

BBA 76616

SÉPARATION ET PURIFICATION DES SITES RÉCEPTEURS DE LA LECTINE DE *ROBINIA* ET DE LA CONCANAVALINE A, PRÉSENTS À LA SURFACE DES CELLULES HÉPATIQUES NORMALES ET TUMORALES (HÉPATOME DE ZAJDÉLA)

J. C. DIEVARD et R. BOURRILLON

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Lariboisière-St Louis, Université Paris VII, 45 rue des Saints Pères, Paris 6° (France)*

(Reçu le 4 décembre, 1973)

SUMMARY

Separation and purification of Robinia lectin and concanavalin A binding sites from the surface of normal and transformed hepatic cells (Zajdela's hepatoma)

This report describes separation and purification of cell-surface components possessing *Robinia* lectin and concanavalin A activities from rat normal liver and ascites hepatoma cells.

Limited treatment of both normal and transformed cells with trypsin releases a glycopeptide fraction from the cell surface. These fractions inhibit agglutination and (or) growth inhibition by *Robinia* lectin and concanavalin A, indicating that receptor sites for both lectins are components of the cell surface glycopeptide fraction.

The successive stages of purification of binding sites were followed by measuring the ability of the various fractions to inhibit the cell agglutination and cell growth with the corresponding lectins. The cell surface glycopeptide fraction was fractionated by repeated gel filtration into fractions, two of which are more than 50 times as effective as the trypsin proteolysate.

The differences in biological activities displayed by the cell surface lectin receptors from normal and transformed cells support the belief that these two types of binding sites are different.

INTRODUCTION

Les membranes cellulaires jouent un rôle déterminant dans le contrôle de la morphogénèse, de la croissance et de la différenciation par l'intermédiaire de macromolécules situées à leur surface. La transformation cellulaire par les virus oncogènes et par les carcinogènes provoque d'importantes modifications biochimiques de ces macromolécules et (ou) induit la synthèse de nouveaux déterminants antigéniques.

* Équipe de Recherches Associée au C.N.R.S. No. 321.

Ces antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses, mais pas des cellules normales, seraient l'une des expressions de la transformation cellulaire.

Ces modifications peuvent être révélées par les lectines qui provoquent l'agglutination des cellules tumorales [1-4] mais pas celle des cellules normales, stimulent la croissance de ces dernières, mais inhibent celle des cellules transformées [5-6]. Les actions des lectines sur les cellules impliquent leur interaction avec des sites récepteurs situés à la surface des membranes cellulaires [5]. Cette interaction restaure l'inhibition de contact cellulaire perdue au cours de la transformation cellulaire, et arrête la division anarchique des cellules [7].

Des observations, fondées sur l'action de diverses lectines sur des cellules normales ou transformées et leur inhibition par des haptènes glucidiques, suggèrent que des sites récepteurs de structures différentes sont présents sur les surfaces cellulaires. Un certain nombre de récepteurs cellulaires ont été partiellement purifiés à partir des érythrocytes [8-10], des lymphocytes humains ou de porc [11-12] et des cellules transformées [13-15]. Cependant, la comparaison directe des récepteurs n'a pas encore été réalisée et elle paraît indispensable pour établir une base moléculaire de la transformation cellulaire.

Le présent travail décrit la séparation et la purification des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A présents à la surface des cellules hépatiques normales et tumorales chez le rat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits chimiques: Les produits utilisés proviennent de la firme Merck. La lectine de *Robinia* est préparée dans le laboratoire à partir des graines de *Robinia pseudoacacia* [16]. La concanavaline A est obtenue de Sigma (Saint Louis, Mo., U.S.A.). L'homogénéité de ces deux phytohémagglutinines a été vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide [17].

Récolte des cellules

Les cellules transformées par l'hépatome de Zajdela, sont cultivées dans le liquide intraperitoneal de rats Charles River de 250 g. Huit jours après l'inoculation de 0.30 ml d'une suspension de cellules de cet hépatome, le liquide d'ascite est prélevé et centrifugé à $800 \times g$ pendant 5 min. Le culot cellulaire est lavé 3 fois avec une solution de 0.15 M NaCl. La concentration cellulaire est amenée à $1 \cdot 10^8$ cellules/ml.

Les cellules hépatiques de rat normal sont obtenues par dispersion mécanique du tissu hépatique dans une solution de 0.15 M NaCl; ce tissu est lentement écrasé à l'aide d'un pilon et passé à travers une toile à bluter nylon Monyl HC.

Protéolyse des cellules

Une suspension de cellules normales ou transformées (10^9 cellules dans 10 ml de solution 0.15 M NaCl), est additionnée de 20 µg de Trypsine TPCK (Sigma)/ml et incubée à 37 °C pendant 30 min; la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 20 µg/ml d'inhibiteur trypsique (Koch-Light Laboratories).

Les cellules sont séparées par centrifugation à $1000 \times g$ pendant 5 min. Le surnageant est concentré. La viabilité des cellules après cette protéolyse est déterminée par l'épreuve du bleu Trypan.

Gel filtration

Filtration sur colonne de Séphadex

Les Séphadex G 75 et G 50 (Pharmacia) sont mis à gonfler pendant une nuit dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0.05 M (pH 7.5). On laisse sédimenter la suspension 3 fois, en remplaçant le surnageant par un égal volume de tampon neuf.

Les suspensions finales sont introduites dans des colonnes de 2 cm de diamètre et elles sédimentent par gravité jusqu'à une hauteur de 110 cm. L'élution est effectuée par une solution de bicarbonate d'ammonium 0.05 M (pH 7.5). Le débit de la colonne est de 20 ml/h pour le Séphadex G 50 et de 16 ml/h pour le Séphadex G 75.

Filtration sur Biogel P 60

Deux colonnes (20 cm × 0.75 cm) de Biogel P 60 (Biorad Laboratories) sont équilibrées dans deux tampons différents.

L'une des colonnes est préparée dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0.1 M (pH 7.5), et la deuxième colonne est équilibrée dans de l'acétate de pyridine 0.1 M (pH 3). Dans les deux cas, les tampons d'équilibration sont utilisés pour l'élution.

Techniques d'analyse biochimiques

Les dosages des protéines et des constituants glucidiques ont été effectués selon des techniques rapportées par ailleurs [18]. Les déterminations en chromatographie gazeuse des constituants glucidiques sont réalisées après méthanolysé des produits, dans l'appareil Hewlett-Packard selon la technique de Chambers et Clamp [19].

Tests d'activité biologique

La purification et la séparation des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A sont suivies par trois méthodes fondées sur l'inhibition des propriétés agglutinante et mitotique de ces lectines.

(a) Inhibition de l'agglutination des érythrocytes par la lectine de *Robinia* et par la concanavaline A

La réaction est effectuée sur plaque d'opaline en ajoutant 15 µl d'une suspension d'érythrocytes humains (lectine de *Robinia*) ou de rat (concanavaline A) à 4%, à un mélange, incubé 3 min, de 3 µl d'une solution de lectine à 500 µl/ml et de 20 µl de dilutions de la solution à tester. Si le site est présent, il se fixe sur la lectine, laquelle alors n'agglutine plus les érythrocytes. L'unité d'inhibition de l'érythroagglutination (UIE) sera définie comme la quantité minimale d'haptène qui inhibe 4 doses agglutinantes de lectine.

(b) Inhibition de l'agglutination des cellules d'hépatome

La réaction d'agglutination est effectuée dans les godets de plaques à flocculation. 3 µl d'une solution de lectine à 500 µg/ml sont ajoutés à 20 µl d'une suspension de cellules d'hépatome à $1 \cdot 10^6$ cellules par ml. L'agglutination des cellules est observée au microscope inversé; le degré d'agglutination est fondé sur le nombre et la taille des grappes cellulaires par rapport aux cellules non agglutinées.

La réaction d'inhibition de la cytoagglutination est réalisée en ajoutant à la suspension de cellules d'hépatome un mélange préalablement incubé de 10 µl de la solution hapténique à tester et de 3 µl de la solution de lectine. L'inhibition de

la cytoagglutination est fondée sur l'absence d'amas cellulaire et l'observation d'un tapis cellulaire homogène.

(c) *Inhibition de l'action des lectines sur la croissance des cellules en culture*

Culture d'hépatocytes normaux. Les hépatocytes de rats normaux sont mis en culture dans des flacons Falcon à raison de $1 \cdot 10^6$ cellules par ml de milieu de Eagle additionné de 10% de sérum de veau. Le volume total est de 5 ml. Les cultures sont poursuivies durant 72 h sans renouvellement du milieu.

Des solutions de lectine de *Robinia* et de concanavaline A sont ajoutées à la concentration finale de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu de culture, correspondant à la quantité minimale de lectine provoquant la croissance maximum des hépatocytes normaux.

Culture d'hépatocytes tumoraux. Les cellules sont mises dans des tubes de Lejeune à raison de $2.5 \cdot 10^5$ cellules/ml de milieu de Eagle. Le volume total est de 5 ml. Les cultures sont poursuivies durant 8 h sans renouvellement du milieu.

Des solutions de lectine de *Robinia* et de concanavaline A sont ajoutées à la concentration finale de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu de culture, correspondant à la quantité minimale de lectine inhibant au maximum la croissance des hépatocytes tumoraux.

Inhibition hapténique. 0.05 ml de la solution de lectine à 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 0.1 ml de diverses dilutions de la solution hapténique à tester sont incubés pendant 15 h à 37 °C. Les mélanges sont ensuite ajoutés à 5 ml de suspensions cellulaires.

L'unité d'inhibition de l'action des lectines est définie comme la quantité minimale d'haptène qui inhibe à 100% l'action de la lectine sur la croissance des hépatocytes normaux ou transformés.

RESULTATS

Préparation et analyse de la fraction glycopeptidique cellulaire libérée par la trypsine

La libération par la trypsine des protéines et des constituants glucidiques des surfaces des cellules normales et transformées ainsi que celle des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A sont étudiées en fonction de la température. Il est observé un maximum de libération à 37 °C à la fois pour les constituants glucidiques et les sites récepteurs, sans modification sensible de la viabilité des cellules, celle-ci étant toujours supérieure à 90% (Tableau I).

Une étude analytique comparée entre les cellules normales et tumorales révèle qu'à 37 °C la trypsine libère trois fois plus de protéines et deux fois plus d'hexoses à partir des hépatocytes normaux qu'à partir des cellules d'ascite tumorale.

En outre, les activités biologiques des deux protéolysats libérés par la trypsine à 37 °C diffèrent considérablement. Le protéolysat provenant des cellules normales est sans effet sur l'action érythroagglutinante et l'inhibition de croissance des cellules tumorales provoquées par les lectines, même à des doses égales ou supérieures à 1000 μg ; ce même protéolysat inhibe l'action des lectines sur la croissance des hépatocytes normaux à la dose de 200 μg . Le protéolysat des cellules tumorales inhibe l'action des lectines sur l'érythroagglutination et sur l'inhibition de croissance des cellules transformées, respectivement aux doses de 15 et 150 μg ; par contre, il est sans effet sur l'action des lectines sur la croissance des cellules normales, même à des doses de 5000 μg .

L'analyse chimique des protéolysats des cellules normales et transformées (Tableau II, colonne 1) révèle certaines différences dans la composition en amino-

TABLEAU I

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA LIBÉRATION PAR LA TRYPSINE DES PROTÉINES, DES HEXOSES ET DES ACTIVITÉS DE SITES RÉCEPTEURS DE LA LECTINE DE *ROBINIA* ET DE LA CONCANAVALINE A, À PARTIR DE HÉPATOCYTES NORMAUX ET TUMORAUX (HÉPATOME DE ZAJDÉLA)

L'activité de sites récepteurs est exprimée par la quantité minimale d'haptène (en μg) qui inhibe à 100 % l'action des lectines. Les valeurs entre parenthèses expriment l'activité totale en unités d'inhibition.

	4 °C			20 °C			37 °C		
	Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux		Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux		Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux	
		Hépatocytes	tumoraux		Hépatocytes	tumoraux		Hépatocytes	tumoraux
Protéines libérées (mg)	50	15	55	20	5	20	80	25	5,5
Hexoses libérés (mg)	4,8	4	6						
Test de l'érythroagglutination									
de la lectine de <i>Robinia</i>	> 1000	25 (600)	> 1000				15 (1300)	> 1000	14 (1750)
de la concanavaline A	> 1000	30 (600)	> 1000				18 (1100)	> 1000	16 (1500)
Test de croissance des cellules normales									
de la lectine de <i>Robinia</i>	300 (140)	> 5000	225 (240)	> 5000			200 (400)	> 5000	
de la concanavaline A	300 (140)	> 5000	225 (240)	> 5000			200 (400)	> 5000	
Test de croissance des cellules transformées									
de la lectine de <i>Robinia</i>	> 8000	400 (38)	> 8000		250 (80)		> 8000		150 (170)
de la concanavaline A	> 8000	400 (38)	> 8000		250 (80)		> 8000		150 (170)
Viabilité des cellules (%)	96	96	94	93	93	93	93	91	

TABLEAU II

PROTÉINES ET CONSTITUANTS GLUCIDIQUES TOTAUX LIBÉRÉS DANS LE PROTÉOLYSAT TOTAL ET DANS LES FRACTIONS PURIFIÉES DES CELLULES NORMALES ET TRANSFORMÉES

Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

	Protéolysat total		Fraction F.4		Fraction F.4.B		Fraction F.4.C	
	Hépatocytes normaux		Hépatocytes tumoraux		Hépatocytes normaux		Hépatocytes tumoraux	
	Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux	Hépatocytes tumoraux	Hépatocytes normaux	Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux	Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux
Protéines	85	83	78	77	66	68	84	77
Composés glucidiques	15	17	23	23	35	32	17	23
Acide aspartique	1.05	2.49	1.35	2.32	1.30	2.04	0.84	1.40
Thréonine	2.55	2.49	2.34	2.54	2.60	2.20	9.24	9.24
Sérine	5.40	4.20	1.75	1.64	2.70	2.72	6.50	7.20
Acide glutamique	5.55	7.47	1.95	1.80	7.84	6.85	19.80	18.10
Proline	7.20	5.81	4.29	4.62	3.95	3.40	5.04	5.39
Glycine	17.3	16.65	22.10	21.70	7.15	6.80	10.80	7.20
Alanine	16.5	14.14	19.90	20.0	5.52	6.46	7.30	6.50
Valine	4.25	4.15	4.68	3.85	2.60	2.72	5.04	5.10
Isoleucine	2.55	3.32	2.34	2.32	3.25	2.72	2.52	2.80
Leucine	5.60	4.20	2.36	1.61	1.96	2.38	4.20	3.85
Tyrosine	2.55	2.49	1.85	1.92	10.50	10.80	1.26	1.54
Phénylalanine	2.55	2.49	1.95	1.15	4.22	6.16	0.96	0.77
Lysine	6.80	6.64	4.20	3.85	7.80	8.16	5.04	5.39
Histidine	1.25	1.66	2.34	3.80	1.30	2.72	1.50	1.54
Arginine	2.55	3.32	2.40	2.31	1.30	1.36	0.95	0.77
Méthionine	1.75	1.05	1.17	1.15	0.65	0.68	0.84	0.77
Mannose	3.7	4.55	7.20	7.4	10.1	10.9	4.52	4.37
Galactose	3.7	4.55	1.20	3.0	7.20	6.9	4.96	6.90
Glucose	0.25	0.30	2.5	2.10	2.10	2.0	1.92	3.45
Glucosamine	2.1	5.60	9.0	9.6	12.5	11.4	5.0	7.69
Acide N-acétyl neuraminique	5.4	2.1	3.1	1.0	3.1	1.7	1.50	0.70

acides; en particulier, le protéolysat des cellules transformées contient plus d'acides aspartique et glutamique tandis que le protéolysat des cellules normales contient plus de sérine, proline, leucine et méthionine. La composition en hexoses et le rapport mannose/galactose sont semblables pour les deux types de cellules; au contraire, le taux de glucosamine est plus élevé dans les cellules transformées et celui de l'acide sialique est plus élevé dans les cellules normales.

*Séparation des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A*

Les protéolysats des cellules normales et des cellules transformées sont concentrés à faible volume. Des quantités semblables (soit 2.5 mg de constituants glucidiques) de protéolysat des cellules normales et transformées sont filtrées sur une colonne de Séphadex G 75. Les déterminations des hexoses et de l'absorption à 280 nm permettent de séparer quatre fractions à partir des deux types de protéolysats (Fig. 1).

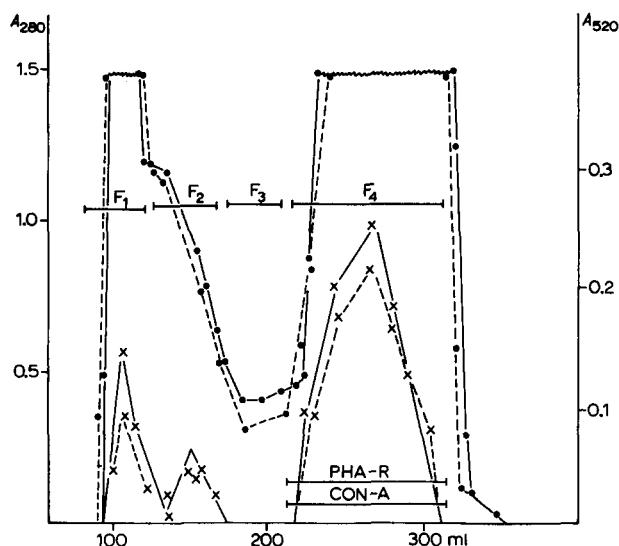


Fig. 1. Gel filtration sur colonne de Séphadex G 75 (110 cm × 1.75 cm) dans le bicarbonate d'ammonium 0.01 M, des protéolysats des cellules normales (trait plein) et tumorales (trait discontinu). Dosage des protéines (●) par absorption à 280 nm et des hexoses (×) par dosage avec l'orcinol à 520 nm dans chaque tube (7 ml) recueilli au cours de l'élution. Les contenus des tubes sont réunis selon les barres noires. PHA-R, lectine de *Robinia*; CON-A, concanavaline A.

Les fractions F1 et F2, mieux individualisées par les dosages des hexoses présentent le poids moléculaire le plus élevé et contiennent 50% des protéines des protéolysats totaux mais seulement 25% des constituants glucidiques et 20% des activités biologiques.

La fraction F3 est insignifiante et elle est éliminée. La fraction F4, la plus retardée, contient la majeure partie des sites récepteurs des deux lectines et des constituants glucidiques présents dans les protéolysats. La fraction F4 des cellules normales et transformées est ensuite résolue sur une colonne de Séphadex G 50. Les

déterminations des protéines et des hexoses dans les fractions effluentes permettent de distinguer 4 pics. Le pic A, de poids moléculaire le plus élevé, ne présente aucune activité de sites récepteurs. Les pics B et C sont de nature glycopeptidique et leur poids moléculaire se situe entre 2500 et 5000. Le Tableau II rapporte l'analyse chimique des deux fractions B et C qui révèle des différences entre les cellules normales et transformées.

Il apparaît que la fraction F4.B des cellules transformées contient plus d'acide aspartique, de phénylalanine et d'histidine, et moins d'acide sialique que la fraction correspondante des cellules normales, les autres constituants étant en proportion semblables dans les deux types de cellules. La fraction F4.C des cellules transformées contient plus de galactose, glucose et glucosamine, et moins d'acide sialique que la fraction F4.C des cellules normales; en outre, celle-ci contient plus de glycine et moins d'acide aspartique. Enfin, un résultat capital de cette opération réside dans la séparation des activités de sites récepteurs de la lectine de *Robinia* (pic B) et de la concanavaline A (pic C) (Fig. 2 et Tableau III).

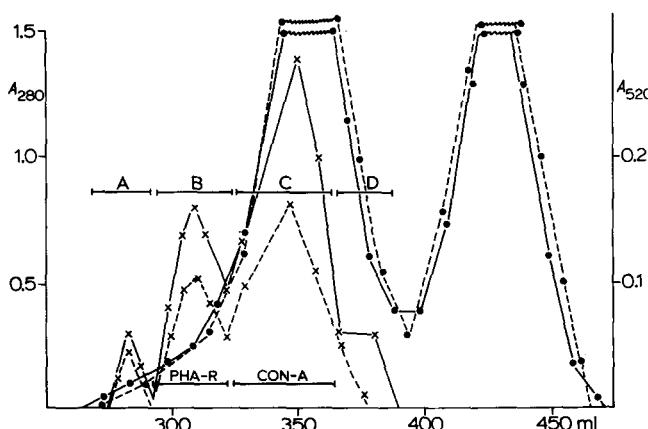


Fig. 2. Résolution par gel filtration sur Séphadex G 50 (110 cm × 2.5 cm) dans le bicarbonate d'ammonium 0.01 M des fractions F4 (voir Fig. 1). Mêmes légendes que pour la Fig. 1.

Purification des sites récepteurs par affinité de liaison

Les fractions B et C ainsi préparées par gel filtration sont incubées séparément avec la lectine de *Robinia* (fraction B) et la concanavaline A (fraction C) à 37 °C pendant 30 min dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0.1 M (pH 7.5).

Après ce temps les mélanges d'incubation sont filtrés sur une colonne de Biogel P 60, équilibrée dans le bicarbonate d'ammonium 0.1 M, pH 7.5 (Fig. 3a1 et 3a2).

Les complexes lectine-sites et la lectine en excès sont exclus de la colonne (pics P1), tandis que les glycopeptides non complexés sont retardés (pics P2). Par les tests d'agglutination et de croissance cellulaire, il est montré que toutes les fractions retardées P2 sont inactives, suggérant que les sites se sont combinés en totalité à leurs lectines respectives.

La dissociation du complexe site récepteur-lectine est obtenue en acidifiant

TABLEAU III

BILAN DE LA RÉPARTITION DES PROTÉINES ET DES HEXOSES (EN μg POUR $1 \cdot 10^9$ CELLULES), DES ACTIVITÉS TOTALES ET SPÉCIFIQUES DE SITES RÉCEPTEURS DE LA LECTINE DE *ROBINIA* ET DE LA CONCANAVALINE A AU COURS DE LEUR PURIFICATION

L'activité de sites récepteurs est exprimée en unité d'inhibition de la croissance ou (et) de l'érythroagglutination pour $1 \cdot 10^9$ cellules. Les valeurs entre parenthèses expriment la valeur de l'activité spécifique.

Protéines	Hexoses			Test de croissance des cellules transformées (Hépatocytes tumoraux)			Test d'érythroagglutination (Hépatocytes tumoraux)		
	Hépatocytes normaux	Hépatocytes tumoraux	Hépatocytes normaux	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavagine A	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavagine A	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavagine A
Protéolysat total	80	25	10	5.5	400 (5)	400 (5)	170 (7)	170 (7)	1750 (70)
Fraction F.1+F.2	36	10	2.8	1.5	100	100	40	40	375
Fraction F.4	40	15	7.0	4.3	350 (6)	350 (6)	140 (15)	140 (15)	1450 (165)
Fraction F4.A	4.6	1.5	0.65	0.45					
Fraction F4.B	6.5	3.5	2.7	1.1	270 (34)	70	125 (42)	20	1300 (433)
Fraction F4.C	30	10.5	3.5	2.5	50	270 (8)	20	125 (23)	200
Fraction F4.B.P1.b	0.40	0.30	0.30	0.25	200 (500)	100 (333)			1000 (135)
Fraction F4.C.P1.b	0.35	0.25	0.25	0.20	200 (570)	100 (400)			800 (3200)

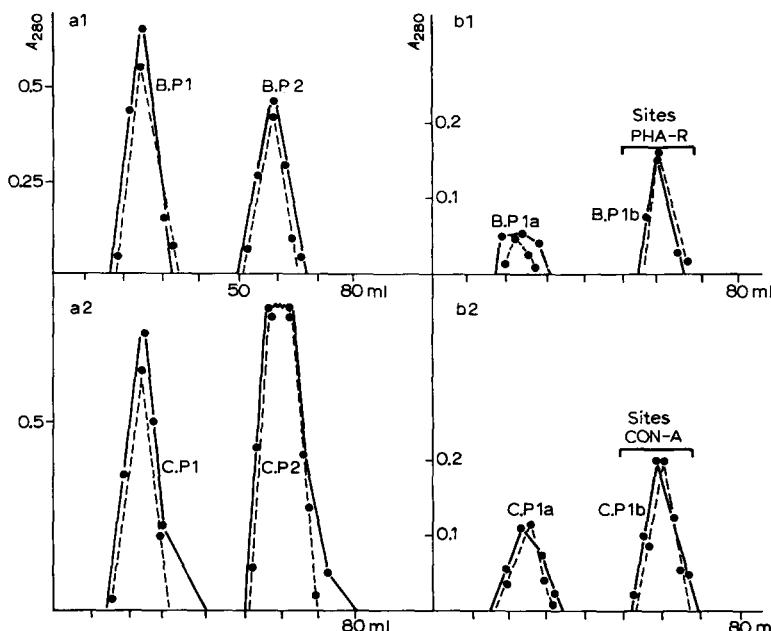


Fig. 3. Purification des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A. (a) Filtration sur colonne de Biogel P 60 ($20\text{ cm} \times 0.75\text{ cm}$) dans le bicarbonate d'ammonium 0.1 M (pH 7.5) des complexes de ces deux lectines et des fractions B et C obtenues selon la Fig. 2. a1, lectine de *Robinia*; a2, concanavaline A. (b) Dissociation des complexes B.P1 et C.P1 obtenus en (a) et séparation des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* B.P1b et de la concanavaline A (C.P1b). b1, lectine de *Robinia*; b2 concanavaline A. La filtration est effectuée sur colonnes de Biogel P 60 ($20\text{ cm} \times 0.75\text{ cm}$), dans l'acétate de pyridine 0.1 M (pH 3). Mêmes légendes que pour la Fig. 1.

le milieu à pH 2.5 par l'acide acétique 1 M. La lectine en excès et la lectine ainsi libérée des complexes sont précipitées par l'éthanol à 80%. Le surnageant qui contient les sites récepteurs est concentré sous vide et purifié sur colonne de Biogel P 60 équilibré dans l'acétate de pyridine 0.1 M, pH 3 (Fig. 3b1 et 3b2).

Une petite quantité de lectine non précipitée par l'éthanol est exclue (pics P1a) et séparée des pics P1b qui contiennent les sites récepteurs.

Activités biologiques des sites récepteurs purifiés

Le bilan des activités des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A présents à la surface des cellules normales et transformées, aux différentes étapes de leur purification, est rapporté dans le Tableau III.

Le rendement de la préparation des sites récepteurs de ces deux lectines, présents sur les cellules normales, est de 50%. Leur activité spécifique est multipliée par un facteur de 100 entre la première et la dernière étape de leur purification. Dans le cas des cellules transformées le rendement de préparation est de 71% pour la lectine de *Robinia* et de 62% pour celui de la concanavaline A. L'activité spécifique est multipliée pour les deux sites par un facteur de 54.

Le Tableau IV rapporte les activités biologiques des sites récepteurs purifiés des deux lectines. Les sites des cellules normales n'inhibent pas les actions des deux

TABLEAU IV

ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES SITES RÉCEPTEURS PURIFIÉS DE LA LECTINE DE *ROBINIA* ET DE LA CONCANAVALINE A PRÉSENTS À LA SURFACE DES CELLULES NORMALES ET DES CELLULES TRANSFORMÉES.

Les résultats expriment la quantité minimale de récepteurs (en µg) inhibant à 100 % l'action des lectines.

	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavine A	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavine A	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavine A	Lectine de <i>Robinia</i>	Concanavine A
	Test de croissance des cellules normales	Test de croissance des cellules tumorales	Test d'érythro- agglutination	Test d'érythro- agglutination	Test de cytoagglutination			
Sites récepteurs des cellules normales								
de la lectine de <i>Robinia</i>	3	> 700	> 700	> 700	> 700	> 700	> 700	> 700
de la concanavagine A	> 700	3	> 700	> 700	> 700	> 700	> 700	> 700
Sites récepteurs des cellules transformées								
de la lectine de <i>Robinia</i>	> 500	> 500	5.5	> 500	0.5	500	8	> 700
de la concanavagine A	> 500	> 500	> 500	4.5	> 500	0.5	> 700	8

lectines sur l'érythroagglutination et sur la croissance des cellules transformées même à la dose de 700 µg. Au contraire, le site récepteur de la lectine de *Robinia* sur les cellules normales inhibe, à la dose de 3 µg, l'action de cette lectine sur la croissance des cellules normales; il est sans effet sur l'action de la concanavaline A, même à la dose 700 µg. De même, le site de la concanavaline A purifié des cellules normales inhibe seulement l'action de cette lectine sur la croissance des cellules normales à la dose de 3 µg.

Les sites récepteurs des cellules transformées n'inhibent pas l'action des lectines sur la croissance des cellules normales, même à des doses de 500 µg. Le site récepteur de la lectine de *Robinia*, présent à la surface des cellules transformées inhibe l'action de cette lectine sur l'érythroagglutination et sur la croissance des cellules transformées, respectivement aux doses minimales de 0.5 et 5.5 µg. Ce site récepteur est sans effet sur les activités de la concanavaline A, même pour des doses supérieures à 500 µg.

De même le site récepteur purifié de la concanavaline A, présent sur les cellules transformées, inhibe l'action de cette lectine sur l'érythroagglutination et sur la croissance des cellules transformées aux doses de 0.5 et de 4.5 µg. Ce site est sans effet inhibiteur sur les activités de la lectine de *Robinia*, même à des doses supérieures à 500 µg.

La lectine de *Robinia* et la concanavaline A agglutinent les cellules transformées mais pas les cellules normales. Les sites récepteurs purifiés des deux lectines isolés de la surface des cellules normales n'inhibent pas l'action cytoagglutinante de ces lectines, même à des doses supérieures à 700 µg. Au contraire et à la dose de 8 µg, l'agglutination par les lectines des cellules transformées est inhibée spécifiquement par les sites récepteurs purifiés de chaque lectine, présents à la surface des cellules transformées.

Ces résultats suggèrent que les sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et ceux de la concanavaline A sont différents pour un même type de cellule et que les sites d'une même lectine sont différents selon l'état normal ou transformé de la cellule.

DISCUSSION

Puisque, dans la majorité des cas, les cellules normales et transformées fixent des quantités semblables de lectines (réfs 20, 21; Dievard et Bourrillon, résultats non publiés), pourquoi la croissance des cellules tumorales, agglutinables, est-elle inhibée par ces agglutinines alors que la croissance des cellules normales, non agglutinables est stimulée? L'action des lectines mitogènes sur les cellules résultant de leur liaison à des sites récepteurs membranaires [5, 22, 23], il apparaît que ces différences dans les propriétés des cellules normales et tumorales, révélées par les lectines, sont liées à des altérations des surfaces membranaires accompagnant la transformation maligne [1, 2, 7]. Ces altérations intéresseraient la structure chimique [24] et (ou) la distribution topologique [25] des sites récepteurs cellulaires de lectines.

Afin de vérifier cette interprétation, une comparaison des caractéristiques chimiques et des propriétés de liaison aux lectines de sites récepteurs présents à la surface des cellules normales et transformées, s'avérait indispensable.

Comme dans le cas des érythrocytes [26] et des cellules en lignée continue [13-15, 27-29], la protéolyse limitée des hépatocytes normaux et tumoraux de rat libère des fractions de nature glycopeptidique dont certaines ont conservé la capacité de se lier aux lectines et d'inhiber leur action sur l'agglutination ou la croissance des

cellules dont elles proviennent. Ces résultats indiquent que les protéolysats contiennent les sites cellulaires de liaison aux lectines, ou une partie d'entre eux, et que ces sites sont situés à la surface cellulaire. En outre, l'analyse chimique de ces protéolysats révèle un pourcentage en acide sialique plus faible dans les hépatocytes tumoraux, résultat qui a généralement été observé dans l'analyse chimique comparée des cellules normales et transformées [30-32], bien que d'autres analyses n'aient révélé aucune modification [33] ou même une augmentation de l'acide sialique après transformation maligne [28, 34-35].

La résolution des sites récepteurs cellulaires de la concanavaline A et de la lectine de *Robinia* a été obtenue, et des fractions possédant une puissante activité inhibitrice dirigée spécifiquement sur l'une ou l'autre de ces lectines, ont été préparées à partir des hépatocytes normaux et tumoraux. Une telle résolution a aussi été rapportée pour les cellules d'ascite de Novikoff [14] et pour les cellules AS-300 D [15] avec la concanavaline A et la lectine du germe de blé. Ces résolutions suggèrent des différences de structure ou (et) de topologie des sites récepteurs de lectine sur une même cellule. Il est toutefois possible que ces sites récepteurs fassent partie d'une même glycoprotéine principale et qu'ils soient séparés au cours de clivage protéolytique. L'existence d'un glycopeptide polyvalent agissant comme site récepteur de trois lectines a été démontré dans la membrane d'érythrocyte humain [10].

En outre, chaque fraction, spécifiquement inhibitrice d'une lectine, est aussi spécifique du type de cellule dont elle provient, c'est-à-dire qu'elle inhibe seulement l'action d'une lectine sur la croissance des cellules normales ou des cellules transformées. Ces résultats suggèrent que les sites récepteurs cellulaires de lectine sont différents sur les cellules normales et transformées.

Ainsi une lectine possèderait au moins deux sites de fixation différents. Un site agglutinant se fixant sur des sites membranaires présents sur les cellules tumorales ou les érythrocytes, et entraînant l'agglutination de ces cellules; ces sites seraient absents ou masqués dans les cellules normales. Un site mitogénique se fixant sur les sites cellulaires présents seulement sur les cellules normales et induisant la croissance cellulaire. Le schéma de la Fig. 4 résume cette hypothèse du mode d'action différent

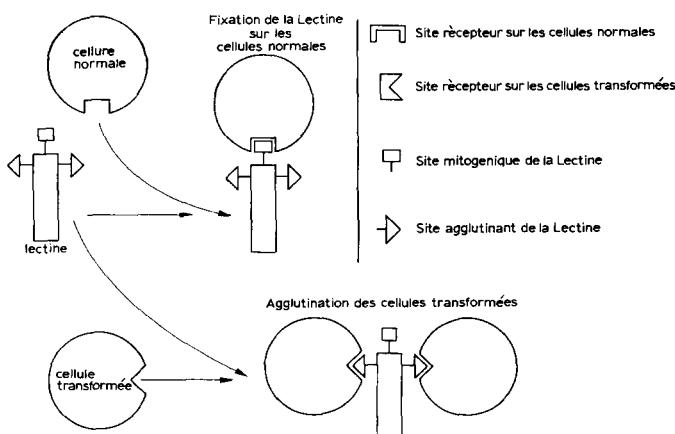


Fig. 4. Modèle proposé pour l'action des lectines sur les cellules.

des lectines sur les cellules normales et transformées. Cette hypothèse est à rapprocher des résultats obtenus avec la lectine de *Phaseolus vulgaris* dans laquelle les activités érythroagglutinante et mitotique sont séparées et portées par deux types différents de sous unités [36].

RÉSUMÉ

Dans ce rapport sont décrites la séparation et la purification des constituants de la surface cellulaire possédant des activités vis à vis de la lectine de *Robinia pseudoacacia* et de la concanavaline A. Celles-ci sont réalisées à partir des cellules normales de foie de rat et d'un hépatome ascitique.

Le traitement limité des cellules normales et transformées par la trypsine libère des fractions glycopeptidiques à partir de la surface cellulaire. Ces fractions inhibent l'agglutination et (ou) l'inhibition de croissance induites par la lectine de *Robinia* et la concanavaline A, ce qui indique que les sites récepteurs de ces lectines sont des constituants de la fraction glycopeptidique de la surface cellulaire.

Les étapes de purification de ces sites récepteurs sont suivies en mesurant le pouvoir de ces diverses fractions d'inhiber l'agglutination et la croissance cellulaires induites par les lectines correspondantes.

Les fractions glycopeptidiques de surface cellulaire sont séparées par des gel-filtration répétées en sous fractions dont 2 sont plus de 50 fois plus actives que le trypsinisat de départ.

Les différences dans les activités biologiques montrées par les récepteurs cellulaires des lectines à partir des cellules normales et transformées sont un argument en faveur d'une différence entre les 2 types de sites de liaisons.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Docteur Zajdela, Directeur de Recherches à l'INSERM (Institut du Radium à Orsay) pour les aimables dons de cellules d'ascite tumorale, Mademoiselle Font qui nous a fourni la lectine de *Robinia* et Mademoiselle Aubery qui a effectué les tests de croissance cellulaire. Ce travail a été subventionné par la D.G.R.S.T. (Convention No. 71-7-3183), l'INSERM (Action Thématique No. 7114232) et la D.R.M.E. (Convention No. 72-34-620-00-480-75-01).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Aub, J. C., Tieslau, C. et Lankester, A. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 59, 613-619
- 2 Aub, J. C., Sanford, B. H. et Cote, G. N. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 396-399
- 3 Burger, M. M. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62, 994-1001
- 4 Inbar, M. et Sachs, L. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 1418-1425
- 5 Nowell, P. (1960) Cancer Res. 20, 462-466
- 6 Aubery, M., Font, J. et Bourrillon, R. (1972) Exp. Cell. Res. 71, 59-64
- 7 Burger, M. M. et Noonan, K. D. (1970) Nature (London) 228, 512-515
- 8 Kornfeld, R. et Kornfeld, S. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2536-2545
- 9 Kornfeld, S., Rogers, S. et Gregory, W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6581-6586
- 10 Leseney, A. M., Bourrillon, R. et Kornfeld, S. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 831-836
- 11 Allan, D., Auger, J. et Crumpton, M. J. (1972) Nat. New Biol. 236, 23-25

- 12 Hayman, M. J. et Crumpton, M. J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 923-930
- 13 Burger, M. M. (1968) *Nature (London)* 219, 499-500
- 14 Wray, Y. P. et Walborg, E. F. (1971) *Cancer Res.* 31, 2072-2079
- 15 Smith, D. F., Neri, G. et Walborg, E. F. (1973) *Biochemistry* 12, 2111-2118
- 16 Bourrillon, R. et Font, J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 154, 28-39
- 17 Rodbard, D. et Chrambach, A. (1971) *Anal. Biochem.* 40, 95-134
- 18 Bourrillon, R. et Vernay, J. L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 117, 319-330
- 19 Chambers, R. E. et Clamp, J. R. (1971) *Biochem. J.* 125, 1009-1018
- 20 Cline, M. J. et Livingstone, D. C. (1971) *Nat. New Biol.* 232, 155-156
- 21 Ozane, B. et Sambrook, J. (1971) *Nat. New Biol.* 232, 156-160
- 22 Powell, A. E. et Leon, M. A. (1970) *Exp. Cell. Res.* 62, 315-325
- 23 Novogrosky, A. et Katchalsky, E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 228, 579-583
- 24 Martinez-Palomo, A. (1970) *Int. Rev. Cytol.* 29, 29-75
- 25 Nicolson, G. L. (1971) *Nat. New Biol.* 233, 244-246
- 26 Langley, O. K. et Ambrose, E. J. (1964) *Nature (London)* 204, 53-54
- 27 Kornfeld, S. et Kornfeld, R. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 63, 1439-1443
- 28 Buck, C. A., Glick, M. C. et Warren, L. (1970) *Biochemistry* 9, 4567-4576
- 29 Codington, J. F., Sanford, B. H. et Jeanloz, R. W. (1972) *Biochemistry* 11, 2559-2564
- 30 Ohta, N., Pardee, A. B. et Auslan, B. R. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 158, 98-102
- 31 Wu, H. C., Meezan, E., Black, P. H. et Robbins, P. W. (1969) *Biochemistry* 8, 2509-2517
- 32 Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H. et Robbins, P. W. (1969) *Biochemistry* 8, 2518-2524
- 33 Sakiyama, H. et Burge, B. W. (1972) *Biochemistry* 11, 1366-1377
- 34 Buck, C. A., Glick, M. C. et Warren, L. (1971) *Biochemistry* 10, 2176-2180
- 35 Buck, C. A., Glick, M. C. et Warren, L. (1971) *Science* 172, 169-171
- 36 Weber, T. H., Norman, C. T. et Grasbeck, R. (1967) *Scand. J. Haematol.* 4, 77-80