D. (1992 a) "Platelets and cancer metastasis : a causal relationship?" *Cancer Metastasis Rev.*, **11**, 325-51.
- Honn K.V., Tang D.G. & Chen Y.Q. (1992 b) "Platelets and cancer metastasis : more than an epiphenomenon." *Semin. Throm. Hemost.*, **18**, 392-415.
- Hu Y.P., Dalziel M. & Lau J.T.Y. (1997) "Murine hepatic β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene expression involves usage of a novel upstream exon region." *Glycoconjugate J.*, **14**, 407-11.

Huang S., Byrd J.C., Yoor W.H. & Kim Y.S. (1992) "Effect of benzyl-alpha-GalNAc, an inhibitor of mucin glycosylation, on cancer-associated antigens in human colon cancer cells." *Oncol. Res.*, **4**, 507-15.

Huet G., Kim I., de Lobos C., Lo-Guidice J.M., Moreau O., Hemon B., Richet C., Delannoy P., Real F.X. & Degand P. (1995) "Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucus-secreting HT-29 cell subpopulation." *J. Cell Sci.*, **108**, 1275-85.

Humphries M.J., Matsumoto K., White S.L. & Olden K. (1986) "Inhibition of experimental metastasis by catabospermine in mice : blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors." *Cancer Res.*, **46**, 5215-22.

I

Ikeda Y., Kuwano H., Baba K., Ikebe M., Matushima T., Adachi Y. Mori M. & Sugimachi K. (1993) "Expression of sialyl-Tn antigen in normal squamous epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma in the esophagus." *Cancer Res.*, **53**, 1706-8.

Inoue M., Ton S.M., Ogawa H. & Tanizawa O. (1991 a) "Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary." *Am. J. Clin. Pathol.*, **96**, 711-6.

Inoue M., Ogawa H., Tanizawa O., Kobayashi Y., Tsujimoto M. & Tsujimura T. (1991 b) "Immunodetection of sialyl-Tn antigen in normal, hyperplastic and cancerous tissues of the uterine endometrium." *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **418**, 157-62.

Irimura T., Tressler R.J. & Nicolson G.L. (1986) "Sialoglycoproteins of murine RAW117 large cell lymphoma/lymphosarcoma sublines of various metastatic colonization properties." *Exp. Cell Res.*, **165**, 403-16.

Ishikawa M. & Kerbel R.S. (1989) "Characterization of a metastasis-deficient lectin-resistant human melanoma mutant." *Int. J. Cancer*, **43**, 134-9.

Ishikawa H., Satoh H., Kamma H., Naito T., Yamashita Y.T., Ohtsuka M. & Hasegawa S. (1997) "Elevated sialyl Lewis X-i antigens in pleural effusions in patients with carcinomatous pleuritis." *Intern. Med.*, **36**, 685-9.

Itai S., Nishikata J., Takashashi N., Tanaka O., Matsubara Y, Hasegawa S., Yanai N., Takaoka K., Arie S., Tobe T. (1990) "Differentiation-dependent expression of I and sialyl I antigens in the developing lung and human embryos and in lung cancer." *Cancer Res.*, **50**, 7603-11.

Itai S., Nishikata J., Yoneda T., Ohmori K., Tsunekawa S., 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 Res.*, **67**, 1576-87.

Ito H., Hiraiwa N., Sawada-Kasugai M., Akamatsu T., Kasai Y., Akiyama S., Ito K., Takagi H. & Kannagi R. (1997) "Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues." *Int. J. Cancer*, **71**, 556-64.

Itzkowitz S.H, Yuan M., Ferrel L.D., Ratcliff R.M., Chung Y.S., Satake K. Umeyama K., Jones R.T. & Kim Y.S. (1987) "Cancer-associated alterations of blood group antigen expression in the human pancreas." *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 425-34.

Itzkowitz S.H, Yuan M., Montgomery C.K., Kjeldsen T., Takahashi H.K., Bigbee W.L. & Kim Y.S. (1989) "Expression of Tn, sialosyl Tn and T antigens in human colon cancer" *Cancer Res.*, **49**, 197-204.

Itzkowitz S.H, Bloom E.J., Kokal W.A., Modin G., Hakamori S. & Kim Y.S. (1990) "Sialosyl Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients" *Cancer*, **66**, 1960-6.

Itzkowitz S.H, Kjeldsen T., Frieria A., Hakamori S., Yuan U.S. & Kim Y.S. (1991) "Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas." *Gastroenterology*, **100**, 1691-700.

Itzkowitz S. (1992) "Carbohydrate changes in colon carcinoma." *APMIS*, **100 (suppl. 27)**, 173-80.

Itzkowitz S.H., Bloom E.J., Lau T-S, Kim YS (1992) "Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps." *Gut.*, **33**, 518-23.

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.

Iwasaki, M. & Inoue, S. (1985). "Structures of the carbohydrates units of polysialoglycoproteins isolated from the eggs of four species of salmonid fishes." *Glycoconjugate J.*, **2**, 209-28.

J

Jamieson, J.C., Mc Caffrey, G. & Harder, P.G. (1993). "Sialyltransferase : a novel acute-phase reactant." *Comp. Biochem. Physiol.*, **105B**, 29-33.

Jass J.R., Allison L.M. & Edgar S. (1994) "Monoclonal antibody TKH2 to the cancer-associated epitope sialosyl-Tn shows cross-reactivity with variants of normal colorectal goblet cell mucin." *Pathology*, **26**, 418-22.

Jennings, H.J. & Smith, I.C.P. (1978). "Polysaccharide structures using C-13 nuclear magnetic resonance." *Methods Enzymol.*, **50**, 39-50.

Jordon D.A., Jardirdar J. & Kaneko M. (1989) "Blood group antigens, Lewis^X and Lewis^Y in the diagnostic discrimination of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma." *Am. J. Pathol.*, **135**, 931-7.

Jorgensen T., Berner A.A., Kaalhus O., Tvetter K.J. Danielsen H.E. & Bryne M. (1995) "Up-regulation of the oligosaccharide sialyl Lewis-x : a new prognosis parameter in metastatic prostate cancer." *Cancer Res.*, **55**, 1817-23.

K

Kadmon G., Kowitz A., Altevogt P. & Schachner M. (1990) "The neural cell adhesion molecule N-Cam enhances L1-dependant cell-cell interactions" *J. Cell. Biol.*, **110**, 193-208.

Kageshita T., Hirai S., Kimura T., Hanai N., Ohta S. & Ono T. (1995) "Association between sialyl Lewis^a expression and tumour progression in melanoma." *Cancer Res.*, **55**, 1748-51.

Takeji Y., Maehara Y., Morita M., Matsukuma A., Furusawa M., Tanahashi I., Kusumoto T., Ohno S. & Sugimachi K. (1995) "Correlation between sialyl-Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma." *Br. J. Cancer*, **71**, 191-5.

Kanani A., Sutherland D.R., Fibach E., Matta K.L., Hindenburg A., Brochhausen I., Kuhns W., Taub R.N., van den Eijden D.H. & Baker M.A. (1990) "Human leukemic myeloblasts cells contain the enzyme cytidine 5'-monophosphate-N-acetylneuraminic acid : Gal β 1-3GalNAc α (2-3)-sialyltransferase." *Cancer Research*, **50**, 5003-7.

Kaneko Y., Yamamoto H., Kersey D., Colley K.J., Leestma J.E. & Moskal J.R. (1996) "The expression of Gal β 1,4GlcNAc α 2,6sialyltransferase and α 2,6-linked sialoglycoconjugates in human brain tumours." *Acta Neuropathol.*, **91**, 284-92.

Kannagi R., Fukushi Y., Tachikawa T., Noda A., Shin S., Shigeta K., Hiraiwa N., Fukuda Y., Inamoto T., Hakamori S. & Imura H (1986) "Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain poly lactosamine." *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., Hakamori 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.

Kannagi R. (1997) "Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer." *Glycoconj. J.*, **14**, 577-84.

Kaplan, H.A., Woloski, B.M.R.N.J., Hellman, M. & Jamieson, J.C. (1983). "Studies on the effect of inflammation on Rat liver and serum sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **258**, 11505-11509.

Karpatkin S. & Pearlstein E. (1981) "Role of platelets in tumor cell metastases." *Ann. Intern. Med.*, **95**, 636-41.

Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M-E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P. & Crocker, P.R. (1994). "Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." *Curr. Biol.*, **4**, 965-72.

Kemmner W., Krück D. & Schlag P. (1994) "Different sialyltransferase activities in human colorectal carcinoma cells from surgical specimens detected by specific glycoprotein and glycolipid acceptors." *Clin. Exp. Metastasis*, **12**, 245-54.

Kern W.F., Spier C.M., Hanneman E.H., Miller T.P., Matzner M. & Grogan T.M. (1992) "Neural cell adhesion molecule-positive peripheral T-cell lymphoma : a rare variant with a propensity for unusual sites of involvement." *Blood*, **79**, 2432-7.

Kijima-Suda I., Miyamoto Y., Toyoshima S., Itoh M. & Osawa T. (1986) "Inhibition of experimental metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid : nucleoside conjugate having sialyltransferase inhibiting activity." *Cancer Res.*, **46**, 858-62.

Kinney A.Y., Sahin A., Vernon S.W., Frankowski R.F., Annegers J.F., Hortobagyi G.N., Buzdar A.U., Fry D.K. & Dhingra K. (1997) "The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with breast carcinoma treated with adjuvant chemotherapy." *Cancer*, **80**, 2240-9.

Kim Y-J., Kim K-S., Kim S-H; Kim C-H., Ko J. H., Choe I. S., Tsuji S. & Lee Y-C. (1996a) "Molecular cloning and expression of human Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase (hST3Gal II)." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 324-7.

Kim Y. S., Gum JR J. & Brockhausen I. (1996b) "Mucin glycoproteins in neoplasia." *Glycoconjugate J.*, **13**, 693-707.

Kim Y.J. & Varki A. (1997) "Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer." *Glycoconj. J.*, **14**, 569-76.

Kim Y-J., Kim K-S., Do S., Kim C-H., Kim S.K. & Lee Y-C. (1997) "Molecular cloning and expression of human α 2,8-sialyltransferase (hST8Sia V)." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 327-30.

Kiriyama K., Watanabe T., Sakamoto J., Ito K., Akiyama S., Yamauchi M. & Tanagi H. (1991) "Expression and clinical significance of type-I blood group antigens (Lea, leb, CA19-9) in colorectal cancer-comparison with CEA." *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, **92**, 320-30 (in japanese).

- Kishore G.S., Budnick R.M. & Dao T.L. (1985) "Some biochemical properties of human breast tumor sialyltransferase." *Biochemical Medecine*, **33**, 1-7.
- Kitagawa, H. & Paulson, J.C. (1993) "Cloning and Expression of human Gal β 1,3(4)GlcNAc : α 2,6-sialyltransferase." *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **194**, 375-82.
- Kitagawa, H. & Paulson, J.C. (1994a) "Differential Expression of Five Sialyltransferases Genes in Human Tissues." *J. Biol. Chem.*, **269**, 17872-17879.
- Kitagawa, H. & Paulson, J.C. (1994b) "Cloning of a Novel α 2,3-Sialyltransferase that Sialylates Glycoproteins and Glycolipids Carbohydrate Group." *J. Biol. Chem.*, **269**, 1394-401.
- Kitagawa H., Mattei M-G. & Paulson J.C. (1996) "Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc α 2,3-sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **271**, 931-8.
- 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) epitope." *Cancer Res.*, **48**, 2214-20.
- Kojima N., Handa K., Newman W. & Hakamori S. (1992) "Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1288-95.
- Kojima, N., Yoshida, Y., Lee, Y.C. & Tsuji, S. (1995a) "Enzymatic Activity of a Developmentally Regulated Member of the Sialyltransferase Family (STX) : Evidence for α 2,8-Sialyltransferase Activity Toward N-linked Oligosaccharides." *FEBS Letters*, **360**, 1-4.
- Kojima N., Yoshida Y. & Tsuji S. (1995b) "A developmentally regulated member of the sialyltransferase family (ST8Sia II, STX) is a polysialic acid synthase." *FEBS Letters*, **373**, 119-22.
- Kono M., Ysoshida Y., Kojima N. & Tsuji S. (1996) "Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate psecificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3." *J; Biol. Chem.*, **271**, 29366-71.
- Kono M., Ohyama Y., Lee Y-C., Hamamoto, Kojima N. & Tsuji S. (1997) "Mouse β -galactoside α 2,3-sialyltransferases : comparison of *in vitro* substrate speciicities and tissue specific expression." *Glycobiology*, **7**, 469-79.
- Kuan S. F., Byrd J. C., Basbaum C. & Kim Y. S. (1989) "Inhibition of mucin glycosylation by Aryl-N-acetyl- α -galactosaminides in human colon cancer cells." *J. Biol. Chem.*, **264**, 19271-77.

Kundu, S.K. (1992). "Glycolipids : structure, synthesis, function." *In* Allen, H.J. and Kisailus, E.C. (eds), *Glycoconjugates*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong-Kong, pp. 203-62.

Kurosawa N., Kawasaki, M., Hamamoto T., Nakaoka T., Lee Y.C., Arita M. & Tsuji S. (1994a) "Molecular Cloning and Expression of Chick Embryo Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-Sialyltransferase." *Eur. J. Biochem.* **219**, 375-81.

Kurosawa N., Hamamoto T., Lee Y.-C., Nakaoka T., Kojima N. & Tsuji S. (1994b) "Molecular Cloning and Expression of GalNAc α 2,6-Sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **269**, 1402-9.

Kurosawa N., Kojima, N., Inoue M., Hamamoto T. & Tsuji S. (1994c) "Cloning and Expression of Gal β 1,3GalNAc-specific GalNAc α 2,6-Sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **269**, 19048-53.

Kurosawa N., Hamamoto T., Inoue M., & Tsuji S. (1995) "Molecular cloning and expression of chick Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase." *Biochim. Biophys. Acta.*, **1244**, 216-22.

Kurosawa, N., Inoue M., Yoshida Y. & Tsuji, S. (1996) "Molecular cloning and genomic analysis of mouse Gal β 1,3GalNAc-specific GalNAc α 2,6-Sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **271**, 15109-16.

L

Lamblin G., Lhermitte M., Klein A., Houdret N., Scharfman A., Reuben R. & Roussel P. (1991) "The carbohydrate diversity of human respiratory mucins : a protection of the underlying mucosa ?" *Am. Rev. Respir.*, **144**, S19-S24.

Lambrecht V., Bertout M., Boilly B. & Le Bourhis X. (1998) "Effect of TGF β , sodium butyrate and retinoic acid on cell proliferation and differentiation of normal and cancerous human breast epithelial cells." Soumis dans *Breast Cancer Research and Treatment*.

Leathem A.J. & Brooks S.A. (1987) "Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival." *Lancet*, **i**, 1054-6.

Ledeen, R.W. (1978). "Ganglioside structures and distribution : Are they localized at the nerve ending?" *J. Supramol. Struct.*, **8**, 1-17.

Lee, Y.C., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T. & Tsuji, S. (1993) "Molecular Cloning and expression of Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from mouse brain." *Eur. J. Biochem.*, **216**, 377-85.

Lee, Y.C., Kojima, N., Wada, E., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Hamamoto, T. & Tsuji, S. (1994) "Cloning and expression of cDNA for a new type of Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **269**, 10028-33.

Le Marer, N., Laudet, V., Svensson, E.C., Cazlaris, H., Van Hille, B., Lagrou, C., Stéhelin, D., Montreuil, J., Verbert, A. & Delannoy, P. (1992). "The *c-Ha-ras* oncogene induces increased expression of β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells." *Glycobiology*, **2**, 49-56.

Le Marer, N. & Stéhelin, D. (1995) "High alpha-2,6-sialylation of N-acetyllactosamine sequences in ras-transformed rat fibroblasts correlates with high invasive potential." *Glycobiology* **5**, 219-56

Lesuffleur T, Barbat A., Dussaulx E. & Zweibaum A. (1990) "Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells." *Cancer Res*, **50**, 6334-43.

Lesuffleur T, Barbat A., Luccioni C., Beaumatin J., Claire M., Kornowski A., Dussaulx E., Dutrillaux B. & Zweibaum A. (1991) "Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells." *J. Cell Biol.*, **115**, 1409-18.

Lesuffleur T, Zweibaum A. & Real F. X. (1994) "Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues." *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **17**, 153-80.

Li M., Andersen V. & Lance P. (1995) "Expression and regulation of glycosyltransferases for N-glycosyl oligosaccharides in fresh human surgical and murine tissues and cultured cell lines." *Clinical Science*, **89**, 397-404.

Limas C. & Lange P. (1986) "T-antigen in normal and neoplastic urothelium." *Cancer*, **58**, 1236-45.

Livingston B.D., Jacobs J.L., Glick M.C. & Troy F. (1988) "Extended polysialic acid chains (n > 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells." *J. Biol. Chem.*, **263**, 9443-8.

Livingston, B.D. & Paulson, J.C. (1993) "Polymerase Chain Reaction Cloning of a Developmentally Regulated Member of the Sialyltransferase Gene Family." *J. Biol. Chem.*, **268**, 11504-7.

Lo N-W. & Lau J.T.Y. (1996) "Novel heterogeneity exists in the 5'-untranslated region of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase mRNAs in the Human B-Lymphoblastoid cell line, Louckes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 380-5.

Lotan R., Skutelski E., Danon D. & Sharon N. (1975) "The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from Peanut (*Arachis hypogaea*)." *J. Biol. Chem.*, **250**, 5818-25.

Lowe J.B., Stoolman L.M., Nair R.P., Larsen R.D., Berhend T.L. & Marks R.M. (1990) "ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by transfected human fucosyltransferase cDNA." *Cell*, **63**, 475-84.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951) "Protein measurement with Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.*; **193**, 265-75.

M

Ma J., Qiam R., Rausa III F.M. & Colley K.J. (1997) "Two naturally occurring α 2,6-sialyltransferase forms with a single amino acid change in the catalytic domain differ in their catalytic activity and proteolytic processing." *J. Biol. Chem.*, **272**, 672-9.

MacLean G.D., Reddish M., Koganty R.R., Wong T., Gandhi S., Smolenski M., Samuel J., Nabholz J.M. & Longenecker B.M. (1993) "Immunization of breast cancer patients using a synthetic sialyl-Tn glycoconjugate plus Detox adjuvant." *Cancer Immunol. Immunother.*, **36**, 215-22.

Magnani J.L., Nilsson B., Brockhaus M., Zopf D., Stepkowski Z., Koprowski H. & Ginsburg V. (1982 a) "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 J.L., Brockhaus M., Smith D.F. & Ginsburg V. (1982 b) "Detection of glycolipid ligands by direct binding of carbohydrate-binding proteins to thin-layer chromatograms." *Methods. Enzymol.*, **83**, 235-41.

Magnani J.L. (1991) "The tumor markers sialyl Le^a and sialyl Le^x bind ELAM-1." *Glycobiology*, **1**, 318-20.

Majuri M-L., Niemela R., Thsala S., Renkonen O. & Renkonen R. (1995) "Expression and function of α 2,3-sialyl- and α 1,3/1,4-fucosyltransferase in colon adenocarcinoma cell lines : role in synthesis of E-selectin counter-receptors." *Int. J. Cancer*, **63**, 551-9.

Mannori G., Crottet P., Cecconi O., Hanasaki O., Aruffo A., Nelson R.M., Varki A. & Bevilacqua M.P. (1995) "Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin : rôle of mucin-type glycoproteins." *Cancer Res.*, **55**, 4425-31.

Maoret J.J., Font J., Augeron C., Codogno P., Bauvy C., Aubery M. & Labois C. (1989) "A mucus-secreting human colonic cancer cell line. Purification and partial characterization of the secreted mucins." *Biochem. J.*, **258**, 793-9.

Mareel M., Van Roy F. & Bracke M.E. (1993) "How and when do tumor cells metastasize ?" *Critical Reviews in Oncogenesis*, **4**, 559-94.

Matsumoto H., Muramastu H., Shimotakahara T., Yanagi M., Nishijima H, Mitani N., Baba K., Muramastu T & Shimazu H. (1993) "Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas." *Cancer*, **72**, 75-81.

Matsusako T., Muramastu H., Shirahama T., Muramastu T. & Ohi Y. (1991) "Expression of 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.

Matsushita Y; Nakamori S., Seftro E.A., Hendrix M.J.C. & Imura T. (1991) "Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric Le^x antigen." *Exp. Cell. Res.*, **196**, 20-5.

Medema, R.H. & Bos, J.L. (1993). "The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling." *Crit. Rev. oncogenis*, **4**, 615-61.

Metoki R., Kakudo K., Tsuji Y., Teng N., Calusen H. & Hakamori S. (1989) "Deletion of histo-blood group A and B antigens and expression of incompatible A antigen in ovarian cancer." *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1151-7.

Michalek M.T., Mold C. & Bremer E.G. (1988) "Inhibition of the alternative pathway of human complement by structural analogues of sialic acid." *J. Immunol.*, **140**, 1588-94.

Miles D.W., Happerfield L.C., Smith P., Gillibrand R., Bobrow L.G., Gregory W.M. & Rubens R.D. (1994) "Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer." *Br. J. Cancer*, **70**, 1272-5.

Mitchell B.S., Vernon K., Schumacher U & Habil M. (1995) "Ultrastructural localization of Helix pomatia (HPA)-binding sites in human breast cancer cell lines and characterization of HPA-binding glycoproteins by wetern blotting." *Ultrastruct. Pathol.*, **19**, 51-9.

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 cancer." *Cancer Res.*, **48**, 7150-8.

Mizuochi, T., Yamashita, K., Fujikawa, K., Kisiel, W. & Kobata, A. (1979). "The carbohydrate of bovine prothrombin. Occurence of Gal β 1,3GlcNAc grouping in asparagine-linked sugar chains." *J. Biol. Chem.*, **254**, 6419-25.

Montreuil, J. (1980). "Primary structure of glycoprotein. Glycans basis for the molecular biology of glycoproteins." *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 157-223.

Moolenaar C.E., Muller E.J., Schol D.J., Figdor C.G., Bock E., Bitter-Suermann D. & Michalides R.J. (1990) "Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212." *Cancer Res.*, **50**, 1102-6.

Munro S. (1995) "An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention." *EMBO*, **14**, 4695-704.

Muramatsu H. (1993) "Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas." *Glycobiology*, **3**, 291-6.

Murayama T., Zuber C., Steelentag W.K.F., Li W-P, Kemmner W., Heitz P.U. & Roth J. (1997) "Colon carcinoma glycoproteins carrying α 2,6-linked sialic acid reactive with sambucus nigra agglutinin are not constitutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen." *Int. J. Cancer*, **70**, 575-81.

N

Nakagoe T., Fukushima K., Hirota M., Kusano H., Ayabe H., Tomita M. & Kamihara S. (1993) "Immunohistochemical expression of sialyl Le^X antigen in relation to survival of patients with colorectal carcinoma." *Cancer*, **72**, 2323-30.

Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Kabuto T., Iwanaga T., Matsushita Y. & Irimura T. (1993) "Increased expression of sialyl Lewis-x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma." *Cancer Res.*, **53**, 3632-37.

Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Izumi Y. & Irimura T. (1997 a) "Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(X) in colorectal cancer metastasis." *Dis. Colon Rectum*, **40**, 420-31.

Nakamori S., Furukawa H., Hiratsuka M., Iwanaga T., Imaoka S., Ishikawa O., Kabuto T., Sasaki Y., Kameyama M., Ishiguro S. & Irimura T. (1997 b) "Expression of carbohydrate antigen sialyl Le(a) : a new functional prognostic factor in gastric cancer." *J. Clin. Oncol.*, **15**, 816-25.

Nakasaki H., Mitomi T., Noto T., Ogoshi K., Hanaue H., Tanaka Y., Makuuchi H., Clausen H. & Hakamori S. (1989) "Mosaicism in the expression of tumor-associated carbohydrate antigens in human colonic and gastric cancers." *Cancer Res.*, **49**, 3662-9.

Nakata, N., Furukawa, K., Greenwalt, D.E. & Kobata, A. (1991). "Bovine milk epithelial glycoprotein IV (CD36) contains novel sialylated tri- and tetraantennary complex-type sugar chains having a β -N-acetylgalactosamine linked to an N-acetylglucosamine residue." *Glycoconjugate J.*, **8**, 250.

Nakayama T., Watanabe M., Katsumata T., Teramoto T. & Kitajima M. (1995 a) "Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma." *Cancer*, **75**, 2051-6.

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Hirabayashi, Y., Sasaki, K., Nishi, T. & Fukuda, M. (1995) "Expression Cloning of Human Polysialyltransferases." *Glycoconjugate J.*, **12**, 516.

Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y. & Sinai, Y. (1994) "Expression Cloning of a CMP-NeuAc Gal β 1,4Glc β 1-1'-Cer α 2,8-Sialyltransferase (GD3 Synthase) from Human Melanoma Cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7952-56.

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**, 3044-54.

Nelson R.M., Venot A., Bevilacqua M.P., Linhardt R.J. & Stamenkovic I. (1995) "Carbohydrate-protein interactions in vascular biology." *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **11**, 601-31.

Nilsson O., Lindholm L., Holmgren J. & Svennerholm L. (1985) "Monoclonal antibodies raised against NeuAc α 2-6neolactotetraosylceramide detect carcinoma-associated gangliosides." *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 577-83.

Nishiyama T., Matsumoto Y., Watanabe H., Fujiwarar M. & Sato S. (1987) "Detection of Tn antigen with Vicia villosa agglutinin in urinary bladder cancer : its relevance to the patient's clinical course." *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 1113-7

O

O'Boyle K.P., Zamore R., Adluri S., Cohen A., Kemeny N., Welt S., Lloyd K.O., Oettgen H.F., Old L.J. & Livingston P.O. (1992) "Immunization of colorectal cancer patients with modified ovine submawillary gland mucin and adjuvant induces IgM and IgG antibodies to sialylated Tn." *Cancer Res.*, **52**, 5663-7.

Ogata S., Maimonis P.J. & Itzkowitz S.H. (1992) "Mucin bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediates inhibition of natural killer cell cytotoxicity." *Cancer Res.*, **52**, 4741-6.

Ogata S., Ho I., Chen A., Dubois D., Maklansky J., Singhal A., Hakamori S. & Itzkowitz S.H. (1995) "Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa." *Cancer Res.*, **55**, 1869-74.

Ogata S., Koganty R., Reddish M., Longenecker B.M., Chen A., Perez C. & Itzkowitz S.H. (1998) "Different modes of sialyl-Tn expression during malignant transformation of human colonic mucosa." *Glycoconj. J.*, **15**, 29-35.

Ogawa J., Tsurumi T., Yamada S., Koide S. & Shohtsu A. (1994) "Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewis^a and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. Relation to postoperative recurrence." *Cancer*, **73**, 1177-83.

Ogawa J., Sano A., Inoue H. & Koide S. (1995) "Expression of Lewis-related antigens and prognosis in stage I non-small cell lung carcinoma." *Ann. Thorac. Surg.*, **59**, 412-5.

Ogawa J-I., Inoue H. & Koide S. (1997) " α -2,3-sialyltransferase type 3N and α -1,3-fucosyltransferase type VII are related to sialyl LewisX synthesis and patient survival from lung carcinoma." *Cancer*, **79**, 1678-85.

O'Hanlon, T.P. & Lau, J.T.Y. (1992). "Analysis of kidney mRNAs expressed from the rat β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase gene." *Glycobiology*, **2**, 257-66.

Okada Y., Arima T., Togawa K., Nagashima H., Jinno K., Moriwaki S., Kunitomo T., Thurin J. & Koprowski H. (1987) "Neoexpression of ABH and Lewis blood group antigens in human hepatocellular carcinomas." *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 19-28.

Onrust S.V., Hartl P.M., Rosen S.D. & Hanahan D. (1996) "Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice." *J. Clin. Invest.*, **97**, 54-64.

Oriol R., Mollicone R., Coullin P., Dalix A-M & Candelier J-J (1992) "Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues." *APMIS*, **100 (suppl. 27)**, 499-512.

Orntoft T.F. (1990) "Expression and biosynthesis of ABH-related carbohydrate antigens in normal and pathologic human urothelium" *APMIS*, **98 (suppl. 17)**, 5-34.

Orntoft T.F., Harving N. & Langkilde N.C. (1990) "O-linked mucin-type glycoproteins in normal and malignant colon mucosa : lack of T antigen expression and accumulation of Tn and sialosyl-Tn antigens in carcinomas." *Int. J. Cancer*, **45**, 666-72.

Orntoft T.F. (1992) "Carbohydrate changes in bladder carcinoma." *APMIS*, **100 (suppl. 27)**, 181-7.

Osako M., Yonezawa S., Siddiki B., Huang J., Ho J.J. & Kim Y.S. (1993) "Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors." *Cancer*, **71**, 2191-9.

P

Palcic M.M., Ripka J., Kaur K.J., Shoreibah M., Hindgsaul O. & Pierce M. (1990) "Regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V activity. Kinetic comparisons of parental, rous sarcoma virus-transformed BHK, and L-phytohemagglutinin-resistant BHK cells using synthetic substrates and an inhibitory substrate analog." *J. Biol. Chem.*, **265**, 6759-69.

Paulson, J. C., Weinstein, J. & Schauer, A. (1989) "Tissue-Specific Expression of Sialyltransferases." *J. Biol. Chem.*, **264**, 10931-34.

Peterson G. L. (1977) "Modified procedure for protein assay." *Anal. Biochem.*; **83**, 346-56.

Phillips M.L., Nudelman E., Gaeta F.C.A., Perez M., Singhai A.K., Hakamori S. & Paulson J.C. (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.

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

Powell L.D. & Varki A. (1995) "I-type lectins." *J. Biol. Chem.*, **270**, 14243-6.

Q

R

Ravindranath M.H., Amiri A.A., Bauer P.M., Kelley M.C., Essner R. & Morton D.L. (1997) "Endothelial-selectin ligands sialyl Lewis(X) and sialyl Lewis(a) are differentiation antigens immunogenic in human melanoma." *Cancer*, **79**, 1686-97.

Reano A., Ledger P.W., Bonnefoy J-Y. & Thivolet J. (1984) "ConA- and PNA-binding glycoproteins of human epidermis." *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 202-5.

Reano A., Hesse S. & Viac J. (1990) "Effect of gamma-interferon on lectin-binding glycoproteins in cultured human keratinocytes." *Arch. Dermatol. Res.*, **282**, 246-52.

Recchi M-A., Vandamme-Feldhaus V., Harduin-Lepers A. & Delannoy P. (1995) "La sialylation chez les mammifères : spécificité et régulation des sialyltransférases." *Regard sur la Biochimie*, n°3, 22-32.

Renkonen J., Paavonen T. & Renkonen R. (1997) "Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(X) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma." *Int. J. Cancer*, **74**, 296-300.

Rice G.E. & Bevilacqua M.P. (1989) "An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion." *Science*, **246**, 1303-6.

Rosswsk W.i & Srivastava I.S. (1983) "Glycosyltransferase activities in leukemic cells from patients and human leukemic cell lines." *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**, 1431-7.

Roth J. (1987) "Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells." *Biochem. Biophys. Acta*, **906**, 405-36.

Roth J., Zuber C., Wagner P., Taatjes D., Weisgerber C., Heitz P.U., Goridis C. & Bitter-Suermann D. (1988) "Reexpression of poly(sialic acid) units of neural cell adhesion molecule in Wilms tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 29995-3003.

Roussel P., Lamblin G., Lhermitte M., Houdret N., Lafitte J.J., Perini J.M., Klein A. & Scharfman A.A. (1988) "The complexity of mucins." *Biochimie*, **70**, 1471-82.

Ruoslahti E. (1996) "Cancer et métastases." *Pour La Science*, **229**, 44-9.

Rutishauser U., Acheson A., Hall A.K., Mann D.M. & Sunshine J. (1988) "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." *Science*, **240**, 53-7.

S

Sadler, E.J., Paulson J.C. & Hill R.L. (1979). "The role of sialic acid in the expression of Human MN blood group antigens." *J. Biol. Chem.*, **254**, 2112-19.

Saitoh O., Piller F., Fox R.I. & Fukuda M. (1991) "T-lymphocytic leukemias express complex, branched O-linked oligosaccharides on a major sialoglycoprotein, leukosialin." *Blood*, **77**, 1491-9.

Sakamoto J., Watanabe T., Tokumaru T., Takagi H., Nakazato H. & Lloyd K.O. (1989) "Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue." *Cancer Res.*, **49**, 745-52.

Sasaki R., Takaku F., Lin Y-L & Bollum F. (1982) "Sialyltransferase activity in leukemia." *Leukemia Research*, **6**, 197-202.

Sasaki K., Watanabe E., Kawashima K., Sekine S., Dohi T., Oshima H., Hanai N., Nishi T. & Hasegawa M. (1993) "Expression Cloning of a Novel Gal β (1-3/1-4)GlcNAc α 2,3-Sialyltransferase Using Lectin Resistance Selection." *J. Biol. Chem.*, **268**, 22782-7.

Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S. & Nishi, T. (1994) "Expression Cloning of a GM₃ α 2,8-Sialyltransferase (GD₃ Synthase)." *J. Biol. Chem.*, **269**, 15950-6.

Sata T., Roth J., Zuber C., Stamm B. & Heitz P.U. (1991) "Expression of α 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa." *J. Histochem.*, **37**, 257-65.

Sawada R., Lowe J.B. & Fukuda M. (1993) "E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels." *J. Biol. Chem.*, **268**, 12675-81.

Sawada T., Ho J.J.L., Chung Y. Sowa M. & Kim Y.S. (1994) "E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera." *Int. J. Cancer*, **57**, 901-7.

Schachter, H. & Brockhausen, I. (1989). "The biosynthesis of branched O-Glycans." In Chantler, E. and Ratcliffe, N.A. (eds) *Mucus and related topics*. Society for Experimental Biology, Cambridge, Vol. 43, pp. 1-26.

Scheidegger E.P., Lackie P.M., Papay J. & Roth J. (1994) "In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule." *Lab. Invest.*, **70**, 95-106.

Schuessler M.H., Pintado S., Welt S., Real F.X., Xu M., Melamed M.R., Lloyd K.O. & Oettgen H.F. (1991) "Blood group and blood-group-related antigens in normal pancreas and pancreas cancer enhanced expression of precursor type 1, Tn and sialyl-Tn in pancreatic cancer." *Int. J. Cancer*, **47**, 180-7.

Schumacher U., Adam E., Brooks S.A. & Leatham A.J. (1995) "Lectin-binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin." *J. of Histochem. and Cytochem.*, **43**, 275-81.

Schumacher U, Mukhtar D., Stehling P. & Reutter W. (1996) "Is the lectin binding pattern of human breast and colon cancer cells influenced by modulators of sialic acid metabolism?" *Histochem. Cell Biol.*, **106**, 599-604.

Shah S., Lance P., Smith T.J., Berenson C.S., Cohen S.A., Horvath P.J., Lau J.T.Y. et Baumann H. (1992) "n-Butyrate reduces the expression of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase in HepG2 cells." *J. Biol. Chem.*, **267**, 10652-8.

Sheinfeld J., Reuter V.E., Fair W.R. & Cordon-Cardo C. (1992) "Expression of blood group antigens in bladder cancer : current concepts." *Semin. Surg. Oncol.*, **8**, 308-15.

Shi W.X., Chammas R., Varki N.M., Powel L. & Varki A. (1996) "Sialic acid 9-O-acetylation on murine erythroleukemia cells affects complement activation, binding to I-type lectins, and tissue homing." *J. Biol. Chem.*, **271**, 31526-32.

Shibuya N., Goldstein I. J., Broeckaert W. F., Nsimba-Lubaki M., Peeters B., Peumans W. J. (1987) "The elderberry (*sambucus nigra* L) bark lectin recognizes the NeuAc(α 2-6)Gal/GalNac sequence." *J. Biol. Chem.*; **4**, 1596-1601.

Shimodaira K., Nakayama J, Nakamura N., Hasebe O., Katsuyama T. & Fukuda M; (1997) "Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer : rôle of O-glycans in tumor progression." *Cancer Res.*, **57**, 5201-5206.

- Shimono R., Mori M., Akazawa K., Adachi Y. & Sugimachi K. (1994) "Immunohistochemical expression of carbohydrate antigen 19-9 in colorectal carcinoma." *Am. J. Gastroenterol.*, **89**, 101-5.
- Siddiki B., Ho J.J., Huang J., Byrd J.C., Lau E., Yuan M. & Kim Y.S. (1993) "Monoclonal antibody directed against colon cancer mucin has high specificity for malignancy." *Int. J. Cancer*, **54**, 467-74.
- Singhal A.K., Orntoft T.F., Nudelman E., Nance S., Schibing L., Stroud M.R., Clausen H. & Hakomori S. (1990) "Profiles of LewisX-containing glycoproteins and glycolipids in sera of patients with adenocarcinoma." *Cancer Res.*, **50**, 1375-80.
- Singhal A.K. (1991) "Histo-blood group antigens in cancer." *Cancer Biol.*, **2**, 379-88.
- Singhal A., Fohn M. & Hakamori 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.
- Sjoberg E.R., Kitagawa H., Glushka J., van Halbeek H. & Paulson J.C. (1996) "Molecular cloning of a developmentally regulated N-acetylgalactosamine α 2,6-sialyltransferase specific for sialylated glycoconjugates." *J. Biol. Chem.*, **271**, 7450-9.
- Soares R., Marinho A. and Schmitt F. (1996) "Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters." *Pathol. Res. Pract.*, **192**, 1181-6.
- Sotiropoulou G., Anisowicz A & Sager R. (1994) "Isolation and cloning from human mammary epithelial cells" from the Gen Bank™/EMBL Data Bank under accession number. U14550.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409-16.
- Springer G.F. (1989) "Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine α -O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma : a functional predictor of aggressiveness." *Mol. Immunol.*, **26**, 1-5.
- Springer T.A. & Lasky L.A. (1991) "Sticky sugars for selectins." *Nature*, **34**, 196-7.
- Stenersen T.C. & Debelsteen E. (1992) "Changes in the glycosylation pattern of histo-blood group antigens in benign, premalignant laryngeal epithelial lesions." *APMIS*, **100** (suppl. 27), 139-48.
- Stoppa-Lyonnet D., Blandy C. & Eisinger F. (1997) "Cancer du sein : évaluer le risque." *La recherche*, **294**, 72-6.
- Summers J.L., Coon J.S., Ward R.M., Falor W.H., Mille A.W. III & Weinstein R.S. (1983) "Prognosis of the urinary bladder based upon tissue blood group ABH and

Thomsen-Friedenreich antigen status and karyotype of the initial tumor." *Cancer Res.*, **43**, 934-9.

Svensson, E.C, Conley, P.B. & Paulson, J.C. (1992). "Regulated expression of α 2,6-sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP." *J. Biol. Chem.*, **267**, 3466-72.

T

Takada A., Ohmori K., Yoneda T., Tsuyuoka K., Hasegawa A. & Kiso M. (1993) "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis^a and sialyl Lewis^x to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." *Cancer Res.*, **53**, 354-61.

Takano R., Nose M., Testuro N. & Kyogoku M. (1990) "Increase of β 1-6-branched oligosaccharides in human esophageal carcinomas invasive against surrounding tissue in vivo and in vitro." *Am. J. Pathol.*, **137**, 1007-11.

Takano R., Muchmore E. & Dennis J.W. (1994) "Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants." *Glycobiology*, **4**, 665-74.

Taniguchi A. & Matsumoto K. (1998) "Down-regulation of human sialyltransferase gene expression during in vitro human keratinocyte cell line differentiation." *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **243**, 177-83.

Troy, F. A. (1992). "Polysialylation : from bacteria to brain." *Glycobiology*, **2**, 5-23.

Tsuji S. (1996) "Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases." *J. Biochem.*, **120**, 1-13

Tsuji S., Datta A.K. & Paulson J.C. (1996) "Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology*, **6**, pp. v-xiv.

U

Ura Y., Dion A.S., Williams C.J., Olsen B.D., Redfield E.S., Ishida M., Herlyn M. & Major P.P. (1992) "Quantitative dot blot analysis of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues." *Int. J. Cancer*, **50**, 57-63.

Ura H., Denno R., Hirata K., Yamaguchi K., Yasashima T. & Shishido T. (1997) "Close correlation between increased sialyl-Lewis^x expression and metastasis in human gastric carcinoma." *World J. Surg.*, **21**, 773-6.

V

Vandamme, V., Pierce, A., Verbert, A. & Delannoy P. (1993). "Transcriptional induction of β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone." *Eur. J. Biochem.*, **211**, 135-140.

Van den Eijden D.H., Koenderman A.H.L. & Schiphorst W.E.C.M. (1988) "Biosynthesis of blood group i-active polylectosaminoglycans." *J. Biol. Chem.*, **263**, 12461-71.

Van Roy F. & Mareel M. (1992) "Tumor invasion : effects of cell adhesion and motility." *Trends in Cell Biology*, **2**, 163-9.

Varki A. (1993) "Biological roles of oligosaccharides : all of the theories are correct." *Glycobiology*, **3**, 97-130.

Varki A. (1994) "Selectin ligands." *Proc. Natl. Acad.*, **91**, 7390-7.

Varki A. (1997 a) "Selectin ligands : will the real ones please stand up ?" *J. Clin. Invest.*, **99**, 158-62.

Varki A. (1997 b) "Sialic acid as ligands in recognition phenomena" *FASEB J.*, **11**, 248-55.

Vavasseur F., Dole K., Yang J., Matta K.L., Myerscough N., Corfield A., Paraskeva C. & Brockhausen I. (1994) "O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer." *Eur. J. Biochem.*, **222**, 415-24.

Vavasseur F., Yang J., Dole K., Paulsen H. & Brockhausen I. (1995) "Synthesis of O-glycan core 3 : Characterization of UDP-GlcNAc : GalNAc-R β 3-N-acetylglucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cells lines." *Glycobiology*, **5**, 351-7.

Vertino-Bell, A., Ren, J., Black, J.D. & Lau, J.T.Y. (1994) "Developmental Regulation of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase in Small Intestine Epithelium." *Dev. Biology*, **165**, 126-36.

Verstergaard E.M., Wolf H. & Orntoft T.F. (1998) "Increased concentrations of genotype-interpreted Ca19-9 in urine of bladder cancer patients mark diffuse atypia of the urothelium." *Clin. Chem.*, **44**, 197-204.

W

Waltz 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.

Wang W. C. & Cumming R. D. (1988) "The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked

oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α 2-3 to penultimate galactose residues." *J. Biol. Chem.*, **263**, 4576-85.

Wang, X.C., O'Hanlon, T.P. & Lau, J.T.Y. (1989). "Regulation of β -galactoside : α -2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone." *J. Biol. Chem.*, **264**, 1854-59.

Wang, X.C., Smith, T.J. & Lau, J.T.Y. (1990). "Transcriptional regulation of liver β -galactoside : α 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids." *J. Biol. Chem.*, **265**, 17849-53.

Wang, X.C., Vertino, A., Eddy, R.L., Bryers, M.G., Jani-Sait, S.N., Shows, T.B. & Lau, J.T.Y. (1993). "Chromosome mapping and organization of the Human β -Galactoside : α 2,6-sialyltransferase gene ." *J. Biol. Chem.*, **268**, 4355-61.

Wagner H.E., Thomas P., Wolf B.C., Ropoza A. & Steele G. (1990) "Inhibition of sialic acid incorporation prevents hepatic metastases." *Arch. Surg.*, **125**, 351-4.

Watanabe Y., Nara K., Takahashi H., Nagai Y. & Sanai Y. (1996) "The molecular cloning and expression of alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) in a rat brain." *J. Biolchem.*, **120**, 1020-27.

Watkins W.M. (1980) "Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems." In : Harris H., Hirschlorm K., eds. *Advances in human genetics*. New York : Plenum Press , 1-136.

Weinberg R. (1996) "L'apparition des cancers." *Pour La Science*, **229**, 34-42.

Weisshaar, G., Hiyama, J., Renwick, A.G.C. & Nimtz, M. (1991). "NMR investigations of N-linked oligosaccharides at individual glycosylation sites of human lutropin." *Eur. J. Biochem.*, **195**, 257-68.

Wen, D.X., Livingston, B.D., Medzihradzky, K.K., Kelm, S., Burlingame, A.L. & Paulson, J.C. (1992a) "Primary Structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc : α 2,3-Sialyltransferase Determined by Mass Spectrometry Sequence Analysis and Molecular Cloning." *J. Biol. Chem.*, **267**, 21011-9.

Wen, D.X., Svensson, E.C. & Paulson, J.C. (1992b) "Tissue Specific Alternative Splicing of the β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase Gene." *J. Biol. Chem.*, **267**, 2512-8.

Werther J.L., Rivera-MacMurray S., Bruckner H., Tatematsu & Itzkowitz S.H. (1994) "Mucin -associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome." *Br. J. Cancer*, **69**, 613-6.

Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P., & Paulson, J.C. (1987) "Primary Structure of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, **262**, 17735-43.

Whitehouse C., Burchell J., Gschmeissner S., Brockhausen I., Lloyd K.O. & Taylor-Papadimitriou J.C. (1997) "A transfected sialyltransferase that is elevated in breast

cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans." *J. Cell Biol.*, **137**, 1229-41.

Wiegandt, H. (1982). "The gangliosides." *Adv. Neurochem.*, **4**, 149-223.

Wong K.F., Chan J.K., Ng C.S., Lee K.C., Tsang W.Y.W. & Cheung M.M.C. (1992) "CD56 (NKH-1) positive hematolymphoid malignancies : an aggressive neoplasm featuring frequent cutaneous/mucosal involvement cytoplasmic azurophilic granule and angiocentricity." *Hum. Pathol.*, **23**, 798-804.

Wright, A. & Morrison, S.L. (1994). "Effect of altered CH₂-associated carbohydrate structure on the functional properties and *in vivo* fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1." *J. Exp. Med.*, **180**, 1087-96.

X

Y

Yagel S., Feinmesser R., Wafhorne C., Lala P.K., Breitman M.L. & Dennis J.W. (1989) "Evidence that β 1-6 branched Asn-linked oligosaccharides on metastatic tumor cells facilitate invasion of basement membranes." *Int. J. Cancer*, **44**, 685-90.

Yamada N., Chung Y-S., Takatsuka S., Arimoto Y., Sawada T. & Sowa M. (1997) "Increased sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with acquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line." *British J. Cancer*, **76**, 582-7.

Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J. & Hakamori S. (1990) "Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system." *Nature*, **345**, 229-33.

Yamamoto H., Kaneko Y., Vandermulen D., Kersey D., Mkrdichian E., Cerullo L., Leestma J. & Moskal J.R. (1995) "The expression of CMP-NeuAc : Gal β 1,4GlcNAc α 2,6sialyltransferase [EC 2.4.99.1] and glycoproteins bearing α 2,6-linked sialic acids in human brain tumours." *Glycoconjugate J.*, **12**, 848-56.

Yamamoto H., Saito T., Kaneko Y., Kersey D., Yong V.W., Bremer E.G., Mkrdichian E., Cerullo L., Leestma J. & Moskal J.R. (1997) " α 2,3-sialyltransferase mRNA and α 2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas." *Brain Research*, **755**, 175-9.

Yamashiro S., Okada M., Haragushi M., Furukawa K., Lloyd K.O., Shiku H. & Furukawa K. (1995) "Expression of α 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene in human cancer cell lines : high level expression in melanoma and up-regulation in activated T lymphocytes." *Glycoconjugate J.*, **12**, 894-900.

- Yamashita K., Fukushima K., Sakiyama T., Murata F., Kuroki M. & Matsuoka Y. (1995) "Expression of Sia α 2,6Gal 1,4GlcNAc residues on sugar chains of glycoproteins including carcinoembryonic antigens in human colon adenocarcinoma : applications of trichosanthes japonica agglutinin I for early diagnosis." *Cancer Res.*, **55**, 1675-9.
- Yang J.-M., Byrd J.C., Siddiki B.B., Chung Y.S., Okuno M., Sowa M., Kim Y.S., Matta K.L. & Brockhausen (1994) "Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues." *Glycobiologie*, **4**, 873-84.
- Yogeeswaran G. & Tao T. (1980) "Cell surface sialic acid expression of lectin-resistant variant clones of B16 melanoma with altered metastasizing potential." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1452-60.
- Yogeeswaran G. & Salk P.L. (1981) "Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines." *Science*, **212**, 1514-6.
- Yoon W.-H., Park H.-D., Lim K. & Hwang B.-D. (1996) "Effect of O-Glycosylated mucin on invasion and metastasis of HM7 human colon cancer cells." *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **222**, 694-9.
- Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T. & Tsuji, S. (1995a) "Molecular Cloning of Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc α 2,8-Sialyltransferase from Mouse Brain." *J. Biol. Chem.*, **270**, 14628-33.
- Yoshida, Y., Kojima, N., & Tsuji, S. (1995b) "Molecular Cloning and characterization of a third type of N-glycan α 2,8-sialyltransferases from mouse lung." *J. Biochem.*, **118**, 658-64.
- Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T. & Kobata, A. (1981). Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma α 1-acid glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8476-84.
- Yousefi S., Higgins E., Daoling ZZ., Pollex-Kruger A., Hindsgaul O. & Dennis J.W. (1991) "Increased UDP-GlcNAc : Gal β 1-3GalNAc (GlcNAc to GalNAc) β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of poly lactosamine synthesis." *J. Biol. Chem.*, **266**, 1772-82.
- Yuan M., Itzkowitz S.H., Palekar A., Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F. & Kim Y.S. (1985) "Distribution of blood-group antigens A, B, H, Lewis^a, and Lewis^b, in human normal, fetal, and malignant colonic tissue." *Cancer Res.*, **45**, 4499-511.
- Yuan M., Itzkowitz S.H., Boland C.R., Kim Y.D., Tomita J.T., Palekar A., Bennington J.L., Trump B.F. & Kim Y.S. (1986) "Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant and malignant human colonic tissues using lectin and antibody immunohistochemistry." *Cancer Res.*, **46**, 4841-7.

Z

Zebda N, Bailly M., Brown S., Doré J-F. & Berthier-Vergnes O. (1994) "Expression of PNA-binding sites on specific glycoproteins by human melanoma cells is associated with a high metastatic potential." *J. Cell. Biochem.*, **54**, 161-73.

Zebda N., Pedron S., Rebbaa A., Portoukalian J. & Berthier-Vergnes O. (1995) "Deficiency of ganglioside biosynthesis in metastatic human melanoma cells : relevance of CMP-NeuAc : LacCer α 2-3 sialyltransferase (GM3 synthase)." *FEBS Letters*, **362**, 161-4.

Zenita K., Kirihata Y., Kitahara A., Shigeta K., Higuchi K., Hirashima K., Murachi T., Miyaka M., Takeda T. & Kannagi R. (1988) "Fucosylated type-2 chain polylactosamine antigens in human lung cancer." *Int. J. Cancer*, **41**, 344-9.

