

50376
1999
295

Université des Sciences et Technologies de Lille I

Année universitaire 1999

n° d'ordre :

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lille I

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : **Biochimie**

présentée et soutenue publiquement

par

Sophie Degroote



Le 29 octobre 1999

**GLYCOSYLATION/SULFATATION
DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :
INFLUENCE DE L'INFLAMMATION**

Jury

Président

Professeur A. Verbert

Rapporteurs

Docteur A. Corfield

Docteur R. Mollicone

Examineurs

Docteur J.-C. Michalski

Professeur Ph. Roussel

Directeur de thèse

Docteur G. Lamblin

A mes proches,

A Antoine et David, qui nous manquent beaucoup.

Ce travail a été réalisé à l'Unité INSERM n° 377 «Biologie et Physiopathologie des cellules mucipares», dirigée par Monsieur le Professeur Pierre Degand, dans le groupe de Monsieur le Professeur Philippe Roussel et de Madame le Docteur Geneviève Lamblin, Directeur de recherches INSERM.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à

Monsieur le Professeur André Verbert

qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur Anthony Corfield,

Madame le Docteur Rosella Mollicone

qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Madame le Docteur Geneviève Lamblin,

Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski,

Monsieur le Professeur Philippe Roussel

qui ont bien voulu juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe Roussel de m'avoir accueillie au sein de son groupe, d'avoir suivi mon travail de thèse et sa rédaction avec intérêt.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Geneviève Lamblin, qui a encadré mon apprentissage scientifique, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont beaucoup apporté durant ces quatre années passées au laboratoire.

Mes remerciements s'adressent également à

Madame Andrée Scharfman, qui m'héberge dans son laboratoire depuis 4 ans, m'a fait bénéficier de ses connaissances scientifiques et qui a toujours répondu à mes questions avec une grande patience.

Marie-Paule Ducourouble, qui a été ma binôme de Dionex et de RT-PCR depuis mon arrivée au laboratoire, et m'a beaucoup aidée dans la rédaction et la mise en page de cette thèse. Nos années de travail commun se sont passées dans la (très) bonne humeur, et nous ont permis de découvrir de nombreux restaurants lors des moments plus difficiles.

André Klein, grâce à qui je sais maintenant faire le thé dans les règles de l'art (de préférence le thé vert de chez Méo).

Monique Davril qui m'a fait bénéficier de son expérience scientifique.

J'adresse également mes remerciement les plus sincères à

*toute l'équipe de culture cellulaire pour leur gentillesse et leur bonne
humeur : Annie (« la tornade blanche »), Jean-Marc, Philippe (spécialiste de
l'amplification du CFTIR),*

*Pascale qui m'a appris à manier la clef à molettes devant l'appareil
Dionex,*

*Monique Luyckx pour les nombreux dosages « orcinol » qu'elle a
réalisés,*

*tous les autres membres de l'Unité 377 que j'ai pu côtoyer durant ces
années passées au laboratoire.*

Ce travail a bénéficié de collaborations

*Monsieur le Professeur Jean-Jacques Lafitte nous a fourni les pièces de
muqueuse bronchique humaine nécessaires à nos études.*

Madame le Docteur Catherine Figarella,

Monsieur le Docteur Marc Merten

nous ont procuré la lignée cellulaire MM-39.

Monsieur le Professeur Gérard Strecker,

Monsieur Docteur Yves Planche

ont réalisé l'étude en RMN de nos produits.

Nos travaux ont fait l'objet de :

Publications

Degroote S., Lo-Guidice J.M., Strecker G., Ducourouble M.P., Roussel P., Lamblin G.
Characterization of an *N*-Acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase from human
respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains.

J. Biol. Chem. (1997), **272**, 29493-29501.

présentée dans la première partie

Davril M., Degroote S., Humbert P., Galabert C., Dumur V., Lafitte J.J., Lamblin G.,
Roussel P.

The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or
from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection.

Glycobiology (1999) **3**, 311-321.

présentée dans la deuxième partie

Scharfman A., Degroote S., Beau J., Lamblin G., Roussel P., Mazurier J.

Pseudomonas aeruginosa binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate
determinants and predominantly to sialyl Lewis x conjugates.

Glycobiology (1999) **9**, 757-764.

présentée dans la troisième partie

Degroote S., Ducourouble M.P., Roussel P., Lamblin G.

Sequential biosynthesis of sulfated and/or sialylated Lewis x determinants by transferases
of human bronchial mucosa.

Glycobiology (1999) **9**, 1199-1211.

présentée dans la première partie

Communications

Degroote S., Lo-Guidice J.M., Strecker G., Ducourouble M.P., Roussel P., Lamblin G.

An N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase from human respiratory mucosae active on mucin carbohydrate chains.

8th Joint Meeting of the «Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van glycoconjugaten», the «Groupe lillois de Glycobiologie» & the «Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie», 9 et 10 décembre 1996, Giessen (Allemagne).

Lamblin G., Davril M., Degroote S., Galabert C., Roussel P.

Airway mucin sialylation and infection.

Pediatric Pulmonology, supp. **14**, 1997, 281.

Scharfman A., Mazurier J., Hallaert C., Degroote S., Lamblin G., Roussel P.

The binding of *Pseudomonas aeruginosa* to the sialyl-Lewis X determinant and to human respiratory mucins.

Pediatric Pulmonology, supp. **14**, 1997, 281.

Lamblin G., Degroote S., Lo-Guidice J.M., Strecker G., Roussel P.

Airway mucin sulfation and cystic fibrosis.

Pediatric Pulmonology, supp. **14**, 1997, 283.

Degroote S., Lo-Guidice J.M., Strecker G., Roussel P., Lamblin G.

The sulfation of respiratory mucins in cystic fibrosis (CF).

Glycoconjugate Journal, **14**, suppl. 1, 1997, S58.

Davril M., Degroote S., Lamblin G., Roussel P.

Increased sialylation of respiratory mucins and infections.

Glycoconjugate Journal, **14**, suppl. 1, 1997, S58.

Scharfman A., Mazurier J., Hallard C., Degroote S., Lamblin G., Roussel P.

The binding of *Pseudomonas aeruginosa* to the sialyl-Lewis X epitope and to human respiratory mucins.

Glycoconjugate Journal, **14**, suppl. 1, 1997, S58.

Degroote S., Lo-Guidice J.M., Strecker G., Ducourouble M.P., Roussel P., Lamblin G.
Characterization of two sulfotransferases from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains.

9th Joint Meeting of the «Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van glycoconjugaten», the «Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für biologische Chemie» & the «Groupe lillois de Glycobiologie», les 24 et 25 novembre 1997, Lille (France).

Degroote S., Ducourouble M.P., Roussel P., Lamblin G.

Sequential biosynthesis of the 6-sulfo sialyl Lewis x determinant of human respiratory mucin.

10th Joint Meeting of the "Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van glycoconjugaten", the "Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für biologische Chemie" & the "Groupe lillois de Glycobiologie", les 2 et 3 novembre 1998, Nuland (Pays-Bas).

Degroote S., Delmotte P., Davril M., Lamblin G., Roussel P., Périni J.M.

Modifications de glycosylation des mucines sécrétées par une lignée cellulaire d'origine trachéo-bronchique (MM-39) sous l'effet du TNF α .

1^{er} Glycojeune, le 31 mars 1999, Villeneuve d'Ascq (France). Communication orale.

Degroote S., Delmotte P., van Seuningen I., Moniaux N., Davril M., Lamblin G., Roussel P., Périni J.M.

Modifications de glycosylation des mucines sécrétées par une lignée cellulaire d'origine trachéo-bronchique (MM-39) sous l'effet du TNF α .

Congrès des jeunes chercheurs pour la mucoviscidose, le 7 mai 1999, Paris (France).

~~Notes~~

Table des mat. ières

Abréviations	1
Introduction	3
Revue générale	7

Première partie

GLYCOSYLATION ET SULFATATION DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES

A - Rappels

I. Les mucines bronchiques humaines	11
1. Généralités	11
2. Conformation	13
II. Les gènes codant les mucines épithéliales chez l'Homme	15
1. Gènes <i>MUC</i> localisés en 11p15.5	17
2. Gènes <i>MUC</i> codant des mucines membranaires	19
3. Autres gènes <i>MUC</i>	20
III. La glycosylation des mucines	21
1. Chaînes <i>O</i> -glycanniques	21
1.1 Parties centrales ou «noyaux» ou «cores»	22
1.2 Squelettes	24
1.3 Régions périphériques	27
1.3.1 Antigènes tissulaires A, B, H et Lewis	27
1.3.2 Sialylation des chaînes glycanniques de mucines bronchiques	33
1.3.3 Sulfatation des chaînes glycanniques de mucines bronchiques	34
2. Chaînes <i>N</i> -glycanniques	41
IV. Les fonctions des mucines bronchiques	44

B – Travaux personnels

- I. Mise en évidence et caractérisation d'une activité GlcNAc-6-O-sulfo-transférase de muqueuse bronchique humaine active sur les chaînes glycaniques de mucines**

47

Characterization of an *N*-Acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains.

J. Biol. Chem. (1997), 272, 29493-29501.

Résultats – Discussion

48

- II. Étude de la séquence de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant Le^x par les transférases de la muqueuse bronchique humaine**

49

Sequential biosynthesis of sulfated and/or sialylated Lewis x determinants by transferases of human bronchial mucosa.

Glycobiology (1999), 9, 1199-1211.

Résultats – Discussion

50

Deuxième partie

MUCOVISCIDOSE ET ANOMALIES DE GLYCOSYLATION/SULFATATION DES MUCINES INFLUENCE DE L'INFLAMMATION

A - Rappels

- I. La mucoviscidose**

55

1. Généralités

55

2. Bases génétiques de la maladie

55

II. Les anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués dans la mucoviscidose	59
1. Anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués membranaires ou sécrétés provenant de patients ou de cellules CF	59
2. Inflammation bronchique et mucoviscidose	63
III. Inflammation et glycosylation	64
1. Exemple des modifications de glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation	64
2. Influence des cytokines sur la sécrétion et la glycosylation des mucines	66
2.1 <i>Le facteur α de nécrose tumorale (TNFα)</i>	66
2.1.1 Modifications de sécrétion et de glycosylation des mucines	67
2.1.2 Transduction du signal du TNF α	67
2.2 <i>L'interleukine 4 (IL-4)</i>	68

B – Travaux personnels

I. Étude de la sialylation, la sulfatation et de l'expression de l'épitope sialyl Le^x au niveau de mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique, infectés ou non.	71
--	-----------

The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection.

Glycobiology (1999) 9, 311-321.

Résultats – Discussion	73
II. Etude de l'influence d'une cytokine pro-inflammatoire, le TNFα sur :	
1. la sécrétion, la fucosylation, la sialylation et la sulfatation des mucines sécrétées par une lignée d'origine glandulaire bronchique humaine (MM-39)	
2. les activités fucosyl-, sialyl- et sulfotransférasiques d'explants de muqueuse bronchique humaine	76
Conclusion – Discussion	78

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA COLONISATION PULMONAIRE

PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A - Rappels

I. Colonisation par <i>P. aeruginosa</i>	83
1. Différents facteurs peuvent favoriser la colonisation par <i>P. aeruginosa</i>	83
1.1 Altération de la rhéologie du mucus	83
1.2 Altération de l'activité anti-microbienne du mucus	84
1.3 Primo-infection des voies respiratoires	85
2. Hypothèses sur la colonisation par <i>P. aeruginosa</i>	85
2.1 Émergence de récepteurs pour <i>P. aeruginosa</i> ?	85
2.2 Influence de la composition du milieu sur les protéines d'adhésion de <i>P. aeruginosa</i>	90
II. Persistance de <i>P. aeruginosa</i>	90

B – Travaux personnels

I. Étude de l'affinité de <i>P. aeruginosa</i> pour différents épitopes glycaniques dérivés de l'épitope Le^x, présents en périphérie des mucines bronchiques humaines, par une technique de cytométrie de flux.	93
---	-----------

Pseudomonas aeruginosa binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate determinants and predominantly to sialyl Lewis x conjugates.

Glycobiology (1999) 9, 757-764.

Résultats – Discussion	94
------------------------	----

Conclusion générale	95
----------------------------	-----------

Bibliographie	101
----------------------	------------

Résumé

Dix ans après la découverte du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose, l'infection pulmonaire persistante des malades par *Pseudomonas aeruginosa* reste mal comprise. Cette bactérie se fixe majoritairement sur les chaînes glycaniques des mucines bronchiques, dont la glycosylation et la sulfatation sont modifiées dans la mucoviscidose.

Nous avons tout d'abord caractérisé une GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine, qui pourrait être responsable de l'hypersulfatation des mucines bronchiques des patients atteints de mucoviscidose (CF).

Puis nous avons défini la séquence de biosynthèse, par les transférases de muqueuse bronchique humaine, des dérivés sulfatés et/ou sialylés de l'épitope Lewis x qui sont présents en périphérie des mucines bronchiques de patients CF. Certains de ces épitopes, en particulier le 6-sulfo sialyl Lewis x qui est le meilleur ligand de la L-sélectine, pourraient interagir avec les leucocytes et moduler la réponse inflammatoire.

Nous avons ensuite caractérisé, en périphérie des mucines bronchiques de patients CF ou atteints de bronchite chronique, une hypersialylation et une surexpression de l'épitope sialyl Lewis x liées à l'inflammation (et à l'infection), alors que l'hypersulfatation des mucines bronchiques serait une anomalie primaire, liée aux mutations du gène *CFTR*.

L'influence de l'inflammation sur les phénomènes de glycosylation et de sulfatation a été confirmée en caractérisant une certaine augmentation des activités α 1-3-fucosyltransférasiqes, α 2-3-sialyltransférasiqes et GlcNAc-6-*O*-sulfotransférasiqes induite par le facteur α de nécrose tumorale dans la lignée MM-39 d'origine glandulaire bronchique humaine, et dans des explants bronchiques.

Enfin, nous avons démontré que *P. aeruginosa* reconnaissait préférentiellement l'épitope sialyl Lewis x présent en périphérie des mucines bronchiques humaines et surexprimé chez les patients très infectés, ce qui pourrait expliquer la persistance de cette bactérie dans la mucoviscidose.

Abréviations

- **aa** : acide aminé.
- **ABC protéine** : «*ATP Binding Cassette*» protéine.
- **AEBSF** : fluorure de 4-(2-aminoéthyl)-benzènesulfonyle.
- **AMPc** : adénosine 5'-monophosphate cyclique.
- **Asn** : asparagine.
- **ATP** : adénosine triphosphate.
- **CF** : «*Cystic Fibrosis*» (fibrose kystique du pancréas ou mucoviscidose).
- **CFTR** : «*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*».
- **CK** : «*Cystein Knot*».
- **Da** : dalton.
- **Fuc** : fucose.
- **Gal** : galactose.
- **GalNAc** : *N*-acétylgalactosamine.
- **GlcNAc** : *N*-acétylglucosamine.
- **HPAEC-PAD** : chromatographie haute performance d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée.
- **IL** : interleukine.
- **kb** : kilobase.
- **Le** : Lewis ; **Le^a** : Lewis a ; **Le^b** : Lewis b ; **Le^x** : Lewis x ; **Le^y** : Lewis y.
- **Mes** : acide (*N*-morpholino)-2-éthanesulfonique.
- **Mops** : acide (*N*-morpholino)-3-propanesulfonique.
- **MUC** : gène de mucine.
- **NeuAc** : acide *N*-acétylneuraminique.
- **PAPS** : 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate.
- **patient CF** : patient atteint de mucoviscidose.
- **RMN** : résonance magnétique nucléaire.
- **Ser** : sérine.
- **SO₃H** : sulfate.
- **Thr** : thréonine.
- **TNF α** : facteur α de nécrose tumorale.

- **Tris** : tris(hydroxyméthyl)aminométhane.
- **Triton® X-100** : éther octylphénylique du décaéthylèneglycol.
- **VNTR** : «*Variable Number of Tandem Repeat*».
- **vWF** : facteur de von Willebrand.

INTRODUCTION

L'un des groupes de l'Unité INSERM n° 377 s'intéresse à la physiopathologie de la mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas, *cystic fibrosis*), exocrinopathie généralisée affectant une naissance sur 2 500. Malgré le clonage du gène *CFTR* responsable de la maladie en 1989, il n'existe pas, à ce jour, de traitement permettant la guérison des patients. Le problème majeur auquel sont confrontés ces patients est la production d'un mucus bronchique très visqueux qui obstrue les voies aériennes et facilite les infections bactériennes. L'étude des mucines bronchiques réalisée à l'Unité INSERM n° 377 a permis de montrer des anomalies de leur composition en sucres (acide sialique, fucose) ainsi qu'en sulfate.

Les mécanismes aboutissant à des anomalies de glycosylation/sulfatation des mucines bronchiques humaines restent mal connus. Ces anomalies pourraient découler directement de la protéine CFTR mutée, *via* une alcalinisation des compartiments intracellulaires qui modifierait l'activité de glycosyl- ou sulfotransférases, ou bien être une conséquence directe de l'inflammation pulmonaire très précoce observée dans la maladie. En effet, l'influence des phénomènes inflammatoires sur la glycosylation des glycoprotéines a été observée dans de nombreuses pathologies ; la surexpression de l'épitope sialyl Lewis x serait particulièrement liée à l'inflammation.

Ces anomalies de glycosylation/sulfatation pourraient avoir une grande importance dans la physiopathologie de la maladie, car elles sont susceptibles de modifier les propriétés rhéologiques du mucus, et de créer des motifs glycaniques spécifiquement reconnus par *Pseudomonas aeruginosa*, qui est la bactérie responsable de l'essentiel de la mortalité et de la morbidité dans la mucoviscidose.

Le travail que nous avons réalisé comporte cinq parties, concernant la glycosylation et la sulfatation des chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines et leurs anomalies dans la mucoviscidose. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence de l'inflammation sur la glycosylation périphériques des mucines, et au rôle potentiel de certains épitopes glycaniques dans la colonisation de l'appareil respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa*.

① Des études antérieures conduites au laboratoire ont permis de déterminer, par une technique de chromatographie haute performance d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD), la localisation précise des groupements sulfate en périphérie des chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines : soit sur le C3 d'un

résidu de galactose (Gal) terminal, soit sur le C6 d'un résidu de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) [Lo-Guidice *et al.*, 1994].

Ces études structurales ont abouti à la caractérisation de la sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine responsable de la sulfatation en C3 sur le résidu de Gal des chaînes glycaniques de mucines [Lo-Guidice *et al.*, 1995].

Nous avons poursuivi ce travail pour caractériser, dans la muqueuse respiratoire humaine, l'activité sulfotransférase responsable du transfert d'un groupement sulfate sur le C6 d'un résidu de GlcNAc de chaîne glycanique de mucines.

② En utilisant la technique d'HPAEC, qui est une méthode idéale pour la séparation d'oligosaccharides sulfatés et/ou sialylés, nous nous sommes intéressée, dans des fractions microsomales de muqueuse bronchique humaine, à la biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés de l'épitope Lewis x, déterminants existant en périphérie des chaînes glycaniques de mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose. En effet, des données contradictoires existaient dans la littérature concernant la séquence d'action des fucosyl-, sialyl-, et sulfotransférases.

③ Nous avons également voulu étudier l'influence (i) de l'inflammation et (ii) du déficit primaire de la mucoviscidose sur la glycosylation et la sulfatation des mucines bronchiques humaines. Pour cela, nous avons déterminé dans les mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique, infectés ou non :

- ↳ la quantité de sulfate, d'acide sialique ;
- ↳ l'expression du déterminant glycanique sialyl Lewis x.

Cette étude était nécessaire afin d'évaluer les effets respectifs du gène *CFTR* muté et de l'inflammation dans les anomalies de glycosylation/sulfatation rencontrées au niveau des mucines bronchiques de patients CF.

④ L'appareil respiratoire de patients atteints de mucoviscidose étant un terrain propice à la colonisation par *P. aeruginosa*, nous avons recherché les déterminants glycaniques (présents en périphérie des chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines) préférentiellement reconnus par cette bactérie. L'étude de l'affinité de *P. aeruginosa* pour le déterminant glycanique sialyl Lewis x, dont l'expression semble liée à l'inflammation, nous semblait particulièrement nécessaire.

⑤ Enfin, nous avons étudié l'effet de la cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire, le facteur α de nécrose tumorale (TNF α), sur la sécrétion, la glycosylation (fucosylation, sialylation) et la sulfatation des mucines sécrétées par une lignée cellulaire d'origine glandulaire bronchique humaine, nommée MM-39. Nous avons complété cette étude par des expériences similaires réalisées sur des explants de muqueuse bronchique humaine, les cellules MM-39 ne présentant qu'un faible potentiel de fucosylation et de sulfatation.

REVUE GÉNÉRALE

Première partie

GLYCOSYLATION

ET

SULFATATION

DES MUCINES BRONCHIQUES

HUMAINES

A - Rappels

I. Les mucines bronchiques humaines

1. Généralités
2. Conformation

II. Les gènes codant les mucines épithéliales chez l'Homme

1. Gènes *MUC* localisés en 11p15.5
2. Gènes *MUC* codant des mucines membranaires
3. Autres gènes *MUC*

III. La glycosylation des mucines

1. Chaînes *O*-glycanniques
 - 1.1 *Parties centrales ou «noyaux» ou «cores»*
 - 1.2 *Squelettes*
 - 1.3 *Régions périphériques*
 - 1.3.1 Antigènes tissulaires A, B, H et Lewis
 - 1.3.2 Sialylation des chaînes glycanniques de mucines bronchiques
 - 1.3.3 Sulfatation des chaînes glycanniques de mucines bronchiques
2. Chaînes *N*-glycanniques

IV. Les fonctions des mucines bronchiques

B - Travaux personnels

I. Mise en évidence et caractérisation d'une activité GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine active sur les chaînes glycanniques de mucines

II. Étude de la séquence de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant Le^x par les transférases de la muqueuse bronchique humaine

A - Rappels

I. Les mucines bronchiques humaines

1. Généralités

Le mucus bronchique forme un tapis continu à la surface de l'épithélium respiratoire et constitue une barrière importante entre le milieu extérieur et la muqueuse des voies aériennes. A l'état normal, ce film de mucus est mobilisé en permanence par le battement ciliaire, depuis l'extrémité distale des bronchioles jusqu'au pharynx où il est dégluti, entraînant avec lui les particules et les micro-organismes inhalés. Il représente donc la première ligne de défense de la muqueuse respiratoire.

Le mucus bronchique est constitué par 95 % d'eau mais il contient également des ions, des lipides, des acides nucléiques, des protéines, glycoprotéines et peptides [Jacquot *et al.*, 1992 ; Singh *et al.*, 1998]. Certains de ces composants ont des propriétés anti-bactériennes (IgA de sécrétion, lysozyme, lactoferrine, antiprotéases, défensines). Toutefois, les mucines représentent les éléments les plus importants du mucus car elles sont responsables de ses propriétés rhéologiques, indispensables au bon fonctionnement du système muco-ciliaire.

Les mucines constituent une vaste famille de *O*-glycoprotéines, synthétisées par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface et par les cellules muqueuses des glandes sous-muqueuses (**Figure 1**). Ce sont des molécules très hétérogènes, de haute masse moléculaire (de plusieurs milliers à plusieurs millions de daltons (Da)), très riches en sucres (jusqu'à 80 % de la masse totale) [Lamblin *et al.*, 1991], se présentant en microscopie électronique sous la forme de filaments de longueur variable (quelques centaines de nanomètres jusqu'à plusieurs micromètres) [Roussel & Lamblin, 1996]. Ces filaments correspondent à des axes peptidiques (ou apomucines) hérissés de centaines de chaînes glycaniques très diverses.

L'hétérogénéité des mucines bronchiques est d'abord due à la multiplicité des apomucines, codées par les gènes *MUC* exprimés dans le tractus respiratoire (*MUC1*, -2, -4, -5A, -5B, -7 et -8) [Porchet *et al.*, 1999]. Les apomucines sont riches en acides aminés hydroxylés, sérine et thréonine, qui sont des sites potentiels de *O*-glycosylation [Slayter *et al.*, 1984]. L'hétérogénéité des mucines est considérablement amplifiée par la diversité des événements post-traductionnels que sont la glycosylation et la sulfatation [Roussel & Lamblin, 1996].

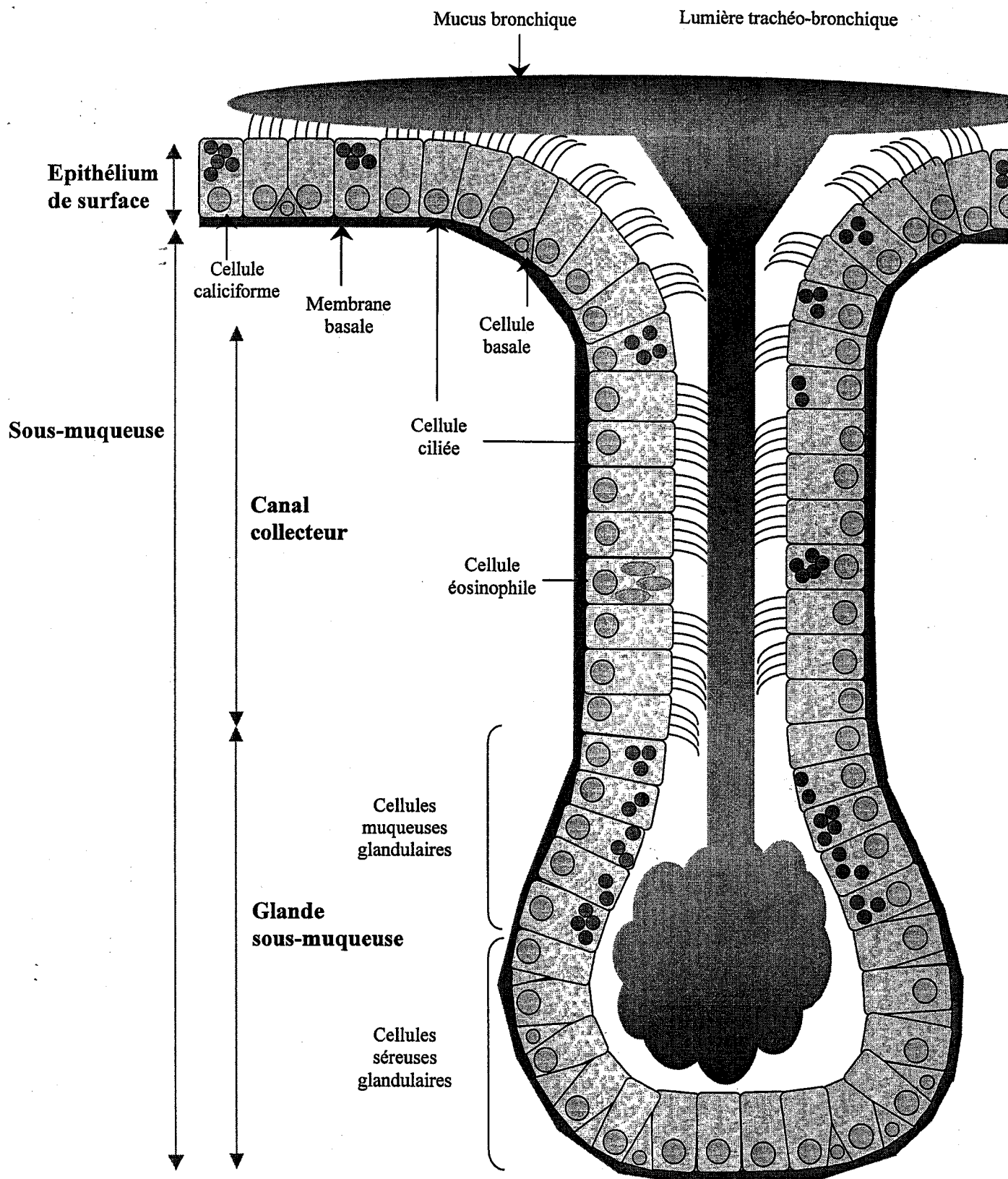


Figure 1 : Coupe schématisique de la muqueuse bronchique humaine.

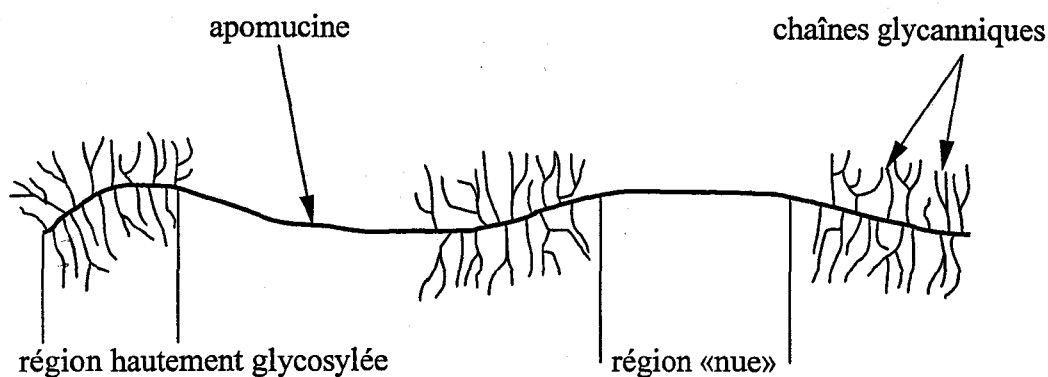
2. Conformation

L'étude de l'action d'enzymes protéolytiques sur les mucines a permis d'identifier deux types de régions dans ces molécules : d'une part des domaines très glycosylés résistants à l'action des protéases, et d'autre part des domaines peu ou pas glycosylés, sensibles à la protéolyse [Donald, 1973]. De ce fait, la représentation habituelle d'une mucine est celle d'un «goupillon», avec une alternance de régions dites «nues», ou peu glycosylées, et de régions hérissées de nombreuses chaînes glycaniques [Carlstedt *et al.*, 1985 ; Roussel *et al.*, 1988] (Figure 2).

Divers travaux suggèrent que les mucines résulteraient de l'assemblage de plusieurs sous-unités (de deux à trois millions de daltons, contenant quatre à cinq régions hautement glycosylées séparées par des régions «nues»), assemblées par des ponts disulfure entre des résidus de cystéine présents dans les régions terminales [Carlstedt *et al.*, 1983 ; Sheehan & Carlstedt, 1990]. Ces résultats sont corroborés par la présence d'un ou plusieurs domaines riches en cystéine dans les mucines cutanées de batracien [Hoffman & Hauser, 1993], dans les mucines trachéo-bronchiques canines [Verma & Davidson, 1993], dans les mucines intestinales de Rat (Muc 2) [Bell *et al.*, 1998], dans la mucine sous-maxillaire porcine [Perez-Vilar *et al.*, 1998] mais surtout dans les produits des gènes d'apomucines humaines *MUC2*, *-5AC* et *-5B* [Desseyn *et al.*, 1998]. Ces trois gènes, décrits plus loin (p. 16), appartiennent à la famille des gènes de mucines localisés en 11p15.5 codant de volumineuses apomucines, responsables de la formation du gel de mucus dans les organes mucipares d'origine endodermique.

Plusieurs études suggèrent que les *N*-glycannes auraient un rôle dans la conformation correcte et la dimérisation des mucines. Les différentes étapes de biosynthèse aboutissant à la polymérisation de la mucine sous-maxillaire porcine ont été récemment décrites [Perez-Vilar *et al.*, 1998]. La dimérisation des apomucines a lieu dès la sortie du réticulum endoplasmique, *via* la partie C-terminale des monomères. Les dimères sont ensuite *N*-glycosylés et passent dans l'appareil de Golgi, où ont lieu les phénomènes de *O*-glycosylation. Des multimères de mucines se forment dans les derniers compartiment golgiens, *via* des ponts disulfure entre les domaines D (analogues aux domaines D du pré-profacteur de von Willebrand) situés dans la

① - Structure schématique d'une mucine



② - Exemples de structures de chaînes glycaniques

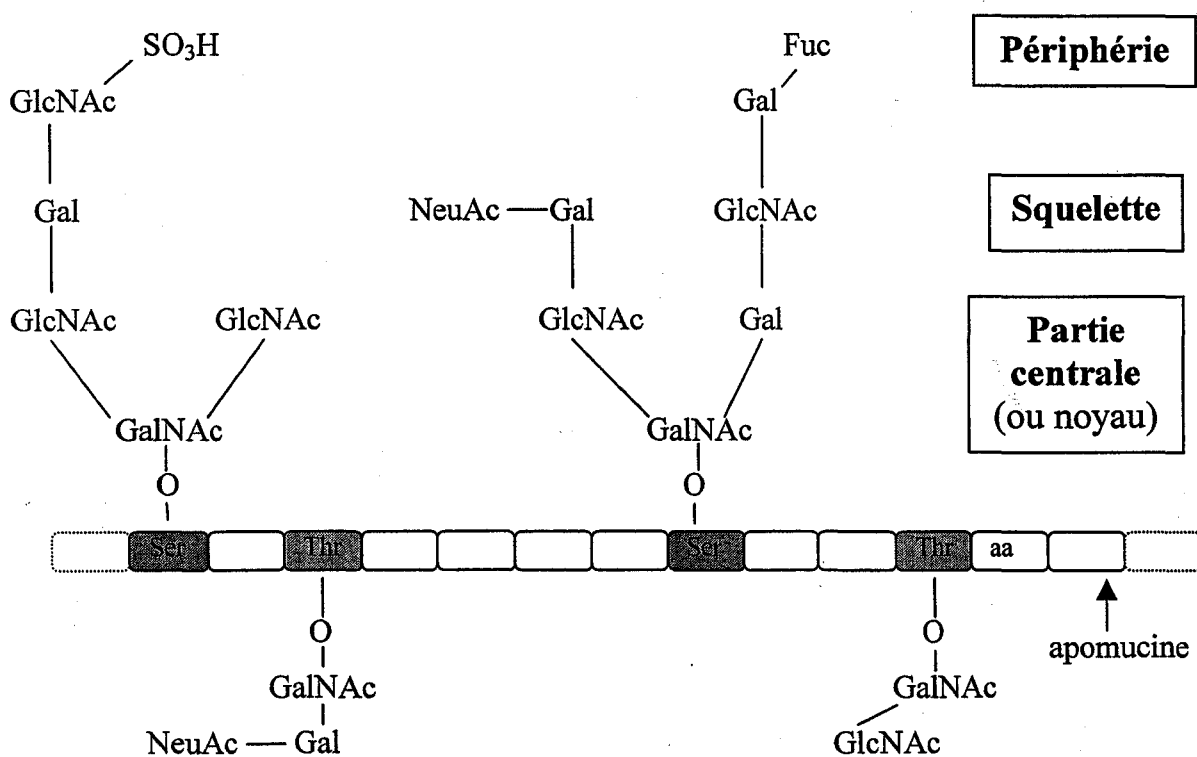


Figure 2 : Représentation schématique d'une mucine respiratoire humaine ① et de chaînes glycaniques liées à l'apomucine par une liaison O-glycosidique entre un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) et un résidu de N-acétylgalactosamine ②.

Abréviations : Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; NeuAc, acide N-acétylneuraminique ; SO₃H, sulfate ; Ser, sérine ; Thr, thréonine ; aa, acide aminé.

partie N-terminale des apomucines. De même, la dimérisation de la mucine humaine MUC2 dans le réticulum endoplasmique est suivie par un transfert dépendant des *N*-glycannes dans l'appareil de Golgi [Asker *et al.*, 1998]. Les *N*-glycannes seraient donc essentiels dans les processus d'oligomérisation des mucines dont les gènes appartiennent au «cluster» localisé en 11p15.5 (*MUC2*, -5*AC*, -5*B* et -6) [van Klinken *et al.*, 1998]. D'autres mucines, comme la mucine gastrique de Rat, semblent suivre le même processus : l'oligomérisation a lieu dans le réticulum endoplasmique ; elle est dépendante des *N*-glycannes et précède la *O*-glycosylation [Dekker & Strous, 1990].

II. Les gènes codant les mucines épithéliales chez l'Homme

Les gènes *MUC* codent les apomucines qui constituent l'axe peptidique des mucines. Depuis 1987, un certain nombre d'ADNc complets ou partiels d'apomucines humaines ont pu être caractérisés à partir de tissus mucipares variés, notamment par l'un des groupes de l'Unité INSERM n° 377. L'étude de leur structure et de leur expression a permis d'identifier huit gènes appelés *MUC* (*MUC1*, -2, -3, -4, -5*AC*, -5*B*, -6 et -7) [Gendler & Spicer, 1995 ; Porchet *et al.*, 1999]. Plus récemment, deux autres gènes, encore mal caractérisés, ont été proposés : *MUC8* et *MUC9* [Shankar *et al.*, 1994, 1997 ; Lapensée *et al.*, 1997] (Tableau I).

Les gènes *MUC* ont des caractéristiques communes :

→ des séquences répétées en tandem

Ils possèdent tous dans leur région codante des répétitions plus ou moins parfaites, en nombre de nucléotides et en séquence, codant des domaines peptidiques plus ou moins semblables mais toujours riches en proline et en acides aminés hydroxylés (sérine, thréonine), sites potentiels de *O*-glycosylation. Quelques rares sites potentiels de *N*-glycosylation ont également été décrits dans les apomucines.

→ des exons de grande taille

Pour les gènes *MUC* dont l'organisation génomique est connue, le domaine peptidique répétitif (en position centrale dans l'apomucine) est codé par un seul exon de grande taille (de 2,2 kb pour *MUC7* à 19 kb pour *MUC4*) [Bobek *et al.*, 1996 ; Nollet *et al.*, 1998].

Tableau I : Les gènes *MUC* : nomenclature, localisation chromosomique, principales caractéristiques (d'après Porchet *et al.*, 1999).

Dénomination	Expression tissulaire majeure	Localisation chromosomique	VNTR	Taille du domaine élémentaire (aa)	Références
<i>MUC1</i> (épisialine)	Glande mammaire, pancréas, ovaire, épithélium bronchique, pancréatique, intestinal...	1q21-24	+	20	Gendler <i>et al.</i> , 1987, 1990
<i>MUC2</i>	Jéjunum, iléon, colon, épithélium bronchique, endocol.	11p15.5	+	23	Gum <i>et al.</i> , 1989
<i>MUC3</i>	Épithélium du jéjunum, de l'iléon, du colon, de la vésicule biliaire.	7q22	+	17	Gum <i>et al.</i> , 1990
<i>MUC4</i>	Bronche (cellules caliciformes, ciliées, et glandes), tractus gastro-intestinal, endocol.	3q29	+	16	Porchet <i>et al.</i> , 1991
<i>MUC5B</i>	Glande bronchique, sous-maxillaire, œsophagienne, pancréas, endocol, vésicule biliaire.	11p15.5	-	Irrégulier 29	Desseyn <i>et al.</i> , 1997
<i>MUC5AC</i>	Épithélium bronchique, trachée, fundus, antrum, endocol.	11p15.5	+	8	Aubert <i>et al.</i> , 1991
<i>MUC6</i>	Estomac, vésicule biliaire, iléon, colon, endocol, pancréas.	11p15.5	+	169	Toribara <i>et al.</i> , 1997
<i>MUC7</i>	Glandes salivaires, bronchiques, prostate, testicule.	4q13-q21	-	23	Bobek <i>et al.</i> , 1993
<i>MUC8</i>	Bronche (glandes sous-muqueuses), appareil génital (testicule, placenta, endocol ...).	12q24.3	?	13 41 (imparfait)	Shankar <i>et al.</i> , 1997
<i>MUC9</i> (oviductine)	Oviducte	1q13	-	15	Lapensée <i>et al.</i> , 1998

→ un polymorphisme de répétition et de mutation

Lorsque le domaine nucléotidique répétitif dépasse quelques kilobases, apparaît un polymorphisme interindividuel de type VNTR (pour *Variable Number of Tandem Repeat*), dû à une instabilité des répétitions au cours des générations. En outre, le domaine répétitif des gènes *MUC* présente un polymorphisme de mutations [Debailleul *et al.*, 1998 ; Vinall *et al.*, 1998].

→ des régions peu glycosylées («nues»)

Les domaines N- et C-terminaux des apomucines sont relativement peu denses en sites de N- ou O-glycosylation. Ces domaines, accessibles à des ligands, des anticorps et à la protéolyse, ont certainement des fonctions biologiques [Xu *et al.*, 1996].

→ ils codent des apoprotéines modulaires

Les mucines sont constituées de la juxtaposition de domaines fonctionnels, certains ayant de fortes similitudes avec des domaines déjà connus : domaines B, C, D et CK (pour *Cystein Knot*, ou «TGFβ like») du pré-profacteur de von Willebrand [Gum *et al.*, 1994], domaines «EGF-like» [Gum *et al.*, 1997]. La **figure 3** représente, par exemple, l'agencement des domaines de l'apomucine MUC2, qui comporte trois domaines D à l'extrémité N-terminale, suivis d'un large domaine de séquences répétées en tandem, d'un quatrième domaine D et d'un domaine CK à l'extrémité C-terminale.

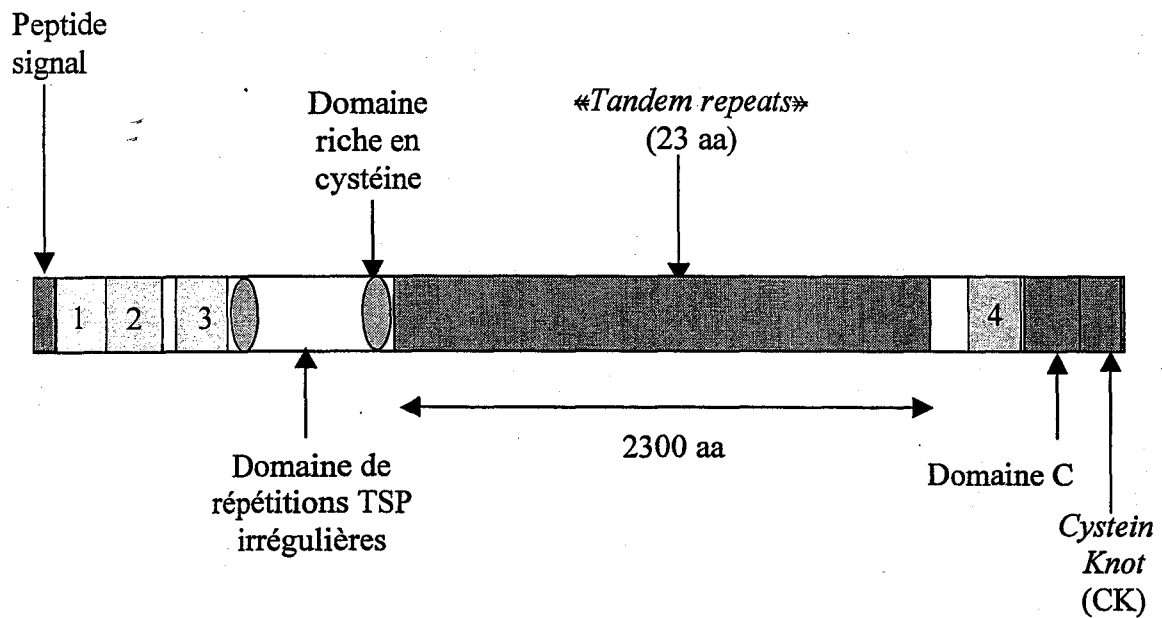
→ une expression dans les cellules épithéliales

Les gènes *MUC* sont exprimés par des cellules épithéliales variées, au niveau des muqueuses, des glandes sous-muqueuses ou exocrines, des épithélia sécrétoires. Un élément fonctionnel peut distinguer les apomucines sécrétées par ces cellules : elles peuvent contenir, ou pas, un domaine transmembranaire et donc être soit membranaires, soit sécrétées. Ce critère permet la subdivision des gènes de mucines en plusieurs sous-familles.

1. Gènes *MUC* localisés en 11p15.5

Les gènes *MUC* localisés en 11p15.5 sont au nombre de quatre : *MUC2*, *-5AC*, *-5B* et *-6* [Gum *et al.*, 1994 ; Guyonnet-Dupérat *et al.*, 1995 ; Dufossé *et al.*, 1993 ; Toribara *et al.*, 1997]. Ces quatre gènes sont rassemblés dans un complexe de 400 kb riche en îlots CpG, situé

MUC2



Pré-propeptide du vWF

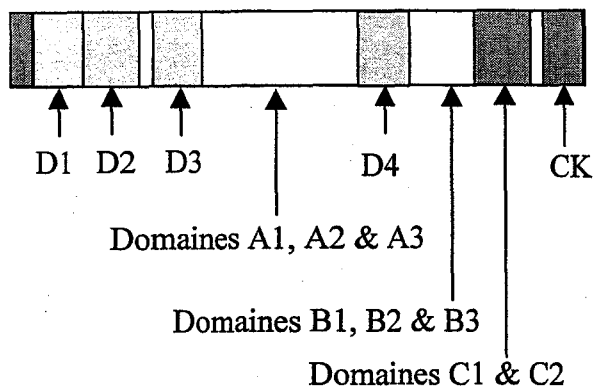


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des domaines de MUC2, similaire à celle du pré-propeptide du facteur de von Willebrand (vWF).

Abréviations : aa, acide aminé ; CK, «Cystein Knot» ; P, proline ; S, sérine ; T, tyrosine ; vWF, facteur de von Willebrand.

entre le proto-oncogène HRAS et l'IGF2 (pour *Insulin-like Growth Factor 2*) [Pigny *et al.*, 1996]. Ils codent de volumineuses apomucines sécrétées, responsables de la formation du mucus dans les organes d'origine endodermique. Ces gènes, exprimés par des cellules mucipares qui synthétisent des grains de mucus, sont adjacents et volumineux : ils proviennent vraisemblablement d'un même gène précurseur ancestral [Desseyn *et al.*, 1998 ; Pigny *et al.*, 1996].

Le profil d'expression de ces gènes est caractéristique de chaque tissu. Ainsi, *MUC2* et *-6* sont des gènes de mucines essentiellement intestinales ; *MUC5B* est présent dans les glandes salivaires, bronchiques et œsophagiennes. Quant au transcrit de *MUC5AC*, il est présent dans les épithélia de la trachée, de la bronche et de l'estomac [Audié *et al.*, 1993].

La séquence protéique N-terminale de la mucine *MUC2* contient un élément répétitif d'environ 350 acides aminés (aa), ayant de fortes similarités avec les domaines D du pré-profacteur de von Willebrand. L'agencement des domaines D, au nombre de quatre, est similaire entre *MUC2* et le pré-profacteur de von Willebrand (trois sont situés à l'extrémité N-terminale, et un à l'extrémité C-terminale) [Gum *et al.*, 1994]. Ces régions, impliquées dans la dimérisation du pré-profacteur de von Willebrand, pourraient également l'être dans la polymérisation de *MUC2* et dans son «empaquetage» dans des vacuoles de sécrétion. *MUC2* possède également un domaine CK en son extrémité C-terminale.

MUC5AC et *-5B* possèdent une organisation similaire : trois domaines D à l'extrémité N-terminale, un domaine D et un domaine CK (pour *MUC5B*) à l'extrémité C-terminale, la partie centrale étant composée de domaines riches en cystéine et de séquences répétitives riches en acides aminés hydroxylés [Desseyn *et al.*, 1997].

D'autre part, des séquences kappaB, sites de fixation du facteur nucléaire NF-kappaB, ont été décrites dans le promoteur des gènes *MUC2* et *-5AC* [Li *et al.*, 1998a, 1998b]. Ces séquences pourraient avoir un rôle dans l'induction de l'expression de ces gènes par différents facteurs, comme les produits bactériens.

2. Gènes *MUC* codant des mucines membranaires

MUC1, *-3* et *-4* codent des isoformes d'apomucines membranaires, sécrétées ou solubles [Gendler *et al.*, 1990 ; Gum *et al.*, 1990 ; Porchet *et al.*, 1991].

→ La mucine MUC1 (ou épisialine) est exprimée dans la plupart des épithélia délimitant les canaux et glandes exocrines, ainsi que dans certains épithélia de surface. MUC1 est généralement ancrée dans la région apicale, mais peut aussi exister sous forme soluble. Cette mucine existe sous de nombreux variants peptidiques et sous de multiples glycoformes, selon le tissu et l'état physiologique. C'est un marqueur de carcinome, et, du fait de ses propriétés d'anti-adhérence, elle favoriserait la progression tumorale et la métastase [Yonezawa & Sato, 1997].

→ La mucine MUC4 est une volumineuse mucine membranaire (4 500 à 8 500 aa), d'expression tissulaire large, et également un marqueur de nombreux carcinomes. *MUC4* est majoritairement exprimé dans l'épithélium respiratoire et dans le tractus intestinal [Audié *et al.*, 1993]. La séquence complète de l'ADNc et l'organisation des domaines de *MUC4* ont récemment été déterminées par Nollet *et al.* [1998] et Moniaux *et al.* [1999]. MUC4 a une structure modulaire composée de deux domaines : l'un de type mucine (MUC4 α), l'autre (MUC4 β) contenant deux domaines «EGF-like», un domaine hydrophobe potentiellement transmembranaire, et une queue intracytoplasmique. MUC4 serait l'analogue humain de la sialomucine de Rat SMC [Moniaux *et al.*, 1999].

→ La mucine MUC3 est encore mal connue (du fait de son volumineux ADNc) : son gène contiendrait au moins trois très grands domaines répétitifs, ainsi qu'un domaine «EGF-like» dans la partie C-terminale [Gum *et al.*, 1997]. Du fait de sa taille, de son terrain d'expression, *MUC3* semble apparenté à *MUC4* (qui contient deux domaines «EGF-like»).

3. Autres gènes MUC

Dans ce groupe sont rassemblés les gènes *MUC* pour lesquels il n'existe pas, ou pas encore, d'élément permettant une classification structurale ou fonctionnelle.

→ MUC7 est une petite mucine soluble (225 000 Da) sécrétée par les cellules séreuses salivaires et bronchiques [Bobek *et al.*, 1993]. C'est une molécule d'adhérence privilégiée pour les souches de streptocoques ; elle aurait donc un rôle dans la modulation de la clairance bactérienne au niveau de la cavité orale [Jenkinson & Lamont, 1997].

→ Les informations très partielles concernant *MUC8* (appareil respiratoire et génital) et *MUC9* (oviducte) ne permettent pas de les intégrer dans la classification [Shankar *et al.*, 1994, 1995 ; Lapensée *et al.*, 1997]. *MUC8* contiendrait un domaine répétitif de 41 nucléotides.

III. La glycosylation des mucines

Les chaînes glycaniques de mucines sont presque toutes liées à l'axe peptidique par une liaison *O*-glycosidique entre un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) et un résidu de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc). Néanmoins, quelques rares *N*-glycannes peuvent également être trouvés au niveau des mucines.

1. Chaînes *O*-glycaniques

La taille et la complexité des chaînes *O*-glycaniques varient d'une mucine à l'autre. La plus simple semble être la mucine sous-maxillaire ovine qui ne comprend, sur ses acides aminés hydroxylés, qu'un seul résidu de GalNAc (ce qui correspond à l'antigène Tn : GalNAc- α -Ser/Thr), pouvant être substitué par un résidu d'acide sialique (ou acide *N*-acétylneuraminique (NeuAc)) [Graham & Gottschalk, 1960]. On a longtemps pensé que la mucine sous-maxillaire bovine ne comportait que des chaînes glycaniques très simples contenant des résidus de GalNAc et du galactose (Gal) (sous forme d'antigène Tn et d'antigène T : Gal(β 1-3)GalNAc- α -Ser/Thr, éventuellement substitués par un résidu d'acide sialique), mais des structures plus complexes contenant jusqu'à huit sucres, dont la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et le fucose (Fuc), ont été mises en évidence plus récemment [Savage *et al.*, 1991 ; Chai *et al.*, 1992a, 1992b].

Le développement des techniques de chromatographie liquide haute performance (HPLC) et de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN) a permis la résolution de nombreuses structures d'oligosaccharides présentes dans les mucines bronchiques humaines, et a montré que ces structures glycaniques pouvaient être très complexes et très hétérogènes [Lo-Guidice *et al.*, 1994 ; Klein *et al.*, 1991].

Puisqu'il est très difficile d'obtenir du mucus bronchique «normal», qui est continuellement dégluti, les structures d'oligosaccharides ont été déterminées à partir de

mucines provenant d'expectorations de patients souffrant d'hypersécrétion bronchique (bronchite chronique, bronchiectasie, mucoviscidose).

De nombreux sucres peuvent entrer dans la composition des chaînes glycaniques de mucines bronchiques : Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc, NeuAc. Des groupements sulfate peuvent également exister en périphérie. Dans la structure des *O*-glycannes de mucines, on distingue trois parties qui correspondent aux différentes étapes du processus de *O*-glycosylation qui se déroulent dans les différents saccules golgiens et dans le réseau transgolgien : le noyau (initiation), le squelette (élongation), et la périphérie (fin de synthèse des glycannes), [Hounsell & Feizi, 1982] (**Figure 2**).

Le seul élément commun à tous les *O*-glycannes est le résidu de GalNAc lié à un acide aminé hydroxylé de l'apomucine. Cette étape d'initiation de la glycosylation est beaucoup plus complexe que ce qui avait été imaginé auparavant, et il est clair aujourd'hui qu'une famille entière d'UDP-GalNAc:polypeptide-*N*-acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAc-transférases) soit impliquée dans cette étape [Hagen *et al.*, 1997] ; six enzymes d'origine humaine de cette famille ont été clonés [Bennett *et al.*, 1998a, 1998b, 1999]. Ces enzymes diffèrent par leurs expressions et/ou leurs spécificités de substrat.

1.1 Parties centrales ou «noyaux» ou «cores»

Le noyau comprend le résidu de GalNAc lié à l'axe peptidique par une liaison *O*-glycosidique, ainsi que le (ou les) sucre(s) lié(s) sur ce résidu de GalNAc. Huit structures différentes ont été déterminées jusqu'à présent (**Figure 4**).

Cinq d'entre elles (*cores* 1, 2, 3, 4 et 8) peuvent se trouver dans les mucines bronchiques humaines. Les *cores* 1, 2, 3, et 4 impliquent la liaison en β d'un résidu de Gal et/ou de GlcNAc sur le résidu de GalNAc du point d'attache [Lamblin *et al.*, 1991]. Le *core* 8, décrit en 1994 dans les mucines bronchiques humaines, est constitué d'un résidu de Gal lié en α sur le résidu de GalNAc du point d'attache [van Halbeek *et al.*, 1994].

Les *cores* 5 et 6, comprenant respectivement un résidu de GalNAc ou de GlcNAc lié au résidu de GalNAc, ont été caractérisés dans les mucines de kyste ovarien humain [Schachter & Brockhausen, 1992] et le méconium [Hounsell *et al.*, 1985]. Le *core* 7 a été mis en évidence dans la mucine sous-maxillaire bovine [Chai *et al.*, 1992a].

L'enzyme responsable de la biosynthèse du *core* 1, la «*core* 1 β 1-3-Gal-transférase», n'est pas encore cloné, ni même complètement purifié.

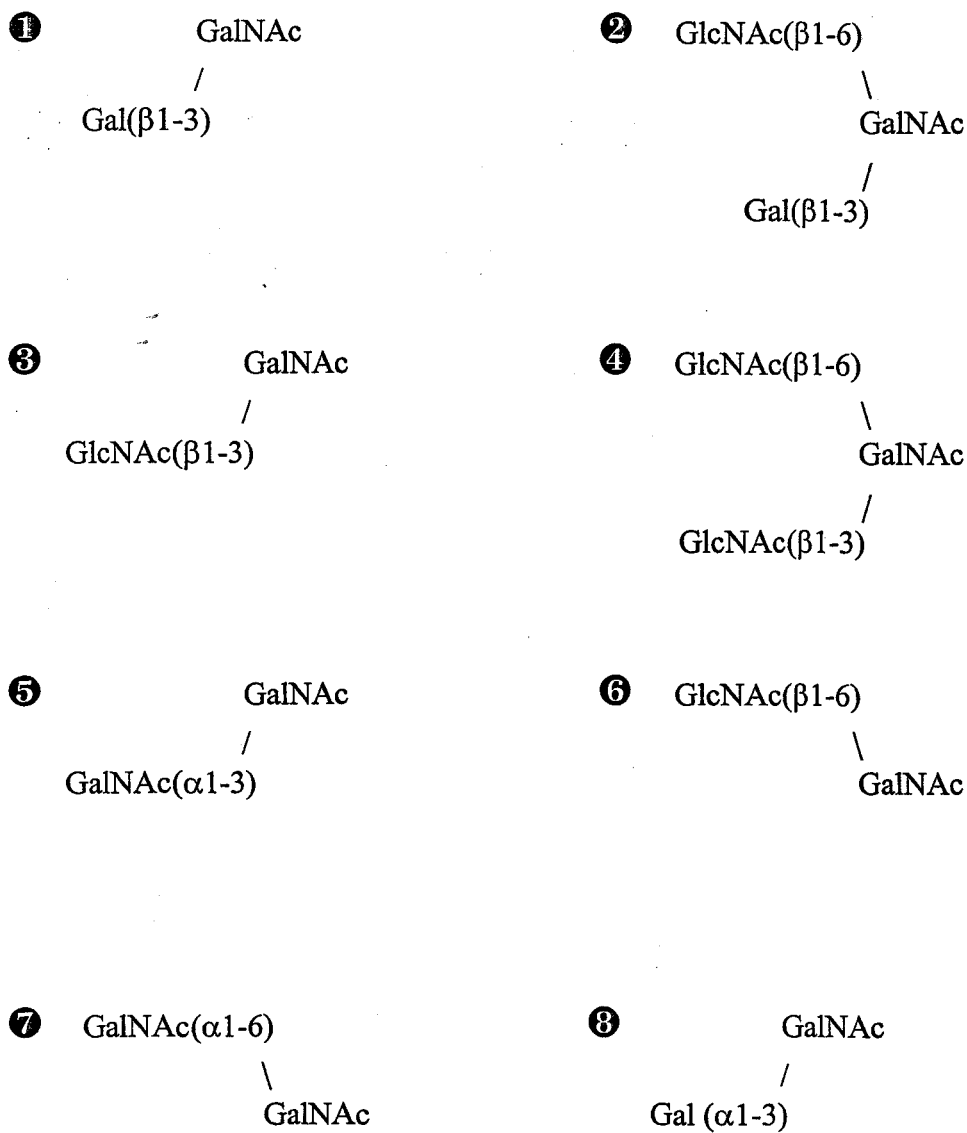


Figure 4 : Partie centrale (ou noyau ou *core*) des chaînes glycaniques de mucines.

① ② ③ ④ d'après Lamblin *et al.*, 1991.

⑤ ⑥ d'après Schachter & Brockhausen, 1992, et Hounsell *et al.*, 1985.

⑦ d'après Chai *et al.*, 1992a.

⑧ d'après van Halbeek *et al.*, 1994.

Abréviations : Gal, galactose ; GalNAc, *N*-acétylgalactosamine ; GlcNAc, *N*-acétylglucosamine.

Deux enzymes capables de synthétiser le *core* 2 («*core* 2 β 1-6-GlcNAc-transférase») à partir du *core* 1, ont été clonés ; l'enzyme de type L ne synthétise que le *core* 2, et est localisé majoritairement au niveau des leucocytes [Bierhuizen & Fukuda, 1992] ; l'enzyme de type M (pour mucine) a récemment été cloné par deux équipes, qui ont déterminé une localisation chromosomique de cet enzyme pratiquement identique (15q22 et 15q21.3) [Yeh *et al.*, 1999 ; Schwientek *et al.*, 1999] mais des spécificités de substrat légèrement différentes. Pour Yeh *et al.*, en plus de sa capacité à synthétiser le *core* 2, cet enzyme peut intervenir dans la biosynthèse du *core* 4 (en greffant un résidu de GlcNAc en (β 1-6) à partir du *core* 3) et également dans celle de l'antigène I (cf. § 1.2). Pour la seconde équipe, cet enzyme interviendrait dans la biosynthèse des *cores* 2 et 4, mais pas dans celle de l'antigène I (**Tableau II**).

Les enzymes synthétisant les *cores* 3 (β 1-3-GlcNAc-transférase), 5 (α 1-3-GalNAc-transférase), 6 (β 1-6-GlcNAc-transférase), 7 (α 1-6-GalNAc-transférase) et 8 (α 1-3-Gal-transférase) ne sont pas encore caractérisés.

1.2 Squelettes

Le squelette est constitué de l'enchaînement, linéaire ou branché, d'unités disaccharidiques de type 1 (Gal(β 1-3)GlcNAc) ou de type 2 (Gal(β 1-4)GlcNAc), antigéniquement distinctes [Kabat, 1982] (**Figure 5**). La grande variété des squelettes est due à la variabilité de leur longueur, ainsi qu'à leur degré de branchement [Hounsell & Feizi, 1982].

Parmi les squelettes possibles, l'antigène i correspond à l'enchaînement linéaire d'unités disaccharidiques de type 2 liées en (β 1-3). L'antigène I, quant à lui, correspond à une structure branchée constituée de chaînes de type 2, associées par une liaison (β 1-6) et une liaison (β 1-3) entre les deux résidus de GlcNAc et le même résidu de Gal (**Figure 5**).

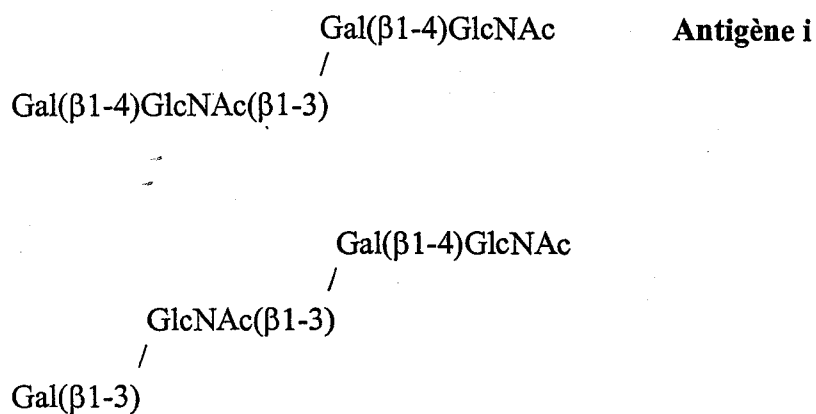
Au niveau des oligosaccharides de mucines bronchiques humaines, les liaisons de type Gal(β 1-4)GlcNAc prédominent.

Tableau II : Les β 1-3- et β 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférases humaines clonées, susceptibles de synthétiser les noyaux et les squelettes des chaînes glycaniques de mucines.

Ne figurent pas dans ce tableau les β -N-acétylglucosaminyltransférases spécifiques de la biosynthèse des N-glycannes.

Enzyme	Localisation chromosomique	N° d'accès GenBank	Spécificité de substrat	Expression	Référence
(β1-3)-<i>N</i>-acétylglucosaminyltransférases					
β 3GnT	?	AF092051	Synthèse de poly- <i>N</i> -acétyl-lactosamines	Ubiquitaire	Zhou <i>et al.</i> , 1999
iGnT	?	AF029893	Synthèse de l'antigène i	Cœur, cerveau muscle, rein pancréas...	Sasaki <i>et al.</i> , 1997
(β1-6)-<i>N</i>-acétylglucosaminyltransférases					
C2GnTL	9q21	M97347	Synthèse du core 2	Moëlle osseuse, nodules lymphatiques.	Bierhuizen & Fukuda, 1992
C2GnTM	15q22	AF102542	Synthèse des cores 2 & 4 et antigène I	Colon, trachée, intestin, estomac.	Yeh <i>et al.</i> , 1999
C2GnT	15q21.3	AF038650	Synthèse des cores 2 & 4 mais pas de l'antigène I	Colon, rein, pancréas, intestin grêle.	Schwientek <i>et al.</i> , 1999
IGnT	9q21	L19659	Synthèse de l'antigène I	?	Bierhuizen <i>et al.</i> , 1993
Gène <i>LARGE</i> (GnT)	22q12.3	AJ007583	?	?	Peyrard <i>et al.</i> , 1999

☛ Structures linéaires



☛ Structures branchées

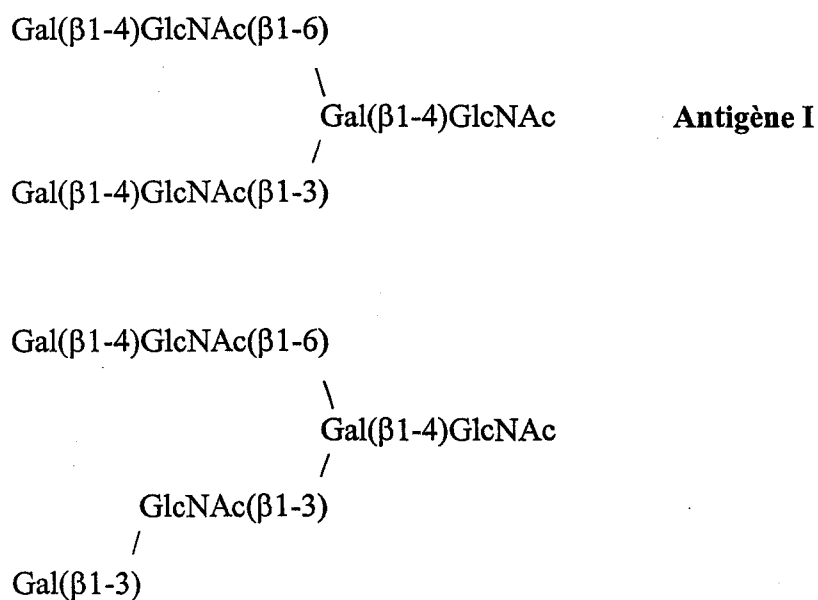


Figure 5 : Exemples de squelettes de chaînes glycaniques de mucines.

Abréviations : Gal, galactose ; GlcNAc, *N*-acétylglucosamine.

De nombreuses β 1-3- et β 1-4-galactosyltransférases humaines ont été clonées et sont décrites dans le **tableau III**. En plus des galactosyltransférases, le processus d'élongation des O-glycannes implique également différentes β 1-3- et β 1-6-N-acétylglucosaminyltransférases (**Tableau II**). Deux β 1-3-N-acétylglucosaminyltransférases humaines sont clonées : l'une (iGnT) est impliquée dans la biosynthèse de l'antigène i (**Figure 5**) [Sasaki *et al.*, 1997] ; la seconde intervient également dans les processus d'élongation des chaînes poly-N-acétyllactosaminiques [Zhou *et al.*, 1999]. Dans la famille des β 1-6-N-acétylglucosaminyltransférases humaines, l'enzyme synthétisant l'antigène I est cloné [Bierhuizen *et al.*, 1993]. Une autre N-acétylglucosaminyltransférase, codée par le gène *LARGE*, a également été caractérisée [Peyrard *et al.*, 1999].

1.3 Régions périphériques

1.3.1 Antigènes tissulaires A, B, H et Lewis

Les régions périphériques des mucines peuvent porter de nombreux déterminants antigéniques. Les produits directs des gènes de groupes tissulaires ABO, H, Sécréteur et Lewis sont des glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des déterminants glucidiques périphériques des mucines [Kabat, 1982]. Les gènes correspondant à ces glycosyltransférases ont été caractérisés. Le système ABO, localisé en 9q34-34.2, code des glycosyltransférases alléliques responsables du phénotype ABO. L'allèle A code une α 1-3-N-acétylgalactosaminyltransférase, responsable de la synthèse des antigènes de groupe A. L'allèle B code une α 1-3-galactosyltransférase, responsable de la synthèse des antigènes de groupe B, et ne diffère de l'enzyme de groupe A que par la nature de quatre acides aminés, ce qui suffit à modifier la spécificité de substrat de l'enzyme. Le produit le plus fréquent de l'allèle O code une protéine tronquée et inactive de 116 acides aminés [Yamamoto *et al.*, 1990].

L'enzyme FucT-II (ou enzyme sécréteur, Se) est une α 1-2-fucosyltransférase capable de transférer un résidu de Fuc à partir du donneur, le GDP-Fuc, sur le résidu de Gal terminal d'une unité de type 1 ou de type 2, conduisant à la synthèse d'épitopes H type 1 ou 2 [Kelly *et al.*, 1995] (**Figures 6 et 7**). Cette α 1-2-fucosyltransférase n'est pas exprimée dans la lignée

Tableau III : Les β 1-3- et β 1-4-galactosyltransférases humaines clonées.

Enzyme	Localisation chromosomique	N° d'accès GenBank	Spécificité de substrat	Terrain majoritaire d'expression	Référence
UDP-Gal:βGlcNAc-β1-3-galactosyltransférases					
β3-GalT1	?	E07739	O- et N-glycannes, glycosphingolipides (série lacto)	Cerveau	Sasaki <i>et al.</i> , 1994c
β3-GalT2	1q31	Y15060	Proche de celle de β3-GalT1	Cœur, cerveau.	Amado <i>et al.</i> , 1998
β3-GalT3	3q25	Y15061	?	Cœur, rein, cerveau, pancréas	
β3-GalT4	6p21.3	Y15062	GM2 et GG3 (Synthèse de GM1/GD1)	Cœur, muscle, foie, pancréas, placenta.	
β3-GalT5	21q22.3	AB020337	Synthèse des antigènes Lewis de type 1	Estomac, colon, jéjunum, pancréas	Isshiki <i>et al.</i> , 1999
UDP-Gal:βGlcNAc-β1-4-galactosyltransférases					
β4-GalT1	9p21	X14085	Glycoprotéines et glycolipides (élongation des chaînes poly-N-acétyllactosaminiques)	Partout sauf dans le cerveau	Masri <i>et al.</i> , 1988
β4-GalT2	1p32-p33	Y12510	Proche de celle de β4-GalT1	Muscle, cœur, ovaire, prostate pancréas, testicule, intestin	Almeida <i>et al.</i> , 1997
β4-GalT3	1q23	Y12509	Glycoprotéines et glycolipides (première unité N-acétyl-lactosaminique)	Ubiquitaire	
β4-GalT4	3q13	AF038662	Glycosphingolipides	Cœur, rein, pancréas.	Lo <i>et al.</i> , 1998
β4-GalT5	11	AF038663	Surtout sur GlcNAc(β1-6)GalNAc (cores 2, 4, et 6)	Cœur, cerveau, rein, placenta, muscle, pancréas.	
β4-GalT6	18q11	AF038664	?	Cerveau	

Unité disaccharidique de type 1

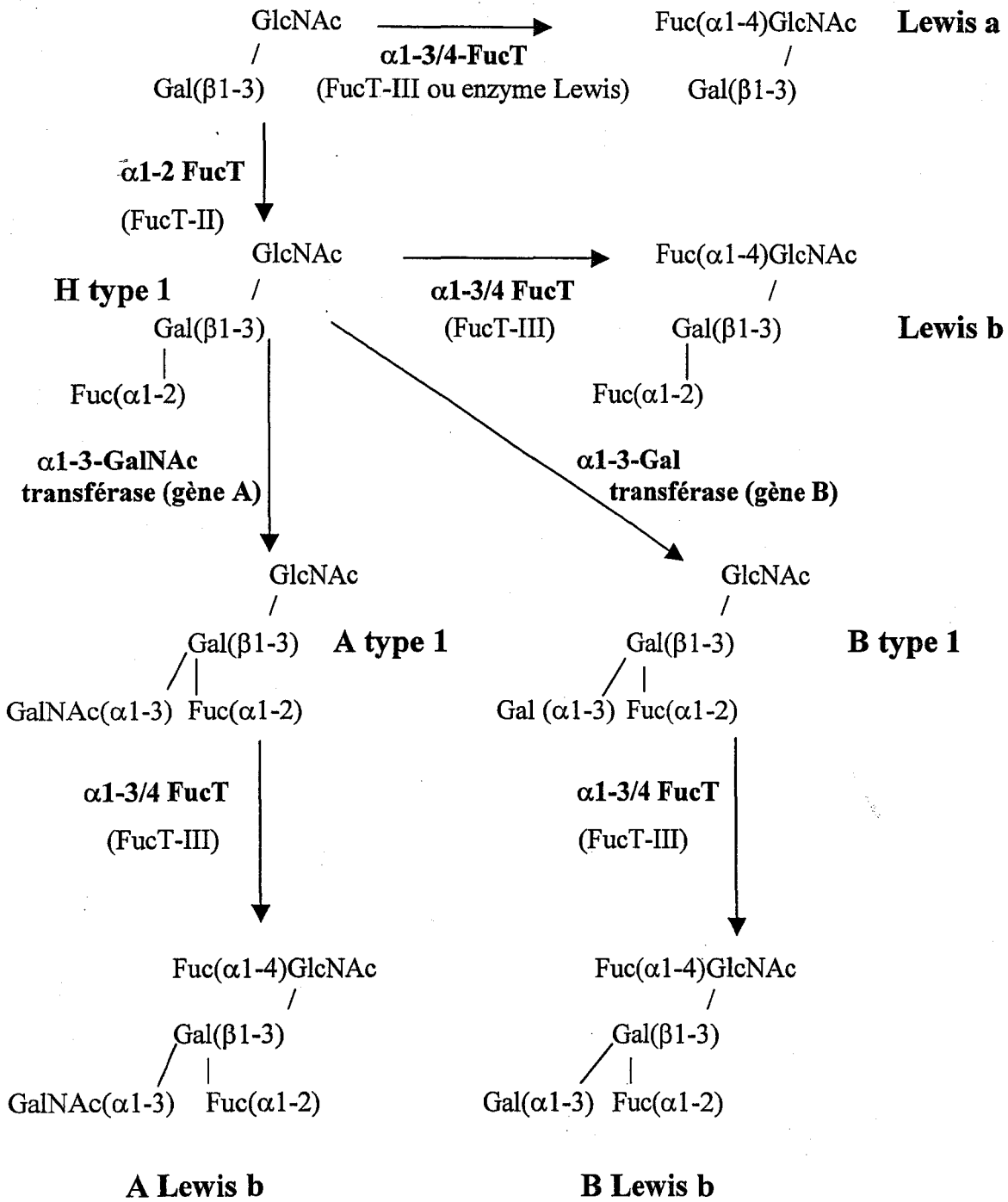


Figure 6 : Déterminants glycaniques présents dans les régions périphériques des mucines résultant de la fucosylation et de la substitution par les enzymes de groupes tissulaires A et B, en différentes positions, d'une unité disaccharidique de type 1 (Gal(β1-3)GlcNAc).

Abréviations : FucT, fucosyltransférase ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine.

Unité disaccharidique de type 2

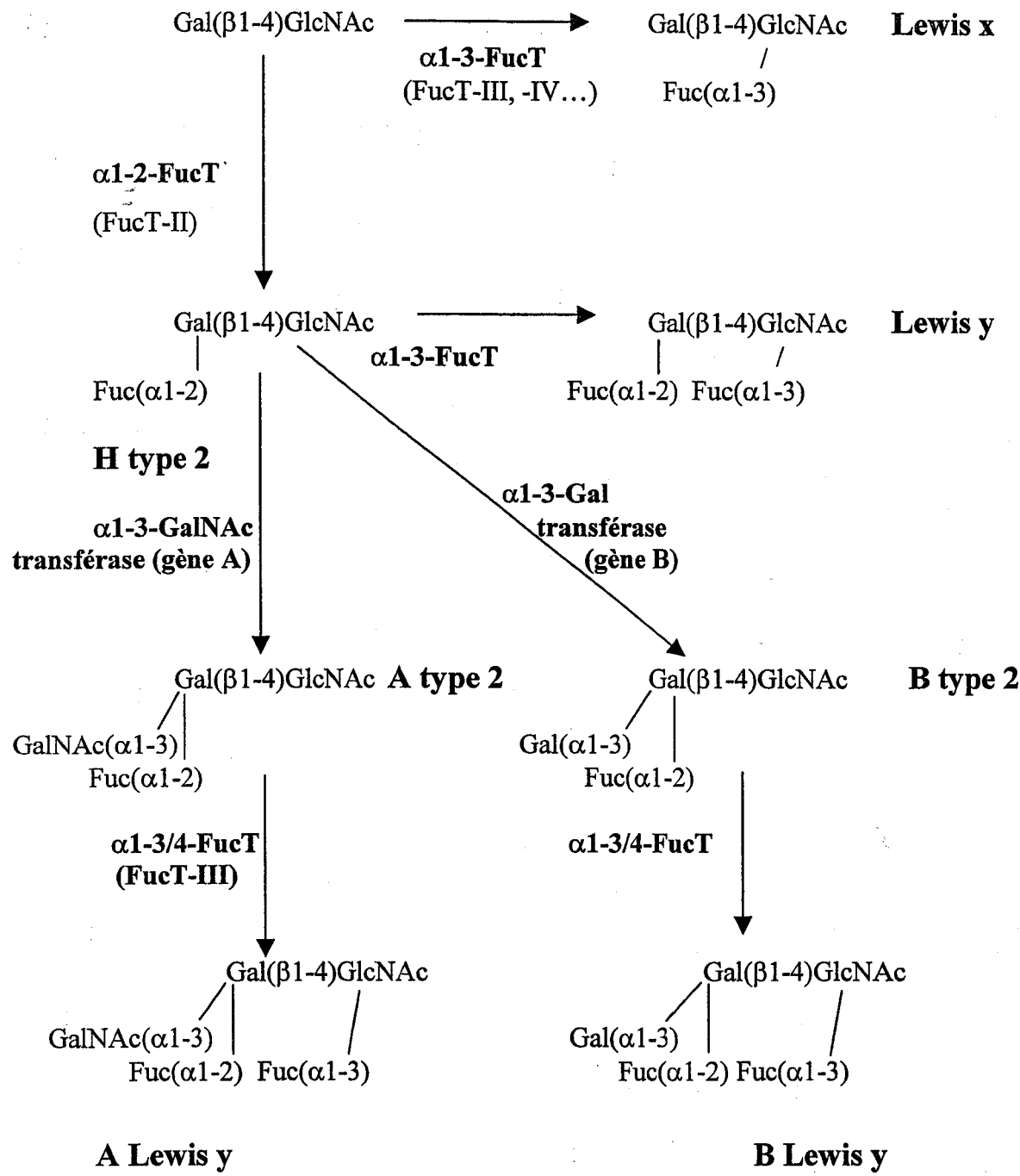


Figure 7 : Déterminants glycanniques présents dans les régions périphériques des mucines résultant de la fucosylation et de la substitution des enzymes de groupes tissulaires A et B, dans différentes positions d'une unité disaccharidique de type 2 (Gal(β1-4)GlcNAc).

Abréviations : FucT, fucosyltransférase ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNac, N-acétylgalactosamine.

érythrocytaire (contrairement à FucT-I) mais est bien exprimée dans les muqueuses. Si un sujet possède le gène *FUT2*, les antigènes de groupes tissulaires seront présents dans les sécrétions exocrines et en particulier sur les mucines (A, B, ou H).

Si l' α 1-3-*N*-acétylgalactosaminyltransférase (enzyme de groupe A) ou l' α 1-3-galactosyltransférase (enzyme de groupe B) sont présentes, elles vont pouvoir agir sur les précurseurs H type 1 ou 2 et permettent la biosynthèse d'épitopes A type 1 ou 2, et B type 1 ou 2 (**Figures 6 et 7**).

Une autre activité α 1-2-fucosyltransférase (FucT-I ou enzyme H) a été clonée [Larsen *et al.*, 1990]. Cet enzyme est capable, *in vitro*, de transférer un résidu de Fuc sur un résidu de Gal terminal d'une unité disaccharidique de type 1 ou 2. Au niveau des érythrocytes, FucT-I agit exclusivement sur des disaccharides de type 1 et est responsable de l'expression des activités de groupe sanguin dans ces cellules.

L'enzyme Lewis (FucT-III) est une α 1-3/4-fucosyltransférase pouvant transférer un résidu de Fuc sur le résidu de GlcNAc interne d'une unité de type 1 ou de type 2 (les chaînes de type 1 étant de meilleurs substrats), conduisant respectivement à la biosynthèse d'un déterminant Lewis a (Le^a) ou Lewis x (Le^x) [Kukowska-Latallo *et al.*, 1990]. Cet enzyme peut également agir sur des déterminants H type 1 ou 2, générant respectivement un épitope Lewis b (Le^b) ou Lewis y (Le^y) (**Figures 6 et 7**). Cette transférase est également active sur des déterminants A type 1 ou 2, ou B type 1 ou 2, conduisant alors respectivement à des structures A Le^b ou Le^y , ou B Le^b ou Le^y (**Figures 6 et 7**).

Outre FucT-III, cinq α 1-3-fucosyltransférases humaines (FucT-IV à -VII, et FucT-IX) ont été clonées (**Tableau IV**). Elles ont des spécificités de substrat très proches et sont toutes capables (sauf FucT-VII) de fucosyler un disaccharide de type 2, conduisant à un épitope Le^x . De plus, les unités de type 2 portant un résidu de NeuAc en (α 2-3) sont de bons substrats pour toutes les α 1-3-fucosyltransférases (conduisant à la synthèse d'un épitope sialyl Le^x), sauf pour FucT-IV et FucT-IX.

L'étude de l'expression de ces différents enzymes par des cellules bronchiques humaines en culture secondaire a montré que seules FucT-III et -IV sont exprimées dans ce modèle [Emery *et al.*, 1997]. FucT-V, -VI et -VII ne sont pas du tout exprimées dans ces

Tableau IV : Les différents fucosyltransférases humaines clonées et leur spécificité d'action.

Gène (N° accès GenBank)	Liaison créée	Chromo- some	Expression tissulaire	Oligosaccharide accepteur	Références
<i>FUT1</i> (M35531)	$\alpha 1-2$	19q13.3	Lignée érythroïde et autres tissus.	Type 1 (Gal($\beta 1-3$)GlcNAc) → H1 (Fuc($\alpha 1-2$)Gal($\beta 1-3$)GlcNAc). Type 2 (Gal($\beta 1-4$)GlcNAc) → H2 (Fuc($\alpha 1-2$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc).	Larsen <i>et al.</i> , 1990
<i>FUT2</i> (U17894)	$\alpha 1-2$	19q13.3	Tissus muco-sécréteurs : glandes salivaires, poumon, intestin.	Surtout type 1, mais aussi type 2.	Kelly <i>et al.</i> , 1995
<i>FUT3</i> (X53578)	$\alpha 1-3/4$	19p13.3	Colon, intestin, estomac, poumon, foie, vésicule biliaire.	Surtout type 1 (→ Le ^a), type 1 sialylé (→ sLe ^a), et H1 (→ Le ^b) mais aussi sur type 2 (→ Le ^x), type 2 sialylé (→ sLe ^x), et H2 (→ Le ^y).	Kukowska- Latallo <i>et al.</i> , 1990
<i>FUT4</i> (M65030)	$\alpha 1-3$	11q21	Lignée myéloïde.	Sur type 2 (→ Le ^x) mais pratiquement pas sur type 2 sialylé. Fucosylation interne des chaînes poly-N-acétyllactosaminiques.	Lowe <i>et al.</i> , 1991 Niemela <i>et al.</i> , 1998
<i>FUT5</i> (M81485)	$\alpha 1-3$	19p13.3	Foie, colon, testicule.	Sur type 2 (→ Le ^x), type 2 sialylé (→ sLe ^x), et H2 (→ Le ^y).	Weston <i>et al.</i> , 1992a
<i>FUT6</i> (L01698)	$\alpha 1-3$	19p13.3	Foie, rein, intestin, glandes salivaires.	Sur type 2 (→ Le ^x), type 2 sialylé (→ sLe ^x), mais pas sur H2.	Weston <i>et al.</i> , 1992b
<i>FUT7</i> (X78031)	$\alpha 1-3$	9q34.3	Leucocytes.	Type 2 nécessairement sialylé (→ sLe ^x).	Sasaki <i>et al.</i> , 1994a
<i>FUT8</i> (Y17979)	$\alpha 1-6$	14q23	?	Résidu de GlcNAc lié à l'asparagine du point d'attache des N-glycannes.	Yanagidani <i>et al.</i> , 1997
<i>FUT9</i> (AB023021)	$\alpha 1-3$	?	?	Sur type 2 (→ Le ^x).	Kaneko <i>et al.</i> , 1999

Abréviations : Le, Lewis ; sLe, sialyl Lewis ; type 1, Gal($\beta 1-3$)GlcNAc ; type 2, Gal($\beta 1-4$)GlcNAc ; H1, Fuc($\alpha 1-2$)Gal($\beta 1-3$)GlcNAc ; H2, Fuc($\alpha 1-2$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc.

Spécificités de substrat d'après Mollicone *et al.*, 1992 ; 1995.

cellules [Emery, résultats non publiés]. Les fucosyltransférases éventuellement impliquées dans l' α 1-3/4-fucosylation des chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines pourraient donc être FucT-III et -IV, ou d'autres fucosyltransférases encore non identifiées.

Une α 1-6-fucosyltransférase humaine, nommée FucT-VIII, a été clonée à partir d'une lignée gastrique [Yanagidani *et al.*, 1997]. Cet enzyme est capable de transférer un résidu de Fuc sur le résidu de GlcNAc lié à l'asparagine du point d'attache des *N*-glycannes. Plus récemment encore, le gène *FUT9* humain, fortement similaire au gène *FUT9* murin, a été cloné [Kaneko *et al.*, 1999]. Ce gène code un enzyme qui serait impliqué dans la biosynthèse des déterminants glycaniques Le^x.

1.3.2 Sialylation des chaînes glycaniques de mucines bronchiques

Les sialyltransférases sont des enzymes capables de transférer un résidu de NeuAc à partir du donneur, le CMP-NeuAc (cytidine 5'-monophosphate-acide *N*-acétylneuraminique) sur un sucre accepteur en position terminale non réductrice.

Dans les mucines bronchiques, deux types de liaison, (α 2-3) ou (α 2-6), peuvent exister entre un résidu de NeuAc et un résidu de Gal ou de GalNAc. Il n'existe pas de liaison NeuAc(α 2-8) dans les mucines bronchiques.

Les structures sialylées les plus simples comportent une liaison (α 2-6) entre un résidu de NeuAc et le résidu de GalNAc lié à un acide aminé hydroxylé de l'apomucine [van Halbeek *et al.*, 1988].

Des oligosaccharides, possédant un *core* 1 ou 3 (éventuellement allongé par d'autres sucres) peuvent également être sialylés en (α 2-6) sur le résidu de GalNAc du point d'attache [van Halbeek *et al.*, 1988 ; Breg *et al.*, 1987].

Quelques rares structures avec un résidu de NeuAc en (α 2-6) sur le résidu de Gal d'une unité disaccharidique de type 2 ont été décrites dans les mucines bronchiques [Breg *et al.*, 1987 ; Lo-Guidice *et al.*, 1994].

L' α 2-3-sialylation est majoritaire dans les chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines. Le résidu de Gal des *cores* 1 ou 3 (lié en (α 1-3) sur le résidu de GalNAc) peut porter un résidu de NeuAc lié en (α 2-3) [Breg *et al.*, 1987]. En outre, parmi les

chaînes glycaniques dont les structures ont été déterminées, nombreuses sont celles qui contiennent un résidu de NeuAc en (α 2-3) sur une unité terminale de type 2 [Lamblin *et al.*, 1984 ; Lo-Guidice *et al.*, 1994].

Une α 2-6-sialyltransférase (ST6Gal-I) et six α 2-3-sialyltransférases (ST3Gal-I, -II, -III, -IV, -V et -VI) humaines ont été clonées (**Tableau V**). ST3Gal-I, -II agissent uniquement sur des unités de type Gal(β 1-3)GalNAc. Les enzymes ST3Gal-III, -IV et -VI sont actives sur des substrats de type Gal(β 1-3/4)GlcNAc et peuvent donc intervenir dans la biosynthèse de déterminants glycaniques de type sialyl Le^x et sialyl Le^a. La séquence de biosynthèse de ces derniers épitopes est très stricte : les α 2-3-sialyltransférases sont inactives sur les structures terminales Le^x et Le^a, alors que les α 1-3/4-fucosyltransférases sont, en général, actives sur des structures terminales NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3/4)GlcNAc (**Tableau IV** et **Figure 8**).

De nombreuses α 2-8-sialyltransférases humaines ont également été clonées (**Tableau V**). Ces enzymes ne participent pas à la biosynthèse des chaînes glycaniques de mucines, qui ne contiennent jamais de résidu de NeuAc lié en (α 2-8).

1.3.3 Sulfatation des chaînes glycaniques de mucines bronchiques

Les sulfotransférases sont des enzymes capables de transférer un groupement sulfate à partir de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (ou PAPS, donneur universel de sulfate), sur un accepteur (sucre, acide aminé,...).

La détermination de structures d'oligosaccharides acides de mucines bronchiques humaines a montré que la sulfatation pourrait se produire soit sur le C3, le C4 ou le C6 d'un résidu de Gal terminal (ou interne dans le cas de la sulfatation sur le C6), soit sur le C6 d'un résidu de GlcNAc [Lo-Guidice *et al.*, 1994, 1997 ; Mawhinney *et al.*, 1992a, 1992b].

Pour démontrer la présence de groupements sulfate sur le C4 ou le C6 d'un résidu de Gal, Mawhinney *et al.* n'ont pas utilisé la ¹H RMN, qui est la technique idéale pour la détermination de structures d'oligosaccharides-alдитols et la localisation du groupement sulfate, mais ont employé des techniques moins performantes de digestion par des

Tableau V: Les sialyltransférases humaines clonées (nomenclature d'après Tsuji *et al.*, 1996).

Enzyme N° d'accès GenBank	Accepteur(s)	Liaison créée	Origine	Références	Chromo- some
ST6Gal-I X17247	Gal(β1-4)GlcNAc	NeuAc (α2-6)Gal	Placenta	Grundmann <i>et al.</i> , 1990	3(q27-q28)
ST3Gal-I L29555	Gal(β1-3)GalNAc	NeuAc (α2-3)Gal	Placenta	Kitagawa & Paulson, 1994a	8
ST3Gal-II U63090	Gal(β1-3)GalNAc	NeuAc (α2-3)Gal	Foie	Kim <i>et al.</i> , 1996	?
ST3Gal-III L23768	Gal(β1-3/4)GlcNAc	NeuAc (α2-3)Gal	Placenta	Kitagawa & Paulson, 1993	1(p34-p33)
ST3Gal-IV L23767	Gal(β1-4/3)GlcNAc et Gal(β1-3)GalNAc	NeuAc (α2-3)Gal	Placenta	Kitagawa & Paulson, 1994b	11(q23-q24)
ST3Gal-V AB018356	Lactosylcéramide	NeuAc (α2-3)Gal	Cerveau	Ishii <i>et al.</i> , 1998	?
ST3Gal-VI AB022918	Gal(β1-4)GlcNAc	NeuAc (α2-3)Gal	Cellules de mélanome	Okajima <i>et al.</i> , 1999	?
ST8Sia-I X77922	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcCer	NeuAc (α2-8)NeuAc	Cellules de mélanome	Sasaki <i>et al.</i> , 1994b	12
ST8Sia-II U33551	(NeuAcα2-8) _n NeuAc(α2-3)-N-glycannes	NeuAc (α2-8)NeuAc	Placenta	Scheidegger <i>et al.</i> , 1995	15q26
ST8Sia-III AF004668	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc	NeuAc (α2-8)NeuAc	Cerveau	Lee <i>et al.</i> , 1998	?
ST8Sia-IV L41680	(NeuAcα2-8) _n NeuAc(α2-3)-N-glycannes	NeuAc (α2-8)NeuAc	Cerveau d'embryon	Nakayama <i>et al.</i> , 1995	5q21
ST8Sia-V U91641	GM1b, GD1a, GT1b, GD3.	NeuAc (α2-8)NeuAc	Cerveau	Kim <i>et al.</i> , 1997	18

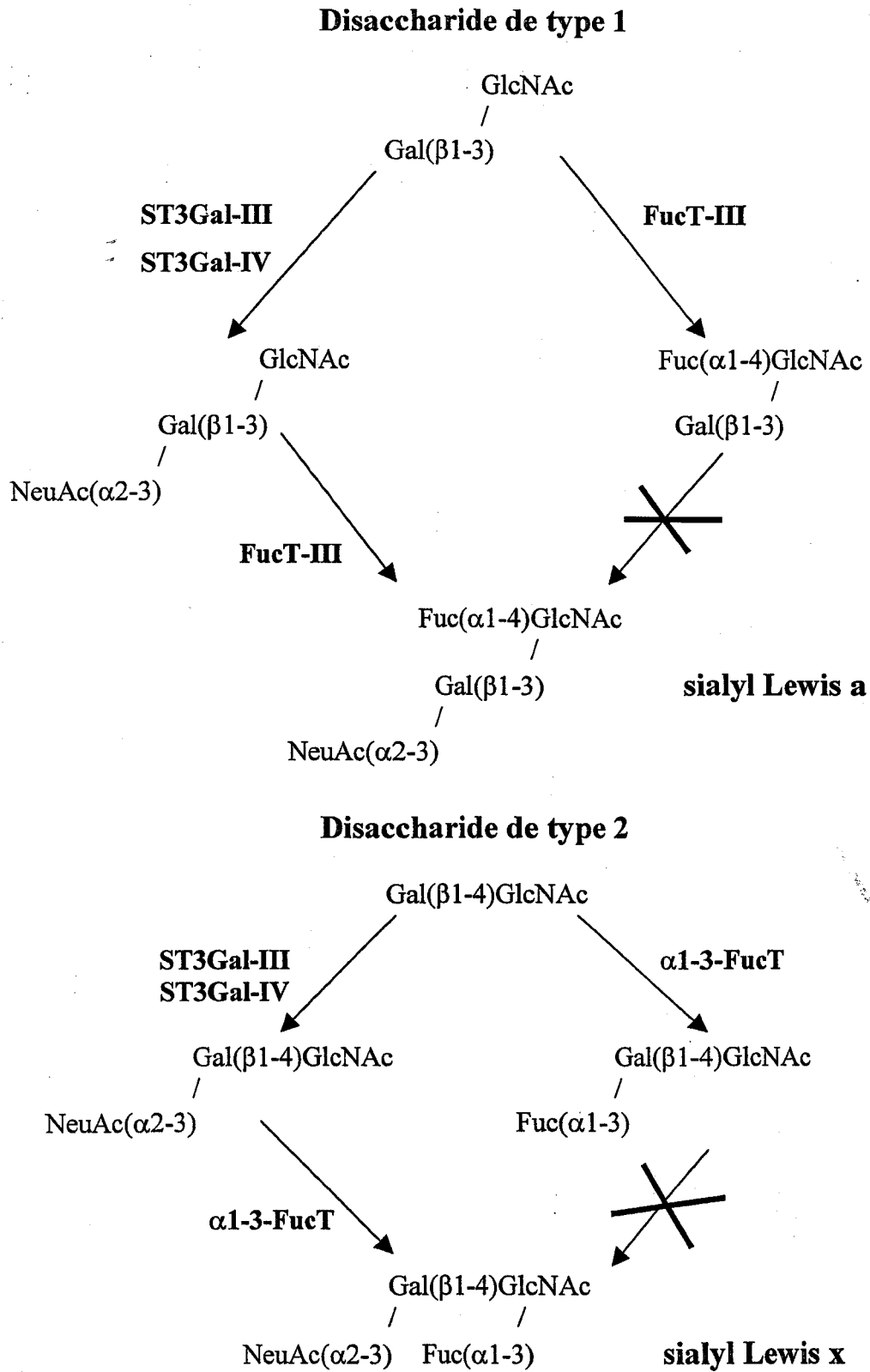


Figure 8 : Voies de biosynthèse des épitopes sialyl Le^x et sialyl Le^a.

Abréviations: FucT, fucosyltransférase ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; ST3Gal, α2-3-sialyltransférase.

glycosidases, de désulfatation et de perméthylation [1992a, 1992b]. Dans les structures déterminées par des techniques combinées de HPAEC et de ^1H RMN, les groupements sulfate ont été localisés soit sur le C3 de résidus de Gal terminaux, soit sur le C6 de résidus de GlcNAc, jamais sur le C4 d'un résidu de Gal [Lo-Guidice *et al.*, 1994, 1997 ; Lamblin *et al.*, 1991].

La localisation, au niveau des mucines bronchiques, d'une sulfatation en C3 d'un résidu de Gal terminal ou en C6 d'un résidu de GlcNAc laissait supposer qu'il existerait au moins deux sulfotransférases dans la muqueuse bronchique humaine, capables de sulfater les mucines.

Lo-Guidice *et al.* ont caractérisé une Gal-3-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine, active sur les résidus de Gal terminaux de chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines [1995]. En recherchant les activités Gal-3-*O*-sulfotransféra-siques dans de nombreux tissus humains, Chandrasekaran *et al.* ont mis en évidence deux groupes de Gal-3-*O*-sulfotransférases, ayant des spécificités de substrat et des paramètres cinétiques différents [1997].

Différentes GlcNAc-6-*O*-sulfotransférases ont été décrites : dans le foie de Rat (intervenant dans la biosynthèse des *N*-glycannes) [Spiro *et al.*, 1996], chez la Souris [Uchimura *et al.*, 1998a]. Trois GlcNAc-6-*O*-sulfotransférases humaines ont été récemment clonées [Uchimura *et al.* 1998b ; Bistrup *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999].

La présence prédominante de 6-*O*-sulfatation sur des résidus de GlcNAc dans les mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose (patients CF) [Lo-Guidice *et al.*, 1994] nous a incités à caractériser, dans les fractions microsomales de muqueuse respiratoire humaine, la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase qui pourrait être responsable de l'hypersulfatation des mucines observée dans cette affection.

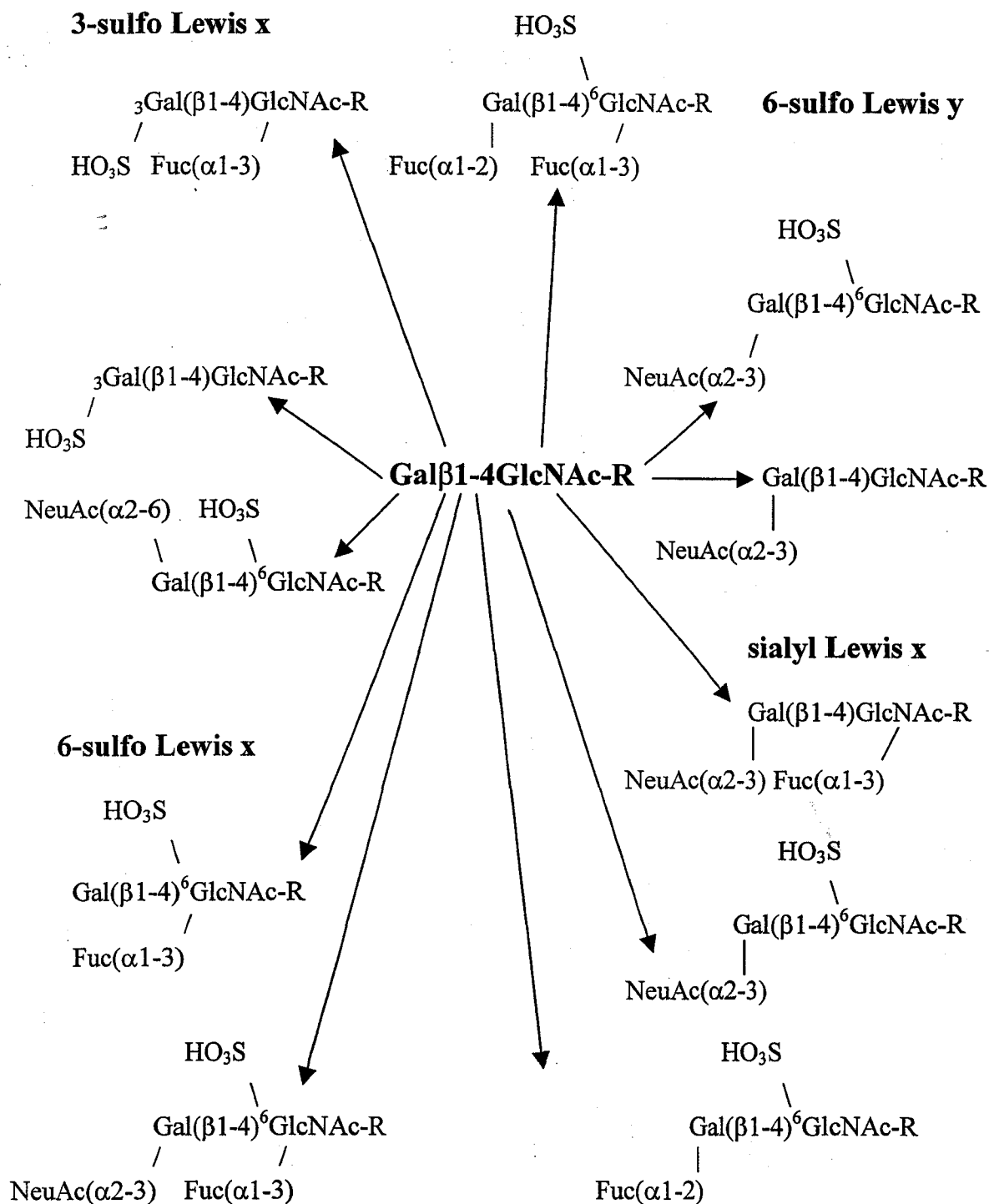
La première partie de mon travail a donc consisté à définir les propriétés enzymatiques de cet enzyme, à étudier différents paramètres influant sur son activité, ainsi que sa spécificité de substrat.

Dans les structures d'oligosaccharides sulfatés de mucines bronchiques déterminées précédemment au laboratoire [Lo-Guidice *et al.*, 1994], les groupements sulfate peuvent coexister sur une même unité de type 2 avec un résidu de NeuAc et/ou de Fuc. Ainsi, au niveau des mucines bronchiques humaines de patients CF ont été décrites des structures de type 3-sulfo Le^x, 6-sulfo Le^x, 6-sulfo Le^y, 6-sulfo sialyl Le^x (Figure 9).

Ces structures périphériques sulfatées, sialylées et fucosylées sont d'une grande importance car elles interviennent dans la reconnaissance de nombreux micro-organismes [Lamblin & Roussel, 1996] (Tableau VI). De plus, nombre d'entre elles sont d'excellents ligands pour les sélectines. Le 6-sulfo sialyl Le^x, particulièrement bien exprimé au niveau des mucines bronchiques de patients CF, a été décrit comme étant le meilleur ligand des L-sélectines [Galustian *et al.*, 1997 ; Mitsuoka *et al.*, 1998]. Ces épitopes 6-sulfo sialyl Le^x pourraient avoir un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire au niveau du poumon.

Le rôle potentiel des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant Le^x a entraîné un certain nombre d'études de leur biosynthèse : si les auteurs s'accordent sur le fait que l' α 2-3-sialylation précède l' α 1-3-fucosylation durant la biosynthèse du déterminant sialyl Le^x, les résultats concernant la biosynthèse du 6-sulfo sialyl Le^x sont controversés. Pour Crommie & Rosen, la sialylation précède la fucosylation et la 6-O-sulfatation [1995]. Pour Scudder *et al.*, la sulfatation en C6 de la GlcNAc est le premier événement, suivie de l' α 2-3-sialylation puis de l' α 1-3-fucosylation [1994].

La séquence de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant glycanique Le^x (3-sulfo Le^x, 6-sulfo Le^x, 6-sulfo sialyl Le^x) étant controversée (du moins en ce qui concerne la fucosylation et la sulfatation), une étude de celle-ci dans des fractions microsomales de muqueuse bronchique humaine nous a paru nécessaire.



6-sulfo sialyl Lewis x

Figure 9 : Exemples de substitutions par un résidu de NeuAc et/ou un groupement sulfate d'une unité disaccharidique terminale de type 2 déterminées dans les mucines bronchiques humaines (d'après Lo-Guidice *et al.*, 1994).

Abréviations : Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine. ; NeuAc, acide N-acétylneuraminique ; SO_3H , sulfate.

Tableau VI : Exemples de structures glycaniques reconnues par des micro-organismes et qui existent également dans les mucines bronchiques humaines (d'après Roussel & Lamblin, 1996).

Micro-organismes	Structures glycaniques	Références
<i>Entamoeba histolytica</i>	Gal/GalNAc N-acétyllactosamine	Mc Coy <i>et al.</i> , 1994 Ravdin <i>et al.</i> , 1989
<i>Candida albicans</i>	Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc	Brassart <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GlcNAc(β1-3)Gal GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-4)Glc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-4)Glc	Andersson <i>et al.</i> , 1983
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Gal(β1-3)GalNAc	Brennan <i>et al.</i> , 1987
<i>Streptococcus sanguis</i>	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	Murray <i>et al.</i> , 1982
<i>E. coli</i> (type <i>S fimbriae</i>)	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	Parkkinen <i>et al.</i> , 1986
<i>E. coli</i> (type <i>X fimbriae</i>)	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc	Leffer & Svanborg-Eden, 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal (β1-4)Glc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Ramphal <i>et al.</i> , 1991a Rosenstein <i>et al.</i> , 1992 Ramphal <i>et al.</i> , 1991a
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc HO ₃ S-3Galβ1-	Roberts <i>et al.</i> , 1989 Krivan <i>et al.</i> , 1989
<i>Virus influenzae</i>	NeuAc(α2-6)Gal NeuAc(α2-3)Gal	Gambaryan <i>et al.</i> , 1995

Abréviations : Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; Glc, Glucose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; NeuAc, acide N-acétylneuraminique ; SO₃H, sulfate.

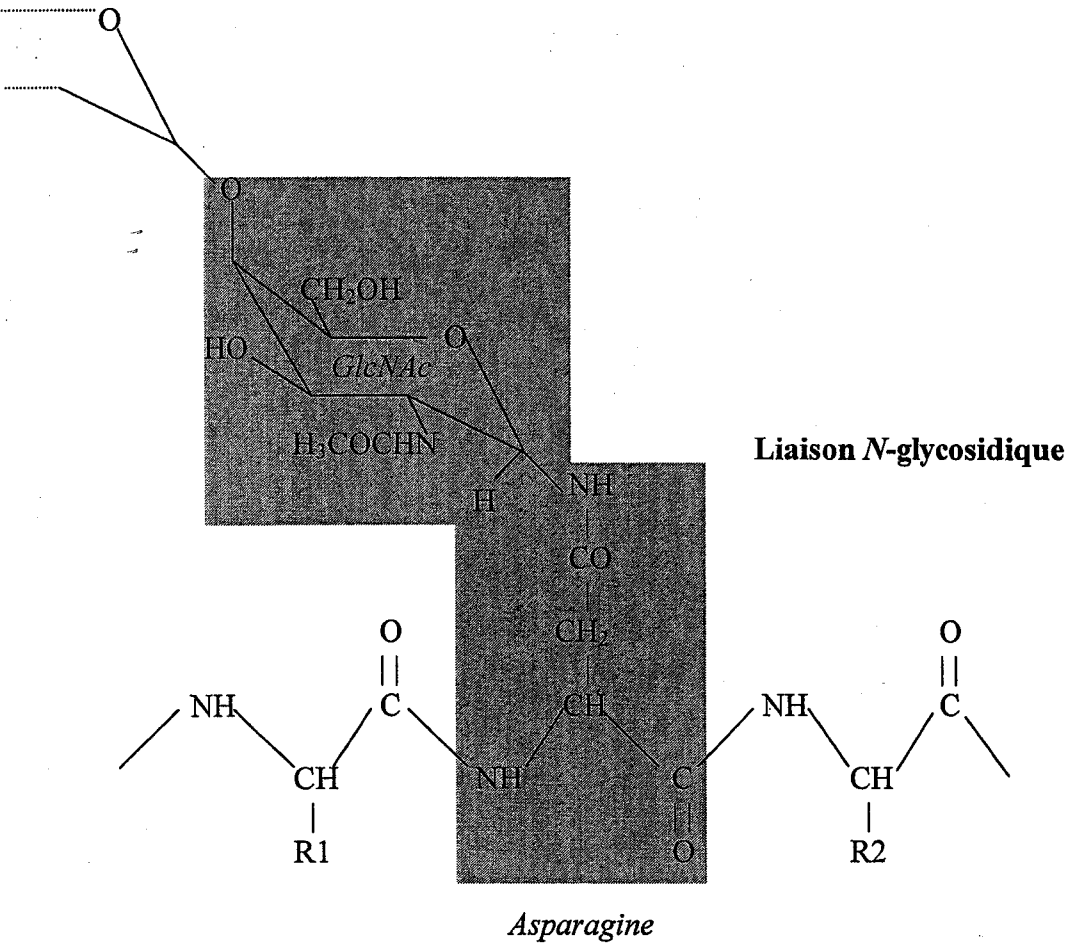
Elle permettra, à l'avenir, d'évaluer l'influence de l'inflammation sur l'activité des différentes sulfo-, sialyl-, et fucosyltransférases et de déterminer si la surexpression des épitopes glycaniques résultant de l'action de ces enzymes ne pourrait pas favoriser la colonisation bactérienne par *P. aeruginosa*, problème majeur auquel sont confrontés les malades souffrant de la mucoviscidose.

2. Chaînes N-glycanniques

Les N-glycannes sont reliés à l'apomucine par une liaison entre la fonction semi-aldéhydrique d'un résidu de GlcNAc et le groupement amide d'un résidu asparaginyll de l'axe peptidique (Figure 10). Contrairement aux O-glycannes qui n'ont en commun que le résidu de GalNAc impliqué dans la liaison à l'apomucine, la structure commune des N-glycannes correspond à un noyau pentasaccharidique, le trimannosyl-di-N-acétylchitobiose (Figure 10). Trois types de N-glycannes peuvent être distingués selon la substitution du noyau : complexe (ou N-acétyllactosaminique) ; oligomannosidique ; ou hybride (Figure 11). Les antennes N-acétyllactosaminique peuvent être substituées, par de l'acide sialique en (α 2-3) ou (α 2-6) sur des résidus de Gal terminaux, ou par des résidus de Fuc, aboutissant à la formation de déterminants de groupes A, B, H, Lewis. Des groupements sulfate ont été localisés sur certaines N-glycoprotéines, soit sur le C3 de résidus de Gal, soit sur le C6 de résidus de GlcNAc internes (par exemple sur la thyroglobuline humaine, porcine, bovine) [de Waard *et al.*, 1991 ; Spiro *et al.*, 1988].

La présence de mannose dans les mucines a longtemps été discutée [Périni *et al.*, 1991]. La caractérisation de séquences Asn-X-Ser(Thr) dans les apomucines a définitivement apporté la preuve de la possibilité de N-glycosylation des apomucines. Les mucines contenant très peu de N-glycannes, aucune structure correspondant aux chaînes N-glycanniques de mucines bronchiques humaines n'a été déterminée. Les chaînes N-glycanniques peuvent être porteuses, tout comme les O-glycannes, de certains épitopes reconnus par des micro-organismes. Néanmoins, les chaînes O-glycanniques étant largement majoritaires, le rôle des N-glycannes dans la colonisation de l'appareil respiratoire par certains pathogènes n'est vraisemblablement que négligeable.

① - Représentation de la liaison *N*-glycosidique



② - Représentation du noyau pentasaccharidique des *N*-glycannes

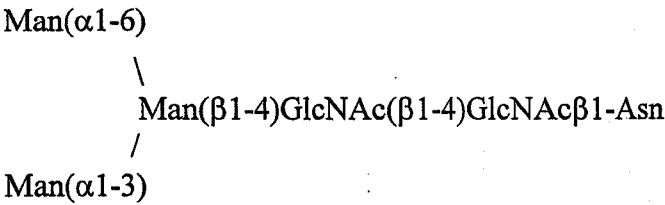
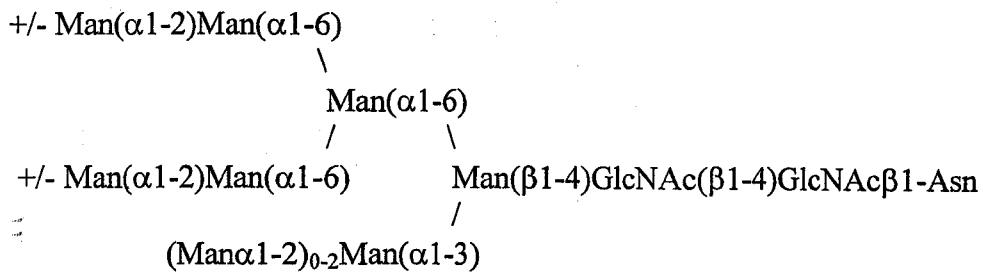


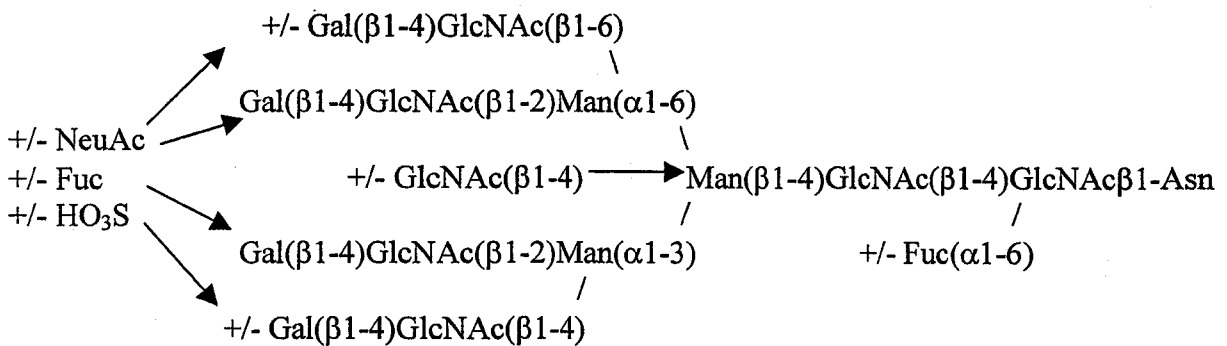
Figure 10 : Représentation schématique de la liaison *N*-glycosidique ① et du noyau trimannosyl-di-*N*-acétylchitobiose ②.

Abréviations : Asn, asparagine ; Gal, galactose ; GlcNAc, *N*-acétylglucosamine ; Man, mannose.

➡ **Type «oligomannosidique»**



➡ **Type «complexe»**



➡ **Type «hybride»**

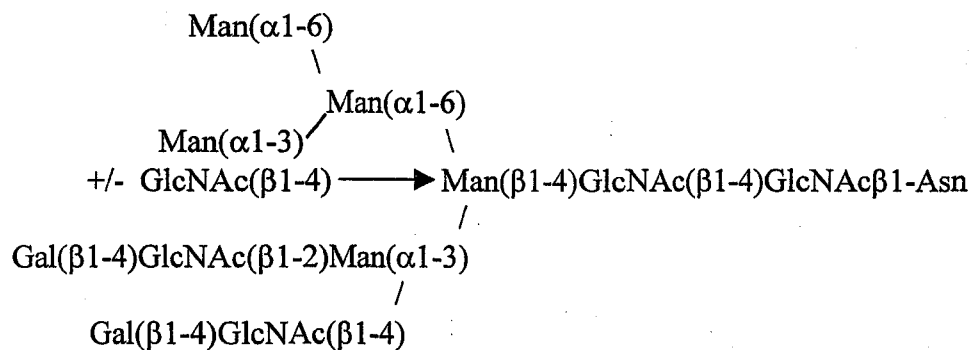


Figure 11 : Les trois types de *N*-glycannes (oligomannosidique, complexe, et hybride) avec ou sans résidu de GlcNAc intercalaire (GlcNAc (β 1-4)).

Abbreviations : Asn, asparagine ; Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine ; Man, mannose ; NeuAc, acide *N*-acétylneuraminique ; HO₃S, sulfate.

IV. Les fonctions des mucines bronchiques

Les mucines bronchiques, du fait de leur structure filamenteuse, sont en grande partie responsables des propriétés rhéologiques du mucus et participent (comme les mucines sécrétées dans la cavité buccale, dans l'appareil intestinal, génital) à la protection de l'épithélium qu'elles recouvrent vis-à-vis des agressions chimiques et mécaniques [Slomiany *et al.*, 1996 ; Mc Neer *et al.*, 1998]. Les glycannes sont essentiels pour la conformation filamenteuse des mucines bronchiques, donc dans le maintien des propriétés rhéologiques du mucus bronchique nécessaire au bon fonctionnement du système muco-ciliaire. Les glycannes protègent également l'apomucine de l'action d'agents protéolytiques [Variyam *et al.*, 1983].

Le rôle des glycannes dans les interactions hôte/micro-organismes et dans les phénomènes d'adhérence bactérienne a été envisagé depuis longtemps. De nombreuses structures glycaniques pouvant être reconnues par les adhésines des micro-organismes ont été décrites : par exemple, le virus *Influenzae* reconnaît, selon les souches, des structures glycaniques de type NeuAc(α 2-3)Gal ou NeuAc(α 2-6)Gal [Couceiro *et al.*, 1993 ; Gambaryan *et al.*, 1995] ; *Mycoplasma pneumoniae* peut se fixer sur des structures HO₃S-3Gal β 1-R [Krivan *et al.*, 1989] et *Pseudomonas aeruginosa* sur les unités Gal(β 1-3)GlcNAc et Gal(β 1-4)GlcNAc des structures lacto-*N*-tétrase, lacto-*N*-néotétrase et NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)GlcNAc [Ramphal *et al.*, 1991a ; Rosenstein *et al.*, 1992 ; Roussel & Lamblin, 1996] (**Tableau VI**).

Ces structures, reconnues par des micro-organismes pouvant être pathogènes pour l'appareil respiratoire, existent également dans les chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines (**Tableau VI**). Sur un plan fonctionnel, la diversité des glycannes portés par les mucines bronchiques pourrait constituer une mosaïque de sites récepteurs permettant, par des mécanismes d'adhérence, de «piéger» les micro-organismes inhalés, préalable nécessaire à leur évacuation par le système muco-ciliaire. La diversité glycanique des mucines jouerait donc un rôle primordial dans la défense de la muqueuse de l'arbre respiratoire.

De plus, certains déterminants glycaniques portés par les mucines sont d'excellents ligands pour les sélectines. Avec leurs ligands osidiques, les sélectines jouent un grand rôle dans l'interaction des leucocytes et des parois endothéliales, et dans la migration des leucocytes vers les foyers inflammatoires. Il a été démontré que les différentes sélectines (E ou endothéliale, P ou plaquettaire, et L ou leucocytaire) reconnaissent comme épitope

minimum la structure NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc ou sialyl Le^x, et la structure NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc ou sialyl Le^a. De même, les dérivés 6-sulfatés du sialyl Le^x serait particulièrement bien reconnus par la sélectine L.

L'épitope sialyl Le^x est aussi exprimé en surface de différentes cellules cancéreuses et pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance de ces cellules par la sélectine E (endothéliale) et la diffusion métastatique [Hoff *et al.*, 1989]. Cet épitope pourrait être sous le contrôle des fucosyltransférases codées par les gènes *FUT4* et -7 [Ogawa *et al.*, 1996] et son expression pourrait être augmentée par le facteur α de nécrose tumorale (TNF α) [Majuri *et al.*, 1995].

Au niveau bronchique, l'épitope sialyl Le^x, ses analogues et ses dérivés sulfatés, sont largement représentés dans les mucines bronchiques humaines pathologiques, provenant notamment des patients CF [Lo-Guidice *et al.*, 1994], et Crottet *et al.* ont démontré que les mucines bronchique humaines sont capables d'interagir avec la sélectine L, et donc avec les leucocytes [1996].

Les chaînes glycaniques des mucines pourraient donc avoir un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire dans certains phénomènes inflammatoires, rencontrés par exemple dans la mucoviscidose. Cette maladie génétique, la plus fréquente dans la population caucasienne, se caractérise par une réponse inflammatoire très forte au niveau du poumon (en particulier par un afflux de leucocytes). La présence de déterminants sialyl Le^x (NeuAc(α 2-3)Gal β 1-4[Fuc(α 1-3)]GlcNAc-...), sulfo Le^x (HO₃S-3Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc-... et Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)](HO₃S-6)GlcNAc-...), et sulfo-sialyl Le^x (NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)](HO₃S-6)GlcNAc) au niveau des chaînes glycaniques de patients CF pourrait avoir un rôle de modulation de la réponse inflammatoire, par interaction avec les leucocytes [Lo-Guidice *et al.*, 1994].

B - Travaux personnels

I. Mise en évidence et caractérisation d'une activité GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine active sur les chaînes glycaniques de mucines

Les études menées sur de nombreuses structures d'oligosaccharides de mucines bronchiques humaines ont démontré que les groupement sulfate pouvaient exister soit sur le C3 d'un résidu de Gal terminal, soit sur le C6 d'un résidu de GlcNAc [Lo-Guidice *et al.*, 1994].

L'activité Gal-3-*O*-sulfotransférase ayant été caractérisée au laboratoire [Lo-Guidice *et al.*, 1995], nous avons entrepris l'étude de l'activité GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase dans des fractions microsomales préparées à partir de pièces de muqueuse bronchique humaine macroscopiquement saines, prélevées sur des patients atteints de cancers bronchiques. L'incubation de ces fractions microsomales avec le [³⁵S]PAPS (donneur universel de sulfate) et différents substrats a permis de déterminer les conditions optimales d'activité de l'enzyme, ses paramètres cinétiques, ainsi que sa spécificité de substrat.

Les produits sulfatés néosynthétisés durant les incubations des fractions microsomales avec le [³⁵S]PAPS et différents substrats ont été identifiés par une technique de chromatographie haute performance d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) et une détection de la radioactivité. Les produits néosynthétisés marqués au [³⁵S] sont visualisés par détection de la radioactivité, et identifiés par co-élution avec des standards non marqués, qui sont repérés par détection ampérométrique pulsée. La détection ampérométrique pulsée permet de détecter spécifiquement les oses, par oxydation de leurs fonctions alcool secondaires.

Ce travail est décrit dans un article intitulé : «Characterization of an *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains. (1997) *J. Biol. Chem.*, 273, 29493-29501».

Characterization of an *N*-Acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase from Human Respiratory Mucosa Active on Mucin Carbohydrate Chains*

(Received for publication, June 20, 1997, and in revised form, September 2, 1997)

Sophie Degroote‡, Jean-Marc Lo-Guidice‡, Gérard Strecker§, Marie-Paule Ducourouble‡, Philippe Roussel‡, and Geneviève Lamblin‡¶

From ‡Unité INSERM 377, place de Verdun, F-59045 Lille, and §UMR CNRS 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

A microsomal GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase activity from human bronchial mucosa, able to transfer a sulfate group from adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate onto methyl-*N*-acetylglucosaminides or terminal *N*-acetylglucosamine residues of carbohydrate chains from human respiratory mucins, has been characterized. The reaction products containing a terminal HO₃S-6GlcNAc were identified by high performance anion-exchange chromatography. Using methyl-β-*N*-acetylglucosaminide as a substrate, the optimal activity was obtained with 0.1% Triton X-100, 30 mM NaF, 20 mM Mn²⁺, 5 mM AMP in a 30 mM MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) buffer at pH 6.7. The apparent *K_m* values for adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate and methyl-β-*N*-acetylglucosaminide were observed at 9.1×10^{-6} M and 0.54×10^{-3} M, respectively. The enzyme had more affinity for carbohydrate chains with a terminal GlcNAc residue than for methyl-β-*N*-acetylglucosaminide; it was unable to catalyze the transfer of sulfate to position 6 of the GlcNAc residue contained in a terminal Galβ1-4GlcNAc sequence. However, oligosaccharides with a nonreducing terminal HO₃S-6GlcNAc were substrates for a β1-4 galactosyltransferase from human bronchial mucosa. These data point out that GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase must act before β1-4 galactosylation in mucin-type oligosaccharide biosynthesis.

Human respiratory epithelium is covered by a gelatinous layer of mucus, situated on the top of the cilia, and continuously moved toward the pharynx where it is swallowed (1). Mucins are the main components of the respiratory mucus and are responsible to a large extent for the characteristic rheological properties of respiratory mucus, necessary for the efficiency of the mucociliary system.

Human respiratory mucins consist of a broad family of poly-disperse and high molecular mass glycoproteins synthesized by the respiratory mucosa. The peptide diversity stems from the expression of several genes (2, 3); however, this mucin diversity is increased widely by post-translational phenomena, mostly *O*-glycosylation but also sulfation, which are responsible for 70–80% of the mass of the mucin molecule. These phenomena lead to a remarkable diversity of carbohydrate chains (4) allowing the recognition of inhaled microorganisms (for review,

see Ref. 5) which are then eliminated by the activity of the mucociliary system. Thus mucins play an essential role in the defense of the respiratory mucosa. Any change in the glycosylation or sulfation of mucins may affect the rheological properties of respiratory mucus and the efficiency of the mucociliary system, leading to bronchial obstruction as observed in cystic fibrosis (CF).¹

CF, a general exocrinopathy, is the most common severe genetic disease among Caucasians. In its most typical form, the severity of CF is the result of chronic lung infection and mucus hypersecretion. This infection is very peculiar and characterized by the predominance of *Staphylococcus aureus* in early life and, later on, of *Pseudomonas aeruginosa* which is almost impossible to eradicate and is responsible for most of the morbidity and mortality of the disease (6).

CF is caused by mutations in the gene encoding for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (7), a chloride channel of low conductance activated by protein kinase A (8–11). ΔF508 deletion is the most frequent mutation (about 70% of the CF chromosomes) and leads to a misfolding of CFTR which is retained in the endoplasmic reticulum and degraded (12). This mislocation of mutated CFTR may have consequences for other cell compartments. In CF cells, a defect in the acidification of endosomes, prelysosomes, or *trans*-Golgi/*trans*-Golgi network has been observed and could be responsible for abnormal glycosylation and sulfation processes (13–16).

Previous works have shown that salivary and respiratory mucins (17–19) as well as glycoproteins secreted by CF nasal epithelial cells in culture (20) were oversulfated. More recently, Zhang *et al.* (21), using a model of human xenograft that eliminates the influence of inflammation and infection, observed an increased mucin sulfation that may correspond to a primary defect, varying according to the CF genotype. Mucin sulfation affords a strong negative charge to carbohydrate chains influencing the viscoelastic properties of bronchial mucus. Moreover, sulfated carbohydrate sequences, identical to those found in respiratory mucins, have been shown to be specific ligands for selectins (22, 23) and for microorganisms (24). The development of a protocol of purification based mainly on high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) has allowed the structural determination of sulfated carbohydrate chains from CF and non-CF mucins in which sulfation occurs either on the C-3 of a terminal galactose (Gal)

* This work was supported by INSERM and by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose. 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.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-2029-8862; Fax: 33-3-2053-8562; E-mail: Lamblin@lille.inserm.fr.

¹ The abbreviations used are: CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; HPAEC, high performance anion-exchange chromatography; PAPS, adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate; APS, adenosine 5'-phosphosulfate; sLe^x, sialyl Lewis x; MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid; AEBF, 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid.

TABLE I
Structures of oligosaccharide-alditols OS1, OS2, and OS3

Oligosaccharide-alditol	Structure
OS1	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc-ol Gal(β1-3) NeuAc(α2-3)
OS2	GlcNAc(β1-6) GalNAc-ol Gal(β1-3) NeuAc(α2-3)
OS3	GalNAc-ol GlcNAc(β1-3)

residue or on the C-6 of an *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residue (25). These data suggest that sulfation of respiratory mucins involves at least two sulfotransferases.

Lo-Guidice *et al.* (26) have characterized recently a sulfotransferase from human airways responsible for the 3-*O*-sulfation of terminal galactose in *N*-acetylglucosamine-containing mucin carbohydrate chains.

In this paper we report the characterization of a microsomal GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase activity from human bronchial mucosa. This enzyme is able to transfer a sulfate group from PAPS to a terminal GlcNAc residue contained in a carbohydrate chain. The GlcNAc-6-*O*-sulfation is inhibited by the prior β1-4 galactosylation of the GlcNAc residue, indicating that 6-*O*-sulfation has to precede galactosylation during biosynthesis of sulfated mucin-type oligosaccharides. The main difference in the enzymatic properties of the 3-*O*-Gal- and the 6-*O*-GlcNAc-sulfotransferase is their optimum pH, 6.1 and 6.7, respectively.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Enzyme Preparation—Tissues collected in macroscopically healthy areas of the bronchial tree from patients undergoing surgery for bronchial carcinoma were placed in Leibovitz L15 medium (Life Technologies, Inc.) and transported immediately on ice to the laboratory and processed for mucosa isolation. Mucosae (2–3 cm²) were cut into 1-mm² pieces, and homogenates were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 25 mM potassium chloride, 250 mM saccharose, 5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM magnesium acetate, using a glass-Teflon homogenizer (1,400 rpm, five strokes). The mixture obtained was submitted to 16,000 × *g* centrifugation for 20 min at 4 °C. The resulting supernatants were ultracentrifuged further at 180,000 × *g* for 1 h at 10 °C. The resulting pellet containing microsomal fractions was stored at –80 °C until used (26).

Sulfate Acceptors—The oligosaccharide-alditols of respiratory mucins from a patient suffering from CF were released by alkaline borohydride treatment of mucin glycopeptides, then fractionated by anion-exchange chromatography on an AG 1-X2 column (Bio-Rad) and then by gel filtration chromatography on a Bio-Gel P4 column (Bio-Rad) according to Lamblin *et al.* (27). Fraction IIIc1 containing mono- or disialyloligosaccharide-alditols was fractionated by HPAEC on a CarboPac PA-100 column (Dionex), and the structures of the main oligosaccharide-alditols were determined by high resolution ¹H NMR spectroscopy in combination with fast atom bombardment-mass spectrometry (25).

The different compounds also used for acceptor specificity studies were from the following sources: GlcNAcα1-*O*-Met, GlcNAcβ1-*O*-Met, GlcNAcβ1-3Gal-*O*-Met were from Sigma; NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc-*O*-Met (α2-3sialyl-*N*-acetylglucosamine-*O*-Met), and NeuAcα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc-*O*-Met (sialyl-Lewis x-*O*-Met or sLe^x-*O*-Met) were from Toronto Research Chemicals Inc. We also used three oligosaccharide-alditols OS1, OS2, and OS3, whose structures are described in Table I. The oligosaccharide-alditol OS1 was from *Collocalia* mucins (28) and OS3 was from human bronchial mucins. OS2 was

obtained by treating OS1 with *Streptococcus pneumoniae* β-galactosidase (Sigma) according to Paulson *et al.* (29). The galactose was then removed by gel filtration on a Bio-Gel P2 column (Bio-Rad). Fraction IIIc1 was also treated with *S. pneumoniae* β-galactosidase using the same protocols.

Standards Preparation—Sulfated oligosaccharide-alditols (fraction IVc) were prepared from the respiratory mucins of a CF patient using the same methods as for fraction IIIc1 (25). The structures of 11 sulfated oligosaccharide-alditols from fraction IVc have been determined by Lo-Guidice *et al.* (25).

6-*O*-Sulfated methyl-β-*N*-acetylglucosaminide was synthesized according to the protocol described by Van Kuik *et al.* (30) specific for sulfation of –CH₂OH. Briefly, 50 mg of GlcNAcβ1-*O*-Met was dissolved in 1.25 ml of dry pyridine. The mixture was cooled to 5 °C, and 18.5 μl of chlorosulfonic acid in 75 μl of dry chloroform was added. After stirring for 30 min at 5 °C and then for 2 h at 25 °C, the reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of water. The solvent was then evaporated to dryness. The sulfated GlcNAcβ1-*O*-Met was purified on a silica column (1.2 × 13 cm) (Florisil, Merck) eluted by a mixture of dichloromethane/methanol (5:3, v/v), and their structure was determined by 400 MHz ¹H NMR spectroscopy on a two-dimensional homonuclear COSY spectrum. The analysis proved the presence of two sulfated products: HO₃S-6GlcNAcβ1-*O*-Met, which was the main synthesized product; and HO₃S-3GlcNAcβ1-*O*-Met (90%/10%). The sulfation of GlcNAcβ1-*O*-Met on the C-6 was confirmed by the strong downfield shift for the AH6/AH6' protons (+0.45 ppm and +0.49 ppm, respectively). HO₃S-6GlcNAcβ1-3Gal-*O*-Met was a generous gift from K. L. Matta (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) (31).

Sulfotransferase Assays—The reaction mixture (100 μl) for the sulfotransferase assays was performed as follows. 50–100 μg of microsomal protein was incubated with 0.5 μCi of [³⁵S]PAPS (NEN Life Science Products, 2.48–2.50 Ci/mmol), 5 mM of methylglycosides (GlcNAcβ1-*O*-Met, GlcNAcβ1-3Gal-*O*-Met, NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc-*O*-Met, or sLe^x-*O*-Met), or 100 μg of one of the oligosaccharide-alditols (OS1, OS2, OS3) in a 30 mM MOPS/NaOH buffer, pH 6.7, containing 0.1% (w/v) Triton X-100, 20 mM MnCl₂, 30 mM NaF, 5 mM AMP, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF). After incubation for 60 min at 30 °C, the reaction was stopped by the addition of 300 μl of ice-cold methanol. The resulting mixture was kept overnight at 4 °C, and the formed precipitates were eliminated by centrifugation at 10,000 × *g* for 20 min. The pellets were washed twice with ice-cold methanol and centrifuged. The supernatants were collected, evaporated to dryness, and then submitted to HPAEC.

Action of Human Microsomal Galactosyltransferase on HO₃S-6GlcNAcβ1-*O*-Met or on Oligosaccharide-alditol IVc-19 (OS2 with a Terminal HO₃S-6GlcNAc)—After incubation of GlcNAcβ1-*O*-Met or OS2 with radiolabeled [³⁵S]PAPS and microsomal preparation for 60 min at 30 °C as described above, UDP-Gal (Sigma) was added to the mixture to have a final concentration of 5 mM. The mixture was kept for 1 h 30 min at 30 °C, and the reaction was stopped as described for the sulfotransferase assays. The synthesized products were identified by HPAEC.

To compare the activity of this galactosyltransferase on GlcNAcβ1-*O*-Met/HO₃S-6GlcNAcβ1-*O*-Met and OS2/IVc-19, each substrate (1 mM) was incubated with 1 μCi of radiolabeled UDP-[6-³H]Gal (Sigma, 17.65 Ci/mmol) for 1 h 30 min at 30 °C in a 30 mM MOPS/NaOH buffer containing 5 mM AMP, 30 mM NaF, 20 mM MnCl₂, 1 mM AEBSF, and 0.1% Triton X-100. The reaction was stopped as described for the sulfotransferase assays, and the radiolabeled products were studied by HPAEC.

Action of β1-4 Galactosyltransferase from Bovine Milk on HO₃S-6GlcNAcβ1-*O*-Met—To obtain a standard of Galβ1-4(HO₃S-6)GlcNAc-*O*-Met, chemically synthesized HO₃S-6GlcNAcβ1-*O*-Met (5 mM) was incubated with 1 μCi of radiolabeled UDP-[6-³H]Gal (Sigma, 17.65 Ci/mmol) and 150 milliunits of β1-4 galactosyltransferase from bovine milk (Sigma) in 50 μl of 100 mM sodium cacodylate, 154 mM NaCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM AMP, 10 mM MnCl₂, 0.5% (w/v) Triton X-100 (32). After 1 h 30 min at 30 °C, the reaction was stopped as described for the sulfotransferase assays, and the synthesized product was characterized by HPAEC.

Characterization of Labeled Products by HPAEC—Dry samples of sulfated or galactosylated products were dissolved in water and injected directly onto a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) for HPAEC (Dionex Corp.). The elution of neosynthesized products was monitored both by pulsed amperometric detection (PAD 2 model, Dionex Corp.) and by radioactivity on line (high performance liquid chromatography radioactivity detector LB 506 C-1, EG & G, Berthold, Wildbad, Germany).

Elution of sulfated GlcNAcβ1-*O*-Met and sulfated products synthe-

sized from methylglycosides (GlcNAc β 1-3Gal-O-Met, NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-O-Met, and sLe^x-O-Met) was performed at alkaline pH at a flow rate of 1 ml/min in 0.05 M NaOH, 0.2 M sodium acetate with a linear gradient of sodium acetate to 0.05 M NaOH, 0.3 M sodium acetate at 22 min, to 0.05 M NaOH, 0.95 M sodium acetate at 24 min, and followed by isocratic elution with 0.05 M NaOH, 0.95 M sodium acetate for 10 min (gradient I). The standards used were HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met and HO₃S-6GlcNAc β 1-3Gal-O-Met for sulfated GlcNAc β 1-O-Met and sulfated GlcNAc β 1-3Gal-O-Met, respectively.

The same gradient I was used for elution of the ³⁵S-sulfated and galactosylated products synthesized from GlcNAc β 1-O-Met. The standard used was Gal β 1-4(HO₃S-6)GlcNAc-O-Met (resulting from incubation of HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met with UDP-[6-³H]Gal and β 1-4 galactosyltransferase from bovine milk).

Elution of neosynthesized radiolabeled sulfated oligosaccharide-alditols was performed at alkaline pH at a flow rate of 1 ml/min in 0.1 M NaOH for 10 min, then with a linear gradient of sodium acetate to 0.1 M NaOH, 0.07 M sodium acetate at 16 min, to 0.1 M NaOH, 0.1 M sodium acetate at 30 min, to 0.1 M NaOH, 0.45 M sodium acetate at 80 min, to 0.1 M NaOH, 0.95 M sodium acetate at 82 min and followed by isocratic elution with 0.1 M NaOH, 0.95 M sodium acetate for 10 min (gradient II). Fraction IVc containing 11 sulfated oligosaccharide-alditols was used as a standard (25). For elution of both ³⁵S-sulfated and galactosylated products synthesized from OS2, we also used gradient II and fraction IVc as a control.

Protein Determination—The protein content of the microsomal fractions was determined by BCA Protein Assay (Pierce) (33).

RESULTS

Sulfation of Methyl-N-acetylglucosaminides

Methyl-N-acetylglucosaminides were first used to test the N-acetylglucosamine-sulfotransferase activity since it is difficult to obtain enough oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins to characterize the enzyme completely. After incubation of methyl- β -N-acetylglucosaminide (GlcNAc β 1-O-Met) with microsomes and [³⁵S]PAPS and separation of the radiolabeled products by HPAEC, two peaks were observed: a peak at 11 min 30 s corresponding to free [³⁵S]sulfate (this peak is still present when incubation is performed without any carbohydrate acceptor) and another peak at 9 min 30 s, absent when there is no GlcNAc β 1-O-Met in the incubation mixture, corresponding to a sulfated GlcNAc β 1-O-Met (Fig. 1a). Unreacted [³⁵S]PAPS or [³⁵S]APS, which are very acidic compounds, are eluted with high concentrations of sodium acetate, and so they are not visualized on the elution profile.

To find out the position of the sulfate group on the GlcNAc residue, the radiolabeled products were chromatographed with a mixture (90%/10%) of HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met and HO₃S-3GlcNAc β 1-O-Met that was chemically synthesized. The sulfated GlcNAc β 1-O-Met synthesized during incubation with microsomes and [³⁵S]PAPS coeluted with the standard HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met. This showed that the sulfotransferase was able to transfer a sulfate group from PAPS to the C-6 of GlcNAc β 1-O-Met (Fig. 1b).

A very low sulfotransferase activity was found when methyl- α -N-acetylglucosaminide (GlcNAc α 1-O-Met) was used as substrate acceptor, showing that the enzyme was more active on the β anomers than on the α anomers. The activity was about 120-fold higher for GlcNAc β 1-O-Met (17.27 pmol/mg of protein/min) than for GlcNAc α 1-O-Met (0.14 pmol/mg of protein/min) using the same conditions of incubation.

Properties of the GlcNAc-6-O-sulfotransferase

We first looked at the effect of pH on the transfer of sulfate group from PAPS to GlcNAc β 1-O-Met, using MES buffer (pH 5.4–6.4) and MOPS buffer (pH 6.1–7.9). The optimal conditions for sulfation of GlcNAc β 1-O-Met were obtained with 30 mM MOPS/NaOH buffer at pH 6.7 (data not shown).

The influence of divalent cations on the activity of this GlcNAc-6-O-sulfotransferase from respiratory mucosa was

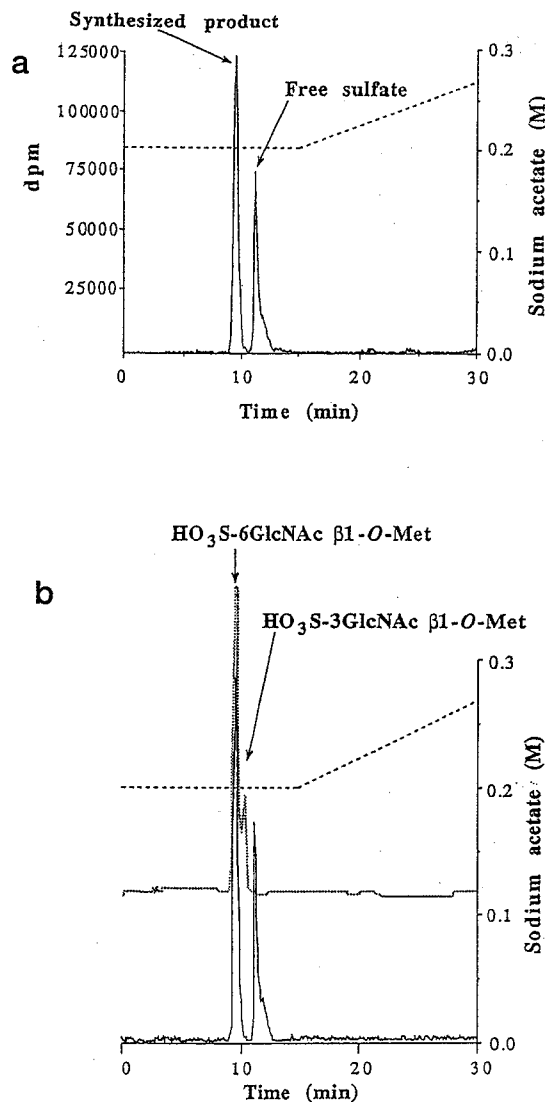


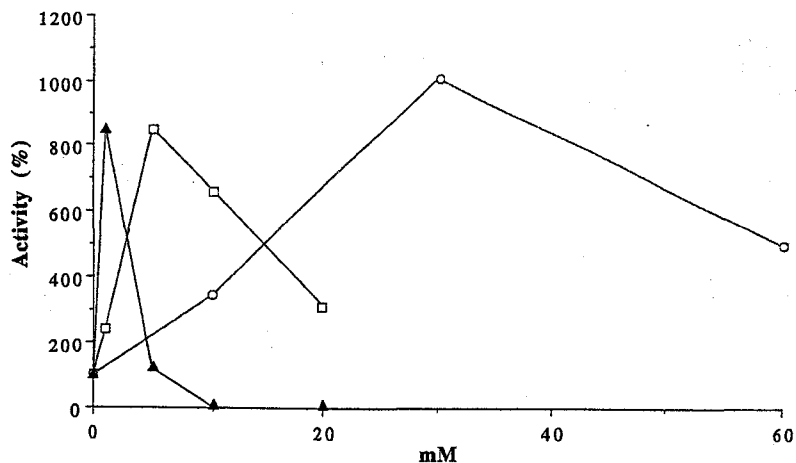
FIG. 1. HPAEC elution profile of ³⁵S-labeled products enzymatically obtained from GlcNAc β 1-O-Met on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm). These products were studied alone (panel a) or after mixing with two synthetic GlcNAc β 1-O-Met bearing a sulfate group either on C-3 or C-6 (panel b). Elution was performed with gradient I described under "Experimental Procedures." Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

also studied. Mn²⁺ and Mg²⁺ had a stimulatory effect on the GlcNAc-6-O-sulfotransferase with an optimal activity at 20 mM Mn²⁺. The sulfotransferase activity was 4-fold higher with 20 mM Mn²⁺ than without this cation. Ca²⁺ had an inhibitory effect even at very low concentrations (data not shown).

We also studied the influence of AMP, ATP, and NaF on the transfer of [³⁵S]sulfate to GlcNAc β 1-O-Met. Both AMP and ATP had a stimulatory effect at a concentration of 1 mM. Above this concentration, ATP abolished the sulfotransferase activity, whereas AMP had an increased stimulatory effect up to a 5 mM concentration. The presence of NaF in the incubation mixture stimulated the sulfotransferase activity, with a maximal effect at 30 mM NaF (Fig. 2).

These three compounds had an inhibitory effect on the liberation of free [³⁵S]sulfate from [³⁵S]PAPS during the incubations, allowing an increase of sulfotransferase activity. There was a free [³⁵S]sulfate decrease, 10, 85, and 80%, when the incubations were performed with 30 mM NaF, 5 mM AMP, and 10 mM ATP, respectively. Concerning ATP, the stimulatory

FIG. 2. Effect of AMP, ATP, and NaF on enzymatic sulfation of GlcNAc β 1-O-Met by human respiratory mucosa 6-O-sulfotransferase. Incubations were carried out under standard assay conditions with indicated amounts of ATP ($\blacktriangle$), AMP ($\square$), and NaF ($\circ$).



effect was only observed at low concentrations (1 mM). Above this concentration, ATP had an inhibitory effect. This compound, which can be considered as a structural analog of PAPS, has already been shown to inhibit sulfotransferase activities (34). At high concentrations, the impact on PAPS degradation would be lower than the inhibitory effect.

The optimal sulfotransferase activity was obtained with 0.1% (w/v) Triton X-100, 30 mM NaF, 20 mM MnCl₂, and 5 mM AMP in a 30 mM MOPS/NaOH buffer at pH 6.7.

When using these conditions, the sulfotransferase activity increased linearly up to 360 min, in the range of 2–96 μ g of microsomal proteins (data not shown).

Kinetic measurements of GlcNAc-6-O-sulfotransferase activity with different concentrations of [³⁵S]PAPS (Fig. 3a) and GlcNAc β 1-O-Met (Fig. 3b) allowed the determination of K_m values from Lineweaver-Burk plots for these two components, 9.1 μ M and 0.54 mM, respectively.

Sulfation of Oligosaccharidic Substrates

Sulfation of Different Oligosaccharide-alditols—The sulfotransferase activity was measured on different oligosaccharide-alditols: OS1, OS2, OS3 (Table I), and fraction IIIc1 (sialylated oligosaccharide-alditols from human bronchial mucins (25)) with or without prior treatment with β -galactosidase. These oligosaccharides were incubated with microsomal preparation and [³⁵S]PAPS in conditions described under "Experimental Procedures." The ³⁵S-radiolabeled products were analyzed by HPAEC using a CarboPac PA-100 column and gradient II and compared with a mixture of 11 sulfated oligosaccharide-alditols whose structures have been determined previously (IVc) (25). Three of them were particularly interesting. The oligosaccharide-alditol IVc-10 had the same structure as OS1 with a sulfate group on the C-3 of the terminal galactose residue; IVc-12 had the same structure as OS1 with a sulfate group on the C-6 of the internal GlcNAc residue, and IVc-19 corresponded to OS2 with a sulfate group on the C-6 of the terminal GlcNAc residue. The structure of the oligosaccharide-alditol IVc-2 was also very useful for this study (Table II).

After sulfation of OS1, two radiolabeled peaks were obtained (Fig. 4a). The first peak was eluted at 45 min 24 s and was also present when the incubation mixture did not contain any acceptors; it corresponded to free [³⁵S]sulfate. The second peak was eluted at 46 min 36 s; it corresponded to the product synthesized from OS1. When this product was injected with a mixture of sulfated oligosaccharides (fraction IVc), it coeluted with oligosaccharide-alditol IVc-10, which corresponds to OS1 with a sulfate group on the C-3 of the terminal galactose residue. No radiolabeled peak had the same retention time as oligosaccharide-alditol IVc-12, which corresponds to OS1 with

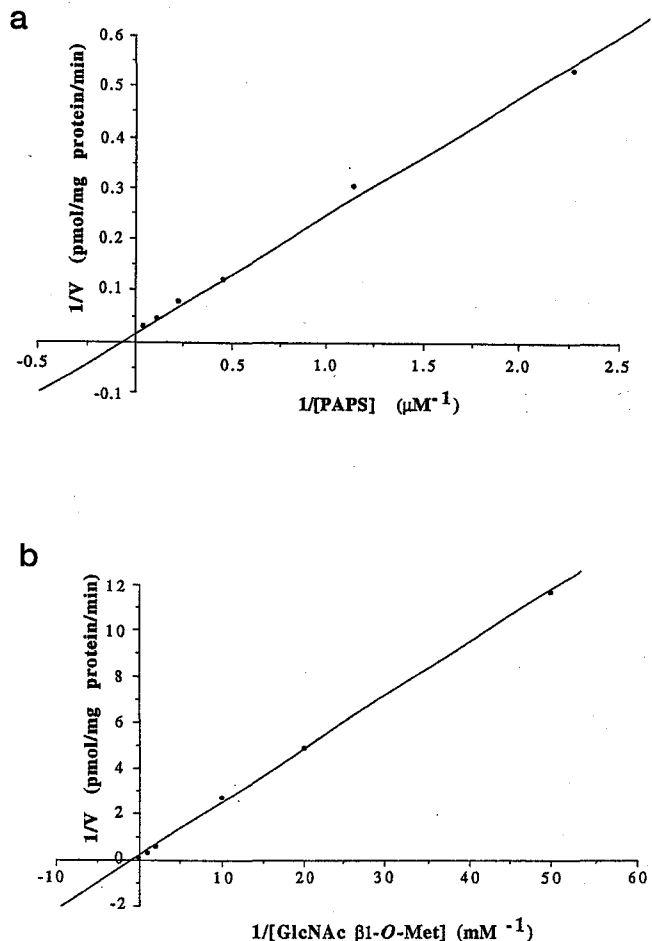


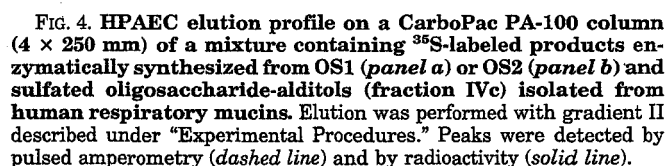
FIG. 3. Effect of PAPS (panel a) and GlcNAc β 1-O-Met (panel b) concentrations on human respiratory mucosa 6-O-sulfotransferase activity. Incubation mixtures were the same as described under "Experimental Procedures" except for the concentrations of PAPS (0.44–22 μ M) and GlcNAc β 1-O-Met (20 μ M–10 mM).

a sulfate group on the internal GlcNAc residue (Table II). Thus the GlcNAc-6-O-sulfotransferase activity from human bronchial mucosa was not directly active on the internal GlcNAc residue of OS1 (Scheme 1).

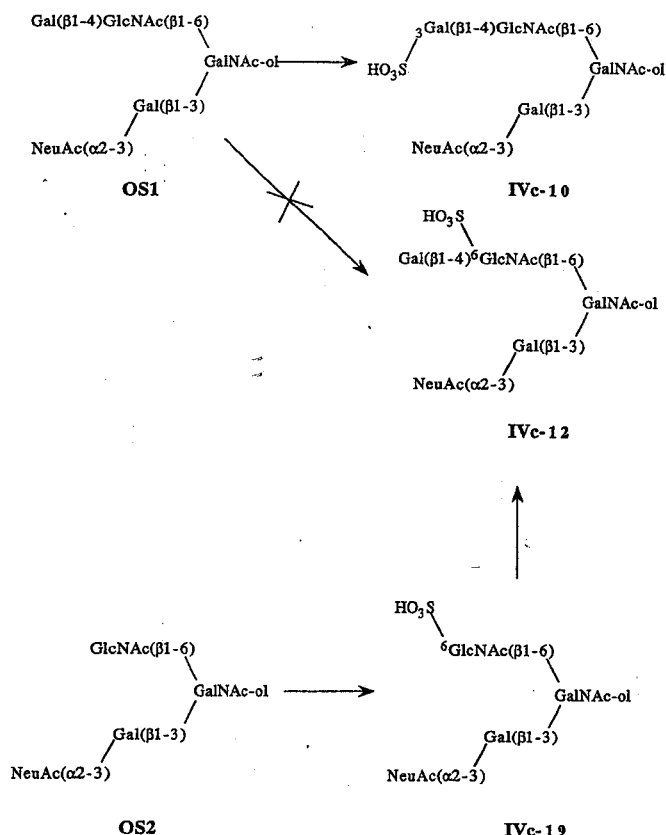
OS1 was then submitted to the action of β -galactosidase from *S. pneumoniae* and led to OS2 (Table I), which was incubated under the same conditions as OS1. The radiolabeled products were separated by HPAEC in two peaks (Fig. 4b). The first peak was eluted at 45 min 24 s and corresponded to free [³⁵S]sulfate; the second peak was eluted at 56 min 6 s and

Oligosaccharide-alditol	Structure
IVc-2	$ \begin{array}{ccccc} & & \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-6) & & \\ & \swarrow & & \searrow & \\ \text{HO}_3\text{S} & & \text{Fuc}(\alpha 1-3) & & \text{GalNAc-ol} \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{Gal}(\beta 1-3) \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{NeuAc}(\alpha 2-3) \end{array} $
IVc-10	$ \begin{array}{ccccc} & & \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-6) & & \\ & \swarrow & & \searrow & \\ \text{HO}_3\text{S} & & & & \text{GalNAc-ol} \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{Gal}(\beta 1-3) \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{NeuAc}(\alpha 2-3) \end{array} $
IVc-12	$ \begin{array}{ccccc} & & \text{Gal}(\beta 1-4) {}^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6) & & \\ & \swarrow & & \searrow & \\ \text{HO}_3\text{S} & & & & \text{GalNAc-ol} \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{Gal}(\beta 1-3) \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{NeuAc}(\alpha 2-3) \end{array} $
IVc-19	$ \begin{array}{ccccc} & & \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-6) & & \\ & \swarrow & & \searrow & \\ \text{HO}_3\text{S} & & & & \text{GalNAc-ol} \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{Gal}(\beta 1-3) \\ & & & & \swarrow \\ & & & & \text{NeuAc}(\alpha 2-3) \end{array} $

Sulfation of Methylglycosides—Three different methylglycosides containing GlcNAc residues were used as sulfate accep-



For this study, we used the oligosaccharide-alditols OS1 and



SCHEME 1. Sulfation of oligosaccharide-alditols OS1 and OS2 by microsomal sulfotransferases from human bronchial mucosa. The mucin carbohydrate chains can be substrates for either a Gal-3-O-sulfotransferase or for a GlcNAc-6-O-sulfotransferase. The Gal-3-O-sulfotransferase is active on terminal Gal residues. The GlcNAc-6-O-sulfotransferase is active on terminal GlcNAc residues, but this type of sulfation is inhibited by prior β 1-4 galactosylation.

OS2 at a molar concentration of about 1 mM. GlcNAc β 1-O-Met had an important inhibitory effect on the sulfation of OS2 but no effect on the sulfation of OS1 (Fig. 6). The sulfation of OS2 was 50–66% lower when 1–33 mM GlcNAc β 1-O-Met was added in the incubation mixture. These data proved that the same enzyme was responsible for the 6-O-sulfation of GlcNAc β 1-O-Met and OS2. The 3-O-sulfation of OS1 was not affected by the presence of GlcNAc β 1-O-Met. These results prove that the GlcNAc-6-O-sulfotransferase characterized in the present work is different from the Gal-3-O-sulfotransferase described by Lo-Guidice *et al.* (26). This GlcNAc-6-O-sulfotransferase has more affinity for carbohydrate chains with a terminal GlcNAc residue than for GlcNAc β 1-O-Met since oligosaccharide sulfation is not inhibited completely by high concentrations of GlcNAc β 1-O-Met.

For the 6-O-sulfation of GlcNAc β 1-3Gal-O-Met, we had a standard that was a gift from K. L. Matta. Using this standard, we could show that sulfation of GlcNAc β 1-3Gal-O-Met occurred on the C-6 of the terminal GlcNAc residue, resulting from the action of a GlcNAc-6-O-sulfotransferase. GlcNAc β 1-O-Met also inhibited the 6-O-sulfation of this component (data not shown), suggesting that the same enzyme was responsible for the sulfation of GlcNAc β 1-O-Met and GlcNAc β 1-3Gal-O-Met.

Galactosylation of $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met and IVc-19 by Human Microsomal Galactosyltransferase

As $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$ may be a component of a sulfated *N*-acetylglucosamine unit, it was interesting to determine whether this sulfated sugar could be an acceptor for a micro-

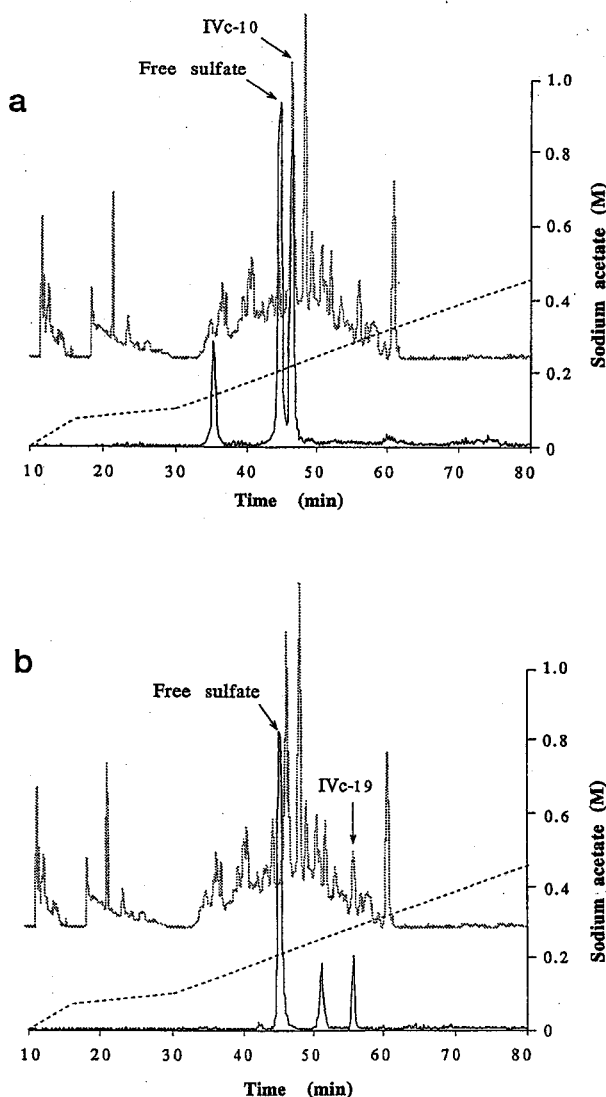


FIG. 5. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing ^{35}S -labeled products enzymatically synthesized from fraction IIIc1 (panel a), fraction IIIc1 treated with *S. pneumoniae* β -galactosidase (panel b), and sulfated oligosaccharide-alditols (fraction IVc) from human respiratory mucins. Elution was performed using gradient II described under "Experimental Procedures." Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

somal galactosyltransferase. When GlcNAc β 1-O-Met was incubated first with [^{35}S]PAPS and microsomal preparation and then with UDP-Gal, the neosynthesized products analyzed by HPAEC in conditions described under "Experimental Procedures" using gradient I showed three main radiolabeled peaks (Fig. 7a). One was eluted at 9 min 30 s and corresponded to ^{35}S -labeled $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met. The free [^{35}S]sulfate peak was eluted at 11 min 30 s. The third peak was eluted at 4 min 36 s and probably resulted from the action of a galactosyltransferase on $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met.

To identify this product, we synthesized radiolabeled Gal β 1-4($\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met) by incubating $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met (synthesized according to Van Kuik *et al.* (30)) with UDP-[^3H]Gal in conditions described under "Experimental Procedures." The neosynthesized products were studied by HPAEC using gradient I (Fig. 7b). Two radiolabeled peaks were obtained. One peak was eluted at 3 min 18 s and was also present when the incubation mixture did not contain $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}\beta$ 1-O-Met. It corresponded to UDP-[^3H]Gal. The

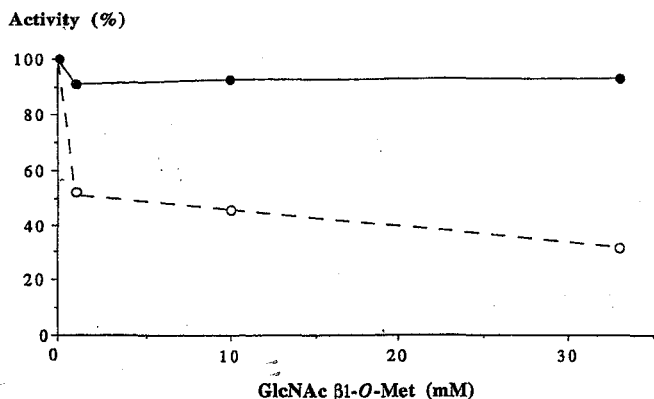


FIG. 6. Competition for sulfation between GlcNAc β 1-O-Met and oligosaccharide-alditols OS1 or OS2. The molar concentration of OS1 or OS2 used in the competition experiments was roughly estimated as 1 mM. These results show the residual sulfotransferase activity on oligosaccharide-alditols OS1 (●) or OS2 (○). The composition of the incubation mixture was the same as described under standard assay conditions, except that different concentrations of GlcNAc β 1-O-Met (1–33 mM) were used.

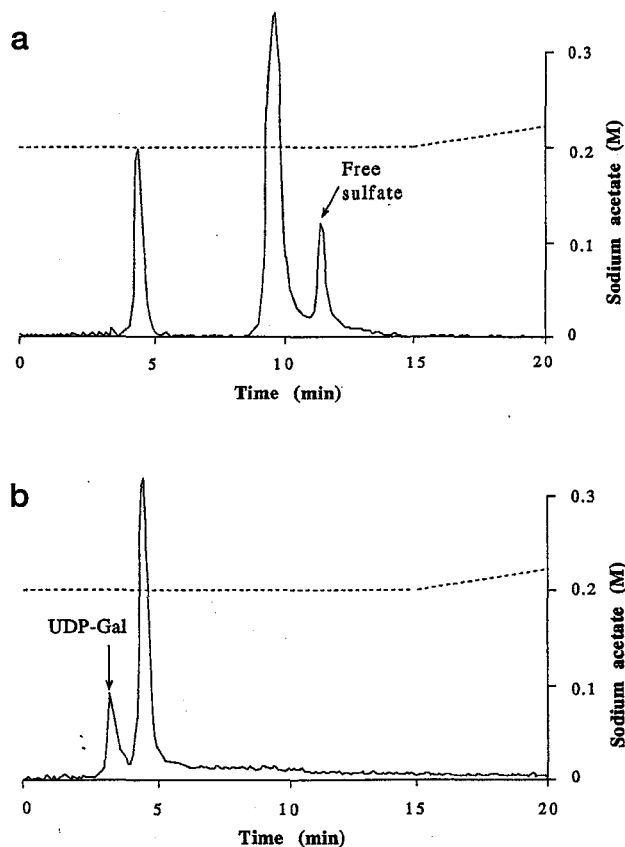


FIG. 7. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of (panel a) labeled products synthesized from GlcNAc β 1-O-Met, [35 S]PAPS, and UDP-Gal by microsomal sulfotransferase and galactosyltransferase and of (panel b) 3 H-labeled products synthesized from HO $_3$ S-6GlcNAc β 1-O-Met and UDP-[6- 3 H]Gal by β 1-4 galactosyltransferase from bovine milk. Elution was performed with gradient I described under "Experimental Procedures." Peaks were detected by radioactivity.

other peak was eluted at 4 min 36 s and corresponded to Gal β 1-4(HO $_3$ S-6)GlcNAc β 1-O-Met synthesized by the action of β 1-4 galactosyltransferase from bovine milk on HO $_3$ S-6GlcNAc β 1-O-Met. These results prove that a galactosyltransferase from human bronchial mucosa can transfer galactose from UDP-Gal on HO $_3$ S-6GlcNAc β 1-O-Met in a manner simi-

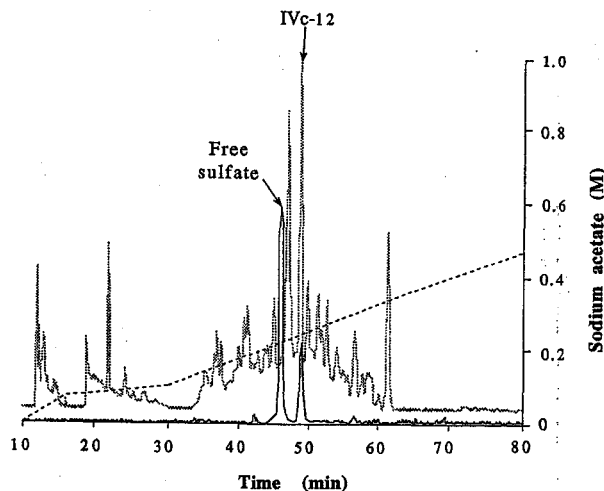


FIG. 8. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing 35 S-labeled products enzymatically synthesized from OS2 and sulfated oligosaccharide-alditols from human bronchial mucins (fraction IVc). Elution was performed with gradient II described under "Experimental Procedures." Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

lar to the β 1-4 galactosyltransferase from bovine milk.

These two galactosyltransferases were also active in a similar manner on GlcNAc β 1-O-Met (data not shown).

We also incubated OS2 (Table I) with [35 S]PAPS and microsomal preparation and then with UDP-Gal as explained under "Experimental Procedures" and analyzed the neosynthesized products by HPAEC using gradient II. Two main radiolabeled peaks were obtained. The first one was eluted at 45 min 24 s and corresponded to free [35 S]sulfate. The other peak was eluted at 49 min 30 s and coeluted with oligosaccharide IVc-12 (Table II) when the radiolabeled products were injected simultaneously with fraction IVc (Fig. 8). This indicates that a microsomal bronchial β 1-4 galactosyltransferase is active on a terminal HO $_3$ S-6GlcNAc residue from human mucin carbohydrate chains. No other neosynthesized peak but IVc-12 appeared on the elution profile, indicating that this oligosaccharide-alditol IVc-12 has not been 3-O-sulfated further on the terminal Gal residue.

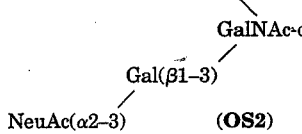
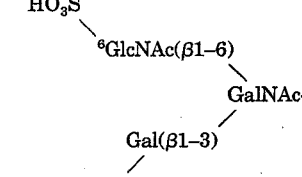
The action of the β 1-4 galactosyltransferase from human bronchial mucosa was compared on the substrates GlcNAc β 1-O-Met/HO $_3$ S-6GlcNAc-O-Met and OS2/IVc-19 (Table III) to check the influence of the 6-O-sulfation of GlcNAc on its further galactosylation. These four substrates, having a terminal non-reducing GlcNAc residue, 6-O-sulfated or not, were galactosylated. The activity of the galactosyltransferase was slightly lower when the terminal GlcNAc residue was 6-O-sulfated.

DISCUSSION

In a previous work, we have developed a performant protocol of purification of acidic carbohydrate chains from CF and non-CF mucins, based mainly on HPAEC, which has proved to be a suitable and reliable method to separate and to identify sulfated oligosaccharides (25). These data have shown that sulfation may occur either on the C-3 of a terminal galactose part of an N-acetylglucosamine chain or on the C-6 of an N-acetylglucosamine residue (25, 35). Therefore sulfation of human respiratory mucins involves at least two sulfotransferases. Recently, Lo-Guidice *et al.* (26) have characterized a galactose 3-O-sulfotransferase from human airways. We report here the characterization of a second sulfotransferase activity from human respiratory mucosa, responsible for the transfer of a sulfate group from PAPS to the C-6 of an N-acetylglucosamine

TABLE III

Activity of β 1-4 galactosyltransferase from human bronchial mucosa toward GlcNAc β 1-O-Met/ HO_3S -6GlcNAc β 1-O-Met and OS2/IVc-19. Assays conditions were as described in "Experimental Procedures."

Acceptor substrate	β 1-4 Galactosyltransferase activity pmol/mg protein/min
GlcNAc β 1-O-Met	7.23
HO_3S -6GlcNAc β 1-O-Met	6.28
GlcNAc(β 1-6)	6.97
 (OS2)	
 (IVc-19)	5.51

residue.

The activity and the properties of this sulfotransferase were determined as described by Lo-Guidice *et al.* (26). The chemical synthesis of a standard of 6-*O*-sulfated methyl- β -*N*-acetylglucosaminide (30) allowed us to demonstrate that the bronchial microsomal preparation contained a sulfotransferase capable of transferring a sulfate group from PAPS to the C-6 of a terminal GlcNAc residue.

The presence of free [^{35}S]sulfate in the reaction mixture was also observed in the previous work on the galactose 3-*O*-sulfotransferase (26) and in several other tissue extracts (36–38). The addition of NaF and AMP in sulfotransferase assays protects the PAPS from degradation, allowing an increase in the sulfotransferase activity (26, 39). The GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase is stimulated significantly by Mg^{2+} and more particularly by Mn^{2+} .

Using methyl- β -*N*-acetylglucosaminide as an acceptor, the optimal activity of the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase was obtained with 0.1% Triton X-100, 30 mM NaF, 20 mM Mn^{2+} , 5 mM AMP in a 30 mM MOPS/NaOH buffer at pH 6.7. The main difference in the enzymatic properties of the Gal-3-*O*- and GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase is their optimum pH.

Most of the sulfated or sialylated and sulfated oligosaccharide-alditols described previously have a core type 2. In 12 oligosaccharides 6-*O*-sulfation occurred on the GlcNAc part of this core, and in 2 cases, 6-*O*-sulfation occurred on a GlcNAc residue β 1-3 linked to the Gal part of core 1 (in 6 oligosaccharide-alditols, sulfation occurs on the C-3 of a terminal Gal residue contained in *N*-acetylglucosamine chains) (25). Therefore, in a first step, we tested the activity of the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase on two oligosaccharide-alditols, OS1 and OS2 (see Table I). After incubation of these oligosaccharide-alditols with the microsomal preparation (which contains both activities Gal-3-*O*- and GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase) and [^{35}S]PAPS, two sulfated products were obtained: OS1 sulfated on the C-3 of the terminal galactose, corresponding to IVc-10 (see Table II and ref. 25), and OS2 sulfated on the C-6 of the terminal GlcNAc residue corresponding to IVc-19. No sulfation occurred on the C-6 of the internal GlcNAc of OS1, leading to oligosaccharide-alditol IVc-12 present in human respiratory mucins. No sulfation occurred either on OS3 corresponding to core 3 of mucins. It should be stressed that in carbohydrate

chains of human respiratory mucins, no sulfation on GlcNAc residues β 1-3 linked to *N*-acetylglucosaminitol has been observed so far (25, 35).

Incubation of a pool of sialylated oligosaccharide-alditols IIIc1 from human respiratory mucins (25) with the microsomal preparation led to the sulfation of two oligosaccharide-alditols on the C-3 of galactose. Prior degalactosylation of IIIc1 with β -galactosidase is very limited due to sialylation of most Gal residues but allowed to obtain at least one oligosaccharide-alditol with a terminal nonreducing GlcNAc that could be 6-*O*-sulfated to generate IVc-19.

Four substrates having nonreducing terminal GlcNAc, 6-*O*-sulfated or not, could be galactosylated by the β 1-4 galactosyltransferase from human bronchial mucosa. This enzyme probably recognizes terminal GlcNAc, 6-*O*-sulfated or not, and the influence of the sulfate group on the activity of the galactosyltransferase is only moderate (Table III). As a matter of fact, terminal *N*-acetylglucosamine units from human respiratory mucins may be nonsulfated on the GlcNAc residue (25). Altogether, these results suggest that in the biosynthesis of *N*-acetylglucosamine chains containing 6-*O*-sulfated GlcNAc, the sulfation of GlcNAc has to precede galactosylation and that the *N*-acetylglucosamine chains cannot be acceptors for this GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase. These results are in good agreement with those observed for a 6-*O*-sulfotransferase from rat liver active on GlcNAc residues β 1-6 linked to mannose (40). It is likely that, *in vivo*, there is a competition between the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase and the β 1-4 galactosyltransferase, acting both on the same GlcNAc residue, and that once the Gal residue is linked to the GlcNAc, the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase is inactive.

Only two human sulfotransferases active on mucins have been characterized so far: a Gal-3-*O*-sulfotransferase (26) and a GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase, described here, both localized in respiratory mucosa. Other Gal-3-*O*- (39, 41) as well as GlcNAc-6-*O*-sulfotransferases (42–44) acting on animal mucin carbohydrate chains have also been described previously.

One of the best endothelial associated ligands for L-selectin is GlyCAM-1, a mucin-like glycoprotein (45) whose smallest *O*-glycans have a core 2 and an upper chain consisting of 6-*O*-sulfated derivatives of sLe x either on the GlcNAc or on the Gal residues of the Gal β 1-4GlcNAc chain (46). In the biosynthesis of GlyCAM-1, Crommie and Rosen (47) have observed that sialylation precedes both fucosylation and sulfation during biosynthesis. However, the temporal relationship between sulfation and fucosylation is still controversial (48, 49). In our case, no sulfation occurred using sLe x -O-Met or α 2-3-sialyl-*N*-acetylglucosamine as acceptor for the respiratory GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase.

Because two oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins were 6-*O*-sulfated on a GlcNAc β 1-3 linked to a Gal residue, we looked at the activity of this GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase on GlcNAc β 1-3Gal-O-Met. The neosynthesized product coeluted exactly with the corresponding 6-*O*-sulfated standard.

In conclusion, we have characterized a GlcNAc-sulfotransferase in human respiratory mucosa which transfers sulfate to the C-6 position of terminal GlcNAc residues of carbohydrate chains from human respiratory mucins and which can be substituted further by a galactose residue to produce Gal β 1-4(HO_3S -6)GlcNAc. This enzyme is inactive on *N*-acetylglucosamine chains, suggesting that 6-*O*-sulfation of GlcNAc has to precede galactosylation during mucin-type oligosaccharide biosynthesis. The same results have been observed for a GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase from rat liver acting on GlcNAc β 1-6Man sequences (40). Structural determinations of oligosac-

charide-alditols isolated from CF and non-CF mucins have shown that CF mucins were predominantly 6-*O*-sulfated on GlcNAc, whereas non-CF mucins may be more 3-*O*-sulfated on Gal (25, 35). Enzymatic properties and K_m of the two sulfotransferases responsible for sulfation of respiratory mucins are rather similar except for their optimum pH. The GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase described here has an optimal pH (6.7) higher than that of the Gal-3-*O*-sulfotransferase described previously (6.1) (26). This observation is interesting within the context of CF since some reports have suggested that mutations of CFTR (especially $\Delta F508$) could be responsible for defective acidification of the *trans*-Golgi/*trans*-Golgi network pH (whose normal pH is 6.0) leading to modifications in the sulfation and glycosylation processes and notably to hyperactivity of some sulfotransferases (13, 14). Altogether these results suggest that the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase described here might be responsible for the predominance of 6-*O*-sulfation in CF respiratory mucins (25) and for oversulfation of CF mucins, which has been recently shown to be a primary defect (21).

Acknowledgments—We are indebted to Prof. J. J. Lafitte for kindly providing human respiratory mucosa and to Dr. K. L. Matta for the sulfated substrate HO₃S-6GlcNAc β 1-3Gal-*O*-Met. We thank Dr. Yves Plancke for running the NMR spectra.

REFERENCES

- Lamblin, G., Lhermitte, M., Klein, A., Houdret, N., Scharfman, A., Ramphal, R., and Roussel, P. (1991) *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S19–S24
- Gendler, S. J., and Spicer, A. P. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 607–634
- Porchet, N., Pigny, P., Buisine, M. P., Debailleul, V., Degand, P., Laine, A., and Aubert, J. P. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 800–805
- Roussel, P., and Lamblin, G. (1996) in *Glycoproteins and Disease* (Montreuil, J., Vliegthart, J. F. G., and Schachter, H., eds) pp. 351–393, Elsevier, Amsterdam
- Roussel, P., Lamblin, G., and Ramphal, R. (1996) in *Environmental Impact on the Airways, from Injury to Repair* (Chrétien J., and Dussier, D., eds) Vol. 93, pp. 437–469, Marcel Dekker, New York
- Højby, N. (1988) *Chest* **94**, 97S–103S
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plasvik, N., Chou, J. L., Drumm, M. C., Iannuzzi, M. C., Collins, F. C., and Tsui, L. C. (1989) *Science* **245**, 1066–1073
- Tabcharani, J. A., Chang, X. B., Riordan, J. R., and Hanrahan, J. W. (1991) *Nature* **352**, 628–631
- Riordan, J. R. (1993) *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 609–630
- Sferra, T. J., and Collins, F. S. (1993) *Annu. Rev. Med.* **44**, 133–144
- Welsh, M. J., and Smith, A. E. (1993) *Cell* **73**, 1251–1254
- Lukacs, G. L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X. B., Riordan, J. R., and Grinstein, S. (1994) *EMBO J.* **13**, 6076–6086
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D., and Al-Awqati, Q. (1991) *Nature* **352**, 70–73
- Barasch, J., and Al-Awqati, Q. (1993) *J. Cell Sci.* **17**, (suppl.) 229–233
- Lazatin, J. O., Glick, M. C., and Scanlin, T. F. (1994) *Glycosylation Dis.* **1**, 263–270
- Dosanjh, A., Lencer, W., Brown, D., Ausiello, D. A., and Stow, J. L. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, C360–C366
- Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J. M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G., and Roussel, P. (1993) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 323–334
- Boat, T. F., Cheng, P. W., and Wood, R. E. (1977) *Mod. Probl. Paediat.* **19**, 141–152
- Lamblin, G., Lafitte, J. J., Lhermitte, M., Degand, P., and Roussel, P. (1977) *Mod. Probl. Paediat.* **19**, 153–164
- Cheng, P. W., Boat, T. F., Ganfill, K., Yankaskas, J. R., and Boucher, R. C. (1989) *J. Clin. Invest.* **84**, 68–72
- Zhang, Y., Doranz, B., Yankaskas, J. R., and Engelhardt, J. F. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 2997–3004
- Sanders, W. J., Katsumoto, T. R., Bertzi, C. R., Rosen, S. D., and Kiessling, L. L. (1996) *Biochemistry* **35**, 14862–14867
- Koenig, A., Jain, R., Vig, R., Norgard-Sumnicht, K. E., Matta, K. L., and Varki, A. (1997) *Glycobiology* **7**, 79–93
- Krivan, H. C., Olson, L. D., Barile, M. F., Ginsburg, V., and Roberts, D. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9283–9288
- Lo-Guidice, J. M., Wieruszkeski, J. M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P., and Lamblin, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18794–18813
- Lo-Guidice, J. M., Perini, J. M., Lafitte, J. J., Ducourouble, M. P., Roussel, P., and Lamblin, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27544–27550
- Lamblin, G., Rahmoune, H., Wieruszkeski, J. M., Lhermitte, M., Strecker, G., and Roussel, P. (1991) *Biochem. J.* **275**, 199–206
- Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Cuvillier, O., Michalski, J. C., and Montreuil, J. (1992) *Biochimie (Paris)* **74**, 39–52
- Paulson, J. C., Prieels, J. P., Glasgow, L. R., and Hill, R. L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5617–5624
- Van Kuik, J. A., Breg, J., Kolsteeg, C. E. M., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G. (1978) *FEBS Lett.* **221**, 150–154
- Jain, R. K., Xiao-Gao, L., and Matta, K. L. (1995) *Carbohydr. Res.* **268**, 279–285
- Cacan, R., Delannoy, P., and Verbert, A. (1995) in *Methods on Glycoconjugates* (Verbert A., ed.) pp. 201–210, Harwood Academic Publishers, Switzerland
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fulimoto, E. K., Goke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
- Whittemore, R. M., Pearce, L. B., and Roth, J. A. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 464–471
- Lo-Guidice, J. M., Herz, H., Lamblin, G., Plancke, Y., Roussel, P., and Lhermitte, M. (1997) *Glycoconjugate J.* **14**, 113–125
- Suzuki, S., and Strominger, J. L. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 257–266
- DeLuca, S., and Silbert, J. E. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 2725–2729
- Miller, R. R., and Waechter, C. J. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 31–41
- Kuhns, W., Jain, R. K., Matta, K. L., Paulsen, H., Baker, M. A., Geyer, R., and Brockhausen, I. (1995) *Glycobiology* **5**, 689–697
- Spiro, R. G., Yasumoto, Y., and Bhoyroo, V. (1996) *Biochem. J.* **319**, 209–216
- Vavasseur, F., Dole, K., Yang, J., Matta, K. L., Myerscough, N., Corfield, A., Paraskeva, C., and Brockhausen, I. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 415–424
- Slomiany, A., Murty, V. L. N., Liau, Y. H., Carter, S. R., and Slomiany, B. L. (1988) *Arch. Oral Biol.* **33**, 669–676
- Carter, S. R., Slomiany, A., Gwozdziński, K., Liau, Y. H., and Slomiany, B. L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11977–11984
- Goso, Y., and Hotta, K. (1993) *Glycoconjugate J.* **10**, 226 (abstr.)
- Laski, L. A., Singer, M. S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, E. J., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S. R., and Rosen, S. D. (1992) *Cell* **69**, 927–938
- Hemmerich, S., Leffler, H., and Rosen, S. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12035–12047
- Crommie, D., and Rosen, S. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22614–22624
- Scudder, P. R., Shailubhai, K., Duffin, K. L., Streeter, P. R., and Jacob, G. S. (1994) *Glycobiology* **4**, 929–933
- Chandrasekaran, E. V., Jain, R. K., Larsen, R. D., Wlasichuk, K., and Matta, K. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 2925–2936

Résultats - Discussion

La GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine que nous avons caractérisée est active sur les résidus de GlcNAc en position terminale non réductrice, mais elle est inactive sur les résidus de GlcNAc internes, par exemple sur le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc. Par contre, ce disaccharide est un bon substrat pour la Gal-3-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine, conduisant à la synthèse d'un déterminant HO₃S-3Gal(β 1-4)GlcNAc. De plus, l'activité β 1-4-galactosyltransférase de muqueuse bronchique humaine est active sur les résidus HO₃S-6GlcNAc terminaux, ce qui signifie que la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase doit agir avant la β 1-4-galactosyltransférase durant la biosynthèse des chaînes glycaniques de mucines bronchiques humaines.

Les conditions optimales d'activité de la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine ont été déterminées dans un tampon Mops/NaOH 30 mM, pH 6,7, contenant 30 mM de NaF, 20 mM de Mn²⁺, 5 mM d'AMP et 0,1 % de Triton X-100. Elles sont proches de celles de la Gal-3-*O*-sulfotransférase, excepté le pH optimal qui est plus basique pour la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase (6,7 contre 6,1 pour la Gal-3-*O*-sulfotransférase). Les expériences de compétition nous ont permis de vérifier que ces deux enzymes étaient bien distincts. En tenant compte de la prépondérance de la 6-*O*-sulfatation dans les mucines bronchiques CF [Lo-Guidice *et al.*, 1994] et de l'augmentation de pH observée par Barasch *et al.* [1991, 1993] au niveau du trans-Golgi et du réseau transgolgien des cellules de sujets CF, ces résultats pourraient permettre d'expliquer l'augmentation de l'activité de la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase et l'hypersulfatation des mucines bronchiques de patients CF.

Ce travail est la première description d'une activité GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine agissant sur les chaînes glycaniques de mucines. Cet enzyme est susceptible de participer à la biosynthèse d'épitopes glycaniques sulfatés en C6 sur les résidus de GlcNAc, comme par exemple le 6-sulfo sialyl Le^x. Ce déterminant glycanique semble être fortement exprimé dans les mucines bronchiques de patients CF ; il est également le meilleur ligand de la L-sélectine. Nous nous sommes donc intéressée, dans la suite de notre travail, à la biosynthèse des déterminants glycaniques sulfatés et/ou sialylés dérivés de l'épitope Le^x par les transférases de muqueuse bronchique humaine.

II. Étude de la séquence de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant Le^x par les transférases de la muqueuse bronchique humaine

Les chaînes glycaniques de mucines bronchique humaines peuvent contenir le déterminant Le^x, mais aussi ses dérivés sialylés et/ou sulfatés, sialyl Le^x, 3-sulfo Le^x (sulfaté en C3 sur le résidu de Gal terminal), 6-sulfo Le^x (sulfaté en C6 sur le résidu de GlcNAc interne), et 6-sulfo sialyl Le^x. Les résultats contradictoires décrits dans la littérature nous ont amenée à étudier la séquence d'action des fucosyl-, sialyl-, galactosyl- et sulfotransférases de muqueuse bronchique humaine intervenant dans cette biosynthèse. Des fractions microsomales ont été préparées à partir de fragments de muqueuse bronchique humaine macroscopiquement saine, prélevés lors de lobectomies ou de pneumectomies réalisées chez des patients atteints de cancers bronchiques, de la même manière que pour l'étude de l'activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase.

La spécificité de substrat (et donc la séquence d'action) des activités α 1-3-fucosyl-, α 2-3-sialyl-, β 1-4-galactosyl- et GlcNAc-6-O-sulfotransférases de muqueuse bronchique humaine a été étudiée en procédant à l'incubation des fractions microsomales avec divers intermédiaires de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés du Le^x et des nucléotides-sucres marqués ($[^{14}\text{C}]\text{CMP-NeuAc}$, $[^3\text{H}]\text{GDP-Fuc}$, $[^3\text{H}]\text{UDP-Gal}$, $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$). Les produits marqués néosynthétisés ont été identifiés par la technique d'HPAEC-PAD couplée à une détection de la radioactivité.

Nos résultats ont fait l'objet d'un article intitulé : «Sequential biosynthesis of sulfated and/or sialylated Lewis x determinants by transferases of human bronchial mucosa. (1999) *Glycobiology*, 9, 1199-1211» .

Sequential biosynthesis of sulfated and/or sialylated Lewis x determinants by transferases of the human bronchial mucosa

Sophie Degroote, Marie-Paule Ducourouble, Philippe Roussel and Geneviève Lamblin¹

Unité INSERM n° 377, Place de Verdun, F-59045 Lille, France

Received on December 23, 1998; revised on April 9, 1999; accepted on April 17, 1999

The structural determination of sulfated carbohydrate chains from a cystic fibrosis patient respiratory mucins has shown that sulfation may occur either on the C-3 of the terminal Gal, or on the C-6 of the GlcNAc residue of a terminal *N*-acetylglucosamine unit. The two enzymes responsible for the transfer of sulfate from PAPS to the C-3 of Gal or to the C-6 of GlcNAc residues have been characterized in human respiratory mucosa. These two enzymes, in conjunction with fucosyl- and sialyltransferases, allow the synthesis of different sulfated epitopes such as 3-sulfo Lewis x (with a 3-*O*-sulfated Gal), 6-sulfo Lewis x and 6-sulfo-sialyl Lewis x (with a 6-*O*-sulfated GlcNAc). In the present study, the sequential biosynthesis of these epitopes has been investigated using microsomal fractions from human respiratory mucosa incubated with radiolabeled nucleotide-sugars or PAPS, and oligosaccharide acceptors, mostly prepared from human respiratory mucins. The structures of the radiolabeled products have been determined by their coelution in HPAEC with known oligosaccharidic standards. In the biosynthesis of 6-*O*-sulfated carbohydrate chains by the human respiratory mucosa, the 6-*O*-sulfation of a terminal nonreducing GlcNAc residue precedes β 1–4-galactosylation, α 2–3-sialylation (to generate 6-sulfo-sialyl-*N*-acetylglucosamine), and α 1–3-fucosylation (to generate the 6-sulfo-sialyl Lewis x determinant). The 3-*O*-sulfation of a terminal *N*-acetylglucosamine may occur if this carbohydrate unit is not substituted. Once an *N*-acetylglucosamine unit is synthesized, α 1–3-fucosylation of the GlcNAc residue to generate a Lewis x structure blocks any further substitution. Therefore, the present study defines the pathways for the biosynthesis of Lewis x, sialyl Lewis x, sulfo Lewis x, and 6-sulfo-sialyl Lewis x determinants in the human bronchial mucosa.

Key words: biosynthesis/bronchial mucins/cystic fibrosis/6-sulfo-sialyl Lewis x/transferases

Introduction

Human respiratory mucins consist of a broad family of high molecular weight and polydisperse *O*-glycosylproteins synthesized by specialized cells from the bronchial mucosa. Their peptide diversity stems from the expression of several genes (*MUC2*, 4, 5AC, 5B, 7, and 8) (Bobek *et al.*, 1993; Jeffery and Li, 1997; Shankar *et al.*, 1997; Desseyn *et al.*, 1998) but the mucin heterogeneity is essentially due to post-translational phenomena, mostly *O*-glycosylation but also sulfation (Roussel and Lamblin, 1996). These phenomena lead to a remarkable diversity of carbohydrate chains, which allows the binding of inhaled microorganisms. These pathogens are then eliminated by the activity of the mucociliary system (Roussel and Lamblin, 1996).

Mucins are the most important compounds of the mucus layer. They are responsible for its rheological properties. Changes in the carbohydrate sequences of respiratory mucins could modify the mucus properties, leading to a nonefficient mucociliary clearance and to bacterial colonization and infection, as observed in cystic fibrosis (CF) and chronic bronchitis.

Cystic fibrosis is the most frequent autosomal recessive disease among Caucasians and is characterized in its most typical form by mucus hypersecretion and severe chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*. This disease is due to mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), an apical membrane chloride channel (Riordan, 1993) that affects several other epithelial channels or transporters. Δ F508 is the most frequent mutation in CF patients and prevents CFTR from exiting the endoplasmic reticulum (Pind *et al.*, 1994). It has been known for many years that there were abnormalities in glycosylation and sulfation of various glycoconjugates in CF. Several studies have shown that respiratory and salivary mucins secreted by CF patients as well as mucins synthesized by CF nasal epithelial cells were oversulfated (Roussel *et al.*, 1975; Lamblin *et al.*, 1977; Boat *et al.*, 1977; Cheng *et al.*, 1989; Carnoy *et al.*, 1993). More recently, Zhang *et al.* (1995), using a model of human xenograft which eliminates the influence of infection and inflammation, have suggested that the increased sulfate content of CF mucins might be a primary defect. These abnormalities may be related to a defective acidification of the trans-Golgi/trans-Golgi network in CF cells, due to mislocation of mutated CFTR, and leading to modifications in the sulfation and glycosylation processes (Barasch *et al.*, 1991; Barasch and Al-Awqati 1993; Dosanjh *et al.*, 1994). However, Pasyk and Fokett (1997) have recently suggested that CFTR could modulate the amount of adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) in the Golgi apparatus and that mutated CFTR

¹To whom correspondence should be addressed

Table I. GlcNAc-6-O-sulfotransferase assays with human bronchial microsomes

Substrate for GlcNAc-6- <i>O</i> -sulfation	GlcNAc-6- <i>O</i> -sulfated standard	GlcNAc-6- <i>O</i> -sulfotransferase relative activity (%) ^a
GlcNAcβ1- <i>O</i> -Met*	HO ₃ S-6GlcNAcβ1- <i>O</i> -Met	100
Fuc(α1-3)GlcNAcβ1- <i>O</i> -Met	No standard	0
Gal(β1-4)[Fucα1-3]GlcNAc	No standard	0
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc	No standard	0
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)[Fucα1-3]GlcNAc	No standard	0
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) OS1 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc-ol	HO₃S Gal(β1-4)⁶GlcNAc(β1-6) IVc-12 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc-ol	0
GlcNAc(β1-6) OS2 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc-ol	HO₃S ⁶GlcNAc(β1-6) IVc-19 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc-ol	27

^aRelative rates for each are expressed as a percentage of the incorporation with GlcNAc β 1-*O*-Met (17.27 pmol/mg of protein/min).

could be responsible for the accumulation of PAPS in the Golgi and for mucin hypersulfation.

In addition to oversulfation, recent studies on salivary and bronchial mucins from CF patients have shown an increased content of sialic acid (Barasch *et al.*, 1991; Barasch and Al-Awqati, 1993; Carnoy *et al.*, 1993; Dosanjh *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Pasyk and Foskett, 1997; Davril *et al.*, 1999), and in the case of CF bronchial mucins, of sialyl Lewis x (sLe^x) determinants that might be related to the strong inflammatory response observed in this disease (Davril *et al.*, 1999).

Such posttranslational modifications may lead to abnormal carbohydrate chains in respiratory mucins specifically recognized by *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* that usually colonize the CF lung and are responsible for most of the morbidity and mortality of the disease (Høiby, 1988).

The structural determination of mucin carbohydrate chains from CF patients has shown the presence of various complex structures such as the sialyl Lewis x (sLe^x), the 3-sulfo Lewis x (3-sulfo Le^x), and the 6-sulfo-sialyl Lewis x (6-sulfo-sLe^x) determinants (Lo-Guidice *et al.*, 1994). The role of such determinants in the colonization of the CF airways by *Pseudomonas aeruginosa* has not yet been established. Moreover, the biosynthesis of these determinants remains controversial (Scudder *et al.*, 1994; Crommie and Rosen, 1995).

In order to ultimately study the respective roles of CFTR abnormality and lung inflammation on the expression of the sialylated and/or sulfated determinants of CF mucins, we have analyzed the biosynthesis of these different Le^x derivatives by microsomal fractions from human respiratory mucosa. The synthesized products were characterized by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric (HPAEC-PAD) and radioactivity detection. The present work gives new information about the specificity of the various fuc-

osyl-, sialyl-, and sulfotransferases involved in the biosynthesis of complex Le^x structures.

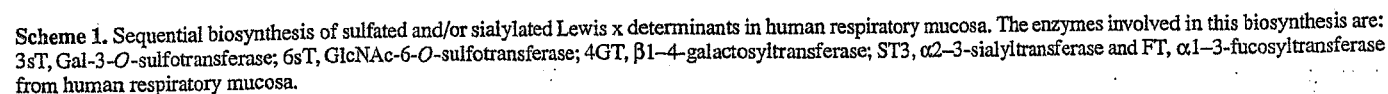
Results

6-O-sulfation of carbohydrate acceptors having a terminal nonreducing GlcNAc residue

As reported previously (Degroote *et al.*, 1997), the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase from human respiratory mucosa is able to catalyze the transfer of a sulfate group onto the C-6 of GlcNAc β 1-*O*-Met (which leads to HO₃S-6GlcNAc β 1-*O*-Met) and on the C-6 of the terminal GlcNAc residue of OS2 (which leads to oligosaccharide-alditol IVc-19) (Table I). This enzyme is not active anymore after the action of a β 1-4-galactosyltransferase from human respiratory mucosa which adds a Gal residue linked β 1-4 to this GlcNAc (Degroote *et al.*, 1997). Thus, when OS1 (with a terminal Gal residue on the upper branch) was incubated with [³⁵S]PAPS and bronchial microsomal fractions (which contained both GlcNAc-6-*O*- and Gal-3-*O*-sulfotransferase activities), the radiolabeled product which was obtained coeluted with oligosaccharide-alditol IVc-10 (Table II) which corresponded to OS1 with a sulfate group on the C-3 of the terminal Gal residue but there was no peak corresponding to oligosaccharide-alditol IVc-12 indicating that there was no direct sulfation of the GlcNAc residue of OS1 (Table I, Scheme 1).

Other substrates were assayed for 6-*O*-sulfation. No sulfation could be obtained with Fuc(α 1-3)GlcNAc β 1-*O*-Met, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, indicating that once the GlcNAc residue is substituted (by a Gal or a Fuc residue), GlcNAc-6-*O*-sulfation cannot occur anymore. The only peak which was observed on the HPAEC elution profile

^aRelative rates for each acceptor are expressed as a percentage of the incorporation with Galβ1-*O*-Met (18.44 pmol/mg of protein/min).



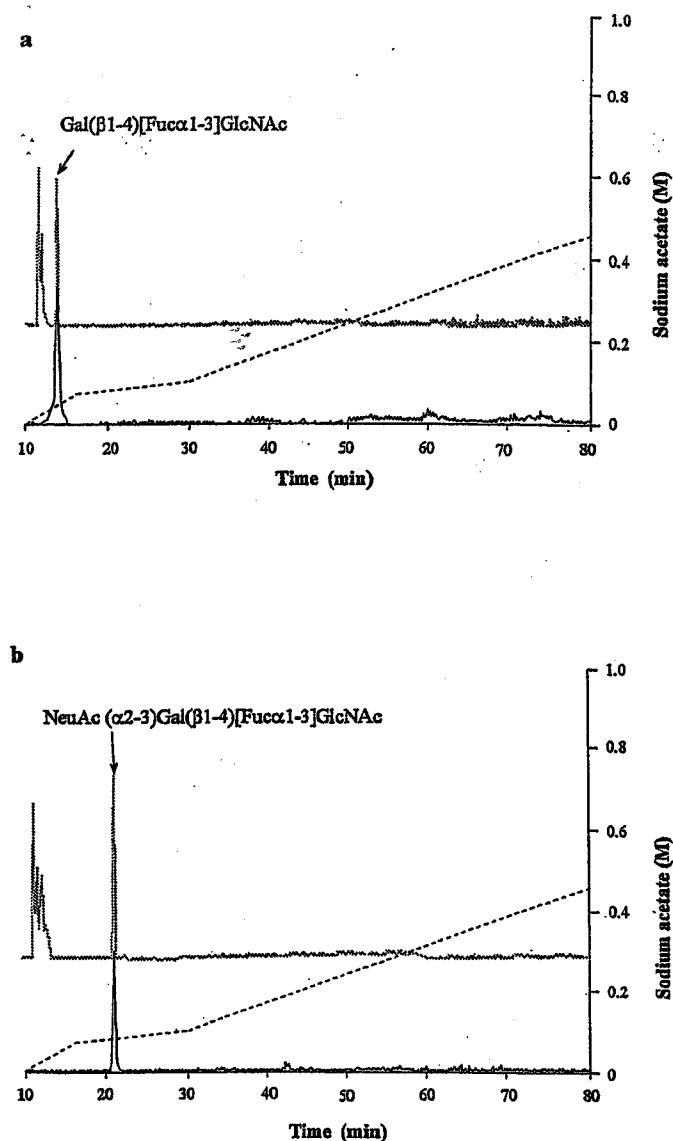


Fig. 1. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing [^3H]-labeled products enzymatically synthesized from [^3H]GDP-Fuc and Gal(β 1-4)GlcNAc (a) or NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc (b), and unlabeled α 1-3-fucosylated standards: Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc and NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, respectively. Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

was the free [^{35}S]sulfate peak, at 11 min 30 s using gradient I or at 45 min 24 s when gradient III was used. The activity of the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase on the different substrates which were tested is described in Table I.

These data indicate that, in mucin-type oligosaccharide biosynthesis, the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase must act on a non-substituted terminal GlcNAc residue.

3-O-Sulfation of carbohydrate acceptors having a terminal nonreducing Gal residue

As already mentioned, Gal β 1-*O*-Met and oligosaccharide-alditol OS1 with a terminal *N*-acetylglucosamine unit were sul-

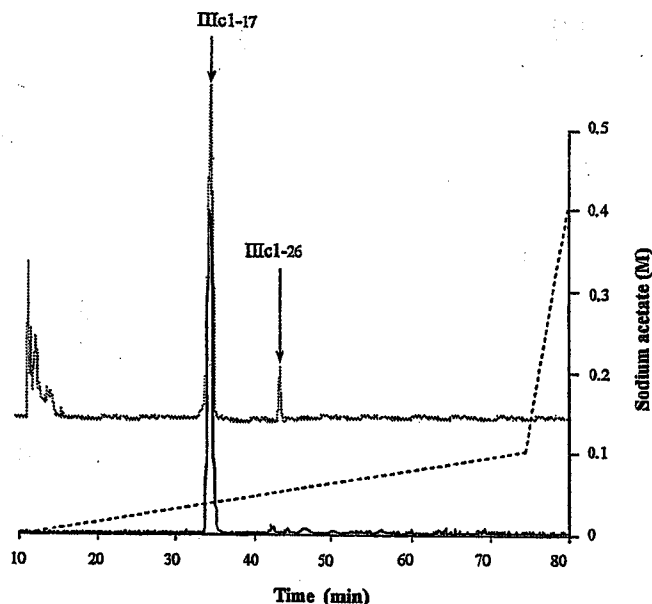


Fig. 2. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing [^3H]-labeled products enzymatically synthesized from [^3H]GDP-Fuc and oligosaccharide-alditol IIIc1-26, and unlabeled α 1-3-fucosylated standard oligosaccharide-alditol IIIc1-17. Elution was performed with gradient II described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

fated by the Gal-3-*O*-sulfotransferase characterized by Lo-Guidice *et al.* (1995). However, this enzyme was not active on terminal Le x structures: when microsomal fractions were incubated with Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc-*O*-Met and [^{35}S]PAPS, no Gal-3-*O*-sulfation could be observed (Table II). Fraction IIc (which contains in particular an oligosaccharide-alditol with a core type 2, a Le x determinant on the upper branch and a NeuAc(α 2-3)Gal unit on the lower branch) was also used as acceptor. No radiolabeled peak coeluted with IVc-2, which means that the bronchial Gal-3-*O*-sulfotransferase is not active on a Le x determinant (Table II). The activity of the Gal-3-*O*-sulfotransferase on the different substrates which were tested is described in Table II.

Fucosylation of different carbohydrate determinants by the α 1-3-fucosyltransferase activity of the human bronchial mucosa

GlcNAc β 1-*O*-Met and HO $_3$ S-6GlcNAc β 1-*O*-Met were first used to test the α 1-3-fucosyltransferase activity of the bronchial microsomal fractions (Table III). No radiolabeled peak could be observed on the HPAEC elution profile, indicating that the transfer of a Fuc residue from GDP-Fuc on the C-3 of a terminal GlcNAc (6-*O*-sulfated or not) was not possible. No peak corresponding to radiolabeled [^3H]GDP-Fuc appeared on the elution profile; this compound was eluted with higher concentrations of sodium acetate. Similarly, no fucosylation of the oligosaccharide-alditols OS2 (with a terminal GlcNAc residue) and IVc-19 (with a terminal HO $_3$ S-6GlcNAc residue) could be obtained (Table III).

When Gal(β 1-4)GlcNAc was incubated with bronchial microsomal fractions and radiolabeled [^3H]GDP-Fuc, the HPAEC elution profile showed a characteristic radiolabeled peak at 13 min 48 s (Figure 1a). In order to find out the position

Table III. α 1-3-fucosyltransferase assays with human bronchial microsomes

Substrate for α 1-3-fucosylation	α 1-3-fucosylated standard	α 1-3-fucosyltransferase relative activity (%) ^a
GlcNAc β 1-O-Met	Fuc(α 1-3)GlcNAc β 1-O-Met	0
HO ₃ S-6GlcNAc β 1-O-Met	No standard	0
Gal(β 1-4)GlcNAc*	Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc	100
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc	172
OS2 $\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	No standard	0
IIIc1-26 $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	IIIc1-17 $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol	248
IVc-10 HO_3S $\diagdown$ $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	IVc-2 HO_3S $\diagdown$ $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol	54
IVc-12 HO_3S $\diagdown$ $\text{Gal}(\beta 1-4)^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	IVc-5 HO_3S $\diagdown$ $\text{Gal}(\beta 1-4)^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol	237
IVc-19 HO_3S $\diagdown$ $^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	No standard	0
IVc-23 HO_3S $\diagdown$ $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ GalNAc-ol $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$	IVc-14 HO_3S $\diagdown$ $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)^6\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ $\diagdown$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol	75

^aRelative rates for each acceptor are expressed as a percentage of the incorporation with Gal(β 1-4)GlcNAc (0.23 pmol/mg of protein/min).

of the Fuc residue on this radiolabeled product, it was coinjected with a nonlabeled Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, which was visualized by PAD. The neosynthesized fucosylated product coeluted exactly with Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, indicating that a bronchial α 1-3-fucosyltransferase activity was able to transfer a Fuc residue from [³H]GDP-Fuc onto the C-3 of the GlcNAc residue of a type 2 chain (Figure 1a). In our experimental conditions, the absence of any neosynthesized peak corresponding to Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc suggested that α 1-2-fucosyltransferases were absent or expressed at a very low level as compared to the α 1-3-fucosyltransferase activity.

When NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc was incubated with microsomal fractions and radiolabeled [³H]GDP-Fuc, a characteristic radiolabeled peak was observed, which was eluted at 20 min 54 s (Figure 1b). When the radiolabeled products were coinjected with nonlabeled NeuAc(α 2-3)Gal[Fuc α 1-3]GlcNAc, the characteristic peak at 20 min 54 s coeluted with this standard. This proved that the α 1-3-fucosyltransferase activity was active on a α 2-3-sialylated type 2 N-acetylglucosamine unit. Similarly, the α 1-3-fucosyltransferase activity was tested on oligosaccharide-alcohol IIIc1-26, which has an α 2-3-sialylated type 2 unit on the upper branch (Table III). The HPAEC elution profile showed a characteristic radiolabeled peak at 33

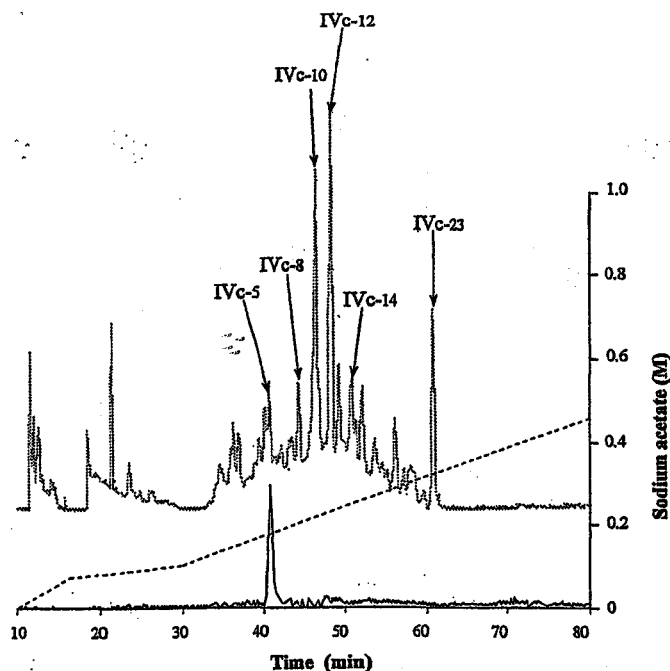


Fig. 3. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing [^3H]-labeled products enzymatically synthesized from [^3H]GDP-Fuc and oligosaccharide-alditol IVc-12, and unlabeled oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins (fraction IVc). Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

min 54 s, which coeluted with oligosaccharide-alditol IIIc1-17 (Figure 2). This oligosaccharide has the same structure as IIIc1-26, with a Fuc residue ($\alpha 1-3$) linked to the internal GlcNAc residue (Table III). Altogether, these results indicate that the $\alpha 1-3$ -fucosyltransferase activity from human bronchial mucosa is active on a type 2 *N*-acetylglucosamine unit, $\alpha 2-3$ -sialylated or not, but is inactive on terminal GlcNAc or $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$ residues.

Moreover, $\beta 1-4$ -galactosylation was possible on terminal GlcNAc or $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$ residues, but not on Fuc($\alpha 1-3$)GlcNAc $\beta 1-O$ -Met, indicating that the $\alpha 1-3$ -fucosyltransferase activity from human bronchial mucosa was active after the action of the $\beta 1-4$ -galactosyltransferase (data not shown).

In order to determine whether an internal $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$ residue in a type 2 *N*-acetylglucosamine unit may affect $\alpha 1-3$ -fucosylation, the oligosaccharide-alditol IVc-12 which has a Gal($\beta 1-4$)[$\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$] structure on the upper branch (Table III) was incubated with microsomal fractions and [^3H]GDP-Fuc (Table III). The elution profile showed a characteristic radiolabeled peak at 41 min 24 s which coeluted with oligosaccharide-alditol IVc-5 (Figure 3); IVc-5 has the same structure as IVc-12 but with a Fuc residue ($\alpha 1-3$) linked to the internal $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$ residue (Table III). No $\alpha 1-2$ -fucosylation occurred on the terminal Gal residue, as proved by the absence of any radiolabeled oligosaccharide-alditol having the same retention time than IVc-8, the fucosylated derivative of

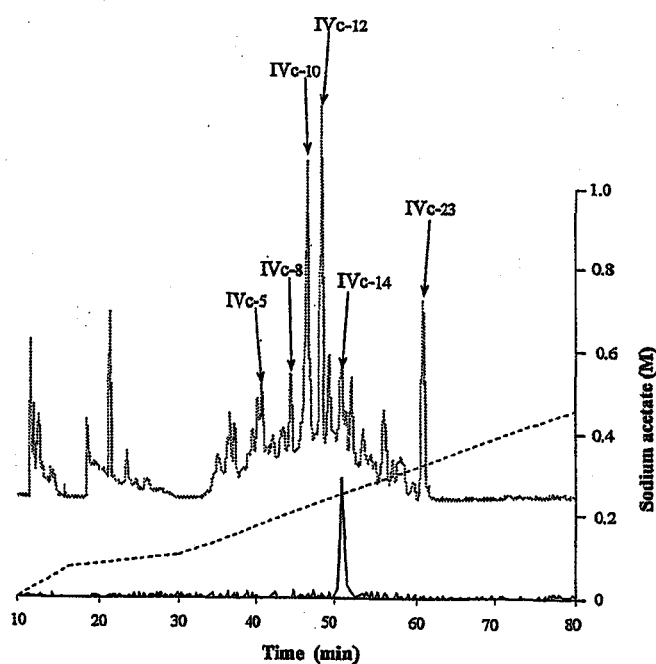


Fig. 4. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing [^3H]-labeled products enzymatically synthesized from [^3H]GDP-Fuc and IVc-23, and unlabeled oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins (fraction IVc). Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

IVc-5 with a Fuc residue linked ($\alpha 1-2$) to the terminal Gal residue.

These results suggest that, starting from a terminal GlcNAc residue, the enzymes responsible for the biosynthesis of a 6-sulfo Le^x determinant act in the following order: (1) GlcNAc-6-*O*-sulfation, (2) $\beta 1-4$ -galactosylation, and (3) $\alpha 1-3$ -fucosylation.

Similarly, the oligosaccharide-alditol IVc-23 (which has a NeuAc($\alpha 2-3$)Gal($\beta 1-4$)[$\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$] structure on the upper branch and a NeuAc($\alpha 2-3$)Gal disaccharide on the lower branch) (Table III) was incubated with microsomal fractions and [^3H]GDP-Fuc. The HPAEC elution profile of the neosynthesized product showed one radiolabeled peak (Figure 4), which had the same retention time as oligosaccharide-alditol IVc-14 (the fucosylated derivative of IVc-23 with a Fuc ($\alpha 1-3$) linked to the internal GlcNAc residue) (Table III). These results suggest that, in the biosynthesis of 6-sulfo- sLe^x , $\alpha 1-3$ -fucosylation of the GlcNAc residue of a terminal Gal($\beta 1-4$)GlcNAc unit occurs after the actions of GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase, $\beta 1-4$ -galactosyltransferase and Gal- $\alpha 2-3$ -sialylation. In fact, the $\alpha 1-3$ -fucosyltransferase from human bronchial mucosa is also active (1) on the GlcNAc residue of a terminal Gal($\beta 1-4$)GlcNAc unit, (2) on the GlcNAc residue of a terminal Gal($\beta 1-4$)[$\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc}$] unit, and (3) on the GlcNAc residue of a terminal NeuAc($\alpha 2-3$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc unit.

The influence of a sulfate group linked to the C-3 of the Gal residue of a *N*-acetylglucosamine unit on the α 1-3-fucosyl transferase activity was also tested. The enzyme was active on oligosaccharide-alditol IVc-10, which has a Gal(β 1-4)GlcNAc with a sulfate group on the C-3 of the terminal Gal residue on the upper branch (Table III) and led to the synthesis of oligosaccharide-alditol IVc-2 which has a terminal HO₃S-3Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc structure on the upper branch (data not shown).

As the Gal-3-*O*-sulfotransferase from human bronchial mucosa is not active on terminal Le^x structures, we can conclude that in the biosynthesis of the 3-sulfo Le^x, Gal-3-*O*-sulfation occurs before GlcNAc- α 1-3-fucosylation (Scheme 1). The relative activity of the α 1-3-fucosyltransferase on the different substrates which were used is described in Table III.

Action of α 2-3-sialyltransferase from human bronchial mucosa on oligosaccharidic acceptors

The α 2-3-sialyltransferase activity was first tested with Gal(β 1-4)GlcNAc. When microsomal fractions were incubated with this acceptor and radiolabeled [¹⁴C]CMP-NeuAc, the HPAEC elution profile, using gradient III, showed three radiolabeled peaks (Figure 5). Two of them were present when incubations were performed without any substrate; they were identified by coelution with nonlabeled standards whose retention times are known. The first radiolabeled peak, which was eluted at 21 min 4 s corresponded to free sialic acid. The one which was eluted at 47 min 30 s was identified as being [¹⁴C]CMP-NeuAc. The characteristic radiolabeled peak was eluted at 23 min 24 s and coeluted with the standard NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc. The α 2-3-sialyltransferase

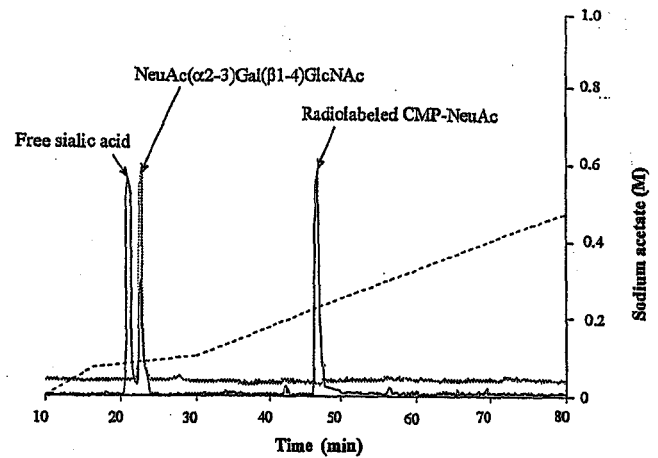


Fig. 5. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4 × 250 mm) of a mixture containing [¹⁴C]-labeled products enzymatically synthesized from [¹⁴C]CMP-NeuAc and oligosaccharide-alditol Gal(β 1-4)GlcNAc, and unlabeled NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc. Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

activity was also tested on oligosaccharide-alditol OS1, which has a Gal(β 1-4)GlcNAc unit on the upper branch (Table IV). When the radiolabeled products were fractionated by HPAEC using gradient III, three radiolabeled peaks were observed (Figure 6): two of them were not characteristic and corresponded to free sialic acid (retention time: 21 min 4 s), and to [¹⁴C]CMP-NeuAc (retention time: 47 min 30 s). A characteristic

Table IV. α 2-3-sialylation assays with human bronchial microsomes

Substrate for α 2-3-sialylation	α 2-3-sialylated standard	α 2-3-sialyltransferase relative activity (%) ^a
Gal β 1- <i>O</i> -Met	No standard	0
Gal(β 1-4)GlcNAc*	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc	100
Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc	0
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) OS1 GalNAc-ol	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) IIIc1-26 GalNAc-ol	190
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3) HO ₃ S Gal(β 1-4) ⁶ GlcNAc(β 1-6) IVc-12 GalNAc-ol	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3) HO ₃ S NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4) ⁶ GlcNAc(β 1-6) IVc-23 GalNAc-ol	85
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3) HO ₃ S Gal(β 1-4) ⁶ GlcNAc(β 1-6) Fuc(α 1-3) IVc-5 GalNAc-ol	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3) HO ₃ S NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4) ⁶ GlcNAc(β 1-6) IVc-14 Fuc(α 1-3) GalNAc-ol	0

^aRelative rates for each acceptor are expressed as a percentage of the incorporation with Gal(β 1-4)GlcNAc (41.07 pmol/mg of protein/min).

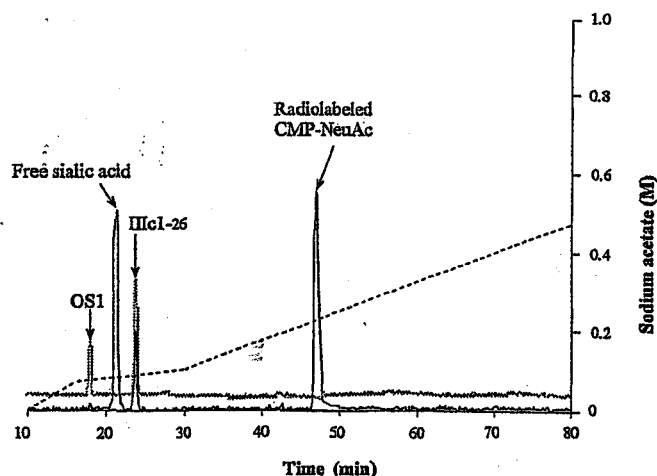


Fig. 6. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4×250 mm) of a mixture containing [^{14}C]-labeled products enzymatically synthesized from [^{14}C]CMP-NeuAc and oligosaccharide-alditol OS1, and unlabeled oligosaccharide-alditol IIIc1-26. Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

peak was eluted at 23 min 54 s. When the radiolabeled products were injected with the oligosaccharide-alditol IIIc1-26 (which has the same structure as OS1 with a NeuAc ($\alpha 2-3$) linked to the terminal Gal residue) (Table IV), the characteristic peak coeluted with IIIc1-26 (Figure 6); this proved that this $\alpha 2-3$ -sialyltransferase was active on terminal Gal residue of OS1.

In order to check if Gal- $\alpha 2-3$ -sialylation was possible on a terminal Gal($\beta 1-4$)[HO $_3$ S-6]GlcNAc unit, the oligosaccharide-alditol IVc-12 (Table IV) was incubated with microsomal fractions and radiolabeled [^{14}C]CMP-NeuAc. A neosynthesized radiolabeled peak coeluted with oligosaccharide-alditol IVc-23 (Figure 7), which has the same structure as IVc-12 with a NeuAc ($\alpha 2-3$) linked to the terminal Gal residue (Table IV). This result suggests that the $\alpha 2-3$ -sialyltransferase is also active on a terminal Gal residue of a Gal($\beta 1-4$)[HO $_3$ S-6]GlcNAc unit.

When microsomal fractions were incubated with radiolabeled [^{14}C]CMP-NeuAc and Gal($\beta 1-4$)[Fuc $\alpha 1-3$]GlcNAc, no characteristic radiolabeled peak was observed, the enzyme was not active on this substrate. The $\alpha 2-3$ -sialyltransferase activity was neither active on oligosaccharide-alditol IVc-5 (Table IV) nor on Gal $\beta 1-O$ -Met. The relative activity of the $\alpha 2-3$ -sialyltransferase on the different substrates which were used is indicated in Table IV.

These results suggest that Gal- $\alpha 2-3$ -sialylation occurs after GlcNAc-6-*O*-sulfation but before GlcNAc- $\alpha 1-3$ -fucosylation. Indeed, once there was a Fuc residue ($\alpha 1-3$) linked to the internal GlcNAc residue, the $\alpha 2-3$ -sialyltransferase was not active anymore (Scheme 1).

Discussion

The structural determination of oligosaccharide-alditols from a CF patient respiratory mucins has shown the presence of dif-

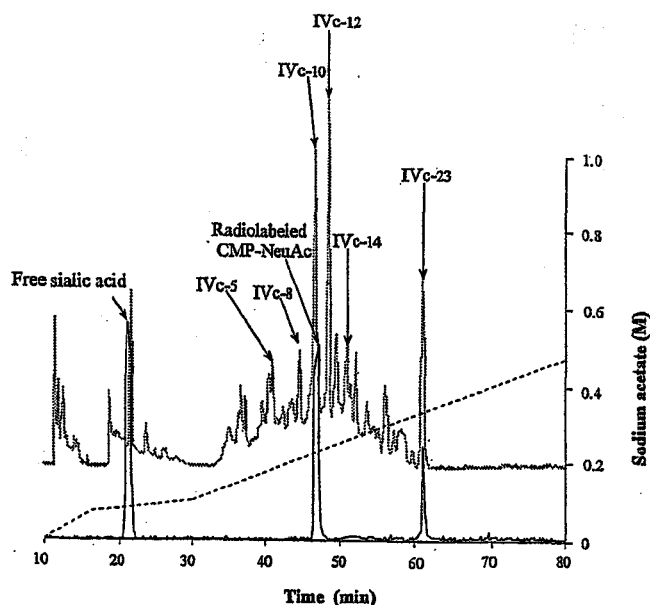


Fig. 7. HPAEC elution profile on a CarboPac PA-100 column (4×250 mm) of a mixture containing [^{14}C]-labeled products enzymatically synthesized from [^{14}C]CMP-NeuAc and IVc-12 and unlabeled oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins (fraction IVc). Elution was performed with gradient III described under *Materials and methods*. Peaks were detected by pulsed amperometry (dashed line) and by radioactivity (solid line).

ferent sulfated epitopes, such as terminal 3-sulfo Le x , 6-sulfo Le x , and 6-sulfo-sLe x structures (Lo-Guidice *et al.*, 1994). We report here the sequential biosynthesis of these structures in human respiratory mucosa.

Our analysis concerning the biosynthesis of 6-sulfo-sLe x argues that GlcNAc-6-*O*-sulfation is the first event, followed by β -galactosylation, $\alpha 2-3$ -sialylation and $\alpha 1-3$ -fucosylation (Scheme 1).

As reported before, the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase from human bronchial mucosa is only active on terminal GlcNAc residues (Degroote *et al.*, 1997). These results are in agreement with those obtained by Spiro *et al.* (1996) who characterized a GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase from rat liver. Recently, a human GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase was cloned by Uchimura *et al.* (1998b), based on the sequence homology to the cloned cDNA of mouse GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase (Uchimura *et al.*, 1998a). This enzyme was active on terminal GlcNAc residues and involved in the biosynthesis of NeuAc($\alpha 2-3$)Gal($\beta 1-4$)-[HO $_3$ S-6]GlcNAc and Gal($\beta 1-4$)[Fuc $\alpha 1-3$][HO $_3$ S-6]GlcNAc. This enzyme is strongly expressed in cerebrum, cerebellum, eye, pancreas, and lung of adult mice. Another report by Bowman *et al.* (1998) dealing with the identification of a GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase activity specific for lymphoid tissue indicates the requirement for a substrate with a terminal GlcNAc residue, suggesting that, as found for the GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase described here, sulfation precedes further biosynthetic assembly of 6-sulfo-sLe x .

The Gal-3-*O*-sulfotransferase from human respiratory mucosa was active on terminal Gal residues of Gal($\beta 1-4$)GlcNAc disaccharide from oligosaccharide-alditols carbohydrate chains (Lo-Guidice *et al.*, 1995). Our results showed that this enzyme was inactive if the internal GlcNAc residue was $\alpha 1-3$ -

fucosylated. Thus, in the biosynthesis of 3-sulfo Le^x, an α 1-3-fucosyltransferase acts after the action of the Gal-3-O-sulfotransferase (Scheme 1). These results are in good agreement with those of Chandrasekaran *et al.* (1997) who characterized two groups of Gal-3-O-sulfotransferases which were both inactive on terminal Le^x structures.

An α 2-3-sialyltransferase activity was also present in the microsomal fractions, adding *N*-acetylneuraminic acid on the terminal Gal residue of Gal(β 1-4)GlcNAc or Gal(β 1-4)[HO₃S-6]GlcNAc disaccharide (Table IV). Similar results were obtained by Spiro *et al.* (1996) concerning an α 2-3-sialyltransferase from rat liver. Moreover, the α 2-3-sialyltransferase from human bronchial mucosa was inactive on Le^x structures (with or without a sulfate group on the C-6 of the GlcNAc residue). Among the human α 2-3-sialyltransferases already cloned, ST3Gal III and ST3Gal IV use the disaccharide sequence Gal(β 1-4)GlcNAc as an acceptor to form NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc (Kitagawa and Paulson, 1994). These two enzymes are expressed in the human bronchial mucosa (unpublished observations).

Concerning the α 1-3-fucosyltransferase activity which was also present in the microsomal fractions, it was active on Gal(β 1-4)GlcNAc, Gal(β 1-4)[HO₃S-6]GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[HO₃S-6]GlcNAc and on HO₃S-3Gal(β 1-4)GlcNAc structures (Table III). Recent studies about the acceptor specificity of three human α 1-3/(4) fucosyltransferases (FucT-III, FucT-IV and FucT-V) (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1991; Weston *et al.*, 1992a) have shown that they have slightly different, but mainly overlapping substrate specificities (De Vries *et al.*, 1995; Chandrasekaran *et al.*, 1996a). FucT-III is mostly active on type 1 but also on type 2 units, sialylated or not. Concerning FucT-IV, neutral and GlcNAc-6-O-sulfated type 2 chains were good substrates whereas α 2-3-sialylated type 1 and 2 structures were poor acceptors. FucT-V was active on a broad variety of neutral and acidic substrates. The two last human α 1-3-fucosyltransferases that have been cloned, FucT-VI (Weston *et al.*, 1992b) and FucT-VII (Sasaki *et al.*, 1995), can both be involved in the biosynthesis of sLe^x epitopes (De Vries *et al.*, 1996; Britten *et al.*, 1998). However, a recent study of the expression of α 1-3-fucosyltransferases in human bronchial epithelial cells in secondary culture has shown that only FucT-III and FucT-IV were expressed in these cells (Emery *et al.*, 1997). FucT-V, FucT-VI, and FucT-VII have not been detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in human bronchial epithelial cells in secondary culture (unpublished observations). Thus, our results suggest that the α 1-3-fucosyltransferases involved in the biosynthesis of sLe^x and 6-sulfo-sLe^x epitopes by human bronchial mucosa are FucT-III and FucT-IV (Davril *et al.*, 1999).

The absence of α 1-2-fucosyltransferase activity was quite unexpected because the two cloned enzymes FucT-I and FucT-II (Larsen *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 1995) mRNAs were detected in human bronchial epithelial cells in secondary culture (Emery *et al.*, 1997). When IVc-12 (which has a Gal(β 1-4)[HO₃S-6]GlcNAc on the upper branch) was incubated with microsomal fractions and [³H]GDP-Fuc, the only neosynthesized product coeluted with IVc-5, the α 1-3-fucosylated derivative (Table III). HPAEC-PAD is a suitable method to separate oligosaccharides, even those with an identical molecular weight but with different linkages (Lo-Guidice *et al.*, 1994).

The only difference between oligosaccharide-alditols IVc-5 and IVc-8 is the Fuc linkage, α (1-3) and α (1-2), respectively, and they have different retention times: 41 min 24 s and 43 min 36 s, respectively (Figure 3). According to Chandrasekaran *et al.* (1996b), FucT-I and FucT-II were found to be active on terminal Gal(β 1-4)GlcNAc but a substituent on GlcNAc decreased or abolished the acceptor ability. This could explain the absence of α 1-2-fucosyltransferase activity on IVc-12, which could be a better substrate for the α 1-3-fucosyltransferase from human bronchial mucosa. The absence of α 1-2-fucosyltransferase activity on Gal(β 1-4)GlcNAc may correspond to a competition between the α 1-2- and the α 1-3-fucosyltransferases, in favor of the α 1-3-fucosylation. However, it is quite possible that, as for the Gal-3-O-sulfotransferase and the α 2-3-sialyltransferase, the α 1-2-fucosyltransferase activity from human bronchial mucosa is inactive on terminal Le^x structures.

No α 2-6-sialylation was observed on terminal Gal residues of the different substrates which were tested. α 2-6-Sialylation of terminal Gal residue may occur very rarely in human respiratory mucins. More than 150 oligosaccharides have been described so far in human respiratory mucins, and only three of them have a α 2-6-sialylated terminal Gal residue (Breg *et al.*, 1987; Mawhinney *et al.*, 1992; Lo-Guidice *et al.*, 1994).

In this study, we did not test for the formation of the sulfated and/or sialylated Le^a derivatives. Indeed, in our previous work on structural determination of oligosaccharides from mucins secreted by patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis, all the patients chosen were Secretor and Lewis positive. So the presence of both H and Lewis epitopes on type 1 chain leads to the Le^b structure or Le^y on a type 2 chains. In the bronchial mucins most of the chains are type 2 chains and express Le^x and Le^y epitopes. So we were more interested in the biosynthesis of sulfated and/or sialylated Le^x derivatives. Moreover, we do not have any standard which contain the sulfated and/or sialylated derivatives of the Le^a structure.

Our finding in the ordering of α 2-3-sialylation versus α 1-3-fucosylation is in good agreement with previous studies (Natsuka *et al.*, 1994; Crommie and Rosen, 1995): α 2-3-sialylation precedes α 1-3-fucosylation in sLe^x and 6-sulfo-sLe^x biosynthesis. Moreover, the α 2-3-sialyltransferases, as well as the Gal-3-O-sulfotransferase and the α 1-2-fucosyltransferases from human respiratory mucosa, were not active on a terminal Le^x structure.

Altogether, these results suggest that 6-O-sulfation of the GlcNAc residue is the first event in the biosynthesis of 6-sulfated chains leading to the 6-sulfo-sLe^x in human respiratory mucosa and that it precedes both galactosylation and α 2-3-sialylation. α 1-3-Fucosylation of the GlcNAc residue is the last event. Similarly, the Gal-3-O-sulfotransferase active on terminal Gal, in *N*-acetyllactosamine-containing mucin carbohydrate chains, cannot act if the C-3 position of the GlcNAc residue is fucosylated.

The activity of the GlcNAc-6-O-sulfotransferase in respiratory mucins biosynthesis leads to the synthesis of carbohydrate chains having the same structure as those of GlyCAM-1, one of the best ligand for L-selectin. GlyCAM-1 contains both 6-sulfo-sLe^x and 6'-sulfo-sLe^x structures, but recent studies have shown that 6-sulfo-sLe^x (found in mucin carbohydrate chains) was the best ligand for L-selectin (better than 6'-sulfo-sLe^x and 6-6'-bis-sulfo-sLe^x) (Galustian *et al.*, 1997). Crottet *et al.*

(1996) have shown that human respiratory mucins containing such oligosaccharides were bound by L-selectin and thus could interact with leukocytes.

In CF, two types of events may influence the biosynthesis of mucin carbohydrate chains: (1) oversulfation which has been reported to be linked to the primary defect (Zhang *et al.*, 1995) and (2) hypersialylation and sLe^x hyperexpression which are related to the inflammatory response (Davril *et al.*, 1999).

In the future, it will be important to investigate the influence of cytokines on the activity of various sulfo-, sialyl-, and fucosyltransferases and to find out if the overexpression of the resulting carbohydrate determinants may favor the airway colonization by *Pseudomonas aeruginosa*, the major problem faced by the patients suffering from this disease.

Materials and methods

Preparation of microsomes from the human respiratory mucosa

Fragments of bronchial mucosa from patients undergoing surgery for bronchial carcinoma were collected in macroscopically healthy areas of the bronchial tree. Microsomal fractions were prepared from a pool of bronchial mucosa fragments from different patients as previously described and stored at -80°C until used (Lo-Guidice *et al.*, 1995).

Acceptors and/or standards

The different compounds used for acceptor specificity studies were from the following sources: GlcNAc β 1-O-Met, Gal β 1-O-Met, and Gal(β 1-4)GlcNAc were from Sigma; Fuc(α 1-3)GlcNAc β 1-O-Met, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β 1-O-Met, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc (α 2-3sialyl-N-acetylglucosamine), HO₃S-3Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β 1-O-Met, and NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (sLe^x) were from Toronto Research Chemicals Inc.; HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met was synthesized according to the protocol described by Van Kuik *et al.* (1987). The oligosaccharide-alditols OS1 and OS2 from *Collocalia* mucins, whose structures are described in Table I, were prepared as described previously (Strecker *et al.*, 1992).

Ten oligosaccharide-alditols from human respiratory mucins, whose structures were determined by Lo-Guidice *et al.* (1994), were also used as acceptors (IIIc1-26, IVc-5, IVc-10, IVc-12, IVc-19, IVc-23) and/or standards (IIIc1-17, IIIc1-26, IVc-2, IVc-5, IVc-8, IVc-10, IVc-12, IVc-14, IVc-19, IVc-23). Briefly, these oligosaccharide-alditols were prepared by alkaline borohydride treatment of mucin glycopeptides, fractionated by anion-exchange chromatography on an AG 1-X2 column (Bio-Rad) according to acidity and then by gel-filtration on a Bio-Gel P4 column (Bio-Rad) according to size (Lamblin *et al.*, 1991). The pools of acidic oligosaccharide-alditols IIIc1 and IVc were further fractionated by HPAEC, using a CarboPac PA-100 column (Dionex Corp.) and a PAD 2-pulsed amperometric detector (Dionex Corp.). The structure of 24 sialylated and/or sulfated oligosaccharide-alditols were determined by high resolution ¹H NMR in combination with fast atom bombardment-mass spectrometry (Lo-Guidice *et al.*, 1994). The oligosaccharides used in the present study are shown in Tables I-IV. Most of them have a core type 2.

A fraction of monosialyl oligosaccharide-alditols from a CF patient respiratory mucins was also used as acceptors (fraction IIc) (Breg *et al.*, 1987). This fraction contains 24 oligosaccharide-alditols whose structure was determined by ¹H NMR. One of them is particularly interesting for this study: it has a core type 2, a Le^x structure on the upper branch, and a NeuAc(α 2-3)Gal disaccharide on the lower branch (Table II).

GlcNAc-6-O-Sulfotransferase and Gal-3-O-sulfotransferase assays

The GlcNAc-6-O-sulfotransferase assays were performed as described previously (Degroote *et al.*, 1997). The incubation mixture contained 50–100 μ g of microsomal proteins, 0.5 μ Ci [³⁵S]PAPS (NEN Life Science Products, 2.25–2.50 Ci/mmol), 5 mM of one of the following substrates: GlcNAc β 1-O-Met, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, Fuc(α 1-3)GlcNAc β 1-O-Met, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, or 100 μ g of one of the oligosaccharide-alditols, OS1 or OS2 (Table I), in a Mops/NaOH buffer, pH 6.7, containing 0.1 % (w/v) Triton X-100, 20 mM MnCl₂, 30 mM NaF, 5 mM AMP, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzene sulfonyl fluoride (AEBSF).

For the Gal-3-O-sulfotransferase assays, the incubation mixture contained 50–100 μ g of microsomal proteins, 0.5 μ Ci [³⁵S]PAPS (NEN Life Science Products, 2.25–2.50 Ci/mmol), 5 mM of Gal β 1-O-Met, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β 1-O-Met, or 100 μ g of OS1 or 700 μ g of fraction IIc (Table II), in a Mes/NaOH buffer, pH 6.1, containing 0.1 % (w/v) Triton X-100, 20 mM MnCl₂, 30 mM NaF, 10 mM AMP, 1 mM AEBSF.

After incubation for 1 h at 30°C, the reactions were stopped by addition of ice-cold methanol. The mixtures were kept overnight at 4°C and the resulting precipitates were eliminated by centrifugation at 10,000 $\times$ g for 20 min. The pellets were washed twice with ice-cold methanol and centrifuged. The supernatants were pooled, evaporated to dryness, and then directly submitted to HPAEC-PAD.

The standards used for the identification of the 6-O-sulfated neosynthesized products were HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met, IVc-12 (which has the same structure as OS1 but with a sulfate group on the internal GlcNAc residue), IVc-19 (which corresponds to OS2 with a sulfate group on the terminal GlcNAc residue) (Table I).

For the identification of the 3-O-sulfated neosynthesized products, the standards used were HO₃S-3Gal β 1-O-Met, HO₃S-3Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β 1-O-Met, IVc-10 (which has the same structure as OS1 with a terminal HO₃S-3Gal) and IVc-2 (which has a core type 2 and a 3-sulfo Le^x on the upper branch) (Table II).

α 1-3-Fucosyltransferase assays

The reaction mixture for the fucosyltransferase assays was performed according to De Vries *et al.* (1995): 50–100 μ g of microsomal proteins were incubated with 0.3 μ Ci [³H]GDP-Fuc (Amersham Life Science Products, 61 Ci/mmol), 5 mM of one of the following substrates: GlcNAc β 1-O-Met, HO₃S-6GlcNAc β 1-O-Met, Gal(β 1-4)GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, or 100 μ g of one of the following oligosaccharide-alditols: OS2, IIIc1-26, IVc-10, IVc-12, IVc-19, or IVc-23 (Table III), in a Mops/NaOH buffer, pH 7.5, containing 20 mM MnCl₂, 0.1 % Triton X-100, 100 mM NaCl, 4 mM ATP, 1 mM

AEBSF. Incubations were performed for 2 h at 30°C and stopped as described for the sulfotransferase assays. The neosynthesized products were then studied by HPAEC-PAD. The α 1-3-fucosylated standards used were: Fuc(α 1-3)GlcNAc β 1-O-Met, Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, oligosaccharide-alcohol IIIc1-17 (which is the α 1-3-fucosylated derivative of IIIc1-26), IVc-2 (the α 1-3-fucosylated derivative of IVc-10), IVc-5 (the α 1-3-fucosylated derivative of IVc-12), and IVc-14 (the α 1-3-fucosylated derivative of IVc-23) (Table III).

α 2-3-Sialyltransferase assays

Reactions were performed according to the slightly modified method of Majuri *et al.* (1994), in a Tris/acetate buffer, pH 6.7, containing 50–100 μ g of microsomal proteins, 0.5 μ Ci of [14 C]CMP-NeuAc (Amersham Life Science Products 0.294 Ci/mmol), 0.1 % Triton X-100, 1 mM AEBSF, 5 mM of one of the following substrates: Gal β 1-O-Met, Gal(β 1-4)GlcNAc, Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, or 100 μ g of one of the following oligosaccharide-alcohols, OS1, IVc-12, IVc-5 (Table IV). Incubations were performed 5 h at 30°C and stopped as described for the sulfotransferase assays. The neosynthesized products were then studied by HPAEC-PAD. The standards used for the identification of the α 2-3-sialylated neosynthesized products were NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc, the oligosaccharide alcohols IIIc1-26 (which is the α 2-3-sialylated derivative of OS1), IVc-23 (the α 2-3-sialylated derivative of IVc-12), and IVc-14 (the α 2-3-sialylated derivative of IVc-5) (Table IV).

Characterization of radiolabeled products by HPAEC-PAD

Dry samples of sulfated, fucosylated, or sialylated radiolabeled products were dissolved in water and directly injected onto a CarboPac PA-100 column (4 $\times$ 250 mm) for HPAEC (Dionex Corp.). The elution of neosynthesized products was monitored both by pulsed amperometric detection (PAD 2 model, Dionex Corp.) and by radioactivity on line (high performance liquid chromatography radioactivity detector LB 506 C-1, EG & G, Berthold).

Elution of sulfated GlcNAc β 1-O-Met was performed at alkaline pH with a flow rate of 1 ml/min in 0.05 M NaOH/0.2 M sodium acetate with a linear gradient of sodium acetate to 0.05 M NaOH/0.3 M sodium acetate at 22 min, to 0.05 M NaOH/0.95 M sodium acetate at 24 min, and followed by isocratic elution with 0.05 M NaOH/0.95 M sodium acetate for 10 min (gradient I).

Elution of the fucosylated radiolabeled oligosaccharide-alcohol synthesized from IIIc1-26 was performed at alkaline pH at a flow rate of 1 ml/min in 0.1 M NaOH for 10 min followed by a linear gradient of sodium acetate to 0.1 M NaOH/0.1 M sodium acetate at 75 min, and to 0.1 M NaOH/0.4 M sodium acetate at 80 min (gradient II).

Elution of the radiolabeled products synthesized from all other substrates was performed at alkaline pH at a flow rate of 1 ml/min in 0.1 M NaOH for 10 min followed by a linear gradient of sodium acetate to 0.1 M NaOH/0.07 M sodium acetate at 16 min, to 0.1 M NaOH/0.1 M sodium acetate at 30 min and to 0.1 M NaOH/0.45 M sodium acetate at 80 min (gradient III).

The activity of the different enzymes was expressed as picomoles of radiolabeled nucleotide-sugar transferred/min/mg of

protein. Relative rates for each acceptor are expressed as a percentage of the incorporation of [35 S] in GlcNAc β 1-O-Met for the GlcNAc-6-O-sulfotransferase (Table I), and in Gal β 1-O-Met for the Gal-3-O-sulfotransferase (Table II). For the fucosyl- and sialyltransferase assays, relative rates for each acceptor are expressed as a percentage of the incorporation with Gal(β 1-4)GlcNAc (Tables III, IV).

Acknowledgments

We are indebted to Prof. J.J. Lafitte for kindly providing human respiratory mucosa. This work was supported by INSERM and by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM).

Abbreviations

CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; HPAEC, high performance anion exchange chromatography; HPAEC-PAD, high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection; AEBSF, 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride; [14 C]CMP-NeuAc, cytidine 5'-monophospho[14 C]sialic acid; [3 H]GDP-Fuc, guanosine 5'-diphospho- β -L-[5,6- 3 H]fucose; Mes, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; Mops, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid; PAPS, adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate; Le x , Lewis x (Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1); sLe x , sialyl Lewis x (NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1); 6-sulfo Le x , Lewis x with 6-O-sulfation of the GlcNAc residue; 6-sulfo-sLe x , sialyl Lewis x with 6-O-sulfation of the GlcNAc residue; 6'-sulfo-sLe x , sialyl Lewis x with 6-O-sulfation of the Gal residue; 3-sulfo Le x , Lewis x with 3-O-sulfation of the Gal residue; ST3Gal, α 2-3-sialyltransferase; FucT, fucosyltransferase; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

References

- Barasch, J. and Al-Awqati, Q. (1993) Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J. Cell Sci.*, **17** (Suppl.), 229–233.
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D. and Al-Awqati, Q. (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, **352**, 70–73.
- Boat, T.F., Cheng, P.W. and Wood, R.E. (1977) Tracheobronchial mucus secretion *in vivo* and *in vitro* by epithelial tissues from cystic fibrosis and control subjects. *Mod. Probl. Paediatr.*, **19**, 141–152.
- Bobek, L.A., Tsai, H., Biesbrock, A.R. and Levine, M.J. (1993) Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J. Biol. Chem.*, **268**, 20563–20569.
- Bowman, K.G., Hemmerich, S., Bhakta, S., Singer, M.S., Bistrup, A., Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R. (1998) Identification of an *N*-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase activity specific to lymphoid tissue: an enzyme with a possible role in lymphocyte homing. *Chem. Biol.*, **5**, 447–460.
- Breg, J., Van Halbeek, H., Vliegthart, J.F., Lamblin, G., Houvenaghel, M.C. and Roussel, P. (1987) Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 57–68.

- Britten, C.J., van den Eijnden, D.H., McDowell, W., Kelly, V.A., Witham, S.J., Edbrooke, M.R., Bird, M.L., de Vries, T. and Smithers, N. (1998) Acceptor specificity of the human leukocyte α 3-fucosyltransferase: role of FucT-VII in the generation of selectin ligands. *Glycobiology*, **8**, 321–327.
- Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J.M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G. and Roussel, P. (1993) Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **9**, 323–334.
- Chandrasekaran, E.V., Jain, R.K., Larsen, R.D., Wlasichuk, K., DiCioccio, R.A. and Matta, K.L. (1996a) Specificity analysis of three clonal and five non-clonal α 1,3-L-fucosyltransferases with sulfated, sialylated, or fucosylated synthetic carbohydrates as acceptors in relation to the assembly of 3'-sialyl-6'-sulfo Lewis x (the L-selectin ligand) and related complex structures. *Biochemistry*, **35**, 8925–8933.
- Chandrasekaran, E.V., Jain, R.K., Larsen, R.D., Wlasichuk, K. and Matta, K.L. (1996b) Characterization of the specificities of human blood group H gene-specified α 1,2-L-fucosyltransferase toward sulfated/sialylated/fucosylated acceptors: evidence for an inverse relationship between α 1,2-L-fucosylation of Gal and α 1,6-L-fucosylation of asparagine-linked GlcNAc. *Biochemistry*, **35**, 8914–8924.
- Chandrasekaran, E.V., Jain, R.K., Vig, R. and Matta, K.L. (1997) The enzymatic sulfation of glycoprotein carbohydrate units: blood group T-hapten specific and two other distinct Gal-3-O-sulfotransferases as evident from specificities and kinetics and the influence of sulfate and fucose residues occurring in the carbohydrate chain on C-3 sulfation of terminal Gal. *Glycobiology*, **7**, 753–768.
- Cheng, P.W., Boat, T.F., Cranfill, K., Yankaskas, J.R. and Boucher, R.C. (1989) Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **84**, 68–72.
- Crommie, D. and Rosen, S.D. (1995) Biosynthesis of GlyCAM-1, a mucin-like ligand for L-selectin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22614–22624.
- Crottet, P., Kim, Y.J. and Varki, A. (1996) Subsets of sialylated, sulfated mucins of diverse origins are recognized by L-selectin. Lack of evidence for unique oligosaccharide sequences mediating binding. *Glycobiology*, **6**, 191–208.
- Davril, M., Degroote, S., Humbert, P., Galabert, C., Dumur, V., Lafitte, J.J., Lamblin, G. and Roussel, P. (1999) The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. *Glycobiology*, **9**, 311–321.
- De Vries, T., Smka, C.A., Palcic, M.M., Swiedler, S.J., van den Eijnden, D.H. and Macher, B.A. (1995) Acceptor specificity of different length constructs of human recombinant α 1,3/4-fucosyltransferases. Replacement of the stem region and the transmembrane domain of fucosyltransferase V by protein A results in an enzyme with GDP-fucose hydrolyzing activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8712–8722.
- De Vries, T., Palcic, M.P., Schoenmakers, P.S., van den Eijnden, D.H. and Joiasse, D.H. (1996) Acceptor specificity of GDP-Fuc:Gal β 1–4GlcNAc-R α 3-fucosyltransferase VI (FucT VI) expressed in insect cells as soluble, secreted enzyme. *Glycobiology*, **7**, 921–927.
- Degroote, S., Lo-Guidice, J.M., Strecker, G., Ducourouble, M.P., Roussel, P., Lamblin, G. (1997) Characterization of a N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29493–29501.
- Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Degand, P. and Laine, A. (1998) Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J. Mol. Evol.*, **46**, 102–106.
- Dosanjh, A., Lencer, W., Brown, D., Ausiello, D.A. and Stow, J.L. (1994) Heterologous expression of Δ F508 CFTR results in decreased sialylation of membrane glycoconjugates. *Am. J. Physiol.*, **266**, C360–C366.
- Emery, N., Lo-Guidice, J.M., Lafitte, J.J., Lhermitte, M. and Roussel, P. (1997) The fucosylation and secretion of mucins synthesized in human bronchial cells vary according to growth conditions. *Glycobiology*, **7**, 95–101.
- Galustian, C., Lawson, A.M., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M. and Feizi, T. (1997) Sialyl-Lewis x sequence 6-O-sulfated at N-acetylglucosamine rather than at galactose is the preferred ligand for L-selectin and de-N-acetylation of the sialic acid enhances the binding strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 748–751.
- Højby, N. (1988) *Hemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas cepacia*, and *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Chest*, **94**, 97S–103S.
- Jeffery, P.K. and Li, D. (1997) Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.*, **10**, 1655–1662.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G. and Lowe, J.B. (1995) Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group α (1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4640–4649.
- Kitagawa, H. and Paulson, J.C. (1994) Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17872–17878.
- Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, R.D., Nair, R.P. and Lowe, J.B. (1990) A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group α (1,3/4)fucosyltransferase. *Genes Dev.*, **4**, 1288–1303.
- Kumar, R., Potvin, B., Muller, W.A. and Stanley, P. (1991) Cloning of a human α (1,3)-fucosyltransferase gene that encodes ELFT but does not confer ELAM-1 recognition on Chinese hamster ovary cell transfectants. *J. Biol. Chem.*, **266**, 21777–21783.
- Lamblin, G., Lafitte, J.J., Lhermitte, M., Degand, P. and Roussel, P. (1977) Mucins from cystic fibrosis sputum. *Mod. Probl. Paediatr.*, **19**, 153–164.
- Lamblin, G., Rahmoune, H., Wieruszski, J.M., Lhermitte, M., Strecker, G. and Roussel, P. (1991) Structure of two sulphated oligosaccharides from respiratory mucins of a patient suffering from cystic fibrosis. A fast-atom-bombardment m. s. and ^1H -n. m. r. spectroscopic study. *Biochem. J.*, **275**, 199–206.
- Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P. and Lowe, J.B. (1990) Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 6674–6678.
- Lo-Guidice, J.M., Wieruszski, J.M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P. and Lamblin, G. (1994) Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18794–18813.
- Lo-Guidice, J.M., Perini, J.M., Lafitte, J.J., Ducourouble, M.P., Roussel, P. and Lamblin, G. (1995) Characterization of a sulfotransferase from human airways responsible for the 3-O-sulfation of terminal galactose in N-acetyl-lactosamine-containing mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27544–27550.
- Majuri, M.L., Pinola, M., Niemelä, R., Tiisala, S., Natunen, J., Renkonen, O. and Renkonen, R. (1994) α 2,3-sialyl and α 1,3-fucosyltransferase-dependent synthesis of sialyl Lewis x, an essential oligosaccharide present on L-selectin counterreceptors, in cultured endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 3205–3210.
- Mawhinney, T.P., Landrum, D.C., Gayer, D.A. and Barbero, G.J. (1992) Sulfated sialyl-oligosaccharides derived from tracheobronchial mucous glycoproteins of a patient suffering from cystic fibrosis. *Carbohydr. Res.*, **235**, 179–197.
- Natsuka, S., Gersten, K.M., Zenita, K., Kannagi, R. and Lowe, J.B. (1994) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte α -1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16789–16794.
- Pasyk, E.A. and Foskett, J.K. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7746–7751.
- Pind, S., Riordan, J.R. and Williams, D.B. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12784–12788.
- Riordan, J.R. (1993) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**, 609–630.
- Roussel, P. and Lamblin, G. (1996) Human mucosal mucins in diseases. In Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. and Schachter, H. (eds.), *Glycoproteins and Disease*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 351–393.
- Roussel, P., Lamblin, G. and Degand, P. (1975) Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2114–2122.
- Sasaki, K., Kurata, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N. and Nishi, T. (1995) Expression cloning of a novel α 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14730–14737.
- Scudder, P.R., Shailubhai, K., Duffin, K.L., Streeter, P.R. and Jacob, G.S. (1994) Enzymatic synthesis of a 6'-sulphated sialyl-Lewis x which is an inhibitor of L-selectin binding to peripheral addressin. *Glycobiology*, **4**, 929–932.
- Shankar, V., Pichan, P., Eddy, R.L., Tonk, V., Nowak, N., Sait, S.N., Shows, T.B., Schultz, R.E., Gotway, G., Elkins, R.C., Gilmore, M.S. and Sachdev, G.P. (1997) Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and

- cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **16**, 232-241.
- Spiro, R.G., Yasumoto, Y. and Bhoyroo, V. (1996) Characterization of a rat liver golgi sulphotransferase responsible for the 6-O-sulphation of N-acetylglucosamine residues in β -linkage to mannose: role in assembly of sialyl-galactosyl-N-acetylglucosamine 6-sulphate sequence of N-linked oligosaccharides. *Biochem. J.*, **319**, 209-216.
- Strecker, G., Wieruszski, J.M., Cuvillier, O., Michalski, J.C. and Montreuil, J. (1992) ^1H and ^{13}C -NMR assignments for sialylated oligosaccharide-alditols related to mucins. Study of thirteen components from hen ovomucin and swallow nest mucin. *Biochimie (Paris)*, **74**, 39-51.
- Uchimura, K., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., Fan, Q.W., Kurosawa, N., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O. and Muramatsu, T. (1998a) Molecular cloning and characterization of an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22577-22583.
- Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., Yamamura, K., Ozaki, T., Nakagawara, A., Kadomatsu, K. and Muramatsu, T. (1998b) Human N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis x: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **124**, 670-678.
- Van Kuik, J.A., Breg, J., Kolsteeg, C.E.M., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. (1987) Primary structure of the acidic carbohydrate chain of hemocyanin from *Panulirus interruptus*. *FEBS Lett.*, **221**, 150-154.
- Weston, B.W., Nair, R.P., Larsen, R.D. and Lowe, J.B. (1992a) Isolation of a novel human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4152-4160.
- Weston, B.W., Smith, P.L., Kelly, R.J. and Lowe, J.B. (1992b) Molecular cloning of a fourth member of a human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x, and difucosyl sialyl Lewis x epitopes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24575-24584.
- Zhang, Y., Doranz, B., Yankaskas, J.R. and Engelhardt, J.F. (1995) Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2997-3004.

Résultats - Discussion

L'étude de la spécificité de substrat des activités fucosyl-, sialyl-, et sulfotransférasiques de muqueuse bronchique humaine nous a permis de déterminer la séquence de biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés de l'épitope Le^x.

La GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine est seulement active sur les résidus de GlcNAc en position terminale non réductrice ; dès que le résidu de GlcNAc est substitué (par un résidu de Fuc ou de Gal), l'enzyme est incapable d'agir.

L'activité α 2-3-sialyltransférasique est active sur le disaccharide terminal Gal(β 1-4)GlcNAc, sulfaté ou non en C6 sur le résidu de GlcNAc. Par contre, cet enzyme est inactif dès que le résidu de GlcNAc est substitué par un résidu de Fuc.

L'activité α 1-3-fucosyltransférasique de muqueuse bronchique humaine est inactive sur un résidu de GlcNAc terminal, mais peut agir sur le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc, éventuellement sulfaté en C6 sur le résidu de GlcNAc et/ou sialylé en (α 2-3) sur le résidu de Gal terminal.

Ces résultats nous permettent de définir la séquence de biosynthèse du déterminant 6-sulfo sialyl Le^x dans la muqueuse bronchique humaine : la GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase est le premier enzyme qui agit, suivi de la β 1-4-galactosyltransférase, de l' α 2-3-sialyltransférase, et enfin de l' α 1-3-fucosyltransférase. Les dérivés sulfatés et/ou sialylés de l'épitope Le^x présents en périphérie des mucines (et en particulier le 6-sulfo sialyl Le^x qui a été décrit comme le meilleur ligand de la L-sélectine [Galustian *et al.*, 1997]) pourraient avoir une importance physiopathologique, en modulant la réponse inflammatoire *via* des interactions mucines/leucocytes. Crottet *et al.* ont montré que des glycopeptides de mucines bronchiques se fixaient à la L-sélectine [1996]. Ils pourraient, en outre, constituer des sites de fixation potentiels pour les micro-organismes colonisant l'appareil respiratoire.

Deuxième partie

MUCOVISCIDOSE ET ANOMALIES DE GLYCOSYLATION/SULFATATION DES MUCINÉS

INFLUENCE DE L'INFLAMMATION

A - Rappels

I. La mucoviscidose

1. Généralités
2. Bases génétiques de la maladie

II. Les anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués dans la mucoviscidose

1. Anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués membranaires ou sécrétés provenant de patients ou de cellules CF
2. Inflammation bronchique et mucoviscidose

III. Inflammation et glycosylation

1. Exemple des modifications de glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation
2. Influence des cytokines sur la sécrétion et la glycosylation des mucines
 - 2.1 *Le facteur α de nécrose tumorale (TNF α)*
 - 2.1.1 Modifications de sécrétion et de glycosylation des mucines
 - 2.1.2 Transduction du signal du TNF α
 - 2.2 *L'interleukine 4 (IL-4)*

B – Travaux personnels

- I. Étude de la sialylation, la sulfatation et de l'expression de l'épitope sialyl Le^x au niveau de mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique, infectés ou non.

II. Étude de l'influence d'une cytokine pro-inflammatoire, le $\text{TNF}\alpha$, sur :

- 1. la sécrétion, la fucosylation, la sialylation et la sulfatation des mucines sécrétées par une lignée d'origine glandulaire bronchique humaine (MM-39),**
- 2. les activités fucosyl-, sialyl- et sulfotransférasiques d'explants de muqueuse bronchique humaine.**

A - Rappels

I. La mucoviscidose

1. Généralités

La mucoviscidose ou CF (pour *Cystic Fibrosis*) est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne, puisqu'elle touche environ une naissance sur 2 500. C'est une maladie grave : de fait, il y a encore peu de temps, la plupart des enfants atteints ne parvenaient pas à l'âge adulte. Les progrès récents de l'antibiothérapie et la prise en charge nutritionnelle des patients ont considérablement augmenté leur durée de vie. Néanmoins, il n'existe encore aucun traitement spécifique de la maladie.

La mucoviscidose se présente comme une exocrinopathie généralisée qui se traduit par une insuffisance pancréatique, une stérilité masculine, une atteinte hépatique et surtout une bronchopathie chronique avec des bronchiectasies et une infection bactérienne sévère. La colonisation du poumon est très particulière : *Staphylococcus aureus* et *Hemophilus influenzae* dominant au début de la maladie, mais ces germes sont progressivement remplacés par *Pseudomonas aeruginosa* [Tummler *et al.*, 1997]. Ce dernier pathogène est pratiquement impossible à éliminer car il devient rapidement résistant aux antibiotiques.

Une des conséquences directes de la maladie est la production d'un mucus anormalement épais et visqueux, propice aux infections bactériennes. L'infection bactérienne entraîne une forte réponse humorale, une production locale de cytokines et un afflux de neutrophiles au niveau du poumon. Cette réponse inflammatoire très forte conduit à une hypersécrétion de mucus, une obstruction des voies aériennes et à la destruction progressive du parenchyme respiratoire, cause directe de 95 % des décès dus à la maladie.

2. Bases génétiques de la maladie

Le gène responsable de la maladie a été cloné par le groupe de Tsui en 1989 : il est localisé sur le bras long du chromosome 7 (q31.2), s'étend sur 230 kb (27 exons) et code une protéine glycosylée de 170 kDa appelée CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) [Riordan *et al.*, 1989] (Figure 11).

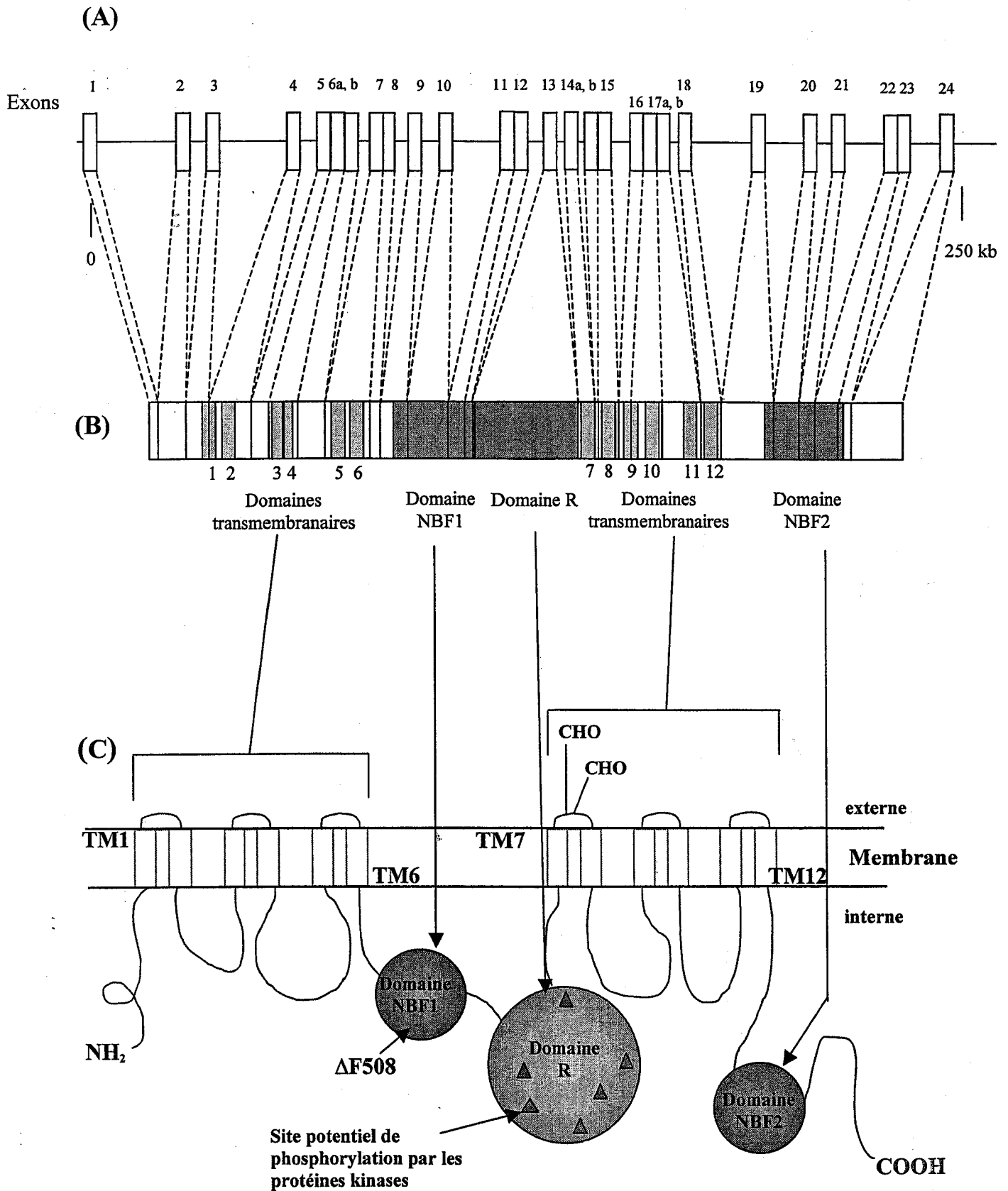


Figure 11 : Représentation schématique du gène *CFTR* (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) (A), la chaîne peptidique de la protéine CFTR (B) et un modèle structural de CFTR (C), d'après Riordan, 1993.

Abréviations : domaine NBF, domaine de liaison à l'ATP ou «Nucleotide Binding Fold» ; TM, domaine transmembranaire.

La protéine CFTR possède une activité de canal chlore de faible conductance AMPc dépendant, activable par la protéine kinase A appartenant à la super-famille des «ABC protéines» (pour *ATP Binding Cassett* protéines) [Zielenski & Tsui, 1995].

La modélisation moléculaire a permis de déterminer la structure de la protéine CFTR. Elle serait constituée de deux moitiés similaires, contenant chacune six hélices transmembranaires (définissant un domaine transmembranaire TM) et un domaine NBF (pour *Nucleotide Binding Fold*), pouvant interagir avec l'adénosine tri-phosphate (ATP). Ces deux parties sont connectées par un domaine fortement chargé dit «de régulation» (ou domaine R), contenant des sites potentiels de phosphorylation pour la protéine kinase «AMPc dépendante» (protéine kinase A) et pour la protéine kinase C (**Figure 11**).

La protéine CFTR est donc apparentée à la super-famille des «ABC protéines», d'abord du fait de sa structure, mais aussi par son fonctionnement. En effet, des études ont montré qu'elle était régulée par des phénomènes de phosphorylation hormono-dépendants [Tabcharani *et al.*, 1991], et également par le niveau d'énergie de la cellule (ATP). Néanmoins, elle est le seul membre de la super-famille des «ABC protéines» ayant une fonction de canal ionique.

La protéine CFTR aurait également d'autres fonctions que celle de canal chlore : elle interviendrait dans la régulation de canaux sodiques [Stutts *et al.*, 1995], d'un canal chlore de forte conductance nommé ORCC (pour *Outwardly Rectifying Chloride Channel*) [Schwiebert *et al.*, 1995], et d'autres canaux ioniques [Loussouarn *et al.*, 1996 ; Schwiebert *et al.*, 1999]. Elle pourrait également transporter d'autres molécules comme l'ATP [Reisin *et al.*, 1994], le PAPS [Pasyk & Foskett, 1997], ou l'urée.

La protéine CFTR a été localisée dans la région apicale de différents épithélia, au niveau des cellules intestinales, des canaux pancréatiques et des glandes salivaires. Dans l'appareil respiratoire, elle est peu exprimée dans les cellules de l'épithélium de surface et dans les cellules ductales, mais fortement au niveau des cellules séreuses des glandes sous-muqueuses [Engelhardt *et al.*, 1993]. Ce canal chlore est également présent au niveau des membranes du trans-Golgi et du réseau transgolgien [Barasch *et al.*, 1991] et pourrait jouer un rôle dans la régulation du pH de ces compartiments intracellulaires.

La mucoviscidose est due à des mutations du gène *CFTR*. Certaines mutations conduisent à l'absence de la protéine CFTR (c'est le cas de la délétion $\Delta F508$) au niveau de la membrane apicale de cellules de l'épithélium bronchique ; d'autres mutations entraînent la production d'un canal d'activité anormale. La conséquence est une perturbation des mouvements d'eau et d'électrolytes, qui générerait un mucus déshydraté, très visqueux. Ce dernier altérerait le fonctionnement du système muco-ciliaire et stagnerait dans les voies aériennes, favorisant ainsi les infections bactériennes.

Plus de 800 mutations (caractérisées au niveau des 27 exons) ont été décrites. Elles peuvent être divisées en plusieurs classes, selon leur influence sur la capacité de la protéine CFTR à remplir sa fonction de canal chlore [Zielenski & Tsui, 1995]. On distingue celles qui entraînent :

- une absence de production de CFTR ;
- un défaut de la conductance du canal chlore. C'est le cas des mutations entraînant des substitutions d'acides aminés au niveau des domaines transmembranaires ;
- un défaut de la régulation de CFTR. C'est le cas de la plupart des mutations trouvées dans les domaines NBF ;
- la production d'un ARNm instable ;
- une conformation incorrecte de CFTR qui, par-là même, est dégradé et ne peut pas (ou peu) rejoindre la membrane plasmique et accomplir sa fonction de canal chlore.

La délétion $\Delta F508$ (absence de 3 bases codant une phénylalanine en position 508, au niveau du domaine NBF1) est la mutation la plus fréquente (elle touche environ 70 % des chromosomes de malades). Cette délétion correspond à une véritable maladie du trafic intracellulaire, puisqu'elle entraîne une mauvaise conformation de la protéine CFTR qui ne répond plus au contrôle de qualité nécessaire à sa sortie du réticulum endoplasmique pour passer dans l'appareil de Golgi et atteindre la membrane apicale des cellules. La protéine CFTR stagne dans le réticulum endoplasmique, puis elle est dégradée. De ce fait, les patients dont les chromosomes portent la mutation $\Delta F508$ n'ont pratiquement pas de protéine CFTR

au niveau des membranes cellulaires apicales et présentent des symptômes sévères de la maladie, avec atteintes pulmonaires et pancréatiques.

Il n'existe pas de relation claire chez les patients CF entre génotype et phénotype, sauf pour la fonction pancréatique (pour laquelle certaines mutations entraînent spécifiquement une insuffisance pancréatique, sans troubles pulmonaires) et l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents [Dumur *et al.*, 1996 ; Tsui & Durie, 1997]. Toutes les mutations n'ont pas pour conséquence un même degré d'atteinte : il existe des mutations «sévères», entraînant des complications pulmonaires et pancréatiques importantes, mais aussi des formes plus «bénignes» de la maladie, avec, par exemple, pour seul symptôme la stérilité masculine, à tel point que la mucoviscidose passe parfois inaperçue. De plus, quand une mutation «sévère» est combinée avec une mutation «légère», l'expression de la maladie peut avoir une gravité intermédiaire.

La sévérité des symptômes pulmonaires n'est pas clairement lié au génotype, ce qui semble suggérer que le phénotype de la maladie pourrait être modulé par des facteurs génétiques supplémentaires ou/et environnementaux [Ferrari & Cremonesi, 1996].

II. Les anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués dans la mucoviscidose

1. Anomalies de glycosylation et de sulfatation des glycoconjugués membranaires ou sécrétés provenant de patients ou de cellules CF

Les mucines bronchiques, et plus généralement les glycoconjugués de patients CF, présentent des anomalies dans leur composition en groupements sulfate, ainsi qu'en résidus de Fuc, de NeuAc, sucres essentiellement situés dans la périphérie des glycannes [Lazatin *et al.*, 1994].

Depuis longtemps, des études ont montré une augmentation de la sulfatation des mucines bronchiques, salivaires et intestinales de patients CF [Boat *et al.*, 1977 ; Lamblin *et al.*, 1977 ; Wesley *et al.*, 1983 ; Carnoy *et al.*, 1993]. Il a également été observé que les glycoconjugués sécrétés par des cellules épithéliales de patients CF étaient hypersulfatés

[Cheng *et al.*, 1989]. Au niveau bronchique, la sévérité de la maladie serait même liée à la quantité de sulfate des mucines [Chace *et al.*, 1983]. Le développement de modèles de Souris *CFTR* (-/-) a permis d'approfondir les études sur les anomalies de sulfatation. Le problème majeur du modèle murin est que la Souris, du fait de la structure particulière de sa muqueuse bronchique (elle ne contient pas ou peu de glandes où s'exprime la protéine *CFTR*), ne présente pas ou peu de symptômes pulmonaires ; les manifestations cliniques de la maladie sont surtout intestinales et pancréatiques. Hill *et al.* ont rapporté une hypersulfatation des glycosaminoglycannes seulement au niveau de certains organes (foie, pancréas), ainsi que des modifications dans les proportions de chondroïtine, dermatane et héparane sulfate au niveau de la matrice extracellulaire [1997]. D'autres études ont montré, au niveau du pancréas d'un modèle murin *CFTR* (-/-), des sécrétions hypersulfatées : la glycoprotéine «gp300» (glycoprotéine majeure des cellules d'acinus de souris) ne présente pas de modification de sulfatation et de glycosylation, mais est beaucoup plus exprimée en surface des cellules, ce qui favoriserait le développement de la maladie dans le pancréas [De Lisle, 1995].

Les mucines salivaires de patients CF contiennent plus de résidus de NeuAc, de Fuc et plus de groupements sulfate que celles de sujets normaux [Carnoy *et al.*, 1993]. Une fucosylation accrue a également été démontrée dans des lignées cellulaires dérivées de patients CF [Scanlin *et al.*, 1985 ; Lazatin *et al.*, 1994].

Des cellules dont le gène *CFTR* porte la mutation $\Delta F508$ synthétisent des glycoprotéines membranaires ou sécrétées et des gangliosides moins sialylés que ceux de cellules exprimant une protéine *CFTR* normale ou n'exprimant pas de protéine *CFTR* du tout [Dosanjh *et al.*, 1994]. De même, Barasch *et al.* ont montré une diminution de la sialylation des glycoconjugués sécrétés par des cellules de polypes nasaux de patients CF [1991]. Par ailleurs, le groupe de Scanlin a décrit une augmentation de la fucosylation et une diminution de la sialylation des glycoprotéines membranaires dans des cellules CF, réversible quand ces cellules expriment la protéine *CFTR* normale [Liu *et al.*, 1998 ; Park *et al.*, 1998].

Il semble donc que l'hypersulfatation observée au niveau des glycoconjugués dans la mucoviscidose fasse l'unanimité, mais il existe un véritable paradoxe en ce qui concerne l'acide sialique : les mucines sécrétées semblent être hypersialylées, alors que les glycoconjugués sécrétés ou membranaires de cellules en culture contiendraient moins d'acide sialique que la normale.

La première hypothèse pour expliquer ces anomalies de sulfatation et de glycosylation a été fournie par l'équipe de Barasch [Barasch *et al.*, 1991]. La protéine CFTR a été localisée au niveau des membranes de certains compartiments intracellulaires, en particulier celles du trans-Golgi et du réseau transgolgien, des prélysosomes et des endosomes, où elle aurait un rôle dans la régulation du pH, *via* un échange Cl^-/H^+ . Barasch *et al.* ont décrit dans des cellules de patients CF une alcalinisation du trans-Golgi et du réseau transgolgien, résultant de l'altération du transport d'ions chlorures [1991]. Ce défaut pourrait expliquer les modifications de glycosylation et de sulfatation observées dans la mucoviscidose : en effet, le pH optimal des sialyltransférases est légèrement acide, alors que celui des fucosyl- et sulfotransférases serait plus basique [Al-Awqati *et al.*, 1992]. L'alcalinisation favoriserait donc l'action des fucosyl- et sulfotransférases, et diminuerait les activités sialyltransféra-siques [Barasch & Al-Awqati *et al.*, 1993]. L'hypersialylation des mucines salivaires et, au contraire, l'hyposialylation des glycoprotéines sécrétées ou membranaires de cellules CF, pourraient correspondre à l'existence de sialyltransférases différentes (appartenant peut-être à des types cellulaires différents) intervenant dans la biosynthèse de ces molécules : certaines sialyltransférases seraient stimulées par une alcalinisation des compartiments golgiens, d'autres pourraient voir leur activité diminuer lorsque le pH augmente. Néanmoins, l'influence de la protéine CFTR sur le pH intracellulaire reste controversée [Seksek *et al.*, 1996].

L'hypothèse formulée par Barasch pourrait expliquer l'hypersulfatation, l'hyperfucosylation et l'hyposialylation des glycoprotéines et glycolipides membranaires et des glycoprotéines sécrétées par des cellules en culture, mais ne permet pas de comprendre l'hypersialylation observée au niveau des mucines salivaires sécrétées *in vivo*. Une question se pose alors : l'hypersialylation des mucines salivaires de malades CF est-elle un phénomène primaire (directement lié au déficit touchant la protéine CFTR) ou secondaire à d'autres phénomènes (l'inflammation ou l'infection par exemple) ?

Afin de vérifier que l'anomalie de sulfatation des mucines bronchiques dans la mucoviscidose était liée à un phénomène primaire, et pas à un effet secondaire de colonisation bactérienne chronique, Zhang *et al.* ont utilisé un modèle de xénogreffe humaine [1995] : ils ont ainsi pu démontrer des différences de sulfatation entre mucines sécrétées par un épithélium constitué de cellules bronchiques normales ou de cellules de patients CF, en l'absence de phénomènes inflammatoires secondaires à l'infection bactérienne. La corrélation du génotype avec la sulfatation des mucines sécrétées a permis de distinguer deux groupes :

un premier groupe dont les mutations entraînent une forte augmentation de la quantité de sulfate (c'est le cas de la délétion $\Delta F508$), et un second n'ayant pas d'effet sur elle. Ces résultats suggèrent donc que le défaut de sulfatation dans la mucoviscidose serait primaire, du moins dans le cas de la délétion $\Delta F508$ qui est la mutation la plus fréquente.

D'autres auteurs ont remis en question la théorie de Barasch, suggérant que la protéine CFTR pouvait réguler la concentration du donneur de sulfate, le PAPS, dans la lumière des compartiments intracellulaires, et donc influencer le processus de sulfatation [Pasyk & Foskett, 1997]. La protéine CFTR normale permettrait de moduler le taux de PAPS dans l'appareil de Golgi en permettant de faire repasser dans le cytoplasme une partie du PAPS, alors qu'une protéine CFTR absente ou inactive entraînerait une accumulation de PAPS dans les compartiments golgiens, et éventuellement une augmentation des processus de sulfatation. Cette hypothèse n'apporte pas d'explication aux anomalies de glycosylation.

Une autre hypothèse a été suggérée concernant les anomalies de sulfatation : au niveau des cellules épithéliales bronchiques, l'hypersulfatation des glycoconjugués ne serait pas due à un défaut de transport du sulfate ni de quantité de sulfate intracellulaire, mais plutôt à des perturbations dans l'activation du sulfate intracellulaire en PAPS, ou dans le transfert de sulfate, à partir du PAPS, sur les glycoconjugués [Mohapatra *et al.*, 1995].

Ainsi, si l'hypersulfatation des glycoconjugués semble être un phénomène primaire, directement lié aux mutations du gène *CFTR*, certaines anomalies de glycosylation (et en particulier l'hypersialylation observée au niveau de mucines salivaires sécrétées par des patients CF) pourraient avoir une autre origine. Ces observations ont donc conduit différents groupes à explorer l'hypothèse selon laquelle les anomalies de la glycosylation, sialylation ou fucosylation, seraient liées à l'inflammation. En effet, les cellules en culture n'ont certainement pas le même environnement inflammatoire que les cellules muqueuses des patients présentant une infection. Il est donc envisageable que, même si l'anomalie primaire de la maladie semble diminuer les processus de sialylation, cette tendance puisse être inversée *in vivo* du fait de la réaction inflammatoire.

Cette hypothèse semblait particulièrement intéressante car la mucoviscidose est une maladie caractérisée par une forte réponse inflammatoire au niveau de la sphère broncho-pulmonaire, avec production de mucus très visqueux et surinfection par *P. aeruginosa*.

2. Inflammation bronchique et mucoviscidose

On a longtemps pensé que l'inflammation bronchique observée dans la mucoviscidose était secondaire à l'infection par *P. aeruginosa*. Cette conception est actuellement discutée.

Des études récentes ont montré que l'inflammation était très précoce chez les patients CF, et qu'elle pourrait même précéder l'infection bactérienne : Birrer *et al.* ont démontré la présence d'élastase leucocytaire dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de très jeunes enfants CF [1994]. Par ailleurs, en étudiant les liquides broncho-alvéolaires d'un groupe d'enfants CF, infectés mais ayant un état fonctionnel respiratoire sensiblement normal, Konstan *et al.* ont observé une élévation importante du nombre de neutrophiles, ainsi que la présence d'élastase active [1994]. Les liquides de lavages broncho-alvéolaires de patients CF contiennent également des quantités importantes de différentes interleukines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α et IL-8) qui ne sont normalement pas présentes dans les liquides de sujets normaux [Bonfield *et al.*, 1995b].

De plus, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de très jeunes enfants (moins de six mois) touchés par cette maladie, une quantité accrue de neutrophiles, d'élastase leucocytaire et d'interleukine 8 (IL-8) a été observée en absence de tout pathogène détectable [Khan *et al.*, 1995]. Ces expériences ont mis en évidence la présence d'une inflammation des voies aériennes dès l'âge de quatre semaines.

Une étude récente a montré que les glandes sous-muqueuses bronchiques de patients homozygotes pour la délétion $\Delta F508$ exprimaient des niveaux accrus d'IL-8, alors que les niveaux d'IL-1 et d'IL-6 ne différaient pas des sujets contrôles [Tabary *et al.*, 1998]. Kammouni *et al.* ont montré que les cellules séreuses glandulaires de patients CF sécrétaient plus d'IL-6 et d'IL-8 que celles de patients normaux, et que, contrairement aux cellules normales, elles ne sécrétaient pas de TNF α en réponse au lipopolysaccharide (LPS) de *P. aeruginosa* [1997]. L'augmentation sélective de l'IL-8, en l'absence de stimulus infectieux, pourrait représenter un événement primaire responsable de l'initiation de l'inflammation bronchique chez les patients CF. De plus, la présence de *P. aeruginosa* sur la muqueuse bronchique entraînerait immédiatement la translocation dans le noyau du facteur de transcription NF-kappaB, et ce dernier induirait l'expression de l'IL-8 [Di Mango *et al.*, 1998].

L'IL-10 est une cytokine régulatrice puissante, qui réduit la réponse inflammatoire et la stimulation des lymphocytes T. Les cellules épithéliales de patients CF produisent moins d'IL-10 que les cellules de sujets sains [Bonfield *et al.*, 1995a]. Il en est de même pour les lymphocytes CD4+ possédant une protéine CFTR mutée [Moss *et al.*, 1996]. Au niveau du poumon sain, il est très probable que l'épithélium bronchique joue un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire locale, en produisant de l'IL-10 qui diminue la réaction inflammatoire. Dans l'appareil respiratoire des patients CF, la diminution voire l'absence de la sécrétion d'IL-10 par les cellules épithéliales pourrait contribuer à augmenter l'inflammation locale et les lésions tissulaires.

Des expériences réalisées chez la Souris confirment ces anomalies de la réponse inflammatoire. La diminution de la clairance muco-ciliaire et l'inflammation de la sous-muqueuse bronchique représenteraient des événements très précoces, antérieurs à la colonisation bactérienne [Zahm *et al.*, 1997]. De plus, des souris homozygotes pour la mutation S489X du gène *CFTR* développent une réponse inflammatoire excessive lors d'une infection par *P. aeruginosa* par rapport à des souris contrôles [Heeckeren *et al.*, 1997].

Le lien éventuel entre mutations de la protéine CFTR et réaction inflammatoire très précoce et/ou excessive reste inexpliqué.

On peut aussi s'interroger sur le rôle de l'inflammation pulmonaire, et peut-être des cytokines pro-inflammatoires présentes en quantité accrue dans les lavages broncho-alvéolaires de patients CF (combinées à un déficit en cytokine anti-inflammatoire IL-10), sur l'expression accrue de certains épitopes glycaniques périphériques des mucines bronchiques. Ces épitopes pourraient être des ligands préférentiels pour *P. aeruginosa*, et ainsi expliquer la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique par cette bactérie, et sa persistance dans la maladie.

III. Inflammation et glycosylation

1. Exemple des modifications de glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation

Certaines études démontrent que les phénomènes inflammatoires peuvent entraîner des modifications de glycosylation des glycoprotéines. Les «protéines de la phase aiguë» sont des protéines synthétisées par le foie, dont la concentration sérique se modifie au cours de la réaction inflammatoire. Certaines glycoprotéines, comme l' α_1 -glycoprotéine acide (ou orosomucoïde), voient leur concentration augmenter au cours d'états inflammatoires aigus. Le mode d'activation, pour l' α_1 -glycoprotéine acide et d'autres protéines de la phase aiguë, comme les protéines SAA (pour *Serum Amyloid A*), peut impliquer différents facteurs de transcription, dont le facteur NF-kappaB. Ce facteur de transcription ubiquitaire gouverne l'expression de nombreux gènes : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion et certaines protéines de la phase aiguë chez l'individu sain, ainsi qu'à différents stades pathologiques [Chen *et al.*, 1999]. Le facteur NF-kappaB et une phosphoprotéine de 140 kDa (nommée Nopp 140) peuvent, par interaction avec différents activateurs, entraîner l'induction de l'expression du gène de α_1 -glycoprotéine acide [Lee *et al.*, 1996]. De même, les mécanismes impliqués dans le contrôle positif ou négatif de l'expression des gènes des protéines SAA mettent en jeu le facteur NF-kappaB, son inhibiteur I-kappaB, ainsi que d'autres facteurs de transcription et répresseurs [Jensen & Whitehead, 1998].

Deux types de modifications glycaniques de l' α_1 -glycoprotéine acide ont été observées au cours d'états inflammatoires aigus : une augmentation du nombre des antennes et des modifications de la glycosylation terminale. La modification de «l'antennarisation» des *N*-glycannes hépatiques est sous la dépendance de cytokines, comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α [Mackiewicz *et al.*, 1989 ; Pos *et al.*, 1990]. Dans les états inflammatoires aigus [De Graaf *et al.*, 1993], dans le choc septique [Brinkman-van der Linden *et al.*, 1996], au cours de la polyarthrite évolutive [Jorgensson *et al.*, 1998], dans le syndrome d'hyper-IgD [Havenaar *et al.*, 1995], une augmentation de l'expression de l'antigène sialyl Le^x sur l' α_1 -glycoprotéine acide est observée. Il a été suggéré que l'hyperexpression de l'épitope sialyl Le^x sur l' α_1 -glycoprotéine acide pourrait exercer un effet inhibiteur sur la reconnaissance des leucocytes par les sélectines et sur l'efflux des leucocytes au niveau des foyers inflammatoires [van Dijk *et al.*, 1998]. L' α_1 -glycoprotéine acide ainsi modifiée exercerait un rôle de modulateur de la réponse inflammatoire.

La présence accrue du déterminant glycanique sialyl Le^x a également été démontrée en périphérie des mucines coliques de patients atteints de cancers coliques [Hanski *et al.*, 1993], sur les glycoprotéines membranaires de la prostate en cas de cancer [Martensson *et al.*, 1995], ainsi qu'en cas de cancer du poumon [Fukuoka *et al.*, 1998]. La surexpression du sialyl

Le^x serait liée au potentiel métastatique et invasif des cancers, affections dans lesquelles la réaction inflammatoire est souvent importante.

Nous nous sommes alors posé la question de savoir si l'inflammation broncho-pulmonaire très précoce dans la mucoviscidose ne pourrait pas entraîner des modifications de glycosylation/sulfatation des mucines bronchiques sécrétées par les patients CF, aboutissant à une surexpression du déterminant sialyl Le^x et de ses dérivés.

Nous nous sommes interrogés sur plusieurs points :

(i) les mucines bronchiques de patients CF contiennent-elles plus d'acide sialique que celles de patients atteints de bronchite chronique ?

(ii) si oui, cette hypersialylation est-elle corrélée à la mucoviscidose (anomalie primaire) ou bien aux phénomènes d'infection/inflammation (anomalie secondaire) ?

(iii) l'hypersialylation serait-elle corrélée à une sur-expression de l'épitope glycanne sialyl Le^x, dont l'expression semble fortement liée à l'inflammation ?

2. Influence des cytokines sur la sécrétion et la glycosylation des mucines

De nombreux travaux, dont la majorité concernent le TNF α (cytokine initiateur de la réponse inflammatoire) et l'IL-4, suggèrent que les cytokines ont une influence directe sur la sécrétion et la glycosylation des mucines dans de nombreux modèles.

2.1 Le facteur α de nécrose tumorale (TNF α)

2.1.1. Modifications de sécrétion et de glycosylation des mucines

Une hypersécrétion de mucines induite par le TNF α a été décrite dans de nombreux modèles : au niveau d'explants bronchiques humains en culture [Levine *et al.*, 1995], dans des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques [Fisher *et al.*, 1995 ; Levine *et al.*, 1995], dans des cellules d'adénocarcinome colo-rectal [Novotny-Smith *et al.*, 1993], et dans des cellules épithéliales d'oreille moyenne de Chinchilla [Lin *et al.*, 1998].

Des modifications de glycosylation des mucines intestinales de Lapin ont également été observées [Wanke & Bistran, 1997], ainsi que des modifications de sulfatation des mucines intestinales sécrétées par les cellules caliciformes en réponse à une infection par *Salmonella* [Arnold *et al.*, 1993]. Majuri *et al.* ont également montré que le TNF α induisait une augmentation de l'expression et des activités α 2-3-sialyl- et α 1-3/4-fucosyl-transférases, enzymes responsables de la biosynthèse de déterminants glycaniques sialyl Le^{x/a} dans des lignées d'adénocarcinomes coliques [1995].

En plus de ces effets sur la sécrétion et la glycosylation des mucines, le TNF α induit des effets pléiotropes sur les cellules productrices de mucus : dédifférenciation [Hamada *et al.*, 1991], hyper- [Lou *et al.*, 1998] ou hypoplasie des cellules épithéliales [Jarry *et al.*, 1992].

L'effet du TNF α sur la sécrétion et la glycosylation des mucines décrit dans de nombreux modèles nous a incitée à étudier l'influence de cette cytokine pro-inflammatoire sur la sécrétion et la glycosylation (sialylation, fucosylation, sulfatation) des mucines sécrétées par une lignée de cellules d'origine glandulaire bronchique humaine, nommée MM-39. Ces cellules possédant un faible potentiel basal de fucosylation et de sulfatation, même après stimulation par le TNF α , nous avons poursuivi cette étude sur des explants de muqueuse bronchique humaine. En effet, la muqueuse bronchique humaine contient des activités glycosyl- et sulfotransférases plus élevées que celles des cellules MM-39 et qui, de plus, sont capables de synthétiser l'épitope 6-sulfo sialyl Le^x.

2.1.2. Transduction du signal du TNF α

Lorsque le TNF α se lie à son récepteur en surface de la cellule cible, le récepteur passe sous une forme activée, ce qui stimule des voies de signalisation intracellulaires, conduisant à des modifications d'expression de certains gènes de la cellule, de la traduction et

du métabolisme de protéines, aboutissant finalement à des phénomènes tels que la différenciation, la prolifération ou la mort cellulaire.

Trois voies de transduction ont été identifiées : la première fait intervenir la phospholipase A2 [Neale *et al.*, 1988], la deuxième dépend de la phospholipase C, spécifique de la phosphatidylcholine (PC-PLC) [Prasanna *et al.*, 1998], la troisième voie est celle de la sphingomyélinase [Peraldi *et al.*, 1996].

Le facteur de transcription le plus clairement impliqué dans la transduction du signal du TNF α est le NF-kappaB. La forme la plus fréquente du complexe NF-kappaB est un hétérodimère p50/p65, lié à l'I-kappaB, protéine inhibitrice empêchant la translocation du dimère dans le noyau. L'activation par le TNF α du complexe NF-kappaB procède par la phosphorylation de l'I-kappaB, permettant la dégradation de cet inhibiteur. Outre le NF-kappaB, le TNF α active également quatre autres facteurs de transcription, dont l'AP1 (constitué d'homodimères *c-jun* ou d'hétérodimères *c-jun/c-fos*), le NF-GMa, l'IRF-1 et -2. Par conséquent, le TNF α active une gamme de gènes très étendue, et induit la production consécutive de cytokines, facteurs de croissance, protéines du CMH (pour *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*), molécules d'adhérence, et glycoprotéines de la phase aiguë. Le TNF α pourrait également stimuler l'expression des gènes de mucines *MUC2* et *-5AC* qui possèdent dans leur promoteur une séquence de fixation pour le facteur NF-kappaB [Li *et al.*, 1998a, 1998b], ainsi que l'expression de glycoprotéines de la phase aiguë.

2.2. L'interleukine 4 (IL-4)

L'IL-4, qui jouerait un rôle important dans certaines formes d'asthme, induit une hypersécrétion de mucus ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène de mucine *Muc5AC* dans le poumon de Souris, ainsi qu'au niveau de cellules murines bronchiques en culture [Temann *et al.*, 1997 ; Dabbagh *et al.*, 1999]. L'IL-4 serait également impliquée dans la différenciation de l'épithélium bronchique en cellules caliciformes muci-sécrétantes [Dabbagh *et al.*, 1999]. Des résultats inverses ont été décrits concernant des cellules trachéo-bronchiques humaines en culture, pour lesquelles l'IL-4 a un effet inhibiteur sur la sécrétion de mucines et sur l'expression des gènes de mucines *MUC5AC* et *-5B* [Jayawickreme *et al.*, 1999].

Au total, l'inflammation et les cytokines semblent avoir un effet sur la synthèse et la glycosylation d'un certain nombre de protéines.

B - Travaux personnels

I. Étude de la sialylation, la sulfatation et de l'expression de l'épitope sialyl Le^x au niveau de mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique, infectés ou non.

Outre l'hypersulfatation des mucines bronchiques sécrétées par des patients CF, il a également été montré que les mucines salivaires de ces malades, qui sont mieux reconnues par différentes souches de *P. aeruginosa* que les mucines salivaires de sujets normaux, étaient à la fois plus sulfatées, plus fucosylées, et plus sialylées [Carnoy *et al.*, 1993]. Il existe un véritable paradoxe concernant la sialylation des glycoconjugués CF : si les glycoconjugués membranaires ou sécrétés par les cellules CF semblent contenir moins d'acide sialique que la normale, les mucines salivaires de patients CF sont hypersialylées.

Nous avons donc cherché à savoir si, dans les formes sévères de mucoviscidose, les mucines bronchiques ne présenteraient pas, outre des anomalies de sulfatation qui seraient liées au déficit primaire de la maladie, d'autres anomalies post-traductionnelles (de sialylation et de fucosylation) liées à la réponse inflammatoire et qui pourraient faire le lit de la colonisation par *P. aeruginosa*.

Plusieurs observations nous ont incités à entreprendre cette étude :

↪ la démonstration de la précocité de l'inflammation dans la mucoviscidose [Bonfield *et al.*, 1995a] ;

↪ l'observation, faite par le groupe de van Dijk, de modifications profondes de la fucosylation de certaines glycoprotéines de la réponse inflammatoire (les *acute phase proteins*), avec notamment l'hyperexpression de l'épitope sialyl Le^x, qui est un bon ligand des sélectines [Brinkman-van der Linden *et al.*, 1996] ;

↪ la mise en évidence d'autres anomalies post-traductionnelles des mucines salivaires des sujets CF (en dehors de l'hypersulfatation), notamment d'hypersialylation et d'hyperfucosylation [Carnoy *et al.*, 1993] ;

↳ la présence de nombreux épitopes sialyl Le^x et de leurs dérivés sulfatés dans les mucines bronchiques humaines, notamment de sujets CF [Lo-Guidice *et al.*, 1994].

Nous avons donc purifié 38 mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique, infectés ou non, et étudié (i) leur composition en sulfate et acide sialique et (ii) l'expression de l'épitope glycannique sialyl Le^x en périphérie de ces mucines.

Le but de ce travail était de savoir s'il existait un lien entre les anomalies des glycosylation/sulfatation des mucines bronchiques et (i) le déficit primaire de la maladie ou (ii) le degré d'inflammation des malades, évalué par le rapport de l'absorbance à 260 nm (acides nucléiques) sur l'absorbance à 520 nm (copule glucidique).

Ces résultats ont été publiés dans la revue *Glycobiology* sous le titre : «The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. (1999) *Glycobiology*, 9, 311-321».

The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection

Monique Davril, Sophie Degroote, Pascale Humbert, Claude Galabert², Viviane Dumur¹, Jean-Jacques Lafitte¹, Geneviève Lamblin and Philippe Roussel³

Unité INSERM no. 377 and ¹Université de Lille 2, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France and ²Hôpital René Sabran, Giens, 83400 Hyères, France

Received on June 16, 1998; revised on July 17, 1998; accepted on July 24, 1998

³To whom correspondence should be addressed

Bronchial mucins were purified from the sputum of 14 patients suffering from cystic fibrosis and 24 patients suffering from chronic bronchitis, using two CsBr density-gradient centrifugations. The presence of DNA in each secretion was used as an index to estimate the severity of infection and allowed to subdivide the mucins into four groups corresponding to infected or noninfected patients with cystic fibrosis, and to infected or noninfected patients with chronic bronchitis. All infected patients suffering from cystic fibrosis were colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. As already observed, the mucins from the patients with cystic fibrosis had a higher sulfate content than the mucins from the patients with chronic bronchitis. However, there was a striking increase in the sialic acid content of the mucins secreted by severely infected patients as compared to noninfected patients. Thirty-six bronchial mucins out of 38 contained the sialyl-Lewis x epitope which was even expressed by subjects phenotyped as Lewis negative, indicating that at least one α 1,3 fucosyltransferase different from the Lewis enzyme was involved in the biosynthesis of this epitope. Finally, the sialyl-Lewis x determinant was also overexpressed in the mucins from severely infected patients. Altogether these differences in the glycosylation process of mucins from infected and noninfected patients suggest that bacterial infection influences the expression of sialyltransferases and α 1,3 fucosyltransferases in the human bronchial mucosa.

Key words: fucosyltransferases/inflammation/sialic acid/sialyl-Lewis x/sialyltransferases

Introduction

Cystic fibrosis (CF), a general exocrinopathy, is the most frequent, lethal inherited disease affecting Caucasians (Welsh *et al.*, 1995). CF is due to alterations of the CF gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Welsh *et al.*, 1995). CFTR is a cAMP-regulated chloride channel but has other functions such as regulation of sodium channels, outwardly rectifying chloride channels, and also transport of ATP (Boucher, 1994; Welsh *et al.*, 1995; Devidas and Guggino, 1997). CF patients usually suffer from chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa* leading to a progressive and destructive lung disease. The pathophysiology of the chronic lung infection is not well

understood. CF respiratory cells have defective chloride secretion and elevated sodium absorption (Boucher, 1994), and lung infection may result from an alteration of the airway mucociliary clearance and/or from abnormalities in the defense mechanisms related to abnormal ion and water movements across the airway epithelium (Smith *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 1997). However, the ion concentration of airway surface liquid of patients suffering from cystic fibrosis is currently a matter of debate (Knowles *et al.*, 1997). In addition to its role on ion movements, CFTR may influence the processing of glycoproteins and alterations of the CF gene may affect the biosynthesis of airway mucins.

Human airway mucins are high molecular weight and heavily glycosylated glycoproteins synthesized in goblet cells and bronchial glands of the human airway mucosa. They are encoded by several mucin genes and the synthesized apomucins undergo very diverse posttranslational modifications leading to hundreds of different carbohydrate chains that can be devoid of acidic residues or substituted by N-acetylneuraminic acid and/or sulfate groups (Roussel and Lamblin, 1996). These airway mucins are part of the mucociliary escalator which normally removes inhaled particles or microorganisms, and the carbohydrate chains are believed to act as recognition sites for bacteria or viruses. As a matter of fact, several neutral or sialylated carbohydrate chains analogous to carbohydrate chains of airway mucins may be recognized by different microorganisms (Roussel and Lamblin, 1996).

Altered sulfate content of airway mucins from CF patients has been reported (Roussel *et al.*, 1975; Boat *et al.*, 1976; Lamblin *et al.*, 1977; Chace *et al.*, 1985). Since the airways of these patients are usually heavily infected, especially by *P. aeruginosa*, the relationship of such mucin abnormalities with the primary defect of cystic fibrosis has been questioned for a long time. However, altered sulfation and glycosylation of glycoproteins secreted by CF cells in culture (Frates *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1989; Barasch *et al.*, 1991; Barasch and Al-Awqati, 1993) as well as hypersulfation of CF human airway mucins secreted by a xenograft model of CF airway mucosa have also been reported (Zhang *et al.*, 1995). The lack of infection in the xenograft model suggests a link between hypersulfation of CF mucins and the primary defect of the disease. Nevertheless, there is so far no evidence for an involvement of sulfate groups in the ability of airway mucins to bind to *P. aeruginosa*.

More recently, much attention has been paid to the precocity of lung inflammation in CF patients (Birrer *et al.*, 1994; Konstan *et al.*, 1994; Bonfield *et al.*, 1995a,b) and to the excessive inflammatory response of CF mice to bronchopulmonary infection with *P. aeruginosa* (Heeckeren *et al.*, 1997). Therefore, the question of whether or not mucosal alterations due to inflammation pave the way for subsequent bacterial colonization is a matter of debate.

Inflammation as such may modify certain glycoproteins. Quantitative alterations of acute phase glycoproteins synthesized in the liver in relation to inflammation are well known but several recent reports have indicated possible glycosylation alterations of

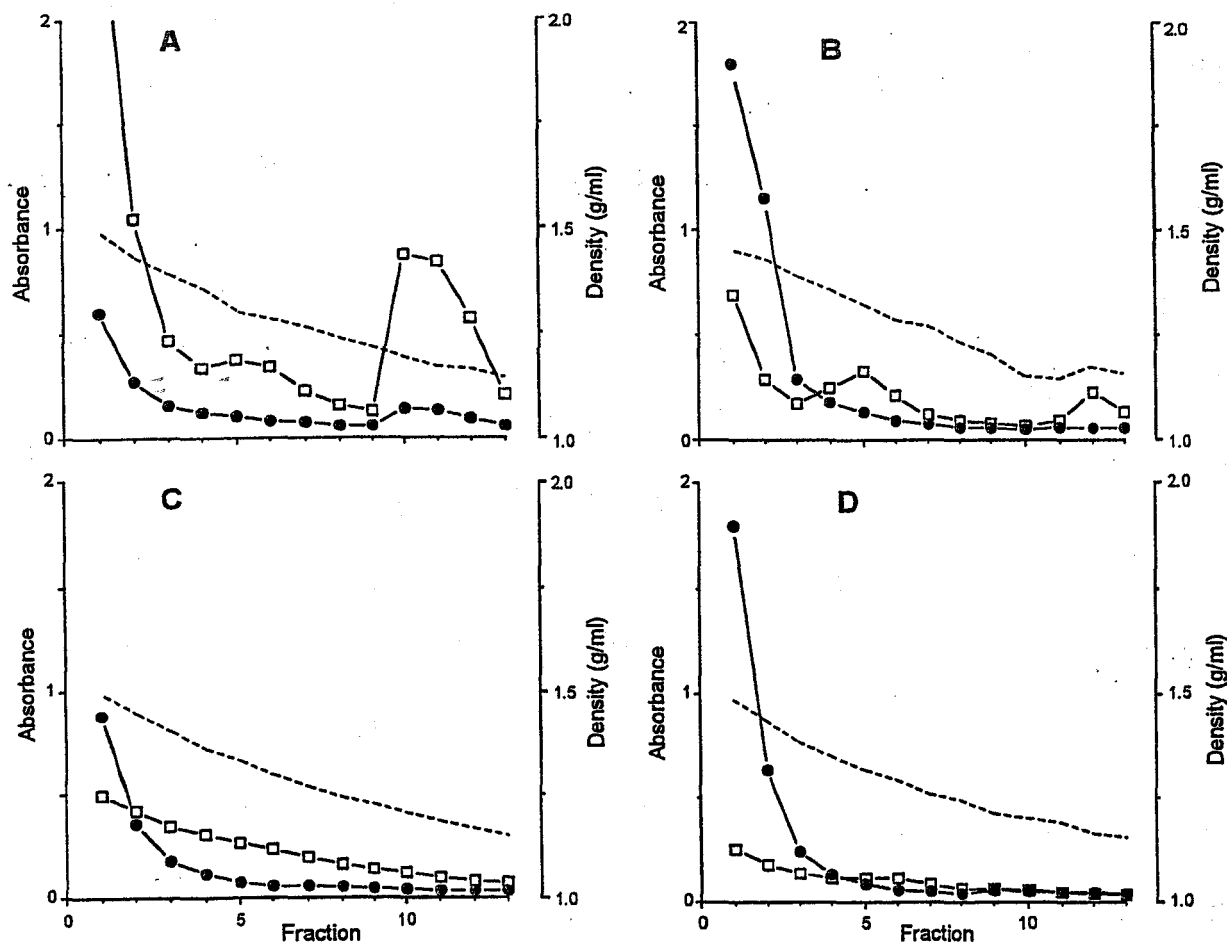


Fig. 1. CsBr density-gradient centrifugation profiles of two mucin preparations obtained from an infected patient suffering from cystic fibrosis (A and C) and from a noninfected patient suffering from chronic bronchitis (B and D). Sputum supernatants (80 mg) were submitted to a first step of density-gradient centrifugation (A and B). Fractions 1–3 were collected, treated by nucleases and glycosaminoglycan-degrading enzymes, and further submitted to a second step of density-gradient centrifugation (C and D). The purified mucins were collected in tubes 1–3. Open boxes indicate $A_{260\text{nm}}$ and solid circles $A_{520\text{nm}}$; dotted line signifies density.

acute phase glycoproteins such as an increased expression of sialyl-Lewis x epitopes in relation to the secretion of cytokines (De Graaf *et al.*, 1993; Havenaar *et al.*, 1995). Many carbohydrate chains containing the sialyl-Lewis x epitope have been isolated from mucins secreted by patients suffering either from cystic fibrosis or from chronic bronchitis (Lamblin *et al.*, 1984; Breg *et al.*, 1987; Van Halbeek *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1993). One may therefore raise the question of an alteration of the glycosylation process in the airway mucosa of severely infected patients.

In the present work, we purified 38 mucins secreted by patients, severely infected or not, suffering either from cystic fibrosis or from chronic bronchitis and we compared their sialic acid and sulfate contents, as well as the sialyl-Lewis x expression. The mucins from infected patients were more sialylated and contained more sialyl-Lewis x epitopes than the mucins from not severely infected patients.

Results

Bronchial mucin purification and estimation of infection

Mucin isolation from the 38 samples of the patients under study (14 patients suffering from cystic fibrosis and 24 patients

suffering from chronic bronchitis) was performed by a first step of density-gradient centrifugation. Figure 1 shows typical separations obtained from the sputum of an infected patient suffering from cystic fibrosis (Figure 1A) and from the sputum of a noninfected patient suffering from chronic bronchitis (Figure 1B). In the CF sample, the high-density, orcinol-reactive fraction containing the mucins exhibits a high absorbance at 260 nm, suggesting the presence of nucleic acid (Figure 1A). The presence of nucleic acid in this mucin fraction was detected by agarose electrophoresis (Figure 2). Mucins were intensively stained by Schiff-periodate in the two samples, whereas the anodic band stained with toluidine blue and corresponding mostly to nucleic acid was only visualized in the CF sample (Figure 2).

We therefore attempted to estimate an index of infection of each sample by calculating the following ratio: absorbance at 260 nm (nucleic acid estimation)/absorbance at 520 nm with orcinol (carbohydrate reaction). As shown on Figure 3, comparison of this index with the presence or absence of nucleic acid on agarose electrophoresis after the first step of density-gradient centrifugation allowed a subclassification of the 38 patients into a group of 20 infected patients (ratio above 1.1) and another group of 18 mildly (or non-) infected patients (ratio below 1.1). The first group corresponded to young CF patients (Table I, patients 1–13) and

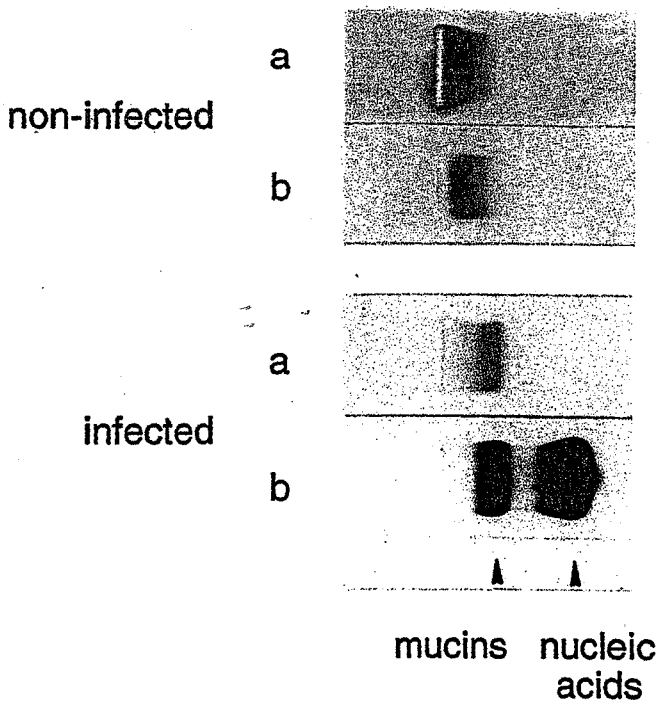


Fig. 2. Comparative study on agarose gel electrophoresis of the mucin-containing fractions obtained by CsBr density-gradient centrifugation (1st step in Figure 1) of sputum supernatants from a noninfected patient suffering from chronic bronchitis and from an infected patient suffering from cystic fibrosis. The gels were stained by periodic acid-Schiff (a) and by toluidine blue (b). Mucins are visualized by periodic acid-Schiff. In contrast to the sample from the noninfected patient, the sample from the infected patient contains an anodic band stained by toluidine blue corresponding mostly to nucleic acids.

to older patients suffering from chronic bronchitis (Table I, patients 15–21). In this group of severely infected patients, all the CF patients and three CB patients (patients 15, 19, and 21) were colonized by *P.aeruginosa*, whereas the other patients suffering from chronic bronchitis (patients 16, 17, 18, and 20) were colonized by other bacteria (data not shown). The second group corresponded to 17 adult patients suffering from chronic bronchitis (Table I, patients 22–38) and to one CF patient (Table I, patient 14) who were not or only mildly infected (the detailed germ analyses are not shown). Patient 14, although harboring some *P.aeruginosa*, was mildly infected at the time his sputum was sampled.

After the first step of centrifugation, the mucin fractions were treated by nucleases and glycosaminoglycan-degrading enzymes to remove the contaminating nucleic acids and proteoglycans if any (Rahmoune *et al.*, 1991). They were further purified using a second step of density-gradient centrifugation (Figure 1C,D).

Sulfate content of the 38 bronchial mucins

The sulfate content of the 38 mucins is reported in Table I. The average sulfation of bronchial mucins from patients suffering

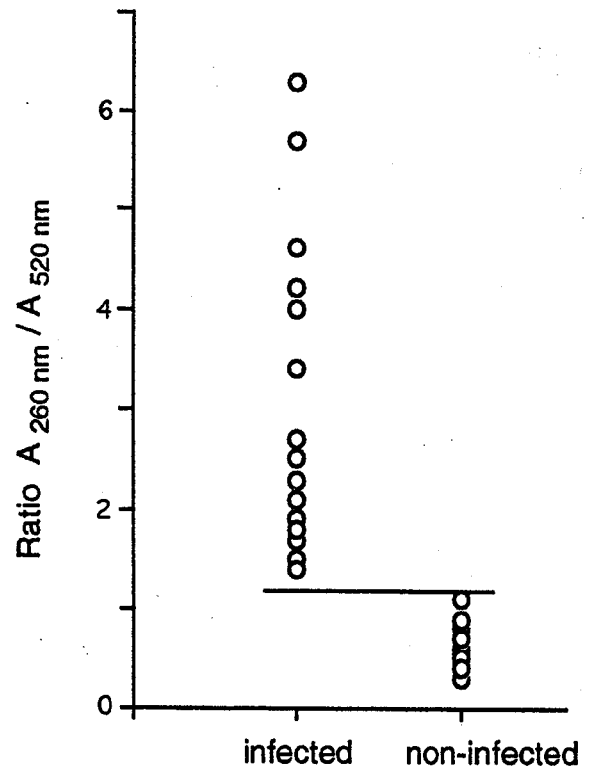


Fig. 3. Determination of the ratio $A_{260\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ (nucleic acids/neutral sugar) in the mucin preparations (1st step of CsBr density-gradient centrifugation) from infected ($n = 20$) and noninfected patients ($n = 18$).

from cystic fibrosis ($3.31\% \pm 0.25$) was higher than that of mucins from the patients suffering from chronic bronchitis ($2.67\% \pm 0.56$), and the difference was significant ($P = 0.024$). Moreover, the average sulfation of bronchial mucins from the 20 infected patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis ($3.16\% \pm 0.18$) was also higher than that of the mucins from the 18 noninfected patients ($2.62\% \pm 0.15$), and the difference was significant ($P = 0.014$).

Sialic acid content of the 38 bronchial mucins

The 38 individual mucins were also investigated for their N-acetylneuraminic acid content (Table I). Comparison of the two groups of patients according to infection showed that the mucins of the infected patients had a higher sialic acid content (mean: 7.18%) than that of the mucins from noninfected patients (mean: 3.92% ; Table II). This difference is highly significant. When the two groups of patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis were subdivided according to infection, one could observe that the sialic acid contents of the mucins from the infected patients suffering either from cystic fibrosis or from chronic bronchitis were significantly higher than those of the noninfected patients (Figure 4, Table II).

Table I. Sulfate, sialic acid and sialyl-Lewis x contents of 38 human respiratory mucins from infected or noninfected patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis

Patient	Mutations	<i>Pa</i> , <i>Bc</i> ^a	A _{260 nm} /A _{520 nm}	Sulfate ^b	Sialic acid ^b	Sialyl-Lewis x ^c	Phenotype ^d
1 CF	ΔF508/L137R	<i>Pa</i>	6.3	4.8	9.1	1.02	Se/Le
2 CF	ΔF508/S1251N	<i>Pa</i>	2.1	2.7	9.2	1.75	se/le
3 CF	ΔF508/S1251N	<i>Pa</i>	1.9	2.9	7.9	1.98	se/le
4 CF	ΔF508/ΔF508	<i>Pa</i>	2.3	3.1	8.0	0.96	Se/Le
5 CF	ΔF508/ΔF508	<i>Pa</i>	1.4	3.1	6.0	1.19	Se/Le
6 CF	ΔF508/2184DelA	<i>Pa</i>	1.5	5.6	5.2	1.49	Se/Le
7 CF	ΔF508/ 1717-1G→A	<i>Pa</i>	1.8	3.3	6.2	1.51	Se/Le
8 CF	ΔF508/unknown	<i>Pa</i>	4.2	3.3	8.2	0.66	se/le
9 CF	N.D.	<i>Pa</i>	1.5	3.6	4.7	0.81	Se/le
10 CF	ΔF508/ΔF508	<i>Pa</i> + <i>Bc</i>	4.0	2.2	10.0	1.23	Se/Le
11 CF	ΔF508/2143DelT	<i>Bc</i>	2.5	2.5	8.5	1.33	Se/Le
12 CF	ΔF508/unknown	<i>Pa</i> + <i>Bc</i>	1.4	2.6	7.2	0.67	Se/Le
13 CF	ΔF508/ΔF508	<i>Pa</i> + <i>Bc</i>	5.7	2.7	9.4	0.81	Se/Le
14 CF	ΔF508/-	<i>Pa</i>	0.8	3.9	1.6	0.02	Se/Le
15 CB	N.D.	<i>Pa</i>	2.7	3.4	4.3	1.50	Se/le
16 CB	N.D.		3.4	3.3	9.7	0.94	Se/Le
17 CB	N.D.		1.7	3.2	2.0	0.82	Se/Le
18 CB	N.D.		4.6	2.6	8.2	1.31	Se/Le
19 CB	N.D.	<i>Pa</i>	1.4	2.5	6.5	1.14	Se/Le
20 CB	N.D.		1.8	3.3	5.8	1.03	se/Le
21 CB	N.D.	<i>Pa</i>	2.7	2.5	7.6	1.00	Se/Le
22 CB	N.D.		0.6	3.2	6.8	0.94	Se/Le
23 CB	N.D.		0.4	2.3	3.1	1.02	Se/Le
24 CB	N.D.		0.9	4.0	1.3	0.03	Se/Le
25 CB	N.D.	<i>Pa</i>	0.6	2.4	4.7	1.44	Se/le
26 CB	N.D.		0.7	2.6	3.3	0.67	se/Le
27 CB	N.D.		0.4	2.1	4.0	1.26	Se/Le
28 CB	N.D.		0.5	1.8	3.1	1.44	Se/Le
29 CB	N.D.		0.9	2.2	4.9	0.67	Se/Le
30 CB	N.D.		0.4	2.8	6.1	0.85	se/Le
31 CB	N.D.		1.1	2.3	4.2	1.10	Se/Le
32 CB	N.D.		0.4	2.0	3.0	1.19	Se/Le
33 CB	N.D.		0.3	1.6	3.5	0.67	Se/Le
34 CB	N.D.		0.4	2.5	5.8	0.90	Se/Le
35 CB	N.D.		0.5	2.9	3.2	0.51	se/Le
36 CB	N.D.		0.4	3.1	2.4	0.14	Se/le
37 CB	N.D.		0.4	2.9	2.1	0.13	Se/Le
38 CB	N.D.		0.7	2.5	7.5	1.41	Se/Le

N.D., Not determined

^a*Pa*, Presence of *Pseudomonas aeruginosa*; *Bc*, presence of *Burkholderia cepacia*.^bSulfate and sialic acid are expressed in % by weight.^cThe reactivity of the mucin samples with the anti-sialyl-Lewis x mAb was determined in ELISA assay by measuring absorbance at 490 nm.^dThe determination of the secretor and Lewis status of each mucin is indicated in Table III.

Table II. Comparison of the sialic acid content and of the sialyl-Lewis x reactivity of the bronchial mucins from infected and noninfected patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis

Mucin origin	No. subjects	Sialic acid ^a	<i>P</i>	Sialyl-Lewis x ^b	<i>P</i>
Infected (CF + CB)	20	7.18 ± 0.46	0.0001 (inf vs. non-inf)	1.16 ± 0.08	0.035 (inf. vs. non-inf)
Noninfected (CF + CB)	18	3.92 ± 0.41		0.80 ± 0.11	
Infected CF	13	7.66 ± 0.47	NS (inf CF vs. inf CB)	1.19 ± 0.12	NS (inf CF vs inf CB)
Noninfected CF	1	1.6		0.02	
Infected CB	7	6.30 ± 0.97	0.04 (inf. CB vs. non-inf CB)	1.11 ± 0.09	NS (inf. CB vs. non-inf CB)
Noninfected CB	17	4.06 ± 0.41	0.0001 (inf CF vs. non-inf CB)	0.85 ± 0.11	NS (inf CF vs. non-inf CB)

The mucins were obtained from infected (inf) or non-infected (non-inf) mucus samples from patients suffering from cystic fibrosis (CF) or from chronic bronchitis (CB).

^aMean ± SEM. Sialic acid is expressed in % by weight.

^bMean ± SEM. The reactivity of the mucin samples with the anti-sialyl-Lewis x mAb was determined in ELISA assay by measuring absorbance at 490 nm.

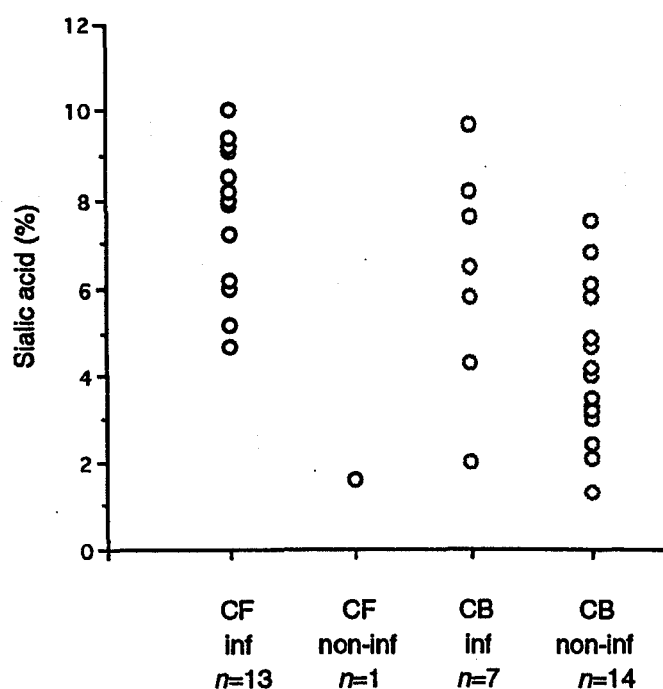


Fig. 4. N-Acetylneuraminic acid content of purified mucins from infected (inf) and noninfected (non-inf) patients suffering either from cystic fibrosis or from chronic bronchitis. Means ± SEM are indicated in Table II.

Secretor and Lewis phenotyping of the purified mucins

The secretor and Lewis phenotypes were checked before assaying the sialyl-Lewis x reactivity of the 38 mucins. Figure 5 summarizes the pathways including the fucosyltransferases Fuc-TII (secretor enzyme) and Fuc-TIII (Lewis enzyme) which are supposed to be involved in the biosynthesis of the different secretor and Lewis epitopes of human bronchial mucins.

In order to establish the secretor status of the mucins, ELISA assays were used with both the anti-H mAb and the *Ulex europaeus* lectin which recognize the H-type 2 antigen. Anti-Lewis a and anti-sialyl-Lewis a mAbs were used to assess the Lewis status of the mucins. The simultaneous expression of H and Lewis determinants was assessed using anti-Lewis b and anti-Lewis y mAbs (see Figure 5 and Table III).

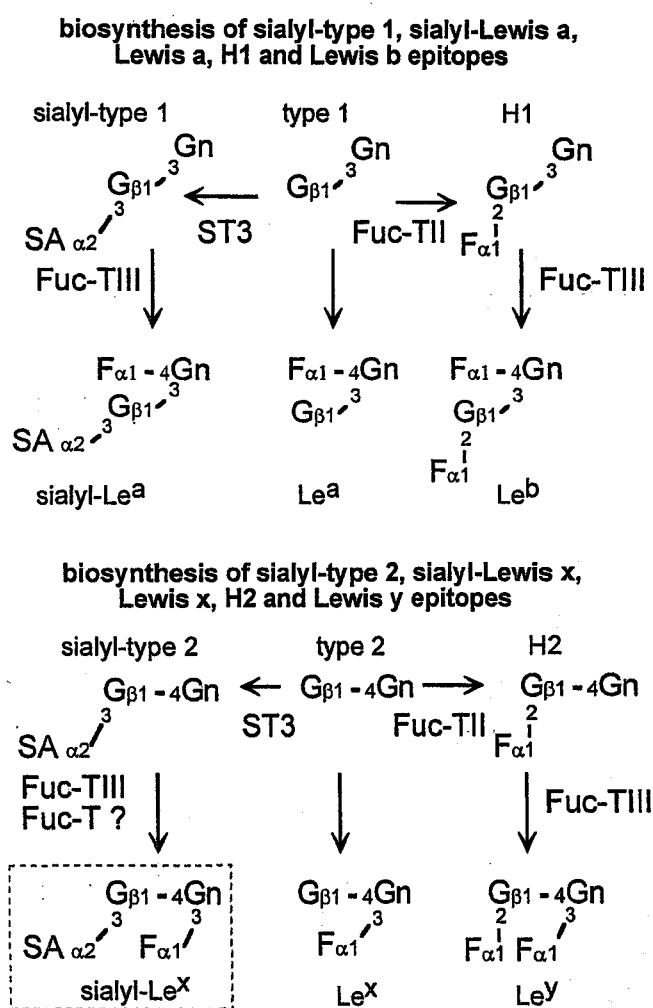


Fig. 5. Biosynthesis of Lewis and H mucin epitopes. G, Galactose; Gn, N-acetylglucosamine; F, fucose; SA, N-acetylneuraminic acid; ST3, α2,3-sialyltransferase; Fuc-TII, α1,2 fucosyltransferase; Fuc-TIII, α1,3/4 fucosyltransferase.

Table III. Determination of the Secretor and Lewis phenotypes of 38 respiratory mucins

Patient	H	<i>Ulex</i>	Le ^y	Le ^b	Le ^a	Sia-Le ^a	Phenotype	ABO
1 CF	0.40	0.49	0.17	0.54	0.09	0.38	Se/Le	O
2 CF	0.01	0.01	0.00	0.01	0.09	0.05	se/le	O
3 CF	0.01	0.00	0.00	0.02	0.09	0.09	se/le	O
4 CF	0.52	0.79	0.21	0.69	0.05	0.44	Se/Le	O
5 CF	0.94	0.98	0.54	0.81	0.12	0.19	Se/Le	O
6 CF	0.81	1.17	0.13	1.05	0.26	0.36	Se/Le	O
7 CF	1.28	1.97	0.28	1.34	0.06	0.10	Se/Le	O
8 CF	0.03	0.05	0.07	0.11	0.03	0.17	se/le	O
9 CF	0.20	0.11	0.08	0.01	0.02	0.00	Se/le	O
10 CF	0.66	0.60	0.83	0.90	0.16	0.31	Se/Le	O
11 CF	0.87	0.58	0.83	1.04	0.10	0.12	Se/Le	O
12 CF	0.28	0.36	0.31	0.47	0.02	0.17	Se/Le	O
13 CF	0.06	0.03	0.11	0.15	0.02	0.42	Se/Le	A
14 CF	0.06	0.18	0.02	0.39	0.06	0.01	Se/Le	A
15 CB	1.17	1.15	0.29	0.03	0.03	0.00	Se/le	O
16 CB	0.31	0.09	0.29	0.60	0.20	0.28	Se/Le	O
17 CB	1.34	1.34	0.48	1.40	0.25	0.07	Se/Le	O
18 CB	0.57	0.22	0.43	0.56	0.02	0.18	Se/Le	O
19 CB	0.08	0.03	0.06	0.32	0.29	0.24	Se/Le	A
20 CB	0.03	0.01	0.03	0.18	0.79	1.61	se/Le	A
21 CB	0.02	0.00	0.07	0.26	0.14	0.44	Se/Le	B
22 CB	0.27	0.17	0.20	0.41	0.02	0.13	Se/Le	O
23 CB	1.21	1.34	0.28	1.05	0.22	0.24	Se/Le	O
24 CB	0.22	0.19	0.05	0.65	0.20	0.03	Se/Le	O
25 CB	1.82	2.07	0.18	0.01	0.02	0.00	Se/le	O
26 CB	0.00	0.00	0.01	0.86	1.22	1.07	se/Le	O
27 CB	1.25	1.21	0.20	0.99	0.11	0.04	Se/Le	O
28 CB	1.49	1.53	0.12	1.23	0.35	0.27	Se/Le	O
29 CB	0.82	0.66	0.60	0.60	0.04	0.12	Se/Le	O
30 CB	0.01	0.01	0.02	0.28	0.54	1.07	se/Le	O
31 CB	1.49	1.23	0.70	1.00	0.21	0.12	Se/Le	O
32 CB	1.73	1.90	0.30	1.27	0.43	0.21	Se/Le	O
33 CB	0.74	0.75	0.16	0.53	0.02	0.12	Se/Le	O
34 CB	0.95	0.66	0.96	0.71	0.03	0.29	Se/Le	O
35 CB	0.01	0.00	0.04	0.90	1.95	0.83	se/Le	O
36 CB	0.03	0.11	0.20	0.00	0.00	0.00	Se/le	O
37 CB	1.03	1.76	0.60	0.72	0.06	0.02	Se/Le	O
38 CB	0.06	0.02	0.18	0.37	0.38	0.60	Se/Le	A

The reactivity of the mucin samples with the lectin (*Ulex*) and mAbs was determined in ELISA assay by measuring absorbance at 490 nm.

The two patients (patients 2 and 3) whose mucins did not react with the *Ulex* lectin or anti-Lewis antibodies (Table III) were genotyped for the 428G-A mutation of the secretor gene (*FUT2*) and for the most frequent mutations of the Lewis gene (*FUT3*). They were characterized as homozygotes for the mutation 428G-A of the *FUT2* gene and compound heterozygotes for the

FUT3 gene (59T-G and 1067T-A for one allele, and 202T-C and 314C-T for the other). Therefore, the genotyping of these two patients confirmed the phenotyping of their mucins: these patients did not express active fucosyltransferase Fuc-TII or Fuc-TIII.

Sialyl-Lewis x expression in the 38 bronchial mucins

The sialyl-Lewis x reactivity of the purified mucins is presented in Table I. Comparison with the secretor and Lewis status (Table I) shows that mucins from seven patients (patients 2, 3, 8, 9, 15, 25, and 36) phenotyped as Lewis negative have a sialyl-Lewis x reactivity. This indicates that the expression of sialyl-Lewis x in these patients implies a fucosyltransferase which is different from the fucosyltransferase Fuc-TIII.

The comparison of the different groups of airway mucins is shown on Table II. The average sialyl-Lewis x reactivity of the infected samples is higher than that of noninfected samples but there is no significant difference between mucins secreted by CF patients and mucins secreted by patients suffering from chronic bronchitis.

Discussion

In the present work, we compared the sulfate and sialic acid contents as well as the sialyl-Lewis x expression of bronchial mucins from 38 patients suffering from chronic bronchitis or from cystic fibrosis.

The present data confirm the higher sulfation already reported in cystic fibrosis (Roussel *et al.*, 1975; Boat *et al.*, 1976; Lamblin *et al.*, 1977; Chace *et al.*, 1985). Several hypotheses have been postulated to explain this oversulfation which is related to the primary defect (Zhang *et al.*, 1995). It has been suggested that, in CF cells, alkalization of the *trans*-Golgi network may modify the activity of sulfotransferases (Barasch *et al.*, 1991). Structural studies of the sulfated carbohydrate chains of bronchial mucins from a patient suffering from cystic fibrosis have shown more carbohydrate chains bearing a 6-sulfated N-acetylglucosamine than chains having a 3-sulfated terminal galactose (Lo-Guidice *et al.*, 1994). The two sulfotransferases responsible for these sulfation reactions have been characterized and the optimal pH of the 6-sulfo-N-acetylglucosamine-transferase is higher than that of the 3-sulfo-galactosyl-transferase (Lo-Guidice *et al.*, 1995; Degroote *et al.*, 1997), an observation which may suggest a preferential activity of the 6-sulfo-N-acetylglucosamine-transferase in CF. However, this issue of an alkalization of the *trans*-Golgi network is controversial (Seksek *et al.*, 1996). More recently, it has been suggested that the concentration of PAPS, the sulfate donor, may be regulated in part by CFTR (Pasyk and Foskett, 1997) and therefore may influence the sulfation process. The wild-type CFTR would tend to lower the PAPS concentration in the Golgi lumen by letting PAPS leak out of the Golgi whereas the lack of CFTR in CF would increase PAPS concentration in the Golgi and therefore would favor sulfation reactions.

The sulfate content of the mucins from the infected patients was also higher than that of the mucins from the noninfected patients, and this raises the question of a possible influence of severe inflammation on the sulfation process.

Surprisingly, the sialic acid level of bronchial mucins from severely infected CF and CB patients was significantly higher than that of the mucins secreted by non-infected patients suffering from chronic bronchitis. According to our estimation of infection (Figure 3), we could observe only one noninfected CF patient (patient 14) and, as shown in Table I, the sulfate content of his bronchial mucins was high in contrast to the sialic acid content. The increased sialylation of mucins from infected patients is in agreement with our previous report showing an increased sialylation of salivary mucin glycopeptides from CF patients as compared to normals (Carnoy *et al.*, 1993). However, in contrast

to these observations, several reports in the literature indicate a decrease in the sialic acid content of secreted or membrane-bound glycoproteins from CF cells in culture (Barasch *et al.*, 1991; Barasch and Al-Awqati, 1993; Dosanjh *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997). There are several reasons which might explain these discrepancies between glycoproteins secreted *in vivo* and glycoproteins obtained from cell cultures. Most immortalized respiratory cell lines studied so far may differ from typical mucin-secreting cells in the human bronchial mucosa. Some of these immortalized cell lines adopt an unusual mixed, serous and mucous, phenotype (Lo-Guidice *et al.*, 1997). *In vivo*, there are differences in the sialylation pattern of the various cells of the bronchial epithelium: sialylation of the terminal galactose residues of mucins contained in goblet cells occurs mostly on the 3-OH of these residues, whereas sialylation of membrane-bound glycoproteins of the other bronchial cells occurs predominantly on the 6-OH of the terminal galactose residues (Couceiro *et al.*, 1993). This last observation is also in agreement with all the structural works performed on carbohydrate chains of secreted human bronchial mucins, showing very little sialylation of bronchial mucins on the 6-OH of a terminal galactose (Roussel and Lamblin, 1996).

One should also consider that glycoproteins secreted by cells in culture may not have the same inflammatory environment as mucosal cells of infected patients. Even if the basic defect induces a tendency to decrease the sialylation process in cultured CF cells (Barasch *et al.*, 1991), this tendency might be reversed *in vivo* by the inflammatory reaction. So far, there are indications that TNF may enhance some $\alpha 2,3$ sialyltransferase activity and a sialyl-Lewis x expression in colonic adenocarcinoma cell lines (Majuri *et al.*, 1995).

In human airway mucins, sialic acid may also be attached to the 6-OH of the GalNAc residue involved in the carbohydrate-peptide linkage. However, there is a large predominance of chains with a sialic acid linked $\alpha 2,3$ to galactose as compared to chains with sialic acid linked $\alpha 2,6$ to N-acetylgalactosamine (Breg *et al.*, 1987; Lo-Guidice *et al.*, 1994) and, in mucins secreted by CF patients, the proportion of short sialylated chains is usually low.

Theoretically, different fucosyltransferases, Fuc-TI (H enzyme), Fuc-TII (secretor enzyme) and Fuc-TIII (Lewis enzyme), may be responsible for the fucosylation of human airway mucins, as well as the sialyl-Lewis x expression (Figure 5). The fucose content of respiratory mucins may vary according to the expression of these different fucosyltransferases, and especially according to the Lewis or H genotype of each individual. The mucins of two patients (patients 2 and 3) with blood group O (therefore expressing fucosyltransferase Fuc-TI for the biosynthesis of erythrocyte glycoconjugates) did not contain any H or Lewis epitopes (Table III). These two patients were considered as nonsecretor and Lewis negative and this was confirmed by finding inactivating mutations on the genes encoding fucosyltransferases Fuc-TII and Fuc-TIII. Moreover, the absence of H epitope on the mucins of these patients suggests that the fucosyltransferase Fuc-TI is not involved in the biosynthesis of respiratory mucins and probably implies that Fuc-TII is responsible for the fucosylation of both type 1 and 2 chains in the respiratory mucosa of secretor patients (see Figure 5).

In the present work, the sialyl-Lewis x epitope is expressed in 36 mucins out of 38 (Table I). Several carbohydrate chains bearing this epitope have already been identified in the mucins secreted by CF patients (Lamblin *et al.*, 1984; Breg *et al.*, 1987) and by a patient suffering from chronic bronchitis (Van Halbeek *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1993). Glycopeptides from airway mucins bearing sialyl-Lewis x epitopes bind to L-selectin (Crottet

et al., 1996), and mucins in the airways may probably interact with leukocytes which are abundant in infected mucus. However, the physiological significance of the present observation, an overexpression of the sialyl-Lewis x epitope in mucins from infected mucus, is an open question.

Interestingly, this sialyl-Lewis x epitope is expressed as well in the mucins from the Lewis-positive subjects as in those from the Lewis-negative subjects (Table III). This is a strong indication that, in the human airway mucosa, a fucosyltransferase different from Fuc-TIII is also involved in the biosynthesis of the sialyl-Lewis x epitope (Figure 5). The fucosyltransferase Fuc-TIV which has been detected in human bronchial cells in culture (Emery *et al.*, 1997) is a possible candidate to catalyze this reaction.

Links between expression of fucosyltransferases and inflammation have been suggested by several investigators. In acute phase glycoproteins synthesized by the liver, the sialyl-Lewis x epitope is expressed in response to a stimulation of the fucosyltransferase Fuc-T-VI by cytokines (De Graaf *et al.*, 1993; Havenaar *et al.*, 1995; Brinkman-Van der Linden *et al.*, 1996). This epitope is also present on cultured human endothelial cells from the umbilical vein, and its expression increases after TNF- α stimulation as well as that of Fuc-TVI (Majuri *et al.*, 1994). This is also the case for colon adenocarcinoma cell lines where TNF- α enhances α 2,3-sialyltransferase and α 1,3/1,4-fucosyltransferase activities (Majuri *et al.*, 1995).

Therefore, the overexpression of sialyl-Lewis x in mucins from severely infected patients may correspond (1) to an increased expression of an α 2,3-sialyltransferase (ST3) competing with the fucosyltransferase Fuc-TII for the same substrate, the terminal Gal β 1,4GlcNAc chains (type 2 chains) (Figure 5), and possibly (2) to an increased expression of an α 2,3-fucosyltransferase activity.

There is only a weak correlation between the sialic acid content of the mucins and the sialyl-Lewis x epitope assayed by ELISA (data not shown), and there may be several explanations for this observation. As already mentioned, N-acetylneuraminic acid in airway mucins is predominantly attached to the C3 of a terminal galactose but it may also be attached to the C6 of an N-acetylgalactosamine residue linking a carbohydrate chain to the apomucin (Roussel and Lamblin, 1996). It is also possible that the ELISA assay is not convenient when glycoproteins contain clusters of certain epitopes such as sialyl-Lewis x, or that the antibody does not detect the sialyl-Lewis x determinant with a 6-sulfated GlcNAc, a structure which is frequently expressed on certain bronchial mucins such as the mucins from CF patients (Lo-Guidice *et al.*, 1994).

Finally, these different modifications of secreted CF mucins raise the question of their relationship with the colonization by *Paeruginosa*. Respiratory and salivary mucins from CF patients have been shown to have a higher affinity for *Paeruginosa* than most mucins from non-CF subjects (Carnoy *et al.*, 1993; Devaraj *et al.*, 1994). Several mucin-type carbohydrate epitopes, sialylated or neutral, are recognized *in vitro* by this microorganism (Welsh *et al.*, 1995). There are also data concerning the involvement of sialic acid in the aggregation of *Paeruginosa* by CF saliva: an increased aggregation of *Paeruginosa* mediated by saliva from patients with CF has been observed and seems to be directly related to the sialic acid content (Komiyama *et al.*, 1987).

However, the relevance of these observations to the *in vivo* situation is an open question. It has been shown that the abnormally high amounts of mucus secreted by CF patients might induce the expression of several genes in relation with the *Paeruginosa* infection (Lory *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996), but,

at the present time, we do not know if bacteria grown *in vitro* have the same adhesive properties as bacteria grown in the airways of patients. One should also mention that *Pseudomonas* exoproducts induce mucin overproduction by acting on κ B regulatory sites of mucin genes (Li *et al.*, 1998a,b).

In conclusion, bronchial mucins from CF patients severely infected by *Paeruginosa* undergo at least two biosynthetic abnormalities, (1) oversulfation which is mostly linked to the primary defect (Zhang *et al.*, 1995), and (2) hypersialylation and overexpression of sialyl-Lewis x which are not specific for CF and which may reflect a strong inflammatory reaction of the respiratory mucosa.

In the future, it will be necessary to identify the different sialyl- and fucosyltransferases expressed in the human bronchial mucosa and to investigate the influence of cytokines on their expression. In the case of cystic fibrosis, it will be important to find out if the overexpression of certain sialylated carbohydrate determinants may favor the airway colonization by *Paeruginosa*, the major problem faced by the patients suffering from this disease.

Materials and methods

Patients

Twenty-four patients suffering from chronic bronchitis and 14 patients suffering from cystic fibrosis were studied. All CF patients had a positive sweat test. The genotypes of the CF patients were: Δ F508/ Δ F508 ($n = 4$); Δ F508/S1251N ($n = 2$); Δ F508/L137R ($n = 1$); Δ F508/2184DelA ($n = 1$); Δ F508/2143DelT ($n = 1$); Δ F508/1717-1G $\rightarrow$ A ($n = 1$); Δ F508/unknown ($n = 2$); unknown ($n = 2$). The ABO blood group of these patients was determined. Sputa were collected and the individual samples were kept frozen until used.

Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in the sputa

The sputum samples were plated on the following media: Drigalski (for growth of *Pseudomonas aeruginosa*) and selective differential OFPBL agar (for growth of *Burkholderia cepacia*) containing 9.4 g oxidation-fermentation basal medium, 15.0 g Bacto agar, 10.0 g lactulose (all from Difco Lab.), 300,000 U polymyxin B sulfate and 200 U bacitracin (both from Sigma) per liter. Isolates were identified by standard biochemical procedures (API 20 NE, Bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Preparation of bronchial mucins

The collected sputa were thawed, diluted 1:12 with deionized water containing 0.02% sodium azide, stirred overnight at 4°C and centrifuged at 3000 $\times g$ for 30 min. The supernatants were dialyzed and freeze-dried (Slayter *et al.*, 1984). Aliquots of the above materials were dissolved by stirring at 4°C for 48 h in 16.7 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 33 mM NaCl, 0.02% sodium azide, and 42% CsBr. Insoluble materials, if any, were removed by centrifugation as above and the supernatants were submitted to a first step of density-gradient centrifugation at 43,000 r.p.m. for 72 h at 10°C, as described previously (Houdret *et al.*, 1986). Fractions (1 ml) were collected from the bottom of each centrifuge tube and aliquots were diluted 1:4 with deionized water.

The diluted aliquots were measured for absorbance of nucleic acid at 260 nm and for hexose content by an automated orcinol assay (Demaille *et al.*, 1965). Densities were also measured by weighing aliquots of each fraction. The high-density ($d \geq 1.46$ g/ml)

fractions were pooled and exhaustively dialyzed against deionized water and freeze-dried. The crude mucin preparations were subjected to a purification procedure which first involved nucleic acid removal. Aliquots were dissolved in 62 mM sodium tetraborate buffer, pH 8.8, containing 1.25 mM CaCl_2 and 0.05% BSA, in the presence of 50 μM Pefabloc SC[®] (Pentapharm, Basel, Switzerland). DNase (nuclease, micrococcal, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and RNase (type I-AS from bovine pancreas, Sigma) were added in amounts of 100 mU and 420 mU, respectively, per mg of crude mucin, and the mixtures were gently stirred for 24 h at 37°C. The same amounts of both enzymes were added again and the reaction was proceeded for another 24 h. The solutions were dialyzed and lyophilized. The nuclease-treated materials were then dissolved in 200 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 2 mM CaCl_2 , and the following enzymes were added: hyaluronate lyase from *S.hyalurolyticus* (type IX, Sigma), chondroitinase ABC from *P.vulgaris* (Seikagaku, Tokyo, Japan), heparinase III from *F.heparinum* (Sigma) in amounts of 100 mU, 50 mU, and 50 mU, respectively, per mg of nuclease-treated material. The mixtures were stirred overnight at 37°C and freeze-dried.

A second step of CsBr density-gradient centrifugation was then performed in the same conditions and the collected fractions were assayed as above. The high density-, hexose-rich materials which contained the purified mucins were recovered, dialyzed, and freeze-dried.

Agarose gel electrophoresis

Aliquots of the purified mucins (400 μg) were subjected to agarose gel electrophoresis in veronal buffer, pH 8.2, as described previously (Rahmoune *et al.*, 1991). Slides were stained for protein with amidoblack, for carbohydrate with periodic acid-Schiff reagent and for acidic components with toluidine blue.

Analytical procedures

Total sialic acid content was assessed, after hydrolysis with 0.1 M H_2SO_4 for 30 min at 80°C, by the thiobarbituric acid method (Aminoff, 1961) and expressed as N-acetylneuraminic acid. Sulfate determination was performed by high-pressure anion-exchange chromatography after hydrolysis with 1 M HCl for 5 h at 100°C (Lo-Guidice *et al.*, 1994).

Enzyme-linked immunosorbent assay

The purified mucin samples were dissolved in PBS, pH 7.2, and aliquots (25 ng in 100 μl PBS) were coated on 96-well Maxisorp immunoplates (Nunc, Roskilde, Denmark) overnight at 4°C. Unbound sites were blocked with BSA (1% in PBS) for 2 h at room temperature (RT). After washing with PBS, the following mouse mAbs, anti-H type 2 (Dako Corp., Carpinteria, CA) diluted 1:100; anti-Lewis b (Emery *et al.*, 1995) diluted 1:1000; anti-Lewis a (Seikagaku) diluted 1:16,000; anti-Lewis y (Seikagaku) diluted 1:100; anti-sialyl-Lewis a (Seikagaku) diluted 1:2000; anti-sialyl-Lewis x (Kamiya Biomed. Comp., Seattle, WA) diluted 1:400, all in PBS containing 1% BSA, were added and left for 1 h at RT. The wells were washed once with PBS-0.1% Tween-20 and three times with PBS. The peroxidase-conjugated goat antibody against mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Lab., Westgrove, PA) diluted 1:2000 in PBS-1% BSA was added and left for 90 min at RT. After successive washings as above, the plates were developed with o-phenylenediamine

(Sigma) at 1 mg/ml in 0.1 M sodium phosphate-citrate buffer, pH 5.5, in the presence of 0.03% H_2O_2 . The reaction was stopped with 1 M HCl, and the plates were read at 490 nm on a Bio-Rad model 3550 microplate reader (Bio-Rad Lab., Hercules, CA). *Ulex europaeus* lectin biotin-labeled (Seikagaku) and peroxidase-conjugated streptavidin (Pierce, Rockford, IL) were diluted 1:2000.

Genotyping of fucosyltransferases FUT2 and FUT3

Methods based upon polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism were used to detect mutations of the *FUT2* gene (coding for the Secretor enzyme) and of the *FUT3* gene (coding for the Lewis enzyme) (Kelly *et al.*, 1995; Ørntoft *et al.*, 1996).

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM. Data were compared using Mann-Whitney U. A $P < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgments

We thank M-PDucourouble, M-C.Houvenaghel, M.Luyckx, and C.Vandepierre for excellent technical assistance. This investigation was supported by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose.

Abbreviations

CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CB, chronic bronchitis; Fuc-T, fucosyltransferase; *FUT*, fucosyltransferase gene; Se, secretor; se, non secretor; Le, Lewis positive; le, Lewis negative; Le^a, Lewis a; Sia-Le^a, sialyl-Lewis a; Le^b, Lewis b; Le^x, Lewis x; Le^y, Lewis y; ST, sialyltransferase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; mAb, monoclonal antibody; BSA, bovine serum albumin; PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; TNF, tumor necrosis factor; DNase, deoxyribonuclease; RNase, ribonuclease; PBS, 0.02 M phosphate-buffered saline; RT, room temperature.

References

- Aminoff, D. (1961) Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-392.
- Barasch, J. and Al-Awqati, Q. (1993) Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J. Cell Sci. Suppl.*, **17**, 229-233.
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D. and Al-Awqati, Q. (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, **352**, 70-73.
- Birrer, P., McElvaney, N.G., Rudeberg, A., Sommer, C.W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R. and Crystal, R.G. (1994) Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, 207-213.
- Boat, T.F., Cheng, P.-W., Iyer, R., Carlson, D.M. and Polony, I. (1976) Human tract secretions: mucous glycoproteins of nonpurulent tracheobronchial secretions and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 95-104.
- Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., Ghnaim, H. and Berger, M. (1995a) Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **152**, 2111-2118.
- Bonfield, T.L., Konstan, M.W., Burfeind, P., Panuska, J.R., Hilliard, J.B. and Berger, M. (1995b) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukine-10, which is down-regulated in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **13**, 257-261.
- Boucher, R.C. (1994) Human airway ion transport. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, 581-593.

- Breg, J., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G., Lamblin, G., Houvenaghel, M.C. and Roussel, P. (1987) Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 57-68.
- Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Mollicone, R., Oriol, R., Larson, G., Van den Eijnden, D.H. and Van Dijk, W. (1996) A missense mutation in the *FUT6* gene results in total absence of α 3-fucosylation of human α 1-acid glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14492-14995.
- Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J.-M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G. and Roussel, P. (1993) Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **9**, 323-334.
- Chace, K.V., Flux, M. and Sachdev, G.P. (1985) Comparison of physicochemical properties of purified mucus glycoproteins isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis and asthmatic patients. *Biochemistry*, **24**, 7334-7341.
- Cheng, P.-W., Boat, T.F., Cranfill, K., Yankaskas, J.R. and Boucher, R.C. (1989) Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **84**, 68-72.
- Couceiro, J.N., Paulson, J.C. and Baum, L.G. (1993) Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.*, **29**, 155-165.
- Crottet, P., Kim, Y.J. and Varki, A. (1996) Subsets of sialylated, sulfated mucins of diverse origins are recognized by L-selectin. Lack of evidence for unique oligosaccharide sequences mediating binding. *Glycobiology*, **6**, 191-208.
- De Graaf, T.W., Van der Stelt, M.E., Anbergen, M.G. and van Dijk, W. (1993) Inflammation-induced expression of sialyl-Lewis x-containing glycan structures on α 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J. Exp. Med.*, **177**, 657-666.
- Degroote, S., Lo-Guidice, J.-M., Strecker, G., Ducourouble, M.-P., Roussel, P. and Lamblin, G. (1997) Characterization of an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29493-29501.
- Demaille, J., Dautreaux, M., Havez, R. and Biserte, G. (1965) Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de l' α 2-macroglobuline de porc. *Bull. Soc. Chim. France*, **12**, 3506-3511.
- Devaraj, N., Sheykhazari, M., Warren, W.S. and Bhavanandan, V.P. (1994) Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology*, **4**, 307-316.
- Devidas, S. and Guggino, W.B. (1997) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 547-552.
- Dosanjh, A., Lencer, W., Brown, D., Ausiello, D.A. and Stow, J.L. (1994) Heterologous expression of Δ F508 CFTR results in decreased sialylation of membrane glycoconjugates. *Am. J. Physiol.*, **266**, C360-C366.
- Emery, N., Palfai, S.B., Place, G., Oriol, R., Hall, R.L., Roussel, P. and Lhermitte, M. (1995) A new monoclonal antibody (3D3) generated with human respiratory mucins and directed against Lewis determinants. *Glycobiology*, **5**, 563-570.
- Emery, N., Lo-Guidice, J.-M., Lafitte, J.-J., Lhermitte, M. and Roussel, P. (1997) The fucosylation and secretion of mucins synthesized in human bronchial cells vary according to growth conditions. *Glycobiology*, **7**, 95-101.
- Frates, R.C., Jr., Kaizu, T.T. and Last, J.A. (1983) Mucus glycoproteins secreted by respiratory epithelial tissue from cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.*, **17**, 30-34.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M. and Wilson, J.M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, **88**, 553-560.
- Havenaar, E.C., Drenth, J.P.H., Van Ommen, E.C.R., Van Der Meer, J.W.M. and van Dijk, W. (1995) Elevated serum level and altered glycosylation of α 1-acid glycoprotein in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome: evidence for persistent inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **76**, 279-284.
- Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M.W., Bonfield, T., Davis, P.B. and Ferkol, T. (1997) Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2810-2815.
- Houdret, N., Perini, J.-M., Galabert, C., Scharfman, A., Humbert, P., Lamblin, G. and Roussel, P. (1986) The high lipid content of respiratory mucins in cystic fibrosis is related to infection. *Biochim. Biophys. Acta*, **880**, 54-61.
- Kelly, R.B., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G. and Lowe, J.B. (1995) Sequence and expression of a candidate for the human *Secretor* blood group α (1,2) fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4640-4649.
- Klein, A., Carnoy, C., Lamblin, G., Roussel, P., van Kuik, J.A. and Vliegthart, J.F.G. (1993) Isolation and structural characterization of novel sialylated oligosaccharide-alditols from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 491-500.
- Knowles, M.R., Robinson, J.M., Wood, R.E., Pue, C.A., Mentz, W.M., Wager, G.C., Gatz, J.T. and Boucher, R.C. (1997) Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2588-2595.
- Komiyama, K., Habbick, B.F. and Tumber, S.K. (1987) Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.*, **55**, 2364-2369.
- Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Norvell, T.M. and Berger, M. (1994) Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung diseases suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, 448-454.
- Lamblin, G., Lafitte, J.-J., Lhermitte, M., Degand, P. and Roussel, P. (1977) Mucins from cystic fibrosis sputum. *Mod. Probl. Paediatr.*, **19**, 153-164.
- Lamblin, G., Boersma, A., Klein, A., Roussel, P., van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1984) Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. The occurrence of the NeuAc- α (2,3)Gal β (1,4)[Fuc α (1,3)]GlcNAc β (1-) structural element revealed by 500-MHz ^1H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9051-9058.
- Li, J.-D., Feng, W., Gallup, M., Kim, J.-H., Gum, J., Kim, Y. and Basbaum, C. (1998a) Activation of NF- κ B via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5718-5723.
- Li, D., Gallup, M., Fan, N., Szymkowski, D.E. and Basbaum, C. (1998b) Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human *MUC5AC* mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6812-6820.
- Lo-Guidice, J.-M., Wieruszkeski, J.-M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P. and Lamblin, G. (1994) Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18794-18813.
- Lo-Guidice, J.-M., Perini, J.-M., Lafitte, J.-J., Ducourouble, M.-P., Roussel, P. and Lamblin, G. (1995) Characterization of a sulfotransferase from human airways responsible for the 3-O-sulfation of terminal galactose in N-acetyllactosamine-containing mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27544-27550.
- Lo-Guidice, J.-M., Merten, M.D., Lamblin, G., Porchet, N., Houvenaghel, M.-C., Figarella, C., Roussel, P. and Perini, J.-M. (1997) Mucins secreted by a transformed cell line derived from human tracheal gland cells. *Biochem. J.*, **326**, 431-437.
- Lory, S., Jin, S., Boyd, J.M., Rakeman, J.L. and Bergman, P. (1996) Differential gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* during interaction with respiratory mucus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **154**, S183-S186.
- Majuri, M.-L., Pinola, M., Niemelä, R., Tiisala, S., Natunen, J., Renkonen, O. and Renkonen, R. (1994) Alpha 2,3-sialyl and α 1,3-fucosyltransferase-dependent synthesis of sialyl Lewis x, an essential oligosaccharide present on L-selectin counterreceptors, in cultured endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 3205-3210.
- Majuri, M.-L., Niemelä, R., Tiisala, S., Renkonen, O. and Renkonen, R. (1995) Expression and function of α 2,3-sialyl and α 1,3/4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors. *Int. J. Cancer*, **63**, 551-559.
- Ørntoft, T.B., Vestergaard, E.M., Holmes, E., Jakobsen, J.S., Grønnet, N., Mortensen, M., Johnson, P., Bross, P., Gregersen, N., Skorstengaard, K., Jensen, U.B., Bolund, L. and Wolf, H. (1996) Influence of Lewis α 1,3/4-L-fucosyltransferase (*FUT3*) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis x levels. *J. Biol. Chem.*, **271**, 32260-32268.
- Park, P.J., Leeflang, B., Vliegthart, J.F.G., Rhim, A.M., Scanlin, T.F. and Glick, M.C. (1997) Fucosylated and sialylated glycopeptides from cystic fibrosis (CF) airway epithelial cells. *Glycoconjugate J.*, **14** (Suppl. 1), S102.
- Pasyk, E.A. and Foskett, J.K. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7746-7751.
- Rahmoune, H., Lamblin, G., Lafitte, J.-J., Galabert, C., Filliat, M., and Roussel, P. (1991) Chondroitin sulfate in sputum from patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **5**, 315-320.
- Roussel, P. and Lamblin, G. (1996) Human mucosal mucins in diseases. In Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. and Schachter, H. (eds.), *Glycoproteins and Disease*. Elsevier, Amsterdam, pp. 351-393.
- Roussel, P., Lamblin, G., Degand, P., Walker-Nasir, E. and Jeanloz, R.W. (1975) Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2114-2122.
- Seksek, O., Biwersi, J. and Verkman, A.S. (1996) Evidence against defective trans-Golgi acidification in cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15542-15548.

- Slayter, H.S., Lamblin, G., Le Treut, A., Galabert, C., Houdret, N., Degand, P. and Roussel, P. (1984) Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 209–218.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P. and Welsh, M.J. (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, **85**, 229–236.
- Van Halbeek, H., Breg, J., Vliegthart, J.F.G., Klein, A., Lamblin, G. and Roussel, P. (1988) Isolation and structural characterization of low-molecular mass monosialyl oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis. *Eur. J. Biochem.*, **177**, 443–460.
- Wang, J., Lory, S., Ramphal, R. and Jin, S. (1996) Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* genes inducible by respiratory mucus derived from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.*, **22**, 1005–1012.
- Welsh, M.J., Tsui, L.-C., Boat, T.F. and Beaudet, A.L. (1995) Cystic fibrosis. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3799–3876.
- Zhang, Y., Doranz, B., Yankaskas, J.R. and Engelhardt, J.F. (1995) Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2997–3004.

Résultats - Discussion

Après avoir purifié par deux étapes d'ultracentrifugations en bromure de césium les mucines bronchiques de 14 patients CF et de 24 patients atteints de bronchite chronique, nous les avons divisées en quatre groupes, selon la pathologie et selon le degré d'infection du mucus.

Nous avons constaté une hypersulfatation des mucines bronchiques de patients CF par rapport aux mucines de patients souffrant de bronchite chronique ; ces résultats confirment qu'il existe une hypersulfatation des glycoconjugués liée à la mucoviscidose.

Par ailleurs, les mucines bronchiques de patients sévèrement infectés (atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique) contiennent plus d'acide sialique que les patients non infectés. L'infection (et l'inflammation) pourraient donc induire *in vivo* une augmentation de certaines activités sialyltransférases, ce qui expliquerait l'hypersialylation des mucines bronchiques et salivaires de patients CF, et compenser une hyposialylation directement liée à la maladie (nous avons vu précédemment que les glycoconjugués membranaires ou sécrétés par des cellules CF sont moins sialylés que la normale). De plus, il existe, *in vivo*, des différences de sialylation des différentes cellules de l'épithélium bronchique : la sialylation des mucines sécrétées par les cellules caliciformes semble être prédominante sur le C3 des résidus de Gal terminaux, alors que l'acide sialique présent sur les glycoprotéines membranaires des autres types cellulaires serait surtout lié en (α 2-6). L'alcalinisation du trans-Golgi et du réseau transgolgien observée par Barasch *et al.* pourrait donc diminuer l'activité des α 2-6-sialyltransférases qui agissent surtout sur les glycoconjugués membranaires ou sécrétés par les cellules CF non caliciformes, mais augmenter celle des α 2-3-sialyltransférases (qui pourraient avoir un pH optimal plus basique), ce qui expliquerait l'hypersialylation des mucines sécrétées par les patients CF [1991].

L'épitope sialyl Le^x est exprimé dans 36 des 38 mucines, même chez des patients Lewis négatif, ce qui signifie qu'au moins une autre fucosyltransférase que l'enzyme Lewis est impliquée dans la biosynthèse de ce déterminant dans la muqueuse bronchique humaine. Les patients sévèrement infectés contiennent plus d'épitopes sialyl Le^x en périphérie de leurs mucines que les patients non-infectés.

Ces résultats suggèrent que l'infection (et l'inflammation) modifient l'activité (l'expression ?) de sialyl- et peut-être d' α 1-3-fucosyltransférases dans la muqueuse

bronchique humaine, induisant une surexpression de l'épitope glycanique sialyl Le^x. Ces modifications pourraient avoir une grande importance physiopathologique, créant de nouveaux sites glycaniques qui pourraient être spécifiquement reconnus par *P. aeruginosa*, ce qui expliquerait la persistance de cette bactérie dans la mucoviscidose. Par la suite, il sera nécessaire d'identifier les différentes sialyl- et fucosyltransférases exprimées dans la muqueuse bronchique humaine et d'étudier l'effet des cytokines sur leur expression et leur activité.

Afin de vérifier l'hypothèse de l'influence de l'inflammation sur la glycosylation et la sulfatation des mucines, nous avons ensuite utilisé une approche cellulaire. Nous disposons au laboratoire d'une lignée d'origine glandulaire bronchique humaine, exprimant les gènes de mucines *MUC1* et *MUC4*. Cette lignée, nommée MM-39, a été établie dans le laboratoire du Dr C. Figarella, à Marseille, par immortalisation d'une culture primaire de cellules glandulaires trachéales. Cette lignée a ainsi conservé une différenciation de type séreux (sécrétion de lysozyme, de lactoferrine et d'inhibiteur bronchique, modulable par les agonistes adrénergiques et cholinergiques). Elle possède donc un phénotype mixte, de type séro-muqueux.

Nous avons étudié l'influence de la cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire, le TNF α , sur l'expression et l'activité des sialyl- et fucosyltransférases présentes dans les cellules MM-39. D'éventuelles modifications d'expression ou d'activité de ces enzymes sous l'influence de l'inflammation pourraient expliquer l'apparition, ou l'augmentation, de certains épitopes sialylés et fucosylés portés par les sujets colonisés par *P. aeruginosa* (malades souffrant de bronchite chronique ou de mucoviscidose).

II. Étude de l'influence d'une cytokine pro-inflammatoire, le $\text{TNF}\alpha$, sur :

- 1. la sécrétion, la fucosylation, la sialylation et la sulfatation des mucines sécrétées par une lignée d'origine glandulaire bronchique humaine (MM-39),**
- 2. les activités fucosyl-, sialyl- et sulfotransférasiques d'explants de muqueuse bronchique humaine.**

Le $\text{TNF}\alpha$, cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire, induit des modifications de sécrétion et de glycosylation des mucines dans de nombreux modèles. Une augmentation des activités $\alpha 2$ -3-sialyltransférasiques et $\alpha 1$ -3-fucosyltransférasiques induite par le $\text{TNF}\alpha$ a également été décrite [Majuri *et al.*, 1995]. Cette cytokine, présente dans les lavages broncho-alvéolaires de patients CF, pourrait avoir un rôle dans les modifications de glycosylation et de sulfatation des mucines bronchiques CF.

Nous avons donc étudié l'effet de cette cytokine pro-inflammatoire sur la glycosylation (fucosylation, sialylation) et la sécrétion des mucines sécrétées par une lignée cellulaire d'origine glandulaire bronchique humaine, la lignée MM-39. Des résultats antérieurs suggéraient qu'en l'absence de stimulation, les mucines n'incorporaient pas (ou très peu) de fucose [Lo-Guidice *et al.*, 1997]. Il pouvait donc être intéressant d'utiliser ces cellules comme modèle pour étudier l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la glycosylation (en particulier la fucosylation).

Pour cela, nous avons purifié les mucines sécrétées par ces cellules et comparé dans les conditions basales ou après stimulation par le $\text{TNF}\alpha$:

- l'incorporation de fucose tritié, de glucosamine tritiée ;
- l'expression des ARN messagers correspondant aux fucosyltransférases (*FUT1* à -7) et aux $\alpha 2$ -3-sialyltransférases (*ST3Gal-I*, -III et -IV) ;

– les activités sulfo-, sialyl- et fucosyltransférasiques, en procédant à des incubations de microsomes de cellules (contrôle ou stimulées) avec un nucléotide-sucré radiomarqué ($[^3\text{H}]\text{GDP-Fuc}$, $[^{14}\text{C}]\text{CMP-NeuAc}$, $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$) et différents accepteurs glycaniques ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-O-Met}$, ...). Les produits radiomarqués néo-synthétisés ont ensuite été caractérisés par HPAEC-PAD.

A l'issue de cette étude qui a révélé le faible potentiel de fucosylation et de sulfatation de la lignée MM-39, même sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$, nous nous sommes tournée vers un modèle d'explants de muqueuse bronchique humaine, prélevés sur des fragments de muqueuse bronchique humaine macroscopiquement saine, provenant de lobectomies ou de pneumectomies réalisées chez des patients atteints de cancers bronchiques. Ce modèle pourrait posséder des capacités de glycosylation et de sulfatation plus proches de celles de la muqueuse bronchique humaine *in vivo*, et donc bien plus importantes que celles de la lignée MM-39. La difficulté étant d'obtenir des pièces opératoires de muqueuse bronchique en quantité suffisante, seule l'étude des activités sulfo-, sialyl- et fucosyltransférasiques a été réalisée pour le moment.

1. Effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la sécrétion, la fucosylation, la sialylation et la sulfatation des mucines sécrétées par une lignée d'origine glandulaire bronchique humaine (MM-39)

Résumé

L'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression et l'activité des sialyl-, fucosyl-, et sulfotransférases susceptibles d'agir sur les mucines sécrétées par la lignée cellulaire MM-39 a été étudié. Cette cytokine augmente modérément l'expression des gènes de fucosyltransférases *FUT2* et *FUT3*, ainsi que les activités $\alpha 1$ -2- et $\alpha 1$ -3-fucosyltransférasiques et l'incorporation de fucose dans les mucines sécrétées. Le $\text{TNF}\alpha$ entraîne également une augmentation de l'expression et de l'activité des $\alpha 2$ -3-sialyltransférases, ainsi que l'apparition d'une activité GlcNAc-6-O-sulfotransférasique. Néanmoins, les mucines sécrétées par la lignée MM-39 sont essentiellement sialylées, peu sulfatées et fucosylées. Nos résultats mettent en évidence l'expression et l'activité faibles des fucosyltransférases (et des sialyltransférases) présentes dans la lignée MM-39, très inférieures à celles rencontrées dans la muqueuse bronchique humaine, et ne nous permettent pas de conclure définitivement sur l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la glycosylation et la sulfatation des mucines.

Introduction

Les mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose présentent des anomalies de glycosylation (hypersialylation, surexpression de l'épitope glycanique sialyl Lewis x (Le^x) [Davril *et al.*, 1999]) et de sulfatation (hypersulfatation) qui pourraient avoir un rôle important dans la physiopathologie de la maladie, créant de nouveaux sites glycaniques favorisant la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer l'origine de ces anomalies. La protéine CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) mutée aurait une influence directe sur les mécanismes de glycosylation et de sulfatation [Barasch *et al.*, 1991 ; Pasyk & Foskett, 1997], mais l'inflammation très précoce (présence anormale dans les lavages broncho-alvéolaires de cytokines pro-inflammatoires, d'élastase leucocytaire et d'un nombre accru de neutrophiles) observée dans la maladie pourrait également modifier ces mécanismes [Birrer *et al.*, 1994 ; Bonfield *et al.*, 1995a]. L'hypersialylation et l'expression accrue de l'épitope sialyl Le^x seraient directement liées à l'infection (et à l'inflammation).

Des études récentes suggèrent que les cytokines elles-mêmes pourraient induire des modifications de glycosylation des protéines de la phase aiguë, en particulier une surexpression de l'épitope glycanique sialyl Le^x [De Graaf *et al.*, 1993 ; Havenaar *et al.*, 1995 ; Brinkman-van der Linden *et al.*, 1996]. Pour toutes ces raisons, l'effet direct des cytokines sur la sécrétion et la glycosylation des mucines pourrait être envisagé. Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de la cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire, le facteur α de nécrose tumorale ($\text{TNF}\alpha$), sur la sécrétion, la glycosylation et la sulfatation des mucines sécrétées par la lignée MM-39 d'origine glandulaire bronchique humaine. Cette lignée possède un phénotype mixte séro-muqueux et sécrète des mucines MUC1 et MUC4, essentiellement sialylées [Lo-Guidice *et al.*, 1997].

Le $\text{TNF}\alpha$ induit une hypersécrétion de mucines dans un modèle humain d'explants bronchiques [Levine *et al.*, 1995], dans des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques [Adler *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 1995 ; Levine *et al.*, 1995], dans des cellules d'adénocarcinome colorectal [Novotny-Smith *et al.*, 1993], ainsi que dans des cellules épithéliales d'oreille moyenne de Chinchilla [Lin *et al.*, 1998].

Des modifications de glycosylation induites par le $\text{TNF}\alpha$ ont été décrites dans les mucines intestinales de Lapin [Wanke & Bistran, 1997], ainsi que des modifications de sulfatation des mucines sécrétées par les cellules caliciformes en réponse à l'infection intestinale par *Salmonella* [Arnold *et al.*, 1993]. Le $\text{TNF}\alpha$ a également des effets pléiotropes sur les cellules productrices de mucines : dédifférenciation [Hamada *et al.*, 1991], changements morphologiques [Novotny-Smith *et al.*, 1993], et hyper- [Lou *et al.*, 1998] ou hypoplasie des cellules épithéliales [Jarry *et al.*, 1992].

Le but de ce travail a été d'étudier l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur (i) la sécrétion des mucines par la lignée MM-39 et (ii) l'expression et les activités sialyl-, fucosyl-, et sulfotransférasiques susceptibles d'agir en périphérie de ces mucines. Nous avons comparé, dans les cellules cultivées dans les conditions basales ou stimulées par le $\text{TNF}\alpha$, l'expression et l'activité des enzymes (fucosyl-, sialyl-, et sulfotransférases) intervenant dans la glycosylation périphérique des mucines. Après marquage des cellules avec des précurseurs radiomarqués ($[^3\text{H}]$ glucosamine et $[^3\text{H}]$ fucose), les mucines sécrétées ont été purifiées ; l'incorporation de $[^3\text{H}]$ glucosamine ou $[^3\text{H}]$ fucose sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ a été comparée à celle des mucines sécrétées dans les conditions basales.

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit [Lo-Guidice *et al.*, 1997]. Le milieu employé pour l'entretien des cellules se compose du milieu DMEM/F12 (milieu essentiel minimum modifié de Dulbecco/mélange nutritif F12 (1/1)) enrichi par l'addition de différents composants : 10 % de sérum de bœuf, 2 % d'Ultroser G[®], 10 g/l de glucose, 0,22 g/l de pyruvate de sodium, des acides aminés, de l'adrénaline et des antibiotiques. Les passages sont effectués suivant le rapport 1:3. La trypsinisation s'effectue une fois par semaine selon le protocole de Lo-Guidice *et al.* [1997]. Les produits utilisés sont commercialisés par Life Technologies.

Marquages métaboliques

Cinq jours après trypsinisation, 28 flasques T75 contenant des cellules à confluence (10^7 cellules par boîte) sont incubées avec (i) 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]fucose (Amersham) en présence de 1 mM mannose dans le milieu pendant 24 h ou (ii) 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]glucosamine (Amersham). Après 24 h de contact, la moitié des flasques est stimulée par 20 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ ajouté au milieu de culture contenant le produit marqué pendant 16 h à 37 °C. L'autre moitié des flasques sert de contrôle.

Séparation des produits radiomarqués synthétisés par la lignée MM-39

Première chromatographie de gel-filtration

Les surnageants de culture sont rassemblés et supplémentés par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (hydrochloride de benzamidine, EDTA, *N*-éthylmaléimide, acide ϵ -aminohexanoïque, PMSF (pour *fluorure de phénylméthylsulfonyl*) [Fogg *et al.*, 1996]. Ils sont concentrés à 4 °C par ultrafiltration sur une membrane YM-30 (seuil de coupure : 300 000 ; Amicon). La chromatographie de gel-filtration est effectuée sur Sepharose^R CL-4B (Pharmacia). La colonne (2,5 x 50 cm) est

équilibrée en tampon phosphate de sodium 67 mM, pH 6,7, contenant le cocktail d'inhibiteurs de protéases décrit précédemment [Fogg *et al.*, 1996]. Le fractionnement s'effectue à 4 °C au débit de 20 ml/h ; des fractions de 5 ml sont recueillies.

Traitement enzymatique

Les fractions de haut poids moléculaire sont soumises à l'action de l'endonucléase micrococcace de *Staphylococcus aureus* (Foggi strain) (1,25 U/ml) (Sigma) et de la ribonucléase A (RNase A) (50 µg/ml) (Boehringer) pendant 1 h à 37 °C. Le pH est ensuite ajusté à 6,0 avec de l'acide citrique, puis la hyaluronidase de testicule bovin (10 U/ml) (Sigma) est ajoutée pendant 24 h à 37 °C. Le pH est ensuite ajusté à 4,6 avec de l'acide citrique avant un troisième traitement enzymatique avec l'amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* (1 U/ml) (Boehringer) pendant 16 h à 37 °C. Après dialyse contre un tampon Tris/acétate 100 mM, pH 7,3, contenant le cocktail d'inhibiteurs de protéases, les fractions sont concentrées en utilisant une membrane d'ultrafiltration YM-30, puis incubées avec la chondroïtinase ABC (0,2 U/ml) (Seikagaku) pendant 5 h à 37 °C, puis avec l'héparitinase I (Héparinase III) de *Flavobacterium heparinum* (5 U/ml) (Sigma) pendant 5 h à 37 °C. Avant chaque traitement enzymatique, 1 mM de PMSF est ajouté.

Ultracentrifugation isopycnique

Le matériel de haute masse moléculaire récupéré après traitements enzymatiques est ensuite soumis à une ultracentrifugation isopycnique selon la méthode de Carlstedt *et al.* [1983], dans un tampon contenant 67 % (p/v) de chlorure de césium et 4 M de chlorure de guanidine (Merck). L'ultracentrifugation est réalisée pendant 72 h à 170 000 x g à 25 °C dans des tubes Quik-Seal™ (Beckman) de 15 ml. Le fond de chaque tube est ensuite percé et des fractions de 1 ml sont recueillies, avec un débit de 2 ml/min. Sur chaque fraction, la radioactivité et la densité sont déterminées.

Seconde chromatographie de gel-filtration

Les fractions de densités égales à celles décrites pour les mucines ($d = 1,45-1,50$), obtenues après ultracentrifugation, sont ensuite réduites avec du dithiothréitol et S-alkylées [Fogg *et al.*, 1996]. Après ce traitement, elles sont à nouveau soumises à une chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sepharose CL-4B (1 x 50 cm) équilibrée en chlorure de guanidine 6 M, avec un débit de 4 ml/h. Le matériel de haut poids moléculaire est dialysé contre de l'eau et lyophilisé.

Les différentes étapes de purification des glycoconjugués de haut poids moléculaire, de densités égales à celles des mucines, sécrétés par la lignée MM-39 sont résumées dans la figure 1.

Préparation des microsomes

Après trypsinisation, 10^7 cellules (stimulées ou non par le $\text{TNF}\alpha$) ont été soumises à une sonication dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contenant 25 mM KCl, 250 mM de saccharose, 5 mM de β -mercaptoéthanol, 5 mM d'acétate de magnésium, et directement centrifugées à $16\,000 \times g$ (à $4\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min). Le surnageant est ensuite soumis à une ultracentrifugation à $180\,000 \times g$ pendant 1 h à $10\text{ }^\circ\text{C}$. Le culot obtenu, contenant les fractions microsomales, est stocké à $-80\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Dosage de protéines

La quantité de protéines présentes dans les fractions microsomales est déterminée par la technique BCA (Pierce) [Smith *et al.*, 1985].

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'analyse des produits contenus dans les pics de $K_{av} = 0$ et $K_{av} = 0,2$ est réalisée en SDS-PAGE 8-25 % [Lo-Guidice *et al.*, 1997].

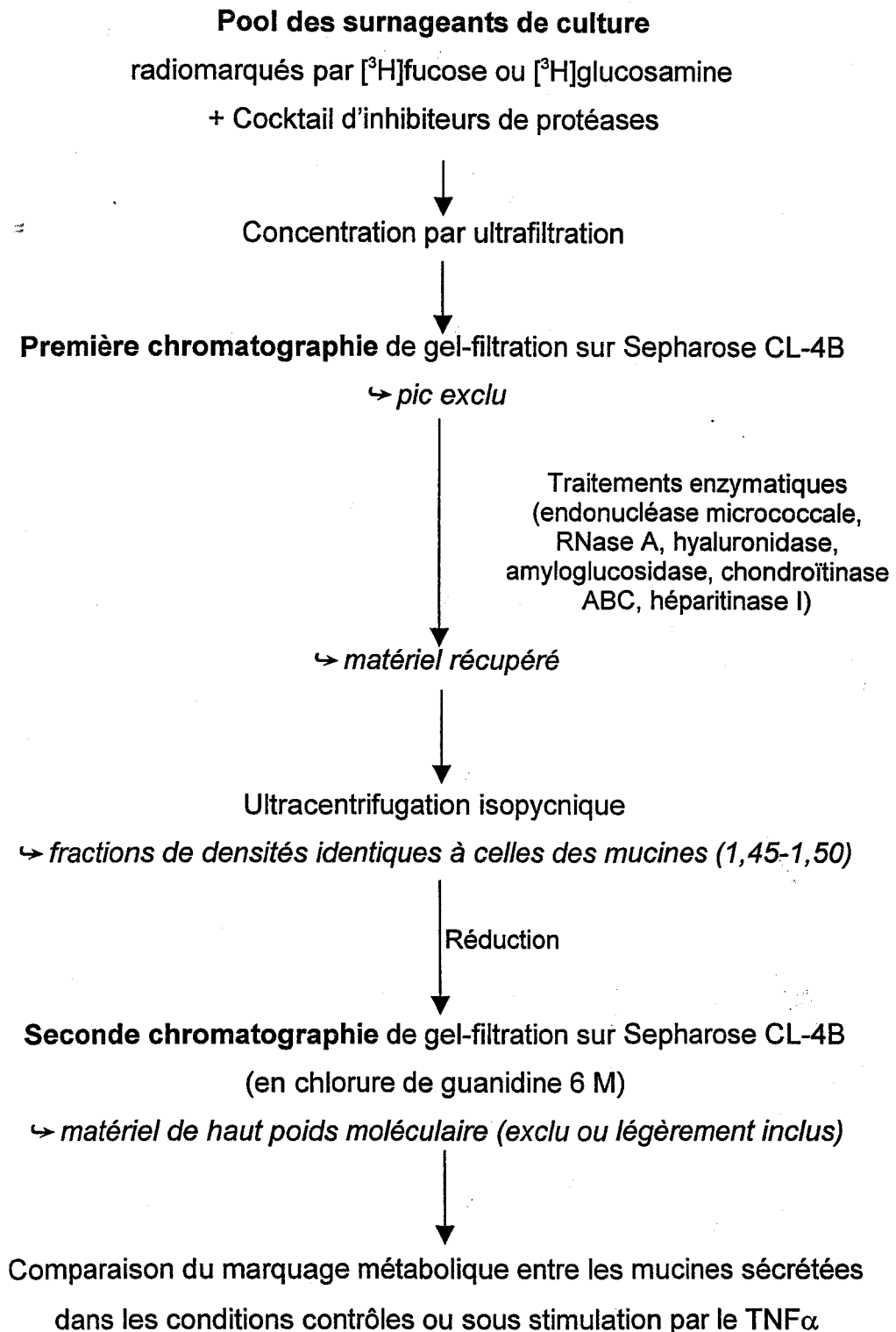


Figure 1 : Protocole de purification des mucines sécrétées par la lignée MM-39.

Étude des activités GlcNAc- and Gal-sulfotransférasiques

Le milieu d'incubation pour l'étude de l'activité GlcNAc-6-O-sulfotransférasique contient : 50-100 μ g de protéines microsomales (provenant de cellules stimulées ou non par le $\text{TNF}\alpha$), 0,5 μ Ci de [^{35}S]PAPS (DuPont NEN, 1,95 Ci/mmol), et 5 mM de méthyl- β -*N*-acétylglucosaminide (GlcNAc- β 1-O-Met), dans un tampon Mops/NaOH 30 mM, pH 6,7, contenant 0,1 % Triton X-100, 20 mM de MnCl_2 , 30 mM de NaF, 5 mM d'AMP, et 1 mM de fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle (AEBSF) (Sigma). Après 2 h à 30 °C, la réaction est stoppée par l'addition de méthanol à -20 °C. Le milieu réactionnel est gardé une nuit à 4 °C, et le précipité obtenu est éliminé par centrifugation (20 min à 10 000 $\times g$). Le culot est lavé deux fois avec du méthanol glacial puis centrifugé. Les surnageants sont rassemblés, évaporés, puis directement étudiés par chromatographie haute performance d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC/PAD) et à une détection de la radioactivité.

Les standards utilisés pour l'identification des GlcNAc- β 1-O-Met sulfatés néosynthétisés sont $\text{HO}_3\text{S-3GlcNAc-}\beta$ 1-O-Met et $\text{HO}_3\text{S-6GlcNAc-}\beta$ 1-O-Met, synthétisés selon la méthode de van Kuik *et al.* [1987].

L'étude de l'activité Gal-sulfotransférasique a été réalisée selon Lo-Guidice *et al.* [1995]. Les standards utilisés pour l'identification des Gal- α 1-O-Met sulfatés néosynthétisés sont $\text{HO}_3\text{S-6Gal-}\alpha$ 1-O-Met, synthétisé selon la méthode de van Kuik *et al.* [1987], et Gal- α 1-O-Met -2-O-, -3-O-, et -4-O- sulfatés, fournis par J.F.G. Vliegthart (Université d'Utrecht, Pays-Bas).

Étude des activités α -fucosyltransférasiques

Le milieu d'incubation pour l'étude des activités fucosyltransférasiques présentes dans les cellules MM-39 est préparé selon la technique décrite par de Vries *et al.* [1995] : 50-100 μ g de protéines microsomales sont incubées avec 0,3 μ Ci de [^3H]GDP-Fuc (Amersham, 61 Ci/mmol), 5 mM de Gal(β 1-4)GlcNAc (Sigma) ou NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc (Toronto Research Chemicals), dans un tampon Mops/NaOH, pH 7,5, contenant 20 mM de MnCl_2 , 0,1 % de Triton X-100, 100 mM de NaCl, 4 mM d'ATP, et 1 mM d'AEBSF. Les incubations sont réalisées 2 h

à 30 °C, et stoppées comme précédemment décrit pour les sulfotransférases. Les produits néosynthétisés sont ensuite étudiés par HPAEC/PAD. Les standards fucosylés utilisés sont Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (Sigma) and NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (Toronto Research Chemicals).

Étude des activités α 2-3-sialyltransférasiques

L'étude de l'activité α 2-3-sialyltransférasique présente dans les cellules MM-39 est réalisée selon la méthode légèrement modifiée de Majuri *et al.* [1995] : les protéines microsomales (50-100 μ g) sont incubées avec 0,5 μ Ci de [14 C]CMP-NeuAc (Amersham, 0,294 Ci/mmol), 5 mM de Gal(β 1-4)GlcNAc ou de Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, dans un tampon Tris/acétate, pH 6,7, contenant 0,1 % de Triton X-100, 20 mM de MnCl₂ et 1 mM d'AEBSF. Les incubations sont réalisées pendant 5 h à 30 °C, et stoppées comme précédemment décrit. Les produits sialylés néosynthétisés sont ensuite étudiés par HPAEC/PAD. Les standards α 2-3-sialylés utilisés pour leur identification sont NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc et NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc.

Identification des produits radiomarqués néosynthétisés par HPAEC/PAD

Après évaporation des surnageants rassemblés, les produits radiomarqués sulfatés, fucosylés ou sialylés sont dissous dans l'eau et directement injectés sur une colonne CarboPac™ PA-100 (4 x 250 mm) pour une étude en HPAEC (Dionex Corp). L'élution des produits néosynthétisés est suivie à la fois par détection ampérométrique pulsée (PAD 2 model, Dionex Corp.) et par détection de la radioactivité (high performance liquid radioactivity detector LB 506 C-1, EG & G, Berthold).

L'élution des GlcNAc- β 1-O-Met et Gal- α / β 1-O-Met sulfatés est effectuée à pH alcalin, à un débit de 1 ml/min dans 0,05 M NaOH/0,2 M acétate de sodium, avec un gradient linéaire d'acétate de sodium (de 0,05 M NaOH/0,3 M acétate de sodium à t = 22 min, à 0,05 M NaOH/0,95 M acétate de sodium à t = 24 min, suivi par une

élution isocratique avec 0,05 M NaOH/0,95 M acétate de sodium pendant 10 min (gradient I).

L'élution des produits sialylés, ou fucosylés synthétisés à partir de NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, est réalisée à pH alcalin, à un débit de 1 ml/min dans 0,1 M NaOH pendant 10 min, suivi par un gradient linéaire d'acétate de sodium (de 0,1 M NaOH/0,07 M acétate de sodium à $t = 16$ min, à 0,1 M NaOH/0,1 M acétate de sodium à $t = 30$ min, et à 0,1 M NaOH/0,45 M acétate de sodium à $t = 80$ min (gradient II)).

L'élution des produits fucosylés synthétisés à partir de Gal(β 1-4)GlcNAc est réalisée à pH alcalin, à un débit de 1 ml/min dans 0,08 M NaOH pendant 10 min, suivi par un gradient linéaire d'acétate de sodium (de 0,08 M NaOH/0,01 M acétate de sodium à $t = 40$ min, à 0,1 M NaOH/0,1 M acétate de sodium à $t = 50$ min (gradient III)).

L'activité des différents enzymes est exprimée en picomoles de nucléotide-sucre transféré/minute/mg de protéine, afin de comparer l'activité de ces enzymes dans les cellules stimulées ou non par le TNF α .

Extraction des ARN et synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Les ARN cellulaires totaux ont été préparés, à partir de 10^7 cellules, par la méthode au thiocyanate de guanidine/chlorure de césium [Chirgwin *et al.*, 1979]. Dans le but d'étudier l'influence (i) de la concentration en TNF α , (ii) du temps de contact de cette cytokine avec les cellules sur l'expression de différentes glycosyltransférases, les ARN totaux ont été extraits des cellules stimulées (i) avec différentes concentrations de TNF α (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 ng/ml) pendant 16 h, ou (ii) pendant différents temps (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 24 ; 48 h) avec une concentration de TNF α de 20 ng/ml. Les ARN isolés ont été traités avec de la DNase I, qualité amplification (Life Technologies), puis soumis à l'action de l'ExpandTM Reverse Transcriptase (Boehringer) afin de synthétiser les ADNc selon les instructions du fabricant.

Analyse par PCR

Les oligonucléotides utilisés comme amorces pour les amplifications par PCR sont donnés dans le tableau I. Les amorces des fucosyltransférases *FUT1* and *FUT2* ont été déduites des séquences publiées par Kelly *et al.* [1995] ; celles utilisées pour l'amplification de *FUT6* et *FUT7* ont été obtenues à partir des séquences publiées respectivement par Weston *et al.* [1992b] et Sasaki *et al.* [1994a]. Les amorces utilisées pour l'amplification des fucosyltransférases *FUT3/5* and *FUT4* ont été précédemment décrites par Yago *et al.* [1993].

Concernant les deux β 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférases (Core 2-*N*-acétylglucosaminyltransférase (*C₂GnT*) et I-*N*-acétylglucosaminyltransférase (*IGnT*)), les amorces ont été déduites des séquences publiées respectivement par Bierhuizen & Fukuda [1992] et Bierhuizen *et al.* [1993].

Les amorces utilisées pour l'amplification des fragments des sialyltransférases *ST3Gal-I*, *ST3Gal-III* et *ST3Gal-IV* ont été décrites par Recchi *et al.* [1998].

Les amplifications sont effectuées dans un Minicycler (MJ Research) en utilisant 2 μ l d'ADNc dans un volume final de 25 μ l d'un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,4 à 25 °C) contenant 50 mM KCl, 0,4 μ M d'amorces sens et antisens, 0,2 mM d'un mélange de désoxynucléotides tri-phosphate (dNTP), 0,625 U de Taq Polymérase (Life Technologies) et du MgCl₂ à une concentration dépendant de l'enzyme étudié : 1 mM pour les gènes de fucosyltransférases et 1,5 mM pour les gènes de β 1-6-*N*-acétylglucosaminyl- et de sialyltransférases.

Des expériences préliminaires ont permis de déterminer, pour chaque couple d'amorces, un nombre de cycles correspondant à la phase exponentielle d'amplification. La méthode de PCR utilisée ici, avec la β -actine comme standard externe, est considérée comme semi-quantitative.

Tableau I : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes de fucosyl-, N-acétylglucosaminyl- et sialyltransférases.

Gène	Taille (pb) [limites du fragment amplifié]	Séquence de l'amorce (5' → 3')	T _m (°C)*
<i>β-actine</i>	228	S GCACTCTTCCAGCCTTCC AS GCGCTCAGGAGGAGCAAT	58
<i>FUT1</i>	374 [432-805]	S GCAGCTTCACGACTGGATGTCGGAGGAGTA AS TACACCACTCCATGCCGTTGCTGGTGACCA	72
<i>FUT2</i>	368 [57-424]	S GCGGCTAGCGAAGATTCAAGCCATGTGGGA AS AGCAGGGGTAGCCGGTGAAGCGGACGTACT	72
<i>FUT3/5</i>	447/486 [70-516]	S CTGCTGGTGGCTGTGTGTTTCTTCTCCTAC AS CAGCCAGCCGTAGGGCGTGAAGATGTCGGA	72
<i>FUT4</i>	319 [807-1125]	S GGTGCCCCGAAATTGGGCTCCTGCACAC AS CAGCCAGCCGTAGGGCGTGAAGATGTCGGA	72
<i>FUT6</i>	404 [110-513]	S CTCAAGACGATCCCACTGTGTAC AS CAGCCAGCCGTAGGGCGTGAAGATGTCGGA	72
<i>FUT7</i>	231 [348-578]	S TGCCACCTGAGTGCCAACCGAAGCCTGCTG AS GGGCACAAAGATGTCCGAGTCGCGCCGGTA	72
<i>C₂GnT</i>	375 [857-1231]	S GTGCCTACTTCGTGGTCAG AS TGGCAAAGAGGTCAACATCC	62
<i>I-GnT</i>	633 [557-1189]	S TCAACACCTGTGGGCAAGAC AS GGGTGGTATCGCAGTTTCACTC	62
<i>ST3Gal-I</i>	538 [362-899]	S TCAGAGTGGTGCCTGGGAATGT AS CGTTTCCCTTGACCGTGGTGAT	58
<i>ST3Gal-III</i>	280 [752-1031]	S CGGATGGCTTCTGGAAATCTGT AS AGTTTCTCAGGACCTGCGTGTT	58
<i>ST3Gal-IV</i>	459 [322-780]	S CCCAAGAACATCCAGAGCCTCA AS CTAATTCGTCTTCGGGTGGTGC	58

* T_m utilisé pour le programme de PCR.

S, AS : oligonucléotide respectivement sens (S) et antisens (AS).

Les amplifications sont effectuées selon les conditions suivantes : pour les fucosyltransférases : 94 °C (2 min), 1 cycle ; 94 °C (1 min), 72 °C (3 min 30 s) pendant 35 à 45 cycles (35 pour *FUT2* et -3/5, 38 pour *FUT1* et -4 ; des essais à 45 cycles pour les amplifications des fragments de *FUT6* et -7 ont été effectués sans aucun résultat positif) ; puis 72 °C pendant 7 min. Les conditions pour les sialyltransférases sont : 94 °C (2 min), 1 cycle ; 94 °C (1 min), 58 °C (1 min), 72 °C (1 min 30 s), 37 cycles ; puis 72 °C pendant 7 min. Les conditions pour les *N*-acétylglucosaminyltransférases sont : 94 °C (2 min), 1 cycle ; 94 °C (1 min), 62 °C (1 min), 72 °C (1 min 30 s), 35 cycles pour la C₂-GnT et 38 pour la I-GnT ; puis 72 °C pendant 7 min.

Pour la β -actine, les conditions sont : 94 °C (2 min), 1 cycle ; 94 °C (1 min), 55 °C (1 min), 72 °C (1 min 30 s), 35 cycles ; puis 72 °C pendant 7 min.

Dans toutes les expériences d'amplification, des contrôles négatifs ont été effectués dans lesquels l'ADNc est remplacé par de l'eau stérile, afin de vérifier l'absence de tout contaminant.

Un échantillon de 11 μ l des produits amplifiés après PCR est déposé sur une gel d'agarose à 2 % équilibré en tampon TBE (Tris/Borate/EDTA), contenant du BET (1 μ g/ml), et soumis à une électrophorèse sous tension constante de 220 V pendant une heure dans le même tampon TBE. Les gels sont ensuite analysés sous lampe UV (qui permet la visualisation des fragments d'ADN combinés au BET) et l'intensité de fluorescence, déterminée par le programme Gel Analyst 3.01, permet de comparer l'expression des différents enzymes dans les cellules contrôles ou stimulées par le TNF α . La taille des fragments amplifiés est vérifiée par comparaison à la migration de multiples fragments d'ADN de tailles connues (DNA Molecular Weight, Boehringer).

Résultats

Marquage métabolique et purification des mucines

Les marquages métaboliques, à la glucosamine ou au fucose tritiés, ont été effectués dans les conditions contrôles ou sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ à la concentration de 20 ng/ml pendant 16 h (cette concentration a été choisie car elle est de l'ordre de celles utilisées par différents auteurs (15-25 ng/ml) au cours de leurs expériences de stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ [Adler *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 1995 ; Levine *et al.*, 1995]).

A l'issue de la première chromatographie de gel-filtration des produits marqués à la glucosamine ou au fucose tritié, nous nous sommes intéressée au pic exclu, qui contient un matériel de haut poids moléculaire (résultats non présentés). Ce matériel est ensuite traité avec un cocktail d'enzymes afin d'éliminer les acides nucléiques et les protéoglycannes contaminants, puis soumis à une ultracentrifugation isopycnique. Concernant le marquage à la glucosamine tritiée, aucune variation significative dans l'incorporation de glucosamine tritiée dans les tubes de densités correspondant à celles des mucines (tubes 7 à 9, $d = 1,45-1,50$) n'a été détectée (résultats non présentés). Par contre, pour le marquage au fucose, il y a une augmentation de l'incorporation de fucose tritié dans les fractions 7 à 9 ($d = 1,45-1,50$) (résultats non présentés).

Les fractions 7 à 9 marquées à la glucosamine ou au fucose tritié sont ensuite rassemblées, réduites, et soumises à une seconde gel-filtration sur Sepharose CL-4B. Le chromatogramme de ce second fractionnement est présenté sur la figure 2.

Le profil d'élution du matériel marqué à la glucosamine nous indique la présence d'un matériel exclu ($K_{av} = 0$) et d'un matériel partiellement inclus ($K_{av} = 0,2$) (Figure 2A). Le pic de $K_{av} = 0$ correspondrait à des mucines matures, celui de $K_{av} = 0,2$ contiendrait des mucines plus petites. Le marquage de ces deux pics est peu modifié sous $\text{TNF}\alpha$. De plus, la migration du pic de $K_{av} = 0$ en SDS-PAGE 8-25 % permet la visualisation d'un matériel de haute masse moléculaire qui migre très peu, et dont l'intensité ne semble pas modifiée sous $\text{TNF}\alpha$ (résultats non

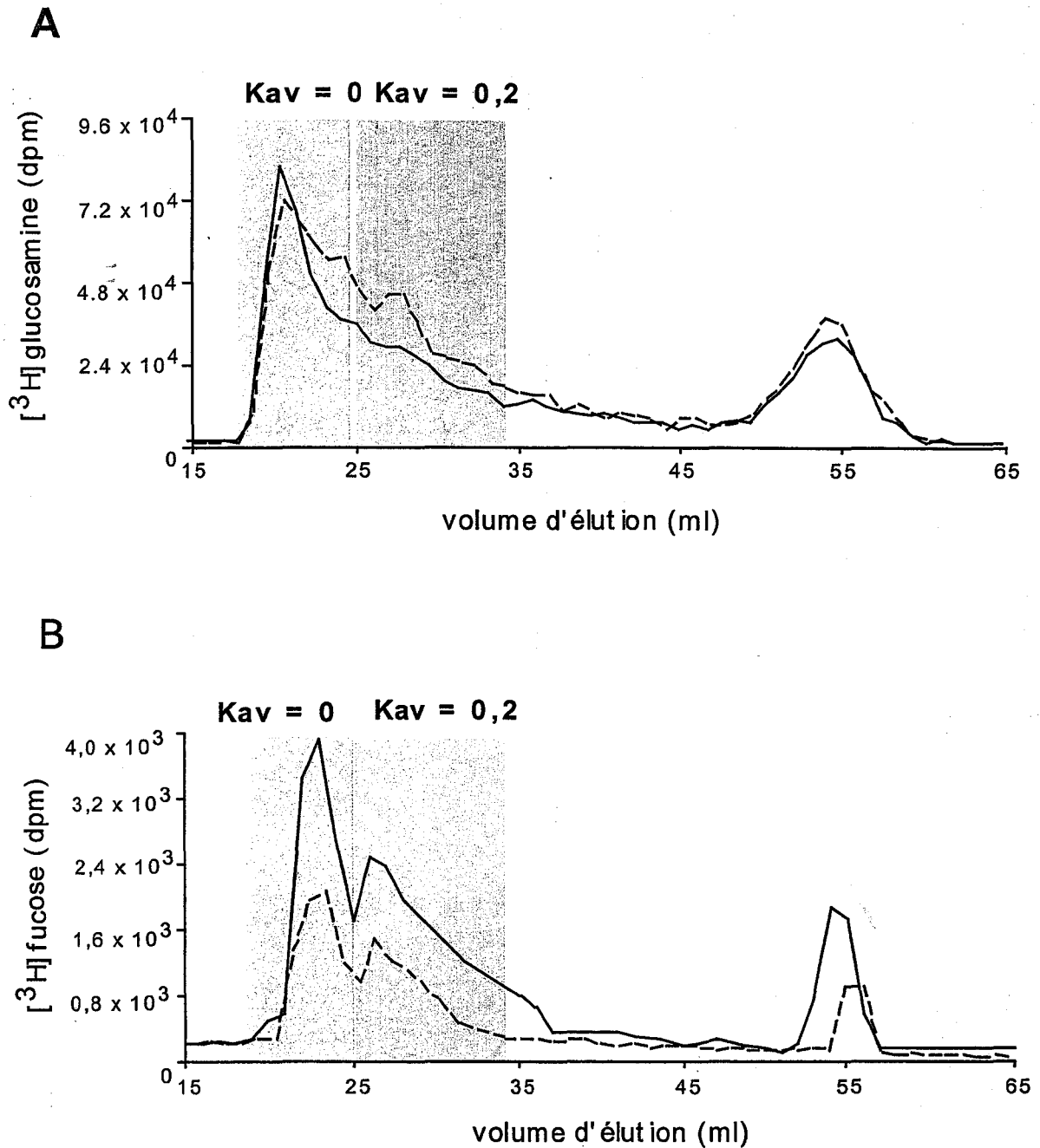


Figure 2 : Second fractionnement chromatographique sur Sepharose CL-4B des fractions 7 à 9 de l'ultracentrifugation des produits sécrétés marqués à la glucosamine (**A**) ou au fucose (**B**) tritiés. L'incorporation de précurseur radiomarké est représentée par (— —) dans les mucines sécrétées dans les conditions basales et par (—) dans les mucines sécrétées après stimulation par le $\text{TNF}\alpha$.

présentés). Par contre, les pics de $K_{av} = 0$ et de $K_{av} = 0,2$ sont plus fucosylés sous $TNF\alpha$ par rapport aux conditions basales (Figure 2B).

Le $TNF\alpha$ ne semble donc pas avoir d'influence sur la sécrétion des mucines, puisque le radiomarquage par [3H]glucosamine ne varie pas, mais entraîne une augmentation de la fucosylation. Néanmoins, l'incorporation de fucose est très faible à l'état basal, et n'augmente que modérément sous $TNF\alpha$.

Un radiomarquage au [^{35}S] a également été effectué : cette expérience n'a révélé aucune incorporation de sulfate radiomarké dans les mucines, aussi bien dans les conditions basales ou qu'après stimulation par le $TNF\alpha$.

Variations d'activité des glycosyl- et sulfotransférases induites par le $TNF\alpha$

Activités sulfotransférasiques

Après avoir incubé les fractions microsomales des cellules contrôles avec le GlcNAc β 1-O-Met et le [^{35}S]PAPS, les produits marqués sont récupérés selon le protocole décrit dans «Matériels et méthodes» et directement injectés sur la colonne CarboPac PA-100. Le profil d'élution obtenu par lecture de la radioactivité ne comporte qu'un seul pic, élué à 11 min 30 s et correspondant au [^{35}S]sulfate libre [Lo-Guidice *et al.*, 1995]. Aucun GlcNAc β 1-O-Met sulfaté néosynthétisé n'est détectable sur le profil d'élution, ce qui signifie qu'il n'existe pas d'activité GlcNAc-sulfotransférasique détectable dans les cellules MM-39 cultivées dans les conditions basales (Figure 3A).

Par contre, dans le cas de l'incubation des microsomes de cellules stimulées par le $TNF\alpha$ avec le GlcNAc β 1-O-Met et le [^{35}S]PAPS, le profil d'élution obtenu par lecture de la radioactivité comporte deux pics : le pic élué à 11 min 30 s correspondant au [^{35}S]sulfate libre, et un pic élué à 9 min 42 s, absent quand les incubations sont réalisées sans substrat, qui correspond vraisemblablement à un méthyl-glycoside GlcNAc β 1-O-Met sulfaté néosynthétisé (Figure 3B). Afin de déterminer la position du groupement sulfate sur ce GlcNAc β 1-O-Met sulfaté néosynthétisé, nous avons injecté les produits radiomarqués (synthétisés durant les incubations) avec un standard synthétisé chimiquement, le méthyl-glycoside

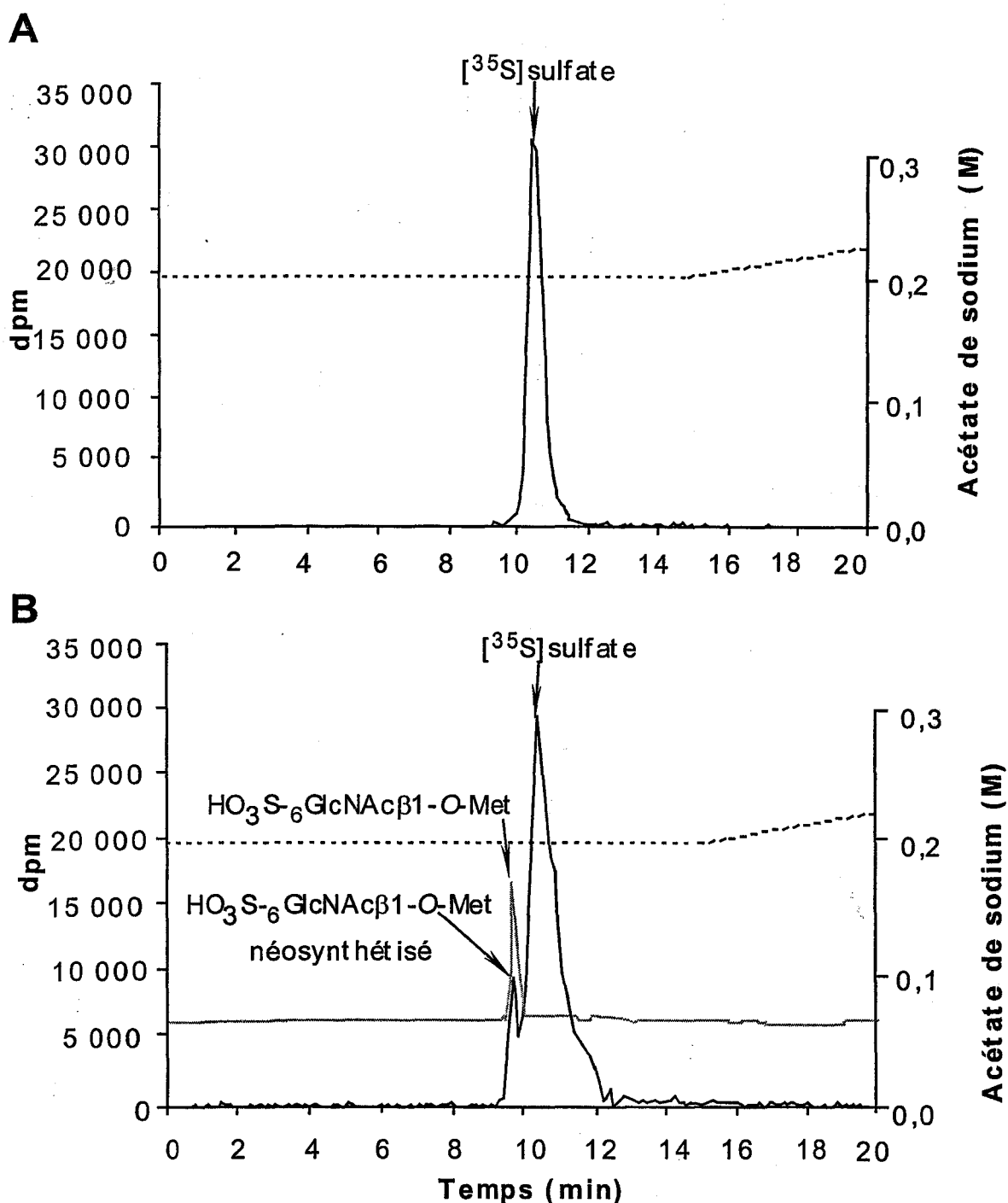


Figure 3 : Profil d'élution en HPAEC des produits synthétisés lors de l'incubation des microsomes de cellules contrôles avec le substrat GlcNAc β 1-O-Met et le $[^{35}\text{S}]$ PAPS (A) ou d'un mélange contenant les produits synthétisés lors de l'incubation des microsomes de cellules stimulées par le $\text{TNF}\alpha$ avec le substrat GlcNAc β 1-O-Met et le $[^{35}\text{S}]$ PAPS, et le standard $\text{HO}_3\text{S}-_6\text{GlcNAc}\beta 1-\text{O-Met}$ (B).

L'élution est suivie à la fois par détection de la radioactivité (—) et détection ampérométrique pulsée (—).

HO₃S-6GlcNAcβ1-O-Met. Ce standard, repéré par PAD, a exactement le même temps de rétention que le méthyl-glycoside GlcNAcβ1-O-Met sulfaté néosynthétisé (visualisé par détection de la radioactivité), ce qui montre la présence d'une activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase dans les MM-39 stimulées par le TNFα (Figure 3B). Cette activité, de 0,69 ± 0,06 pmol/mg de protéines/min, est faible (environ trente fois inférieure) comparée à celle observée dans la muqueuse bronchique humaine [Lo-Guidice *et al.*, 1995] (Tableau II).

Tableau II : Activités α2-3-sialyl-, α1-2-fucosyl-, α1-3-fucosyl-, et sulfotransférases des fractions microsomales de cellules MM-39 cultivées dans les conditions basales ou stimulées par le TNFα.

Activité transférasiq	Gal-3-O- sulfo- (pmol/mg de protéines/min)	GlcNAc-6- O-sulfo- (pmol/mg de protéines/min)	α1-3-fucosyl- (fmol/mg de protéines/min)		α1-2- fucosyl- (fmol/mg de protéines/min)	α2-3-sialyl- (pmol/mg de protéines/min)
Substrat	Galβ1-O- Met	GlcNAcβ1- O-Met	Gal(β1- 4)GlcNAc	NeuAc(α2- 3)Gal(β1-4)GlcNAc	Gal(β1- 4)GlcNAc	Gal(β1- 4)GlcNAc
MM-39	0	0	6,8 ± 0,4	2,6 ± 0,4	17	1,54 ± 0,09
MM-39 + TNFα	0	0,69 ± 0,06	11,5 ± 0,5	4,4 ± 0,5	29	2,35 ± 0,03
Pourcentage d'augmentation			+71 ± 14	+67 ± 4	+70	+53 ± 4
Muqueuse bronchique humaine*	18,48	17,59	230	395	0	41,07

* d'après Lo-Guidice *et al.*, 1995 ; Degroote *et al.*, 1997 ; Degroote *et al.*, 1999.

Aucune activité sulfotransférase n'a été détectée en utilisant le substrat Gal α 1-O-Met, aussi bien dans les microsomes de cellules contrôles que des cellules stimulées par le TNF α .

Activités fucosyltransférases

L'activité α 1-3-fucosyltransférase a d'abord été étudiée en utilisant comme substrat le trisaccharide NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc. Après incubation des fractions microsomales provenant de cellules contrôles avec ce substrat et le [3 H]GDP-Fuc, le profil d'élution obtenu par lecture de la radioactivité ne comporte qu'un pic majeur, élué à 21 min 30 s. Ce pic, identifié par co-élution avec un standard non marqué (repéré par PAD), correspond à la structure NeuAc(α 2-3)Gal[Fuc(α 1-3)](β 1-4)GlcNAc. Un pic mineur, élué à 13 min 30 s, est également détecté sur le diagramme d'élution ; il correspond au [3 H]fucose libre, témoin de la dégradation du [3 H]GDP-Fuc pendant les incubations (Figure 4).

Après incubation des fractions microsomales provenant de cellules stimulées par le TNF α (la même quantité de protéines que pour les incubations «contrôles») avec NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc et le [3 H]GDP-Fuc, le profil d'élution comporte les mêmes pics que ceux visualisés dans les conditions contrôles, mais l'incorporation de fucose sur le substrat NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc est plus importante après stimulation par le TNF α que dans les conditions basales. L'activité α 1-3-fucosyltransférase dans les cellules stimulées est de $4,4 \pm 0,5$ fmol/mg de protéines/min contre $2,6 \pm 0,4$ fmol/mg de protéines/min dans les cellules contrôles (Figure 4 ; Tableau II). Le TNF α stimulerait donc l'activité α 1-3-fucosyltransférase, d'où une augmentation de l'incorporation de fucose sur le substrat NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc (+ 67 ± 4 %). Néanmoins, il faut noter que cette activité reste très faible comparée à celle observée dans la muqueuse bronchique humaine, qui est de 395 fmol/mg de protéines/min pour le même substrat.

Nous avons ensuite testé les activités α 1-2- et α 1-3-fucosyltransférases avec le substrat Gal(β 1-4)GlcNAc. Dans les deux cas (conditions basales ou stimulation par le TNF α), l'incubation de ce substrat avec les microsomes et le

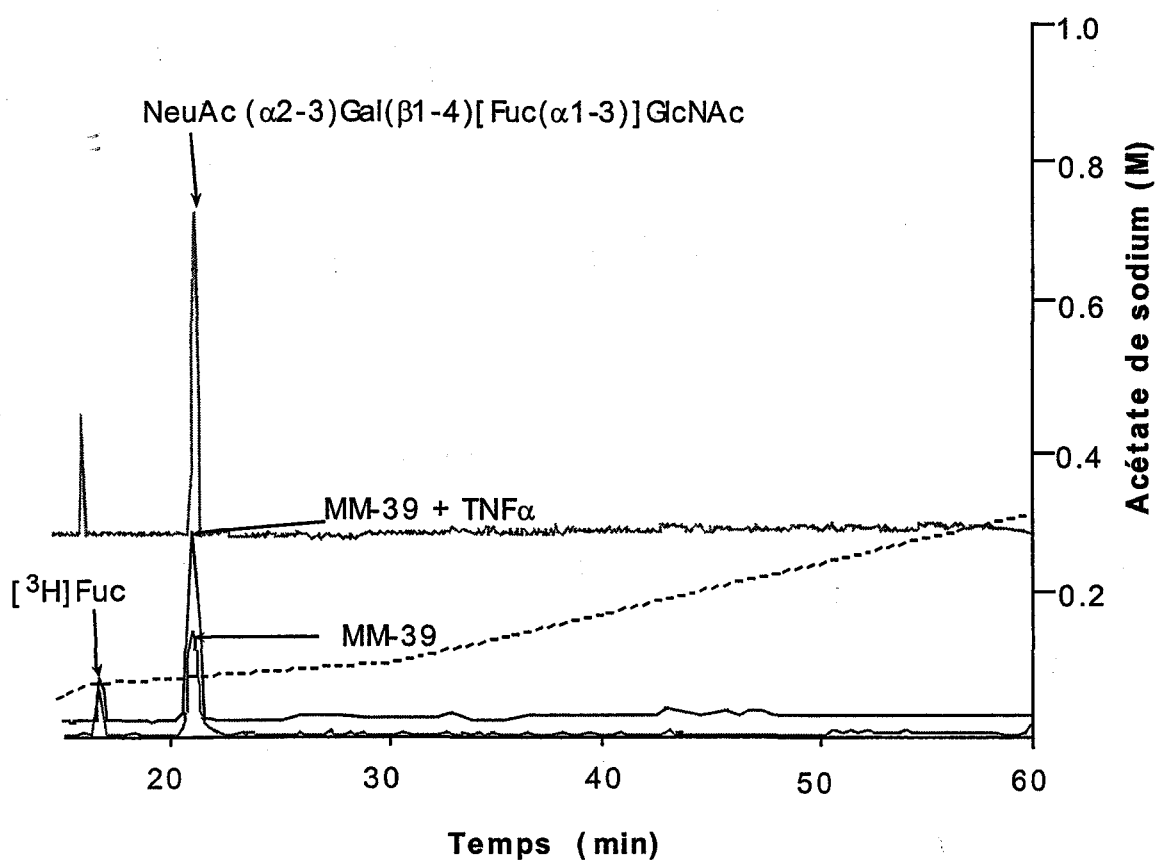


Figure 4 : Profil d'élution en HPAEC d'un mélange contenant les produits radiomarqués synthétisés pendant les incubations des fractions microsomales (provenant des cellules contrôles (—) ou stimulées par $\text{TNF}\alpha$ (—)) avec $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et $[^3\text{H}]\text{GDP-Fuc}$, et le standard $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)[\text{Fuc}\alpha 1-3]\text{GlcNAc}$.

L'élution est suivie par détection de la radioactivité (—, —) et par détection ampérométrique pulsée (—).

[³H]GDP-Fuc conduit à la biosynthèse de structures Le^x (Gal[Fuc(α1-3)](β1-4)GlcNAc) et Le^y (Fuc(α1-2)Gal[Fuc(α1-3)](β1-4)GlcNAc), mais l'incorporation de fucose est plus forte sous stimulation par le TNFα (résultats non présentés). L'activité α1-3-fucosyltransférase sur le substrat Gal(β1-4)GlcNAc dans les cellules stimulées est de 11,5 ± 0,5 fmol/mg de protéines/min contre 6,8 ± 0,4 fmol/mg de protéines/min dans les cellules contrôles (Tableau II). De même, l'activité α1-2-fucosyltransférase, qui est de 17 fmol/mg de protéines/min dans les cellules contrôles, augmente de 65 % pour atteindre 29 fmol/mg de protéines/min dans les cellules stimulées par le TNFα. L'activité α1-3-fucosyltransférase reste très inférieure à celle de muqueuse bronchique humaine. L'activité α1-2-fucosyltransférase ne peut être comparée à celle de muqueuse bronchique humaine, car aucune activité α1-2-fucosyltransférase n'avait été observée sur le substrat Gal(β1-4)GlcNAc au cours de notre étude concernant la biosynthèse des dérivés sulfatés et/ou sialylés de l'épitope Le^x.

Activité α2-3-sialyltransférase

L'activité α2-3-sialyltransférase a été étudiée avec le substrat Gal(β1-4)GlcNAc. Après incubation des microsomes provenant de cellules contrôles avec ce substrat et le [¹⁴C]CMP-NeuAc, le profil d'élution obtenu par lecture de la radioactivité comporte trois pics. Deux d'entre eux sont présents quand les incubations sont effectuées sans substrat et ont été identifiés par co-élution avec des standards non marqués (repérés par PAD) : le pic élué à 20 min 54 s correspond à l'acide sialique libre, et celui à 47 min 42 s correspond au [¹⁴C]CMP-NeuAc non dégradé. Le pic élué à 22 min 36 s correspond à un oligosaccharide sialylé néosynthétisé (Figure 5). Ce pic a été identifié par co-élution avec le standard NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc, ce qui montre la présence d'une activité α2-3-sialyltransférase dans les cellules MM-39 (Figure 5). Cette activité est de 1,54 ± 0,09 pmol/mg de protéines/min, ce qui est à nouveau très inférieur à l'activité α2-3-sialyltransférase de muqueuse bronchique humaine sur le même substrat (41,07 pmol/mg de protéines/min). En utilisant une même quantité de protéines microsomales provenant de cellules stimulées par le TNFα, l'incorporation d'acide sialique sur le substrat

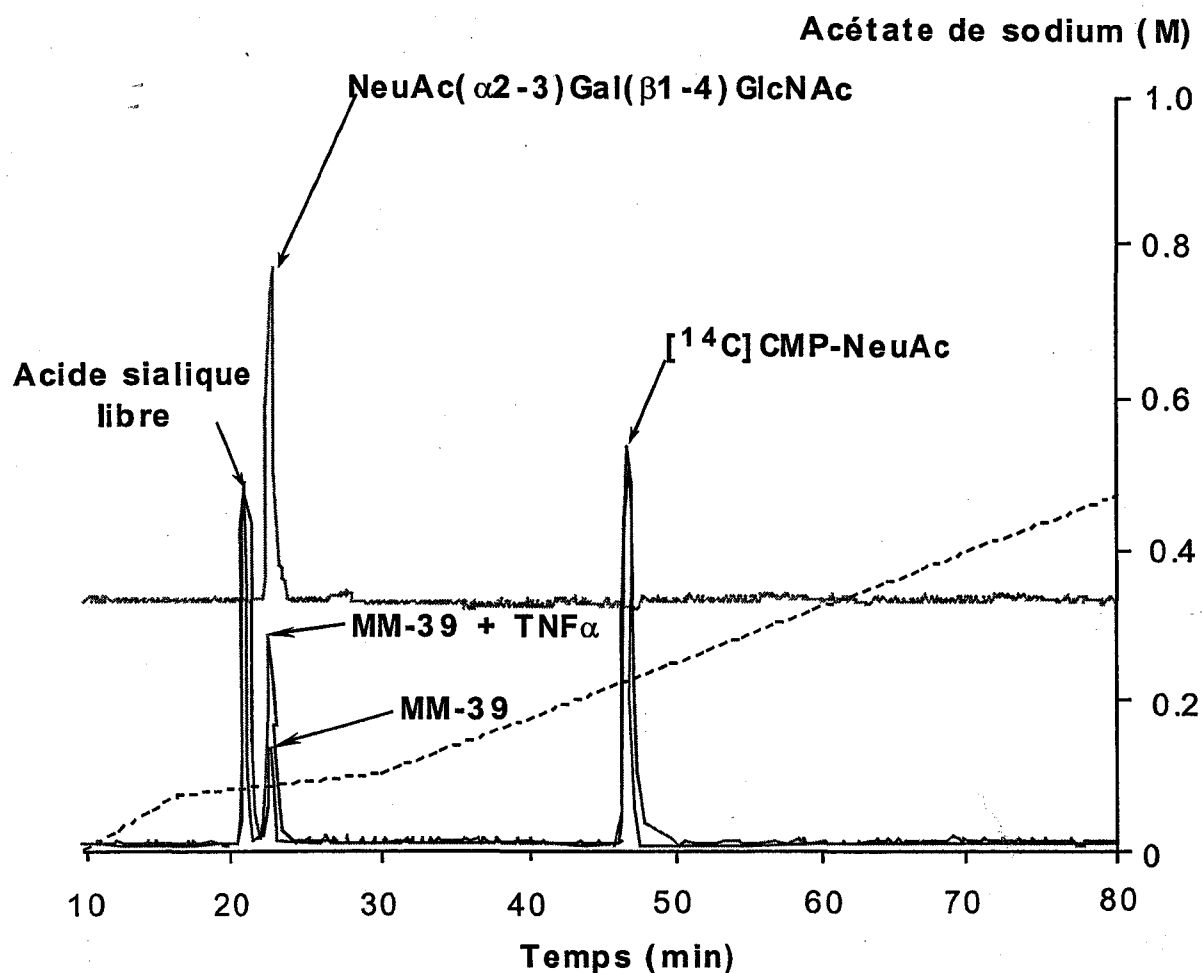


Figure 5 : Profil d'élution en HPAEC d'un mélange contenant les produits sialylés radiomarqués synthétisés pendant les incubations des fractions microsomales (provenant des cellules contrôles (—) ou stimulées par $\text{TNF}\alpha$ (—)) avec $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et [^{14}C] CMP-NeuAc, et le standard $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

L'élution est suivie par détection de la radioactivité (—, —) et par détection ampérométrique pulsée (—).

Gal(β 1-4)GlcNAc est légèrement plus importante que dans les conditions basales ($2,35 \pm 0,03$ pmol/mg de protéines/min). Le $\text{TNF}\alpha$ stimule donc l'activité α 2-3-sialyltransférase présente dans les fractions microsomales de cellules MM-39.

Influence de la concentration en $\text{TNF}\alpha$ et du temps de stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression des gènes de fucosyl- et sialyltransférases

L'augmentation de l'expression des ARNm des α 1-2-fucosyltransférases (*FUT1* et *FUT2*), de l'enzyme Lewis *FUT3*, et des α 2-3-sialyltransférases (*ST3Gal-I*, *ST3Gal-III* et *ST3Gal-IV*) dépend de la concentration du $\text{TNF}\alpha$. L'effet du $\text{TNF}\alpha$ est maximal à 20 ng/ml ; au-dessus de cette concentration, un plateau apparaît (résultats non présentés). Le niveau d'expression des glycosyltransférases atteint également un plateau à partir de 16 h de contact entre les cellules et la cytokine (résultats non présentés).

Variations d'expression des gènes de glycosyltransférases induites par le $\text{TNF}\alpha$

Dans les cellules cultivées dans les conditions basales, les ARNm de *FUT2*, *FUT3*, *ST3Gal-I*, *ST3Gal-III*, *ST3Gal-IV* (Figure 6A), et de *C2-GnT* (résultats non présentés) sont facilement détectables par RT-PCR, alors que ceux de *FUT1*, *FUT4*, et *I-GnT* le sont difficilement (résultats non présentés).

Lorsque les cellules sont stimulées par le $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 16 h), l'expression des α 1-2-fucosyltransférases [*FUT1* (codant l'enzyme H) et *FUT2* (codant l'enzyme Sécréteur)], de l'enzyme Lewis *FUT3*, et des α 2-3-sialyltransférases *ST3Gal-I*, *ST3Gal-III*, et *ST3Gal-IV* est augmentée (Figure 6A et B). L'expression de *FUT3* et de *ST3Gal-III* est particulièrement sensible au $\text{TNF}\alpha$ (+ 90 ± 27 % pour *FUT3* ; + 80 ± 25 % pour *ST3Gal-III*).

Les amorces que nous avons utilisées pour amplifier l'ADNc de *FUT3* (447 pb) pouvaient, en théorie, également amplifier l'ADNc de *FUT5* (486 pb). Dans nos

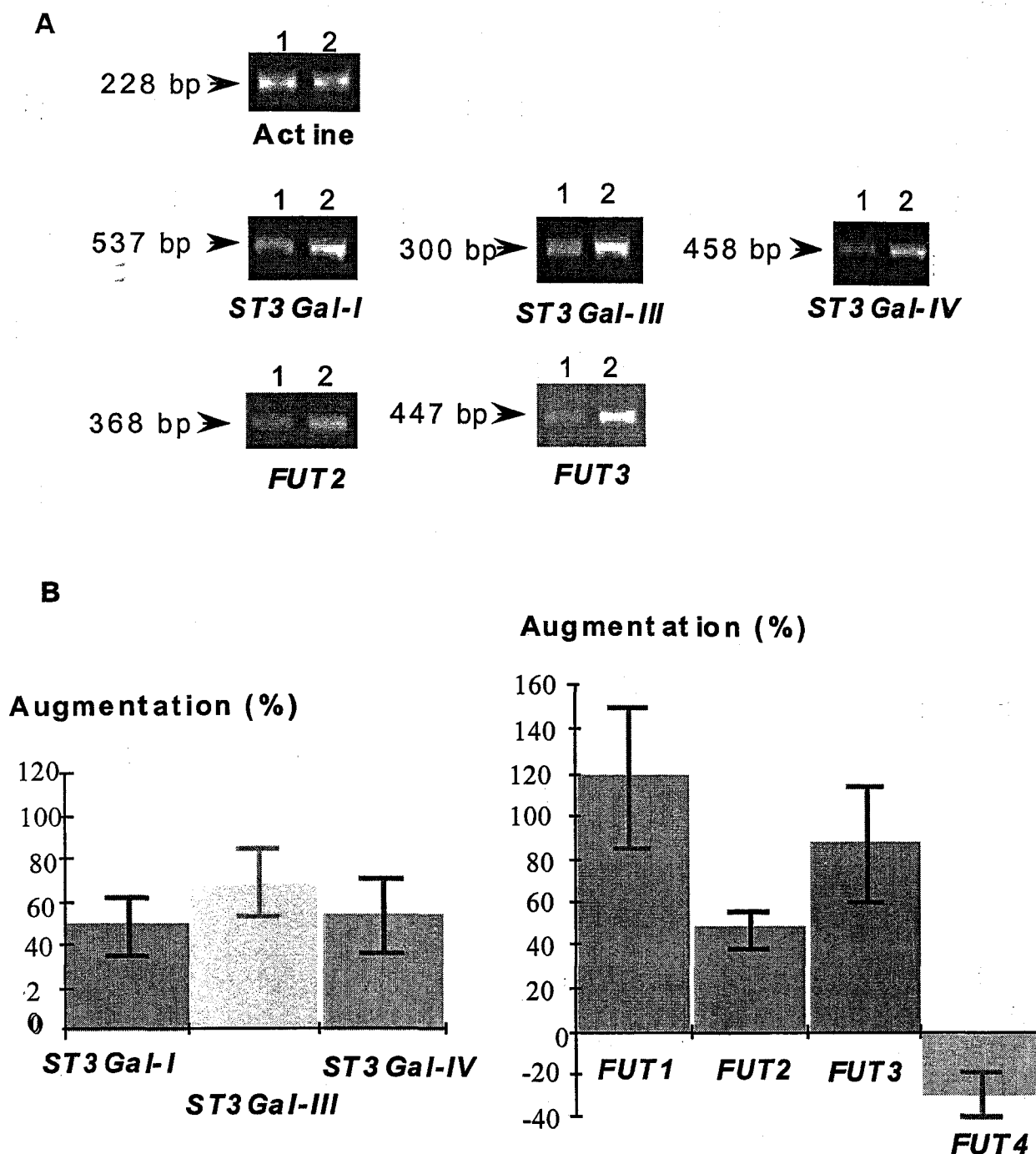


Figure 6 : (A) Variations d'expression en RT-PCR des α 2-3-sialyltransférases (*ST3Gal-I*, *-III*, *-IV*) et des fucosyltransférases *FUT* 2 et -3 dans les conditions basales (piste 1) ou après stimulation par $\text{TNF}\alpha$ (piste 2) (la β -actine est utilisée comme contrôle externe) et (B) histogramme représentant les variations d'expression des α 2-3-sialyltransférases et des fucosyltransférases (*FUT*1, -2, -3, -4) après stimulation par $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml, 16 h).

expériences de PCR, une seule bande a été visualisée après migration en gel de polyacrylamide à 8 %. Ce produit de RT-PCR est clivé en deux fragments de 282 et 165 pb après digestion par *Dde I* [Emery *et al.*, 1997], ce qui signifie que seul le fragment de *FUT3* a été amplifié et qu'il n'y a pas d'expression de *FUT5*. Concernant *FUT4*, toutes les concentrations de $\text{TNF}\alpha$ testées induisent une légère diminution de l'expression de l'enzyme ($-30 \pm 12\%$) (Figure 6B).

Les ARNm de *FUT5*, -6, et -7 ne sont pas détectables dans les cellules MM-39, qu'elles soient cultivées dans les conditions basales ou stimulées par le $\text{TNF}\alpha$.

L'expression des gènes des β 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférases, *C₂-GnT* and *I-GnT*, est identique quels que soient la quantité de $\text{TNF}\alpha$ et le temps de stimulation utilisés (résultats non présentés).

De façon générale, le $\text{TNF}\alpha$ stimule l'expression des gènes *FUT2*, -3, *ST3Gal-I*, -III et -IV, ainsi que les activités α 1-2- et α 1-3-fucosyltransférases, et α 2-3-sialyltransférases. Néanmoins, il faut noter que les fucosyltransférases sont peu exprimées dans la lignée MM-39 (par rapport à l'expression de ces enzymes dans des cultures secondaires de cellules épithéliales bronchiques humaines [Emery *et al.*, 1997], ce qui explique la faible activité des α 1-2- et α 1-3-fucosyltransférases de ces cellules. Si les sialyltransférases sont plus exprimées que les fucosyltransférases, leur activité reste néanmoins inférieure à celle de la muqueuse bronchique humaine.

Discussion

Après stimulation des cellules MM-39 par le $\text{TNF}\alpha$, une augmentation modérée de l'incorporation de fucose dans les mucines a été observée, ainsi qu'une augmentation des activités fucosyl- et sialyltransférases et l'apparition d'une activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase. Néanmoins, l'ensemble de nos résultats, bien que suggérant un effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression et l'activité des fucosyl-, sialyl- et sulfotransférases des cellules MM-39, ne permet pas de le démontrer de façon définitive. En effet, les mucines sécrétées par les cellules MM-39 sont essentiellement sialylées, très peu fucosylées et sulfatées. Lo-Guidice *et al.*, utilisant de plus faibles quantités de cellules pour le radiomarquage, n'avaient pas détecté d'incorporation de fucose [1997]. L'expression des fucosyltransférases et leur activité sont très faibles dans les conditions basales et n'augmentent que légèrement sous stimulation. Cette augmentation d'activité se traduit par une augmentation modérée de l'incorporation du fucose tritié dans les mucines de $K_{av} = 0$ et de $K_{av} = 0,2$.

Ces problèmes sont probablement liés au degré insuffisant de différenciation mucipaire des cellules ou au petit nombre de cellules ayant une différenciation mucipaire parmi la population cellulaire. De plus, les activités des enzymes lysosomiaux sont très élevées dans les liquides de surnageant de cultures primaires de cellules respiratoires humaines ; elles le sont également dans le cas des cellules MM-39 [Merten, communication personnelle]. Nous avons observé au laboratoire que les activités fucosidases présentes dans les microsomes de cellules MM-39 étaient au moins deux fois plus élevées que celles présentes dans la muqueuse bronchique humaine. A l'avenir, il sera donc intéressant d'utiliser un inhibiteur de fucosidases, comme le 1,5-didéoxy 1,5-imino-L-fucitol, durant les incubations.

Lors du marquage métabolique avec le $[^{35}\text{S}]$ sulfate, nous n'avons observé aucune incorporation de $[^{35}\text{S}]$ sulfate dans les mucines sécrétées par la lignée MM-39, que ce soit dans les conditions basales ou sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$. Pourtant, nous avons détecté dans les microsomes des cellules stimulées une faible activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase, susceptible d'agir sur les chaînes glycaniques de mucines. Il est possible que les mucines synthétisées par la lignée MM-39 soient de mauvais substrats pour cette GlcNAc-6-O-sulfotransférase et que,

par un phénomène de compétition avec d'autres enzymes plus actifs, très peu de sulfate soit incorporé dans les chaînes glycaniques de mucines.

Le faible potentiel de fucosylation et de sulfatation de la lignée MM-39 nous a incités à poursuivre l'étude de stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ sur des explants de muqueuse bronchique humaine, car il a été montré au laboratoire que la muqueuse bronchique contenait des activités sulfo-, fucosyl- et sialyltransférasiques beaucoup plus élevées que celles des MM-39 [Lo-Guidice *et al.*, 1995 ; Degroote *et al.*, 1997 ; Degroote *et al.*, 1999, *Glycobiology*, sous presse]. Une seule expérience, au cours de laquelle nous avons examiné les activités sulfo- et glycosyltransférasiques dans les conditions contrôles ou sous $\text{TNF}\alpha$, a pu être réalisée jusqu'à présent, du fait de la difficulté en approvisionnement en pièces opératoires.

2. Effet du $TNF\alpha$ sur les activités fucosyl-, sialyl-, et sulfotransférasiques d'explants de muqueuse bronchique humaine.

Matériel et Méthodes

Culture des explants et stimulation par le $TNF\alpha$

Des fragments de muqueuse et sous-muqueuse bronchiques sont prélevées dans des zones macroscopiquement saines de pièces opératoires de patients atteints de cancer bronchique. Ces fragments sont découpés en petits morceaux de 4 à 5 mm de côté, et répartis dans deux puits d'une flasque à 6 puits. Les pièces contenues dans le premier puits sont recouvertes de 1,5 ml de milieu CMRL-1066 (Life Technologies) contenant 2 mM de glutamine (Life Technologies) pour servir de contrôle. Le même milieu, contenant en plus du $TNF\alpha$ (20 ng/ml), est ajouté dans le second puits. La flasque est placée 16 h à 37 °C sous agitation douce. Au bout de 16 h, les morceaux de muqueuse/sous-muqueuse bronchique sont récupérés en vue d'une préparation de microsomes.

La préparation des microsomes, le dosage de protéines, l'étude des activités GlcNAc- et Gal-sulfotransférasiques, α -fucosyl-transférasiques, α 2-3-sialyl-transférasiques, l'identification des produits radiomarqués néosynthétisés par HPAEC/PAD sont effectués selon les protocoles décrits dans la partie n° 1 concernant les cellules MM-39.

Une activité α 1-3-fucosyltransférase, agissant sur le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc, est également présente dans les fractions microsomales préparées à partir des explants contrôles. Sa valeur dans les conditions basales est environ dix fois supérieure à celle calculée dans les cellules MM-39 sur le même substrat. Sous stimulation par le TNF α , elle augmente fortement (+ 192 % dans notre expérience) et atteint le niveau d'activité présent dans des microsomes directement préparés à partir de muqueuse bronchique. Par contre, aucune activité α 1-2-fucosyltransférase, agissant sur le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc, n'a pu être mise en évidence. Cette absence d'activité α 1-2-fucosyltransférase a déjà constatée dans des microsomes directement préparés à partir de muqueuse bronchique, au cours de notre étude de biosynthèse [Degroote *et al.*, 1999, *Glycobiology*, sous presse].

Une activité α 2-3-sialyltransférase, agissant sur le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc, a également été caractérisée dans les fractions microsomales préparées à partir des explants cultivés dans les conditions contrôles. Sa valeur (9,04 pmol/mg de protéines/min), bien qu'inférieure à celle déterminée dans des microsomes directement préparés à partir de muqueuse bronchique, est six fois plus élevée que celle des microsomes de cellules MM-39. L'activité α 2-3-sialyltransférase est plus élevée dans les microsomes préparés à partir d'explants stimulés par le TNF α (+ 41 %).

Résultats

Les résultats obtenus concernant les activités Gal et GlcNAc-sulfotransférases, α 1-3- et α 1-2-fucosyltransférases et α 2-3-sialyltransférases des explants bronchiques, dans les conditions de culture contrôle ou sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$, sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Activités α 2-3-sialyl-, α 1-2-fucosyl-, α 1-3-fucosyl-, et sulfotransférases des fractions microsomales d'explants bronchiques humains, cultivés dans les conditions basales ou stimulés par le $\text{TNF}\alpha$.

Activité transférasiq	Gal- sulfo- (pmol/mg de protéines/min)	GlcNAc-6- O-sulfo- (pmol/mg de protéines/min)	α 1-3- fucosyl- (fmol/mg de protéines/min)	α 1-2- fucosyl- (fmol/mg de protéines/min)	α 2-3- sialyl- (pmol/mg de protéines/min)
Substrat	Gal β 1-O- Met	GlcNAc β 1- O-Met	Gal(β 1-4)GlcNAc	Gal(β 1- 4)GlcNAc	Gal(β 1- 4)GlcNAc
Explant contrôle	0	0,61	70,1	0	9,04
Explant + $\text{TNF}\alpha$	0	1,09 (+ 78 %)	205 (+ 192 %)	0	12,77 (+ 41 %)

Aucune activité Gal-sulfotransférase n'a été détectée dans les microsomes préparés à partir d'explants de muqueuse bronchique, que ce soit dans les conditions contrôles ou sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$.

Par contre, une faible activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase a été visualisée dans les explants bronchiques ; l'activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase basale est proche de celle détectée dans les MM-39 sous stimulation, elle est augmentée (+ 78 %) quand les explants sont stimulés par le $\text{TNF}\alpha$. Néanmoins, les activités sulfotransférases caractérisées dans les explants sont très inférieures à celles de muqueuse bronchique humaine [Lo-Guidice *et al.*, 1995 ; Degroote *et al.*, 1997] .

Discussion

Les explants bronchiques présentent de faibles activités sulfotransférasiques, mais des activités α 1-3-fucosyltransférasique et α 2-3-sialyltransférasique plus élevées que celles des cellules MM-39 ; ces activités sont augmentées quand les explants sont stimulés par le $\text{TNF}\alpha$.

L'absence totale d'activité Gal-3-O-sulfotransférasique, et la faible activité GlcNAc-6-O-sulfotransférasique détectée dans les explants bronchiques sont surprenantes. En effet, dans des fractions microsomales directement préparées à partir de muqueuse bronchique humaine, les activités Gal-3-O- et GlcNAc-6-O-sulfotransférasiques sont relativement importantes (de l'ordre de 17-18 pmol/mg de protéines/min). La perte (ou la forte diminution) des activités sulfotransférasiques pourrait être due à la présence d'une grande quantité de sous-muqueuse dans les explants bronchiques, alors que la caractérisation de ces enzymes avait été réalisée avec des microsomes directement préparés à partir de l'épithélium de surface. Les activités sulfotransférasiques pourraient se trouver surtout dans l'épithélium de surface (en particulier dans les cellules caliciformes synthétisant des mucines), et être plus faibles dans la sous-muqueuse bronchique : des fractions microsomales préparées à partir d'explants (sous-muqueuse et muqueuse) contiendraient donc des activités sulfotransférasiques plus faibles que celles de l'épithélium bronchique de surface, du fait d'une certaine «dilution». La présence de sulfatases dans les préparations de microsomes est également envisageable.

Il semble que, malgré de faibles ou inexistantes activités sulfotransférasiques qui les distinguent des cellules bronchiques, les explants bronchiques soient un meilleur modèle que les cellules MM-39 pour étudier l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur les activités glycosyltransférasiques. L'inconvénient potentiel des explants de muqueuse bronchique humaine réside en ce qu'ils proviennent à chaque fois d'un patient différent, qui possède un patrimoine génétique et un potentiel de glycosylation et de sulfatation qui lui sont propres. Les activités glycosyl- et sulfotransférasiques basales seront peut-être variables d'un patient à l'autre. Néanmoins, nous nous intéressons surtout à la variation de ces activités après stimulation par le $\text{TNF}\alpha$, plutôt qu'à leurs valeurs absolues.

Nous allons donc compléter cette première expérience par des études similaires sur d'autres explants bronchiques, sur lesquels nous pourrons à nouveau étudier l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activité des glycosyl- et sulfotransférases, et également étudier l'expression par RT-PCR des fucosyl- et sialyltransférases exprimées dans ce modèle.

Conclusion - Discussion

Effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la fucosylation, la sialylation et la sulfatation dans la lignée MM-39 et les explants bronchiques

Les résultats obtenus sur la lignée MM-39, et lors de notre première expérience sur explant bronchique, suggèrent que le $\text{TNF}\alpha$ a un effet stimulateur sur l'expression et l'activité des fucosyl-, sialyl- et sulfotransférases susceptibles d'agir en périphérie des mucines sécrétées. Par contre, aucune hypersécrétion de mucines n'a été observée lors de la stimulation de la lignée MM-39 par cette cytokine. Le $\text{TNF}\alpha$ semble surtout agir sur la glycosylation et la sulfatation des mucines plutôt que sur leur sécrétion. Néanmoins, les augmentations d'expression et d'activité des fucosyl-, sialyl- et sulfotransférases ne signifient pas qu'elles agissent réellement plus sur les mucines sécrétées. Nous devons donc par la suite caractériser plus précisément la glycosylation périphérique des mucines sécrétées par la lignée MM-39, avec des anticorps (anti-sialyl Le^x , anti- Le^y ...) et des lectines (MAA, lectine de *Maackia Amurensis* ; UEA1, lectine d'*Ulex Europeus*).

Les explants bronchiques présentent des activités fucosyltransférasiques et sialyltransférasiques proches de celles décrites dans les microsomes directement préparés à partir de muqueuse bronchique, et nettement supérieures aux activités présentes dans les microsomes préparés à partir de cellules MM-39. Néanmoins, l'activité Gal-3-O-sulfotransférasique n'est pas détectable dans ce modèle, et l'activité GlcNAc-6-O-sulfotransférasique, bien qu'activable par le $\text{TNF}\alpha$, est très faible. Les explants bronchiques ne constituent donc pas un modèle idéal, mais leur utilisation pour l'étude des variations d'expression et d'activités fucosyl- et sialyltransférasiques sous stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ reste plus intéressante que la lignée MM-39.

Nos résultats permettent de compléter l'observation d'une hypersialylation et d'une expression accrue de l'épitope sialyl Le^x en périphérie des mucines bronchiques de patients sévèrement infectés, atteints de mucoviscidose ou de bronchite chronique. Le $\text{TNF}\alpha$, cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire,

entraîne une augmentation légère des activités sialyltransférase et fucosyltransférase dans nos deux modèles (MM-39 et explants), et pourrait avoir le même effet dans l'appareil respiratoire de patients très infectés.

Ces résultats suggèrent que les mucines, du moins certaines d'entre elles, pourraient se comporter comme des molécules inflammatoires, dont la glycosylation et la sécrétion peuvent se trouver modifiées lors de phénomènes inflammatoires. Le rôle de ces modifications (hypersialylation, surexpression de l'épitope sialyl Le^x) pourraient être de moduler la réponse inflammatoire, en interagissant avec les sélectines des leucocytes. Les nouveaux épitopes créés pourraient, en outre, être des sites de fixation pour certains pathogènes ayant un tropisme pour l'appareil respiratoire, facilitant ainsi la colonisation par ces micro-organismes.

Troisième partie

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA COLONISATION PULMONAIRE PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A - Rappels

I. Colonisation par *P. aeruginosa*

1. Différents facteurs favorisant la colonisation par *P. aeruginosa*

1.1 *Altération de la rhéologie du mucus*

1.2 *Altération de l'activité anti-microbienne du mucus*

1.3 *Primo-infection des voies respiratoires*

2. Hypothèses sur la colonisation par *P. aeruginosa*

2.1 *Émergence de récepteurs pour *P. aeruginosa* ?*

2.2 *Influence de la composition du milieu sur les protéines d'adhésion de *P. aeruginosa**

II. Persistance de *P. aeruginosa*

B – Travaux personnels

I. Étude de l'affinité de *P. aeruginosa* pour différents épitopes glycaniques dérivés de l'épitope Le^x, présents en périphérie des mucines bronchiques humaines, par une technique de cytométrie de flux.

A - Rappels

I. La colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste, gram négatif, qui est en général responsable d'infection chez des patients ayant une altération de leurs défenses, comme les sujets atteints du syndrome acquis d'immunodéficience, ceux qui viennent de suivre une chimiothérapie ou encore les grands brûlés. Cette bactérie est également le problème majeur des patients CF, car elle colonise l'appareil respiratoire et devient pratiquement impossible à éliminer. Même si certains facteurs favorisant cette colonisation sont connus, la spécificité et la persistance de l'infection par cette bactérie dans la mucoviscidose restent encore mal comprises.

1. Différents facteurs peuvent favoriser l'infection par *P. aeruginosa*

1.1 *Altération de la rhéologie du mucus*

En 1953, di Sant'Agnese observe une augmentation de la concentration en ions chlorures dans la sueur, qui est due à un défaut de réabsorption de ces ions au niveau des canaux des glandes sudoripares [1953]. Cette observation a donné lieu à la mise en place du premier test de dépistage de la mucoviscidose, appelé test de la sueur, qui est toujours utilisé. Au niveau de l'épithélium respiratoire, l'absence ou l'altération de la protéine CFTR se traduit par un défaut de sécrétion des ions chlorures, accompagné d'une augmentation de l'absorption des ions sodium et d'eau. Les perturbations des mouvements ioniques conduisent à une déshydratation du liquide péri-ciliaire et du mucus, pouvant conduire à un mauvais fonctionnement du système muco-ciliaire et à la stagnation du mucus bronchique dans les voies aériennes, favorisant la colonisation bactérienne. Cependant, l'altération des transports ioniques liée au dysfonctionnement de la protéine CFTR ne semble pas être le seul facteur responsable de la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique, puisqu'il existe d'autres affections dans lesquelles l'efficacité du système muco-ciliaire est très réduite (par exemple dans le cas du syndrome de dyskinésie ciliaire) sans que l'on observe une infection précoce par *P. aeruginosa* [Palmer & Alpern, 1998].

1.2 Altération de l'activité anti-microbienne du mucus

Il y a plus de 70 ans, Fleming avait observé que les sécrétions trachéo-bronchiques humaines étaient capables de tuer des bactéries [1922]. On sait aujourd'hui qu'un certain nombre de protéines et de peptides à propriétés anti-bactériennes sont sécrétés dans le mucus bronchique et qu'ils contribuent à la défense des voies aériennes [Travis *et al.*, 1999]. Leur contribution dépend de leur concentration et de leur activité au sein du liquide péri-ciliaire qui se trouve entre la surface de l'épithélium et la couche de mucus.

Ce sont essentiellement le lysozyme [Kai *et al.*, 1996] et la lactoferrine [Harbitz *et al.*, 1984], sécrétés par les cellules séreuses et les polynucléaires neutrophiles, ainsi que le MPI (pour *Mucus Proteinase Inhibitor*) sécrété par les cellules séreuses et les cellules de Clara [Hiemstra *et al.*, 1996]. Ce dernier représente le principal inhibiteur de sérine-protéases (élastase) du mucus bronchique. Des immunoglobulines A de sécrétion sont également présentes dans le mucus bronchique [Reynolds *et al.*, 1978] et tous ces composants agissent en synergie pour lutter contre les infections des voies aériennes et pour maintenir les bronches stériles.

Au cours de ces dernières années, d'autres peptides dotés de propriétés antibiotiques, appelés défensines, ont été mis en évidence, d'abord dans les granules des leucocytes puis dans les muqueuses [Gabay *et al.*, 1989]. Ces peptides ont tous en commun leur petite taille et leur caractère cationique [Hancock & Lehrer, 1998]. Deux β -défensines, HBD-1 et HBD-2, sont exprimées au niveau de l'épithélium de surface et dans les cellules séreuses des glandes de la sous-muqueuse bronchique [Singh *et al.*, 1998]. Il a été suggéré qu'il existait une diminution de l'activité de ces deux défensines chez les patients CF qui pourrait être due à la concentration importante en sels du liquide de surface de l'épithélium et qui pourrait expliquer la persistance de l'infection chronique par *P. aeruginosa* rencontrée dans cette affection [Smith *et al.*, 1996 ; Bals *et al.*, 1998 ; Goldman *et al.*, 1997]. Toutefois, il a été montré que les défensines contenues dans le mucus bronchique CF étaient intactes et nombreuses [Soong *et al.*, 1997] et qu'il n'y avait pas de différence significative dans la concentration en ions du liquide péri-ciliaire entre les sujets sains, les sujets CF et les sujets souffrant de bronchite chronique [Knowles *et al.*, 1997 ; Matsui *et al.*, 1998]. Puisque les concentrations en ions sont largement suffisantes pour permettre une activité normale des défensines dans les trois groupes de sujets, l'infection des malades CF pourrait être due à d'autres facteurs.

L'«oxyde nitrique synthase», enzyme générant de l'oxyde nitrique (lui-même important médiateur dans les mécanismes de défense de l'hôte) semble être déficiente au

niveau d'explants pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose [Meng *et al.*, 1998]. L'altération de ce système de défense pourrait être liée à la susceptibilité particulière des patients CF vis-à-vis des infections bactériennes.

1.3 *Primo-infection des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose par d'autres pathogènes*

La colonisation pulmonaire par *P. aeruginosa* pourrait être aussi favorisée par une infection préalable par d'autres bactéries. En effet, au début de la maladie, les pathogènes dominants sont *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*. *P. aeruginosa* apparaît plus tardivement et devient le pathogène prédominant au niveau des voies respiratoires (Figure 13). Il semble que l'infection par *P. aeruginosa* soit favorisée par les lésions créées par les pathogènes responsables de la primo-infection [Koch & Høiby, 1993]. Cependant, la prévalence de l'infection par *P. aeruginosa* chez les patients CF est encore mal comprise, de même que la chronologie de l'infection et sa chronicité.

2. Hypothèses sur la colonisation par *P. aeruginosa*

2.1 *L'émergence de récepteurs pour *P. aeruginosa* ?*

L'adhérence de la bactérie aux tissus bronchiques et au mucus pourrait être le préalable nécessaire à la colonisation et à la pathogénicité. L'adhérence bactérienne peut être due à des interactions spécifiques entre les molécules d'adhésion de la bactérie (pili, lipopolysaccharide, flagelle, adhésines de la membrane externe...) et des structures servant de récepteurs présentes en surface des cellules épithéliales respiratoires ou sur les mucines bronchiques (Figure 14).

De nombreuses études ont été réalisées afin de définir très précisément les structures glycaniques reconnues par *P. aeruginosa*. *In vitro*, cette bactérie peut se fixer sur différents glycoconjugués, parmi lesquels les glycolipides membranaires asialo-GM1 et asialo-GM2.

L'asialo-GM1 a été caractérisé sur la surface de cellules épithéliales CF en culture, et pourrait servir de récepteur pour *P. aeruginosa*, mais aussi pour *Staphylococcus aureus* [Imundo *et al.*, 1995]. Pour *P. aeruginosa*, cette interaction se ferait *via* les pili, et plus particulièrement entre la partie C-terminale de la piline (composant majeur du pili) et la séquence GalNAc(β 1-4)Gal des asialo-glycolipides. Lors d'épisodes infectieux chez les sujets sains, l'épithélium pulmonaire en réparation favorise la fixation de *P. aeruginosa* par l'exposition de récepteurs asialo-GM1 [De Benzmann *et al.*, 1996]. Une augmentation du nombre de récepteurs asialo-GM1 a été décrite en surface de cellules CF (comparées avec des cellules non-CF) [Saiman & Prince, 1993] ; cet accroissement du nombre de sites récepteurs pour *P. aeruginosa* pourrait expliquer la prévalence de cette bactérie dans la mucoviscidose. L'exoenzyme S, présente sur la membrane externe des bactéries, reconnaît également la structure GalNAc(β 1-4)Gal des asialo-GM1 et -GM2 [Lingwood *et al.*, 1989].

Un lien encore plus direct entre la protéine CFTR et *P. aeruginosa* a été suggéré : la protéine CFTR serait un récepteur (présent sur les cellules épithéliales) pour cette bactérie, et jouerait un rôle dans l'élimination de *P. aeruginosa* au niveau du poumon [Pier *et al.*, 1997].

Outre les glycolipides membranaires, d'autres composants comme le cholestérol et les esters du cholestérol peuvent aussi servir de récepteurs pour *P. aeruginosa* [Rostand *et al.*, 1993].

Cependant, de nombreuses expériences démontrent que la majorité des bactéries présentes dans les bronches de patients CF se trouvent plus dans le mucus qu'à la surface des cellules [Jeffery & Brain, 1988]. *P. aeruginosa* peut en effet se fixer sur les glycoprotéines sécrétées, et en particulier sur les mucines bronchiques [Sajjan *et al.*, 1992], par des interactions mettant en jeu des chaînes glycaniques de mucines et des adhésines, protéines de la membrane externe de la bactérie qui sont distinctes des pilis [Ramphal *et al.*, 1991b]. Devaraj *et al.* ont montré une affinité accrue de *P. aeruginosa* pour les mucines bronchiques de patients CF [1994]. Les mêmes constatations ont été faites concernant les mucines salivaires [Carnoy *et al.*, 1993]. Ces résultats suggèrent que les mucines bronchiques et salivaires de patients CF possèdent des modifications qualitatives et/ou quantitatives qui induisent une affinité accrue pour *P. aeruginosa*. Les modifications de glycosylation qui sont précisément responsables de la colonisation par cette bactérie sont encore mal connues.

Les squelettes des chaînes glycaniques de mucines sont formées d'une succession de disaccharides de type 1 (Gal(β 1-3)GlcNAc) ou de type 2 (Gal(β 1-4)GlcNAc), structures

2.2 Influence de la composition du milieu sur les protéines d'adhérence de *P. aeruginosa*

Le processus d'adhérence de *P. aeruginosa* aux mucines impliquerait, outre les pilis, des adhésines situées sur la membrane externe de la bactérie.

Plusieurs protéines de la membrane externe de *P. aeruginosa* capables de reconnaître les mucines bronchiques humaines ont été caractérisées [Carnoy *et al.*, 1994]. L'étude de l'influence de différents facteurs a montré que la quantité de fer dans le milieu, et non l'osmolarité, avait une influence sur l'expression de ces protéines capables de se lier aux mucines bronchiques [Scharfman *et al.*, 1996]. L'expression des adhésines de *P. aeruginosa* n'est donc certainement pas constitutive, et certaines d'entre elles pourraient être induites par le milieu très particulier que constitue le liquide péri-ciliaire anormal des patients CF.

II. Persistance de *P. aeruginosa*

La virulence de *P. aeruginosa* repose en partie sur la propriété qu'a cette bactérie de sécréter divers composés toxiques, enzymes de dégradation et toxines. La majorité de ces facteurs de virulence ne sont pas synthétisés de manière constitutive ; nombre d'entre eux sont produits en phase tardive de croissance, ou dans des conditions de carence. En effet, la bactérie doit sans cesse s'adapter à son environnement et déjouer les système de défense de l'hôte. Par exemple, les souches responsables des premières infections sont non-mucoïdes et produisent des quantités importantes d'exoenzymes, mais les souches isolées dans les infections chroniques produisent un mucoexopolysaccharide (ou alginate) responsable du phénotype mucoïde et produisent moins de facteurs de virulence.

Les facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* peuvent endommager directement la muqueuse respiratoire, mais engendrent également une forte réponse immunitaire de l'hôte qui contribue tout autant à la dégradation de la fonction respiratoire des patients CF.

Différents types de facteurs de virulence peuvent être distingués : les facteurs impliqués dans l'adhérence (détaillés précédemment ; **Figure 14**), ceux impliqués dans la multiplication et la persistance de la bactérie (les sidérophores ; l'alginate : mucoexopolysaccharide qui protège la bactérie contre l'action des cellules immunitaires, de la déshydratation et des antibiotiques ; le flagelle), et ceux impliqués dans les lésions tissulaires

directes (cytotoxine, hémolysines, phospholipases, protéases, toxines ADP-rybosylantes, lipase...).

D'autres anomalies peuvent contribuer à la persistance de *P. aeruginosa*, comme la phagocytose déficiente de cette bactérie par les macrophages [Berger *et al.*, 1989 ; Tosi *et al.*, 1990], la fragmentation des IgG [Fick *et al.*, 1984]. Les mucines bronchiques, site préférentiel de fixation de *P. aeruginosa* dans l'arbre trachéo-bronchique des patients CF, pourraient également protéger la bactérie de la phagocytose [Vishwanath *et al.*, 1988]. De plus, la réaction inflammatoire pourrait être exacerbée par un déséquilibre dans la balance oxydants/anti-oxydants [Witko-Sarsat *et al.*, 1996 ; Roum *et al.*, 1993], et la présence d'ADN bactérien [Schwartz *et al.*, 1997].

B - Travaux personnels

I. Étude de l'affinité de *P. aeruginosa* pour différents épitopes glycaniques dérivés de l'épitope Le^x, présents en périphérie des mucines bronchiques humaines, par une technique de cytométrie de flux.

P. aeruginosa joue un rôle important dans la colonisation des voies aériennes des patients CF. Il se lie aux chaînes glycaniques des mucines respiratoires ou salivaires et a une meilleure affinité pour les mucines bronchiques de patients CF que pour celles de patients non CF [Carnoy *et al.*, 1993 ; Devaraj *et al.*, 1994], ce qui suggère qu'il existerait des modifications quantitatives et/ou qualitatives dans la mucoviscidose qui créeraient de nouveaux sites glycaniques reconnus par *P. aeruginosa*.

L'observation d'une augmentation de la synthèse d'épitopes sialyl Le^x (i) au sein des mucines bronchiques de malades porteurs de *P. aeruginosa* (conséquence possible de la réponse inflammatoire) et (ii) en périphérie des mucines sécrétées par la lignée MM-39 stimulée par le TNF α , nous a incité à vérifier si l'abondance de ces épitopes particuliers n'était pas, en partie, responsable de la colonisation par *P. aeruginosa*.

Afin de déterminer le meilleur récepteur glycanique pour *P. aeruginosa*, nous avons développé une technique de cytométrie de flux en utilisant une série de néoglycoconjugués constitués de polyacrylates marqués à la fluorescéine et porteurs d'un seul épitope glycanique tel que le sialyl Le^x, Le^a, Le^y, Le^x, 3-sulfo Le^x, qui correspondent à des déterminants glycaniques pouvant exister en périphérie des mucines bronchiques humaines.

Nous avons étudié l'affinité de différentes souches de *P. aeruginosa* (la souche 1244-NP qui adhère aux mucines bronchiques et salivaires (fournie par le Dr Lory, Seattle, USA), et quatre souches provenant de patients CF) pour ces néoglycoconjugués.

Ces résultats sont publiés dans la revue *Glycobiology*, sous le titre : «*Pseudomonas aeruginosa* binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate determinants and predominantly to sialyl Le^x conjugates. (1999) *Glycobiology*, 9, 757-764».

***Pseudomonas aeruginosa* binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate determinants and predominantly to sialyl-Lewis x conjugates**

Andrée Scharfman, Sophie Degroote, Julie Beau, Geneviève Lamblin, Philippe Roussel² and Joël Mazurier¹

Unité INSERM no. 377 and Université de Lille 2, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France and ¹UMR CNRS no. 111, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received on July 14, 1998; revised on December 23, 1998; accepted on January 29, 1999

²To whom correspondence should be addressed at: Unité INSERM no. 377, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Pseudomonas aeruginosa plays an important role in the colonization of the airways of patients suffering from cystic fibrosis. It binds to the carbohydrate part of respiratory and salivary mucins and its binding to cystic fibrosis mucins is even higher, suggesting that qualitative or/and quantitative modifications of the carbohydrate chains may be involved in this process. In order to find out the best carbohydrate receptors for *P. aeruginosa*, a flow cytometry technique using a panel of polyacrylamide based glycoconjugates labeled with fluorescein was developed. The neoglycoconjugates contained neutral, sialylated or sulfated chains analogous to carbohydrate determinants found at the periphery of respiratory mucins (Le^a, Le^y, Le^x, sialyl- and 3'-sulfo-Le^x, and blood group A determinants). We used also neoglycoconjugates containing Gal(α1–2)Galβ and sialyl-N-acetylglucosamine determinants. The interaction of these glycoconjugates with the nonpilated strain of *P. aeruginosa*, 1244-NP, was saturable except for the glycoconjugates containing blood group A or sialyl-N-acetylglucosamine epitopes. The measure of K_d indicated that strain 1244-NP had a higher affinity for the glycoconjugate bearing the sialyl-Le^x determinant than for all the other glycoconjugates studied. The role of sialic acid was confirmed by competition assay using mainly sialylated mucin glycopeptides. In order to find out if this behavior was the same for pathological strains as for the 1244-NP mutant, four mucoid strains of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients were analyzed with the Le^x neoglycoconjugate, its sialylated and its sulfated derivatives. Individual variations in the binding of these strains to the three glycoconjugates were observed. However, three strains out of four had a higher affinity for the sialyl-Le^x than for the 3'-sulfo-Le^x derivative.

Key words: binding/mucin-carbohydrates/*Pseudomonas aeruginosa*/sialyl-Lewis x

Introduction

Adhesion of *P. aeruginosa*, an opportunistic pathogen, to respiratory mucins and/or to epithelial glycoconjugates has attracted much attention because of its role as the major airway colonizer

in immunocompromised hosts and patients with cystic fibrosis (Høiby, 1982).

Cystic fibrosis (CF), a general exocrinopathy, is the most common severe genetic disease among Caucasians. In its most typical form, the severity of the disease is due to mucus hypersecretion and to chronic lung infection characterized by the predominance of three bacteria, *Hemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in early life, and thereafter *P. aeruginosa*, often in a mucoid form, a pathogen which is responsible for most of the morbidity and mortality of the disease. CF is caused by mutations in the gene encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a chloride channel of low conductance activated by protein-kinase A (Riordan, 1993) which has probably other functions (Barasch *et al.*, 1991; Stutts *et al.*, 1995; Devidas and Guggino, 1997; Pasyk and Foskett, 1997). The relation between the CFTR defect and the specificity of airways infection by *P. aeruginosa* is not yet elucidated.

The binding of *P. aeruginosa* to the human airway mucosa may involve several host receptors and bacterial adhesins. Pili present on the surface of *P. aeruginosa* recognize the sequence GalNAc(β1,4)Gal of asialo-GM1 and -GM2 receptors and may contribute to the binding of bacteria to epithelial cells (Lee *et al.*, 1994), especially in a regenerating respiratory epithelium following damage (De Bentzman *et al.*, 1996).

However, human airway mucins, a population of heavily glycosylated glycoproteins synthesized by goblet cells and bronchial glands of the human airway mucosa, are part of the mucociliary escalator which normally removes inhaled particles or microorganisms. Their very diverse carbohydrate chains act as recognition sites for bacteria or viruses. Indeed, several reports have demonstrated that various strains of *P. aeruginosa* adhere to mucins (Vishwanath and Ramphal, 1984; Ramphal *et al.*, 1989; Sajjan *et al.*, 1992; Carnoy *et al.*, 1993; Devaraj *et al.*, 1994) and that the adhesion process involves several adhesins localized on the outer membrane of *P. aeruginosa* (Carnoy *et al.*, 1994). More recently, the role of flagella in the binding of the bacteria to mucins (Ramphal *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 1998) and to cell surface glycolipids (Feldman *et al.*, 1998) has been emphasized and the flagellar cap protein, Fli D, has been shown to be responsible for the adhesion of another nonpilated strain of *P. aeruginosa*, PAK-NP, to human bronchial mucins (Arora *et al.*, 1998).

In the airways of CF patients suffering from cystic fibrosis colonized by *P. aeruginosa*, most bacteria are embedded in the airway mucus and their interactions with respiratory mucins probably represent a major step in the development of the colonization process. Bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis (Roussel *et al.*, 1975; Boat *et al.*, 1976; Lamblin *et al.*, 1977; Chace *et al.*, 1985), by CF cells (Frates *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1989) or by xenograft models of CF cells (Zhang *et al.*, 1995) are oversulfated, and it has been suggested that the ΔF508 deletion, the most frequent mutation in CF, leads to a misfolding of CFTR which is retained in the

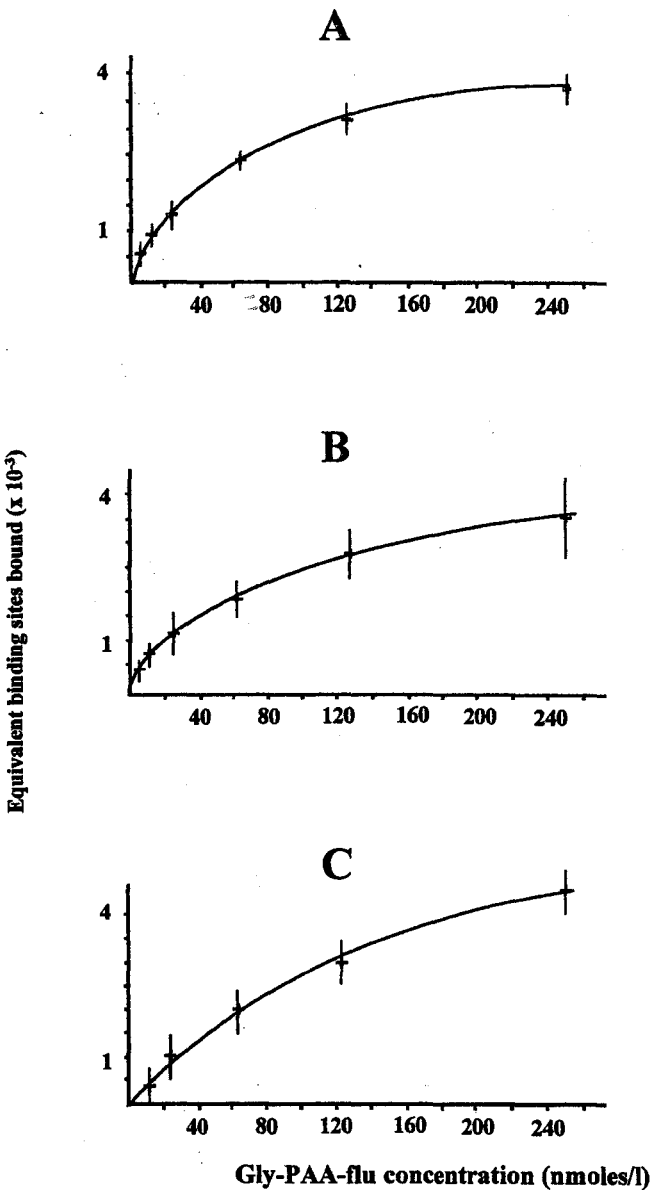


Fig. 1. Influence of the concentration of fluorescent glycoconjugate on the binding to *P.aeruginosa* 1244-NP. Bacterial suspension was incubated with increasing concentrations (from 6.25 to 250 nM) of Le^x-PAA-flu (A), sialyl-Le^x (B) and sialyl-N-acetylactosamine- (C) epitopes. After 30 min in the dark, a flow cytometry analysis was performed.

endoplasmic reticulum and degraded (Pind *et al.*, 1994). Barasch *et al.* (1991) have suggested that this mislocation might affect the pH of the *trans*-Golgi network and modify the activity of various glycosyl- and sulfo-transferases. However, these data are controversial and it has been recently suggested that the concentration of PAPS in the Golgi lumen, the sulfate donor, is directly regulated by CFTR, which therefore may influence the sulfation processes (Pasky and Foskett, 1997).

Previous reports have demonstrated an increased affinity of *P.aeruginosa* for respiratory (Devaraj *et al.*, 1994) and salivary CF mucins (Carnoy *et al.*, 1993), suggesting that the qualitative or/and quantitative modifications of the mucin carbohydrate chains may be involved in this process. Using different approaches, several neutral carbohydrate determinants have been

shown to be potential receptors for different strains of *P.aeruginosa* (Ramphal *et al.*, 1991a; Rosenstein *et al.*, 1992). However, recent data indicate that, in addition to oversulfation, airway mucins from patients severely infected by *P.aeruginosa* may undergo increased sialylation as well as increased expression of sialyl-Le^x epitopes (Davril *et al.*, 1999).

In an attempt to find out the better carbohydrate receptors for *P.aeruginosa*, we have developed a flow cytometry technique using a panel of neoglycoconjugates and different strains of *P.aeruginosa*, (1) strain 1244-NP which is known to adhere to respiratory and salivary mucins carbohydrate chains (Ramphal *et al.*, 1991b; Carnoy *et al.*, 1993, 1994) and (2) four strains isolated from CF patients. The neoglycoconjugates contained neutral, sialylated or sulfated carbohydrate chains mostly analogous to carbohydrate determinants commonly found at the periphery of human respiratory mucins (Roussel and Lamblin, 1996), multivalently bound to a polyacrylamide carrier labeled with fluorescein (Bovin *et al.*, 1993; Veerman *et al.*, 1997). In most strains, the sialyl-Le^x determinant was found to be a better receptor than its 3' sulfated analog.

Results

Comparative binding of the different Gly-PAA-flu derivatives to *P.aeruginosa* 1244-NP

The different fluorescent neoglycoconjugates (Gly-PAA-flu) used to evaluate the binding to the non-mucoid and nonpiliated strain 1244-NP are listed in Table I. The binding of these neoglycoconjugates to *Pseudomonas* strains was analyzed by flow cytometry and was shown to be time dependent, reaching a plateau at 30 min (data not shown). This period was retained for subsequent experiments. The binding of the fluorescent derivatives containing Le^a, Le^y, Le^x, sialyl-Le^x, 3'-sulfo-Le^x or Gal(α1-2)Galβ was dose dependent and was saturable at a concentration varying from 62.5 nM up to 250 nM as was shown for Le^x and sialyl-Le^x in Figure 1A,B. In contrast, the binding to neoglycoconjugates containing the sialyl-N-acetylactosamine and blood group A Gly-PAA-flu determinants was not saturable at concentrations up to 250 nM (Figure 1C). In the range of concentration used in the study (6.25–250 nM) the different fluorescent conjugates did not aggregate bacteria as shown by the dot plot analysis of forward scatter versus side scatter (data not shown).

Table I. Synthetic neoglycoconjugates used in the study

Carbohydrate	Neoglycoconjugate
Le ^a	Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAcβ-PAA-flu
Le ^y	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAcβ-PAA-flu
Le ^x	Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAcβ-PAA-flu
Blood group A determinant	GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Galβ-PAA-flu
Gal(α1-2)Galβ	Gal(α1-2)Galβ-PAA-flu
Sialyl-Le ^x	Neu5Ac(α2-3)Galβ1-4[Fuc(α1-3)]GlcNAcβ-PAA-flu
3'-Sulfo-Le ^x	HSO ₃ -3Galβ1-4[Fuc(α1-3)]GlcNAcβ-PAA-flu
Sialyl-N-acetylactosamine	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAcβ-PAA-flu

PAA-flu, Polyacrylamide carrier labeled with fluorescein.

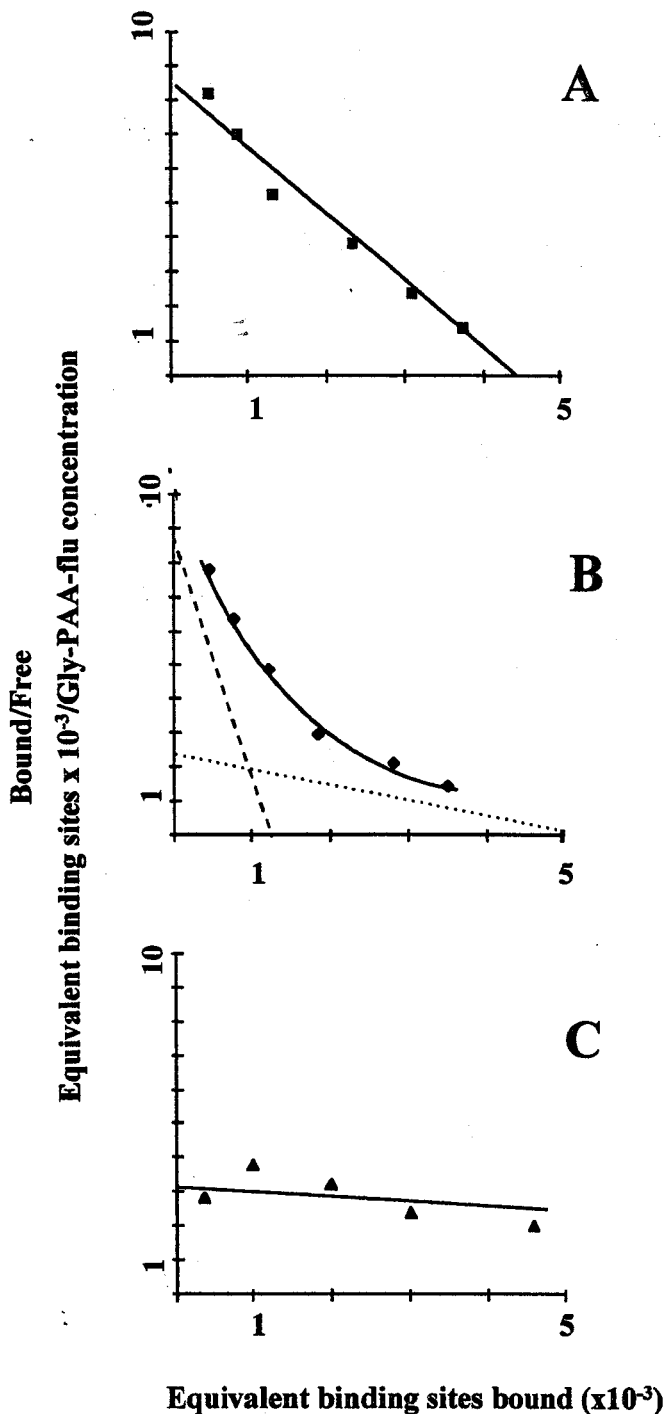


Fig. 2. Scatchard analysis of the binding of Le^x (A), sialyl- Le^x (B) and sialyl-N-acetyllactosamine (C) fluorescent derivatives to *Paeruginosa* 1244-NP. After incubation of bacteria with increasing concentrations of the fluorescent glycoconjugates, flow cytometry analysis was performed.

Scatchard analysis of the data (Figure 2, Table II) showed that there were differences in the binding of the different fluorescent derivatives to *Paeruginosa* 1244-NP. The binding of derivatives containing Le^a , Le^y , Le^x , 3'-sulfo- Le^x or $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ epitopes was monophasic, suggesting that there was only one single class of receptors (Figure 2A); the dissociation constant (K_d) ranged from 87 nM for $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ to ~50 nM for the other derivatives (Table II). The number of binding sites varied from

1569 ± 199 for the Le^y -fluorescent derivative to 4500 ± 262 for the sulfo- Le^x derivative. In contrast, the binding of *Paeruginosa* 1244-NP to sialyl- Le^x -PAA-flu was biphasic (Figure 2B) suggesting that there were two classes of binding sites for this determinant, one with high affinity ($K_d = 12 \text{ nM} \pm 4.2$, number of binding sites = 1106 ± 345) and another one with low affinity (data not shown). The data obtained for the binding of blood group A and sialyl-N-acetyllactosamine fluorescent derivatives demonstrated that the binding of these two derivatives was non specific as shown for sialyl-N-acetyllactosamine in Figure 2C.

Table II. Comparative binding of the different Gly-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP

Carbohydrate epitope	Number of binding sites	Dissociation constant (K_d nM)
Sialyl- Le^x ^a	1106 ± 345	12 ± 4.2^d
Sulfo- Le^x ^a	4500 ± 262	49 ± 11
Le^x ^a	4264 ± 159	60 ± 5.3
Le^a ^a	2236 ± 273	51 ± 13
Le^y ^b	1569 ± 199	50 ± 12
$\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ ^c	3600 ± 332	87 ± 23

Results are expressed as mean $\pm$ SD.

^aNumber of data point fitted for Scatchard analysis = 36.

^bNumber of data point fitted in Scatchard analysis = 18.

^cNumber of data point fitted in Scatchard analysis = 12.

^dSignificantly different when compared to K_d obtained with the other Gly-PAA-flu ($p < 0.001$).

Altogether the values obtained for K_d and number of binding sites showed that the affinity of fluorescent derivatives containing Le^a , Le^y , Le^x , 3'-sulfo- Le^x or $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ epitopes for *Paeruginosa* 1244-NP was in the same order of magnitude. The value of K_d obtained for the sialyl- Le^x derivative indicated that *Paeruginosa* 1244-NP had an higher affinity for this neoglycoconjugate than for all the other glycoconjugates studied so far ($p < 0.001$).

Specificity of the binding of the Gly-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP

To check the specificity of the interaction between fluorescent derivatives and *Paeruginosa* 1244-NP, competition binding assays were performed for three of them, Le^x -, $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ -, and sialyl- Le^x -PAA-flu.

Incubation of Le^x -PAA-flu and bacteria in presence of 100-fold molar excess of the corresponding unlabeled Le^x derivative, resulted in a decrease of the logarithm of fluorescence intensity, when compared to control as shown in Figure 3 (4250 equivalent bound particles but 8250 in the absence of unlabeled Le^x polyacrylate derivative). Reduction of intensity of fluorescence was evidenced by the Kolmogorov-Smirnov two-sample test. On the contrary, the fluorescence intensity of the Le^x -PAA-flu did not change when incubation was performed in presence of unlabeled $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ polyacrylate derivative. Moreover, K_d value obtained for the binding of Le^x -PAA-flu was not modified ($p > 0.05$) when incubation was performed in presence of unlabeled $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ derivative.

Competitive binding between $\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$ -PAA-flu and the corresponding unlabeled polyacrylate derivative resulted in a decrease of the fluorescence intensity (5400 equivalent bound particles but 8150 in absence of unlabeled derivative). Reduction of intensity was evidenced by the Kolmogorov-Smirnov two-

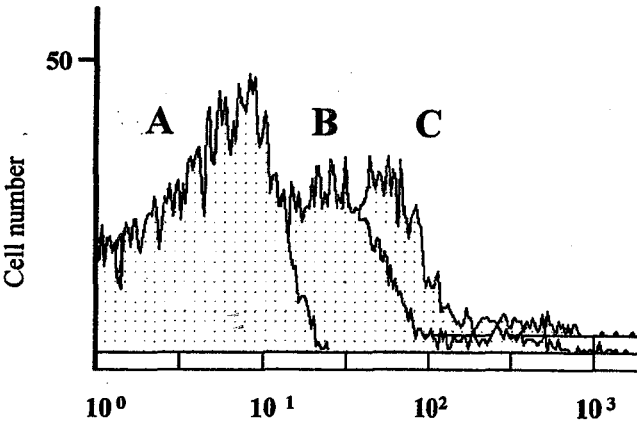


Fig. 3. Specificity of the binding of Le^x-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP. Bacterial suspension was incubated with PBS alone (A), with a 62.5 nM solution of Le^x-PAA-flu in presence (B) or in absence (C) of a 100 molar excess of unlabeled Le^x polyacrylate derivative. After 30 min in the dark, flow cytometry analysis was performed. Representative histograms: x-axis, log of the fluorescence intensity; y-axis number of fluorescent cells.

sample test. Fluorescence intensity was not changed when incubation with Gal(α1-2)Galβ-PAA-flu was performed in presence of unlabeled Le^x polyacrylate derivative.

Competition binding assays were also performed with sialyl-Le^x-PAA-flu and unlabeled glycoconjugates bearing either sialyl-Le^x, Le^x or Gal(α1-2)Galβ epitopes. The presence of an excess of unlabeled sialyl-Le^x derivative in the incubation mixture led to an aggregation of the bacteria as visualized by an increase of the forward scatter (data not shown). The addition of Le^x- and Gal(α1-2)Galβ-PAA to incubation mixtures did not modify the binding of sialyl-Le^x-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP. In addition, K_d value obtained for the binding of sialyl-Le^x was not changed in presence of an excess of the unlabeled Gal(α1-2)Galβ derivative (p > 0.05), confirming the absence of cross-binding of these two derivatives to *Paeruginosa*. Additional experiments also demonstrated that the K_d values of the binding of sialyl-Le^x-PAA-flu was not modified by addition of free stachyose in the incubation mixture. Altogether, these results demonstrated that there was no cross-reactivity between Le^x, Gal(α1-2)Galβ epitopes and sialyl-Le^x-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP.

Competitive binding of Gly-PAA-flu and airways mucins glycopeptides to *Paeruginosa* 1244-NP

Binding assays were also performed in presence of an excess of different airway mucin glycopeptides, neutral, mainly sialylated, or mainly sulfated glycopeptides (Ramphal et al., 1989). As demonstrated by the number of equivalent bound particles, the binding of Gly-PAA containing Le^x, sialyl-Le^x or 3'-sulfo-Le^x to *Paeruginosa* was partly inhibited by mucin glycopeptides (Table III). The binding of Le^x-PAA-flu was equally inhibited by the three classes of glycopeptides, while the binding of 3'-sulfo-Le^x-PAA-flu was better inhibited by mainly sulfated glycopeptides and the binding of sialyl-Le^x-PAA-flu better inhibited by mainly sialylated glycopeptides (Table III). Inhibition experiments were also performed using purified airway mucins from CF and non-CF patients showing that the binding to the sialyl-Le^x derivatives was better inhibited by CF mucins (23% of inhibition) than by non-CF mucins (7%).

Table III. Inhibition of binding of Le^x, sialyl-Le^x, 3'-sulfo-Le^x-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP after competition with airway mucin glycopeptides

Gly-PAA-flu	% of inhibition by glycopeptides ^a		
	Neutral	Mainly sialylated	Mainly sulfated
Le ^x	17	15	11
Sialyl-Le ^x	20	35	13
3'-Sulfo-Le ^x	10	15	25

^aThe percentage of inhibition was calculated from the mean values of fluorescence intensity obtained after incubation with or without mucin glycopeptides.

Binding of Le^x, sialyl-, and 3'-sulfo Le^x-PAA-flu derivatives to clinical strains of *Paeruginosa*

In order to determine whether pathological strains recognize also preferentially sialyl-Le^x determinants, the binding of Le^x, sialyl-Le^x, or 3'-sulfo-Le^x-PAA-flu to four mucoid strains isolated from CF patients was compared by using flow cytometry and Scatchard analysis. All these neoglycoconjugates bound to the four pathological strains. However, there were individual variations in the binding (Table IV). Strain 6118 bound equally to the three derivatives. In contrast, the three other strains (690, 6190, and 130308) bound better to the sialyl-Le^x derivative than to the 3'-sulfo-Le^x derivative. For two of these strains (690 and 6190), there was no significant differences between their binding to the Le^x and to the sialyl-Le^x derivatives.

Table IV. Binding of Le^x, sialyl-Le^x and 3'-sulfo-Le^x-neoglycoconjugates to four strains of *Paeruginosa* isolated from CF patients

Mucoid strains	K _d			p		
	LPF	Sialyl-LPF	3'Sulfo-LPF	LPF vs sialyl-LPF	LPF vs 3'sulfo-LPF	Sialyl-LPF vs sulfo-LPF
690 ^a	80 ± 22	46 ± 6	88 ± 7	N.S.	N.S.	< 0.005
6118 ^b	70 ± 13	43 ± 34	98 ± 46	N.S.	N.S.	N.S.
6190 ^b	36 ± 14	27 ± 3	93 ± 18	N.S.	< 0.05	< 0.05
130,308 ^b	100 ± 25	43 ± 6	129 ± 23	< 0.05	N.S.	< 0.0125

LPF, Le^x-PAA-flu; N.S., not significantly.
^aNumber of data fitted in Scatchard analysis = 26.
^bNumber of data fitted in Scatchard analysis = 16.

Discussion

The aim of the present work was to set up a flow cytometry assay using polyacrylamide-based glycoconjugates labeled with fluorescein (Gly-PAA-flu) (Bovin *et al.*, 1993), in order to compare the binding of *Paeruginosa* to a panel of conjugates containing carbohydrate determinants analogous to the peripheral part of many carbohydrate chains present in human airway mucins (Roussel and Lamblin, 1996). Several proteins of the outer membrane or the flagella of *Paeruginosa* have already been shown to be recognized by various human mucins (Carnoy *et al.*, 1994; Ramphal *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 1998), and several carbohydrate determinants have been identified as possible sites of attachment of this bacteria. In contrast to previous techniques used to identify carbohydrate receptors recognized by *Paeruginosa*, such as chromatography of glyco- or neoglycolipids followed by bacteria overlay (Ramphal *et al.*, 1991a; Rosenstein *et al.*, 1992), flow cytometry allows the interactions bacterial/receptors to occur in a liquid phase. With this technique, using polyacrylamide based glycoconjugates labeled with fluorescein, carbohydrate receptors of *Paeruginosa* surface lectins can be identified. The type of binding of the different glycoconjugates (Table I) to *Paeruginosa* 1244-NP was not identical and was dependent on the carbohydrate epitope. The binding of blood group A and sialyl-*N*-acetylactosamine fluorescent glycoconjugates was not saturable. It was saturable and monophasic for polyacrylate derivatives bearing Le^a, Le^y, Le^x, 3-sulfo-Le^x and Gal(α1-2)Galβ epitopes while there was two binding sites, for the polyacrylate derivative containing the sialyl-Le^x epitope, one of them with high affinity.

To assess the specificity of the binding, different competition experiments were performed using three different fluorescent conjugates. Competition experiments demonstrated that stachyose which does not exist in respiratory mucins was not recognized by *Paeruginosa* 1244-NP. The binding of Le^x and Gal(α1-2)Galβ-PAA-flu to *Paeruginosa* 1244-NP showed a decrease of 50% in the presence of an excess of the corresponding unlabeled polyacrylate derivative. However, it was not possible to obtain a total inhibition: this may be due to a nonspecific fixation of the fluorescent groups on the bacteria (Babiuk and Paul, 1970; Chatelier *et al.*, 1995). Similarly, competing molecules, such as mucin glycopeptides, are not able to inhibit more than 50% of the binding of the fluorescent glycoconjugates. Incubation of sialyl-Le^x with an excess of the unlabeled derivative led to an aggregation of the bacterial population; Komiyama and associates (Komiyama *et al.*, 1987) have suggested a role of sialic acid in the aggregation of *Paeruginosa* by saliva.

In the present study, Le^a, Le^x, and Le^y determinants were identified as receptors for *Paeruginosa* 1244-NP and the K_d values of the binding of these three neoglycoconjugates were not significantly different. On another hand, the binding of this bacteria to the blood group A and to the sialyl-*N*-acetylactosamine neoglycoconjugates was found to be not saturable, attesting a nonspecific binding of these two neoglycoconjugates to *Paeruginosa* 1244-NP which again may be due to the fluorescent groups.

Since *Paeruginosa* synthesizes an internal lectin, PA-IL, which binds to D-galactose in α or β anomeric configuration (Chen *et al.*, 1998) and since its best ligands have a terminal Galα, we also assayed the Gal(α1,2)Galβ-PAA-flu, although human mucins are not supposed to contain terminal Galα, except in mucins with blood group B and mucins which contain a few Gal(α1,3)GalNAc chains (van Halbeek *et al.*, 1994). The binding of *Paeruginosa* to this determinant was in the same order of

magnitude as the binding to Le^x or Le^a determinants which have a terminal Galβ. Competition experiments revealed the absence of cross-binding between fluorescent polyacrylate derivatives carrying Le^x and Gal(α1-2)Galβ derivatives, suggesting that these two epitopes are recognized by different lectins. Glick and Garber (1983) have reported that, even if most PA-IL is internal, small quantities of the lectin may exist on the outer membranes and therefore may be involved in the recognition of the Gal(α1-2)Galβ epitope. Since the pattern of the outer membrane proteins that act as bacterial adhesins for airway mucins varies from one strain of *Paeruginosa* to the other (Carnoy *et al.*, 1994), it will be necessary, in the future, to determine the different surface adhesins involved in the recognition of the different neutral carbohydrate chains.

Neoglycoconjugates containing acidic determinants, sialyl-Le^x or 3'-sulfo-Le^x, were also recognized by *Paeruginosa* 1244-NP. The present study indicates that these neoglycoconjugates were much better receptors than the neoglycoconjugate containing sialyl-*N*-acetylactosamine. As far as the binding of the sialyl-Le^x derivative is concerned, strain 1244-NP had a better affinity for this derivative than for all the other glycoconjugates studied. The dissociation constant obtained for the binding of 1244-NP to 3'-sulfo-Le^x containing glycoconjugates suggested that the preferential affinity of 1244-NP strain for the sialyl-Le^x epitope was not due to the substitution of Le^x by any acidic residue but indeed by the presence of sialic acid residue. The role of sialic acid was confirmed by competition binding assays showing that the binding of *Paeruginosa* to the sialyl-Le^x epitope was better inhibited by mainly sialylated mucin glycopeptides than by neutral or mainly sulfated glycopeptides, and also better by CF mucins than by non-CF mucins. CF mucins indeed contain more sialic acid than non-CF mucins (Davril *et al.*, 1999). Competitive experiments demonstrated the absence of cross binding between sialyl-Le^x-PAA-flu and polyacrylate bearing neutral epitopes such as Le^x and Gal(α1-2)Galβ, suggesting that the receptor for sialyl-Le^x glycoconjugate had a restricted specificity. Therefore, for most strains analyzed in the present study, the sialyl-Le^x polyacrylate derivative is a major receptor.

The role of sialic acid in the binding of *Paeruginosa* has already been suggested by several reports (Baker *et al.*, 1990; Ramphal *et al.*, 1991a). Moreover, desialylation of human salivary mucin glycopeptides has also been shown to reduce their binding to the pilated strain 1244-NP (Carnoy *et al.*, 1993).

Finally, the preferential inhibition of the binding of strain 1244-NP to the sialyl-Le^x or the sulfated Le^x-neoglycoconjugates by the corresponding sialylated or sulfated mucin glycopeptides is in favor of at least two adhesins having different affinities to these two neoglycoconjugates.

There are differences in the binding of *Paeruginosa* PAK and 1244 strains, as well as their nonpilated derivatives, to different glycoconjugates and in the pattern of outer membrane proteins recognized by airway mucins (Ramphal *et al.*, 1991b; Carnoy *et al.*, 1994). In order to find out whether the behavior of *Paeruginosa* is the same for pathological strains as for the 1244-NP strain, four mucoid strains isolated from CF patients were also analyzed with the Le^x neoglycoconjugate and its sulfated and sialylated derivatives. Three strains out of four bound better to the sialyl-Le^x than to the 3'-sulfo-Le^x derivatives. It should be noticed that the results obtained with these clinical isolates showed some variations in the binding to the three neoglycoconjugates from one experiment to another, as indicated by standard deviations. A similar problem has been encountered by Devaraj *et al.* in studying the binding of *Paeruginosa* to CF and non-CF

mucins (Devaraj *et al.*, 1994). Moreover, Govan *et al.* have pointed out the instability of mucoid strains during *in vitro* cultures leading to reversion of the mucoid to nonmucoid forms (Govan *et al.*, 1979).

These findings concerning sialylated or sulfated neoglycoconjugates are of special interest when considering the abnormalities of salivary and respiratory mucins secreted by CF patients. CF salivary mucins have been found to be more sulfated and more sialylated than mucins from controls (Carnoy *et al.*, 1993) and, moreover, they are better recognized by various strains of *P.aeruginosa*. An overexpression of sialyl-Le^x determinants has been observed in various inflammatory conditions, for instance among the acute phase glycoproteins synthesized in the liver under cytokine stimulation (Van Dijk *et al.*, 1998). Recently, we have observed an increased sialylation and an increased expression of sialyl-Le^x epitopes in the airway mucins from patients suffering from CF, in addition to increased sulfation (Davril *et al.*, 1999). This increased sialylation was not specific for cystic fibrosis since it was also observed in the airway mucins secreted by severely infected patients suffering from chronic bronchitis. This observation may suggest that overexpression of sialyl-Le^x determinants on glycoproteins synthesized by the airway mucosa may be viewed as the signature of local inflammation, in the same way as acute phase proteins synthesized by the liver which contain more sialyl-Le^x epitopes during inflammation (Van Dijk *et al.*, 1998). Several reports currently suggest that, in CF airways, the inflammatory response to aggression is abnormal (Birrer *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1995; Bonfield *et al.*, 1997) and that inflammation might pave the way to the initial lung colonization by *P.aeruginosa* (Heeckeren *et al.*, 1997). Therefore, the attachment of *P.aeruginosa* to the sialyl-Le^x epitope may be especially important in the development of lung infection in CF.

In conclusion, *P.aeruginosa* recognizes a whole set of neutral and acidic carbohydrate determinants, and especially the sialyl-Le^x epitope. In the future, it will be important to find out (1) how many bacterial adhesins from *P.aeruginosa* may be involved in the airway colonization of CF patients, (2) which one is specific for the sialyl-Le^x epitope, and (3) whether it is expressed in all strains colonizing CF patients.

Material and methods

Bacteria strains and culture conditions

Strain 1244-NP (provided by S.Lory from University of Washington) is an isogenic nonpilated, nonmucoid strain (Ramphal *et al.*, 1991b) which has already been shown to adhere to mucin carbohydrate chains (Carnoy *et al.*, 1993) and to neoglycolipids (Ramphal *et al.*, 1991a). Other strains were isolated from CF patients as mucoid isolates. All strains were grown in tryptic soy broth (TSB medium, Difco, Detroit) for 18 h at 37°C. After centrifugation of the cultures at 4000 × *g* for 30 min, the cell pellets were washed twice by a filtered physiologic saline containing 5% (v/v) TSB and then resuspended in the same solution. Optical density measurements were used to obtain a bacterial suspension of ~10⁷ CFU/ml. The exact number of bacteria was determined by dilution and plating of the suspension.

Preparation of human respiratory mucins and mucins glycopeptides

High molecular weight mucins were prepared from sputum of patients (blood group O) suffering either from chronic bronchitis

or from CF, by two steps of cesium bromide density-gradient ultracentrifugation as already described (Houdret *et al.*, 1986). Mucins obtained after the first step of ultracentrifugation were treated by a cocktail of enzymes (Lo Guidice *et al.*, 1994) to get rid of nucleic acids and proteoglycans, often associated with mucins of patients suffering from cystic fibrosis (Rahmoune *et al.*, 1991), and then submitted to the second step of ultracentrifugation.

Glycopeptides were obtained by pronase digestion of mucins followed by fractionation by ion exchange chromatography allowing to obtain neutral, mainly sialylated and mainly sulfated glycopeptides (Ramphal *et al.*, 1989).

Binding assay

Analysis of the binding of the different glycoconjugates to *P.aeruginosa* was performed by flow cytometry using fluorescent polymeric neoglycoconjugates obtained from Syntesome (Munich, Germany) (Bovin *et al.*, 1993). In these compounds (Gly-PAA-flu), a fluorescent-labeled polyacrylamide matrix is *N*-substituted every fifth amide group by a carbohydrate determinant on a spacer arm (-(CH₂)₃-). The carbohydrate/fluorescein molar ratio is 20:1. Unsubstituted sides group of the polymer were converted into -CONHCH₂CH₂OH. The different Gly-PAA-flu used in the present study are listed in Table I.

Bacteria cells were resuspended at a concentration of 2 × 10⁶ CFU/ml in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA), and 0.5 ml aliquots were incubated for 30 min in the dark with increasing amounts of the different Gly-PAA-flu (6.25–250 nM). Controls were obtained by omitting glycoconjugates in the incubation mixture (Figure 3A). The mixtures were analyzed on a FACScan cytofluorimeter (Becton-Dickinson) using FACScan and LYSIS software for acquisition and analysis respectively. The light scatters channels were set on a linear gain scale, the flow rate was kept at approximately 200 events per second and 5000 events were collected. Acquisition was done on gated populations (by forward and side scatters) to exclude cell debris and cell aggregates. The green fluorescence was set on a logarithmic scale and the mean value of logarithm of fluorescence was converted in equivalent bound particles using calibrated beads to which a known number of fluorescent particles has been covalently bound (Immuno-Britt, Coulter Counter). Results were expressed as equivalent bound particles after deduction of the value of control. Experimental data were expressed as mean value ± standard variations. Binding capacity and dissociation constants were calculated according to Scatchard using the nonlinear progression data analysis program Enzfitter (Cambridge, UK). For statistical analysis, the Student's test was used. To determine *t*, the following equation was used, $t = [kd1(1) - kd1(2)] / [\sqrt{SE(1)^2 + SE(2)^2}]$ for (*n*₁ + *n*₂ - 4) degrees of freedom, where *kd*1(1) and *kd*1(2) are fitted values for the parameters for data sets 1 and 2, SE(1) and SE(2) are the standard errors for the fitted values, and *n*₁ and *n*₂ are the numbers of datum points in data sets 1 and 2.

Inhibition experiments

Competition assays were performed for the binding of fluorescent glycoconjugates bearing Le^x, Gal(α1-2)Galβ and sialyl-Le^x epitopes. The bacterial suspension was incubated with a 62.5 nM solution of each of the fluorescent glycoconjugates in presence of a 100 molar fold excess of unlabeled polyacrylate derivatives. Bacteria incubated under the same experimental conditions, without any potential inhibitors, are used as controls. After flow

cytometry analysis, the value of mean of fluorescence intensity (expressed as equivalent bound particles) were compared. The Kolmogorov-Smirnov two-sample test was used to calculate the probability that two histograms were different.

Incubation with Le^x-PAA-flu was performed in presence or in absence of unlabeled polyacrylate derivatives bearing Le^x or Gal(α1-2)Galβ epitopes. The same experiments were performed with Gal(α1-2)Galβ-PAA-flu, using in this case, unlabeled conjugates with Le^x or Gal(α1-2)Galβ epitopes.

Competition experiments of the binding of sialyl Le^x-PAA-flu were performed in presence of the corresponding unlabeled polyacrylate derivative and of unlabeled polyacrylate derivatives bearing Le^x or Gal(α1-2)Galβ epitopes.

In some experiments increasing concentration of Le^x or sialyl-Le^x (6.25 to 250 nM) were incubated with bacterial suspension in presence of an 40 molar excess of unlabeled Gal(α1-2)Galβ polyacrylate derivative and of free stachyose. After flow cytometry analysis, binding capacities and dissociation constants were calculated as described above.

Competition binding of Gly-PAA-flu and mucins glycopeptides to *P.aeruginosa* 1244-NP

Assays were performed in the presence of a 100-fold excess of mucin glycopeptides (neutral, mainly sialylated or mainly sulfated).

The bacterial suspension (0.5 ml) was incubated with a 62.5 nM solution of Gly-PAA-flu in presence or absence of mucin glycopeptides (100 µg/ml). After flow cytometry analysis, the percentage of inhibition was calculated from the mean values of fluorescence intensity (expressed as equivalent bound particles), obtained after incubation with or without mucin glycopeptides. In some experiments, incubation of sialyl-Le^x-Gly-PAA-flu with *P.aeruginosa* was performed in presence of CF or non-CF high molecular weight mucins (50 µg/ml).

Analytical procedure

Sugar analysis was carried out by gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of methyl-glycosides (Lamblin *et al.*, 1984). N-acetylneuraminic acid was measured by the thiobarbituric acid assay of Aminoff (1961) after hydrolysis with 0.1 M H₂SO₄ for 30 min at 80°C. Sulfate content was determined by HPAEC after hydrolysis with 1 M HCl as described previously (Lo-Guidice *et al.*, 1994).

Acknowledgments

We thank Claude Galabert (Hopital Renée Sabran, Giens 83400 Hyères, France) and Christelle Neut (Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Lille, France) for providing us with strains from CF patients. This investigation was supported by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose and the Réseau Régional d'Études des Interactions Hôtes-Micro-organismes (Centre Hospitalier et Université de Lille-France).

Abbreviations

CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; asialo-GM1, gangliotetraosyl ceramide; asialo GM2, gangliotriaosyl ceramide; PAPS, adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate; NP, nonpilated; Gly-PAA-flu, polyacrylamide-based glycoconjugates labeled with fluorescein; Le, Lewis; Kd, dissociation constant; PA-IL, *Pseudomonas aeruginosa* (PA-I)

lectin; TSB, tryptic soy broth; CFU, colony forming unit; Gal, galactose; Fuc, fucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid.

References

- Aminoff, D. (1961) Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-392.
- Arora, S.K., Richtings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. and Ramphal, R. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, Flid, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.*, **66**, 1000-1007.
- Babiuk, L.A. and Paul, E.A. (1970) The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 57-62.
- Baker, N., Hansson, G.C., Leffler, H., Riise, G. and Svanborg-Eden, C. (1990) Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **58**, 2361-2366.
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D. and al-Awqati, Q. (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, **352**, 70-73.
- Birrer, P., McElvaney, N.G., Rudeberg, A., Sommer, C.W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R. and Crystal, R.G. (1994) Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, 207-213.
- Boat, T.F., Cheng, P.W., Iyer, R., Carlson, D.M. and Polony, I. (1976) Human tract secretions: mucous glycoproteins of nonpurulent tracheobronchial secretions and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 95-104.
- Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., Ghnaim, H. and Berger, M. (1997) Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **152**, 2111-2118.
- Bovin, N.V., Korchagina, E.Y., Zemlyanukhina, T.V., Byramova, N.E., Galani, O.E., Zemlyakow, A.E., Ivanov, A.E., Zubov, V.P. and Mochalova, L.V. (1993) Synthesis of polymeric neoglycoconjugates based on N-substituted polyacrylamides. *Glycoconjugate J.*, **10**, 142-151.
- Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J.M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G. and Roussel, P. (1993) Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **9**, 323-334.
- Carnoy, C., Scharfman, A., Van Brussel, E., Ramphal, R., Lamblin, G. and Roussel, P. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human mucus glycoproteins. *Infect. Immun.*, **62**, 1896-1900.
- Chace, K.V., Flux, M. and Sachdev, G.P. (1985) Comparison of physicochemical properties of purified mucus glycoproteins isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis and asthmatic patients. *Biochemistry*, **24**, 7334-7341.
- Chatelier, R.C., Gengenbach, T.R., Vasic, Z.R. and Griesser, H.J. (1995) Covalent attachment and non specific binding of reactive probe molecules onto surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **7**, 601-622.
- Chen, C.P., Song, S.C., Gilboa-Garber, N., Chang, K.S.S. and Wu, A.M. (1998) Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycobiology*, **8**, 7-16.
- Cheng, P.W., Boat, T.F., Cranfill, K., Yankaskas, J.R. and Boucher, R.C. (1989) Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **82**, 68-79.
- Davril, M., Degroote, S., Humbert, P., Galabert, C., Dumur, V., Lafitte, J.-J., Lamblin, G. and Roussel, P. (1999) The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. *Glycobiology*, **9**, 311-321.
- De Bentzmann, S., Roger, P. and Puchelle, E. (1996) *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.*, **9**, 2145-2150.
- Devaraj, N., Sheykhanazari, M., Warren, W.S. and Bhavanandan, V.P. (1994) Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology*, **4**, 307-316.
- Devidas, S. and Guggino, W.B. (1997) CFTR: domains, structure and function. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**, 443-451.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffer, L., Brunnett, S., Tang, H. and Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.*, **66**, 43-51.
- Frates, R.C.Jr., Kaizu, T.T. and Last, J.A. (1983) Mucus glycoproteins secreted by respiratory epithelial tissue from cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.*, **17**, 30-34.
- Glick, J. and Garber, N. (1983) The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3085-3090.

- Govan, J.R., Fyfe, J.A. and McMillan, C. (1979) The instability of *Pseudomonas aeruginosa*: fluctuation test and improved stability of the mucoid form in shaken culture. *J. Gen. Microbiol.*, **110**, 229–232.
- Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M.W., Bonfield, T., Davis, P.B. and Ferkol, T. (1997) Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2810–2815.
- Højby, N. (1982) Microbiology of lung infections in cystic fibrosis. *Acta Paediatr. Scand. (Suppl.)*, **301**, 33–54.
- Houdret, N., Périni, J.M., Galabert, C., Scharfman, A., Humbert, P., Lamblin, G. and Roussel, P. (1986) The high lipid content of respiratory mucins in cystic fibrosis is related to infection. *Biochim. Biophys. Acta*, **880**, 54–61.
- Khan, T.Z., Wagener, J.S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F.J. and Riches, D.W. (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**, 1075–1082.
- Komiyama, K., Habbick, B.F. and Tumber, S.K. (1987) Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis. *Infect. Immun.*, **55**, 2364–2369.
- Lamblin, G., Lafitte, J.J., Lhermitte, M., Degand, P. and Roussel, P. (1977) Mucins from cystic fibrosis sputum. *Mod. Probl. Paediatr.*, **19**, 153–164.
- Lamblin, G., Boersma, A., Klein, A., Roussel, P., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) Primary structure of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. The occurrence of the NeuAc- α (2,3)Gal β (1,4)[Fuc α (1,3)]GlcNAc β (1-) structural element revealed by 500-MHz ^1H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9051–9058.
- Lee, K.K., Sheth, H.B., Wong, W.Y., Sherburne, R., Paranchych, W., Hodges, R.S., Lingwood, C.A., Krivan, H. and Irvin, R.T. (1994) The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol. Microbiol.*, **11**, 705–713.
- Lo-Guidice, J.M., Wieruszkeski, J.M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P. and Lamblin, G. (1994) Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18794–18813.
- Pasyk, E.A. and Foskett, J.K. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7746–7751.
- Pind, S.N., Riordan, J.R. and Williams, D.B. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12784–12788.
- Rahmoune, H., Lamblin, G., Lafitte, J.J., Galabert, C., Filliat, M. and Roussel, P. (1991) Chondroitin sulfate in infected sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **5**, 315–320.
- Ramphal, R., Houdret, N., Loo, L., Lamblin, G. and Roussel, P. (1989) Differences in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucin glycopetides from sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis. *Infect. Immun.*, **57**, 3066–3071.
- Ramphal, R., Carnoy, C., Fièvre, S., Michalski, J.C., Houdret, N., Lamblin, G., Strecker, G. and Roussel, P. (1991a) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GlcNAc) or type 2 (Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc) disaccharide units. *Infect. Immun.*, **59**, 700–704.
- Ramphal, R., Koo, L., Ishimoto, K.S., Totten, P.A., Lara, J.C. and Lory, S. (1991b) Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* pilin-deficient mutants to mucin. *Infect. Immun.*, **59**, 1307–1311.
- Ramphal, R., Arora, S.K. and Ritchings, B.W. (1996) Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **154**, S170–S174.
- Riordan, J.R. (1993) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**, 609–630.
- Rosenstein, I.J., Chun, Y., Stoll, M.S. and Feizi, T. (1992) Differences in the binding specificities of *Pseudomonas aeruginosa* M35 and *Escherichia coli* C600 for lipid-linked oligosaccharides with lactose-related core regions. *Infect. Immun.*, **60**, 5078–5084.
- Roussel, P. and Lamblin, G. (1996) Human mucosal mucins in diseases. In Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G. and Schachter, H. (eds) *Glycoproteins and Disease*, Elsevier, Amsterdam. pp. 351–393.
- Roussel, P., Lamblin, G., Degand, P., Walker-Nasir, E. and Jeanloz, R.W. (1975) Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2114–2129.
- Sajjan, U., Reisman, J., Doig, P., Irvin, R.T., Forstner, G. and Forstner, J. (1992) Binding of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **89**, 657–665.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C. and Boucher, R.C. (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, **269**, 847–850.
- Van Dijk, W., Brinkman-Van der Linden, E.C. and Havenaar, E.C. (1998) Occurrence and possible function of inflammation-induced expression of sialyl-Lewis $\times$ on acute-phase proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **435**, 145–150.
- Van Halbeek, H., Strang, A.M., Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G. and Roussel, P. (1994) Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le $^{a+b-}$) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure. *Glycobiology*, **4**, 203–219.
- Veerman, E.C., Bank, C.M., Namavar, F., Appelmek, B.J., Bolscher, J.G. and Nieuw Amerongen, A.V. (1997) Sulfated glycans on oral mucin as receptor for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology*, **7**, 737–743.
- Vishwanath, S. and Ramphal, R. (1984) Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.*, **45**, 197–202.
- Zhang, Y.B., Doranz, J.R., Yankaskas, J.R. and Engelhardt, J.F. (1995) Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2997–3004.

Résultats - Discussion

Nous avons comparé l'adhérence de *P. aeruginosa* à un panel de néoglycoconjugués marqués à la fluorescéine contenant des déterminants glycaniques analogues à ceux décrits dans les mucines bronchiques humaines. La technique de cytométrie de flux permet l'étude des interactions bactéries/épitopes glycaniques en milieu liquide.

Nos résultats montrent que *P. aeruginosa* reconnaît de nombreux épitopes glycaniques (neutres ou acides) présents en périphérie des mucines bronchiques humaines, mais que l'épitope sialyl Le^x est le meilleur ligand de la souche 1244-NP et de trois souches pathologiques (sur les quatre testées).

L'augmentation d'expression de sialyl Le^x en périphérie des mucines bronchiques de patients CF, qui ne semble pas être spécifique de la mucoviscidose mais plutôt liée à l'infection puisqu'elle est aussi observée dans les mucines de patients atteints de bronchite chronique et sévèrement infectés, crée donc de nouveaux ligands préférentiels pour *P. aeruginosa*. Ces nouveaux sites glycaniques induits par l'infection broncho-pulmonaire pourraient, en partie, expliquer la persistance de cette bactérie dans la mucoviscidose.

Nous allons poursuivre ce travail en étudiant l'affinité de *P. aeruginosa* pour l'épitope 6-sulfo sialyl Le^x, car ce déterminant glycanique est bien exprimé en périphérie des mucines bronchiques CF [Lo-Guidice *et al.*, 1994] et il constitue le meilleur ligand de la L-sélectine. Jusqu'à très récemment, cette étude était impossible car les outils nécessaires n'étaient pas disponibles : aucun anticorps anti-6-sulfo sialyl Le^x n'est commercialisé pour étudier l'expression de cet épitope en périphérie des mucines ; l'étude de l'affinité de *P. aeruginosa* pour l'épitope 6-sulfo sialyl Le^x, grâce à la commercialisation du néoglycoconjugué correspondant, est possible depuis peu.

CONCLUSION GENERALE

Dix ans après la découverte du gène *CFTR*, codant la protéine CFTR dont les anomalies sont responsables de la mucoviscidose [Riordan, 1993], la physiopathologie de l'infection broncho-pulmonaire, qui demeure le problème majeur de cette affection, n'est toujours pas élucidée. L'hypothèse d'anomalies de glycosylation et de sulfatation faisant apparaître, au sein des mucines sécrétées ou des glycoconjugués des membranes cellulaires, des sites glycaniques spécifiquement reconnus par *P. aeruginosa* a été avancée par plusieurs laboratoires.

Le but de notre travail a été de préciser les phénomènes de glycosylation et de sulfatation des mucines bronchiques humaines, leurs anomalies chez les patients CF, ainsi que le lien de ces anomalies avec l'inflammation (et l'infection).

L'existence d'une hypersulfatation des mucines bronchiques sécrétées par les patients CF est connue depuis longtemps. C'est ensuite en utilisant un modèle de xénogreffe que le groupe d'Engelhardt a réussi à démontrer le caractère primaire de cette anomalie qui survient en dehors de toute inflammation et infection [Zhang *et al.*, 1995]. Plus récemment, il a été suggéré que la concentration en PAPS, le transporteur de groupements sulfate, pourrait être régulée en partie par la protéine CFTR et donc influencer les processus de sulfatation [Pasyk & Foskett, 1997].

Lo-Guidice *et al.* ont montré que la sulfatation des mucines pouvait se trouver soit sur le C3 d'un résidu de Gal terminal, soit sur le C6 d'un résidu de GlcNAc [1994]. Ils ont ensuite caractérisé la Gal-3-O-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine dont le pH optimal est de 6,1 [1995]. Au cours de la caractérisation structurale des oligosaccharides de mucines bronchiques d'un patient CF, ils ont observé que la 6-O-sulfatation était prépondérante par rapport à la 3-O-sulfatation.

Nous avons donc entrepris de caractériser la GlcNAc-6-O-sulfotransférase de muqueuse bronchique humaine, active sur les chaînes glycaniques de mucines. Cet enzyme, de pH optimal 6,7, pourrait être activé par l'alcalinisation des compartiments intracellulaires de cellules CF décrite par Barasch *et al.* [1991]. L'hypersulfatation des mucines bronchiques des patients CF pourrait donc être liée à une augmentation d'activité de la GlcNAc-6-O-sulfotransférase, due au gène *CFTR* muté (anomalie primaire).

La détermination de structures oligosaccharidiques de mucines bronchiques de patients CF a montré la présence, en périphérie chaînes glycaniques de mucines, des dérivés sulfatés et/ou sialylés du déterminant glycanique Le^x [Lo-Guidice *et al.*, 1994]. Cette

observation nous a incité à étudier la biosynthèse de ces déterminants par les transférases de la muqueuse bronchique humaine. Cette étude nous a permis de caractériser la spécificité de substrat des fucosyl-, sialyl-, et sulfotransférases de muqueuse bronchique humaine, et donc la séquence de biosynthèse de l'épitope 6-sulfo sialyl Le^x, qui est le meilleur ligand de la L-sélectine. La GlcNAc-6-*O*-sulfotransférase est le premier enzyme qui agit (sur un résidu de GlcNAc en position terminale non réductrice), suivi par la β 1-4-galactosyltransférase, l' α 2-3-sialyltransférase et enfin de l' α 1-3-fucosyltransférase. L'épitope 6-sulfo sialyl Le^x, bien exprimé chez les patients CF, pourrait avoir une importance physiologique, en modulant la réaction inflammatoire *via* des interactions mucines/leucocytes, et constituer aussi un site potentiel de fixation pour les micro-organismes (en particulier *P. aeruginosa*, bactérie responsable de la dégradation de l'état de santé des patients CF).

Outre l'hypersulfatation des mucines CF, des anomalies de glycosylation des mucines et des glycoconjugués ont été décrites dans la mucoviscidose. Carnoy *et al.* ont montré que les mucines salivaires sécrétées par les patients CF étaient non seulement hypersulfatées, mais aussi hyperfucosylées et hypersialylées [1993]. L'hypersialylation de ces mucines sécrétées par les patients CF est en contradiction avec l'hyposialylation décrite au niveau des glycoprotéines sécrétées ou membranaires de cellules CF. L'inflammation très précoce observée chez de jeunes patients CF, et les nombreuses études démontrant l'effet de l'inflammation sur la sécrétion et la glycosylation des protéines de la phase aiguë, nous ont incités à chercher un lien potentiel entre les anomalies de glycosylation et de sulfatation des mucines bronchique humaines et le degré d'infection des malades.

Nous avons caractérisé, au sein de mucines bronchiques de patients CF (i) l'hypersulfatation qui serait liée aux mutations du gène *CFTR*, et (ii) une hypersialylation et une surexpression de l'épitope glycaniques sialyl Le^x, qui seraient plutôt liées à l'infection (et à l'inflammation), puisqu'elles existent également au niveau des mucines de patients atteints de bronchite chronique souffrant d'une infection sévère. Ces expériences ont montré que les mucines bronchiques sécrétées par les patients CF étaient hypersialylées, tout comme leurs mucines salivaires, alors que les glycoprotéines sécrétées ou membranaires de cellules CF sont hyposialylées. Ces expériences suggèrent que l'inflammation bronchique pourrait induire, *in vivo*, l'augmentation des activités fucosyl- et sialyltransférasiques.

Nous avons essayé de confirmer cette hypothèse par une étude de l'effet du $\text{TNF}\alpha$ (qui mime l'inflammation) sur l'expression et l'activité de fucosyl-, sialyl- et sulfotransférases dans deux modèles : la lignée MM-39 et les explants bronchiques. La lignée MM-39, d'origine glandulaire bronchique humaine et possédant un phénotype mixte séro-muqueux, présente l'inconvénient de sécréter des mucines très faiblement fucosylées et sulfatées dans les conditions basales. Le traitement des cellules par le $\text{TNF}\alpha$ n'augmente que modérément l'expression et l'activité des fucosyl-, sialyl- et sulfotransférases, et les activités transférases très faibles ne permettent pas de conclure définitivement sur l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la glycosylation et la sulfatation des mucines. Ces problèmes sont probablement liés au degré insuffisant de différenciation mucipare des cellules ou au petit nombre de cellules ayant une différenciation mucipare parmi la population cellulaire. De plus, les activités des enzymes lysosomiaux des cellules MM-39 sont très élevées [Merten, communication personnelle] ; les activités fucosidases présentes dans les microsomes de cellules MM-39 sont environ deux fois plus élevées que celles présentes dans la muqueuse bronchique humaine. L'utilisation d'un inhibiteur de fucosidases (par exemple le 1,5-didéoxy 1,5-imino-L-fucitol) pourrait se révéler utile durant les incubations et permettre d'obtenir des valeurs de fucosyltransférases plus élevées. Il sera également nécessaire d'essayer de transformer le phénotype séro-muqueux (à dominante séreuse) de la lignée MM-39 en un phénotype majoritairement muqueux. Les résultats préliminaires sont encourageants : en utilisant une matrice extracellulaire et de l'acide rétinolique, nous avons observé une augmentation de la sécrétion des glycoconjugués de masse moléculaire élevée et ayant la densité des mucines. Outre les gènes de mucines *MUC1* et *-4*, une certaine expression de *MUC5B* et *-7* a été obtenue récemment. Ces deux gènes sont caractéristiques des cellules glandulaires respiratoires.

Quant aux explants bronchiques, ils présentent des activités sulfotransférases faibles, mais des activités fucosyl- et sialyltransférases proches de celles décrites dans les microsomes directement préparés à partir de muqueuse bronchique. Le $\text{TNF}\alpha$ a également un effet activateur sur les activités $\alpha 1$ -3-fucosyl- et $\alpha 2$ -3-sialyltransférase (+ 192 % et + 41 % respectivement dans notre unique expérience) présentes dans les microsomes préparés à partir des explants. Les explants bronchiques ne constituent pas un modèle parfait, car leurs activités sulfotransférases sont pratiquement inexistantes, contrairement à ce que l'on trouve dans l'épithélium bronchique de surface. La faible activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase présente dans les explants bronchiques semble également stimulée par le $\text{TNF}\alpha$.

Nos résultats suggèrent que les mucines pourraient se comporter, de même que les protéines de la phase aiguë, comme des molécules inflammatoires dont la sécrétion et la glycosylation pourrait être modifiée au cours d'épisodes inflammatoires. L'inflammation induirait, en particulier, une hypersialylation et une surexpression de l'épitope glycanique sialyl Le^x. L'hypersulfatation des mucines bronchiques de patients CF serait, quant à elle, directement liée aux mutations du gène *CFTR*. Les modifications de glycosylation induites par la réaction inflammatoire, et en particulier la surexpression de l'épitope sialyl Le^x, pourrait permettre aux mucines bronchiques de patients CF d'interagir avec les leucocytes, modulant ainsi la réponse inflammatoire en perturbant les interactions bactéries/leucocytes.

De plus, nous avons montré, par une technique de cytométrie de flux qui permet l'analyse des interactions bactérie/épitope glycanique en milieu liquide, que *P. aeruginosa* reconnaissait de nombreux épitopes glycaniques existant en périphérie des mucines bronchiques, mais préférentiellement l'épitope sialyl Le^x. L'augmentation de l'expression de cet épitope en périphérie des mucines bronchiques de patients CF, liée à l'infection, crée de nouveaux sites de fixation préférentiels pour *P. aeruginosa*, facilitant de ce fait la colonisation de l'appareil respiratoire par cette bactérie.



Nos résultats suggèrent que les mucines, du moins certaines d'entre elles, pourraient se comporter comme des molécules inflammatoires (de la même façon que les protéines de la phase aiguë de l'inflammation). Elles pourraient subir des modifications de glycosylation, de sulfatation et de sécrétion lors de phénomènes inflammatoires. L'épitope sialyl Le^x, particulièrement exprimé dans les inflammations importantes et étant le site préférentiel de fixation pour *P. aeruginosa*, sa surexpression pourrait faciliter la colonisation bronchique par cette bactérie.

Ce travail doit se poursuivre par :

– La caractérisation d'oligosaccharides sulfatés de patients non CF (atteints de bronchite chronique) afin de comparer leurs structures (et en particulier leur sulfatation) avec celles de patients CF. Nous voudrions également caractériser les structures d'oligosaccharides disulfatés de mucines bronchiques humaines, de patients CF et non CF. Cette étude nous permettrait peut-être de caractériser de nouvelles

localisations des groupements sulfate sur les sucres, donc potentiellement de nouvelles sulfotransférases de muqueuse bronchique humaine.

– La comparaison des activités fucosyl-, sialyl- et sulfotransférasiques de muqueuse bronchique «macroscopiquement saine» avec les activités glycosyl- et sulfotransférasiques de muqueuse bronchique de patients CF. Des modifications d'activité de certains enzymes pourraient être à l'origine des modifications de glycosylation observées en périphérie des mucines sécrétées par les patients CF.

– D'autres expériences de stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ sur des explants bronchiques, sur lesquels nous étudierons à nouveau les activités α 1-3-fucosyl- et α 2-3-sialyltransférasiques présentes dans les microsomes, ainsi que l'expression des fucosyl- et sialyltransférases par une technique de RT-PCR. Le problème de ces expériences reste l'approvisionnement difficiles en pièces bronchiques. Il serait également possible de tester l'influence du $\text{TNF}\alpha$ sur d'autres mucines d'origines éventuellement autres que mucines bronchiques, afin de vérifier que l'effet stimulateur de cette cytokine sur la fucosylation, la sialylation et la sulfatation ne se limite pas au système trachéo-bronchique.

– L'étude de l'expression de l'épitope glycanique 6-sulfo sialyl Le^x en périphérie des mucines bronchiques de patients CF ou atteints d'autres affections bronchiques. Cet épitope a déjà été caractérisé dans les structures oligosaccharidiques déterminées chez un patient CF [Lo-Guidice *et al.*, 1994]. L'affinité de différentes souches de *P. aeruginosa* pour cet épitope, et la comparaison de cette affinité avec celle de la bactérie pour l'épitope sialyl Le^x , devraient aussi être étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

Adler, K.B., Fischer, B.M., Li, H., Choe, N.H., & Wright, D.T. (1995)

Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells *in vitro* is blocked by inhibition of nitric oxide synthase.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **13**, 526-530.

Al-Awqati, Q., Barasch, J., & Landry, D. (1992)

Chloride channels in intracellular organelles and their potential role in cystic fibrosis.

J. Exp. Biol., **172**, 245-266.

Almeida, R., Amado, M., David, L., Levery, S.B., Holmes, E.H., Merck, G., van Kessel, A.G., Rygaard, E., Hassan, H., Bennett, E., & Clausen, H. (1997)

Cloning and expression of two novel UDP-galactose: β -N-acetylglucosamine- β 1,4-galactosyltransferases, β 3Gal-T2 and β 3Gal-T3.

J. Biol. Chem., **272**, 31979-31991. (Erratum : *J. Biol. Chem.*, (1998) **273**, 18674)

Amado, M., Almeida, R., Carneiro, F., Levery, S.B., Holmes, E.H., Nomoto, M., Hollingsworth, M.A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P.A., Bennett, E.P., & Clausen, H. (1998)

A family of human β 3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose: β -N-acetylglucosamine- β -1,3-galactosyltransferase family.

J. Biol. Chem., **273**, 12770-12778.

Andersson, B., Dahmen, J., Fredj, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G., & Svanborg-Eden, C. (1983)

Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for Pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells.

J. Exp. Med., **158**, 559-570.

Arnold, J.W., Klimpel, G.R., & Niesel, D.W. (1993)

Tumor necrosis factor (TNF α) regulates intestinal mucus production during salmonellosis.

Cell. Immunol., **151**, 336-344.

Arora, S.K., Richtings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., & Ramphal, R. (1998)

The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion.
Infect. Immun., **66**, 1000-1007.

Asker, N., Axelsson, M.A., Olofsson, S.O., & Hansson, G.C. (1998)

Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a *N*-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus.
J. Biol. Chem., **273**, 18857-18863.

Aubert, J.P., Porchet, N., Crépin, M., Duterque-Coquillaud, M., Vergnes, G., Mazzuca, M., Debuire, B., Petitprez, D., & Degand, P. (1991)

Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **5**, 178-185.

Audié, J.P., Janin, A., Porchet, N., Copin, M.C., Gosselin, B., & Aubert, J.P. (1993)

Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by *in situ* hybridization

J. Histochem. Cytochem., **41**, 1479-1485.

Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J.M. (1998)

Human β -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.

J. Clin. Invest., **102**, 874-880.

Barasch, J., & Al-Awqati, Q. (1993)

Defective acidification in the biosynthetic pathway in cystic fibrosis.

J. Cell Sci. Suppl., **17**, 229-233.

Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D., & Al-Awqati, Q. (1991)

Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis.

Nature, **352**, 70-73.

Bell, S.L., Khatri, I.A., Xu, G., & Forstner, J.F. (1998)

Evidence that a peptide corresponding to the rat Muc2 C-terminus undergoes disulphide-mediated dimerization.

Eur. J. Biochem., **253**, 123-131.

Bennett, E.P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M.A., Merkx, G., van Kessel, A.G., Eiberg, H., Steffensen, R., & Clausen, H. (1998a)

Cloning of a human UDP-*N*-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl transferase that complements other GalNAc transferases in complete *O*-glycosylation of the MUC1 tandem repeat.

J. Biol. Chem., **273**, 30472-30481.

Bennett, E.P., Weghuis, D.O., Merkx, G., van Kessel, A.G., Eiberg, H., & Clausen, H. (1998b)

Genomic organization and chromosomal localisation of three members of the UDP-*N*-acetylgalactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family.

Glycobiology, **8**, 547-555.

Bennett, E.P., Hassan, H., Hollingsworth M.A., & Clausen, H. (1999)

A novel human UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates.

FEBS Lett., **460**, 226-230.

Berger, M., Sorensen, R.U., Tosi, M.F., Dearborn, D.G., & Doring, G. (1989)

Complement receptor expression of neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in cystic fibrosis.

J. Clin. Invest., **84**, 1302-1313.

Bierhuizen, M., & Fukuda, M. (1992)

Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc:Gal β 1-3GalNAc-R (GlcNAc to

GalNAc) β 1-6GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 9326-9330.

Bierhuizen, M., Mattei, M.G., & Fukuda, M. (1993)

Expression of the developmental I antigen by a cloned human cDNA encoding a member of a β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene family.

Genes Dev., **7**, 468-478.

Birrer, P., McElvaney, N.G., Rudeberg, A., Sommer, C.W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R., & Crystal, R.G. (1994)

Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **150**, 207-213.

Bistrup A., Bhakta S., Lee J.K., Belov Y.Y., Gunn M.D., Zuo F.R., Huang C.C., Kannagi R., Rosen S.D., & Hemmerich S. (1999)

Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin.

J. Cell Biol., **145**, 899-910.

Boat, T.F., Cheng, P.W., & Wood, R.E. (1977)

Tracheobronchial mucus secretion *in vivo* and *in vitro* by epithelial tissues from cystic fibrosis and control subjects.

Mod. Probl. Paediatr., **19**, 141-152.

Bobek, L.A., Liu, J., Sait, S.N.J., Shows, T.B., Bobek, Y.A., & Levine, M.J. (1996).

Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7.

Genomics, **31**, 277-282.

Bobek, L.A., Tsai, H., Biesbrock, A.R., & Levine, M.J. (1993)

Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7).

J. Biol. Chem., **268**, 20563-20569.

Bonfield, T.L., Konstan, M.W., Burfeind, P., Panuska, J.R., Hilliard, J.B., & Berger, M. (1995a)

Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine IL-10, which is down-regulated in cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **13**, 257-261.

Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, J.B., Hilliard, K.A., Ghnaim, H., & Berger, M. (1995b)

Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **152**, 2111-2118.

Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M., & Neeser, J.R. (1991)

In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc α 1,2Gal β - bearing carbohydrates.

Infect. Immun., **59**, 1605-1613.

Breg, J., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F., Lamblin, G., Houvenaghel, M.C., & Roussel, P. (1987).

Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis.

Eur. J. Biochem., **168**, 57-68.

Brennan, M.J., Joralmón, R.A., Cisar, J.O., & Sandberg, A.L. (1987)

Binding of *Actinomyces naeslundii* to glycosphingolipids.

Infect. Immun., **55**, 487-489.

Brinkman-van der Linden, E.C., van Ommen, E.C., & van Dijk, W. (1996)

Glycosylation of α_1 -acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis x groups.

Glycoconj. J., **13**, 27-31.

Carlstedt, I., Lindgren, H., & Sheehan, J.K. (1983)

The macromolecular structure of human cervical-mucus glycoproteins.

Biochem. J., **213**, 427-435.

Carlstedt, I., Sheehan, J.K., Corfield, A.P., & Gallagher, J.T. (1985)

Mucous glycoproteins: a gel of a problem.

Essays Biochem., **20**, 40-76.

Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J.M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G., & Roussel, P. (1993)

Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **9**, 323-334.

Carnoy, C., Scharfman, A., van Brussel, E., Lamblin, G., Ramphal, R., & Roussel, P. (1994)

Pseudomonas aeruginosa outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins.

Infect. Immun., **62**, 1896-1900.

Chace, K.V., Leahy, D.S., Martin, R., Carubelli, R., Flux, M., & Sachdev, G.P. (1983)

Respiratory mucous secretions in patients with cystic fibrosis: relationship between levels of highly sulfated mucin component and severity of the disease.

Clin. Chim. Acta, **132**, 143-155.

Chai, W., Hounsell, E.F., Cashmore, G.C., Rosankiewicz, J.R., Bauer, C.J., Feeney, J., Feizi, T., & Lawson A.M. (1992a)

Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin.

Eur. J. Biochem., **203**, 257-269.

Chai, W., Hounsell, E.F., Cashmore, G.C., Rosankiewicz, J.R., Feeney, J., & Lawson A.M. (1992b)

Characterization by mass spectrometry and ¹H-NMR of novel hexasaccharides among the acidic O-linked carbohydrate chains of bovine submaxillary mucin.

Eur. J. Biochem., **207**, 973-980.

Chandrasekaran, E.V., Jain, R.K., Vig, R., & Matta, K.L. (1997)

The enzymatic sulfation of glycoprotein carbohydrate units: blood group T-hapten specific and two other distinct Gal:3-O-sulfotransferases as evident from specificities and kinetics and

the influence of sulfate and fucose residues occurring in the carbohydrate chain on C-3 sulfation of terminal Gal.

Glycobiology, **7**, 753-768.

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., & Demers, L.M. (1999)

New insights into the role of nuclear factor-kb, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases.

Clin. Chem., **45**, 7-17.

Cheng, P.W., Boat, T.F., Cranfill, K., Yankaskas, J.R., & Boucher, R.C. (1989)

Increased sulfation of glycoconjugates by cultures nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis.

J. Clin. Invest., **84**, 68-72.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., & Rutter, W.J. (1979)

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.

Biochemistry, **18**, 5294-5299

Couceiro, J.N., Paulson, J.C., & Baum, L.G. (1993)

Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity.

Virus Res., **29**, 155-165

Crommie, D., & Rosen, S.D. (1995)

Biosynthesis of GlyCAM-1, a mucin-like ligand for L-selectin.

J. Biol. Chem., **270**, 22614-22624.

Crottet, P., Kim, Y.J., & Varki, A. (1996)

Subsets of sialylated, sulfated mucins of diverse origins are recognized by L-selectin. Lack of evidence for unique oligosaccharide sequences mediating binding.

Glycobiology, **6**, 191-208.

Dabbagh, K., Takeyama, K., Lee, H.M., Ueki, I.F., Lausier, J.A., & Nadel, J.A. (1999)
IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia *in vitro* and *in vivo*.
J. Immunol., **162**, 6233-6237.

Davril, M., Degroote, S., Humbert, P., Galabert, C., Dumur, V., Lafitte, J.J., Lamblin, G., & Roussel, P. (1999)
The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection.
Glycobiology, **9**, 311-321.

Debailleul, V., Laine, A., Huet, G., Mathon, P., d'Hooghe, M.C., Aubert, J.P., & Porchet, N. (1998)
Human mucin genes *MUC2*, *MUC3*, *MUC5AC*, *MUC5B*, and *MUC6* express stable and extremely large mRNAs and exhibit a variable length polymorphism. An improved method to analyse large mRNAs.
J. Biol. Chem., **273**, 881-890.

De Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C., & Puchelle, E. (1996)
Asialo-GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. Adherence to regenerating respiratory epithelial cells.
Infect. Immun., **64**, 1582-1588.

De Graaf, T.W., van der Stelt, M.E., Anbergen, M.G., & van Dijk, W. (1993)
Inflammation-induced expression of sialyl Lewis x-containing glycan structures on α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera.
J. Exp. Med., **177**, 657-666.

Dekker, J., & Strous, G.J. (1990)
Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation.
J. Biol. Chem., **265**, 18116-18122.

De Lisle, R.C. (1995)

Increased expression of sulfated gp300 and acinar tissue pathology in pancreas of CFTR (-/-) mice.

Am. J. Physiol., **268**, G717-G723.

Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Degand, P., & Laine A. (1998)

Evolutionary history of the 11p15 human gene family.

J. Mol. Evol., **46**, 102-106.

Desseyn, J.L., Guyonnet-Duperat, V., Porchet, N., Aubert, J.P., & Laine, A. (1997)

Human mucin gene *MUC5B*, the 10.7 kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. Structural evidence for a 11p15.5 gene family.

J. Biol. Chem., **272**, 3168-3178.

Devaraj, N., Sheykhazari, M., Warren, W.S., & Bhavanandan, V.P. (1994)

Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins.

Glycobiology, **4**, 307-316.

De Vries, T., Smka, C.A., Palcic, M.M., Swiedler, S.J., van den Eijnden, D.H., & Macher, B.A. (1995)

Acceptor specificity of different length constructs of human recombinant α 1,3/4-fucosyltransferases. Replacement of the stem region and the transmembrane domain of fucosyltransferase V by protein A results in an enzyme with GDP-fucose hydrolyzing activity.

J. Biol. Chem., **270**, 8712-8722.

De Waard, P., Koorevaar, A., Kamerling, J.P., & Vliegthart, J.F. (1991)

Structure determination by ^1H NMR spectroscopy of (sulfated) sialylated *N*-linked carbohydrate chains released from porcine thyroglobulin by peptide-*N*4-(*N*-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase-F.

J. Biol. Chem., **266**, 4237-4243.

DiMango, E., Ratner, A.J., Bryan, R., Tabibi, S., & Prince, A. (1998)

Activation of NF- κ B by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells.

J. Clin. Invest., **101**, 2598-2605.

Di Sant'Agnes, P.A., Darling, R.C., Perera, G.A., & Shea, E. (1953)

Abnormal electrolyte composition in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease.

Pediatrics, **12**, 549-563.

Donald, A.S.R. (1973)

The products of Pronase digestion of purified blood-group specific glycoproteins.

Biochem. Biophys. Acta, **317**, 420-436.

Dosanjh, A., Lencer, W., Brown, D., Ausiello, D.A., & Stow, J.L. (1994)

Heterologous expression of Δ F508 CFTR results in decreased sialylation of membrane glycoconjugates.

Am. J. Physiol., **266**, C360-C366.

Dufossé, J., Porchet, N., Audié, J.P., Guyonnet-Dupérat, V., Laine, A., van Seuningen, I., Marrakchi, S., Degand, P., & Aubert, J.P. (1993)

Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15.

Biochem. J., **293**, 329-337.

Dumur, V., Gervais, R., Rigot, J.M., Delomel-Vinner, E., Decaestecker, B., Lafitte, J.J., & Roussel, P. (1996)

Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype.

Hum. Genet., **97**, 7-10.

Emery, N., Lo-Guidice, J.M., Lafitte, J.J., Lhermitte, M., & Roussel, P. (1997)

The expression of fucosyltransferases in human bronchial cells secreting mucins varies according to growth conditions.

Glycobiology, **7**, 95-101.

Engelhardt, J., Zepeda, M., Cohn, J., Yankaskas, J.R., & Wilson, J.M. (1993)

Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung.

J. Clin. Invest., **93**, 737-749.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffer, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998)

Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection.

Infect. Immun., **66**, 43-51.

Ferrari, M., & Cremonesi, L. (1996)

Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients.

Ann. Biol. Clin. (Paris), **54**, 235-241.

Fick, R.B. Jr, Naegel, G.P., Squier, S.U., Wood, R.E., Gee, J.B., & Reynolds, H.Y. (1984)

Proteins of the cystic fibrosis respiratory tract. Fragmentated immunoglobulin G opsonic antibody causing defective opsonophagocytose.

J. Clin. Invest., **74**, 236-248.

Fisher, B., Krunkovsky, T.M., Wright, D.T., Dolan-O'Keefe, M., & Adler, K.B. (1995)

Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) stimulates mucin secretion and gen expression in airway epithelium *in vitro*.

Chest, **107**, 133S-135S.

Flemming, A. (1922)

On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.

Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **93**, 306-317.

Fogg, F.J., Hutton, D.A., Jumel, K., Pearson, J.P., Harding, S.E., & Allen, A. (1996)

Characterization of pig colonic mucins.

Biochem. J., **316**, 937-942.

Fukuoka, K., Narita, N., & Saijo, N. (1998)

Increased expression of sialyl Lewis x antigen is associated with distant metastasis in lung cancer patients: immunohistochemical study on bronchofiberscopic biopsy specimens.

Lung Cancer, **20**, 109-116.

Gabay, J.E., Scott, R.W., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M.N., Seeger, M., & Nathan, C.F. (1989)

Antibiotic peptides of human polymorphonuclear leucocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **86**, 5610-5614.

Galustian, C., Lawson, A.M., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M., & Feizi, T. (1997)

Sialyl Lewis x sequence 6-O-sulfated at *N*-acetylglucosamine rather than at galactose is the preferred ligand for L-selectin and de-*N*-acetylation of the sialic acid enhances the binding strength.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **240**, 748-751.

Gambaryan, A.S., Piskarev, V.E., Yamskov, I.A., Sakharov, A.M., Tuzikov, A.B., Bovin, N.V., Nifant'ev, N.E., & Matrosovich, M.N. (1995)

Human influenza virus recognition of sialyloligosaccharides.

FEBS Lett., **366**, 57-60.

Gendler, S.J., Burchell, J.M., Duhig, T., Lamport, D., White, R., Parker, M., & Taylor-Papadimitriou, J. (1987)

Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **84**, 6060-6064.

Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, J., Peat, T., & Burchell, J. (1990)

Molecular cloning and expression of a human tumor-associated polymorphic epithelial mucin.

J. Biol. Chem., **265**, 15286-15293.

Gendler, S.J., & Spicer, A.P. (1995)

Epithelial mucin genes.

Annu. Rev. Physiol., **57**, 607-634.

Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., & Wilson, J.M. (1997)

Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, **88**, 553-560.

Graham, E.R.B., & Gottschalk, A. (1960)

Studies on mucoproteins. I. The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Acta*, **38**, 513-524.

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.

Gum, J.R., Byrd, J.C., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Lamport, D.T.A., & Kim, Y.S. (1989)

Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism.

J. Biol. Chem., **264**, 6480-6487.

Gum, J.R., Hicks, J.W., Swallow, D.M., Lagace, R.L., Byrd, J.C., Lamport, D.T., Siddiki, B., & Kim, Y.S. (1990)

Molecular cloning of cDNAs derived from a novel intestinal mucin gene.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **171**, 407-415.

Gum, J.R. Jr, Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B., & Kim, Y.S. (1994)

Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor.

J. Biol. Chem., **269**, 2440-2446.

Gum, J.R. Jr, Ho, J.J.L., Pratt, W.S., Hicks, J.W., Hill, A.S., Vinall, L.E., Robertson, A.L., Swallow, D.M., & Kim, Y.S. (1997)

MUC3 human intestinal mucin. Analysis of gene structure, the carboxyl terminus, and a novel upstream repetitive region.

J. Biol. Chem., **272**, 26678-26686.

Guyonnet-Dupérat, V., Audié, J.P., Debailleul, V., Laine, A., Buisine, M.P., Galiègue-Zouitina, S., Pigny, P., Degand, P., Aubert, J.P., & Porchet, N. (1995)

Characterization of the human mucin gene *MUC5AC*: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes ?

Biochem. J., **305**, 211-219.

Hagen, F.K., Hagen, K.G., Beres, T.M., Balys, M.M., van Wuyckhuysse, B.C., & Tabak, L.A. (1997)

CDNA cloning and expression of a novel UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase.

J. Biol. Chem., **272**, 13843-13848.

Hamada, Y., Kobayashi, K., & Brown, W.R. (1991)

Tumor necrosis factor α decreases expression of the intestinal IgG Fc binding site by HT29-N2 cells.

Immunology, **74**, 298-303.

Hancock, R.E., & Lehrer, R. (1998)

Cationic peptides: a new source of antibiotics.

Trends Biotechnol., **16**, 82-88.

Hanski, C., Drechsler, K., Hanisch, F.G., Sheehan, J., Manske, M., Ogorek, D., Klussman, E., Hanski, M.L., Blank, M., Xing, P.X., Mc Kenzie, I.F.C., Devine, P.L., & Riecken, E.O. (1993)

Altered glycosylation of the MUC1 protein core contributes to the colon carcinoma-associated increase of the mucin-bound sialyl Lewis x expression.

Cancer Res., **53**, 4082-4088.

Harbitz, O., Jenssen, A.O., & Smidsrod, O. (1984)

Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease.

Eur. J. Respir. Dis., **65**, 512-520.

Havenaar, E.C., Drenth, J.P., van Ommen, E.C., van der Meer, J.W., & van Dijk, W. (1995)
Elevated serum level and altered glycosylation of α_1 -acid glycoprotein in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome: evidence for persistent inflammation.

Clin. Immunol. Immunopathol., **76**, 279-284.

Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M.W., Bonfield, T., Davis, P.B., & Ferkol, T. (1997)
Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Clin. Invest., **100**, 2810-2815.

Hiemstra, P.S., Maassen, R.J., Stolk, J., Heinzl-Wieland, R., Steffens, G.J., & Dijkman, J.H. (1996)

Antibacterial activity of antileucoprotease.

Infect. Immun., **64**, 4520-4524.

Hill, W.G., Harper, G.S., Rozaklis, T., Boucher, R.C., & Hopwood, J.J. (1997)

Organ-specific over-sulfation of glycosaminoglycans and altered extracellular matrix in a mouse model of cystic fibrosis.

Biochem. Mol. Med., **62**, 113-122.

Hoff, S.D., Matsushita, Y., Ota, D.M., Cleary, K.R., Yamori, T., Hakomori, S., & Irimura, T. (1989)

Increased expression of sialyl-dimeric Lewis x antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma.

Cancer Res., **49**, 6883-6888.

Hoffman, W., & Hauser, F. (1993)

Biosynthesis of frog skin mucins: cystein-rich shuffled modules, polydispersities and genetic polymorphism.

Comp. Biochem. Physiol., **105**, 465-472.

Hounsell, E.F., & Feizi, T. (1982)

Gastrointestinal mucins.

Med. Biol., **60**, 227-236

Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C., & Feizi, T. (1985)

Structural analysis of the *O*-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens.

Eur. J. Biochem., **148**, 367-377.

Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., & Al-Awqati, Q. (1995)

Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria at their apical surface.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **92**, 3019-3023.

Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., & Saito, M. (1998)

Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase.

J. Biol. Chem., **273**, 31652-31655.

Isshiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shiraishi, N., Sasaki, K., Andoh, T., & Narimatsu, H. (1999)

Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose: β -*N*-acetylglucosamine β 1,3-galactosyltransferase (β 3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom.

J. Biol. Chem., **274**, 12499-12507.

Jacquot, J., Hayem, A., & Galabert, C. (1992)

Functions of proteins and lipids in airway secretions

Eur. Respir. J., **5**, 343-358.

Jarry, A., Muzeau, F., & Labois, C. (1992)

Cytokine effects in a human colonic goblet cell line. Cellular damage and its partial

prevention by 5-aminosalicylic acid.

Dig. Dis. Sci., **37**, 1170-1178.

Jayawickreme, S.P., Gray, T., Nettesheim, P., & Eling, T. (1999)

Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells.

Am. J. Physiol., **276**, L596-603.

Jeffery, P.K. & Brain, A.P.R. (1988)

Surface morphology of human airway mucosa: normal, carcinoma or cystic fibrosis.

Scan. Microscop., **2**, 345-351.

Jenkinson, H.F., & Lamont, R.J. (1997)

Streptococcal adhesion and colonization.

Crit. Rev. Oral Biol. Med., **8**, 175-200.

Jensen, L.E. & Whitehead, A.S. (1998)

Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response.

Biochem. J., **334**, 489-503.

Jorgensen, H.G., Elliott, M.A., Priest, R., & Smith, K.D. (1998)

Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of α_1 -acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis.

Biomed. Chromatogr., **12**, 343-349.

Kabat, E.A. (1982)

Contributions of quantitative immunochemistry to knowledge of blood group A, B, H, Le, I, and i antigens.

Am. J. Clin. Path., **78**, 281-292.

Kai, H., Takeuchi, K., Ohmori, H., Li, J.D., Gallup, M., & Basbaum, C. (1996)

Transcriptional regulation of the lysozyme gene in airway gland serous cells.

J. Cell Biochem., **61**, 350-362.

Kammouni, W., Figarella, C., Marchand, S., & Merten, M. (1997)

Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells.

Infect. Immun., **65**, 5176-5183.

Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N., & Narimatsu, H. (1999)

α 1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX.

FEBS Lett., **452**, 237-242.

Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., & Lowe, J.B. (1995)

Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group α (1,2)fucosyltransferase (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlated with the non-secretor phenotype.

J. Biol. Chem., **270**, 4640-4649.

Khan, T.Z., Wagner, J.S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F.J., & Riches, D.W. (1995)

Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **151**, 1075-1082.

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**, 327-330.

Kim, Y.J., Kim, K.S., Kim, S.H., Kim, C.H., Ko, J.H., Choe, I.S., Tsuji, S., & Lee, Y.C. (1996)

Molecular cloning and expression of human β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase (hST3Gal II).

Biochem. Biophys. Res. Commun., **228**, 324-327.

Kitagawa, H., & Paulson, J.C. (1993)

Cloning and expression of human Gal β 1,3(4)GlcNAc: α 2,3-sialyltransferase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **194**, 375-382.

Kitagawa, H., & Paulson, J.C. (1994a)

Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues.

J. Biol. Chem., **269**, 17872-17878.

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**, 1394-1401.

Klein, A., Carnoy, C., Lamblin, G., Roussel, P., van Kuik, A., de Waard, P., & Vliegthart, J.F. (1991)

Isolation and structural characterization of novel neutral oligosaccharide-alditols from respiratory mucus glycoproteins from a patient suffering from bronchiectasis.

Eur. J. Biochem., **198**, 151-168.

Knowles, M.R., Robinson, J.M., Wood, R.E., Pue, C.A., Mentz, W.M., Wager, G.C., Gatzky, J.T., & Boucher, R.C. (1997)

Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects.

J. Clin. Invest., **100**, 2588-95. (Erratum : *J. Clin. Invest.*, (1998) **101**, 285)

Koch, C., & Høiby, N. (1993)

Pathogenesis of cystic fibrosis.

Lancet, **341**, 1065-1069.

Komiyama, K., Habbick, B.F., & Tumber, S.K. (1987)

Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients.

Infect. Immun., **55**, 2364-2369.

Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Norvell, T.M., & Berger, M. (1994)

Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung

disease suggest ongoing infection and inflammation.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **150**, 448-54. (Erratum : *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, (1995) **151**, 260).

Krivan, H.C., Olson, L.D., Barile, M.F., Ginsburg, V., & Roberts, D.D. (1989)

Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition of dextran sulfate.

J. Biol. Chem., **264**, 9283-9288.

Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, L.D., Nair, R.P., & Lowe, J.B. (1990)

A cloned human cDNA determines expression of a mouse-stage specific embryonic antigen and the Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase.

Genes Dev., **4**, 1288-1303.

Lamblin, G., Boersma, A., Klein, A., Roussel, P., van Halbeek, H., & Vliegthart, J.F. (1984).

Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. The occurrence of the NeuAc $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-4)$ Fuc[$\alpha(1-3)$]GlcNAc $\beta 1$ - structural element revealed by 500-MHz ^1H NMR spectroscopy.

J. Biol. Chem., **259**, 9051-9058.

Lamblin, G., Lafitte, J.J., Lhermitte, M., Degand, P., & Roussel, P. (1977)

Mucins from cystic fibrosis sputum.

Mod. Probl. Paediatr., **19**, 153-164.

Lamblin, G., Lhermitte, M., Klein, A., Houdret, N., Scharfman, A., Ramphal, R., & Roussel, P. (1991)

The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of underlying mucosa ?

Am. Rev. Respir. Dis., **144**, S19-S24.

Lapensée, L., Paquette, Y., & Bleau, G. (1997)

Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (*MUC9*).
Fertil. Steril., **68**, 702-708.

Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P., & Lowe, J.B. (1990)

Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:β-D-galactoside 2-α-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 6674-6678.

Lazatin, J., Glick, M., & Scanlin, T. (1994)

Fucosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells.
Glycosylation Dis., **1**, 263-270.

Lee, J.K., Bhakta, S., Rosen, S.D., & Hemmerich, S. (1999)

Cloning and characterization of a mammalian *N*-acetylglucosamine-6-sulfotransferase that is highly restricted to intestinal tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **263**, 543-549.

Lee, Y.C., Kim, Y.J., Lee, K.Y., Kim, K.S., Kim, B.U., Kim, H.N., Kim, C.H., & Do, S.I. (1998)

Cloning and expression of a cDNA for a human Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcα2,8-sialyltransferase (hST8Sia III).
Arch. Biochem. Biophys., **360**, 41-46.

Lee, Y.M., Miao, L.H., Chang, C.J., & Lee, S.C. (1996)

Transcriptional induction of the α₁-acid glycoprotein (AGP) gene by synergistic interaction of two alternative activator forms of AGP/enhancer-binding protein (C/EBPβ) and NF-κB or Nopp 140.
Mol. Cell Biol., **16**, 4257-4263.

Leffler, H., & Svanborg-Eden, C. (1986)

Glycolipids as receptors for *Escherichia coli* lectins or adhesins.

In : Microbial Lectins and Agglutinins: properties and biological activity. Mirelman D., Wiley J. & sons (Eds), New-York, pp. 93-111.

Levine, S.J., Larivée, P., Logun, C., Angus, C.W., Ognibene, F.P., & Sheldamer, J.H. (1995)
Tumor necrosis factor α induces mucin hypersecretion and *MUC2* gene expression by human airway epithelial cells.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **12**, 196-204.

Li, J.D., Feng, W., Gallup, M., Kim, J.H., Gum, J., Kim, Y., & Basbaum, C. (1998a)
Activation of NF- κ B via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **95**, 5718-5723.

Li, D., Gallup, M., Fan, N., Szymkowski, D.E., & Basbaum, C.B. (1998 b)
Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human *MUC5AC* mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts.
J. Biol. Chem., **273**, 6812-6820.

Lin, J., Kim, Y., & Juhn, S.K. (1998)
Increase of mucous glycoprotein secretion by tumor necrosis factor α via a protein kinase C-dependent mechanism in cultured chinchilla middle ear epithelial cells.
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., **107**, 213-219.

Lingwood, C.A., Cheng, M., Krivan, M.C., & Woods, D. (1991)
Glycolipid receptor binding specificity of Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **175**, 1076-1081.

Liu, A., Park, P.J., Rhim, A.D., Weiser, J.N., Glick, M.C., & Scanlin, T.F. (1998)
Functionnal implications of increased fucosylation of airway epithelial cell surface glycoproteins in CF.
Pediatric Pulmonology (supplement), **17 october 1998**, p218, 79.

Lo, N.W., Shaper, J.H., Pevsner, J., & Shaper, N.L. (1998)

The expanding β 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks.

Glycobiology, **8**, 517-526.

Lo-Guidice, J.M., Herz, H., Lamblin, G., Plancke, Y., Roussel, P., & Lhermitte, M. (1997).

Structures of sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le(a+b-)) patient suffering from chronic bronchitis.

Glycoconj. J., **14**, 113-125.

Lo-Guidice, J.M., Perini, J.M., Lafitte, J.J., Ducourouble, M.P., Roussel, P., & Lamblin, G. (1995)

Characterization of a sulfotransferase from human airways responsible for the 3-O-sulfation of terminal galactose in N-acetyllactosamine-containing mucin carbohydrate chains.

J. Biol. Chem., **270**, 27544-27550.

Lo-Guidice, J.M., Wieruszeski, J.M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P., & Lamblin, G. (1994)

Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis.

J. Biol. Chem., **269**, 18794-18813.

Lou, Y.P., Takeyama, K., Grattan, K.M., Lausier, J.A., Ueki, I.F., Agusti, C., & Nadel, J.A. (1998)

Platelet-activating factor induces goblet cell hyperplasia and mucin gene expression in airways.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **157**, 1927-1934.

Loussouarn, G., Demolombe, S., Mohammad-Panah, R., Escande, D., & Baro, I. (1996)

Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial potassium currents.

Am. J. Physiol., **271**, C1565-C1573.

Lowe, J.B., Kukowska-Latallo, J.F., Nair, R.P., Larsen, R.D., Marks, R.M., Macher, B.A., Kelly, R.J., & Ernst, L.K. (1991)

Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1 dependent cell adhesion.

J Biol Chem, **266**, 17467-17477.

Mackiewicz, A., Schultz, D., Mathison, J., Ganapathi, M., & Kushner, I. (1989)

Effect of cytokines on glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines.

Clin. Exp. Immunol., **75**, 70-75.

Majuri, M.L., Niemela, R., Tiisala, S., Renkonen, O., & Renkonen, R. (1995)

Expression and function of α 2,3-sialyl- and α 1,3/4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors.

Int. J. Cancer, **63**, 551-559.

Marianne, T., Perini, J.M., Lafitte, J.J., Houdret, N., Pruvot, F.R., Lamblin, G., Slayter, H.S., & Roussel, P. (1987)

Peptides of human bronchial mucus glycoproteins.

Biochem. J., **248**, 189-195.

Martensson, S., Bigler, S.A., Brown, M., Lange, P.H., Brawer, M.K., & Hakomori, S. (1995)

Sialyl Lewis x and related carbohydrate antigens in the prostate.

Hum. Pathol., **26**, 735-739.

Masri, K.A., Appert, H.E., & Fukuda, M.N. (1988)

Identification of the full-length coding sequence for human galactosyltransferase (β -N-acetylglucosaminide: β -1,4-galactosyltransferase).

Biochem. Biophys. Res. Commun., **157**, 657-663.

Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., & Boucher, R.C. (1998)

Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the

pathogenesis of cystic fibrosis airways disease.

Cell, **95**, 1005-1015.

Mawhinney, T.P., Adelstein, E., Gayer, D.A., Landrum, D.C., & Barbero, G.J. (1992a)

Structural analysis of monosulfated side-chain oligosaccharides isolated from human tracheobronchial mucous glycoproteins.

Carbohydr. Res., **223**, 187-207.

Mawhinney, T.P., Landrum, D.C., Gayer, D.A., & Barbero, G.J. (1992b)

Sulfated sialyl-oligosaccharides derived from tracheobronchial mucous glycoproteins of a patient suffering from cystic fibrosis.

Carbohydr. Res., **235**, 179-197.

Mc Coy, J.J., Mann, B.J., & Petri Jr, W.A. (1994)

Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around.

Infect. Immun., **62**, 3045-3050.

McNeer, R.R., Huang, D., Fregien, N.L., & Carraway, K.L. (1998)

Sialomucin complex in rat respiratory tract: a model for its role in epithelial protection.

Biochem. J., **330**, 737-744.

Meng, Q.H., Springall, D.R., Bishop, A.E., Morgan, K., Evans, T.J., Habib, S., Gruenert, D.C., Gyi, K.M., Hodson, M.E., Yacoub, M.H., & Polak, J.M. (1998)

Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis.

J. Pathol., **184**, 323-331.

Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M., & Kannagi, R. (1998)

Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis x.

J. Biol. Chem., **273**, 11225-11233.

Mohapatra, N.K., Chang, P.W., Parker, J.C., Paradiso, A.M., Yankaskas, J.R., Boucher, R.C., & Boat, T.F. (1995)

Alteration of sulfation of glycoconjugates, but not sulfate transport and intracellular inorganic sulfate content in cystic fibrosis airway epithelial cells.

Pediatr. Res., **38**, 42-48.

Mollicone, R., Cailleau, A., & Oriol, R. (1995)

Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes.

T. C. B., **4**, 235-242.

Mollicone, R., Candelier, J.J., Mennesson, B., Couillin, P., Venot, A.P., & Oriol, R. (1992)

Five specificity patterns of (α 1-3)-L-fucosyltransferase activity defined by use of synthetic oligosaccharide acceptors. Differential expression of the enzymes during human embryonic development and in adult tissues.

Carbohydr. Res., **228**, 265-276.

Moniaux, N., Nollet, S., Porchet, N., Degand, P., Laine, A., & Aubert, J.P. (1999)

Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin.

Biochem. J., **338**, 325-333.

Moss, R.B., Bocian, R.C., Hsu, Y.P., Dong, Y.J., Kemna, M., Wei, T., & Gardner, P. (1996)

Reduced IL-10 secretion by CD4⁺ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

Clin. Exp. Immunol., **106**, 374-388.

Murray, P.A., Levine, M.J., Tabak, L.A., & Reddy, M.S. (1982)

Specificity of salivary-bacterial interactions: II. Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc sequence.

Biochem. Biophys. Res. Chem., **106**, 390-396.

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Fredette, B., Ranscht, B., & Fukuda, M. (1995)

Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **92**, 7031-7035.

Neale, M.L., Fiera, R.A., & Matthews, N. (1988)

Involvement of phospholipase A2 activation in tumor cell killing by tumor necrosis factor.
Immunology, **64**, 81-85.

Niemela, R., Natunen, J., Majuri, M.L., Maaheimo, H., Helin, J., Lowe, J.B., Renkonen, O., & Renkonen, R. (1998)

Complementary acceptor and site specificities of Fuc-TIV and Fuc-TVII allow effective biosynthesis of sialyl-TriLe^x and related polylactosamines present on glycoprotein counterreceptors of selectins.

J. Biol. Chem., **273**, 4021-4026.

Nollet, S., Moniaux, N., Maury, J., Petitprez, D., Degand, P., Laine, A., Porchet, N., & Aubert, J.P. (1998)

Human mucin gene *MUC4*: organization of its 5' region and polymorphism of its central tandem repeat array.

Biochem. J., **332**, 739-748.

Novotny-Smith, C.L., Zorbas, M.A., Mcisaac, A.M., Irimura, T., Boman, B.M., Yeoman, L.C., & Gallick, G.E. (1993)

Down-modulation of epidermal growth factor receptor accompanies TNF-induced differentiation of the DiFi human adenocarcinoma cell line toward a goblet-like phenotype.

J. Cell Phys., **157**, 253-262.

Ogawa, J., Inoue, H., & Koide, S. (1996)

Expression of α -1,3-fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer.

Cancer Res., **56**, 325-329.

Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., & Urano, T. (1999)

Molecular cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids.

J. Biol. Chem., **274**, 11479-11486.

Palmer, B.F., & Alpern, R.J. (1998)

Liddle's syndrome.

Am. J. Med., **104**, 301-309.

Park, P.J., Leeftang, B., Vliegenthart, J.F.G., Rhim, A.D., Scanlin, T.F., & Glick, M.C. (1998)

Primary and immortalized CF airway epithelial cells express a selectin ligand

Pediatric Pulmonology (supplement), **14 August 1998**, p319, 415.

Parkkinen, J., Rogers, G.N., Korhonen, T., Dahr, W., & Finne, J. (1986)

Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated *Escherichia coli*.

Infect. Immun., **54**, 37-42.

Pasyk, E.A., & Foskett, J.K. (1997)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes.

J. Biol. Chem., **269**, 12784-12788.

Peraldi, P., Hotamisligil, G.S., Buurman, W.A., White, M.F., & Spiegelman, B.M. (1996)

Tumor necrosis factor (TNF) α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase.

J. Biol. Chem., **271**, 13018-13022.

Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., DeLuca, A., & Hill, R.L. (1998)

Porcine submaxillary mucin forms disulfide-linked multimers through its amino-terminal D-domains.

J. Biol. Chem., **273**, 14442-14449.

Perini, J.M., Vandamme-Cubadda, N., Aubert, J.P., Porchet, N., Mazzuca, M., Lamblin, G., Herscovics, A., & Roussel, P. (1991)

Multiple apomucin translation products from human respiratory mucosa mRNA.

Eur. J. Biochem., **196**, 321-328.

Peyrard, M., Seroussi, E., Sandberg-Nordovist, A.C., Xie, Y.G., Han, F.Y., Fransson, I., Collins, J., Dunham, I., Kost-Alimova, M., Imreh, S., & Dumanski, J.P. (1999)

The human *LARGE* gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 598-603.

Pier, G.B., Grout, M., & Zaidi, T.S. (1997)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **94**, 2088-2093.

Pigny, P., Guyonnet-Duperat, V., Hill, A.S., Pratt, W.S., Galiegue-Zouitina, S., d'Hooghe, M.C., Laine, A., van-Seuningen, I., Degand, P., Gum, J.R., Kim, Y.S., Swallow, D.M., Aubert, J.P., & Porchet, N. (1996)

Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics*, **38**, 340-352.

Porchet, N., Nguyen, V.C., Dufosse, J., Audie, J.P., Guyonnet-Duperat, V., Gross, M.S., Denis, C., Degand, P., Bernheim, A., & Aubert, J.P. (1991)

Molecular cloning and chromosomal localisation of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **175**, 414-422.

Porchet, N., Buisine, M.P., Desseyn, J.L., Moniaux, N., Nollet, S., Degand, P., Pigny, P., van Seuningen, I., Laine, A., & Aubert, J.P. (1999)

Gènes *MUC*: une superfamille de gènes? Vers une classification fonctionnelle des apomucines humaines.

Société de Biochimie de Lille, **193(1)**, (in press)

Pos, O., van der Stelt, M.E., Wolbink, G.J., Nijsten, M.W., van der Tempel, G.L., & van Dijk, W. (1990)

Changes in the serum concentration and the glycosylation of human α_1 -acid glycoprotein and α_1 -protease inhibitor in severely burned persons: relation to interleukin-6 levels.

Clin. Exp. Immunol., **82**, 579-582.

Prasanna, G., Dibas, A., Brown, K., & Yorio, T. (1998)

Activation of protein kinase C by tumor necrosis factor- α in human non-pigmented ciliary epithelium.

J. Ocul. Pharmacol. Ther., **14**, 401-412.

Ramphal, R., Arora, S.K., & Ritchings, B.W. (1996)

Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*.

Am. J. Respir. Crit. Care Med., **154**, S170-S174.

Ramphal, R., Carnoy, C., Fiebre, S., Michalski, J.C., Houdret, N., Lamblin, G., Strecker, G., & Roussel, P. (1991a)

Pseudomonas aeruginosa recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal β 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) disaccharide units.

Infect. Immun., **59**, 700-704.

Ramphal, R., Houdret, N., Koo, L., Lamblin, G., & Roussel, P. (1991b)

Differences in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucin glycopeptides from sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis.

Infect. Immun., **57**, 3066-3071.

Ramphal, R., & Pier, G.B. (1985)

Role of *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide in adherence to tracheal cells.

Infect. Immun., **47**, 1-4.

Ravdin, J.I., Stanley, P., Murphy, C.F., & Petri, W.A. Jr (1989)

Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin.

Infect. Immun., **57**, 2179-2186.

Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Boilly-Marer, Y., Verbert, A., & Delannoy, P. (1998)

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

Glycoconj. J., **15**, 19-27.

Reisin, I.L., Prat, A.G., Abraham, E.H., Amara, J.F., Gregory, R.J., Ausiello, D.A., & Cantiello, H.F. (1994)

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel.
J. Biol. Chem., **269**, 20584-20591.

Reynolds, H.Y., Merrill, W.M., Amento, E.P., & Naegel, G.P. (1978)

Immunoglobulin A in secretions from the lower human respiratory tract.
Adv. Exp. Med. Biol., **107**, 553-564.

Riordan, J.R. (1993)

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.
Annu. Rev. Physiol., **55**, 609-630.

Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.C., Iannuzzi, M.C., Collins, F.C., & Tsui, L.C. (1989)

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.
Science, **245**, 1066-1073.

Roberts, D.D., Olson, L.D., Barile, M.F., Ginsburg, V., & Krivan, H.C. (1989)

Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins.
J. Biol. Chem., **264**, 9289-9293.

Rosenstein, I.J., Yuen, C.T., Stoll, M.S., & Feizi, T. (1992)

Differences in the binding specificities of *Pseudomonas aeruginosa* M35 and *Escherichia coli* C600 for lipid-linked oligosaccharides with lactose-related core regions.
Infect. Immun., **60**, 5078-5084.

Rostand, K.S., & Esko, J.D. (1993)

Cholesterol and cholesterol esters: host receptors for *Pseudomonas aeruginosa* adherence.
J. Biol. Chem., **32**, 24053-24059.

Roum, J.H., Buhl, R., McElvaney, N.G., Borok, Z., & Crystal, R.G. (1993)

Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis.

J. Appl. Physiol., **75**, 2419-2424.

Roussel, P., & Lamblin, G. (1996)

Human mucosal mucins in diseases.

In : Glycoproteins and disease. Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G., & Schachter, H. (eds)

Elsevier, Amsterdam, pp 351-393.

Roussel, P., Lamblin, G., Lhermitte, M., Houdret, N., Lafitte, J.J., Perini, J.M., Klein, A., & Scharfman, A. (1988)

The complexity of mucins.

Biochimie, **70**, 1471-1482.

Saiman, I., & Prince, A. (1993)

Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialo-GM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells.

J. Clin. Invest., **92**, 1875-1880.

Sajjan, U., Reisman, J., Doig, P., Irvin, R.T., Forstner, G., & Forstner, J. (1992)

Binding of non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to normal intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis.

J. Clin. Invest., **89**, 657-665.

Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N., & Nishi, T. (1994a)

Expression cloning of a novel $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis^x carbohydrate determinant in leukocytes.

J. Biol. Chem., **269**, 14730-14737.

Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., & Nishi, T. (1994b)

Expression cloning of a GM3-specific α -2,8-sialyltransferase (GD3 synthase).

J. Biol. Chem., **269**, 15950-15956.

Sasaki, K., Sasaki, E., Kawashima, K., Hanai, N., Nishi, T. & Hasegawa, M. (1994c)

β -1,3-galactosyltransferase.

Patent: JP 1994181759-A 1 05-JUL-1994; KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD.

Sasaki, K., Kurata-Miura, K., Ujita, M., Angata, K., Nakagawa, S., Sekine, S., Nishi, T., & Fukuda, M. (1997)

Expression cloning of a cDNA encoding a human β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-*N*-acetyllactosamine biosynthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 14294-14299.

Savage, A.V., D'Arcy, S.M., & Donoghue, C.M. (1991)

Structural characterization of neutral oligosaccharides with blood-group A and H activity isolated from bovine submaxillary mucin.

Biochem. J., **279**, 95-103.

Scanlin, T.F., Wang, Y.M., & Glick, M.C. (1985)

Altered fucosylation of membrane glycoproteins from cystic fibrosis fibroblasts.

Pediatr. Res., **19**, 368-374.

Schachter, H., & Brockhausen, I. (1992)

The biosynthesis of Serine (Threonine)-*N*-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties.

In: *Glycoconjugates*. Allen, H.J., & Kasailus, E.C. (eds), New-York, Marcel Dekker, pp 263-332.

Scharfman, A., Kroczyński, H., Carnoy, C., van Brussel, E., Lamblin, G., Ramphal, R., & Roussel, P. (1996)

Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding

proteins are increased by limiting iron during growth.

Infect. Immun., **64**, 5417-5420.

Scheidegger, E.P., Sternberg, L.R., Roth, J., & Lowe, J.B. (1995)

A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells.

J. Biol. Chem., **270**, 22685-22688.

Schwartz, D.A., Quinn, T.J., Thorne, P.S., Sayeed, S., Yi, A.K., & Krieg, A.M. (1997)

CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract.

J. Clin. Invest., **100**, 68-73.

Schwiebert, E.M., Ega, M.E., Hwang, T.H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., & Guggino, W.B. (1995)

CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP.

Cell, **81**, 1063-1073.

Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., & Guggino, W.B. (1999)

CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel.

Physiol. Rev., **79**, S145-166.

Schwientek, T., Nomoto, M., Levery, S.B., Merkx, G., van Kessel, A.G., Bennett, E.P., Hollingsworth, M.A., & Clausen, H. (1999)

Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel $\beta(1,6)$ -N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4.

J. Biol. Chem., **274**, 4504-4512.

Scudder, P.R., Shailubhai, K., Duffin, K.L., Streeter, P.R., & Jacob, G.S. (1994)

Enzymatic synthesis of a 6'-sulphated sialyl-Lewis x which is an inhibitor of L-selectin binding to peripheral addressin.

Glycobiology, **4**, 929-932.

Seksek, O., Biwersi, J., & Verkman, A.S. (1996)

Evidence against defective trans-Golgi acidification in cystic fibrosis.

J. Biol. Chem., **271**, 15542-15548.

Shankar, V., Gilmore, M.S., Elkins, R.C., & Sachdev, G.P. (1994)

A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization.

Biochem. J., **300**, 295-298.

Shankar, V., Pichan, P., Eddy, R.L., Sait, S.N.J., Nowak, N., Shows, T.B., Elkins, R.C., Gilmore, M.S., & Sachdev, G.P. (1995)

A major airway mucin gene, *MUC8*: chromosomal localisation and cloning of the complementary DNA.

Glycoconj. J., **12**, S19 p. 497.

Shankar, V., Pichan, P., Eddy, R.L. Jr, Tonk, V., Nowak, N., Sait, S.N., Shows, T.B., Schultz, R.E., Gotway, G., Elkins, R.C., Gilmore, M.S., & Sachdev, G.P. (1997)

Chromosomal localization of a human mucin gene (*MUC8*) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **16**, 232-241.

Sheehan, J.K., & Carlstedt, I. (1990)

Electron microscopy of cervical-mucus glycoproteins and fragments therefrom.

Biochem. J., **265**, 169-178.

Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B.A., Greenberg, E.P., Valore, E.V., Welsh, M.J., Ganz, T., Tack, B.F., & Mc Cray, P.B. Jr (1998)

Production of β -defensins by human airway epithelia.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **95**, 14961-14966.

(Erratum : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1999) **96**, 2569)

Slayter, H.S., Lamblin, G., Le Treut, A., Galabert, C., Houdret, N., Degand, P., & Roussel, P. (1984)

Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein.

Eur. J. Biochem., **142**, 209-218.

Slomiany, B.L., Murty, V.L., Piotrowski, J., & Slomiany, A. (1996)

Salivary mucins in oral mucosal defense.

Gen. Pharmacol., **27**, 761-771.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., & Klenk, D.C. (1985)

Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Anal. Biochem., **150**, 76-85.

Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., & Welsh, M.G. (1996)

Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal surface fluid.

Cell, **85**, 229-236.

Soong, L.B., Ganz, T., Ellison, A., & Caughey, G.H. (1997)

Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum.

Inflamm. Res., **46**, 98-102.

Spiro, R.G., & Bhoyroo, V.D. (1988)

Occurrence of sulfate in the asparagine-linked complex carbohydrate units of thyroglobulin.

Identification and localization of galactose 3-sulfate and *N*-acetylglucosamine 6-sulfate residues in the human and calf proteins.

J. Biol. Chem., **263**, 14351-14358.

Spiro, R.G., Yasumoto, Y., & Bhoyroo, V. (1996)

Characterization of a rat liver Golgi sulphotransferase responsible for the 6-*O*-sulphation of *N*-acetylglucosamine residues in β -linkage to mannose: role in assembly of sialyl-galactosyl-*N*-acetylglucosamine 6-sulphate sequence of *N*-linked oligosaccharides.

Biochem. J., **319**, 209-216.

Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., & Boucher, R.C. (1995)

CFTR as a cAMP-dependant regulator of sodium channels.

Science, **269**, 847-850.

Tabary, O., Zahm, J.M., Hinnrasky, J., Couetil, J.P., Cornillet, P., Guenounou, M., Gaillard, D., Puchelle, E., & Jacquot, J. (1998)

Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells *in vivo* and *in vitro*.

Am. J. Pathol., **153**, 921-930.

Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Riordan, J.R., & Hanrahan, J.W. (1991)

Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene.

Nature, **352**, 628-631.

Temann, U.A., Prasad, B., Gallup, M.W., Basbaum, C., Ho, S.B., Flavell, R.A., & Rankin, J.A. (1997)

A novel role for murine IL-4 *in vivo*: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **16**, 471-478.

Toribara, N.W., Ho, S.B., Gum, E., Gum, J.R. Jr, Lau, P., & Kim, Y.S. (1997)

The carboxyl-terminal sequence of the human secretory mucin, *MUC6*.

J. Biol. Chem., **272**, 16398-16403.

Tosi, M.F., Zakem, H., & Berger, M. (1990)

Neutrophil elastase cleaves C3bi on *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch.

J. Clin. Invest., **86**, 300-308.

Travis, S.M., Conway, B.A., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Greenberg, E.P., & Welsh, M.J. (1999)

Activity of abundant antimicrobials of the human airway.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **20**, 872-879.

Tsui, L.C., & Durie, P. (1997)

Genotype and phenotype in cystic fibrosis.

Hosp. Pract. (Off Ed), **32**, 123-129.

Tsui, L.C., & Durie, P. (1997)

Genotype and phenotype in cystic fibrosis.

Hosp. Pract. (Off Ed), **32**, 115-8, 123-9, 134, passim.

Tsuji, S., Datta, A.K., & Paulson, J.C. (1996)

Systematic nomenclature for sialyltransferases.

Glycobiology, **6**, V-VII.

Tummler, B., Bosshammer, J., Breitenstein, S., Brockhausen, I., Gudowius, P., Herrmann, C., Herrmann, S., Heuer, T., Kubesch, P., Mekus, F., Romling, U., Schmidt, K.D., Spangenberg, C., & Walter, S. (1997)

Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.

Behring Inst. Mitt., **98**, 249-255.

Uchimura, K., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., Fan, Q.W., Kurosawa, N., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., & Muramatsu, T. (1998a)

Molecular cloning and characterization of an *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase.

J. Biol. Chem., **273**, 22577-22583.

Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., Yamamura, K., Ozaki, T., Nakagawara, A., Kadomatsu, K., & Muramatsu, T. (1998b)

Human *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells.

J. Biochem. (Tokyo), **124**, 670-678.

Van Dijk, W., Brinkman-Van der Linden, E.C., & Havenaar, E.C. (1998)

Occurrence and possible function of inflammation-induced expression of sialyl Lewis x on acute phase proteins.

Adv. Exp. Med. Biol., **435**, 145-150.

Van Halbeek, H., Breg, J., Vliegenthart, J.F., Klein, A., Lamblin, G., & Roussel, P. (1988)

Isolation and structural characterization of low-molecular-mass monosialyl oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis.

Eur. J. Biochem., **177**, 443-460.

Van Halbeek, H., Strang, A.M., Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G., & Roussel, P. (1994)

Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le(a+b-)) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure.

Glycobiology, **4**, 203-219.

Van Klinken, B.J., Einerhand, A.W., Buller, H.A., & Dekker, J. (1998)

The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins.

Glycobiology, **8**, 67-75.

Van Kuik, J.A., Breg, J., Kolsteeg, C.E.M., Kamerling, J.P., & Vliegenthart, J.F.G. (1978)

Primary structure of the acidic carbohydrate chain of hemocyanin from *Panulirus interruptus*

FEBS Lett., **221**, 150-154.

Variyam, E.P., & Hoskins, L.C. (1983)

In vitro degradation of gastric mucins. Carbohydrate side chains protect polypeptide core from pancreatic proteases.

Gastroenterology, **84**, 533-537.

Verma, M., & Davidson, E.A. (1993)

Mucin gene: structure, expression and regulation.

Glycoconj. J., **11**, 172-179.

Vinall, L.E., Hill, A.S., Pigny, P., Pratt, W.S., Toribara, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Porchet, N., Aubert, J.P., & Swallow, D. (1998)

Variable number tandem repeat polymorphism of the mucine genes located in the complex on 11p15.5.

Hum. Genet., **102**, 357-366.

Vishwanath, S., Ramphal, R., Guay, C.M., Desjardins, D., & Pier, G.B. (1988)

Respiratory-mucin inhibition of the opsonophagocytic killing of *Pseudomonas aeruginosa*.

Infect. Immun., **56**, 2218-2222.

Wanke, C.A., & Bistrrian, B. (1997)

Recombinant human tumor necrosis factor and recombinant murine interleukin-1 alter the binding of *Escherichia coli* to intestine, mucin glycoprotein, and the HT29-C1 intestinal cell line.

Nutrition, **13**, 959-964.

Wesley, A., Forstner, J., Qureshi, R., Mantle, M., & Forstner, G. (1983)

Human intestinal mucins in cystic fibrosis.

Pediatr. Res., **17**, 65-69.

Weston, B.W., Nair, R.P., Larsen, R.D., & Lowe, J.B. (1992a)

Isolation of a novel human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities.

J. Biol. Chem., **267**, 4152-4160.

Weston, B.W., Smith, P.L., Kelly, R.J., & Lowe, J.B. (1992b)

Molecular cloning of a fourth member of a human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x, and difucosyl sialyl Lewis x epitopes.

J. Biol. Chem., **267**, 24575-24584 (Erratum : *J. Biol. Chem.*, (1993) **268**, 18398)

Witko-Sarsat, V., Callen, R.C., Paulais, M., Nguyen, A.T., Bessou, G., Lenoir, G., & Descamps-Latscha, B. (1996)

Disturbed myeloperoxidase-dependant activity of neutrophils in cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, and its correction by amiloride.

J. Immunol., **157**, 2728-2735.

Xu, G., Forstner, G.G., & Forstner, J.F. (1996)

Interaction of heparin with synthetic peptides corresponding to the C-terminal domain of intestinal mucins.

Glycoconj. J., **13**, 81-90.

Yago, K., Zenita, K., Ginya, H., Sawada, M., Ohmori, K., Okuma, M., Kannagi, R., & Lowe J.B. (1993)

Expression of α -(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le(x) and sialyl Le(a), the carbohydrate ligands for E- and P-selectins, in human malignant cell lines.

Cancer Res., **53**, 5559-5565.

Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J., & Hakomori, S. (1990)

Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system.

Nature, **345**, 229-233.

Yanagidani, S., Uozumi, N., Ihara, Y., Miyoshi, E., Yamaguchi, N., & Taniguchi, N. (1997)

Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:N-acetyl- β -D-glucosaminide: α 1-6fucosyltransferase (α 1-6FucT) from human gastric cancer MKN45 cells.

J. Biochem. (Tokyo), **121**, 626-632.

Yeh, J.C., Ong, E., & Fukuda, M. (1999)

Molecular cloning and expression of a novel β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches.

J. Biol. Chem., **274**, 3215-3221.

Yonezawa, S., & Sato, E. (1997)

Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential.

Pathol. Int., **47**, 813-830.

Zham, J.M., Gaillard, D., Dupuit, F., Hinnrasky, J., Porteous, D., Dorin, J.R., & Puchelle, E. (1997)

Early inflammation in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice.

Am. J. Physiol., **272**, C853-C859.

Zhang, Y., Doranz, B., Yankaskas, J.R., & Engelhardt, J.F. (1995)

Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis.

J. Clin. Invest., **96**, 2997-3004.

Zhou, D., Dinder, A., Gutierrez-Gallego, R., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., Berger, E.G., & Hennet, T. (1999)

A β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase with poly-*N*-acetylactosamine synthase activity is structurally related to β -1,3-galactosyltransferase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 406-411.

Zielenski, J., & Tsui, L.C. (1995)

Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations.

Annu. Rev. Genetics, **29**, 777-807.

