

50376 1974 109

MÉMOIRE

PRÉSENTE A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÉS SCIENCES NATURELLES

OPTION BIOCHIMIE

par

Bernard BAYARD

ÉTUDES SUR LES GLYCOPROTÉINES

- 1° Recherches de procédés de coupure des chaînes glycanniques et description d'un procédé de carte chromatographique des oligosaccharides obtenus.
- 2° Mise en évidence et structure du noyau oligosaccharidique commun aux glycannes de l'ovomucoïde, de la transferrine, de la lactotransferrine, de la fétuine et de l'orosomucoïde. Hypothèse concernant son mode de biosynthèse.



présenté le 6 Mars 1974 devant la Commission d'Examen

MM. J. MONTREUIL, Président
J. DEFAYE, Rapporteur
H. CLAUSER, Examinateur
G. BISERTE, Examinateur

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Madame D. ROUX, sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille -Institut Jules DRIESSENS- (Directeur : Professeur G. BISERTE).

Il a bénéficié d'une aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Actions Concertées - Convention 66-CR-228), de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (Opération "Espoir") et du Commissariat à l'Energie Atomique. A MES PARENTS

Par votre travail incessant et votre enthousiasme vous m'avez donné l'exemple de l'effort et de la persévérance. Vos encouragements et votre aide m'ont permis d'aborder mes études avec confiance.

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance.

A MA FEMME

- A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, Je vous exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe et vous remercie pour le choix judicieux du sujet de recherche que vous m'avez confié.
- A Monsieur le Professeur G. BISERTE, Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de corriger et de juger ce travail, je vous remercie vivement et suis très honoré de votre présence parmi les membres de mon jury de thèse.
- A Monsieur J. DEFAYE, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui nous a fait bénéficié de sa compétence scientifique en discutant et corrigeant ce travail. Que ce mémoire soit l'occasion pour nous de lui témoigner notre respectueux attachement.
- A Monsieur le Professeur H. CLAUSER, Vous avez, en qualité de parrain au C.N.R.S., suivi attentivement nos travaux, je vous exprime ma profonde gratitude.
- Nous remercions MM. BOUQUELET, FOURNET et STRECKER pour leur amicale collaboration scientifique.
- Nous remercions vivement Madame D. ROUX et Monsieur Yves LEROY pour leur haute compétence technique, leur conscience et leur gentillesse. De par leurs qualités, ils ont largement contribué à la réalisation de ce mémoire.
- Nous remercions également Mademoiselle DEMAY, Secrétaire, à qui nous devons la frappe de ce mémoire ainsi que Madame et Monsieur GARET, Photographes.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

м.	BACCHUS Pierre	Astronomie
Μ.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
Μ.	BECART Maurice	Physique
М.	BIAYS Pierre	Géographie
М.	BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
Μ.	BONTE Antoine	Géologie Appliquée
М.	BOUGHON Pierre	Mathématiques
М.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
Μ.	CELET Paul	Géologie
Μ.	CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
Μ.	CORSIN Pierre	Paléobotanique
Μ.	DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
Μ.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
Μ.	DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
Μ.	FAURE Robert	Mécanique
Μ.	FOURET René	Physique
Μ.	GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
Μ.	GLACET Charles	Chimie Organique
Μ.	GONTIER Gérard	Mécanique
Μ.	GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
Μ.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
М.	LANSRAUX Guy	Physique
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
Μ.	LOMBARD Jacques	Sociologie
Μ.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Μ.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
М.	MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
Μ.	POUZET Pierre	Informatique (Lille)
Μ.	PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
Μ.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

м.	TRIDOT Gabriel	Chimie
м.	VAILLANT Jean	Mathématiques
м.	VIDAL Pierre	Automatique
М.	VIVIER Emile	Biologie Animale
м.	WERTHEIMER Raymond	Physique
м.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

М.	BOUISSET Simon	Physiologie Animale
М.	DELHAYE Michel	Chimie
М.	DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
М.	LEBRUN André	Electronique (Lille)
Μ.	LEHMANN Daniel	Mathématiques
М.	LINDER Robert	Botanique
М.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
М.	PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
Μ.	SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physique Physique

М.	BELLET Jean
Μ.	BILLARD Jean
М.	BODARD Marcel
Μ.	BOILLET Pierre
Μ.	BONNOT Ernest
Μ.	BRIDOUX Michel
М.	CAPURON Alfred
Μ.	DEPREZ Gilbert
М.	DEVRAINNE Pierre
Μ.	GOUDMAND Pierre
Μ.	GRUSON Laurent
Μ.	GUILBAULT Pierre
М.	LABLACHE-COMBIER Alain
Μ.	LACOSTE Louis
М.	LANDAIS Jean
Mme	LEHMANN Josiane
Μ.	LOUCHEUX Claude
М.	MAES Serge
M1e	MARQUET Simone
Μ.	MONTEL Marc
Μ.	MONTUELLE Bernard
Μ.	PANET Marius
Μ.	SALMER Georges
М.	SEGUIER Guy

Botanique Physique **Biologie** I.U.T. Béthune Chimie Minérale I.U.T. Lille Chimie Minérale Chimie Physique Mathématiques **Biologie** Chimie Biologie Chimie Mathématiques Chimie Physique Mathématiques Physique I.U.T. Lille I.E.E.A. I.E.E.A. I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

Μ.	ADAM Michel
Μ.	ANDRE Charles
Μ.	ANGRAND Jean-Pierre
Μ.	ANTOINE Philippe
Μ.	AUBIN Thierry
Μ.	BART André

Economie Politique Sciences Economiques Géographie Mathématiques Biologie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

Μ. BEGUIN Paul BKOUCHE Rudolphe М. м. BOILLY Bénoni BONNEMAIN Jean+Louis Μ. м. BOSCQ Denis Μ. BREZINSKI Claude Μ. BRUYELLE Pierre M. CARREZ Christian CORDONNIER Vincent М. CORTOIS Jean М. Μ. COQUERY Jean-Louis Μ. CCULON Jean Mle DACCHARI Monique M. DEBOURSE Jean-Pierre DEBRABANT Pierre М. Μ. DELAUNAY Jean-Claude M. DERIEUX Jean-Claude Μ. DOUKHAN Jean-Claude М. DRIEUX Baudouin DUEE Gérard Μ. DYMENT Arthur м. M. ESCAIG Bertrand Mme EVRARD Micheline M. FONTAINE Jacques-Marie Μ. FOURNET Bernard M. **RROELICH** Daniel M. GAMBLIN André Μ. GOBLOT Rémi М. GOSSELIN Gabriel M. GRANELLE Jean-Jacques M. GUILLAUME Henri M. HECTOR Joseph M. HERMAN Maurice Μ. HUARD DE LA MARRE Pierre Μ. JOURNEL Gérard Mle KOSMANN Yvette M. KREMBEL Jean LAURENT François М. Mle LEGRAND Denise Mle LEGRAND Solange M. LENTACKER Firmin M. LEROY Jean-Marie LEROY Yves М. Μ. LHENAFF René Μ. LOCQUENEUX Robert Μ. LOUAGE Francis M. MANIEU Jean-Marie Mme MAILLET Monique M. MAIZIERES Christian M. MALAUSSENA Jean-Louis M. MESSELYN Jean M. MIGEON Michel М. MOTZKIN Joseph м. MONTUELLE Bernard Μ. NICOLE Jacques Μ. PAQUET Jacques М. PARSY Fernand Μ. PECQUE Marcel Μ. PERROT Pierre

Mécanique des Fluides Mathématiques Biologie Biologie Végétale Mathématiques I.E.E.A. Géographie et Aménagement Spatial I.E.E.A. Informatique Physique Biologie I.E.E.A. Géographie et Aménagement Spatial Sciences Economiques et Sociales Sciences Appliquées Sciences Economiques et Sociales Biologie (I.U.T.) Physique I.E.E.A. Sciences de la Terre Mathématiques Physique Chimie (I.U.T.) I.U.T. Lille I.U.T. Lille Sciences Appliquées Géographie Mathématiques Sociologie Sciences Economiques Sciences Economiques et Sociales S.E.N. Calais Physique I.E.E.A. Sciences Appliquées Mathématiques Chimie Automatique Mathématiques Mathématiques Géographie et Aménagement Spatial E.N.S.C.L. Electronique (Lille) Géographie Physique Sciences Appliquées Physique (I.U.T. Lille) Sciences Economiques et Sociales I.E.E.A. Sciences Economiques et Sociales Physique Chimie (Sciences Appliquées) Mathématiques I.U.T. Lille Chimie (E.N.S.C.L.) Sciences Appliquées Mathématiques Chimie (Béthune) Chimie

.../...

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. PERTUZON Emile M. PONSOLLE Louis M. POVY Jean-Claude M. RACZY Ladislas M. ROGALSKI Marc M. ROUSSEAU Jean-Paul M. ROY Jean-Claude Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. SIMON Michel M. SLIWA Henri M. SMET Pierre M. SOMME Jean Mle SPIK Geneviève M. THERY Pierre M. TOULOTTE Jean-Marc M. TREANTON Jean-René М. VANDORPE Bernard M. VILETTE Michel M. WERNER Georges M. WATERLOT Michel Mme ZINN JUSTIN Nicole

• •

Biologie Chimie (Valenciennes) Sciences Appliquées Physique Mathématiques Physiologie Animale **Biologie** Géographie et Aménagement Spatial Psychologie Chimie Physique Géographie Chimie Biologique Calais Sciences Appliquées Sciences Economiques et Sociales Chimie Physique Génie Mécanique (Béthune) Informatique (I.U.T. Lille) Géologie Mathématiques

TABLE des MATIERES

			-
		INTRODUCTION	1-5
		1. HYDROLYSE ACIDE MENAGEE	6
Ι	-	HISTORIQUE	6
А	-	PRINCIPE	6
В	-	<u>APPLICATIONS</u>	6
		1º - Hydrolyse par les acides minéraux dilués	6
		2° - Hydrolyse par les résines de polystyrène sulfoné	9
С	-	<u>CONCLUSIONS</u>	10
II	-	- HYDROLYSE ACIDE MENAGEE. TRAVAUX PERSONNELS	12
А	-	PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS	12
		1° - Partie expérimentale	12
		2° - <u>Résultats</u>	13
В	-,	ISOLEMENT ET STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DES HYDROLYSATS DU GLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOIDE	17
		1º - <u>Partie expérimentale</u>	17
		2° - <u>Résultats</u>	18
С	-	DISCUSSION ET CONCLUSIONS	25

Pages

Pages	
-------	--

2. ACETOLYSE	30
I - HISTORIQUE	30
A - PRINCIPE	30
B - CARACTERISTIQUES ET APPLICATIONS	31
1° - Applications	31
2° - Stabilité des liaisons glycosidiques	33
3° - <u>Modification des glucides au cours de</u> <u>l'acétolyse</u>	35
c - <u>CONCLUSIONS</u>	36
II - ACETOLYSE. TRAVAUX PERSONNELS	37
A - DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES	
<u>ACETOLYSATS</u>	37
1º - Partie expérimentale	38
2° – <u>Résultats</u>	42
3° - <u>Discussion</u>	55
B - ISOLEMENT ET STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DE	
L'ASIALOGLYCCPEPTIDE & DE L'OVOMUCOIDE ET DES	
SIALOSIDES DES ACETOLYSATS DU SIALOGLYCOPEPTIDE 😋	
DE L'OVOMUCOIDE	56
1º - Partie expérimentale	57
2° - <u>Résultats</u>	63
3° - Discussion et conclusions	71

Pages

C - ETUDE DE LA STABILITE DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQU	ES
VIS-A-VIS DE L'ACETOLYSE	75
1° - <u>Partie expérimentale</u>	••• 76
2° - <u>Résultats</u>	76
3° - <u>Discussion et conclusions</u>	••• 81
3. HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION	85
I - HISTORIQUE	85
A - <u>PRINCIPE</u>	••• 85
B - <u>APPLICATIONS</u>	87
1º - Hydrazinolyse et diazotation de mucop saccharides	88
2° - Hydrazinolyse et diazotation de glyco protéines	90
II - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DES GLYCOPEPTIDES.	
TRAVAUX PERSONNELS	93
A - <u>HYDRAZINOLYSE</u> DES O-METHYL-GLYCOSIDES	93
1° - Partie expérimentale	94
2º - <u>Résultats</u>	96
3° - <u>Discussion</u>	••• 96
B - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION DU GLYCOPEPTIDE β I	DE
L'OVOMUCOIDE	97
1° - Partie expérimentale	97
2° - <u>Résultats</u>	100
3° - Conclusions	109

Pages

4. ETUDE COMPAREE DE LA STRUCTURE DE QUELQUES GLYCANNES	112
I - ETUDE COMPAREE DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE ACIDE MENAGEE ET ACETOLYSE DES GLYCANNES :	
DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES OLIGOSACCHARIDES	112
1° - <u>Description du procédé de carte chroma-</u> <u>tographique</u>	113
2º - <u>Résultats expérimentaux</u>	113
3° - <u>Conclusions</u>	120
II - ETUDE COMPAREE DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR	
EVIDENCE D'UN NOYAU OLIGOSACCHARIDIQUE COMMUN	122
1° - Partie expérimentale	122
2º - <u>Résultats</u>	125
3° - Discussion et conclusions	127
CONCLUSIONS GENERALES	135
BIBLIOGRAPHIE,	140

.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

Amino Acides

Ala	:	alanine
Asn	:	asparagine
Asp	:	acide aspartique
Ser	:	sérine
Thr	:	thréonine

Glucides

ANAN	:	acide N-acétylneuraminique
Fuc	:	fucose
Gal	:	galactose
Glc	:	glucose
GlcN	:	glucosamine
GlcNAc	;	N-acétylglucosamine
Man	:	mannose

Divers

POPOP	:	p-bis (2-(5-phényloxazolyl)-benzène
PPO	ŧ	2-5 diphényloxazole

Unités de mesure

c.p.m.	:	coup par minute
D.O.	:	densité optique
g, mg	ţ	gramme, milligramme
H, mn, s	:	heure, minute, seconde
mCi, µCi	:	10 ⁻³ Curie, 10 ⁻⁶ Curie
mM	:	10^{-3} mole
nm	:	nanomètre

INTRODUCTION

Les glycoprotéines résultent de l'association d'une protéine avec un groupement prosthétique de nature glucidique. Longtemps considérées comme des molécules d'une importance très secondaire, elles suscitent de nos jours de la part des chercheurs une curiosité et un intérêt grandissant au fur et à mesure que se dessine leur rôle biologique. La répartition des glycoprotéines est très large et leur rôle est des plus variés : certaines sont des hormones, comme lathyroglobuline, l'hormone de stimulation du follicule, l'hormone lutéinisante..., d'autres sont des enzymes, comme la lactase, la ribonucléase B, la choline estérase..., d'autr encore sont disposées à la surface des membranes cellulaires et jouent un rôle dans la cohésion cellulaire ainsi que dans les phéno mènes immunitaires. En outre, la plupart des liquides biologiques, comme l'urine, le sang, le lait, la salive, la bile et les larmes possèdent des glycoprotéines adaptées aux fonctions les plus diverses : certaines jouent le rôle de transporteur du fer ou du cuivre telles que la transferrine et la céruléoplasmine, d'autres sont des anticorps, il s'agit en particulier des immunoglobulines.

On conçoit mieux désormais qu'il importe de connaître leur structure primaire puis leur conformation dans l'espace afin de comprendre leur mode d'action ainsi que leur mécanisme de biosynthèse.

Toutefois la plupart des schémas de structure proposés actuellement ne sont que très partiels et fragmentaires, car l'exploration de la partie glycannique comprend des difficultés qui sont de deux ordres. En premier lieu, peu de glycannes possèdent de structure simple et linéaire, la majeure partie des copules glucidiques ont des structures branchées formées par l'association de 10 à 15 monosaccharides de nature différente, on rencontre, en effet, des acides uroniques, des hexosamines, des acides sialiques ainsi que des monosaccharides neutres comme le D-mannose, le D-galactose et le L-fucose. En second lieu, l'imperfection des méthodes d'analyse structurale complique singulièrement notre tâche. En outre, l'application d'un seul procédé, même perfectionné, ne permet pas de résoudre la structure complète d'un glycanne, c'est la raison pour laquelle les auteurs font appel à l'originalité et à la complémentarité des différents procédés d'exploration tels que l'oxydation periodique, la perméthylation, l'hydrolyse acide ménagée.

Devant de telles carences techniques, nos travaux se sont orientés vers deux objectifs. Le premier concernait la recherche de procédés de coupure, -aussi sélectifs que possibledes liaisons glycosidiques de manière à obtenir des oligosaccharides dont la structure puisse être aisément déterminée et dont la réassociation permette de reconstituer la structure des glycannes.

Le second que nous poursuivions consistait à rendre reproductible ces coupures de façon à effectuer des cartes chromatographiques comparatives, selon le principe du procédé de "finger-printing" d'INGRAM appliqué à l'exploration de la structure des protéines, afin d'obtenir rapidement et sur de faibles quantités de substances des informations sur les analogies et les différences de structure que présentent les glycannes d'origine différente comme ceux de l'*ovomucotde*, de la *transferrine* ou encore de glycannes appartenant aux membranes plasmiques des cellules normales et transformées.

Cependant, les glucidistes n'ont pas la chance de posséder, comme les protéinistes, de procédés spécifiques d'endocoupures des chaînes glycanniques. En effet, l'utilisation des glycosidases s'est limité jusqu'à présent à des cas simples et peu nombreux. L'emploi de ces enzymes a surtout contribué à explorer la structure des <u>n</u>-glycannes comme ceux des mucines sous-maxillaires ou ceux de la substance fondamentale et de rares <u>iso</u>-glycannes. Il s'agit, dans ce dernier cas, essentiellement d'exoglycosidases qui détachent les résidus de fucose, de galactose et d'acide N-acétylneuraminique, les résultats sont fragmentaires et se limitent toujours à la connaissance de la zone la plus "externe" de ce type de glycanne. La découverte de quelques endoglycosidases spécifiques permettrait d'élucider avec plus de facilité la zone la plus "interne" de ces molécules. Seuls, la hyaluronidase, le

lysozyme, la muramylamidase et la 4'-L-aspartylglycosylamine amido hydrolase sont actuellement connus pour scinder respectivement les liaisons glycosidiques de l'acide glycuronique et de l'acide N-acétylmuramique, quant aux amidases, elles détachent le glycanne de la protéine en coupant la liaison amide qui lie l'acide N-acétylmuramique ou la N-acétylglucosamine.

Ce sont ces raisons qui nous ont conduits à rechercher des procédés de coupures chimiques, -aussi sélectifs que possible-, des liaisons glycosidiques. Les trois types suivants de procédés de coupure ont été appliqués et leurs performances ont été précisées :

- Hydrolyse acide ménagée

- Acétolyse

- Hydrazinolyse suivie d'une diazotation

Nous exposerons donc successivement les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches sur les procédés de coupures dans trois chapitres distincts que nous ferons précéder d'une courte revue générale sur la question. Enfin, dans un quatrième chapitre nous effectuerons, grâce à la mise au point d'un procédé de carte chromatographique des oligosaccharides obtenus à l'aide des procédés de coupures antérieurement décrits, une étude comparée de la structure des glycannes provenant de diverses glycoprotéines afin d'apporter des arguments et des précisions en faveur du mode de biosynthèse de ces molécules.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre général des recherches réalisées en équipe sur la méthodologie des glucides libres et conjugués, au sein de l'E.R.A. nº 320 du C. N. R. S. Ils ont fait l'objet, jusqu'à présent, des notes et mémoires suivants :

A. NOTES

- MONTREUIL J., MONSIGNY M., SPIK G. et BAYARD B., Solution de quelques problèmes concernant la structure des glycannes. <u>Hoppe Seyler's Zeitschrift für Chemie</u>, 1969, 350, 667
- BAYARD B. et MONTREUIL J., Hydrolyse et acétolyse des osides libres et conjugués, <u>Archives Internationales de Physiologie et</u> <u>de Biochimie</u>, 1969, 77, 3

B. MEMOIRES

- BAYARD B., STRECKER G. et MONTREUIL J., Analyse chromatographique des acétolysats de glycopeptides et description d'un procédé reproductible de chromatographie comparative des oligosaccharides "neutres". <u>International Symposium VI - Chromatographie</u> <u>Electrophorèse</u>, Bruxelles 1970, <u>Presses Académiques Européennes</u> <u>Edition 1970</u>, p. 240-247 (ces résultats sont exposés p. 112-121)
- BAYARD B., Thèse de Doctorat de 3e Cycle. Acétolyse des glycopeptides. 1° - Fractionnement des acétolysats. 2° - Détermination de la structure de quelques oligosaccharides isolés des acétolysats d'ovomucoïde, Université des Sciences et Techniques de Lille, 9 décembre 1970
- BAYARD B. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoprotéines.
 XLVIII Description d'un procédé de fractionnement des acétolysats. <u>Carbohyd. Res</u>., 1972, <u>24</u>, 427-443 (ces résultats sont exposés p. 37-56)
- 4. BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoprotéines. XLIX - Isolement et structure des oligosaccharides de la fraction neutre des acétolysats de glycopeptides de l'ovomucoïde. <u>Carbohyd. Res</u>. 1972, <u>24</u>, 445-456 (ces résultats sont résumés p. 56-74)
- 5. BAYARD B. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoprotéines. XLX - Description d'un procédé de coupure spécifique des liaisons N-acétyl-glucosaminidiques par hydrazinolyse suivie d'une diazotation des glycannes. Application au glycopeptide β de l'ovomucoïde. <u>Collection des Colloques Internationaux du C.N.R.S</u> Colloque n° 221 sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973 (ces résultats sont exposés p. 93-111)
- 6. BAYARD B. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoprotéines. Etude de la stabilité des liaisons O-glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse. <u>Biochimie</u> (sous presse) (ces résultats sont décrits p. 75-84)

- BAYARD B., ROUX D. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoprotéines. Hydrolyse ménagée du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Isolement et structure des oligosaccharides isolés des hydrolysats. <u>Biochimie</u> (sous presse) (ces résultats sont résumés p. 12-28)
- 8. BAYARD B. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoconjugués. Hydrazinolyse et diazotation de l'orosomucoïde, de la sérotransferrine humaine, de la lactotransferrine et de la fétuin∉ Description de la structure d'un noyau oligosaccharidique commun (à rédiger) (ces résultats sont résumés p. 122-133)

Nous avons, en outre, participé à des travaux entrepris en collaboration avec d'autres groupes. Bien que ces résultats puissent s'intégrer dans cette thèse, nous laissons cependant le soin aux lecteurs de se reporter aux références suivantes :

- GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., Détermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de Femmes, le dilactaminyl lacto-N-tétraose. <u>Eur. J. Biochem.</u>, 1970, 13, 484-492
- CHAMBERS R., CLAMP J.R., BAYARD B. et MONTREUIL J., The examination by gas chromatography of acetolysis products from glycopeptides. Biochimie, 1973,
- 3. STRECKER G., BAYARD B., FOURNET B. et MONTREUIL J., Etude sur les glycoconjugués. Oxydation periodique de l'ovomucoïde. Etude du noyau résistant (à rédiger)
- 4. STRECKER G., BAYARD B. et MONTREUIL J., Analyse chromatographique rapide des glucides de l'urine. Application à l'étude des oligosaccharides de l'urine normale et de quelques urines pathologiques, C.R. 6e Symp. Intern. Chromat. Electroph., Bruxelles 1970, Presses Acad. Eur. Ed., Bruxelles 1971, 324-33

1. HYDROLYSE ACIDE MENAGEE

I - HISTORIQUE

A - PRINCIPE

L'hydrolyse acide partielle d'un glycoprotide peut être effectuée soit avec des acides dilués (HCl ou H2S04 0,1 à 1 N, à 80-100° pendant 1 mn à 8 h), soit avec des résines de polystyrène sulfoné (Dowex 50, forme acide, 100° pendant 5mn à 2 h). Dans le premier cas, on analyse la fraction dialysable et la fraction adialysable par chromatographie sur papier. Les hydrolysats sont parfois fractionnés sur colonne de charbon-Celite (Procédé de WHISTLER et DURSO (1)) : on obtient un découpage pour des oligosaccharides d'une série homologue en monosaccharides (élution par l'eau), disaccharides (élution par l'éthanol à 1,5 p. 100), trisaccharides (élution par l'éthanol à 3,5 p. 100) etc.... La chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G-10 ou G-15 conduit à des résultats identiques. On détermine ensuite la composition et la structure des oligosaccharides ainsi obtenus et dans un second temps, on essaie de réassocier les fragments obtenus pour reconstituer la molécule.

B - APPLICATIONS

Les résultats et les informations que l'on obtient par l'application de ces procédés peuvent se résumer de la manière suivante :

1º - Hydrolyse par les acides minéraux dilués.

L'hydrolyse des glycoprotides par les solutions diluées d'acides dégrade progressivement les glycannes en libérant préférentiellement des monosaccharides et une très faible quantité d'oligosaccharides. L'intérêt de cette méthode ne réside pas uniquement dans l'étude structurale de ces oligosaccharides mais aussi dans l'analyse et le dosage des monosaccharides libérés. En effet,

ce procédé associé à des expériences "cinétiques", qui consistent à suivre l'apparition des monosaccharides libérés en fonction du temps, apporte de sérieux renseignements sur la position des monosaccharides situés aux extrémités de la molécule. On peut, en effet postuler que les monosaccharides qui sont situés à l'extérieur de la molécule doivent logiquement être libérés beaucoup plus rapidement que les oses qui se trouvent en position plus interne. Toutefois, cette hypothèse ne doit pas conduire à une interprétation absolue des résultats des hydrolyses cinétiques des glycannes car les liaisons O-glycosidiques ne possèdent pas toutes la même stabilité et la coupure de liaisons très labiles peut, en les dévoilant, exposer à l'action des agents d'hydrolyse des monosaccharides "internes" qui deviennent ainsi plus facilement hydrolysables. D'autre part, la libération tardive d'une partie des osamines n'implique pas forcément que ces molécules se trouvent en position interne dans le glycanne. Elle peut, en effet, s'expliquer aussi par la résistance plus grande des liaisons "glucosaminidyl", provoquée par l'apparition d'un proton au voisinage de ces liaisons consécutive à la N-désacétylation du groupement acétamido des N-acétyl-hexosamines (2, 3).

Cette méthode a reçu de nombreuses applications ainsi l'hydrolyse ménagée de l'ovomucoïde laisse apparaître le D-galactose, puis le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dès le début de l'hydrolyse, tandis que le mannose et une partie du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose constituent la fraction la plus "stable" adialysable. On peut admettre que le galactose et une partie du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose se trouvent en position externe par rapport au "noyau" plus résistant composé de mannose et de 2-acétamido-2désoxy-D-glucose (Fig. 1; p. 8).

On obtient des résultats analogues dans le cas de nombreuses glycoprotéines (orosomucoïde, transferrine, lactotransferrine). Il semble donc qu'il existe un schéma général de structure des <u>isog</u>lycannes d'origine animale. En effet, dans tous les cas, l'acide sialique et le fucose, quand toutefois ce dernier est présent dans les glycannes, apparaissent dès le début de l'hydro lyse suivis par le galactose et par une fraction de la N-acétylglucosamine, le reste des hexosamines et le mannose sont libérés plus tardivement.



В

Α

Fig. 1.- A. Courbes de libération des oses au cours d'une hydrolyse acide ménagée de l'ovomucoïde par l'acide sulfurique 0,1 N à 100° (selon ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (4)).

B. Chromatogramme du même hydrolysat. Chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau 4 : 1 : 5. Révélation avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

L'hydrolyse des glycoprotéines par les acides minéraux dilués réalisant une dégradation des glycannes par récurrence, conduit à un mélange très complexe d'oligosaccharides dont la présence se manifeste par la formation de trainées dans la part supérieure des chromatogrammes. Ce procédé est difficilement applicable à l'isolement de trop nombreux fragments osidiques dont la connaissance de la structure pourrait permettre de reconstituer la séquence des monosaccharides au sein des glycannes. La N-acétyllactosamine (0- β -D-galactopyranosyl-(1- \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose) fait cependant exception, elle accompagne, en effet, les monosaccharides dans les hydrolysats partiels de la mucine gastrique de porc (5) (H₂SO₄ 0,6 N ; 30 mn, 100°) de l'orosomucoïde (6) (H₂SO₄ 0,3 N ; 2 h, 95°), de la transferrine, de la lactotransferrine de l'ovomucoïde, des globulines $\gamma_{\rm G}$ humaines et bovines (7), de la fétuine (8) de substances de groupe sanguin (9).

2° - Hydrolyse par les résines de polystyrène sulfoné.

Contrairement à l'hydrolyse par les acides minéraux dilués, l'hydrolyse par les résines de polystyrène sulfoné libère de nombreux oligosaccharides, prélude à l'étude de la structure de la fraction glucidique. Ce procédé préconisé par DIXON (10) puis par BRAGG (11) est à priori très séduisant car l'échangeur de cations joue à la fois le rôle d'agent d'hydrolyse et d'agent de purification en fixant les produits de dégradation de la partie protidique du glycoprotéide ainsi que le 2-amino-2désoxy-D-glucose provenant de la N-désacétylation de la N-acétylglucosamine, cependant les rendements en oligosaccharides sont faibles car on ne peut éviter la formation de quantités importantes de monosaccharides.

Ce procédé a reçu de nombreuses applications : certains auteurs utilisent les résines solubles. PAINTER et MORGAN (12) développent ce procédé pour explorer la structure d'hétérosaccharides de groupe sanguin A, REGE *et al*. (13) isolent le trisaccharide $0-\alpha$ -L-fucosyl- $(1 \longrightarrow 2)-0-\beta$ -D-galactosyl- $(1 \longrightarrow 3)-2-acé$ tamido-2-désoxy-D-glucose des hydrolysats de substance de groupe sanguin H, d'autres auteurs emploient les résines insolubles et

isolent les oligosaccharides après lavage à l'eau distillée de la résine puis dialyse. L'application de ce procédé d'hydrolyse à l'ovomucoïde a permis à MONTREUIL et ADAM-CHOSSON (4) et ADAM-CHOSSON (22) d'isoler de nombreux oligosaccharides (Fig. 11 B ; p. 52). Parmi les nombreux oligosaccharides isolés des hydrolysats acides par le Dowex 50 de l'orosomucoïde, deux d'entre eux ont fait l'objet d'une étude de structure et ont été identifiés au 0-D-mannosyl- $(1 \longrightarrow 3)$ -D-mannose et 0-D-mannosyl- $(1 \longrightarrow 6)$ -D-mannose (FOURNET *et al.* (65)).

Nous observons à la lumière de ces résultats que ce procédé scinde indifféremment les liaisons du mannose et de la N-acétylglucosamine. Ce procédé n'est donc pas spécifique d'un type de liaison donné. En outre, l'expérimentateur n'est pas à l'abri des réactions de transosidation qui introduisent dans le milieu d'hydrolyse des oligosaccharides artéfacts qui résultent, sous l'effet catalytique de la résine échangeuse de cations, de la réassociation de monosaccharides. Ce phénomène est fréquent lorsque la solution glucidique d'hydrolyse est particulièrement concentrée (15). On peut cependant, comme le préconise SPIK *et al*. (16), détecter ces oligosaccharides de transosidation en introduisant dans l'hydrolysat un précurseur radioactif (¹⁴C-D-mannose, par exemple) et en recherchant ensuite les oligosaccharides radioactifs par l'analyse autoradiographique des chromatogrammes.

C - CONCLUSIONS

a - L'hydrolyse des glycoprotéides par les acides minéraux dilués dégrade progressivement la fraction glucidique en libérant préférentiellement des monosaccharides et la N-acétyllactosamine. Elle apporte de précieux renseignements dans la détermination des positions relatives des oses dans les molécules glycanniques.

Appliquée à de nombreuses glycoprotéines, elle permet de démontrer que l'acide sialique, le fucose et le galactose, une partie de la N-acétylglucosamine et la N-acétyllactosamine, se trouvent en position externe par rapport à un "noyau" plus résistant composé de mannose et de N-acétylglucosamine.

b - L'hydrolyse des glycoprotéines par les résines de polystyrène sulfoné fournit de nombreux oligosaccharides contrairement à l'hydrolyse acide. Elle représente donc une méthode de choix pour réaliser la première étape de l'exploration de la structure des molécules de glycannes. Cependant, ce procédé de coupure des liaisons 0-glycosidiques n'est pas spécifique d'un type de liaison, en outre des réactions de transosidation sont probables.

II - HYDROLYSE ACIDE MENAGEE. TRAVAUX PERSONNELS

L'hydrolyse acide partielle par les résines de polystyrène sulfoné a été largement utilisée pour explorer la structure des glycopeptides. Elle présente néanmoins l'inconvénient majeur de libérer une quantité trop élevée de monosaccharides qui se forment au détriment des oligosaccharides. Afin d'améliorer le rendement en oligosaccharides, nous avons recherché les conditions optimales de l'hydrolyse ménagée en effectuant des études cinétiques en fonction de la durée et de la température. Nous décrivons, en outre, un procédé de fractionnement des oligosaccharides présents dans les hydrolysats et appliquons ce procédé à l'étude de la structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde dont l'isolement et les caractéristiques physico-chimiques sont précisés dans l'appendice technique p. 150.

A - PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

1° - Partie expérimentale

a - Hydrolyse ménagée du glycopeptide β de l'ovomucoîde. Le glycopeptide β de l'ovomucoïde (100 mg) dissous dans 100 ml d'eau distillée, est hydrolysé pendant 1 h 30 à 87,5° C sous agitation continue par 100 ml de Dowex 50 (X 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺).

b - Fractionnement des hydrolysats.- La résine Dowex 50, placée dans une colonne, est lavée dans un premier temps avec de l'eau distillée puis avec une solution d'acide chlorhydrique 0,4 M. On obtient ainsi deux fractions : la "Fraction Neutre" qui contient des monosaccharides et des oligosaccharides neutres et la "Fraction Basique" qui contient des oligosaccharides N-désacétylés ainsi que l'hexosamine. Cette dernière fraction est N-réacétylée selon le procédé de ROSEMAN (17).

Nous avons fractionné les oligosaccharides soit sur des colonnes de charbon-*Celite* selon le procédé de WHISTLER et DURSO (1), soit sur colonne de gel de Séphadex G-10.

2° - Résultats

a - Fractionnement des hydrolysats. - L'hydrolyse acide ménagée (à 87,5° pendant 1 h 30) du glycopeptide ß de l'ovomucoïd par la résine de polystyrène sulfoné (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50 H⁺) affecte une partie des liaisons glycosidiques ainsi qu'une plus faible proportion des groupements "acétamido" portés par les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-hexose. Nous obtenons ainsi deux familles de glucides bien distinctes. La première non retenue par l'échangeur de cations, éluée de la résine par l'eau distillée, constitue la fraction glucidique neutre (FN) qui, dans le cas présent, renferme 69,4 p. 100 des glucides initialement hydrolysés. La seconde, retenue par la résine Dowex 50, se compose d'hexosamines et d'oligosaccharides contenant au moins un résidu d'hexosamine résultant d'une N-désacétylation pendant l'hydrolyse. Cette derniè fraction, qui renferme 23,5 p. 100 des glucides totaux, est déplacée dans un second temps par une solution d'acide chlorhydrique 0,4 M puis finalement N-réacétylée. L'ensemble de ces résultats se trouve illustré par la figure 2 et résumé dans le tableau I; p. 15

b - Cinétique d'hydrolyse d'un glycopeptide par les résines de polystyrène sulfoné.- Afin d'améliorer les rendements en oligosaccharides, nous avons effectué l'hydrolyse ménagée du glycopeptide β de l'ovomucoïde à différentes températures 82° -87,5° - 100° pendant 1 h 30. La chromatographie des fractions neutres des hydrolysats sur colonne de Séphadex G-10 nous a permis d'établir des profils d'élution des colonnes de gel filtration et de montrer, comme en témoigne la figure 3, que le rapport monosaccharides conjugués sur monosaccharides libres varie en fonction de la température de l'hydrolyse, nous observons, en outre, que les rendements en oligosaccharides sont maximum lorsque l'hydrolyse se déroule à 87,5° pendant 1 h 30, nous avons adopté ces paramètres pour hydrolyser des quantités importantes de glycopeptide β de l'ovomucoïde (Fig. 3 ; p. 16).



Tableau I

Composition en glucidesdes deux fractions obtenues par hydrolyse acide ménagée (Dowex 50)

du glycopeptide 8 de l'ovomucoïde

Caractéristiques	Glycopeptide ß	"Fraction neutre"	"Fraction basique"
Rendement en glucides (a)		μ,69	23,5
Composition centésimale (%)			
Monosaccharides neutres 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose	23 , 8 39 , 4	17,3 26,6	6,2 8,7
Rapport molaire du 2-acétamido-2-désoxy- D-glucose à monosaccharides neutres	1 , 65	1 , 53	1 , 34

(a) Exprimé en g pour 100 g de glucides hydrolysés.

BUS



Fig. 3.- Chromatographie de la fraction neutre (FN) des hydrolysats acides partiels par le Dowex 50 du glycopeptide β de l'ovomucoïde sur colonne de Séphadex G-10. Les hydrolyses ménagées sont réalisées à 82°, 87,5° et 100° pendant 1 h 30. Des fractions de 0,1 ml sont prélevées et les monosaccharides neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique (18, 19). Gal : D-galactose ; Man : D-mannose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine. di : disaccharides ; tri : trisaccharides.



B - <u>ISOLEMENT ET STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DES HYDROLYSATS</u> DU GLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOIDE

1° - Partie expérimentale

a - Fractionnement des oligosaccharides.- Nous avons hydrolysé une quantité importante (20 g) du glycopeptide ß de l'ovomucoïde afin d'isoler en quantité appréciable les oligosaccha rides. La fraction neutre (FN) et la fraction basique (FB) N-réacé tylée sont soumises respectivement à une chromatographie sur colon ne (4 x 50 cm) de charbon-Celite. Le D-galactose et le D-mannose sont éliminés par le passage de 5 l d'eau distillée et les oligosaccharides sont élués par des solutions aqueuses d'éthanol à 1,5 - 3,5 - 5 - 7,5 - 10 et 15 p. 100 (V/V) (débit 15 ml/h). On obtient, de cette façon, les fractions FNC_{1.5} à FNC₁₅ et FBC_{1,5} à FBC₁₅ à partir desquelles l'isolement des oligosaccharides et la purification de chacun d'eux sont réalisés en soumettant d'abord chaque fraction à une chromatographie préparative sur papier Whatman nº 3 dans le système-solvant 1 : pyridine/acétate d'éthyle/ acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3 ; V/V). Dans quelques cas particuliers, nous avons utilisé, en outre, l'électrophorèse préparative sur papier Whatman nº 3 dans les conditions suivantes : tampon borate de sodium à 1 p. 100 de pH 9,2 ; 7 V/cm pendant 4 h ; purification de l'oligosaccharide par passage sur une colonne (1 x 5 cm) de charbon-Celite et élution du composé par une solution aqueuse d'éthanol à 50 p. 100, après un lavage soigneux à l'eau distillée.

b - Identification et dosage des monosaccharides.- Les quantités de monosaccharides neutres et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose présents dans chaque oligosaccharide ont été déterminées par l'application des procédés colorimétriques décrits dans la monographie n° 1 du Laboratoire (20). Les monosaccharides neutres (D-galactose, D-mannose) ont été identifiés par chromatographie sur papier dans le solvant décrit dans le paragraphe précédent après une hydrolyse chlorhydrique 2 M, à 100° pendant 2 h, des oligosaccharides et purification des hydrolysats sur résines échangeuses d'ions. c - Détermination de la structure des oligosaccharides par la méthode de méthylation.- Les oligosaccharides ont été méthy lés par l'iodure de méthyle dans la N,N-diméthylformamide selon KUHN et al. (21). Le produit obtenu est ensuite repris par 1 ml d'iodure de méthyle. 250 mg d'oxyde d'argent et 150 mg de sulfate de calcium anhydre sont ajoutés et le mélange est chauffé à reflux pendant 20 h, en ajoutant toutes les 4 h les mêmes quantités des trois réactifs. On filtre, lave le filtre avec du chloroforme puis évapore à siccité sous pression réduite.

Les oligosaccharides perméthylés sont traités par l'acide chlorhydrique 4 M, à 100° pendant 4 h, puis l'acide chlorhydrique est éliminé par distillation sous vide à 30°. Les éthers méthyliques des monosaccharides sont ensuite identifiés par une électrophorèse préparative dans le tampon acétate de pyridine de pH 3,9 ; on sépare, de cette manière, les monosaccharides méthylés neutres, les dérivés méthylés du 2-amino-2-désoxy-D-glucose. Les premiers sont d'abord transformés en méthyl-glycosides par action du gaz chlorhydrique M dans le méthanol en tubes scellés sous vide, pendant 8 h à 100°. La solution est ensuite traitée par du carbonate de plomb, filtrée et évaporée à siccité sous vide. Le résidu, repris par du chloroforme ou par du méthanol, est analysé par chromatographie en phase gazeuse (Voir le Tableau II). Les éthers méthyliques du 2-amino-2-désoxy-D-glucose sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse après triméthylsilylation (Voir le Tableau III).

2° - <u>Résultats</u>

a - Isolement des oligosaccharides de la fraction neutre. Toutes les fractions (FNC) obtenues par chromatographie sur colonne de charbon-*Celite* sont hétérogènes. L'isolement des glucides est ensuite réalisé en chromatographie et parfois en électrophorèse préparative sur papier des différentes FNC de la manière suivante : la fraction $\text{FNC}_{1,5}$ a fourni l'oligosaccharide d à l'état pur ; les fractions $\text{FNC}_{3,5}$ et FNC_5 ont donné en chromatographie dans le Tableau II

Identification (a), par chromatographie en phase gazeuse (b), des éthers méthyliques présents dans les hydrolysats des oligosaccharides a - l perméthylés. du D-mannose

Méthyl-α,β-D-mannoside	(o) E				0	ligosa	accha:	rides				
	54	ø	19	U	g	Ø	ولم	в	ч	·.,	<i>.c</i>	ĸ
2,3,4,6-Tétra-0-méthyl	τı				+	+	+	+	+	+	+	+
2,3,4-Tri-O-méthyl	2,1 (d)					+		÷				
2,3,6-Tri-O-méthyl 2,4,6-Tri-O-méthyl	3,2 2,5		+	+	+		+					
3,4,6-Tri-O-méthyl	2,1 (d)			+							+	+
2,4-Di-O-méthyl	6 , 1								÷	÷	+	+

(a) Sous la forme de méthyl- α , β -D-mannosides.

- (b) Conditions expérimentales : Appareil Perkin-Elmer F₁ ; détection par ionisation de flamme ; colonne de verre (0,2 x 300 cm) ; phase stationnairê¹: 3 p. 100 de Carbowax 6 000 sur Chromosorb W HNDS (60-80 "mesh") ; température : 170° ; gas vecteur : azoie (débit : 30 ml/mn).
 - Temps de rétention relatif au méthyl-2,3,4,6-Tétra-0-méthyl-a,8-D-mannoside. (c)
- (d) Les 3,4,6-Tri-O-méthyl et 2,3,4-Tri-O-méthyl du méthyl mannoside sont identifiés dans un second temps sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés.



Tableau III

Identification par chromatographie en phase gazeuse (a) des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques du 2-amino-2-désoxy-D-glucose, présents dans les hydrolysats des oligosaccharides perméthylés. a - 1

						ilo	gosac	chari	des				
Nature des composés (b)	Tr (c)	a	9	v	q	Φ	4-0	a	Ч	•••	·0	К	1
2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-O-méthyl-D- glucose	0 6		+	+	I	1			t		+	+	
2-amino-2-désoxy-3,6-Di-0-méthyl-D- glucose	, t 0	+		+			+	+	I	+		+	

2

- Conditions expérimentales : Appareil Perkin Elmer F_{11} ; détection par ionisation de flamme ; colonne de verre (0,2 x 300 cm) ; phase stationnaire¹; Chromosorb W AW HMDS "mesh" 100-200 ; contenant 3 p. 100 en poids de silicone OV17 ; gas vecteur : azote (débit 15 ml/mn) ; température : 140° C (a)
- (b) Identifiés sous la forme de triméthylsilydérivés.

Temps de rétention relatif au 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-O-méthyl-D-glucose. (c)



système-solvant 1, l'oligosaccharide h à l'état pur et le mélange respectif des oligosaccharides c, e et a, b que l'on sépare dans un second temps par électrophorèse sur papier à pH 9,2. La chromatographie sur papier de la fraction FNC_{7,5} permet d'obtenir les oligosaccharides f, i, m, n et o à l'état pur. Quant à la fraction FNC₁₀, elle renferme les oligosaccharides g, j, l, m et n qui se sont révélés homogènes en chromatographie ainsi qu'en électrophorèse. Les études ultérieures de structure ont confirmé l'homogénéité de tous les oligosaccharides à l'exception toutefois de l'oligosaccharide c qui se compose d'un mélange de deux disaccharides c_1 et c_9 .

b - Isolement des oligosaccharides de la fraction basique. Cette fraction ayant été préalablement N-réacétylée est fractionnée sur une colonne de charbon-Celite (4,3 x 30 cm). L'élution de la colonne par un gradient discontinu en éthanol nous a fourni : la fraction $FBC_{3,5}$ qui contient en mélange les oligosaccharides c, h et i ainsi que la fraction FBC_5 qui renferme à l'état pur l'oligosaccharide b. Les glucides c, h et i ont été ultérieurement fractionnés en chromatographie préparative sur papier dans le solvant 1.

c - Structure des oligosaccharides de la fraction neutre. La structure de 12 oligosaccharides $a \ge l$ a été déterminée sur la base des résultats expérimentaux suivants : (a) tous les oligosaccharides renferment dans des proportions variables des résidus de D-mannose et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose à l'exception toutefois de l'oligosaccharide a qui contient du D-galactose et du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose ; (b) l'hydrolyse des oligosaccharides perméthylés nous a permis de déterminer avec précisions les différents types de liaisons glycosidiques ; ces résultats sont rassemblés dans les tableaux II, III et IV ; (c) en outre, les résultats suivants ont été obtenus :

L'oligosaccharide a a été identifié au $0-\beta-D-g$ alactopyranosyl- $(1 \rightarrow 4)-2$ -acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose, déjà rencontré dans les produits de l'hydrolyse ménagée de l'ovo-mucoïde.

Tableau IV

Caractéristique des oligosaccharides isolés de la "Fraction Neutre" des hydrolysats

de l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde

Oppostánistious					Olig	osaccha	rides				<u></u>
Caracteristique	a	Ъ	с	d	е	f	g	h	i	j	k
Rendement (%)	0,76	0,08	0,08	0,26	0,80	0,48	0,41	0,08	0,07	0,14	0,14
Concentration en éthanol (%) de l'éluant de la colonne	5,0	5,0	3,5	1,5	3,5	7,5	10	5	7,5	10	10
Chromatographie sur papier ; R _{Gal} *dans le solvant 1	0,94	0,97	0,93	0,92	0,89	0,65	0,65	0,54	0,44	0,26	0,22
Rapport des monosaccharides neutres au 2-acétamido-2-desoxy- D-glucose	1,0	1,0	1,2	-	-	1,7	1,8	-	2,7	1,5	1,5
Composition molaire :											
D-galactose	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-mannose	0	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
2-acétamido-2-désoxy-D-glucose	1	1	1	0	0	1	1	0	1	2	2
Identification chromatographique de l'ose réducteur :											
D-mannitol		+	+	+	+			+ <		+	
2-acétamido-2-desoxy-D-glucitol	+		+			+	+	•	+		+
	,										

(*) R_{Gal} : Vitesse relative au galactose des différents oligosaccharides a à k.

L'oligosaccharide c s'est révélé hétérogène lors de la réduction, en effet, nous avons mis en évidence un rési du de D-mannitol ainsi qu'un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-Dglucitol. Cette observation a été confirmée par les résultats des expériences de méthylation où nous avons caractérisé, d'une part, le 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-D-mannose et le 3,4,6-Tri-O-méthyl-Dmannose et, d'autre part, le 2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-Tri-Ométhyl-D-glucose ainsi que le 2-acétamido-2-désoxy-3,6-Di-O-méthyl D-glucose. Il s'agit donc de deux disaccharides en mélange qui répondent donc aux deux structures suivantes : O-2-acétamido-2désoxy-&-D-glucopyranosyl-(1---+2)-D-mannopyranose et le 0-D-manno pyranosyl-(1---+4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose.

L'oligosaccharide d possède les propriétés d'un mannobiose : il s'agit du $0-\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-Dmannopyranose. La réduction par le borohydrure de sodium laisse apparaître du D-mannitol. Le disaccharide perméthylé donne du 2,3,4,6-Tétra-0-méthyl mannose et du 2,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose. Il est, en outre, hydrolysé par l' α -D-mannosidase de la Fève Jack. Il est intéressant de noter que ce composé a été obtenu à partir des produits de l'hydrolyse ménagée de l'ovomucoïde et des acétolysats du glycopeptide β .

L'oligosaccharide e est un isomère de liaison de l'oligosaccharide précédent, il s'agit de l'O- α -D-mannopyranosyl-(1 \longrightarrow 6)-D-mannopyranose. En effet, le disaccharide perméthylé laisse apparaître du 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-D-mannose et du 2,3,4-Tri-O-méthyl-D-mannose. Il est totalement hydrolysé par l' α -Dmannosidase de la Fève Jack.

L'oligosaccharide f répond à la formule du O- α -D-mannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 3)$ - β -D-mannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 4)$ -2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose. Cette structure a été définie sur la base des résultats suivants : la réduction par le borohydrure
de sodium fait disparaître la totalité du 2-acétamido-2-désoxy-Dglucopyranose. Le trisaccharide perméthylé donne du 2,3,4,6-Tétra O-méthyl-D-mannose et du 2,4,6-Tri-O-méthyl-D-mannose.

L'oligosaccharide g est un isomère du précédent. Il a été identifié au $0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 6)-\beta$ -Dmannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 4)-2$ -acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose. En effet, il renferme du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et du D-mannose dans le rapport molaire 1 : 2. On obtient par perméthylation du 2-amino-2-désoxy-3,6-Di-0-méthyl-D-glucose, du 2,3,4,6-Tétra-0méthyl-D-mannose et du 2,3,4-Tri-0-méthyl-D-mannose.

L'oligosaccharide h est un mannotriose. Il répond à la formule : $0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1-3)-0-[\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-D-mannopyranose. L'hydrolyse de ce glucide ne libère que du D-mannose. La réduction de l'oligosaccharide fait disparaître un résidu sur trois de mannose tandis qu'apparaît un résidu de mannitol. La méthylation fournit le 2,3,4,6-Tétra-0méthyl-D-mannose ainsi que le 2,4-Di-0-méthyl-D-mannose.

L'oligosaccharide i est un tétrasaccharide qui possède la structure suivante : $0 - \alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 - 3) - 0- $[\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 - 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 - 4) - 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose. En effet, ce composé renferme le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le D-mannose dans le rapport molaire de 1 : 3. La réduction de l'oligosaccharide fait disparaître l'unique résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. La méthylation fournit, outre du 2-amino-2-désoxy-3,6-di-0-métyl-D-glucose, du 2,3,4,6-Tétra-0-méthyl-D-mannose ainsi que du 2,4-Di-0méthyl-D-mannose.

L'oligosaccharide k est également un pentasac

charide qui répond à la structure suivante : 0-2-acétamido-2désoxy-D-glucopyranosyl-(1-----2)-α-D-mannopyranosyl-(1-----3)-[α-0 D-mannopyranosyl-(1------6)]-β-D-mannopyranosyl-(1-------4)-2-acétamido 2-désoxy-D-glucopyranose. L'hydrolyse de ce composé libère le D-mannose et le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dans les proportior 3 : 2 et la réduction fait disparaître l'un des deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. On obtient après méthylation de la molécule les 2,3,4,6-Tétra-0-méthyl-D-mannose, 3,4,6-Tri-0méthyl-D-mannose et 2,4-Di-0-méthyl-D-mannose ainsi que le 2-acéta mido-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose et 2-acétamido-2-désoxy 3,6-Di-0-méthyl-D-glucose.

d - Structure des oligosaccharides de la fraction basique.- Les quatre oligosaccharides b, c, h et i possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que les oligosaccharides B, C, H et I obtenus par acétolyse de ce glycopeptide. C'est la raison pour laquelle nous ne décrirons pas le détail de l'exploration de leur structure (Voir p. 67). Nous remarquerons cependant qu'à l'exception de l'oligosaccharide b, les trois autres oligosaccharides possèdent un résidu de D-mannose en position terminale réductrice.

C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La détermination des conditions optimales de l'hydrolyse acide partielle par les résines de polystyrène sulfoné nous a permis d'améliorer sensiblement les rendements en oligosaccharides et d'en isoler 15.

Ce procédé affecte une partie des groupements "acétamido" portés par les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et fournit deux catégories d'oligosaccharides : des oligosaccharides neutres rencontrés dans la fraction neutre et des oligosaccharides N-désacétylés rencontrés dans la fraction dite basique.

La connaissance de la structure de 11 oligosaccharides isolés de la fraction neutre des hydrolysats acides partiels de l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde permet de montrer que ce procédé de coupure chimique n'est pas spécifique d'un type donné de liaison glycosidique, en effet, nous observons que certains oligosaccharides possèdent un résidu de D-mannose en position réductrice terminale (par exemple, les oligosaccharide b, c_2, d, e, h et j) et que d'autres possèdent un résidu de 2acétamido-2-désoxy-D-glucose (par exemple, les oligosaccharides a, c_1, f, g, i et k). Les coupures affectent donc indifféremment, soit les liaisons mannosyl, soit les liaisons N-acétyl-hexosaminidyl (Tableau V ; p. 27).

La fraction basique renferme 4 oligosaccharide dont 3 possèdent un résidu de D-mannose en position réductrice terminale. La rupture préférentielle des liaisons mannosyl s'expl que dans ce cas par la stabilité relative de la liaison hexosaminidyl. En effet, cette stabilité est due au proton protecteur provenant de l'ionisation du groupement α -aminé libéré au cours de l'hydrolyse ménagée.

L'étude de la structure de ces oligosaccharide: isolés des hydrolysats de l'asialoglycopeptide ß nous permet de compléter les résultats des travaux préliminaires effectués au Laboratoire par ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (4,22) (Tableau VI). Ces auteurs avaient à l'époque isolé 15 oligosaccharides des hydrolysats acides partiels de l'ovomucoïde (<u>asialog</u>lycopeptide ß et sialoglycopeptide a en mélange), mais avec un rendement trop faible pour réaliser ensuite l'exploration complète de leur structure. Nous avons isolé et retrouvé, à l'exception des oligosaccharides II et X, -qui appartiennent au sialoglycopeptide @-, l'ensemble des oligosaccharides, certains ont été isolés en grande quantité et constituent déjà des modèles moléculaires précieux pour l'étude de l'activité de glycosidases. Les résultats que nous avons obtenus sont difficilement interprétables du point de vue de la connaissance de la structure de la fraction glycannique. En effet, il est difficile de reconstituer la structure complète de la molécule à partir de trop nombreux fragments isolés. Tout au plus, pourrions nous faire figurer dans le schéma la formule de cet oligosaccharide qui résulte de la confrontation des structures des oligosaccharides i, j et k : GlcNAc- β -(1-----2)-Man- α -(1-----3)

Tableau V

Structure des oligosaccharides isolés des fractions neutre (FN) et basiques (FB) des hydrolysats acides partiels par le Dowex 50 de l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde.

$$a$$
 Gal- β -(1-+ 4)-GlcNAc

- c_1 Man- β -(1-+++)-GlcNAc
- c_{2} GlcNAc- β -(1-2)-Man
- $d \quad Man \alpha (1 3) Man$

$$f = Man - \alpha - (1 - 3) - Man - \beta - (1 - 4) - GleNAc$$

$$g \quad \text{Man}-\alpha - (1 - 6) - \text{Man} - \beta - (1 - 4) - \text{GlcNAc}$$

h Man-
$$\alpha$$
-(1----3)
Man- α -(1----6) Man

j GlcNAc-
$$\beta$$
-(1-----2)-Man- α -(1-----3)
Man
GlcNAc- β -(1-----2)-Man- α -(1------6)

k GlcNAc-
$$\beta$$
-(1-----2)-Man- α -(1-----3)
Man- β -(1-----4)-GlcNAc
Man- α -(1-----6)

II - FRACTION BASIQUE

- c GlcNAc- β -(1-2)-Man

/ Man

GlcNAc-β-(1-----4)

Tableau VI

Composition en monosaccharides des oligosaccharides I à XV isolés des hydrolysats de l'ovomucoïde (<u>sialog</u>lycopeptide α et <u>asialog</u>lycopeptide β) par un échangeur de cations (D'après ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (4)).

Désignation des Oligosaccharides	Composition et schéma de structure des oligosaccharides
I	Gal-β-(1+4)-GlcNAc
II	Gal Man
III	Man-(1-+4)(?) Man
IV	Man-(1
V	Man GlcNAc
VI	GlcNAc Man
VII	Man ——— (Man ——— Man)
IIX	Man-(1
IX.	(Man, GlcNAc) —— Man
Х	Gal> GlcNAc
XI	Gal GlcNAC Man
XII	Man (Man, Man) GlcNAc
XIII	(Man, Man, GlcNAc) GlcNAc
XIV	(Man, Man, GlcNAc) Man
XV	Man, GlcNAc-(Man Man) GlcNAc

2. ACETOLYSE

I - HISTORIQUE

A - PRINCIPE

FRANCHIMONT, à la recherche de procédés d'acétylation de la cellulose, découvre dès 1879 (23) que le réactif, composé d'anhydride acétique et d'acide acétique, scinde en partie les liaisons glycosidiques de la cellulose et libère le cellobiose octoacétate. L'acétylation est donc couplée avec des réactions de coupure des liaisons glycosidiques. La méthode prend alors le nom d'acétolyse. Le principe, illustré par la figure 4 est le suivant : l'acide acétique, en milieu rigoureusement anhydre, coupe les liaisons glycosidiques en libérant des acétyl-glycosides. Toutefois, son action se porte également sur les groupements OH libres qui sont acétylés. On obtient finalement un mélange de monosaccharides et d'oligosaccharides peracétylés qui sont ensuite saponifiés et fractionnés.

Le réactif d'acétolyse couramment utilisé se compose du mélange : anhydride acétique-acide acétique et acide sulfurique, d'autres réactifs ont fait l'objet d'un nombre plus restreint d'applications, il s'agit des mélanges :

- anhydride acétique-acide perchlorique

- anhydride acétique-chlorure de zinc
- anhydride acétique-acide trifluoro acétique

Tous ces réactifs libèrent des ions "acétylium qui estérifient les fonctions alcools primaires et secondaires ainsi que les fonctions semi-acétaliques des monosaccharides et des oligosaccharides. Ces dernières sont très rapidement acétylées les processus de transosidation se trouvent de ce fait fortement inhibés. La coupure des liaisons glycosidiques est catalysée par l'acide sulfurique et l'acide acétique, on ne peut cependant dépasser la concentration de 5 p. 100 en acide sulfurique sans risquer de détruire les monosaccharides.



Fig. 4.- Acétolyse d'un polysaccharide (I) et saponification des dérivés peracétylés (II) obtenus. Ac : groupement acétyl (CH₃CO).



B - CARACTERISTIQUES ET APPLICATIONS

Les résultats et les informations que l'on obtient en appliquant ce procédé d'acétolyse peuvent se résumer de la manière suivante :

1° - Applications

L'acétolyse dégrade les polysaccharides et fournit dans des conditions expérimentales peu drastiques des oligosaccharides peracétylés, toutefois, des conditions plus acides provoquent la formation exclusive de mono-, di- et trisaccharides peracétylés.

L'évolution de l'application de cette technique peut être divisée en deux grandes périodes, en effet, dans un premier temps (1879-1956), les auteurs ont appliqué cette méthode à des quantités importantes de glucides composés essentiellement de polymères du glucose, du mannose, du fucose et de la N-acétylglucosamine ; dans un second temps (1956-1973), elle a été appliquée à l'étude structurale de polysaccharides contenant dans des proportions variables des monosaccharides "neutres", des acides sialiques et des N-acétylhexosamines.

a - Acétolyse d'homopolyosides.- La dégradation de la cellulose (SKRAUP et KONIG (24), SPENCER (25), DICKEY et WOLFROM (26)) par le mélange acétolysant composé d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique, a été l'une des toutes premières applications. DICKEY et WOLFROM (26) puis WOLFROM et DACONS (27) ont isolé des acétolysats de la cellulose une série homologue de cinq polymères identifiés au D-cellotriose, au D-cellotétraose, au D-cellopentaose, au cellohexaose et au celloheptaose.

En 1931, parallèlement aux travaux effectués sur la cellulose, BERGMAN *et al*. (28) et ZECHMEISTER (29) ont également appliqué l'acétolyse pour explorer la structure de la *chitine*, en modifiant toutefois le réactif acétolysant, le mélange anhydride acétique-acide acétique-acide sulfurique est remplacé par le mélange anhydride acétique-acide sulfurique. Les auteurs ont isolé des acétolysats : le Di-N-acétyl-hexa-O-acétyl chitobiose avec un faible rendement ainsi que le Tri-N-acétyl-octa-Oacétyl chitotriose ("hendéca-acétyl chitotriose"). La désacétylation alcaline (ZILLIKEN *et al.* (30)) de ces deux oligosides conduit à la formation de chitobiose, de chitotriose et de quatre autres composés considérés par les auteurs comme des produits de dégradation. En 1956 et 1957, KUHN et KRÜGER (31) identifient ces artefacts à des chromogènes, composés qui résultent de la cyclisation des N-acétylhexosamines sous l'effet des agents alcalins. L'application de l'acétolyse à des polysaccharides renfermant des N-acétylhexosamines se trouve donc limitée par la formation de chromogènes qui prennent naissance au cours de la O-désacétylation des acétolysats par les agents alcalins.

ASPINALL *et al.* (32) isolent d'un acétolysat de mannane, provenant du corozo (*Phytelephas macrocarpa*), une série homologue de 4 oligosaccharides (du mannobiose au mannopentaose). La structure d'autres mannanes, extraits du *saccharomyces cerevisiae*, a été explorée au moyen de deux techniques différentes : d'une part, l'acétolyse et, d'autre part, l'hydrolyse acide partielle. Les résultats obtenus par *acétolyse* : GORIN et PERLIN (33), LEE et BALLOU (34) ainsi que par *hydrolyse acide partielle* : PEAT *et al.* (35) permettent de penser que ce mannane possède une structure branchée, composée de liaisons 1,2 - 1,3 et 1,6 dont le squelette serait formé d'une chaîne polymannosique possédant exclusivement des liaisons α -1,6, les liaisons α -1,2 se localiseraient au point de branchement.

b - Acétolyse d'hétérosaccharides.- Dans une seconde période (1956-1973), les auteurs ont appliqué l'acétolyse à l'étude de la structure d'hétéropolyosides, en particulier, aux mucines, aux gangliosides ainsi qu'à quelques glycopeptides. Cette méthode a été utilisée avec succès dans l'étude de polysaccharides d'origine animale ou végétale, au contraire, elle a été très peu employée dans le domaine des glycoprotides, l'étude des acétolysats étant limitée à l'isolement d'un ou deux di-ou trisaccharides à partir des substances spécifiques de groupes sanguins (YOSIZAWA (36), MASAMUNE *et al.* (37, 38)) et du glycopeptide du Colostrum de Vache (KUHN et EKONG (39)).

2° - Stabilité des liaisons glycosidiques

L'ensemble de ces applications permet de démontrer qu'il existe une stabilité relative des lidisons glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse. Les informations que l'on obtient à ce sujet peuvent se résumer de la manière suivante :

a - Labilité de la liaison glycosidique du type 1--- 6. Dès 1952, WOLFROM et DACONS (27) isolent des hydrolysats acides partiels de l'iso-amylose un disaccharide identifié au O-a-D-gluc pyranosyl-(1____6)-glucopyranose et démontrent que cet oligosaccharide n'est pas le produit d'une réaction de transosidation. Cependant, ce même disaccharide n'a pu être isolé des acétolysats de l'iso-amylose. Ces résultats en apparence contradictoires, ne s'expliquent que par la grande labilité des liaisons 1____6 vis-à-vis de l'acétolyse. La démonstration de cette particulière labilité de la liaison 1 ____6 a été ensuite établie sur la base des résultats expérimentaux suivants : GORIN et PERLIN (33) puis LEE et BALLOU (34) isolent des acétolysats de mannanes, dont les liaisons sont du type α -1,3 et α -1,6, le disaccharide : O- α -Dmannopyranosyl-(1 ---- 3)-mannopyranose. Par contre, PEAT et al. (35) obtiennent par hydrolyse partielle du même mannane un disaccharide identifié au 0-a-D-mannopyranosyl-(1 ____6)-mannopyranose. L'acétolyse scinde donc préférentiellement les liaisons 1-6, tandis que l'hydrolyse ménagée coupe essentiellement les liaisons 1 ----- 3 (Fig. 5).

Les résultats précédents sont confirmés par les travaux de MATSUDA *et al.* (40) qui effectuent l'acétolyse (5 h ; 30° C) comparée de l'isomaltose (0- α -D-glucopyranosyl-(1-6)-glucopyranose) et du nigérose (0- α -D-glucopyranosyl-(1-3)-glucopyranose) et observent que la liaison glycosidique du nigérose est intacte alors que celle de l'isomaltose est scindée. Cette propriété de l'acétolyse a ensuite été mise à profit pour isoler par acétolyse de dextranes le nigérose et le kojiobiose.



Fig. 5b.- Hydrolyse acide partielle d'un mannane isolé du saccharomyces cerevisiae, formation préférentielle du $O-\alpha-D$ -mannopyranosyl-(1-----6)-mannopyranose selon PEAT et al. (35).

b - Stabilité de la liaison sialosyl.- L'aspect le plus intéressant de cette technique réside dans la possibilité d'obtenir des oligosaccharides renfermant de l'acide N-acétylneuraminique. La liaison sialosyl est très labile vis-à-vis des acides minéraux dilués, elle est scindée par l'acide sulfurique 0,05 N; 100° C pendant 1 h. De ce fait, l'hydrolyse ménagée n'est pas une technique favorable à l'obtention de sialosides. Au contraire, elle est beaucoup plus stable vis-à-vis des mélanges acétolysants, cependant, cet aspect avantageux de la technique d'acétolyse a reçu jusqu'à présent très peu d'applications, l'étude des acétolysats étant limitée à l'isolement d'un trisaccharide à partir du ganglioside G₁ (KUHN et WIEGANDT (41)) ainsi que deux sialosides à partir du dilactaminyl-lacto-N-tétraose (GRIMMONPREZ *et al.* (42), BAYARD (43)). c - Stabilité du groupement "acétamido" des N-acétylhexosamines.- L'acétolyse préserve les groupements "acétamido" présents dans les mucopolysaccharides, elle fournit, de ce fait, des oligosaccharides N-acétylés. YOSIZAWA (36) et MASAMUNE et YOSIZAWA (44) isolent ainsi des acétolysats de la mucine stomacale du Porc un trisaccharide : le 0-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranc syl-(1 ---- 4)-D-galactopyranosyl-(1 ---- 4)-2-acétamido-2-désoxy-Dglucopyranose.

3° - Modification des glucides au cours de l'acétolyse

a - Anomérisation. - L'anomérisation des aldohexoses peracétylés dans le milieu acétolysant est connue depuis longtemps Dans la série D des glucides, le composé préférentiellement formé est l'anomère O-acétylé α .. En effet, dès 1934, HANN et MUDSON (45 observent que l'acétolyse des méthyl-D-aldohexopyranosides tétraacétates donne exclusivement l'anomère α . Cette observation est ensuite confirmée par les travaux de FREUDENBERG et SOFF (46) qui obtiennent par acétolyse du D-glucopyranose pentaacétate un mélang renfermant 88 p. 100 de l'anomère α et 12 p. 100 de l'anomère β . Les études concernant le méchanisme de cette anomérisation ont été entreprises par LEMIEUX (47) et son école puis par JANSON et LINDBERG (48), cependant l'état actuel de nos connaissances ne nou permet pas d'élaborer de conclusions définitives à ce sujet.

b - Epimérisation. - La possibilité d'épimérisation des glucides durant le processus d'acétolyse ne doit pas être négligée. JERKEMAN (49) prépare le D-mannofuranose pentaacétate par acétolyse du 2,3 - 5,6-Di-O-isopropylidène-D-mannofuranose et obtient, en outre, après désacétylation des acétolysats par la triméthylamine, le D-glucose et le D-mannose dans le rapport 8 : 2 De la même manière, il est démontré que le méthyl- β -D-mannofuranoside est en partie transformé en D-glucose. Cependant, on n'observ aucune modification de structure au cours de l'acétolyse des méthyl- α -D-mannopyranoside et méthyl- β -D-mannopyranoside. D'autres travaux semblent toutefois nécessaire afin de définir plus précisément les conditions d'épimérisations décrites par JERKEMAN. Il serait utile, en particulier, de savoir si ces modifications de structure s'effectuent réellement au cours de l'acétolyse comme le prétend l'auteur, ou bien durant la O-désacétylation.

C - CONCLUSIONS

a - L'acétolyse dégrade les polysaccharides en libérant des monosaccharides et des oligosaccharides. Elle a été largement utilisée avec succès dans l'étude de la structure des homopolysaccharides d'origine animale ou végétale, au contraire, elle a été très peu employée dans le domaine des glycoprotéines car les procédés de 0-désacétylation des acétolysats dégradent les N-acétylhexosamines et les transforment en chromogènes.

b - Comme le suggère WOLFROM, il semble qu'il existe toute une gamme de stabilité des liaisons O-glycosidiques vis-àvis des réactifs d'acétolyse, cependant, peu de travaux illustrent cette hypothèse. Il est cependant démontré que la liaison de type 1 — 6 est dotée d'une particulière fragilité, par contre, la liaison sialosyl est en partie stable, ce qui permet d'isoler dans les acétolysats des sialyl-oligosaccharides. L'acétolyse présente, en outre, un avantage certain sur l'hydrolyse par les *acides dilués* ou par les *résines de polystyrène sulfoné* car elle ne fait courir aucun risque de transglycosylation et ne provoque pas de N-désacétylation des N-acétylhexosamines.

II - ACETOLYSE. TRAVAUX PERSONNELS

L'hydrolyse acide partielle des glycoprotides, utilisée de façon courante, présente néanmoins les inconvénients majeurs suivants : libération d'une quantité élevée de monosaccharides au détriment du rendement en oligosaccharides, libération quantitative des acides sialiques qui prive les hydrolysats des sialo-oligosaccharides et risque de transglycosylation avec formation artificielle d'oligosaccharides. Parmi les méthodes susceptibles d'éliminer ces inconvénients, l'acétolyse a retenu notre attention car elle a été largement utilisée avec succès dans l'étude de polysaccharides d'origine animale ou végétale. Au contraire, elle a été très peu employée dans le domaine des glycoprotides, l'étude des acétolysats étant limitée à l'isolement d'un ou deux di- ou trisaccharides à partir de substances spécifiques de groupes sanguins (36, 37, 38) et du glycopeptide du Colostrum de Vache (39).

Dans le présent rapport, nous décrivons un procédé original de fractionnement des acétolysats qui fournit, dans le cas de sialoglycoprotides, trois groupes de composés : des sialo-oligosaccharides, des oligosaccharides neutres et des glycoprotides qui proviennent respectivement des parties *externes*, *centrales et internes* des groupements glycanniques. En outre, nous avons réalisé, sur des modèles moléculaires, une étude poussée de la stabilité des liaisons O-glycosidiques afin de prévoir les points de rupture au sein des chaînes glycanniques. Nous avons, d'autre part, appliqué ce procédé à l'étude structurale de l'<u>asialc</u> glycopeptide β et du <u>sialog</u>lycopeptide α de l'ovomucoïde et nous avons effectué une étude détaillée des oligosaccharides neutres et acides dans le but de parfaire et de compléter nos résultats préliminaires obtenus par hydrolyse acide ménagée de ces molécules.

A - DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES ACETOLYSATS

Ce procédé de rupture séquentielle utilisé antérieurement par les auteurs pour explorer la structure des glucides tels que la cellulose et la chitine ne faisait guère appel à d'autres méthodes de fractionnement que la chromatographie de partage sur papier ou la chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-*Celite*, car les acétolysats étaient dans ce cas de composition relativement simple.

Dans la mesure où nous désirons appliquer ce procédé d'exploration de la structure de glycopeptides, nous avons tiré parti des trois observations suivantes :

- la grande stabilité des liaisons aspartyl-N-acétylglucosaminylamine (43)

- la stabilité moindre des liaisons sialosyl (41, 42)

- l'absence de N-acétylation des amino-acides (43) pour mettre au point un procédé original de fractionnement des acétolysats glycopeptidiques.

1º - Partie expérimentale

a - Acétolyse des glycopeptides.- Nous avons appliqué le protocole expérimental décrit par KUHN et EKONG (39) que nous avons modifié en réalisant la précipitation quantitative des glucides peracétylés contenus dans la phase d'extraction chloroformique par l'éther de pétrole. Les glycopeptides rigoureusement anhydres sont ajoutés par petites fractions, dans la proportion de 1 g pour 25 ml, à un mélange maintenu à 4° d'acide acétique glacial, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique conc. (10 : 10 1; V/V). La solution obtenue est maintenue à 20° pendant 1 à 4 jours sous agitation constante. Dans quelques expériences, nous avons en outre introduit du D-mannose-1-¹⁴C (20 µCi par ml de solution acétolysante) afin de vérifier, par autoradiographie des chromatogrammes, l'absence de réaction de transglycosylation.

Les solutions d'acétolyse sont versées goutte à goutte sur 75 g de glace pilée. Après décongélation, le pH du mélange est amené à 4,5 par l'addition d'hydrogénocarbonate de sodium. La gelée transparente visqueuse qui renferme les glucides acétylés est extraite 8 fois par 200 ml de chloroforme pur. Les extraits chloroformiques sont rassemblés, lavés par 150 ml d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 1 % et séchés sur chlorure de calcium anh. La solution obtenue est concentrée sous pression réduite à environ 20 ml. L'addition de 2 l d'éther de pétrole provoque la précipitation quantitative des glucides peracétylés que l'on recueille par centrifugation après un repos de 18 h à 4°. On obtient ainsi la *phase chloroformique* (précipité) dont les constituants sont immédiatement saponifiés. Quant à la *phase aqueuse*, elle est directement soumise à la chromatographie sur échangeurs de cations (Fig. 6 ; p. 40).

b - O-désacétylation des composés peracétylés de la phase chloroformique. - Nous avons jugé nécessaire d'effectuer une étude critique systématique des méthodes classiques de 0-désacétylation car celles-ci avaient été appliquées essentiellement à des dérivés acétylés de monosaccharides neutres ou à des produits d'acétolyse de polysaccharides dépourvus de N-acétylhexosamines. Or, celles-ci sont sensibles à l'action des agents alcalins quand elles se trouvent en position terminale réductrice et quand, en outre, leur groupement hydroxyle en C-4 est libre. Dans ces conditions, elles donnent, en effet, naissance à des chromogènes qui demeurent fixés au reste de la chaîne glucidique ou qui s'en détachent selon que la N-acétylhexosamine est conjuguée en C-6 ou en C-3. Nos essais ont été effectués sur le D-galactose pentaacétate et sur le 2-amino-2-désoxy-D-glucose pentaacétate. La composition en glucides des solutions obtenues a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques, chromatographiques et électrophorétiques décrites dans les monographies 1 et 2 du Laboratoire (20). Les chromogènes ont été recherchés par chromatographie sur papier dans le système-solvant : 2-butanol saturé d'eau et révélés par le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde.

- Saponification par l'hydroxyde de sodium (50).- A 200 r d'hydroxyde de sodium 0,1 M, on ajoute 50 ml d'une solution acétonique renfermant 100 mg de composé acétylé. La solution est maintenue constamment à 4° et des prélèvements de 20 ml sont effectués à des temps variant de 5 à 75 min. L'excès d'hydroxyde de sodium est dosé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M. Chaque fraction ainsi neutralisée est purifiée par un passage successif sur une colonne (2 x 40 cm) de Dowex 50 (X 8 ; 25-50 "mesh" ; H⁺) puis de Duolite A-40 (HCO₂⁻). Les effluents neutres auxquels on joint les eaux de lavage des résines sont concentrés à 10 ml.

Sialoglycopeptide

Dissolution dans un mélange d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique (10:10:1). Action à 20° C pendant 1 à 5 j. Addition de 3 à 4 vol. d'eau glacée. Extraction par le chloroforme à pH 4,5



Fig. 6.- Acétolyse d'un glycopeptide. Saponification et fractionnement des dérivés peracétylés obtenus. ANAN : acide N-acétylneuraminique ; Asp : acide aspartique ; le signe O représente les monosaccharides.

- Saponification par le méthanol ammoniacal (51).- Les composés peracétylés sont dissous à raison de 10 mg dans 1 ml de méthanol saturé d'ammoniac. La solution est maintenue à 4° pendan 6 h, sous agitation magnétique. Le solvant est ensuite rapidement éliminé par évaporation sous vide à 20° et le résidu sec est repr: avec une quantité déterminée d'eau distillée.

- Saponification par la triméthylamine (49).- Les D-galactose et 2-amino-2-désoxy-D-glucose pentaacétates (100 mg de chacun) sont dissous dans le mélange méthanol-eau (8 : 1 ; V/V) auquel on ajoute une solution de triméthylamine à 45 % (3 vol.). La solution est maintenue à 4° pendant 18 h et concentrée ensuite sous pression réduite.

- Saponification par le méthylate de sodium (52).- Les composés acétylés (50 mg de chacun) sont dissous dans 100 ml de solution méthanolique de concentration finale en méthylate de sodium 0,5-0,1 et 0,01 M. Les solutions sont maintenues à 4° pendant des temps variant de 10 à 60 min. Elles sont ensuite débarrassées des ions sodium par passage sur une colonne (1 x 10 cm) de Dowex 5 (X 8 ; 25-50 "mesh" ; H⁺). La solution effluente est ensuite conce: trée sous pression réduite à 5 ml.

c - Fractionnement chromatographique des produits de l'acétolyse.- Les solutions aqueuses des constituants de la phase chloroformique préalablement saponifiés ont été soumis à la chromatographie sur Dowex 50 (X 2 ; 50-200 "mesh" ; H⁺) et de Dowex 1 (X 4 ; 200-400 "mesh" ; HCO₂). On obtient deux fractions dans le cas d'asialoglycopeptides : la "Fraction Neutre" qui résulte du passage sur les deux types d'échangeurs d'ions et la "Fraction Basique I" déplacée de l'échangeur de cations par une solution d'ammoniaque à 5 % (V/V). Dans le cas de sialoglycopeptides, on obtient une troisième fraction, la "Fraction Acide", par le traitement de l'échangeur d'anions avec une solution formique à 2 % (V/V) La phase aqueuse est passée, sans saponifica-

tion préalable, sur une colonne (2 x 25 cm pour des aliquotes correspondant à 100 mg de glycopeptide) de Dowex 50 (X 2 ; 100-200 "mesh" ; H⁺) qui fixe les peracétyl-glycoprotides hydrosolubles.

Après un lavage soigneux de la résine avec de l'eau distillée, ceux-ci sont déplacés par une solution d'ammoniaque à 5 % (V/V) qui réalise, à la fois, le déplacement des composés et leur saponification. Cette fraction constitue la "Fraction Basique II" de la *phase aqueuse*.

Nous avons fractionné les oligosaccharides sur des colonnes de charbon-*Celite* (mélange à poids égaux de charbon Activit X-100 et de *Celite* 535 préalablement lavés le premier, avec de l'acide chlorhydrique concentré puis avec de l'eau distillée et, la seconde, avec de l'eau distillée). La taille des colonnes était déterminée sur la base de 0,8 x 10 cm pour 10 mg de glucides totaux.

Le fractionnement de quelques composés de faible masse moléculaire a été réalisé par chromatographie sur Séphadex G-15 dans les conditions suivantes (pour 10 mg de substances) : colonne de 2 x 86 cm ; élution par l'eau ; débit : 5,6 m h ; volume de fractions : 2,8 ml.

2° - Résultats

a - Choix d'un procédé de O-désacétylation.- Les résultats que nous a fourni l'étude critique des différents procédés de O-désacétylation en milieu alcalin, appliqués aux dérivés peracétylés du D-galactose et du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose choisis comme modèles, peuvent se résumer de la manière suivante : On observe que l'action de l'hydroxyde de

sodium 0,08 M à 24° et à 4° sur le peracétyl-D-galactose réalise une saponification totale en 60 mn mais que son action à 24° est à proscrire car on ne peut éviter dans ce cas la destruction d'une proportion importante de D-galactose (35 p. 100 avec 60 mn) (Fig. 7). Au contraire, à 4°, le D-galactose libéré est retrouvé quantitativement dans le milieu réactionnel, même au-delà du temps nécessaire pour réaliser une saponification totale. Nous avons étudié par chromatographie et électrophorèse sur papier le comportement du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose tétraacétate en présence d'hydroxyde de sodium 0,08 M à 4° pendant 60 mn. La chromatographie sur papier révèle la présence, à côté d'un composé X que nous



Fig.7.- Saponification du D-galactose pentaacétate par l'hydroxyde de sodium 0,08 M à 24° et à 4°.

43

BIJS LILLE avons isolé par chromatographie préparative sur papier et identifié par électrophorèse au 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (Fig. 8), d'une proportion importante de chromogènes (28,5 p. 100 ; Tableau VII). La saponification des oligosaccharides peracétylés par l'hydroxyde de sodium ne paraît donc pas être retenue car elle fait courir un risque de destruction du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose situé en position terminale réductrice dans les oligosaccharides.



Α

В

- Fig. 8.- A. Chromatographie des composés formés par l'action de l'hydroxyde de sodium 0,08 M à 4° pendant 1 h sur le 2-acétamido-1,3,4,6-tétra-0-acétyl-2-désoxy-D-glucose suivie d'une purification sur échangeurs de cations. Chromatographie dans du 2-butanol saturé d'eau ; papier Whatman n° 1 pendant 16 h ; révélation par la réaction d'Ehrlich "indirecte" (E:i.) et "directe" (E.d.) ; T : témoin de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (GlcNAc) ; S : solution de saponification ; X : composé identifié par électrophorèse (B) au 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose.
 - B. Electrophorèse du composé X isolé par chromatographie préparative sur papier dans les conditions décrites en A. Electrophorèse selon FOSTER et STACEY (53) sur papier Arches 304 en tampon de borate de sodium de pH 9,2; 12 V/cm pendant 4 h; révélation par le réactif d'Ehrlich; T : témoins de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (GleNAc), 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose (GalNAc) et 2-acétamido-2-désoxy-D-mannose (ManNAc).

Tableau VII

ъ Гл Action de divers agents de O-désacétylation sur le 1,2,3,4,6-Penta-O-acétyl-D-galactose et sur 2-acétamido-1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-désoxy-D-glucose.

Agents	Temp. (°)	Temps (h)	Gal (%) (a)	GNAc (%) (b)	Réactions se Glycosylamines	econdaires Chromogènes (c)	
Hydroxyde de sodium 0,08 M	4	ᠳ	101	71,5	0	28,5	1
Méthanol ammoniacal	Ŧ	ى ب	t1 t1	79,2	÷	16,1	
Triméthylamine	4	18	92	65,3	0	32,7	
Méthylate de sodium 0,01 M	4	-	100	94,5	0	0	

(a) D-galactose récupéré, dosé par chromatographie quantitative sur papier.

(b) 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dosé colorimétriquement (voir la Monographie n° 1 du Laboratoire (20)).

2-acétamido-2-désoxy-D-glucose libre, des chromogènes formés en milieu alcalin à partir de 2-acéta-mido-2-désoxy-D-glucose. Dans un premier temps, nous dosons, par la méthode de LEVVY et Mc ALLAN, l'ensemble des N-acétylhexosamines et des chromogènes. Nous effectuons ensuite une seconde série de détermination en l'absence de borate de potassium qui était destiné à transformer le 2-acétamido-2-Nous avons été amenés à mettre au point un procédé de caractérisation et de dosage, en présence de désoxy-D-glucose en chromogènes : dans ces conditions, nous dosons uniquement les chromogènes préexistants et nous calculons, par différences, la quantité de N-acétylhexosamines. (c)

Le méthanol ammoniacal ne peut être employé comme agent de saponification car il donne lieu à la formation de glycosylamines (Fig. 9) et provoque la formation de chromogènes (Tableau VII ; p. 45).



Fig. 9.- Chromatographie des composés formés au cours de l'action du méthanol ammoniacal sur le D-galactose pentaacétate sur papier Schleicher et Schüll n° 2040 b : pyridine/ acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2 ; V/V) pendant 18 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; T : témoins de D-galactose (Gal), D-glucose (Glc), D-mannose (Man) et 2-acétamido-2-désoxy-D-Glucose (GlcNAc) ; S : solution de saponification ; A, B : α- et β-(ou pyrano- et furano-) D-galactosylamines (cf. CEREZO et DEULOFEU (54)) de R_{Gal} 1,83 et 2,00 respectivement.

La triméthylamine réalise une saponification assez satisfaisante du D-galactose pentaacétate mais elle transforme aussi une proportion importante du 2-acétamido-2-désoxy-Dglucose en chromogènes. Pas plus que les précédents, ce procédé ne peut donc être utilisé pour saponifier les glucides réducteurs peracétylés. La cinétique d'action du méthylate de sodium à différentes concentrations sur le 2-amino-2-désoxy-D-glucose pentaacétate a été étudiée en fonction du temps (Tableau VII et Fig. 10). On voit que, seul, le méthylate de sodium 0,01 M agissant pendant 1 h à 4° réalise la saponification quantitative de ce compo sé sans provoquer la formation de chromogènes.



Fig. 10.- Action du méthylate de sodium 0,01-0,1 et 0,5 M sur le 2-acétamido-1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-D-glucose. A : formation du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. B : formation des chromogènes. En abscisses : durée de la réaction en minutes (mn). En ordonnées : pourcentage (par rapport au 2-acétamido-2désoxy-D-glucose) de chromogènes présents dans le milieu réactionnel préalablement purifié sur échangeur de cations.

Les molarités habituellement utilisées par les auteurs (méthanolate de sodium 0,1 et 0,5 M) conduisent à la formation de chromogènes de KUHN dans les proportions respectives de 17 et 22 p. 100. Ces composés, résultant de la cyclisation en C-4 des N-acétylhexosamines, ont été dosés colorimétriquement (voir la légende du Tableau VII (p. 45)) et identifiés en chromatographie sur papier (voir la légende de la Fig. 8 A (p. 44)).

b - Fractionnement sur échangeurs d'ions des acétolysats de glycopeptides. - Nous avons appliqué à l'asialoglycopeptide ß de l'ovomucoïde les procédés d'acétolyse (durée de la réaction : 4 jours) et d'extraction des composés peracétylés que nous avons décrits dans les paragraphes précédents. La composition centésimale et molaire en glucides et en amino-acides de chacune des fractions est précisée dans le Tableau VIII. La "Fraction Neutre" saponifiée est la plus importante puisqu'elle représente 75 % du glycopeptide natif. Elle ne renferme pas d'acides aminés et est donc exclusivement de nature glucidique. La "Fraction Basique I" saponifiée (4,5 environ du glycopeptide natif) contient des acides aminés conjugués acide aspartique et thréonine. Le comportement chromatographique d cette fraction basique retenue par l'échangeur de cations prouve qu les fonctions amines des acides aminés n'ont pas été acétylées au cours de l'acétolyse. La "Fraction Basique II" (12,4 % environ du glycopeptide natif) est constituée, elle aussi, par des glycopeptides renfermant une proportion relativement plus faible de glucides. Elle renferme des composés peracétylés rendus hydrosolubles en milieu acide par l'importance de la copule peptidique hydrophile en regard de la copule glucidique peracétylée hydrophobe L'application au sialoglycopeptide α des mêmes

procédés d'acétolyse et de fractionnement fournit, outre les 3 fractions précédentes, une "Fraction Acide". Les principales caractéristiques des quatre fractions obtenues sont décrites dans le Tableau IX. Les "Fractions Basiques I et II" présentent beaucoup d'analogies avec les fractions homologues obtenues à partir de l'<u>asialog</u>lycopeptide β : en effet, les rendements sont très voisins et, comme dans le cas précédent, il s'agit de deux fractions de nature glycopeptidique. Enfin, leur composition en glucides sont semblables. La seule différence apparente porte sur la présence de

Tableau VIII

Composition centésimale et molaire des fractions obtenues par chromatographie sur résines échangeuses d'ions des phases chloroformique et aqueuse des acétolysats de l'<u>asialog</u>lycopeptide 8 de l'ovomucoīde

Caractéristiques	3lycopeptide 8		Fractions		ſ
		"Neutre"	"Basique I"	"Basique II"	
Rendements (%)		0 11 6	L		
Composition centésimale (%)		06+7	د +	12,4	
Monosaccharides neutres	23,8	29.6	11.7	a c	
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	39.4	70.1	10 T	7 0 7 1 0 1	
Amino acides totaux	t t		ה מ ה ס ר	0 0 7 0 7 0	
Rapport molaire du 2-acétamido-2-désoxy- D-glucose aux monosaccharides neutres	1,68	2,3	0,95	1,54	
Composition molaire (a)					
D-Galactose	~-1	۲-	ند ح	C	
D-Mannose	ю	یں ا	, (, 7 7 0	·
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	10.3		4° 0	0T.CT	
Acide aspartique	1,15		• 7	, ⁻¹	
Thréonine	0,85		~ ₁ ⊂		
)	7 ° C	0°0	
US					

(a) En moles par mole de glycopeptide dans le cas du glycopeptide B et des "Fractions Basiques" moles par mole de D-galactose dans le cas de la "Fraction Neutre".

49

no :

Tableau IX

Composition centésimale et molaire des fractions obtenues par chromatographie sur résines échangeuses d'ions des phases chloroformique et aqueuse des acétolysats du sialoglycopeptide lpha de l'ovomuco \ddot{i} de.

				Fractions	
caracteristiques	Glycopeptide a	"Neutre"	"Acide"	"Basique I"	"Basique II"
<pre>sendements (%)</pre>		49°3	13.6	۲ ۲	ц С Т
Composition centésimale (%)			> • •		0°51
Monosaccharides neutres	37,3	44.6	37.8	u a r	
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	39,4	0 23 2	0 + 0		7°07
Acide N-acétylneuraminique	7,8	Ó	57.0		
Amino acides totaux	14,0	0	` o		C 0 0
<pre>kapport molaire du 2-acétamido-2-desoxy-)-glucose aux monosaccharides neutres</pre>	1,02	1,02	0,23	0,93	1,62
kapport monosaccharides neutres à Icide N-acétylneuraminique	4,00		0,58		
composition molaire (a)					
D-Galactose	4	~1	←I	С	C
D-Mannose	2,6	2,8	1,2	2.7	0 7 μ
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	3,8	ອ ້ ຕ	0,5	2.5	- C C -
Acide N-acétylneuraminique	0,8	0	0,8	- 0	4 C
Acide aspartique	1,07	0	` o	• • •)
Thréonine	0,33	0	0		- 0,17

(a) En moles par mole de glycopeptide dans le cas du glycopeptide α et des "Fractions Basiques" ; en moles la "Fraction Neutre" et de la "Fraction Acide". par mole de D-galactose dans le cas de

D-galactose dans la "Fraction Basique I" fournie par l'<u>asialo-</u> glycopeptide β alors que ce glucide est absent dans la fraction homologue fournie par le <u>sialog</u>lycopeptide α . La "Fraction Neutre" ne représente plus que 50 % environ du <u>sialog</u>lycopeptide α au lieu de 75 % dans le cas de l'<u>asialog</u>lycopeptide β . L'appauvrissement en oligosaccharides neutres de cette fraction s'est fait au profit de la "Fraction Acide" des sialo-oligosaccharides. Le caractère neutre de cette fraction s'explique par l'absence d'acide sialique et d'acides aminés. A cet égard, elle est donc uniquement de nature glucidique. La "Fraction Acide" est la seule à contenir de l'acide sialique. Comme elle est dépourvue d'acides aminés, nous pouvons conclure qu'elle est composée de sialosides, de mono- et d'oligosaccharides.

- Fraction Neutre. - La chromatographie sur papier de la "Fraction Neutre" des acétolysats du glycopeptide β (Fig. 11 ; p. ! montre que ces derniers renferment une proportion très faible de monosaccharides (D-galactose, D-mannose, 2-acétamido-2-désoxy-Dglucose) et une quantité importante d'oligosaccharides. Le nombre et la quantité des oligosaccharides sont maximaux au bout de 4 jours d'acétolyse. Nous avons donc retenu, dans la suite de nos expériences, cette durée de l'acétolyse. Dans le cas de l'acétolyse effectuée en présence de D-mannose-1¹⁴C, l'autoradiographie des chromatogrammes précédents révèle la présence d'une seule tache à l'emplacement du D-mannose. Ce résultat démontre que l'acétolyse ne provoque pas de transglycosylation. Dans le cas de l'<u>asialo</u>glycopeptide β , la chromatographie sur charbon-*Celite* (Tableau X) confirme la démonstration par chromatographie sur papier que l'acétolyse libère relativement peu de monosaccharides.

- Fraction Basique I.- La chromatographie et l'électrophorèse sur papier n'ont pas permis de séparer d'une manière satisfaisante les constituants de cette fraction en raison de leur masse moléculaire relativement élevée, dans le cas de la chromatographie, et de l'identité des charges, dans le cas de l'électrophorèse. Au contraire, la chromatographie sur gel de Séphadex G-15



Fig. 11.- Chromatographie des glucides neutres dans l'acétolysat (A) et dans l'hydrolysat partiel (B) par le Dower 50 du glycopeptide ß de l'ovomucoîde, sur papier Whatman n° 3, systèmesolvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2 ; V/V) pendant 18 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. Oligo : zone des oligosaccharides ; Gal : D-galactose ; Man : D-mannose ; GleNAc : 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose.





Tableau X

Composition des fractions obtenues par chromatographie sur colonne de "charbon-*Celite*" de la "Fraction Neutre" de la phase chloroformique d'un acétolysat de l'asialoglycopeptide de l'ovomucoïde ď

Rendements (%) (b) 9,0 11,3 Monosaccharides neutres (%) 96,5 53,6 D-Galactose (%) 53,6 42,9	11,3 79,7 33,8
Monosaccharides neutres (%) 96,5 D-Galactose (%) 53,6 D-Mannose (%) 42,9	33,8
D-Mannose (%) 42,9	-
	4 , 1
2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (%) 0 (c)	(c) 65.8
Rapport D-mannose à D-galactose 0,8 (d)	(d) 7,1 (d)

"Fraction Neutre" soumise à la chromatographie. ---- " IP/P/ 40 10

(c) Cette fraction renferme uniquement du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose.

(d) A titre de comparaison, les valeurs du même rapport pour le glycopeptide α natif et pour la "Fraction Neutre" totale sont respectivement 5 et 5,8.

nous a donné 2 pics principaux, tous deux de nature glycoprotidique (Fig. 12). Le Pic I est hétérogène en électrophorèse. Il renferme des glycoprotides dont la masse moléculaire maximale, déterminée sur la base du volume d'exclusion du Bleu Dextran, est de l'ordre de 820 et qui sont composés de D-mannose et de 2-acétamidc 2-désoxy-D-glucose (en quantité équimolaire), d'acide aspartique et de thréonine. Le Pic II possède une masse moléculaire de l'ordre de 500 et renferme du D-mannose, du 2-acétamido-2-désoxy-Dglucose et de l'acide aspartique (accompagné parfois de traces de thréonine), dans des proportions sensiblement équimolaires. Sur la base de résultats antérieurement acquis (55) nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il présente l'enchaînement suivant : Man \rightarrow GNAc \rightarrow Asn (Thr).



Fig. 12.- Chromatographie sur colonne (2 x 86 cm) de Séphadex G-15 de 10 mg de la "Fraction Basique" de l'acétolysat du glycopeptide a de l'ovomucoide : 2,8 ml ; réaction à l'orcinol (____) et à la ninhydrine (- - -). Les traits pleins verticaux correspondent au volume d'exclusion du Bleu Dextran (BD), du raffinose (Raf) et du D-glucose (Glc).

- Fraction Basique II.- Contrairement aux glycoprotides de la phase chloroformique, ceux de la phase aqueuse renferment une plus faible proportion de glucides et leur masse moléculaire est en moyenne plus basse. Dans le cas du <u>sialog</u>lycopeptide α , en particulier, la "Fraction Basique II" contient près de 40 % de protides totaux. La chromatographie sur papier nous a permis d'isoler l'un de ses constituants composé, en proportions équimolaires, d'acide aspartique, de thréonine et de 2-acétamido-2désoxy-D-glucose. En nous fondant à nouveau sur des résultats antérieurement acquis (55), nous pensons qu'il s'agit du glycopeptide GNAc — Asn (Thr).

- Fraction Acide. - L'électrophorèse sur papier à pH 3,9 (Fig. 13) montre que la "Fraction Acide" de l'acétolysat du <u>sialo</u>glycopeptide α ne renferme que des traces de composés neutres et que les glucides acides se résolvent en trois fractions : l'une (R_{Lactose} 1,70) correspond à l'acide N-acétylneuraminique libéré au cours de l'acétolyse ; les deux autres (R_{Lactose} 1,52 et 1,40) correspondent à des sialosides qui ont été purifiés en chromatographie sur colonne de charbon-*Celite*.



Fig. 13.- Electrophorèse de la "Fraction Acide" (FA) de l'acétolysat du glycopeptide a de l'ovomucoîde sur papier Whatman n° 2; tampon de pH 3,9; 7 V/cm pendant 4 h; révélation à l'oxalate d'aniline; T : témoin de lactose (Lac).

3° - Discussion

La dégradation des glycoprotides par acétolyse réalisée dans le but d'obtenir des fragments oligosaccharidiques représente un avantage certain sur l'hydrolyse ménagée par les acides dilués ou par les résines de polystyrène sulfoné. En effet, contrairement à l'hydrolyse, l'acétolyse libère des quantités très faibles de monosaccharides et une proportion élevée d'oligosaccharides, ne fait courir aucun risque de transglycosylation, ne provc que pas de N-désacétylation des N-acétylhexosamines, ne rompt qu'une partie des liaisons sialosyl comme l'avaient démontré antérieurement KUHN et WIEGANDT (41) ne réalise pas la N-acétylation de la fraction peptidique et respecte en partie ou en totalité les liaisons asparagine-2-acétamido-2-désoxy-D-glucose.

Nous avons tiré parti de ces propriétés pour mettre au point, avec des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde, un procédé de fractionnement de l'extrait chloroformique des acétolysats par chromatographie sur des résines échangeuses de cations et d'anions, Nous obtenons de cette manière, dans le cas particulier d'un sialoglycoprotide, trois fractions. La première, non retenue par les résines, contiendes oligosaccharides neutres qui proviennent de la partie "centrale des groupements glycanniques. La seconde, acide, déplacée de l'échangeur d'anions est constituée par des sialo-oligosaccharides qui appartiennent à la fraction la plus "externe" des groupements glycanniques (cette fraction n'existe évidemment pas dans les acétolysats d'asialoglycoprotides). La troisième, éluée de l'échangeur de cations, renferme des glycoprotides dont la copule glucidique est de nature oligosaccharidique et correspond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache de la chaîne peptidique. A ce dernier groupe de composés s'ajoute une deuxième fraction basique. Elle provient de la chromatographie sur échangeurs de cations des peracétylglycoprotides hydrosolubles qui sont retenus par la résine et dont on réalise à la fois l'élution et la saponification par le passage d'une solution d'ammoniaque diluée. Ces glycoprotides sont constitués de très courts chaînons glucidiques, mono- ou disaccharidiques, conjugués à la chaîne peptidique. Ils représentent donc la partie la plus "interne" de la fraction glycannique du glycoprotide natif.

B - ISOLEMENT ET STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DE L'ASIALOGLYCO PEPTIDE β DE L'OVOMUCOIDE ET DES SIALOSIDES DES ACETOLYSATS DU SIALOGLYCOPEPTIDE α DE L'OVOMUCOIDE

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit un procédé général de fractionnement par chromatographie sur résine:

échangeuses d'ions des acétolysats de polysaccharides libres ou conjugués qui fournit, dans le cas particulier de <u>sialog</u>lycopeptides, trois séries de composés : des sialosides, des oligosaccharides neutres et des glycoprotides correspondant, respectivement aux parties *externe*, *centrale* et *interne* des groupements glycanniques.

Dans le présent chapitre, nous décrivons les procédés qui nous ont permis d'isoler et de déterminer la structure de 13 oligosaccharides présents dans la fraction neutre des acétolysats des glycopeptides α et β de l'ovomucoïde, ainsi que la structure de 3 sialosides présents dans la fraction acide des acétolysats du <u>sialog</u>lycopeptide α . Cette étude a pour but de parfaire l'ébauche de structure du glycopeptide β que nous avions antérieurement élaboré dans la première partie, et de mieux connaître les performances du procédé que nous venions de décrire dans le chapitre précédent.

1º - Partie expérimentale

a - Acétolyse et fractionnement des acétolysats.-L'asialoglycopeptide & (25 g) de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (56) a été acétolysé pendant 4 jours, puis saponifié par le méthylate de sodium et fractionné sur des colonnes (8 x 60 cm) de Dowex 50 (X 2 ; 100 "mesh" ; H⁺) et de Duolite A-102 (25-50 "mesh"; HCO_{2}) selon le mode opératoire antérieurement décrit. On obtient, de cette manière, 12 g environ de Fraction Neutre (FN) Celle-ci est soumise à une chromatographie sur colonne (4 x 50 cm) de charbon-Celite. Le D-galactose et le D-mannose sont éliminés par le passage de 5 l d'eau distillée et les oligosaccharides sont élués par des solutions aqueuses d'éthanol à 1,5, 3,5, 5, 7,5, 10 et 15 % (V/V) (débit : 15 ml/h). On obtient, de cette manière, les fractions FNC1.5 à FNC15 à partir desquelles l'isolement des oligo saccharides et la purification de chacun d'eux sont réalisés en soumettant d'abord chaque fraction à une chromatographie préparative sur papier Whatman nº 3 dans les systèmes de solvants suivants : Solv. 1 : alcool butylique/acide acétique/eau (4 : 1 : 5 ; V/V) (durée de la chromatographie : 1 à 4 jours) ; Solv. 2 : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3 ; V/V)

(durée de la chromatographie : 1 à 2 jours). Dans quelques cas particuliers, nous avons, en outre, utilisé l'électrophorèse préparative sur papier Whatman n° 3 dans les conditions suivantes : tampon borate de sodium à 1 % (p/v) de pH 9,2 ; cuve d'électrophorèse en toit ; 7 V/cm pendant 4 h ; purification de l'oligosaccharide par passage sur une colonne (1 x 5 cm) de charbon-*Celite* et élution du composé par une solution aqueuse d'éthanol à 50 %, après un lavage soigneux à l'eau distillée.

Nous avons soumis aux mêmes conditions opératoires le sialoglycopeptide α (5 g).

b - Identification et dosage des monosaccharides.- Les quantités de monosaccharides neutres et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose présents dans chaque oligosaccharide ont été déterminées par l'application des procédés colorimétriques décrits dans les monographies du Laboratoire (20). Les monosaccharides neutres (D-galactose, D-mannose) ont été identifiés par chromatographie sur papier dans les solvants décrits dans le paragraphe précédent après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2 M, à 100° pendant 2 h, des oligosaccharides et purification des hydrolysats sur rési nes échangeuses d'ions.

c - Détermination de la masse moléculaire des oligosaccharides. - La masse moléculaire des oligosaccharides a été déterminée par une méthode de réduction à l'aide d'un borohydrure alcalin et par chromatographie sur gel de Séphadex. Dans la réduction par le borohydrure de sodium, le mode opératoire d'ADAM-CHOSS(et MONTREUIL (4) a été légèrement modifié de la manière suivante : les oligosaccharides réduits sont purifiés par une chromatographie sur échangeurs de cations et l'acide borique de l'effluent préalablement évaporé à siccité est éliminé en reprenant 4 fois successivement le résidu sec par 20 ml de méthanol-acide acétique (4 : 1) que l'on élimine par distillation sous pression réduite. La composition des oligosaccharides est ensuite déterminée par l'application des procédés colorimétriques et chromatographiques décrits ci-dessus. En outre, le polyol présent dans les hydrolysats chlorhydriques (acide chlorhydrique 2 M à 100° pendant 2 h) des oligosaccharides préalablement purifiés sur Duolite A-102 D (25-50 "mesh"; HCO_) est identifié par chromatographie sur papier Whatman

n° 3 dans le Solv. 2 (R_{Man} du 2-amino-2-désoxy-D-glucitol 0,56 ; du 2-amino-2-désoxy-D-glucose 0,68 ; du D-galactose 0,80 ; du D-mannitol 0,88).

La chromatographie sur gel de Séphadex a été effectuée selon la méthode de BHATTI et CLAMP (57) (Fig. 14).



Fig. 14.- Détermination de la masse moléculaire des oligosaccharides E à M par chromatographie sur gel de Séphadex selon BHATTI et CLAMP (57). Conditions expérimentales : 0,4 mg de substance en solution dans 0,2 ml de chlorure de sodium 0,15 M; colonnes (1,8 x 130) de Séphadex G-25 "fine"; déplacement par le chlorure de sodium 0,15 M (débit : 0,2 ml/min); repérage des composés par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique. Le coefficient de distribution a été déterminé par rapport au D-glucose et au Bleu Dextran. Glc : D-glucose; Lac : lactose; Raf : raffinose.
d - Détermination de la structure des oligosaccharides par la méthode de méthylation (x).- Les oligosaccharides ont été méthylés par l'iodure de méthyle dans la N,N-diméthylformamide selon KUHN et al. (21). Les monosaccharides méthylés neutres sont d'abord transformés en méthyl-glycosides par l'action du gaz chlorhydrique M dans le méthanol en tubes scellés sous vide, pendant 8 h à 100°. La solution est ensuite traitée par du carbonate de plomb, filtrée et évaporée à siccité sous vide. Le résidu est repris par du chloroforme ou par du méthanol et analysé par chroma tographie en phase gazeuse (Voir Tableau XI). Les éthers méthyliques du 2-amino-2-désoxy-D-glucose sont identifiés par chromatogr phie en phase gazeuse des 0-acétyl-0-méthyl-D-arabinitols formés par désamination oxydative des dérivés 0-méthylés du 2-amino-2désoxy-D-glucose par la ninhydrine (Tableau XII).

Tableau XI

Identification (a), par chromatographie en phase gazeuse (b), des éthers méthyliques du D-mannose présents dans les hydrolysats des oligosaccharides A-M perméthylés.

Méthyl-α,β-D-mannoside	T _r (c)	Oligosaccharides												
		A	B	C	D	Ε	F	G	H	Ι	J	K	L	Ņ
2,3,4,6-Tétra-0-méthyl	1				· +					+				
3,4,6-Tri-O-méthyl	2,16			+					+		+			
2,4,6-Tri-0-méthyl	2,46				+			+	+			+		
2,3,6-Tri-O-méthyl	3,23	+						+					+	
3,4-Di-O-méthyl	5													
2,4-Di-O-méthyl	6,13													
3,6-Di-O-méthyl	6,93						+					+		+
2,6-Di-O-méthyl	7,66									+	+		+	+
4,6-Di-O-méthyl	8,62					+								
2,3-Di-O-méthyl	9,36													

(a) Sous la forme de méthyl- α , β -D-mannosides. (b) Conditions expérimentales : Appareil Aerograph 1 200 ; détection par ionisation de flamme ; colonne de verre (0,2 x 300 cm) ; phase stationnaire : 3 % de Carbowax 6 000 sur Chromosorb W HMDS (60-80 "mesh") ; température : 170° ; gaz vecteur : azote (débit : 30 ml/ min). (c) Temps de rétention relatif au méthyl-2,3,4,6-Tétra-O-méthyl- α , β -Dmannosides.

(*) La perméthylation des oligosaccharides a été réalisée par
 B. FOURNET.

Tableau XII

Identification par chromatographie en phase gazeuse des O-méthyl-O-acétyl-D-arabinitols obtenus à partir des éthers méthyliques du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose présents dans les hydrolysats des oligosaccharides A-M perméthylés.

0-Méthyl-0-acétyl-D-arabinitols	Tr	Olig	0ligosaccharides				
	(a)	A, C	à M	В			
1,5-Di-O-acétyl-2,3,4-Tri-O-méthyl (b) 1		<u></u>				
1,4-Di-0-acétyl-2,3,5-Tri-0-méthyl	0,77	+					
1,3,4-Tri-O-acétyl-2,5-Di-O-méthyl	1,29			+			

 (a) Temps de rétention relatif au 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-Tri-Ométhyl-D-arabinitol. (b) Ce témoin interne a été choisi à dessein car il ne figure pas parmi les produits de la désamination par la ninhydrine des éthers méthyliques du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucos habituellement présents dans les hydrolysats de glycannes perméthy lés.

e - Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides (*).-Nous avons utilisé les glycosidases suivantes : ß-D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de la rate de Boeuf (58) ; α-D-galactosidase (E.C. 3.2.1.22) des graines de Fenugrec (59) ; α-D-mannosidase (E.C. 2.2.1.24) de la Fève Jack (60) ; N-acétyl-ß-D-glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) de la Fève Jack (61) ; L'hydrolyse des oligosaccharides (2 mM) a été effectuée en présence de 0,1 à 1 unité d'enzyme, à 37° pendant 48 h, dans un tampon citrate de sodium 0,01 M-phosphate disodique 0,1 M de pH 4,6 pour la β-D-galactosidase et pour l' α-D-mannosidase, de pH 5,4 pour la N-acétyl-β-D-glucosaminidase et de pH 5,5 pour l' α-D-galactosidase. Après arrêt de l'action des enzymes par chauffage à 70° pendant 1 à 2 min, les monosaccharides libérés ont été dosés par réductimétrie (62) et le 2-acétamido-2désoxy-D-glucose par colorimétrie à l'aide d'un réactif au boratep-diméthylaminobenzaldéhyde (63) après purification des hydrolysats sur Dowex 50 (X 8; 25-50 "mesh"; H⁺) puis sur Duolite A-102 D (25-50 "mesh"; HCO₂).

(*) Les préparations enzymatiques et les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées par G. SPIK et S. BOUQUELET. f - Action du chlorure de triphényltétrazolium. - Pour confirmer, dans les oligosaccharides C, E et F, la substitution du groupement hydroxyle en position 2 du résidu de D-mannose placé en position terminale réductrice, nous avons utilisé le réactif au chlorure de triphényltétrazolium (64) qui fournit une coloration rouge uniquement avec les glucides dont le groupement hydroxyle en position α du groupement carbonylé est libre (Fig. 15).



Α

В

Fig. 15.- Chromatographie sur papier des osides A, C, D, E, F, G, H.
A. Révélation à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE.
B. Révélation au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISSON (64). Les composés C, E et F dont l'hydroxyle est bloqué en 2 ne réagissent pas avec le réactif B.
Papier Whatman n° 3, système-solvant : n-butanol/acide acétique/ eau (4 : 1 : 5).

g - Acétolyse des oligosaccharides.- Les oligosaccharides de masse moléculaire supérieure, natifs et réduits, ont été acétolysés pendant 1 à 2 jours et les acétolysats ont été saponifiés et purifiés sur échangeurs d'ions dans les conditions décrites précédemment. Les glucides, natifs ou réduits, présents dans la Fraction Neutre des acétolysats ont été isolés par chromatographi préparative sur papier et leur structure a été déterminée par l'application des procédés décrits ci-dessus.

2° - Résultats

a - Isolement des oligosaccharides de l'asialoglycopept: de ß de l'ovomucoîde. - Les glucides de la Fraction Neutre des acé tolysats de l'asialoglycopeptide & sont tout d'abord fractionnés sur colonne de charbon-Celite. Nous observons que toutes les fractions obtenues sont hétérogènes à l'exception de la Fraction FNC1. (Fraction Neutre Charbon éluée par une solution aqueuse d'éthanol à 1,5 p. 100) qui ne contient que l'oligosaccharide D. L'isolement des autres glucides a été réalisé par chromatographie et, parfois par électrophorèse préparative sur papier des différentes fractions FNC de la manière suivante : la Fraction FNC 3,5 a donné, par chromatographie sur papier dans le Solv. 2, les oligosaccharides C, H et J à l'état pur. Dans un premier temps, la chromatographie sur papier de la Fraction FNC5 dans le Solv. 2 fournit l'oligosaccharide M pur et le mélange des oligosaccharides A et B que l'on sépare, dans un second temps, par électrophorèse sur papier à pH 9,2. La chromatographie sur papier dans le Solv. 2 de la Fraction FNC7.5 permet d'obtenir les oligosaccharides G, K et L purs. La Fraction FNC_{10} contient les oligosaccharides E et F qui peuvent être séparés par chromatographie sur papier dans le Solv. 1. Tous les oligosaccharides que nous avons obtenus sont homogènes en chromatographie et en électrophorèse (Fig. 16). Cette homogénéité a été ultérieurement confirmée par les résultats des expériences de méthylation.

b - Isolement des oligosaccharides du <u>sialog</u>lycopeptide de l'ovomucoide. - Le fractionnement sur colonne de charbon-Celite des glucides de la Fraction Neutre des acétolysats du <u>sialog</u>lycopeptide α est en tout point identique à celui des glucides de la Fraction Neutre des acétolysats de l'asialoglycopeptide β .



11

Fig. 16.- Homogénéité en électrophorèse et chromatographie sur papier des oligosaccharides A-P isolés des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoîde.

I. Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 dans le tampon borate de sodium de pH 9,2 ; 15 V/cm ; durée : 4 h.

II. Chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans les systèmes-solvants : (a) pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/ eau (5 : 5 : 1 : 3) ; (b) <u>n</u>-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation des oligosaccharides par le réactif à l'oxalate d'aniline. Raf : raffinose ; Lac : lactose ; Gal : galactose ; Man : mannose.

Les glucides de la Fraction Acide des acétolysats du <u>sialog</u>lycopeptide α sont également fractionnés sur colonne de charbon-*Celit* Seules, les solutions de désorption éthanoliques FAC₂₀ (Fraction Acide Charbon éluée par une solution aqueuse d'éthanol à 20 p. 10 et FAC₂₅ sont riches en glucides, elles renferment respectivement les sialosides *A* et *B*. Chacun de ces oligosaccharides est homogèn en chromatographie dans les systèmes-solvants 1 et 2, ainsi qu'en électrophorèse dans le système tampon de pH 3,9.

c - Structure des oligosaccharides de la Fraction Neutre des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoîde.(*).- La structure complète de 13 oligosaccharides $A \ge M$ a été déterminée sur la base des résultats expérimentaux suivants (Tableau XIII) : (a) Tous les oligosaccharides possèdent un résidu de D-mannose en posi tion terminale réductrice, à l'exception de l'oligosaccharide Bdans lequel cette position est occupée par un résidu de 2-acétamic 2-désoxy-D-glucose ; (b) l'hydrolyse des oligosaccharides perméthy lés contenant un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose fournit toujours du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose, à l'exception de l'oligosaccharide B qui donne du 2-désoxy-3,6-Di-0-méthyl-D-glucose. Dans tous ces oligosaccharides (sauf B), un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose se trouve donc en positio terminale non réductrice ; (c) en outre, les résultats suivants ont été obtenus :

L'oligosaccharide A a été identifié au 0-2acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 ---+4)-D-mannopyranose de la manière suivante : Il est constitué, en proportions équimolaires, de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et de D-mannose. Ce dernier disparaît totalement après réduction par le borohydrure de sodium et il apparaît du mannitol. L'hydrolysat du dérivé perméthylé contient du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose et du 2,3,6-Tri-0-méthyl-D-mannose. L'oligosaccharide est hydrolyspar la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack.

<u>L'oligosaccharide</u> possède toutes les propriététés chimiques du $0-\beta-D$ -galactopyranosyl- $(1 \rightarrow 4)-2$ -acétamido-2-

 ^(*) Les structures des oligosaccharides de la Fraction Neutre des acétolysats du <u>sialog</u>lycopeptide α sont identiques à celles des oligosaccharides de la Fraction Neutre des acétolysats de l'<u>asialog</u>lycopeptide β.

Tableau XIII

Caractéristiques	Oligos	sacchari	des										
	A	В	С	D	E	F	G	Н	1	J	K	L	М
Rendement (%) ^a	2,3	0,6	12,2	0,9	2,0	4,6	0,6	2,0	2,0	4,2	2,1	2,0	2,4
Conc. en éthanol (%) de l'éluant de la colonne	5	5	3,5	1,5	10	10	7,5	3,5	3,5	3,5	7,5	7,5	5
Chromatographie sur papier; R_{Gal}													
Solv. 1	0,87	0,85	0,81	0,78	0,75	0,60	0,55	0,50	0,39	0,38	0,35	0,31	0,23
Solv. 2	0,96	0,93	0,81	0,79	0,74	0,69	0,63	0,48	0,40	0,46	0,36	0,27	0,24
Electrophorèse sur papier $M_{Oligosacch, p}^{b}$	0,92	0,69	0,68	1	0,79	0,80	0,81	0,94	0,84	0,75	0,79	0,76	0,79
Rapport des monosaccharides neutres au													
2-acétamido-2-désoxy-D-glucose													
Avant réduction	1,22	1,07	1,22		0,58	0,55	2,32	2,08	1,96	1,09	0,90	0,95	0,62
Après réduction							0,99	1,28	0,90	0,53	0,47	0,50	0,30
Composition molaire													
Avant réduction, D-galactose		1											
p-mannose	1		1	2	1	· 1	2	2	2	2	2	2	2
2-acétamido-2-désoxy-													
D-glucose	0,82	0,93	0,82		1,71	1,80	0,86	0,96	1,02	1,83	2,21	2,10	3,22
Après réduction, D-galactose													
D-mannose	0		0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
2-acétamido-2-désoxy-													
D-glucose	0,83	0	0,81		1,70	1,81	1,01	0,78	1,11	1,87	2,11	2,00	3,30
Masse moléculaire déterminée													
par réduction	. 383	383	383	342	586	586	545	545	545	748	748	748	950
par chromatographie sur Séphadex					615	610	540	540	525	750	765	740	930
Révélation par le triphényltétrazolium	+		_	+	-	-	÷	+	+	+	+	+	+

caractéristiques des oligosaccharides isolés de la fraction neutre des acétolysats de l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde

"A partir de l'asialoglycopeptide β . "Déplacement anodique relatif à l'oligosaccharide D.



désoxy-D-glucopyranose (N-acétyllactosamine) qui avait déjà été isolé des produits de l'hydrolyse ménagée de l'ovomucoïde (22). Il est, en outre, totalement hydrolysé par la β-D-galactosidase de la rate de Boeuf.

<u>L'oligosaccharide C</u> est le 0-2-acétamido-2désoxy- β -D-glucopyranosyl- $(1 \longrightarrow 2)$ -D-mannopyranose. Il possède, en effet, les mêmes caractéristiques que l'oligosaccharide A, à la différence près qu'il fournit, après méthylation, du 3,4,6-Tri-O-méthyl-D-mannose et qu'il donne une réaction négative avec le chlorure de triphényltétrazolium.

L'oligosaccharide <u>D</u> possède les propriétés d'un mannobiose : le $0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 3)$ -D-mannopyranose. Cette structure a été définie sur la base des résultats suivants : la réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître la moitié du D-mannose tandis qu'apparaît du mannitol. Le disaccharide perméthylé donne du 2,3,4,6-Tétra-0-méthyl-D-mannose et du 2,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose. Il est totalement hydrolysé par l' α -D-mannosidase de la Fève Jack. Il est intéressant de signaler que le même mannobiose a été obtenu à partir des hydrolysats acides partiels de l'ovomucoïde (65).

L'oligosaccharide E répond à la formule du 0-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl- $(1 \longrightarrow 3)$ -O-[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl- $(1 \longrightarrow 2)$]-D-mannopyranose. En effet, il renferme du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et du D-mannose dans les rapports molaires 2 : 1. La totalité du D-mannose est réduite par le borohydrure de potassium. Sa masse moléculaire déterminée par chromatographie sur Séphadex est de 615 (calc. 586). On obtient, par méthylation, du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose et du 4,6-Di-0-méthyl-D-mannose. La N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack libère du 2-acétamido-2désoxy-D-glucose et du D-mannose. L'oligosaccharide ne réagit pas avec le chlorure de triphényltétrazolium.

L'oligosaccharide F a été identifié au 0-2acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1-4)-0-2-acétamido-2désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1-2)-D-mannopyranose de la manière suivante : il est constitué de 2 résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et d'un résidu de D-mannose qui disparaît par réduction. Sa masse moléculaire mesurée par chromatographie sur Séphadex est de 610 (calc. pour un trisaccharide : 586). La méthylation fournit outre du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose, du 3,6-Di-0-méthyl-D-mannose. L'acétolyse conduit à un mélange des deux disaccharides A et C. Le trisaccharide est hydrolysé par la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack en 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et en D-mannose. Il n'est pas révélé par le réactif au chlorure de triphényltétrazolium.

L'oligosaccharide G est le 0-2-acétamido-2désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 - 4)-0- α -D-mannopyranosyl-(1 - 3)-D-mannopyranose. En effet, il est composé de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et de D-mannose dans les rapports molaires 1 : 2 et la moitié des résidus du D-mannose est éliminée par réduction. La masse moléculaire déterminée par chromatographie sur Séphadex est de 540 (calc. pour un trisaccharide : 545). On obtient, après perméthylation, du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose, du 2,3,6-Tri-0-méthyl-D-mannose et du 2,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose. L'acétolyse conduit à un mélange des oligosaccharides A et D. La N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack libère du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et du disaccharide D.

L'oligosaccharide H diffère de l'oligosaccharide G par la conjugaison du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-Dglucose en position C-2 au lieu de la position C-4 sur le résidu de D-mannose médian. C'est donc le 0-2-acétamido-2-désoxy- β -Dglucopyranosyl- $(1 \rightarrow 2)-0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1 \rightarrow 3)$ -D-mannopyranose. En effet, les deux glucides possèdent les mêmes propriétés mais diffèrent sur les deux points suivants : la méthylation fournit, outre du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-D-glucose et du 2,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose, du 3,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose. L'acétolyse donne les oligosaccharides C et D.

L'oligosaccharide I est un isomère des deux trisaccharides G et H précédents dont il diffère par la position du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose qui est, cette fois, conjugué sur le résidu de D-mannose en position terminale réductrice. Il s'agit du 0- α -D-mannopyranosyl- $(1 \longrightarrow 3)-0-\sqrt{2}$ -acétamido-

2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-mannopyranose. Il possède donc, comme le trisaccharide H, les caractéristiques du trisaccharide G sauf en ce qui concerne les produits de la méthylation qui sont le 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-O-méthyl-D-glucose, le 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-D-mannose et le 2,6-Di-O-méthyl-D-mannose. En outre, on obtient par acétolyse les oligosaccharides A et D et par hydrolyse à l'aide de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack, du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le disaccharid ϵ D.

L'oligosaccharide J est le 0-2-acétamido-2désoxy- β -D-glucopyranosyl- $(1 - 2) - 0 - \alpha$ -D-mannopyranosyl- $0 - \left[2 - acé$ $tamido-2-désoxy-<math>\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 - 4)-D-mannopyranose. En effet, il renferme du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et du D-mannose en proportions identiques et la réduction par le borohydrure de sodium élimine la moitié des résidus de D-mannose ; sa masse moléculaire précisée par chromatographie sur Séphadex est de 750 (calc. pour un tétrasaccharide : 748) ; on obtient par perméthylation, du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-0-méthyl-Dglucose, du 3,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose et du 2,6-Di-0-méthyl-D-mannose ; l'acétolyse fournit une faible quantité de disaccharides A, C et D et une quantité importante des trisaccharides H et I ; l'hydrolyse par la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack libère du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le disaccharide D

L'oligosaccharide K est un tétrasaccharide isomère du précédent par la position des deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose qui sont fixés sur le résidu médian de D-mannose. Il possède la structure du 0-2-acétamido-2-désoxy- β -Dglucopyranosyl- $(1 - 4) - 0 - [2-acétamido-2-désoxy-<math>\beta$ -D-glucopyranosyl $(1 - 2) - 0 - \alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 - 3)-D-mannopyranose. Certaines de ses propriétés sont donc celles de l'oligosaccharide J dont il diffère néanmoins par la nature de l'un des dérivés méthylés du D-mannose qui est le 2,4,6-Tri-0-méthyl-D-mannose et par les produits de l'acétolyse qui sont les oligosaccharides F, G et H.

L'oligosaccharide *L* est aussi un isomère du tétrasaccharide *J*. Il s'agit du 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1-4)-0-α-D-mannopyranosyl-(1-3)-0-[2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1-4)-D-mannopyranose. Il conduit, en effet, aux mêmes résultats expérimentaux que l'oligosaccharide *J*

aux différences près suivantes : la perméthylation fournit, outre du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-O-méthyl-D-glucose et du 2,6-Di-Ométhyl-D-mannose, du 2,3,6-Tri-O-méthyl-D-mannose et l'acétolyse libère les oligosaccharides *A*, *D*, *G* et *I*.

L'oligosaccharide M possède la structure du 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1_4)-0-2-acétamido- $2-desoxy-\alpha-D-glucopyranosyl-(1-2)-0-\alpha-D-mannopyranosyl-(1-3)$ 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1-4)-D-mannopyranos Cette structure a été déterminée de la manière suivante : les rési dus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et de D-mannose sont dans le rapport 3 : 2. La moitié de la quantité de D-mannose qu'il renferme disparaît lors de la réduction par le borohydrure de sodium. Il s'agit donc d'un pentasaccharide d'une masse moléculaire, déterminée par chromatographie sur Séphadex, de 930 (calc. pour un pentasaccharide : 950). Après perméthylation, on identifie le 2-amino-2-désoxy-3,4,6-Tri-O-méthyl-D-glucose, les 2,6- et 3,6-Di-O-méthyl-D-mannoses. L'hydrolyse par la N-acétyl-B-D-glucosaminidase de la Fève Jack libère du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Enfin, nous avons identifié dans les acétolysats les trisaccharides G, H et I et les tétrasaccharides J, K et L.

d - Structure des sialosides de la Fraction Acide des acétolysats du <u>sialoglycopeptide</u> a de l'ovomucoîde.- Elué d'une colonne de charbon-*Celite* par une solution aqueuse d'éthanol à 20 p. 100, l'oligosaccharide A est composé d'acide N-acétylneuraminique et de D-galactose en proportion équimoléculaire. La perméthylation de ce sialoside et l'analyse des hydrolysats des monosaccharides méthylés nous ont permis de mettre en évidence le 2,4,6-Tri-O-méthyl-D-galactose. Nous pouvons conclure qu'il s'agit donc de la structure suivante :

Sialoside A ANAN α (2 --- 3) Gal

La solution aqueuse d'éthanol à 25 p. 100 est composée d'acide N-acétylneuraminique, de D-mannose, de D-galactose et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dans les proportions relatives 2 : 2 : 1 : 1. Bien qu'homogène en chromatographie sur papier, le sialoside B se compose, en fait, d'un mélange de deux trisaccharides. En effet, la désialylation de ces composés libère

deux disaccharides neutres qui ont été identifiés au : 2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-D-mannopyranose ainsi qu'au D-galacto-pyranosyl-(1 → 3)-D-mannopyranose. Les structures de ces deux sialosides sont donc les suivantes :

Sialoside B ANAN $\alpha - (2 - x) - GlcNAc - \beta - (1 - 2) - Man$ ANAN $\alpha - (2 - x) - Gal - \alpha - \beta - (1 - 3) - Man$

3° - Discussion et conclusions

Les comportements des hétéro-oligosaccharides au cours de la chromatographie sur charbon-Celite sont étonnants et difficiles à prévoir, mis à part l'effet retardateur du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. En effet, des oligosaccharides isomères possèdent des comportements différents comme, par exemple, les trisaccharides H et G qui sont élués, respectivement, avec de l'éthanol aqueux à 3,5 et à 7,5 %. En outre, des oligosaccharides de masses moléculaires très distinctes comme, par exemple les deux disaccharides A et B, d'une part, et le pentasaccharide M, d'autre part, sont déplacés par l'éthanol aqueux à 5 %. Le comportement des oligosaccharides sur charbon est donc étroitement lié à leur structure sans qu'il nous soit possible, pour l'instant. de tirer des règles générales des résultats que nous avons obtenus. Toutefois, les chromatographies sur charbon sont extrêmement reproductibles et cette observation est à la base d'un procédé de carte chromatographique que nous décrivons dans le chapitre 4.

La connaissance de la structure de 13 oligosaccharides (Tableau XIV) que nous avons isolés de la Fraction Neutre des acétolysats de l'<u>asialog</u>lycopeptide β de l'ovomucoïde ne permet pas encore de donner la structure complète et définitive de la fraction glycannique de l'ovomucoïde. En effet, il est impossible de reconstituer quelque structure que ce soit à partir des trop nombreux fragments oligosaccharidiques que nous avons isolés. Cependant, la description de la structure du pentasaccharide *M* nous permet de compléter l'ébauche du schéma de structure proposé p. 26 après étude des fragments oligosaccharidiques obtenus par hydrolyse ménagée (Fig. 17).



Fig. 17.- Structure partielle du glycopeptide β de l'ovomucoîde; les oligosaccharides encadrés correspondent aux fragments glucidiques obtenus, soit par acétolyse (M) soit par hydrolyse acide ménagée (j et k).

En outre, les oligosaccharides que nous avons isolés en quantité importante sont, dès à présent, extrêmement précieux, d'une part, pour mettre au point les procédés de détermination de structure par résonnance magnétique nucléaire, d'autre part, pour préparer certains éthers méthyliques du D-mannose et enfin pour étudier des relations entre la conformation des saccharides et l'activité ainsi que la spécificité de N-acétyl-β-D-glucosaminidases et d' α-D-mannosidases d'origines diverses.

Nous avons, d'autre part, réalisé l'étude structurale de trois sialyl-oligosaccharides isolés de la Fraction Acide (FA) des acétolysats du glycopeptide α de l'ovomucoïde et démontré pour la première fois que l'acide N-acétylneuraminique pouvait se conjuguer dans une glycoprotéine avec un résidu de Structure des oligosaccharides A à M isolés de la Fraction Neutre des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoïde.

Structure des oligosaccharides Désignation GlcNAc- β -(1-+4)-Man Α $Gal - \beta - (1 \rightarrow 4) - GlcNAc$ В $GleNAc-\beta-(1 \longrightarrow 2)-Man$ С $Man - \alpha - (1 \longrightarrow 3) - Man$ D GlcNAc- β -(1---3) Ε Man GlcNAc- β -(1-+2) GlcNAc- β -(1-+4) F Man $GlcNAc - \beta - (1 -$ GlcNAc- β -(1-+4)-Man- α -(1-+3)-Man G $GlcNAc-\beta-(1-2)-Man--(1-3)-Man$ Η $Man-\alpha-(1-3)$ Ι Man GlcNAc- β -(1-+4) GleNAc- β -(1- \rightarrow 2)-Man- α -(1- \rightarrow 3) JMan GlcNAc-β-(1-+4) Κ $GlcNAc - \beta - (1 - 4)$ $Man-\alpha-(1-3)-Man$ GlcNAc- β -(1-2) $GlcNAc - \beta - (1 \longrightarrow 4) - Man - \alpha - (1 \longrightarrow 3)$ LMan GlcNAc- β -(1-4) GlcNAc - β -(1-+4) Μ Man-α-(1-→3) GleNAc- β -(1---2) Man GlcNAc- β -(1-+4)

2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Comme le <u>sialog</u>lycopeptide α possè le même noyau oligosaccharidique que le glycopeptide β , nous pouvons conclure que la structure partielle présumée du glycopeptide α est la suivante :



Par ailleurs, l'étude structurale de ces 16 oligosaccharides permet de poser en hypothèse que l'acétolyse coupe préférentiellement les liaisons glycosidiques des monosaccharides neutres. En effet, aucun des oligosaccharides obtenus dans la Fraction Neutre, à l'exception de la N-acétyllactosamine, ne possède un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose en position terminale réductrice et nous avons démontré précédemment que les procédés d'acétolyse et de saponification des acétolysats n'entrainaient pas de destruction du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Toutebois, cette hypothèse demande à être confirmée par l'étude du comprement de différentes liaisons 0-glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse.

C - ETUDE DE LA STABILITE DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES VIS-A-VIS DE L'ACETOLYSE

Dès 1949, WOLFROM démontre que la liaison glycosidique du type 1-6 est très labile vis-à-vis des réactifs acétolysants et qu'il existe probablement toute une gamme de stabilité des différents types de liaisons. Cependant, aucune investigation n'est venue jusqu'à présent compléter cette première observation. Nous nous proposons donc d'étudier de façon systématique les stabilités relatives des liaisons 0-glycosidiques rencontrées généralement dans les glycannes et les polysaccharides afin de prévoir, -connaissant la composition en monosaccharides du glycanne-, les points de rupture.

La complexité structurale des glycannes ne nou permet guère d'énoncer de lois à ce sujet car la stabilité intrinsèque des liaisons est modulée par la séquence des monosaccharides au sein du glycanne. Cependant, dans la mesure où les différences de stabilité se révèlent, dans cette étude, suffisamment grandes, nous pourrions alors prévoir les coupures des liaisons au sein des glycannes. Nous avons, de ce fait, étudié dans un premier temps le comportement des liaisons 0-glycosidiques appartenant aux modèles moléculaires suivants : (a) les p-nitrophényl glycosides du D-mannose, D-galactose, D-glucose, 2-acétamido-2-désoxy-Dglucose ; (b) les disaccharides commercialisés tels que le lactose le cellobiose, le maltose, le mélibiose ainsi que les disaccharides isolés des hydrolysats acides partiels et des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoïde ; (c) nous avons, dans un second temps, essayé de prévoir les ruptures des liaisons 0-glycosidiques du glycanne de la bactomucine. Cette molécule a été retenue car c'est un modèle moléculaire dont la composition en monosaccharides est très variée. Elle renferme, en effet, des liaisons O-glycosidiques de différents types : N-acétylglucosaminyl, N-acétylgalactosaminyl, galactosyl et fucosyl.

1º - Partie expérimentale

a - Choix du matériel. - Les p-nitrophényl glycosides du D-galactose, D-mannose, L-fucose et du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, sont des préparations commerciales obtenues chez la "PIERCE CHEMICAL COMPANY". En outre, nous utilisons les disaccharides commercialisés suivants : le lactose et le cellobiose, fourni par "SIGMA", le maltose et le mélibiose obtenus chez "NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION". Le chitobiose est isolé des acétolysats de chitine et les 2-acétamido-2-désoxy-ß-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-mannopyranose et 2-acétamido-2-désoxy-β-D $glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-mannopyranose$ sont obtenus par chromatographie sur colonne de charbon-Celite des acétolysats du glycopeptide ß de l'ovomucoïde. La bactomucine est une préparation commercialisée. L'application des procédés de dosages nous permet de préciser la composition en glucides de cette molécule : monosaccharides neutres (D-galactose/L-fucose 2,05) 19,06 p. 100, N-acétylhexosamines (2-acétamido-2-désoxy-D-glucose/2-acétamido-2-désoxy-D-galactose 1,02) 16,34 p. 100.

b - Acétolyse des glucides. - Les acétolyses sont effectuées en étude cinétique pendant les durées variables suivantes : 15, 40, 65 et 90 minutes selon le mode opératoire décrit précédemment. L'identification et le dosage des monosaccharides libérés sont réalisés en chromatographie sur papier selon le procédé de HUGHES et JEANLOZ (66). La composition centésimale et molaire en monosaccharides de la bactomucine est réalisée selon les méthodes de dosages décrites dans les monographies 1 et 2 (20).

2° - Résultats

a - Cinétique d'acétolyse des p-nitrophényl glycosides.-Les résultats que nous ont fourni les études cinétiques d'acétolyse des p-nitrophényl glycosides, choisis comme modèles moléculaires peuvent se résumer de la manière suivante : On observe que la stabilité des liaisons O-glycosidiques est étroitement liée à la structure du monosaccharide engagé dans cette liaison, et qu'elle dépend plus particulièrement de l'anomérie de liaison α ou β ainsi que de la nature et de la position des groupes de substitution des atomes de carbone du cycle pyranique (Fig. 18 et Tableau XV).



Fig. 18.- Cinétique d'acétolyse des p-nitrophényl glycosides Fuc : fucose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Gal : galactose.

En effet, l'étude cinétique comparée de l'acétolyse des p-nitrophényl- β -D-galactopyranose et p-nitrophényl- α -L-fucopyranose montre que la stabilité de la liaison 0-glycosidique est 1,4 fois plus élevée lorsque le radical méthyl (α -L-fucose) est remplacé par le radical hydroxyméthyl (β -D-galactose). De ce fait, la liaison β -D-galactosyl est légèrement plus stable que la liaison α -L-fucosyl. De la même manière, l'étude cinétique comparée de l'acétolyse du p-nitrophényl- β -D-glucose et p-nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucose indique que la stabilité de la liaison est deux fois plus élevée lorsque l'hydroxyle du

Tableau XV

Etude de la stabilité des liaisons O-glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse.

Caractéristiques	Temps d'acétolyse (en minutes)						
-	15	40	65	90			
2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucose (a)	5,9 (b)	10,0	11,9	13,2			
·a-D-glucose	12,3	22,3	28,4	28,0			
·β-D-glucose	5,8	13,3	22,4	20,5			
α-D-galactose	33,7	55,6	59,3	69,8			
β-D-galactose	17,2	-	46,8	52,3			
a-L-fucose	45,2	54,6	63,9	70,0			
β-L-fucose	46,8	61,9	-	75,5			
α-D-mannose	8,5	17,5	36,2	38,2			

(a) Sous la forme de p-nitrophényl-α,β glycosides.

(b) Résultats exprimés en p. 100 de rupture de liaisons O-glycosidiques.

Bijs ULLE carbone 2 est remplacé par le groupement "acétamido". Nous remarquons, en outre, que la liaison N-acétylglucosaminyl est la plus stable de toutes les liaisons vis-à-vis de l'acétolyse.

La position axiale ou équatoriale de l'hydroxyle, porté par le carbone 2 ou 4 du cycle pyranique, est également susceptible de modifier la stabilité des liaisons O-glycosidiques. En effet, l'étude de la stabilité comparée de la liaison &-D-glucosyl (hydroxyle du carbone 4 en position équatoriale) et β -D-galactosy (hydroxyle du carbone 4 en position axiale) montre que la positior équatoriale de l'hydroxyle du carbone 4 stabilise deux à trois fois mieux la liaison O-glycosidique que la position axiale. Ainsi la liaison β-D-glucosyl est 2,6 fois plus stable que la liaison β-D-galactosyl. Cette règle se trouve également confirmée lorsque l'hydroxyle en position axiale ou équatoriale est porté par le carbone 2 du cycle pyranique. De la même manière, l'étude cinétique comparée de l'acétolyse du p-nitrophényl-a-D-glucopyranose (hydroxyle en 2 en position équatoriale) et p-nitrophényl- α -Dmannopyranose (hydroxyle en 2 en position axiale) montre que la liaison α -D-glucosyl est 1,4 fois plus stable que la liaison α -Dmannosyl. Cet exemple, ainsi que le précédent, démontre que la position équatoriale des hydroxyles stabilise, à des degrés différents selon la position 2 ou 4 du carbone substitué, la liaison O-glycosidique. L'anomérie α ou β de la liaison O-glycosidique est également un facteur capable de modifier cette stabilité. En effet, l'acétolyse comparée des anomères α et β du p-nitrophényl-D-glucopyranose ainsi que des anomères α et β du p-nitrophényl-D-galactopyranose indique que l'anomère de liaison est plus sensible aux agents d'acétolyse que l'anomère de liaison β.

b - Cinétique d'acétolyse des disaccharides.- L'étude cinétique de l'acétolyse de disaccharides a pour but de vérifier que les lois concernant la stabilité des liaisons O-glycosidiques, énoncées dans le paragraphe précédent, s'appliquent également aux disaccharides, et de montrer, en outre, que le type de liaison O-glycosidique 1 - 2, 1 - 4 ou 1 - 6 module sensiblement la stabilité intrinsèque des liaisons D-galactosyl, D-glucosyl et 2-acétamido-2-désoxy-D-glucosyl.

L'acétolyse à 20° C pendant 5 jours du maltose $(0-\alpha-D-glucopyra$ $nosyl-(1-++)-D-glucopyranose) et du cellobiose <math>(0-\beta-D-gluco$ pyranosyl-(1-++)-D-glucopyranose) conduit, après désacétylation par la soude 0,08 N et dosage chromatographique du glucoselibéré, aux résultats suivants : nous observons 12 p. 100 de $rupture de la liaison <math>\alpha$ -D-glucopyranosyl du maltose et seulement 6,8 p. 100 de scission de la liaison β -D-glucopyranosyl du cellobiose. L'anomérie de liaison α est donc un facteur de fragilisation des liaisons 0-glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus précédemment.

L'acétolyse comparée du lactose $(0-\beta-D-galac$ $topyranosyl-(1-+)-D-glucopyranose) et du cellobiose <math>(0-\beta-D$ glucopyranosyl-(1-+6)-D-glucopyranose) confirme également quela liaison D-glucosyl est plus stable que la liaison D-galactosyl(Fig. 19) et que la position équatoriale de l'hydroxyle du carbone 4 du D-glucose est le facteur responsable de cette différencede stabilité.

Pourcentage d'oses libérés





L'ensemble de ces résultats nous permet, dans un premier temps, de conclure que l'ordre de stabilité décroissant des liaisons O-glycosidiques fréquemment recontrées dans les glycannes et les polysaccharides est le suivant : liaisons 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucose > 2-acétamido-2désoxy- α -D-glucosyl > β -D-glucosyl > α -D-glucosyl > α -D-mannosyl β -D-galactosyl > α -D-galactosyl > α -L-fucosyl > β -L-fucosyl. Cependant, la stabilité d'une liaison O-glycosidique n'est pas seulement tributaire de l'anomérie et de la structure du monosaccharide porteur de cette liaison, elle dépend également de la diversité des hydroxyles substitués, c'est-à-dire du caractère 1,2 - 1,3 - 1,4 ou 1,6 de cette liaison.

L'examen des résultats que nous ont fourni les études cinétiques d'acétolyse des 0-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1-+4)-D-mannopyranose et 0-2-acétamido-2désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1-+2)-D-mannopyranose montre que la liaison du type 1-+4 est trois fois plus labile que la liaison du type 1-2 (Fig. 20) De la même façon, l'étude comparée de l'acétolyse du 0- α -D-galactopyranosyl-(1-+6)-D-glucopyranose et 0- β -D-galactopyranosyl-(1-+6)-D-glucopyranose et 0- β -D-galactopyranosyl-(1-+4)-D-glucopyranose montre que la liaison 1-+6 est totalement rompue après 3 jours d'acétolyse alors que la liaison 1-+4 n'est coupée que dans 50 p. 100 des cas.

3° - Discussion et conclusions

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur le comportement des liaisons O-glycosidiques vis-à-vis de l'acétolyse sont les suivantes :

1°) La stabilité des liaisons O-glycosidiques est liée de l'anomérie α ou β du monosaccharide. Les résultats concernant l'étude comparée des stabilités des liaisons $\beta(1 - + 4)$ du cellobiose et $\alpha(1 - + 4)$ du maltose sont à cet égard significatifs. L'anomérie de liaison β est plus stable que l'anomérie α ; cependant, cet écart de stabilité est trop faible pour envisager



Fig. 20.- Cinétique d'acétolyse d'oligosaccharides (I) et du p-nitro-phényl N-acétylglucosaminide (II). (Voir les conditions de l'acétolyse dans le texte p. 38).

Ι

II

l'application de cette propriété à la détermination de la nature α ou β d'une liaison 0-glycosidique.

2°) Il existe des différences de stabilité entre les liaisons D-galactosyl, L-fucosyl, D-glucosyl et 2-acétamido-2désoxy-D-glucosyl. Les précédents résultats démontrent :

- que la substitution du carbone en 2 par un groupement acétamido stabilise 2 fois mieux la liaison que sa substitution par un hydroxyle, la liaison 2-acétamido-2-désoxy-Dglucosyl est plus stable que la liaison D-glucosyl. Nous démontrons, en outre, que la substitution du sixième carbone par un radical hydroxyméthyl stabilise mieux la liaison qu'un radical méthyl. La liaison D-galactosyl est plus stable que la liaison L-fucosyl.

- que la stabilité dépend également de la position axiale ou équatoriale des hydroxyles du carbone 2 ou 4 et que dans les deux cas, la position équatoriale est un facteur de stabilisation, ainsi la liaison D-glucosyl est plus stable que la liaison D-galactosyl et la liaison D-mannosyl est plus stable que la liaison D-galactosyl. L'ordre de stabilité décroissant est donc le suivant : 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucosyl > 2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucosyl > β -D-glucosyl > α -D-glucosyl > α -D-mannosyl > β -D-galactosyl > α -D-galactosyl > α -L-fucosyl β -L-fucosyl.

3°) La nature de l'hydroxyle substitué vient nuancer la stabilité de chaque type de liaison. Ainsi la liaison de type 1 → 2 est sensiblement plus stable que la liaison de type 1 → 4. Nous avons, en outre, confirmé l'observation de WOLFROM à savoir que la liaison du type 1 → 6 était la moins stable.

4°) Les écarts de stabilité entre les différentes liaisons O-glycosidiques sont suffisamment importants pour que nous puissions, dès à présent, prévoir les ruptures au sein des glycannes. - En effet, l'analyse structurale des oligosaccharides des acétolysats du glycopeptide β est à cet égard significatif. Rappelons qu'à l'exception d'un seul oligosaccharide, 15 autres oligosaccharides ont été isolés et possèdent tous un résidu de D-mannose en position réductrice terminale. Les coupures ont porté sur les liaisons mannosyl.

- De la même façon, l'analyse structurale des oligosaccharides isolés des acétolysats de la bactomucine montre que les 5 oligosaccharides isolés contiennent un résidu de D-galactose en position réductrice terminale.

- Tous les oligosaccharides isolés des acétolysats des glycannes de la transferrine possèdent du D-mannose en position réductrice terminale.

Les ruptures de liaisons affectent presque exclusivement les liaisons de monosaccharides neutres : liaisons mannosyl dans le cas du glycopeptide β de l'ovomucoïde et liaisons galactosyls (le mannose étant absent dans cette molécule) dans le cas du glycopeptide de la bactomucine. Les liaisons N-acétylhexosaminidyl sont les plus stables.

3. HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION

I - HISTORIQUE

A - PRINCIPE

L'hydrazine anhydre coupe spécifiquement les liaisons amides (liaison peptidique et fonction acétamido, par exemple) et esters en libérant, sous la forme d'hydrazides, les acides dont le carboxyle est conjugué. Ce principe a tout d'abord été appliqué à l'identification des amino-acides C-terminaux des protéines (AKABORI *et al*, (67)). La réaction s'écrit :

$$\begin{array}{c} \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{CO} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{CO} \end{array} \\ \text{I} \\ \text{R}_{2} \end{array} \\ \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{COOH} \end{array} \\ \text{I} \\ \text{R}_{1} \end{array} \\ \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{CO} - \begin{array}{c} \text{NH} - \begin{array}{c} \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{COOH} \end{array} \\ \text{I} \\ \text{R}_{2} \end{array} \\ \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{CO} - \begin{array}{c} \text{NH} - \begin{array}{c} \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{COOH} \end{array} \\ \text{I} \\ \text{R}_{n} \end{array} \\ \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{CO} - \begin{array}{c} \text{NH} - \begin{array}{c} \text{NH}_{2} - \begin{array}{c} \text{CH} - \begin{array}{c} \text{COOH} \end{array} \\ \text{I} \\ \text{R}_{n} \end{array} \end{array} \end{array}$$

Son emploi a été ensuite étendu aux mucopolysaccharides acides (MATSUSHIMA et FUJII (68) ; WOLFROM et JULIANO (69) ; FUJINAGA et MATSUSHIMA (70) ; YOSIZAWA et SATO (71, 72) et aux glycoprotéines (YOSIZAWA *et al.* (73) ; SATO *et al.* (74, 75). Dans ce cas, l'hydrazine désacétyle les N-acétylhexosamines et détache, en outre, les glycannes conjugués au protide par une liaison "asparaginyl-N-acétylglucosamine" (KAVERZNEVA et DE-FAN (76) ; YOSIZAWA *et al.* (73)).

La coupure sélective de certaines liaisons osaminidyl est ensuite réalisée par une désamination nitreuse de certaines hexosamines selon le procédé de MATSUSHIMA et FUJII (68) et dont le principe se résume de la manière suivante : la diazotation des polysaccharides obtenus par hydrazinolyse ou par action de la soude (ISEMURA et SCHMID (77)) provoque une coupure spontanée des liaisons glucosaminyl et galactosaminyl, par un réarrangement intramoléculaire qui conduit à la formation d'une structure semi-acétalique très labile (Fig. 21)





Fig. 21.- Hydrazinolyse et désamination nitreuse de la chitine. Coupure sélective des liaisons glucosaminidyl par diazotation (MATSUSHIMA et FUJII (68)). dans ces conditions, des oligosides qui possèdent en position terminale "réductrice" un résidu de 2,5-anhydro-hexose (2,5-anhydro-mannose dans le cas de la D-glucosamine (78) et 2,5-anhydrotalose dans le cas de la D-galactosamine (79)) que l'on caractérise facilement, soit au cours de dosages colorimétriques selon le procédé de DISCHE et BORENFREUND (80), soit au cours des analyses chromatographiques grâce aux colorations que donnent ces composés avec les réactifs à l'urée chlorhydrique (81) ou à l'urée phosphorique (82). La diazotation de chaîne glucidique contenant de la mannosamine conduit à la formation de D-glucose (HASE et MATSUSHIMA (83); HORTON et al. (84)) sans que l'on observe de rupture de la liaison mannosaminyl (HASE et MATSUSHIMA (85)) (Fig. 22).

NOH O-R H.N

glucosamine ou galactosamine



O-R NEN

5 anhydrohexose



mannosamine

Fig. 22. - Désamination nitreuse de la glucosamine, galactosamine et mannosamine (HASE et MATSUSHIMA (83)).

B - APPLICATIONS

Bien que séduisant par son principe, ce procédé ne donne pas de résultats quantitatifs et n'a fait l'objet que d'un nombre très limité d'applications. L'ensemble des résultats peuvent se résumer de la manière suivante :

1º - Hydrazinolyse et diazotation de mucopolysac-

charides

JONES *et al*. (86) ont jugé nécessaire d'effectuer une étude de la stabilité du D-galactose vis-à-vis de l'hydrazine avant d'appliquer cette méthode à l'exploration de la structure de mucopolysaccharides et de glycoprotéines. Ces auteurs ont ains: observé que le D-galactose était transformé par l'hydrazine (100° C ; pendant 48 h) en L-fucitol (composé A), 3,4,5,6-tétrahydroxy-D-lyxo-hex-1-ène (composé B) et 1,2-didésoxy-D-lyxo-hexose (composé C).

		CH ₃		CH ₂			CH ₃	
Η	-	C -	OH	CH ₂			CH ₂	
HO	-	Ċ -	Н	но – С – н	HO	-	C -	Η
HO	-	Ċ -	Η	но – С – н	HO		Ċ -	Η
Η		ċ -	OH	Н - С - ОН	Η	-	ċ -	ОН
		CH ₂	OH	сн ₂ он			CH ₂	ΟH
Сс	omĮ	posé	А	Composé B	Сс	mī	posé	С

Bien que le modèle moléculaire soit assez mal choisi (car le D-galactose se trouve toujours sous la forme conjuguée dans les mucopolysaccharides des glycoprotéines), on peut conclure que les monosaccharides libres, et, en particulier, le D-galactose, sont très instables vis-à-vis de l'hydrazine. L'hydrazinolyse de méthyl glycosides divers, choisis comme modèles moléculaires, donnerait des informations complémentaires sur la stabilité des liaisons O-glycosidiques et, en particulier, des liaisons mannosyl, galactosyl, fucosyl, sialosyl, glycuronosyl. Néanmoins, en prélude à cette étude, WOLFROM et JULIANO (69), MATSUSHIMA et FUJII (68) et YOSIZAWA et SATO (71, 72) font remarquer que l'hydrazinolyse (100° C; 10 h) de l'acide chondroîtine sulfate ainsi que de mucopolysaccharides isolés du mucus gastrique du Porc s'accompagne de la rupture d'une partie des liaisons O-glycosidiques avec destruction concomittante des monosaccharides libérés. En outre, la N-désacétylation des N-acétylhexosamines n'est pas quantitative. Ainsi, YOSIZAWA et SATO (72) observent seulement

52-67 p. 100 de désacétylation du *mucopolysaccharide du mucus* gastrique de Porc après un contact avec l'hydrazine anhydre à 100° pendant 10 h. Après un second cycle d'une même durée, le pourcentage de N-désacétylation atteint alors 74-82 p. 100. Aucun oligosaccharide n'a pu être isolé dans ces conditions, la N-désacétylation quantitative constitue le problème majeure de cette technique ; par contre, la désamination nitreuse des hexosamines semble rencontrer moins de difficultés.

En effet, la désamination nitreuse de l'héparine N-désulfatée (HCl 0,1 N ; 100° ; 1 h) s'accompagne de la coupure spontanée des liaisons glucosaminyl (Fig. 23).





FOSTER et al. (87, 88) obtiennent, dans ces conditions, un disaccharide acide : α-D-glucuronopyranosyl-(1-+4)-2,5-anhydro-D-mannose. CIFONELLI et al. (89) démontrent en outre que la glucosamine <u>N-sulfatée</u> conjuguée au résidu d'acide glucuronique est convertie en 2,5-anhydro-D-mannose avec rupture concomittante de la liaison hexosaminidyl. Par contre, les résidus de <u>N-acétylg</u>lucosamine conjugués restent intacts. Les résultats peuvent se résumer dans le schéma suivant :

$$\begin{bmatrix} \operatorname{GlcUA} - \operatorname{GlcN} - \operatorname{SO}_3 \end{bmatrix}_{n}^{\bullet} \begin{bmatrix} \operatorname{GlcUA} - \operatorname{GlcNAc} \end{bmatrix}_{n'}^{\bullet} & \operatorname{GlcUA} - \operatorname{Gal} \rightarrow \operatorname{Gal} \rightarrow \operatorname{Xyl-Ser} \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & &$$

2° - Hydrazinolyse et diazotation de glycoprotéines

L'hydrazinolyse de l'orosomucoïde a permis à YOSIZAWA *et al.* (90) d'isoler en mélange les glycannes de l'orosomucoïde (la masse moléculaire a pu être fixée à 3 300 après N-réacétylation) et de démontrer que la glucosamine se trouvait en position réductrice terminale confirmant ainsi la nature "asparaginyl-N-acétyl-glucosaminidyl" de la liaison glycannes-protéine dans cette glycoprotéine.

Associant le procédé de dégradation récurrente de ROTHFUS et SMITH (91) et l'hydrolyse acide partielle aux glycannes obtenus par hydrazinolyse de l'orosomucoïde, SATO *et al.* (74) ont confirmé que le "noyau" des chaînes glycanniques était riche en résidus de mannose et démontré que ceux-ci étaient essentiellement substitués sur leur carbone 3 en isolant une proportion importante de $0-\beta-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyrano$ syl-(1, 3)-D-mannopyranose. Ces travaux ont été récemment repris par ISEMURA et SCHMID (77) sur des bases techniques nouvelles. En effet, la N-désacétylation de l'orosomucoïde par la soude (2,5 M ; 90°C ; 2,5 h) suivie d'une désamination nitreuse des glycannes N-désacétylés, a permis à ces auteurs d'isoler une famille de 3 oligosaccharides acides renfermant un résidu d'acide neuraminique modifié par mole d'oligosaccharide et de montrer que l'acide N-acétylneuraminique se conjuguait, soit à un résidu de D-galactose, soit à un résidu de N-acétylglucosamine (Fig. 24).



Fig. 24.- Modifications chimiques du trisaccharide "externe" de l'orosomucoîde pendant l'hydrolyse alcaline (I) (NaOH 2,5 M, 90° C; 2,5 h) et la désamination nitreuse (II) selon ISEMURA et SCHMID (77). Les trois liaisons entre l'acide N-acétylneuraminique et le galactose sont indiquées en pointillé.

De l'étude de ces applications de l'hydrazinolyse et de la diazotation, nous pouvons conclure que le problème de la coupure chimique spécifique des N-acétylhexosamines demeure entier, car les conditions d'hydrazinolyse (100°; 10-20 h) ne réalisent pas une N-désacétylation quantitative. Seule, une étude cinétique de l'hydrazinolyse de modèles moléculaires connus permettrait de préciser les conditions optimales de la réaction. L'hydrazinolyse, puis la diazotation étant quantitatives, les fragments obtenus le seraient alors d'une manière reproductible.

t

II - HYDRAZINOLYSE - DIAZOTATION DES GLYCOPEPTIDES. TRAVAUX PERSONNELS

L'étude critique des procédés d'acétolyse et d'hydrolyse ménagée des glycopeptides et les applications que nous avons réalisées, montrent que les coupures des liaisons glycosidiques ne sont pas sélectives mais seulement préférentielles. Le problème de la coupure chimique spécifique demeurait donc entier. C'est pourquoi, nous avons repris un travail réalisé en 1957 par MATSUSHIMA et FUJII (68) sur les mucopolysaccharides acides et qui n'avait pas été poussé très loin. Rappelons cependant que ces auteurs avaient démontré que la diazotation coupait spontanément et spécifiquement les liaisons des hexosamines (glucosamine et galactosamine) préalablement N-désacétylées par l'hydrazine et transformait ces monosaccharides en 2,5-anhydrohexoses.

Le procédé décrit par ces auteurs, séduisant dans son principe, était en fait très imparfait et inapplicable aux glycannes des glycoprotéines, car la N-désacétylation des N-acétylhexosamines n'était que partielle, c'est la raison pour laquelle nous avons effectué, dans un premier temps, une étude cinétique de la N-désacétylation par l'hydrazine du méthyl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucopyranoside, choisi comme modèle moléculaire afin de préciser les conditions optimales de la réaction. Dans une seconde série de travaux, nous avons appliqué ce procédé à l'étude structurale du glycopeptide β de l'ovomucoïde afin de confirmer les résultats antérieurement obtenus par l'application des procédés d'acétolyse et d'hydrolyse acide ménagée.

A - HYDRAZINOLYSE DES O-METHYL GLYCOSIDES

Les conditions opératoires de la méthode d'hydrazinolyse ne sont pas standardisées (100° ; 10 à 20 h) et ne réalisent qu'une désacétylation partielle. Nous avons jugé nécessaire d'effectuer, dans un premier temps, une *étude cinétique* de la N-désacétylation d'un modèle moléculaire de synthèse, en outre, nous avons vérifié que les liaisons 0-glycosidiques étaient stables vis-à-vis de l'hydrazine.

1º - Partie expérimentale

a - Synthèse des méthyl glycosides.- Les méthyl glycosides du D-mannose, D-galactose, 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et 2-amino-2-désoxy-D-glucose ont été préparés par action du méthanol chlorhydrique (1,5 N à 80° pendant 24 h). L'anomère du méthyl-2-amino-2-désoxy-D-glucoside $\left[\alpha\right]_D^{20}$ + 155,6° (C 0,46 dans le méthanol) a été isolé par électrophorèse préparative dans le tampon borate de sodium à 1 p. 100 de pH 9,2, tandis que l'anomère α du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-D-glucoside a été obtenu par chromatographie préparative dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) $\left[\alpha\right]_D^{20}$ + 139,6° (C 0,126 dans le méthanol). La pureté de ces glycosides a été systématiquement contrôlée en chromatographie en phase gazeuse ainsi qu'en chromatographie sur papier dans différents systèmes-solvants.

Le 2,5-anhydro-D-mannose a été préparé par diazotation de la glucosamine hydrochloride ; le 2,5-anhydro-D-mannitol $\left[\alpha\right]_{D}^{20}$ + 58,2° (C 1,89 dans le méthanol) a été obtenu après réduction par le borohydrure de potassium de son homologue réducteur.

b - Cinétique d'hydrazinolyse des méthyl glycosides.-L'étude cinétique de la N-désacétylation par l'hydrazine du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-α-D-glucoside en méthyl-2-amino-2désoxy-α-D-glucoside a été suivie en chromatographie en phase gazeuse en dosant ces deux composés par rapport à une quantité connue de D-ribitol, choisi comme témoin interne (Fig. 25; p. 95). 0,4 mM du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-α-D-glucoside sont hydrazinolysés en tubes scellés par 0,2 ml d'hydrazine anhydre aux températures suivantes : 80°, 100° et 115° pendant 4, 8, 16, 24, 48 et 60 heures. L'hydrazinolysat auquel on ajoute 0,2 mM de D-ribitol est évaporé à siccité sous un courant d'azote. La solution est ensuite triméthylsilylée puis analysée en chromatographie en phase gazeuse. Nous avons, de la même manière, étudié la stabilité des liaisons 0-glycosidiques des méthyl glycosides du D-galactose, D-mannose et L-fucose.



Fig. 25.- Cinétique de N-désacétylation par l'hydrazine anhydre du méthyl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucoside (I). Les hydrazinolysats (100°, 16 h) sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (II) et dosés par rapport au ribitol utilisé comme témoin interne (III). Les conditions expérimentales de la chromatographie en phase gazeuse sont les suivantes : Appareil Perkin-Elmer F₁₁ muni d'un détecteur à ionisation de flamme ; colonne de verré¹ (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de OV 17 ; débit du gaz vecteur (azote) 30 ml/mn. Température de la colonne : 120° pendant 15 mn puis 180° pendant 40 mn. Composé 1 : D-ribitol (Témoin interne) ; Composé 2 : méthyl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucoside (---).
2° - Résultats

Les résultats que nous a fourni l'étude cinétique de la N-désacétylation du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-α-Dglucoside, choisi comme modèle, peuvent se résumer de la manière suivante :

- On observe que la vitesse de la réaction de N-désacétylation est fonction de la température. A 80° la réaction est totale et quantitative au bout de 76 h, ce temps est ramené à 25 h lorsque la réaction se déroule à 100°, il n'est plus que de 9 h quand la température s'élève à 115°.

- L'hydrazinolyse respecte en totalité les liaisons O-glycosidiques. En effet, nous avons vérifié que dans les conditions expérimentales précédemment citées, les liaisons mannosyl, galactosyl et fucosyl sont parfaitement stables. Par contre, les hexoses réducteurs comme le D-mannose et le D-galactose sont rapidement dégradés par l'hydrazine, toutefois les polyols correspondants comme le D-mannitol et le D-galactitol sont stables.

3° - Discussion

La totale N-désacétylation des résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose constitue la condition primordiale pour diazoter ensuite *quantitativement* les résidus de 2-amino-2désoxy-D-glucose présents dans les glycannes. Il importait donc de définir avec précision les conditions optimales de cette réaction car, jusqu'à présent, les conditions usuelles utilisées par les auteurs conduisaient dans tous les cas à une N-désacétylation partielle. Cette première étape a été envisagée en effectuant une étude cinétique de la N-désacétylation du méthyl-2-acétamido-2désoxy- α -D-glucose.

Contrairement aux travaux de FIJINAGA et MATSUSHIMA (70) qui utilisent la chromatographie en couche mince pour contrôler le degré de N-désacétylation, nous avons préféré utiliser l'analyse chromatographique en phase gazeuse pour doser les produits de la N-désacétylation. Cette méthode d'analyse sensible et rapide nous a permis de démontrer que la réaction est totale et quantitative dans les conditions opératoires suivantes : à 80° pendant 76 h, à 100° pendant 25 h et à 115° pendant 10 h. En outre, nous avons vérifié que les liaisons 0-glycosidiques n'étaient pas scindées dans ces conditions par l'hydrazine.

B - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION DU GLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOID

Le procédé d'hydrazinolyse-diazotation donne des coupures absolument spécifiques et désormais quantitatives des liaisons N-acétylhexosaminidiques. L'hydrazinolyse, puis la diazotation étant quantitatives, les fragments obtenus le sont d'une manière reproductible. Ce procédé appliqué à des glycopeptides fournit des oligosaccharides à 2,5-anhydro-D-mannose terminal réducteur suivant le principe inspiré du procédé de MATSUSHI et FUJII et illustré par la figure 26 (p. 98).

1º Partie expérimentale

a - Hydrazinolyse et diazotation du glycopeptide β de l'ovomucoide.- Le glycopeptide (100 mg), rigoureusement anhydre en solution dans l'hydrazine anhydre (1 ml), est porté à 100° pendant 30 h. Séché à siccité sous courant d'azote, l'hydrazinolysat est ensuite redissous dans 0,5 ml de méthanol auquel on ajoute 7 ml d'une solution d'acide acétique à 15 p. 100 ; la solution est ensuite chromatographiée sur une colonne de Séphadex G-50 de manière à isoler le glycanne N-désacétylé à l'état pur et éliminer les contaminants tels que l'hydrazine et les hydrazides amino-acides.

La désamination nitreuse du glycanne N-désacétylé est ensuite réalisée selon le procédé de HORTON *et al.* (84) dans les conditions suivantes : 100 mg de glycanne sont dissous dans 6 ml d'eau distillée contenant 166,8 mg de nitrite de sodium et 0,90 ml d'acide acétique glacial. La solution, maintenue à 4° pendant 20 h sous agitation magnétique, est ensuite dessalée par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex G-10.

b - Détermination du rapport molaire en glucides présents dans les diazotats du glycopeptide. - Les rapports molaires des oligosaccharides et du monosaccharide présents dans les diazotats du glycopeptide β de l'ovomucoïde ont été déterminés



Fig. 26.- Hydrazinolyse des glycopeptides et coupure sélective des liaisons osaminidyl par diazotation (D'après MATSUSHIMA et FUJII (68)).

par comptage de la radioactivité portée par ces glucides, préalablement réduits par le borohydrure tritié. 0,3 à 0,5 mg de glucides totaux sont réduits dans un premier temps par le borohydrure de sodium ³H (0,1 mC; activité spécifique 10 Ci/mM) puis dans un second temps par le borohydrure de sodium "froid". La réaction d'une durée de 4 h est stoppée en acidifiant le milieu par de l'acide acétique dilué. Le réactif en excès qui contamine les glucides réduits est éliminé en effectuant une électrophorèse préparative dans le tampon : pyridine/acide acétique/eau (15 : 50 : 1935) de pH 3,9. Les glucides radioactifs réduits sont ensuite analysés en chromatographie dans le système-solvant : pyridine/ acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ainsi qu'en électrophorèse dans le tampon borate de sodium à 1 p. 100 de pH 9,2 Les bandes de papier des chromatogrammes ou des électrophorégrammes, découpées à 1 cm d'intervalle, sont placées dans 10 ml du mélange scintillant POPOP-PPO puis comptées au compteur de radioactivité.

c - Isolement des oligosaccharides. - L'isolement des glucides est réalisé en chromatographie préparative sur papier dans les systèmes-solvants : Solv. 1 : acétate d'éthyle/pyridine/ acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3), Solv. 2 : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Dans un cas particulier, nous avons en outre utilisé l'électrophorèse préparative sur papier dans le tampon borate de sodium de pH 9,2. Les oligosaccharides ayant un résidu de 2,5-anhydro-D-mannose en position terminale réductrice sont révélés, soit avec le réactif à l'urée chlorhydrique, soit avec le réactif à l'oxalate d'aniline. Le borate de sodium qui souille les préparations est éliminé par passage des solutions sur une colonne (1 x 10 cm) de Dowex 50 (X 8 ; 25-50 "mesh" ; H⁺). L'acide borique de la solution effluente préalablement évaporé à siccité est éliminé en reprenant 4 fois successivement le résidu sec par 20 ml du mélange méthanol-acide acétique (4 : 1 ; V/V) que l'on évapore par distillation sous pression réduite.

d - Détermination de la structure des oligosaccharides. Les rapports molaires en monosaccharides ont été déterminés de la façon suivante : les oligosaccharides réduits sont méthanolysés selon le procédé de CLAMP (92). Les méthyl glycosides et les polyols sont ensuite triméthylsilylés, puis analysés en chromatographie en phase gazeuse. L'analyse de triméthylsilyl glycosides est conduite en utilisant une colonne d'OV-17 à 3 p. 100 chauffée à 110° pendant 15 mn puis de 110° à 180° à raison de 1° par minute. L'azote est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 35 ml/mn.

Les oligosaccharides réducteurs de plus haut poids moléculaire sont, en outre, soumis à une hydrolyse acide ménagée dans les conditions opératoires suivantes : 2 mg de glucide sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 0,1 N, à 80° pendant 1 h. La solution est refroidie et l'acide est éliminé par passage sur une colonne (1 x 10 cm) de Duolite A-102 D (25-50 "mesh", HCO_2^{-}). L'hydrolysat est ensuite analysé en chromatographie sur papier.

Les oligosaccharides réduits sont perméthylés selon le procédé décrit p. 18, et les éthers méthyliques sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse.

2° - Résultats

a - Hydrazinolyse et diazotation du glycopeptide β de l'ovomucoide.- L'hydrazinolysat du glycanne fournit en chromatographie de gel filtration deux fractions A et B dont les volumes d'exclusion respectifs sont : V_A : 311,1 ml et V_B : 428 ml (Fig. 27). La fraction B, dépourvue de glucide, est composée d'hydrazides amino-acides et d'amino-acides, qui résultent d'une part, de la coupure des liaisons peptidiques ayant préalablement résisté à l'hydrolyse pronasique et, d'autre part, de la rupture de la liaison N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine. La fraction A, dépourvue d'amino-acides, riche en glucides, possède un volume de rétention (V_A : 311,1 ml) sensiblement supérieur à celui du glycopeptide β natif (V_β : 309,4 ml), ce qui indique que l'ensemble des liaisons O-glycosidiques sont stables vis-à-vis de l'hydrazine.





Ce résultat confirme l'observation que nous avions faite en ce qui concerne la stabilité des liaisons O-glycosidiques du méthyl-D-galactose et méthyl-D-mannose. Le glycanne N-désacétylé est homogène en électrophorèse dans le tampon : pyridine/acide acétique/eau (15 : 30 : 1935) de pH 3,9 (Rasp : 0,88). Nous avons retrouvé, dans cette dernière fraction, la totalité des monosaccharides neutres et 80 p. 100 de résidus de 2-acétamido-2désoxy-D-glucose, dosés après N-réacétylation du glycanne (Tableau XVI). Cette perte en glucide peut s'expliquer par une N-réacétylation incomplète des résidus de 2-amino-2-désoxy-Dglucose, ce qui entraine une libération incomplète de ces derniers au cours de l'hydrolyse acide qui précède le dosage. Le rapport galactose/mannose 1 : 5 du glycanne hydrazinolysé est identique à celui du glycanne natif. Le pourcentage de N-désacétylation des résidus de N-acétylglucosamine, établi par estimation des résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose présents dans les diazotats, est de 99 p. 100.

Tableau XVI

Détermination de la composition centésimale en glucides du glycopeptide ß avant et après hydrazinolyse.

	Glycopeptide ß	Glycopeptide β hydrazinolysé	Rendement
<u>Composition centési-</u> male			
Monosaccharides neu- tres (a) (D-galactose et D-man- nose)	23,8	24,10	101,2
2-acétamido-2-désoxy- D-glucose (b)	.39,43	31,60 (c)	79,20

- (a) Les monosaccharides neutres ont été déterminés par la méthode à l'orcinol.
- (b) Les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose ont été dosés par la méthode de BELCHER (95) après hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N, 4 h, à 100°, en tubes scellés sous vide).
- (c) Dosés après N-réacétylation du glycanne.

La fraction A, riche en glucides, est ensuite désaminée par l'acide nitreux. La désamination du 2-amino-2-désoxy-D-glucose s'accompagne d'un réarrangement moléculaire qui fragilise la liaison glucosaminyl avec formation concomittante de 2,5-anhydro-D-mannose. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV-17 du diazotat réduit et méthanolysé permet de déceler la présence de D-galactose, D-mannose et 2,5anhydro-D-mannitol dans les proportions relatives suivantes : 0,78 - 5,0 - 8,9. L'absence d'hexitols, autres que le 2,5-anhydro-D-mannitol, montre que les coupures ont porté spécifiquement sur les liaisons hexosaminidyl. Les oligosaccharides réducteurs présents dans le diazotat du glycanne β de l'ovomucoïde sont purifiés, soit en chromatographie de gel filtration sur colonne de Séphadex G-15, soit par passage successif sur colonne de résines échangeuses de cations Dowex 50 (X 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺) et sur résines échangeuses d'anions Duolite A-102 D ("mesh" 25-50 ; HCO₂). L'éluat ainsi que les eaux de rinçage contiennent les oligosaccharides réducteurs et le 2,5-anhydro-D-mannose.

b - Isolement et détermination du rapport molaire en oligosaccharides.- L'isolement de ces oligosaccharides réducteurs est réalisé en chromatographie préparative sur papier dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/ eau (5 : 5 : 1 : 3). Nous obtenons, de cette manière, après révélation des chromatogrammes avec le réactif à l'urée phosphorique, les oligosaccharides 1 et 2 ainsi qu'un composé 3 identifié au 2,5-anhydro-D-mannose. Les glucides 1 et 3 se sont révélés homogènes en chromatographie sur papier dans différents systèmessolvants ainsi qu'en électrophorèse, par contre, l'oligosaccharide 2 se dédouble en électrophorèse en 2a et 2b (Fig. 28).

La détermination des proportions relatives molaires de ces glucides réducteurs est résumée dans la figure 29, les résultats se résument de la manière suivante : les diazotats purifiés, contenant les oligosaccharides 1, 2 et le 2,5-anhydro-D-mannose sont réduits par le borohydrure tritié puis chromatographiés. Les glucides coexistent dans les diazotats dans les proportions relatives 1 - 2,2 - 7. L'oligosaccharide 2 se dédouble en 2a et 2b dans les proportions relatives 1,5 - 0,7 (Fig. 28).





Fig. 28.- I. Chromatographie sur papier du diazotat du glycopeptide B de l'ovomucoîde hydrazinolysé (M). Les composés 1 et 2 sont des oligosaccharides, le composé 3 est identifié au 2,5-anhydro-D-mannose. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n° 3, solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) durée de la chromatographie 18 h, révélation au réactif à l'urée phosphorique.

II. Electrophorèse des produits résultant de la désamination nitreuse du glycopeptide β de l'ovomucoîde. Conditions d'électrophorèse : papier Whatman n° 3, tampon borate de sodium à 1 p. 100 de pH 9,2, tension 20 V/cm pendant 4 h ; révélation avec le réactif à l'urée phosphorique.

11

ł



I

Fig. 29.- Détermination du rapport molaire en glucides réduits par le borohydrure tritié présents dans les diazotats du glycopeptide B de l'ovomucoîde.

I. Chromatographie des glucides réduits et comptage de la radioactivité.

II. Electrophorèse de l'oligosaccharide 2 réduit.

105

11.1

d - Structure des oligosaccharides.- La détermination de la composition molaire en monosaccharides de ces glucides n'a pu être établie dans les conditions opératoires habituelles en effet, le 2,5-anhydro-D-mannose est particulièrement instable vis-à-vis des acides. Comme en témoigne la figure 30, il est détruit après 90 minutes d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique



Fig. 30.- Stabilité du 2,5-anhydro-D-mannose dans l'acide chlorhydrique 1 M, 1,5 M et 2 M à 100°. L'étude cinétique est suivie en dosant le 2,5-anhydro-D-mannose avec le réactif à l'indole selon le procédé de DISCHE et BORENFREUND (80).

1 M, 1,5 M et 2 M dans les proportions relatives suivantes : 27,2 p. 100 ; 41,1 p. 100 et 74,4 p. 100. Par contre, le 2,5anhydro-D-mannitol est stable vis-à-vis du méthanol chlorhydrique 0,5 M, 1 M et 1,5 M à 80° pendant 24 h. Ces résultats préliminaires nous ont conduit à envisager l'étude de la détermination de la composition molaire des oligosaccharides réduits en chromatographie en phase gazeuse (Fig. 31 et Tableau XVII).

Tableau XVII

Détermination du rapport molaire en monosaccharides présents dans les oligosaccharides 1, 2a et 2b isolés des diazotats du glycopeptide ß de l'ovomucoïde préalablement hydrazinolysé.

Oligosaccharides	1	2a	2b
Composition molaire (a)			
D-galactose	-	· _	0,9
D-mannose	2,9	1,0	-
2,5-anhydro-D-mannitol	1,0	1,0	1,0

 (a) Les rapports molaires ont été déterminés par une chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des méthyl glycosides.

La structure des trois oligosaccharides 1, 2a et 2b a été déterminée sur la base des résultats expérimentaux suivants : (a) ils sont composés en proportions variables de D-mannose ou D-galactose et 2,5-anhydro-D-mannose ; (b) tous possèdent un résidu de 2,5-anhydro-D-mannose en position terminale réductrice ; (c) en outre, les résultats particuliers suivants ont été obtenus :

L'oligosaccharide 2a a été identifié au O-Dmannopyranosyl-(1-++)-2,5-anhydro-D-mannose. Il est constitué en proportions équimoléculaires de D-mannose et de 2,5-anhydro-D-mannose, ce dernier disparaît après réduction par le borohydrure alcalin tandis qu'apparaît le 2,5-anhydro-D-mannitol. L'hydrolysat de ce composé réduit puis méthylé contient le 2,3, 4,6-Tétra-O-méthyl-D-mannose ainsi que le 1,3,6-Tri-O-méthyl-2,5-anhydro-D-mannitol.



Rapport molaire



Fig. 31.- I. Séparation chromatographique en phase gazeuse des monosaccharides conjugués recontrés habituellement dans les diazotats réduits de glycopeptides. Ery : Erythritol ; Fuc : L-fucose ; Chit : Chititol ou 2,5-anhydro-D-mannitol ; Man : D-mannose ; Gal : D-galactose.

II. Détermination du facteur de correction molaire obtenu en effectuant le quotient rapport molaire/rapport de surface.

108

L'oligosaccharide 2b répond à la formule

du $0-\beta-D$ -galactopyranosyl- $(1 \longrightarrow 4)-2,5$ -anhydro-D-mannose. En effet, il est constitué de D-galactose et de 2,5-anhydro-D-mannose dans les rapports molaires 1 : 1. La réduction de cet oligosaccharide laisse apparaître un résidu de 2,5-anhydro-D-mannitol. L'hydrolysat de ce disaccharide réduit puis méthylé contient le 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-D-galactose ainsi que le 1,3,6-Tri-Ométhyl-2,5-anhydro-D-mannitol. Il est en outre hydrolysé par la β -D-galactosidase de la rate de Boeuf. Il est intéressant de signaler que nous avons obtenu, par acétolyse de ce glycopeptide, un oligosaccharide B identifié à la N-acétyllactosamine $(0-\beta$ -D-galactopyranosyl- $(1 \longrightarrow 4)-2$ -acétamido-2-désoxy-D-glucose. Ces deux oligosaccharides 2b et B possèdent une origine commune car il n'existe qu'un seul résidu de D-galactose par mole de glycopeptide.

L'oligosaccharide 1 a été identifié au $0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1 \rightarrow 3)-0-\alpha$ -D-mannopyranosyl- $(1 \rightarrow 6)-\beta$ -Dmannopyranosyl- $(1 \rightarrow 4)-2,5$ -anhydro-D-mannose de la manière suivante : il est composé de D-mannose et de 2,5-anhydro-D-mannose dans les proportions 3 : 1. Ce dernier est réduit par le borohydrure de sodium en 2,5-anhydro-D-mannitol. L'hydrolysat de ce tétrasaccharide réduit et perméthylé contient le 2,3,4,6-Tétra-0-méthyl-D-mannose et le 2,4-Di-0-méthyl-D-mannose ainsi que le 1,3,6-Tri-0-méthyl-2,5-anhydro-D-mannitol. En outre, on obtient par hydrolyse acide ménagée de 1'oligosaccharide 1 un trisaccharide constitué exclusivement de D-mannose, il s'agit d'un mannotriose qui est en partie hydrolysé par l' α -D-mannosidase de la Fève Jack.

Les structures des oligosaccharides 1, 2a et 2b sont résumées par la figure 32.

3° - Conclusions

A la lecture de ces résultats, nous pouvons tirer plusieurs conclusions :

1°) Contrairement aux procédés d'hydrolyse acide ménagée et d'acétolyse, ce procédé fournit un petit nombre d'oligosaccharides en raison même de sa très haute spécificité de coupure







1





Fig. 32.- Structure des oligosaccharides 1, 2a et 2b isolés des diazotats du glycopeptide β hydrazinolysé



des liaisons glucosaminidyl et galactosaminyl.

2°) En outre, la réduction des diazotats par le borohydrure tritié permet de doser avec précision les proportions relatives des oligosaccharides formés ainsi que le 2,5-anhydro-D-mannose qui tire son origine, soit des résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose placés en position externe, soit de deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose voisins (*).

3°) L'analyse structurale de l'oligosaccharide 1 montre sans ambiguité qu'il existe un noyau oligomannosidique central correspondant à la structure suivante :

 $Man-\alpha-(1 - 3)$ $Man-\beta-(1 - 4) GlcNAc$ $Man-\alpha-(1 - 6)$

(*) Nous avons démontré que le glycoamino acide suivant : Man-β-(1-4)-GlcNAc-β-(1-4)-GlcNAc Asn isolé par oxydation periodique du glycopeptide β de l'ovomucoîde par G. STRECKER conduisait, après hydrazinolyse et diazotation, à la formation de Man-β-(1-4)-2,5-anhydro-D-mannose et de 2,5-anhydro-D-mannose. On peut donc conclure que le résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose lié par une liaison N-glycosidique à l'asparagine est également converti en 2,5-anhydro-D-mannose. 4. ETUDE COMPAREE DE LA STRUCTURE DE QUELQUES GLYCANNES

Les procédés de coupure chimiques que nous venons de décrire étant bien standardisés, il importait de les appliquer rapidement au plus grand nombre possible de glycannes afin de déceler, soit des analogies, soit des différences de structure.

L'étude comparée de trop nombreux fragments obtenus à l'aide des procédés d'hydrolyse acide ménagée et d'acétolyse nous a amené à envisager dans un premier temps la mise au point d'un procédé de carte chromatographique qui permet d'analyser globalement les oligosaccharides qui proviennent des parties "externe" et "interne" des glycannes.

Par contre, l'étude comparée des deux ou trois oligosaccharides obtenus par coupure spécifique des liaisons de la N-acétylglucosamine (procédé d'hydrazinolysediazotation) nous informe plus particulièrement de la structure "interne", -donc plus difficilement accessible-, des glycannes.

I - ETUDE COMPAREE DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE ACIDE MENAGEE ET ACETOLYSE DES GLYCANNES : DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES OLIGOSACCHARIDES

Afin de pouvoir comparer rapidement les fractions neutres des acétolysats et des hydrolysats acides partiels de glycoprotéines diverses, nous avons été amené à proposer un procédé chromatographique, reproductible et sensible qui fournit, sur de faibles quantités de substances, des cartes chromatographiques des oligosaccharides "neutres" présents dans les acétolysats et les hydrolysats de glycoprotides. A la manière du procédé de "finger-printing" d'INGRAM, notre méthode permet donc d'étudier de façon comparative la séquence des monosaccharides dans les glycoprotéines et d'obtenir des renseignements

précieux sur les analogies et les différences que présente la structure des fractions glucidiques de ces substances.

1° - Description du procédé de carte chromatographique

Au cours de nos tentatives d'isolement des oligosaccharides, nous avions été frappés par la netteté des fractionnements sur colonnes de charbon-*Celite* et par la reproductibilité des résultats fournis par cette méthode. L'idée nous est alors venue d'associer ce procédé de chromatographie d'adsorption à la chromatographie monodimensionnelle de partage sur papier de manière à réaliser des cartes chromatographiques reproductibles des oligosaccharides. Il devient alors possible de comparer la composition en oligosaccharides d'acétolysats et d'hydrolysats acides partiels de glycopeptides d'origine différente (transferrine et ovomucoïde, par exemple) ou identique (variants 1 et 2 de l'ovomucoïde, par exemple) et d'obtenir des renseignements précieux sur la structure comparée des glycannes.

a - Chromatographie d'adsorption sur charbon-Celite.-Une solution aqueuse à 1 p. 100 d'oligosaccharides isolés, soit d'un hydrolysat acide ménagé, soit d'un acétolysat O-désacétylé de glycopeptide ou de glycoprotéine est appliquée au sommet d'une colonne de charbon-*Celite* (1 x 12 cm). Les glucides sont alors déplacés par le passage de 250 ml d'eau distillée, puis de solutions aqueuses d'éthanol (250 ml) de concentration 1,5 -3,5 - 5 - 7,5 - 10 et 15 p. 100, à raison de 15 ml/h.

b - Chromatographie de partage sur papier.- Chacune des fractions de désorption du charbon est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) pendant 28 heures. Les chromatogrammes sont ensuite séchés et révélés avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

2° - Résultats expérimentaux

a - Cartes chromatographiques de la fraction neutre des acétolysats et de la fraction neutre des hydrolysats du glycopeptide β de l'ovomucoîde.- Nous avons utilisé la fraction neutre des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoïde, dont nous disposions de quantités élevées pour mettre au point notre procédé. La figure 33 montre que la chromatographie sur papier des éluats éthanoliques (1,5 - 3,5 - 5 - 7,5 et 10 p. 100) des colonnes de charbon-*Celite* permet de mettre en évidence 19 oligosaccharides (les structures de ces oligosaccharides désignés par des lettres majuscules sont rassemblées dans le Tableau XIV p. 73) individualisés parmi lesquels 4 disaccharides, 5 trisaccharides, 3 tétrasaccharides, 1 pentasaccharide et 2 hexasaccharides. 10 mg de glycopeptides suffisent pour réaliser une carte chromatographique. En outre, des expériences répétées nous ont montré que les résultats étaient parfaitement reproductibles.

Nous avons utilisé, de la même manière, la fraction neutre des hydrolysats acides partiels du glycopeptide β de l'ovomucoïde pour dresser une carte chromatographique des oligosaccharides. La figure 33 B montre que l'analyse de la carte chromatographique des hydrolysats permet d'identifier et d'individualiser 15 oligosaccharides désignés par les lettres a à o et dont les structures se trouvent en partie rassemblées dans le tableau V ; p. 27).

L'étude comparée des cartes chromatographiques des oligosaccharides des hydrolysats et des acétolysats montre que les cartes ne sont pas superposables, -à l'exception toutefois des oligosaccharides *d*, *c* et *D*, *C*-, ce qui nous permet de conclure que les deux procédés de coupure des liaisons 0-glycosidiques sont complémentaires.

b - Cartes chromatographiques des fractions neutres des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoîde avant et après oxydation periodique.- L'oxydation periodique du glycopeptide β de l'ovomucoïde dégrade de manière récurrente le glycanne en oxydant les fonctions α -glycol. On obtient, ainsi, après purification sur colonne de Séphadex G-15, un glycopeptide résistant à l'oxydation composé de 3 résidus de D-mannose, de 3 résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (*). Ce composé est ensuite acétolysé dans les conditions habituelles et la fraction neutre oligosaccharidique est ensuite analysée à l'aide du procédé de

(*) L'oxydation periodique du glycopeptide β a été réalisée par
G. STRECKER (résultats non publiés).







Fig. 33.- Procédé de carte chromatographique des fractions "neutres" (10 mg) des acétolysats (A) et des hydrolysats acides partiels par le Dowex 50 (B) du glycopeptide B de l'ovomucoîde.

La chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-Celite (1) est associée avec la chromatographie de partage sur papier (2). Papier Whatman n° 3, système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3), durée de la chromatographie 28 h, révélation à l'oxalate d'aniline. Les chiffres indiquent la concentration en éthanol de la solution d'élution du charbon.



carte chromatographique. Nous observons après étude comparée des deux cartes (Fig. 34), que seuls les oligosaccharides A, D et G persistent après oxydation periodique.



Α

Fig. 34.- Cartes chromatographiques des oligosaccharides présents dans les fractions neutres des acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoîde natif (A) et oxydé par l'acide periodique (B).

Nous concluons donc que ces oligosaccharides sont situés près du point d'attache du glycanne avec le protide. L'ensemble de ces résultats ainsi que ceux obtenus par perméthylation (*) du glycopeptide résistant à l'acide periodique nous permet de conclure qu'il s'agit du schéma de structure illustré par la figure 35.

(x) La perméthylation du glycopeptide résistant à l'acide periodique a été réalisée par B. FOURNET.



Fig. 35.- Structure du glycopeptide, résistant à l'acide periodique, isolé des produits de l'oxydation periodique du glycopeptide β de l'ovomucoide. Les lettres A, D et G désignent les structures des oligosaccharides identifiés à l'aide du procédé de carte chromatographique.

c - Comparaison des cartes chromatographiques des glycannes des variants 1 et 2 de l'ovomucoîde. - Dans la troisième série d'expériences, nous avons étudié la composition en oligosaccharides des acétolysats des deux variants de l'ovomucoïde : les ovomucoïdes 1 et 2 (voir l'appendice technique, p. 152). Il s'agit d'alloglyco-homoprotéines isolées par chromatographie sur celluloses modifiées de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (JAKUBCZAK et MONTREUIL (95)). Il était donc intéressant de préciser les analogies et les différences que présente la structure des glycannes de ces variants. La figure 36 résoud ce problème. On voit, en effet, qu'un grand nombre d'oligosaccharides sont communs aux deux molécules, il s'agit des oligosaccharides A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M, N et O et que d'autres sont spécifiques de chacune des deux structures, il s'agit en particulier des oligosaccharides K et X. A la vue de ces deux cartes, nous pouvons déjà postuler que les structures des glycannes de ces deux variants glycoprotéiniques sont très voisines et que seule une différence structurale ponctuelle portée par la partie "externe" des glycannes constitue la nature de la variance de ces molécules.

d - Comparaison des cartes chromatographiques des glycannes de la transferrine et de l'ovomucoïde.- Dans une dernière série de travaux, il était intéressant de comparer les structures des glycannes appartenant à des glycoprotéines isolées de milieux très différents. L'étude des cartes chromatographiques des glycannes de l'ovomucoïde et de la transferrine sérique (voir appendice technique, p. 159) est à cet égard très signicatif.



Fig. 36.- Cartes chromatographiques comparées des oligosaccharides présents dans les fractions neutres des acétolysats des glycopeptides des ovomucoîdes 1 et 2. Les conditions de la chromatographie sont précisées dans le texte p. 113. Les lettres désignent les oligosaccharides dont les structures sont précisées dans le Tableau XIV; p. 73). En effet, la figure 37 montre, comme on pouvait s'y attendre, que les deux cartes oligosaccharidiques sont très nettement dissemblables.



1,5 3,5 10 7,5 5

Α

в

Fig. 37.- Cartes chromatographiques comparées des oligosaccharides présents dans les fractions neutres des acétolysats des glycopeptides de l'ovomucoîde (A) et de la transferrine (B).

3° - Conclusions

Nous avons mis au point un procédé rapide, sensible et reproductible d'analyse des oligosaccharides des fractions "neutres" des acétolysats et des hydrolysats acides partiels en associant la chromatographie sur charbon et la chromatographie sur papier. Cette méthode fournit des cartes dont l'étude permet de mettre rapidement en évidence des différences parfois très faibles dans les séquences de monosaccharides constituant les glycannes de glycoprotéines diverses. Nous avons ainsi pu démontrer que, dans le cas de variants glycoprotéiniques, la différence de structure ponctuelle était probablement due à la présence d'un seul résidu de monosaccharide, placé en position externe dans la molécule. Son application nous paraît donc particulièrement indiquée dans le cas de l'étude comparée de glycoprotéines homologues comme celles des milieux sains et cancéreux, dont on dispose généralement de faibles quantités et dont les faibles variations de structure sont souvent difficiles à saisir.

En outre, l'étude comparée des cartes oligosaccharidiques du glycanne ß de l'ovomucoîde natif et oxydé*par l'acide periodique nous permet de compléter définitivement l'ébauche de sa structure progressivement élaborée grâce aux résultats fournis par l'hydrolyse ménagée (p. 26) l'acétolyse (p. 73), l'hydrazinolyse suivie d'une diazotation (p. 109) et la perméthylation du glycanne (94). La confrontation de l'ensemble de ces informations apportées par l'application de ces techniques complémentaires nous permet enfin de proposer une structure complète de la molécule, dont le schéma de structure est illustré dans la figure 38.

 (*) L'oxydation periodique du glycopeptide β de l'ovomucoîde a été réalisée par G. STRECKER (résultats non publiés).



Fig. 38 Structures statistiques du glycopeptide 8 de l'ovomucoïde, selon B. BAYARD, B. BOUQUELET, B. FOURNET, G. STRECKER et J. MONTREUIL

Les oligosaccharides encadrés sont ceux que détache l'hydrozinolyse diazotation.

II - ETUDE COMPAREE DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR HYDRAZINO-LYSE-DIAZOTATION DES GLYCANNES : MISE EN EVIDENCE D'UN NOYAU OLIGOSACCHARIDIQUE COMMUN

La méthode d'hydrazinolyse-diazotation étant désormais standardisée, il devenait essentiel d'explorer la structure de différents glycannes appartenant à des glycoprotéines diverses telles que ceux de l'orosomucoïde, de la transferrine et de la lactotransferrine. Les finalités de ces applications sont multiples. En effet, l'étude de la structure comparée de quelques glycannes peut nous apporter de précieux renseignements sur la manière dont ces polysaccharides sont biosynthétisés par les cellules. S'agit-il, en particulier, d'une biosynthèse codée par la séquence des amino-acides comme c'est le cas pour la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine et dont le code de biosynthèse semble étroitement lié à la présence constante d'un β-hydroxy-amino-acide en β d'un résidu d'asparagine (NEUBERGER (96) ; EYLAR (97)).

D'autre part, existe-t-il une grande diversité structurale des glycannes comme le laissent supposer les schémas de structure proposés dans la littérature et dont certains se trouvent illustrés dans la figure 39 (p. 123).

Ce procédé de coupure spécifique des liaisons glucosaminyl et galactosaminyl, appliqué à divers glycannes, devrait nous permettre d'éclairer ces différents problèmes.

1° - Partie expérimentale

a - Matériel.- Préparation de la lactotransferrine (*) et de l'orosomucoïde (*) (voir appendice technique ; p. 158-159). La transferrine était une préparation commerciale obtenue chez la firme BEHRINGWERKE AG.

 ^(*) La lactotransferrine et l'orosomucoîde étaient des préparations aimablement fournies par G. SPIK et B. FOURNET que nous remercions vivement.







(22) Schéma de structure des glycannes de l'orosomucoîde selon SATO et al.

Gal

6955 6955 Fig. 39.- Schéma de structure des glycannes de l'orosomucoîde, de la transferrine et de la lactotransferrine.

b - Méthodes.- Nous avons utilisé le protocole expérimental de l'hydrazinolyse suivie d'une diazotation des glycoprotéines décrit dans le chapitre 3 II A. Pour chaque glycoprotéine nous avons travaillé sur les glycopeptides en mélange.

2° - Résultats

Les résultats que nous avons obtenus par hydrazinolyse-diazotation de ces trois glycoprotéines peuvent se résumer de la manière suivante :

a - L'hydrazinolyse et la diazotation de l'orosomucoid de la fétuine, de la transferrine et de la lactotransferrine fournissent, pour chaque type de molécule, deux oligosaccharides (appelés 1 et 2) qui possèdent un résidu de 2,5-anhydro-D-mannos en position réductrice terminale et dont les vitesses de migration dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) sont les suivantes :

> Oligosaccharide 1 : $R_F 0,06$ Oligosaccharide 2 : $R_F 0,17$

Nous caractérisons, en outre, un monosaccharide (composé 3) identifié au 2,5-anhydro-D-mannose (Fig. 40).

b - Etude de la structure des oligosaccharides 1 et 2.-Les oligosaccharides 1 et 2, présents dans les diazotats de l'orosomucoïde, de la fétuine, de la lactotransferrine et de la transferrine, ont été étudiés séparément, les résultats des études structurales peuvent se résumer de la manière suivante :

- L'<u>oligosaccharide 1</u> de l'orosomucoïde, de la fétuine, de la transferrine et de la lactotransferrine est composé de D-mannose et de 2,5-anhydro-D-mannose dans les proportions relatives 3 : 1. Il s'agit d'un tétrasaccharide dont le résidu de 2,5-anhydro-D-mannose se localise en position réductric terminale.

L'hydrolyse de cet oligosaccharide réduit et perméthylé nouspermet de caractériser le 2,3,4,6-Tétra-Ométhyl-D-mannose, le 2,4-Di-O-méthyl-D-mannose et le 1,3,6-Tri-O-méthyl-2,5-anhydro-D-mannitol. Il est partiellement hydrolysé



Fig. 40.- Chromatographie sur papier des produits résultant de la diazotation des glycannes de l'orosomucoîde, de la transferrine, de la lactotransferrine et de la fétuine préalablement hydrazinolysés. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n° 3 ; système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; durée de la chromatographie : 10 h ; révélation avec le réactif à l'urée phosphorique. Fet : fétuine ; Oroso : orosomucoîde ; Tr : transferrine sérique humaine ; Lacto : lactotransferrine. Les chiffres 1 et 2 désignent les oligosaccharides ; le chiffre 3 désigne le 2,5-anhydro-D-mannose. par l' α -D-mannosidase (EC 2.2.1.24) de la Fève Jack et le disaccharide résistant composé de D-mannose et de 2,5-anhydro-D-mannose est isolé puis hydrolysé par la β -mannosidase (EC 1.2.3.25) (*). La structure de ce tétrasaccharide commun à ces glycoprotéines est donc :

Man- α -(1--->3) Man- β -(1-->4)-2,5-anhydro-D-mannose Man- α -(1-->6)

Nous remarquons que la structure de cet oligosaccharide est identique à celle de l'oligosaccharide 1 isolé des diazotats de l'ovomucoïde.

- L'<u>oligosaccharide 2</u>, commun aux 4 glycoprotéines contient en proportions équimoléculaires le D-galactose et le 2,5-anhydro-D-mannose. L'hydrolyse de ce disaccharide réduit et perméthylé libère le 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-D-galactose ainsi que le 1,3,6-Tri-O-méthyl-2,5-anhydro-D-mannitol. La structure de ce composé est donc :

 $Gal-\beta-(1-4)-2, 5-anhydro-D-mannose$

Cette structure a été également caractérisée dans les diazotats du glycopeptide β de l'ovomucoïde, il s'agissait de l'oligosaccharide 2b (Voir à ce sujet, p. 109).

3° - Discussion et conclusions

1°) L'application du procédé de coupure spécifique des liaisons N-acétylglucosaminyl aux glycoprotéines suivantes : ovomucoîde, fétuine, orosomucoîde sérique, sérotransferrine humaine et lactotransferrine humaine permet de caractériser le chaînon commun à 14 glycannes (**) et dont la structure est la suivante :

(**) La transferrine comprend 2 glycannes, l'orosomucoîde 5, la fétuine 3, la lactotransferrine 2 et l'ovomucoîde 2, soit au total 14 glycannes.

^(*) Nous remercions vivement Monsieur Stéphane BOUQUELET qui a bien voulu réaliser les hydrolyses enzymatiques.

$$D-Man-\alpha-(1 \longrightarrow 3)$$

D-Man- $\beta-(1 \longrightarrow 4)-2$, 5-anhydro-D-mannose
D-Man- $\alpha-(1 \longrightarrow 6)$

provient de l'enchaînement terminal qui est donc lui-même commun à tous les glycannes de ces glycoprotéines :

GlcNAc-
$$\beta$$
-(1 \rightarrow 2)(4)-Man- α -(1 \rightarrow 3)
Man- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc-Asn
GlcNAc- β -(1 \rightarrow 2)(4)-Man- α -(1 \rightarrow 6)

Il est à noter que des analogies de structure entre les glycannes de diverses glycoprotéines étaient posée en hypothèse dès 1962 par MONTREUIL *et al.* (7). Ces auteurs avaient, à cette époque, caractérisé dans les hydrolysats acides partiels des chaînons communs tels que la N-acétyllactosamine ainsi que deux mannobioses isomères.(FOURNET *et al.* (65)). De la même façon, EYLAR et JEANLOZ (6) et SPIRO (8) caractérisent dans l'orosomucoïde et la fétuine le trisaccharide commun suivant : ANAN $(2 \rightarrow x)$ -Gal- β - $(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc

Nous pouvons préciser, en outre, que chaque glycoprotéine étudiée est constituée d'un noyau mannotriosique dont un résidu de D-mannose, substitué en 3 et 6, constitue le point de ramification de la molécule.

2°) Les 5 glycannes de l'orosomucoïde possèdent le même schéma général de structure car l'hydrazinolyse-diazotation de cette glycoprotéine ne libère que deux oligosaccharides.

3°) Ces résultats infirment la plupart des structures des glycannes citées dans la figure 39 à l'exception cependant de la structure du glycanne de l'orosomucoïde (HATCHER et JEANLOZ (100)) dont nous pouvons désormais préciser la structure du noyau proche du point d'attache avec la protéine.



Remarquons, en comparant cette structure et celle du glycanne ß de l'ovomucoïde (Fig. 38 ; p. 121), qu'il existe pour ces deux molécules des analogies de structures surprenantes, en effet, bien que n'appartenant ni à la même espèce, ni au même milieu, ces deux glycannes ne possèdent pas moins de 9 monosaccharides enchaînés de la même façon, même liaison, même anomérie de liaison. Ceci semble montrer qu'il existe dans divers tissus un code unitaire de la biosynthèse des glycannes.

4°) La comparaison de la séquence des monosaccharides ainsi que les séquences peptidiques au voisinage du point d'attache des glycopeptides I et II de la transferrine (CHARET *et al.* (102)) (Fig. 41 ; p. 129) des glycopeptides I et II de la lactotransferrine (SPIK *et al.* (101)) (Fig. 42 ; p. 130) ainsi que des glycopeptides de l'orosomucoïde (NIMBERG *et al.* (103, 104) ; SCHMID *et al.* (105)) (Fig. 43 ; p. 131) permet de tirer les conclusions suivantes :

a - Mise à part la fixation du premier glucide sur la chaîne peptidique, nous pouvons préciser que la connaissance de la structure des chaînes peptidiques et des chaînes glycanniques des glycoprotéines précédemment citées ne plaide pas en faveur d'une intervention de la séquence des aminoacides dans l'élaboration de la structure des glycannes.

b - Bien au contraire, l'ordre d'enchaînement des monosaccharides, proches du point d'attache, commun à l'ensemble des glycannes étudiés, est en faveur d'une action simultanée des glycosyltransférases du réticulum endoplasmique. Ces transférases sont responsables de l'élongation de la chaîne glycannique et font partie d'un système multi-enzymatique, le système multiglycosyltransférasique (MGT) de ROSEMAN (106).







Leu - Phe - Asn - Gln - Thr - Gly - Ser - Cys - CM - Try

E

Fig. 42.- Séquences peptidiques des glycopeptides I et II de la lactotransferrine selon SPIK et al. (101) et structure partielle de la partie glycannique.

· Ile - Thr -	Asn - Lys -	- Thr - Glu -	Tyr - Asn -	H	Τ Ι Ι	
- Asn - Leu - Val - Pro - Val - Pro - Ile - Thr - Asn - Ala - Thr - Leu - Asp - Arg - I	- Try - Phe - Tyr - Ile - Ala - Ser - Ala - Phe - Arg - Asn - Glu - Glu - Glu - Tyr - A	- Gln - Glu - Ile - Gln - Ala - Thr - Phe - Phe - Tyr - Phe - Thr - Pro - Asn - Lys - T A	- Ile - Phe - Leu - Arg - Glu - Tyr - Gln - Thr - Arg - Gln - Asp - Gln - Cys - Ile - T	- Tyr - Leu - Asn - Val - Glu - Arg - Glu - Asn - Gly - Thr - Ile - Ser - Ang - Tyr	GlcNAc $\frac{1,2(4)}{B}$ Man $\alpha \frac{1,3}{Man}$ β GlcNAc $-Asn$ GlcNAc $\frac{1,2(4)}{B}$ Man $\alpha \frac{1,6}{\alpha}$ GlcNAc $-Asn$	Fig 43 I. Séquence peptidique de la partie N-terminale de l'orosomucoîde selon NIMBERG et MOTOYAMA (103), NIMBERG et al. (104) et SCHMID et al. (105). II. Structure du noyau oligosaccharidique commun aux cinq glycannes de l'orosomucoîde.
Jys - Ala	31y - Lys	Ser - Val	Asp - Thr	lhr - Thr		

BUS
A l'exception de la première N-acétylglucosamine qui se trouve associée au résidu d'asparagine, il semble exister, pour les autres résidus de monosaccharides une organisation des transférases au sein du système MGT qui puisse permettre de déterminer l'ordre séquentiel des monosaccharides des glycannes.

L'étude de la structure du noyau oligosaccharidique nous permet de préciser que l'ordre des glycosyltransférases du système MGT qui entrent en action simultanément au cours de la biosynthèse des glycannes de l'orosomucoïde, de la fétuine, de la lactotransferrine, de la transferrine et de l'ovomucoïde est le suivant :

 β -N-acétyl-glucosaminyltransférase, β -mannosyltransférase, α -mannosyltransférase, α -mannosyltransférase, β -N-acétylglucosaminyl-transférase....(Fig. 44 ; p. 133)



Fig. 44.- Biosynthèse des séquences des monosaccharides des chaînes glycanniques au niveau des membranes du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Schéma de synthèse commun aux noyaux oligosaccharidiques des glycannes de la transferrine, de l'orosomucoîde et de la fétuine. GlcNAc-transf. : N-acétylglucosaminyl-transférase ; Man-transf. : mannosyl-transférase.



CONCLUSIONS GENERALES

L'absence de procédés d'endocoupures enzymatiques ou chimiques des chaînes glycanniques des glycoprotéines a orienté nos travaux, dans un premier temps, vers une étude méthodologique des procédés de coupures des liaisons glycosidiques. La standardisation des méthodes et la parfaite connaissance de leurs performances nous a permis d'effectuer, dans un deuxième temps, une étude comparée de la structure de ces glycannes afin d'envisager dans un programme à plus long terme, et qui dépasse le cadre de cette thèse, l'étude de leur mode de biosynthèse.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces investigations se résument de la façon suivante :

1° - Hydrolyse acide ménagée

Nous avons repris les anciens travaux réalisés de 1961 à 1964 par ADAM-CHOSSON. Le procédé consiste à hydrolyser les glycannes par une résine de polystyrène sulfoné. Les oligosaccharides isolés des hydrolysats de l'ovomucoïde par ADAM-CHOSSON et dont la structure n'avait pas été précisée à l'époque, ont été préparés en grande quantité et la structure de 15 d'entre eux a été précisée.

L'analyse de ces fragments oligosaccharidique nous permet en outre de préciser :

a - que l'hydrolyse acide ne réalise pas de coupures sélectives des liaisons glycosidiques, mais des coupures préférentielles au niveau des liaisons sialyl et fucosyl.

b - qu'une quantité importante de monosaccharides sont toujours libérés au détriment du rendement en oligosaccharides, cependant, une étude systématique des conditions de température et de temps d'hydrolyse nous a permis d'améliorer les rendements en oligosaccharides et de préciser que les conditions sont optimales lorsque la réaction se déroule à 87,5° pendant 1 h 30.

c - on ne peut cependant éviter la N-désacétylation partielle des N-acétylhexosamines, toutefois cette propriété a été mise à profit pour fractionner les hydrolysats en deux familles d'oligosaccharides. La première, non retenue par la résine, contient des oligosaccharides neutres, la seconde, retenue par la résine de polystyrène sulfoné, possède la caractéristique d'avoir un monosaccharide neutre en position réductrice terminale. Ce résultat s'explique, en effet, par la haute stabilité des liaisons hexosaminidyl due au proton protecteur provenant de l'ionisation du groupement α -aminé libéré au cours de l'hydrolyse ménagée.

2°) Acétolyse

Les conditions et les performances de l'acétolyse ont été bien définies, nous nous bornerons à les résumer de la manière suivante :

 a - Contrairement à l'hydrolyse acide ménagée, l'acétolyse libère des quantités très faibles de monosaccharides et une proportion élevée d'oligosaccharides.

 b - Elle respecte les groupements acétamido des
 N-acétylhexosamines et une partie importante des liaisons sialosyl et asparaginyl-N-acétylglucosaminides.

c - Elle ne provoque ni transglycosylation, ni N-acétylation de la chaîne peptidique.

d - Le fractionnement des acétolysats sur échangeurs d'ions donne 3 fractions. La première n'est pas retenue par les résines et contient les oligosaccharides neutres qui provien nent de la partie "centrale" des groupements glycanniques. La seconde, présente seulement dans les acétolysats des sialoglycopeptides, est déplacée de l'échangeur d'anions et contient des sialo-oligosaccharides qui appartiennent à la partie la plus externe des groupements glycanniques. La troisième, éluée de l'échangeur de cations, renferme des glycoprotides et corres pond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache.

e - Appliqué à l'exploration de la structure du glyco peptide β de l'ovomucoïde, 13 oligosaccharides ont été isolés de la fraction neutre et les structures ont été précisées.

f - L'acétolyse ne provoque pas de coupures hautement spécifiques, mais des coupures très préférentielles au niveau des liaisons glycosidiques des monosaccharides neutres.

3° - Hydrazinolyse-diazotation

L'étude des procédés d'hydrolyse ménagée et d'acétolyse des glycopeptides que nous avons réalisée montre que les coupures ne sont pas hautement spécifiques mais préférentielles. C'est pourquoi, nous avons repris un travail réalise en 1957 par MATSUSHIMA et FUJII sur les mucopolysaccharides acides. Les auteurs avaient démontré que la désamination nitreu se des hexosamines coupait spécifiquement et spontanément les liaisons hexosaminidyl préalablement N-désacétylées par l'hydrazine et transformait ces dernières en 2,5-anhydro-hexoses. Ce procédé séduisant dans son principe, était en fait imparfait car la N-désacétylation n'était que partielle. De ce fait, nous avons effectué, dans un premier temps, une étude cinétique de la N-désacétylation du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-α-D-glucoside afin de préciser les conditions optimales de la réaction. Dans un second temps, nous avons appliqué ce procédé à l'exploration de la structure des glycannes de la transferrine, de la lactotransferrine, de l'orosomucoïde et de l'ovomucoïde. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants

a - Le procédé d'hydrazinolyse-diazotation donne des coupures absolument spécifiques des liaisons N-acétylhexosaminidiques. De ce fait, les fragments libérés sont peu nombreux donc obtenus avec un très haut rendement.

b - L'hydrazinolyse, puis la diazotation étant qualitatives, les fragments obtenus le sont d'une manière reproductibl

c - Appliquée au glycanne β de l'ovomucoïde, la méthode a permis d'isoler et de préciser la structure de 3 oligosaccharides dont deux possèdent les structures suivantes :

> Man- α -(1-3) Man- β -(1-4)-2,5-anhydro-D-mannose Man- α -(1-6)

 $Gal-\beta-(1\rightarrow 4)-2, 5-anhydro-D-mannose$

et sont communs aux glycannes de la sérotransferrine, de la lacto transferrine, de l'orosomucoïde et de la fétuine. Le tétrasaccharide provient de l'enchaînement terminal qui serait commun à de nombreux glycannes :

GlcNAc \longrightarrow Man- α -(1 \longrightarrow 3) Man- β -(1 \longrightarrow 4)-GlcNAc-(1 \longrightarrow 4)-GlcNAc \longrightarrow As: GlcNAc \longrightarrow Man- α -(1 \longrightarrow 6)

L'ensemble de ces résultats nous permet de préciser que les "noyaux" de ces glycannes sont synthétisés par un même système multiglycosyltransférasique (système MGT de ROSEMAN), en outre, nous pouvons préciser :

a - que l'ordre d'activité de ces glycosyltransférases
 localisées sur les membranes du réticulum endoplasmique correspon à l'ordre d'enchaînement des monosaccharides dans les glycannes.

b - que la position relative des glycosyltransférases
responsables de l'élongation des glycannes de la transferrine,
de la lactotransferrine, de l'orosomucoïde, de l'ovomucoïde et de
la fétuine est la suivante :

- 1° β-N-acétylglucosaminyltransférase
- 2° β-Mannosyltransférase
- 3° _ α-Mannosyltransférase
- 4° α-Mannosyltransférase
- 5° β-N-acétylglucosaminyltransférase (1 à 4 ou 5)

6° - β-Galactosyltransférase etc...

c - Il est probable que d'autres glycoprotéines possèdent le même noyau oligosaccharidique commun, cependant, l'analyse des cartes chromatographiques des acétolysats des glycannes de la transferrine, de l'ovomucoïde montre qu'il existe néanmoins des différences structurales localisées dans la partie "externe" de la molécule.

Ces observations nous permettent de conclure que le noyau central commun à de nombreux glycannes ne possède pas de rôle fonctionnel propre mais qu'il contribue par son encombrement stérique à mettre en évidence et à rendre mieux accessible la partie "externe" spécifique et qui seule jouerait un rôle fonctionnel et serait biologiquement active. Le noyau ne serait donc que le banal support d'une structure externe spécifique, biologiquement active.

BIBLIOGRAPHIE^{*}

Classement par ordre des références

1. R.L. WHISTLER et D.F. DURSO, J. Amer. Chem. Soc., 72 (1950) 677 2. R.C.G. MOGGRIDGE et A. NEUBERGER, J. Chem. Soc., (1938) 745 3. J. MONTREUIL, Les glycoprotéides dans "Chimie et biochimie générale", M. JAVILLIER et al., MASSON éd. (1958) 935-1002 et "Problèmes actuels de biochimie générale", P. BOULANGER et J. POLONOSKI, MASSON éd., (1972) 174-269 4. A. ADAM-CHOSSON et J. MONTREUIL, Bull. Soc. Chim. Biol., 47 (1965) 1881 5. R.M. TOMARELLI, J.B. HASSINEN, E.R. ECKMART, R.M. CLARK et J.W. BERNHARDT, Arch. Biochem. Biophys., 48 (1954) 225 6. E.H. EYLAR et R.W. JEANLOZ, J. Biol. Chem., 237 (1962) 622 7. J. MONTREUIL, A. CHOSSON et G. SPIK, C.R. Acad. Sci., 255 (1962) 3493 8. R.G. SPIRO, J. Biol. Chem., 237 (1962) 646 9. T.J. PAINTER, W.M. WATKINS et W.T.J. MORGAN, Nature, 193 (1962) 1042 et 199 (1963) 282 10. A.S. DIXON, Biochem. J., 59 (1955) 21 et 60 (1955) 165 11. P.D. BRAGG et L. HOUGH, Biochem. J., 78 (1961) 11 12. T.J. PAINTER et W.T.J. MORGAN, Nature, 39 (1961) 191 13. V.T. REGE, T.J. PAINTER, W.M. WATKINS et W.T.J. MORGAN, Nature, 203 (1964) 360 14. J. MONTREUIL et A. CHOSSON, C.R. Acad. Sci., 255 (1962) 3071 15. J.K.N. JONES et W.H. NICHOLSON, J. Chem. Soc. (1958) 27 16. G. SPIK, G. STRECKER et J. MONTREUIL, Bull. Soc. Chim. Biol., 51 (1969) 1287 17. S. ROSEMAN et I. DAFFNER, Anal. Chem., 28 (1956) 1743 18. J. TILLMANS et K. PHILIPPI, Biochem. Z., 215 (1929) 36 19. C. RIMINGTON, Biochem. J., 25 (1931) 1062 20. J. MONTREUIL et G. SPIK, Microdosage des glucides, Monographie nº 1, Lille (1963) et Monographie nº 2, Lille (1968)

(*) Bibliographie selon l'ordre alphabétique des auteurs p. 144.

21. R. KUHN, H.M. BAER et A. GAUHE, Ber., 89 (1956) 2514 22. A. ADAM-CHOSSON, Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Lille (1964) 23. A. FRANCHIMONT, Ber., 12 (1879) 1941 24. Z.H. SKRAUP et J. KONIG, Ber., 34 (1901) 1115 25. C.C. SPENCER, Cellulosechemie, 10 (1929) 61 26. E.E. DICKEY et M.L. WOLFROM, J. Amer. Chem. Soc., 71 (1949) 825 27. M.L. WOLFROM et J.C. DACONS, J. Amer. Chem. Soc., 74 (1952) 533 28. M. BERGMAN, L. ZERVAS et S. SILBERKWEITE, Chem. Ber., 64 (1931) 2436 29. L. ZECHMEISTER, Ber., 56 (1923) 573 30. F. ZILLIKEN, G.A. BRAUN, C.S. ROSE et P. GYORGY, J. Amer. Chem. Soc., 77 (1955) 1296 31. R. KUHN et G. KRUGER, Chem. Ber., 96 (1963) 866 32. G.O. ASPINALL, R.B. RASHBROOK et G. KESSLER, J. Chem. Soc., 1 (1958) 21533. P.A.J. GORIN et A.S. PERLIN, Can. J. Chem., 34 (1956) 1796 34. Y.E. LEE et C.E. BALLOU, Biochem., 4 (1965) 257 35. S. PEAT, W.J. WHELAN et T.E. EDWARDS, J. Chem. Soc., 1 (1961) 29 36. Z. YOSIZAWA, Tohoku J. Exptl. Med., 51 (1949) 51 et 52 (1950) 11 37. H. MASAMUNE, H. SINOMARA et T. OKUYAMA, Tohoku J. Exptl. Med., 68 (1958) 165 38. H. MASAMUNE et H. SINOMARA, Tohoku J. Exptl. Med., 69 (1958) 59 39. R. KUHN et D. EKONG, Chem. Ber., 96 (1963) 683 40. K. MATSUDA, H. WATANABE, K. FUJIMOTO et K. ASO, Nature, 191 (1961) 278 41. R. KUHN et H. WIEGANDT, Chem. Ber., 96 (1963) 866 42. L. GRIMMONPREZ, S. BOUQUELET, B. BAYARD, G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Eur. J. Biochem., 13 (1970) 484 43. B. BAYARD, Thèse de Doctorat de 3e Cycle, Lille (1970) 44. H. MASAMUNE et Z. YOSIKAWA, Tohoku J. Exptl. Med., 64 (1956) 257 45. R.M. HANN et C.S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc., 56 (1934) 2465

46. K. FREUDENBERG et K. SOFF, Ber., 69 (1948) 1245 47. R. LEMIEUX, Advan. Carbohyd. Chem., 9 (1954) 1 48. J. JANSON et B. LINDBERG, Acta Chem. Scand., 14 (1960) 877 49. P. JERKEMAN, Acta Chem. Scand., 17 (1963) 2769 50. A. KUNZ et C.S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc., 48 (1926) 1978 51. R. KUHN et S. KIRSCHENLOHR, Chem. Ber., 87 (1954) 384 52. G. ZEMPLEN et A. KUNZ, Ber., 56 (1923) 1705 53. A.B. FOSTER et M. STACEY, J. Appl. Chem. (London), 3 (1953) 19 54. A.S. CEREZO et V. DEULOFEU, Carbohyd. Res., 2 (1966) 35 55. M. MONSIGNY, A. ADAM-CHOSSON et J. MONTREUIL, Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 857 56. E. FREDERICQ et H.F. DEUTSCH, J. Biol. Chem., 181 (1949) 499 57. T. BHATTI et J.R. CLAMP, Biochem. Biophys. Acta, 170 (1968) 206 58. E. BUDDECKE et E. WERRIES, Z. Naturforsch., 196 (1964) 798 59. J. BEAUGIRAUD, F. PERCHERON, J.E. COURTOIS et C. LANCHEC, Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 621 60. Y.T. LI, J. Biol. Chem., 241 (1966) 1010 61. S.C. LI et Y.T. LI, J. Biol. Chem., 245 (1970) 5133 62. J. MONTREUIL et N. SCHEPPLER, Bull. Soc. Chim. Biol., 41 (1959) 13 63. T.A. GOOD et S.P. BESSMAN, Anal. Biochem., 9 (1964) 253 64. W.E. TREVEYLYAN, D.P. PROCTER et J.S. HARRISSON, Nature, 444 (1950 166 65. B. FOURNET, G. TAKERKART, J. BROHON et J. MONTREUIL, Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 1351 66. R.C. HUGHES et R.W. JEANLOZ, Biochemistry, 3 (1964) 1535 67. S. AKABORI, K. OHNO et K. NARITA, Bull. Chem. Soc., (Japan), 25 (1952) 21468, Y. MATSUSHIMA et N. FUJII, Bull. Chem. Soc., (Japan), 30 (1957) 48 69. M.L. WOLFROM et B.O. JULIANO, J. Amer. Chem. Soc., 82 (1960) 2588 70. M. FUJINAGA et Y. MATSUSHIMA, Bull. Chem. Soc., (Japan), 37 (1964) 468

71. Z. YOSIZAWA et T. SATO, Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 591 72. Z. YOSIZAWA et T. SATO, J. Biochem., 51 (1962) 233 73. Z. YOSIZAWA, T. SATO et K. SCHMID, Clin. Chim. Acta, 23 (1966) 147 74. T. SATO, Z. YOSIZAWA, T. KOTOBU et M. MASUBUCHI, Biochem. Biophys. Res. Commun., 29 (1967) 387 75. T. SATO, Z. YOSIZAWA, M. MASUBUCHI et F. YAMAUCHI, Carbohyd. Res., 5 (1967) 387 76. E.D. KAVERZNEVA et T. DE-FAN, Biokhimya, 26 (1961) 782 et Biochemistry (USSR), 26 (1961) 675 77. S. ISEMURA et K. SCHMID, Biochem. J., 124 (1971) 591 78. E. BERA, A.B. FOSTER et M. STACEY, J. Chem. Soc., (1956) 4531 79. J. DEFAYE, Bull. Soc. Chim., (France) (1964) 999 80. Z. DISCHE and E. BORENFREUND, J. Biol. Chem., 184 (1950) 517 81. R. DEDONDER, Bull. Soc. Chim., (France), 19 (1952) 874 82. F.L. GREENE et P. MORRIS, Anal. Chem., 30 (1958) 1164 83. S. HASE et Y. MATSUSHIMA, J. Biochem., 66 (1969) 57 84. D. HORTON, K.D. PHILIPS et J. DEFAYE, Carbohyd. Res., 21 (1972) 417 85. S. HASE et Y. MATSUSHIMA, J. Biochem. (Japan), 72 (1972) 1117 et 66 (1969) 87 86. J.K.N. JONES, P. REID et J.R. TURYEY, Canadian J. Chem., 43 (1965 983 87. A.B. FOSTER, R. HARRISSON, T.D. INCH, M. STACEY et J.M. WEBBER, J. Chem. Soc., (1963) 2279 88. A.B. FOSTER, E.F. MARTLEW et M. STACEY, Chem. and Ind. (1953) 825 89. J.A. CIFONELLI, Carbohyd. Res., 8 (1968) 233 90. Z. YOSIZAWA, T. SATO et K. SCHMID, Biochim. Biophys. Acta, 121 (1966) 417 91. J.A. ROTHFUS et E.L. SMITH, J. Biol. Chem., 238 (1963) 1402 92. J.R. CLAMP, T. BHATTI et R.E. CHAMBERS, in "Glycoproteins, their structure and function, A. GOTTSCHALK, Elsevier éd., Amsterdam, (1972) 300 93. R. BELCHER, A.J. NUTTEN et C.M. SAMBROOK, Analyst., 79 (1964) 201 94. B. FOURNET, Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Sciences et Techniques de Lille (1973)

95. E. JAKUBCZAK et J. MONTREUIL, C.R. Acad. Sci. Paris, 271 D (1970) 537 96. A. NEUBERGER et R.D. MARSHALL, in "Symposium Foods : Carbohydrate and their roles", M.W. SCHULTZ, R.F. CAIN and R.W. WROLSTAD éds., Avi, Westport conn. (1969) 97. E.H. EYLAR, J. Theor. Biol., 10 (1966) 89 98. G.A. JAMIESON, M. JETT et S.L. De BERNARDO, J. Biol. Chem., 246 (1971) 3686 99. G. SPIK, Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Lille, Faculté des Sciences (1968) 100. V.B. HATCHER et R.W. JEANLOZ, Collection des Colloques Internationaux du C.N.R.S. (1973) sous presse 101. G. SPIK, R. VANDERSYPPE et J. MONTREUIL, Febs-Letters (sous press 102. P. CHARET, D. TETAERT, K.K. HAN et J. MONTREUIL, C.R. Acad. Sci., 276 D (1973) 1629 103, R.B. NIMBERG et T. MOTOYAMA, Fed. Proc., 30 (1971) 1224 104. R.B. NIMBERG, T. MOTOYAMA et K. SCHMID, J. Biol. Chem., 246 (1971) 5817 105. K. SCHMID, M. ISHIGURO, S. EMURA, S. ISEMURA, H. KAUFMANN et T. MOTOYAMA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 42 (1971) 280 106. S. ROSEMAN, Biochemistry of glycoproteins and related substances. Cystic Fibrosis II., A.G. KARGER éd., Basel (1968) 244

BIBLIOGRAPHIE

Classement des auteurs par ordre alphabétique

ADAM-CHOSSON A., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Lille (1964) (22 p. 10; 26; 67) ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 47 (1965) 188 (11 p. 9) AKOBORI S., OHNO K. et NARITA K., Bull. Chem. Soc., Japan, 25 (1952) 214 (67 p. 85) ASPINALL G.O., RASHBROOK R.B. et KESSLER G., J. Chem. Soc., 1 (1958) 215 (32 p. 32) BAYARD B., Thèse de Doctorat de 3e Cycle, Lille (1970) (43 p. 34 ; 38) BEAUGIRAUD J., PERCHERON F., COURTOIS J.E. et LANCHEC C., Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 621 (59 p. 61) BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst, 79 (1964) 201 (95 p. 102 ; 117) BERA E., FOSTER A.B. et STACEY M., J. Chem. Soc., (1956) 4531 (78 p. 87 BERGMAN M., ZERVAS L. et SILBERKWEITE S., Chem. Ber., 64 (1931) 2436 (28 p. 31) BHATTI T. et CLAMP J.R., Biochim. Biophys. Acta, 170 (1968) 206 (57 p. 5 BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem. J., 78 (1961) 11 (11 p. 9) BUDDECKE E. et WERRIES E., Z. Naturforsch., 196 (1964) 798 (58 p. 61) CEREZO A.S. et DEULOFEU V, Carbohyd. Res., 2 (1966) 35 (54 p. 46) CHARET P., TETAERT D., HAN K.K. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 276 D (1973) 1629 (102 p. 128; 129) CIFONELLI J.A., Carbohyd. Res., 8 (1968) 233 (89 p. 90) CLAMP J.R., BHATTI T. et CHAMBERS R.E., in "Glycoproteins, their struc-ture and function, GOTTSCHALK A. Elsevier éd., Amsterdam (1972) 300 (92 p. 100) DEFAYE J., Bull. Soc. Chim., France (1964) 999 (79 p. 87) DEDONDER R., Bull. Soc. Chim., France, 19 (1952) 874 (81 p. 87) DICKEY E.E. et WOLFROM M.L., J. Amer. Chem. Soc., 71 (1949) 825 (26p.31

DISCHE Z. et BORENFREUND E., J. Biol. Chem., 184 (1950) 517 (80 p. 87 DIXON A.S., Biochem. J., 59 (1955) 21 et 60 (1955) 165 (10 p. 9) EYLAR E.H., J. Theor. Biol., 10 (1966) 89 (97 p. 122) EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., J. Biol. Chem., 237 (1962) 622 (6 p. 9; 127) FOSTER A.B. et STACEY M., J. Appl. Chem., London, 3 (1953) 19 (53 p. 4 FOSTER A.B., HARRISON R., INCH T.D., STACEY M. et WEBBER J.M., J. Chem. Soc., (1963) 2279 (87 p. 89; 90) FOSTER A.B., MARTLEW E.F. et STACEY M., Chem. and Ind., (1953) 825 (88 p. 89; 90) FOURNET B., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Siences et Techniques de Lille (1973) (94 p. 120) FOURNET B., TAKERKART G., BROHON J. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 1351 (65 p. 10 ; 67 ; 127) FRANCHIMONT A., Ber., 12 (1879) 1941 (23 p. 29) FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 181 (1949) 499 (56 p. 57 FREUDENBERG K. et SOFF K., Ber., 69 (1948) 1245 (46 p. 35) FUJINAGA M. et MATSUSHIMA Y., Bull. Chem. Soc., Japan, 37 (1964) 468 (70 p, 85 ; 96) GOOD T.A. et BESSMAN S.P., Anal. Biochem., 9 (1964) 253 (63 p. 61) GORIN P.A.J. et PERLIN A.S., Can. J. Chem., 34 (1956) 1796 (33 p. 32 ; 33 ; 34) GREENE F.L. et MORRIS P., Anal. Chem., 30 (1958) 1164 (82 p. 87) GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., 13 (1970) 484 (42 p. 34; 38) HANN R.M. et HUDSON C.S., J. Amer. Chem. Soc., 56 (1934) 2465 (45 p. 35 S. et MATSUSHIMA Y., J. Biochem., 66 (1969) 57 et 72 (1972) 1117 HASE (85 p. 87) HATCHER V.B. et JEANLOZ R.W., Collection des Colloques Internationaux du C.N.R.S. (1973) sous presse (100 p. 123 ; 127) HORTON D., PHILIPS K.D. et DEFAYE J., Carbohyd. Res., 21 (1972) 417 (84 D. 87) HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry, 3 (1964) 1535 (66 p. 76) ISEMURA S. et SCHMID K., Biochem. J., 124 (1971) 531 (77 p. 85; 91) JAKUBCZAK E. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., Paris, 271 D (1970) 537 (95 p. 102 ; 117)

JAMIESON G.A., JETT M. et De BERNARDO S.L., J. Biol. Chem., 246 (1971) 3686 (98 p. 123)

KAVERZNEVA E.D. et DE-FAN T., Biokhimiya, 26 (1961) 782 et Biochemistr (USSR), 26 (1961) 675 (76 p. 85)

KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Ber., 89 (1956) 2514 (21 p. 17; 60) KUHN R. et KRUGER G., Chem. Ber., 96 (1963) 866 (31 p. 32) KUHN R. et EKONG D., Chem. Ber., 96 (1963) 683 (39 p. 32 ; 38) KUHN R. et KIRSCHENLOHR S., Chem. Ber., 87 (1954) 384 (51 p. 41) KUHN R. et WIEGANDT H., Chem. Ber., 96 (1963) 866 (41 p. 34 ; 38 ; 56) KUNZ A. et HUDSON C.S., J. Amer. Chem. Soc., 48 (1926) 1978 (50 p. 39) LEE Y.E. et BALLOU C.E., Biochem., 4 (1965) 257 (34 p. 32; 33; 34) LEMIEUX R., Advan. Carbohyd. Chem., 9 (1954) 1 (47 p. 35) LI Y.T., J. Biol. Chem., 241 (1966) 1010 (60 p. 61) LI S.C. et LI Y.T., J. Biol. Chem., 245 (1970) 5133 (61 p. 61) MASAMUNE H. et SINOMARA H., Tohoku J. Exptl. Med., 69 (1958) 59 (38 p. 32) MASAMUNE H., SINOMARA H. et OKUYAMA T., Tohoku J. Exptl. Med., 68 (1958) 165 (37 p. 32) MASAMUNE H. et YOSIKAWA Z., Tohoku J. Exptl. Med., 64 (1956) 257 (44 p. 35) MATSUSHIMA Y. et FUJII N., Bull. Chem. Soc., Japan, 30 (1957) 48 (68 p. 85; 86; 88; 93; 98) MATSUDA K., WATANABE H., FUJIMOTO K. et ASO K., Nature, 191 (1961) 278 (40 p, 33) MOGGRIDGE R.C.G. et NEUBERGER A., J. Chem. Soc. (1938) 745 (2 p. 7) MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 857 (55 p. 46) MONTREUIL J., Les glycoprotéines dans "Chimie et Biochimie Générale", M. JAVILLIER et al., MASSON éd. (1958) 935-1002 et "Problèmes actuels de biochimie générale", BOULANGER

P. et POLONOSKI J., MASSON éd. (1972) 174-269 (3 p. 7)

MONTREUIL J. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 255 (1962) 3071 (14 p. 10 MONTREUIL J., CHOSSON A. et SPIK G., C.R. Acad. Sci., 255 (1962) 3493 (7 p. 9; 127) MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bull. Soc. Chim. Biol., 41 (1959) 13 (62 p. 61) MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosages des glucides, Monographie nº 1 et nº 2, Lille (1963 et 1968) (20 p. 17 ; 39 ; 45 ; 5 76) NEUBERGER A. et MARSHALL R.D., in "Symposium Foods : Carbohydrates and their roles", SCHULTZ H.W., CAIN R.F. and WROLSTAD R.W. éds, Avi, Westport Conn., 1969 (96 p. 122) NIMBERG R.B. et MOTOYAMA T., Fed. Proc., 30 (1971) 1224 (103 p. 128; 131)NIMBERG R.B., MOTOYAMA T. et SCHMID K., J. Biol. Chem., 246 (1971) 5817 (104 p. 128) PAINTER T.J. et MORGAN W.T.J., Nature, 39 (1961) 191 (12 p. 9) PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.T., Nature, 193 (1962) 1042 et Nature, 199 (1963) 282 (9 p. 9) PEAT S., WHELAN W.J. et EDWARDS T.E., J. Chem. Soc., 1 (1961) 29 (35 p. 32 ; 33 ; 34) REGE V.T., PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J., Nature, 203 (1964) 360 (13 p. 9) RIMINGTON C., Biochem. J., 25 (1931) 1062 (19 p. 16) ROSEMAN S., Biochemistry of glycoproteins and related substances Cysti-Fibrosis II, KARGER A.G. éd., Basel (1968) 244 (106. p. 128) ROSEMAN S. et DAFFNER I., Anal. Chem., 28 (1956) 1743 (17 p. 12) ROTHFUS J.A. et SMITH E.L., J. Biol. Chem., 238 (1963) 1402 (91p. 90) SATO T., YOSIZAWA Z., MASUBUCHI M. et YAMAUCHI F., Carbohyd. Res., 5 (1967) 387 (75 p. 85) SATO T., YOSIZAWA Z., KOTOBU T. et MASUBUCHI H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 29 (1967) 642 (74 p. 85 ; 90) SCHMID K., ISHIGURO M., EMURA S., ISEMURA S., KAUFMANN H. et MOTOYAMA T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 42 (1971) 280 (105 p. 128; 131) SKRAUP Z.H. et KONIG J., Ber., 34 (1901) 1115 (24 p. 31) SPENCER C.C., Cellulosechemie, 10 (1929) 61 (25 p. 31) SPIK G., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Sciences et Techniques de Lille (1968) (99 p. 123) SPIK G. et MONTREUIL J., Microdosage des glucides, Monographie nº 1 (Lille 1963), Monographie n° 2 (Lille 1968) (20 p. 17; 39; 45; 58; 76) SPIK G., STRECKER G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 51 (1969) 1287 (16 p. 10)

SPIK G., VANDERSYPPE R. et MONTREUIL J., Febs-Letters, (sous presse) (10 p. 128 ; 129) SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 237 (1962) 646 (8 p. 9; 127) TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 215 (1929) 36 (18 p. 16) TOMARELLI R.M., HASSINEN J.B., ECKHARDT E.R., CLARK R.H. et BERNHARDT J.W., Arch. Biochem. Biophys., 48 (1954) 225 (5 p. 9 TREVEYLYAN W.E., PROCTER D.P. et HARRISSON J.S., Nature, 444 (1950) 166 (64 p. 62) WHISLER R.L. et DURSO D.F., J. Amer. Chem. Soc., 72 (1950) 677 (1 p. 6 12)WOLFROM M.L. et DACONS J.C., J. Amer. Chem. Soc., 74 (1952) 533 (27 p. 31 ; 33) WOLFROM M.L. et JULIANO B.D., J. Amer. Chem. Soc., 82 (1960) 2588 (69 p. 88) YOSIZAWA Z. et SATO T., Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 591 (71 p. 8! 88) YOSIZAWA Z. et SATO T., J. Biochem., 51 (1962) 233 (72 p. 85; 88) YOSIZAWA Z., SATO T. et SCHMID K., Clin. Chim. Acta, 23 (1966) 147 (73 p. 85) YOSIZAWA Z., SATO T. et SCHMID K., Biochim. Biophys. Acta, 121 (1966) 417 (90 p. 90) ZECHMEISTER L., Ber., 56 (1923) 573 (29 p. 31) ZEMPLEN G. et KUNZ A., Ber., 56 (1923) 1705 (52 p. 41) ZILLIKEN F., BRAUN G.A., ROSE C.S. et GYORGY P., J. Amer. Chem. Soc., 77 (1955) 1296 (30 p. 32)

APPENDICE TECHNIQUE

Nous ne décrirons en détail que les techniques non courantes que nous avons personnellement appliquées.

La bibliographie, la table des matières et la numérotation des tableaux et des figures de l'appendice technique sont indépendantes de la première partie du mémoire

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

	Pages
1. MATERIEL	150
I - OVOMUCOIDE ET DERIVES	150
A - L'OVOMUCOIDE	151
B - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES	152
II - L'OROSOMUCOIDE	155
III - LA TRANSFERRINE	158
IV - LA LACTOTRANSFERRINE	158
2. PURIFICATION ET PREPARATIONS DES SOLVANTS	160
1° Préparation du méthanol anhydre	160
2° Préparation du méthanolate de sodium	160

1. MATERIEL

I - OVOMUCOIDE ET DERIVES

Nous pouvons distinguer deux groupes fondamentaux de glycannes. Les uns, de composition simple, sont constitués d'un ou de deux monosaccharides seulement. Dans ce cas, les monosaccharides peuvent être associés en unités diholosidiques liées directement à la chaîne polypeptidique (mucines sous-maxillaires par exemple) ou unis les uns aux autres en longues chaînes polysaccharidiques linéaires non ramifiées (mucopolysaccharides acides de la substance fondamentale, par exemple). Nous les appelons *n-glycannes*. Les autres, de composition plus complexe, renferment de nombreux types de monosaccharides associés en molécules ramifiées : ce sont des *iso-glycannes*.

Seule, cette dernière classe de composés a fait l'objet de notre étude, il s'agit en particulier des iso-glycannes de l'ovomucoîde, glycoprotéine du blanc d'oeuf de Poule. Les raisons qui nous ont guidé dans le choix de cette glycoprotéine sont de deux ordres : la première est que cette glycoprotéine du blanc d'oeuf présente des caractéristiques physico-chimiques voisines de celles de la transferrine, de l'orosomucoïde, de la lactotransferrine et des globulines immunes. la deuxième est que cette glycoprotéine se prépare facilement en quantités élevées et qu'elle représente donc un excellent substrat pour mettre au point les techniques dont l'application est ensuite étendue à d'autres substances et, en particulier, aux composés précédemment cités.

Sans énoncer la totalité des connaissances acquises à son sujet, nous exposerons dans un bref historique les données essentielles qui ont motivé nos recherches.

A - L'OVOMUCOIDE

L'ovomucoide du blanc d'oeuf de Poule est connu pour ses diverses activités inhibitrices d'enzymes protéolytiques. Les interactions glycoprotéines-protéines ont longtemps constitué l'intérêt essentiel de cette molécule qui fut découverte dès 1894 par MÖRNER (1). Les difficultés de purifications de la molécule, dues essentiellement au manque de méthodes, ralentissent sérieusement les travaux et c'est en 1947 que LINEWEAVER et MURRAY (2) isolent l'ovomucoïde et découvrent son rôle biologique. Les méthodes d'isolement sont ultérieurement améliorées par FREDERICQ et DEUTSCH en 1949 (3) puis RHODES et al. en 1958 (4) ; JEVONS en 1960 (5) ; CHATTERJEE et MONGOMERY en 1962 (6); FEENEY et al. en 1963 et 1967 (7, 8); DAVIS et al. en 1971 (9); BEELEY en 1971 (10). Dès 1960, RHODES et al. (11) démontrent, en utilisant la chromatographie sur colonne de cellulose modifiée (C-M- cellulose et DEAE-cellulose), qu'il n'existe pas moins de 11 différentes espèces de glycoprotéines dont la microhétérogénéité semble essentiellement due à la partie glycannique. Ces travaux sont repris par JAKUBCZAK et MONTREUIL (12) qui isolent deux asialoglycoprotéines appelées 1 et 2 ainsi que 5 sialoglycoprotéines appelées 3, 4, 5, 6 et 7 (Fig. 1)

Les variants glycoprotéiniques possèdent un poids moléculaire identique, voisin de 28 000, et sont constitués d'une seule chaîne peptidique en hélice α (WHITAKER (13)) dont la composition en amino-acides est commune à l'ensemble des molécules BEELEY (14) et JAKUBCZAK (15). La microhétérogénéité qui caractérise cette famille de glycoprotéines est due, en particulier, à la variation du nombre des résidus d'acide N-acétylneuraminique portés par les extrémités glycanniques. En effet, la désialylation de l'ovomucoïde par les neuraminidases ne laisse plus apparaître que deux bandes (les ovomucoïdes 1 et 2) en électrophorèse.



Fig. 1.- Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'ovomucoide (M) dans le tampon acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45 ; tension de 11 V/cm, durée 3 h 30. Révélation avec le réactif à l'Amido-Schwarz. Les chiffres de 1 à 7 correspondent aux fractions obtenues par chromatographie sur celluloses modifiées de l'ovomucoïde pur (JAKUBCZAK et MONTREUIL (12)).

B - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

La préparation et l'isolement de ces sialoet asialoglycopeptides des ovomucoïdes 1 à 7 sont réalisés en appliquant le procédé de YAMASHINA et MAKINO (16) modifié par MONSIGNY *et al.* (17). Nous obtenons, après une hydrolyse pronasique. des ovomucoïdes 1 à 7, les sialoglycopeptides α qui proviennent des ovomucoïdes 3 à 7 et les asialoglycopeptide β qui proviennent des ovomucoïdes 1 et 2.

1° - Hydrolyse pronasique

A une solution de 10 g d'ovomucoïde dans 1 litre d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 200 mg de pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 37° C, sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par addition de soude 0,1 N, contrôlé par un titrateur automatique (pH-stat Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysat est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu pendant deux heures à la température du laboratoire puis à 2° C pendant 18 h. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M puis soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole expérimental est répété deux fois, à la différence près que le précipité obtenu à partir du 3ème hydrolysat est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

2° - Isolement des glycopeptides

La fraction contenant les glycopeptides est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g p. 100 ml.

Le précipité formé est éliminé par centrifugation après un repos de 18 h à 2° C. La solution surnageante est purifiée par un passage successif sur des colonnes (2 x 35 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50 ; H^+), puis d'anions (Duolite A-102 D ; "mesh" 25-50 ; HCO_2). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage des colonnes, est concentré à 20 ml dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par addition de 10 volumes d'éthanol absolu. Cette fraction glycopeptidique (400 mg) est ensuite débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus sur l'échangeur d'ions par une chromatographie sur colonne (2 x 3,5 cm) de gel de Séphadex G-25. La fraction Séphadex (350 mg) est soumise à la chromatographie sur colonne (2 x 40 cm) de Dowex 50 X 2 ("mesh" 200-400 ; H⁺) ; l'élution de la colonne par 1 l d'eau distillée fournit une première fraction appelées fraction glycopeptidique a et qui contient le sialoglycopeptide a, tandis que le déplacement des autres glycopeptides fixés sur la colonne est ensuite réalisé, à pH 3,0, à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine (système de deux réservoirs contenant : le premier 8 ml de pyridine, 12,5 ml d'acide formique et 479,5 ml d'eau distillée ; le second, 160 ml de pyridine, 250 ml d'acide formique et 90 ml d'eau distillée). On obtient de cette manière les fractions β et γ (Fig. 2). La fraction β contient l'asialoglycopeptide & qui constitue notre matériel d'étude.



Fig. 2.- Diagramme de fractionnement des glycopeptides de l'ovomucoide (350 mg) préalablement purifiés par chromatographie sur Séphadex G-25 et sur colonne de Dowex 50 X 2 ("mesh" 200-400 ; forme acide) selon MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (17). Repérage des composés glycopeptidiques par le phénol sulfurique. En ordonnée : D.O. : densité optique ; C : concentration en formiate de pyridine ; en abscisse : volume d'élution.

3° - Composition centésimale et molaire des glycopepti.

des

La composition centésimale en glucides des glycopeptides β et α a été déterminée par MONSIGNY *et al.* (17). Les compositions molaires en monosaccharides neutres, N-acétylhexosamines et acides sialiques ont été déterminées en appliquant les méthodes de dosages colorimétriques et chromatographiques résumés dans les monographies n° 1 et n° 2 du laboratoire (MONTREUIL et SPIK (18)).

Les résultats concernant la composition centésimale et molaire en glucides des glycopeptides α et β obtenus à partir des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde sont rassemblés dans les tableaux I et II.

4° - Perméthylation du glycopeptide β de l'ovomucoïde

La perméthylation du glycopeptide ß de l'ovomucoïde est réalisée selon le procédé de HAKOMORI (19) modifié par FOURNET (20). Les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques des monosaccharides neutres et des méthyl-osamines effectuées par FOURNET se résument de la manière suivante : cet auteur caractérise le 2,3,4,6-Tétra-Ométhyl-mannose, le 2,3,4,6-Tétra-O-méthyl-galactose, le 3,4,6-Tri-O-méthyl-mannose et les 3,4-, 2,4- et 3,6-Di-O-méthyl-Dmannoses dans les rapports de surface suivants : 0,55 - 1,1 -0,5 - 0,9 et 1,22 respectivement. Quant aux osamines, l'auteur identifie les 3,4,6-Tri-O-méthyl et 3,6-Di-O-méthyl-glucosamines dans les rapports de surface suivants : 1 - 0,76.

II - L'OROSOMUCOIDE : Préparation (*)

L'orosomucoide ou glycoprotéine acide a du sérum humain se trouve essentiellement localisée dans le sang à la concentration de 0,2 - 0,4 g par litre. Elle est préparée

 ^(*) Les préparations des échantillons d'orosomucoîde ont été fournies par B. FOURNET que nous remercions vivement.

Tableau I

Composition centésimale en glucides des glycopeptides α , β et γ isolés des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde

Composition centésimale	Ovomucoide natif	Glyc a	opepti ß	des Y
Monosaccharides neutres	8,50	37,5	31,1	22,9
N-acétylglucosamine	11,1	52,2	64,6	49,0
Acide N-acétylneuramini- que	0,90	11,47	0	0



Tableau II

Composition molaire en glucides et en amino-acides des glycopeptides α , β et γ

	Glycopeptides			
	α	β	γ	
Composition molaire en monosaccharides				
D-Galactose	1	1	1	
D-Mannose	3	5	5	
N-acétyl-D-glucosamine	Ц.	10	10	
Acide N-acétylneuraminique	1	Q	0	
Composition molaire en amino-acides				
Acide aspartique	1,14	1,15	1,4	
Thréonine	0,66	0,85	0,6	
Sérine	0,29	0	0	
Cystéine	0	0	1,4	
Masse moléculaire (calculée d'après la composition molaire)	1958	3220	3543	



par un procédé de relargage au sulfate d'ammonium qui permet d'isoler une fraction nettement enrichie en cette glycoprotéine qui ne précipite qu'à saturation (FOURNET (20)). Ce précipité, enrichi en orosomucoïde (précipité P₅), est purifié par chromatographie sur résine carboxylique de type XE 64 (Amberlite IRC 50) selon le procédé de SCHMID *et al.* (21). La glycoprotéine obtenue est homogène en électrophorèse, en immuno-électrophorèse et en ultracentrifugation. La composition centésimale en glucides est la suivante : 14,5 p. 100 de monosaccharides neutres, 10,5 p. 100 d'osamines et 10,8 p. 100 d'acides sialiques. La fraction glycannique est constituée de galactose, de mannose, de fucose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique

III - LA TRANSFERRINE

La *transferrine* constitue la glycoprotéine de transport du fer à travers tout l'organisme. Elle se trouve essentiellement localisée dans le sang à la concentration de 2 g p. litre environ, on la rencontre également dans de nombreux liquides biologiques comme les urines, le liquide céphalorachidien, la bile, la salive, la lymphe.

Les études de structure ont été effectuées sur des échantillons de transferrine commercialisés par la firme BERHINGWERKE. La masse moléculaire de cette glycoprotéine oscille, selon les auteurs, entre 69 000 et 90 000. La composition centésimale en glucides est la suivante : 2,3 p. 100 de monosaccharides neutres, 1,98 p. 100 d'hexosamines et 1,43 p. 100 d'acides sialiques (SPIK (22)). Elle possède deux chaînes glycanniques constituées de galactose, de mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 5 – 5 - 8 - 3 ou 4.

IV - LA LACTOTRANSFERRINE

La *lactotransferrine* (*), glycoprotéine associée au fer, est isolée du lait de Femme. Le lait délipidé est

(*) La lactotransferrine nous a été aimablement donnée par
 G. SPIK que nous remercions vivement.

soumis à un fractionnement préalable associant un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH. La fraction obtenue par précipitation à saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7 est soumise à la chromatographie sur CMcellulose.

La composition centésimale en glucides est la suivante : 3,3 p. 100 de monosaccharides neutres, 2,4 p. 100 d'hexosamines et 1,2 p. 100 d'acides sialiques (SPIK (22)). Elle possède deux chaînes glycanniques par mole de glycoprotéine (PM 76 000) constituées de galactose, de mannose, de fucose et de N-acétylglucosamine dans les proportions qui restent à définir. 2. PURIFICATION ET PREPARATION DES SOLVANTS

1º - Préparation du méthanol anhydre

Le méthanol employé dans les réactions de méthanolyse, de méthylglycosilation ou de O-désacétylation est déshydraté de la manière suivante : 1 l de méthanol est chauffé à reflux, pendant 4 h, en présence de 50 g de tournures de magnésium, puis distillé à 64,5° C en atmosphère anhydre et conservé dans les flacons bien bouchés.

2° - Préparation du méthanolate de sodium

Le méthanolate de sodium utilisé dans les réactions de O-désacétylation est préparé de façon extemporanée en dissolvant des copaux de sodium (0,5 g) dans du méthanol anhydre (100 ml).

3° - Préparation de l'hydrazine

L'hydrate d'hydrazine commercial est, à température ordinaire, un liquide que l'on peut conserver sans précautions particulières. On le déshydrate par un traitement à la chaux vive de la manière suivante :

50 g d'hydrate d'hydrazine sont ajoutés à une suspension de 500 g d'oxyde de calcium dans 500 ml de toluène pur. Le mélange est agité, puis abandonné pendant 18 h à 20° C. Après une ébullition à reflux pendant 3 h, l'azéotrope toluènehydrazine est distillé. La fraction, passant entre 90 et 95° C, est recueillie. Après refroidissement, le distillat se sépare en deux phases : la phase inférieure, constituée par l'hydrazine anhydre, est recueillie par décantation. L'hydrazine anhydre est conservée à température du laboratoire, à l'abri de la lumière, dans des flacons de verre pyrex.

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

BEELEY J.G., Biochim. Biophys. Acta, 230 (1971) 595 (10)

- BEELEY J.G. et Mc CAIRNS E., Abstract 9e Intern. Congrès of Biochem. Stockholm (1973) (14)
- CHATTERJEE A.K. et MONTGOMERY R., Arch. Biochem. Biophys., 99 (1962) 426 (6)
- DAVIS J.G., MAPES C.J. et DONOVAN J.W., Biochem., 10 (1971) 39 (9)
- FEENEY R.E., OSUGA D.T. et MAEDA H., Arch. Biochem. Biophys., 119 (1967) 124 (8)
- FEENEY R.E., STEVENS F.C. et OSUGA D.T., J. Biol. Chem., 238 (1963) 1415 (7)
- FOURNET B., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Sciences et Techniques, Lille (1973) (20)

FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 181 (1949) 499 (3)

HAKOMORI S.I., J. Biochem. (Tokyo), 55 (1964) 205 (19)

JAKUBCZAK E., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Sciences et Techniques, Lille (1972) (15)

JAKUBCZAK E. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci. (Paris), 271 D (1970) 537 (12)

JEVONS F.R., Biochem. Biophys. Acta, 45 (1960) 384 (5)

LINEWEAVER H. et MURRAY C.W., J. Biol. Chem., 171 (1947) 565 (2)

MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosages des glucides, Lille, Monographie nº 1 (1963) et nº 2 (1968) (18) MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 857 (17)

MORNER C.T., Z. Physiol. Chem., 18 (1894) 525 (1)

- RHODES M.B., BENNETT N. et FEENEY R.E., J. Biol. Chem., 235 (1960) 1686 (11)
- RHODES M.B., AZARI P.R. et FEENEY R.E., J. Biol. Chem., 230 (1958) 399 (4)
- SCHMID K., Mac NAIR M.B. et BURGI A.F., J. Biol. Chem., 230 (1958) 853 (21)
- SPIK G., Thèse de Doctorat ès Sciences, Université des Sciences et Techniques, Lille (1968) (22)
- YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem., 51 (1962) 359 (16)

WHITAKER J.R., Anal. Chem., 35 (1963) 1950 (13)

