

50376
1984
107

50376
1984
107

N° d'ordre : 623

THÈSE

présentée à

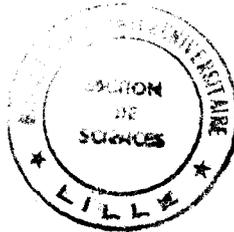
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

José PAZ PARENTE



STRUCTURE PRIMAIRE DE GLYCANNES ISOLÉS DE L'OVOMUCOÏDE DU BLANC D'OEUF DE POULE

Présentée le 18 Juin 1984 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	H. EGGE
Rapporteur :	B. FOURNET
Rapporteur :	M. MONSIGNY
Examineur :	P. ROUSSEL
Examineur :	G. STRECKER

Nos travaux de recherche ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des constituants membranaires) grâce à une bourse du "Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico do Brasil-CNPq". Ils ont été dirigés dans leur ensemble par les Professeurs Bernard FOURNET et Jean MONTREUIL (Directeur du Laboratoire).

A minha mãe

A meu pai

A minha esposa

A meus filhos

A meus irmãos

A todos os meus

em testemunha de minha afeição

A Monsieur le Professeur B. FOURNET,

Sans qui cette thèse n'existerait pas.

J'ai toujours trouvé auprès de vous une très large compréhension jointe à un sens très aigu des réalités ainsi qu'une bienveillante amitié. Vous m'avez accueilli avec gentillesse dans votre équipe et guidé tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de votre expérience et de votre compétence scientifique. Votre rigueur scientifique a toujours été pour moi un exemple.

Je ne saurais oublier tout ce que je vous dois et je profite de l'aboutissement de ce travail pour vous exprimer ma sincère reconnaissance et ma profonde amitié.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Vous m'avez accepté dans votre Laboratoire au sein d'une équipe dynamique à qui vous avez toujours communiqué votre enthousiasme et votre haute compétence scientifique. Je vous remercie d'avoir bien voulu m'accorder votre confiance en me donnant le soin de réaliser des travaux que vous aviez vous-même déjà bien engagés sur la voie de la réussite.

Qu'il me soit permis de vous témoigner toute ma gratitude et ma sincère amitié.

A Monsieur le Professeur H. EGGE,

Je vous remercie vivement ainsi que tout votre groupe pour l'efficacité et la compétence scientifique avec lesquelles vous avez réalisé les analyses de spectrométrie de masse ("fast atom bombardement").

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur M. MONSIGNY,

Sachant l'intérêt que vous portez à ce sujet, je suis très honoré de votre présence parmi les Membres de mon Jury en tant que rapporteur et je vous en remercie vivement.

A Monsieur G. STRECKER, Maître de Recherche au C.N.R.S.,

Je sais l'intérêt et la contribution que vous avez portés à ce travail et souvent j'ai pu apprécier votre simplicité et votre compétence scientifique. Je suis heureux et honoré que vous ayez accepté de juger cette thèse.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Ph. ROUSSEL,

Je suis honoré de votre présence dans ce Jury et je voudrais vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'intérêt que vous voulez bien porter à ce travail.

A Monsieur le Professeur Walter B. MORS,

Je profite de l'occasion qui m'est donnée pour vous remercier bien vivement de m'avoir guidé et conseillé pendant mes premières années de recherche. Durant celles-ci, vous m'avez appris à goûter aux joies d'un travail d'équipe. Je regrette que vous soyez absent de ce Jury.

Permettez-moi de vous exprimer ma plus vive reconnaissance et mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également à

Messieurs Guy RICART
Herman van HALBEEK
Jasna PETER-KATALINIĆ
Jean-Michel WIERUSZESKI
Johannes F.G. VLIEGENTHART
Lambertus DORLAND
Pascal CARDON

pour leur collaboration dans l'ensemble de ce travail ;

Yves LEROY pour sa précieuse collaboration et pour sa constante amitié ;

Myriam CONIEZ qui a effectué la préparation des glycopeptides β de l'ovomucoïde de Poule ;

Philippe DEBEIRE et Henri DEBRAY pour m'avoir initié à la recherche sur les glycoprotéines,

Brigitte MAHIEU qui a participé à la réalisation de ce travail en effectuant avec compétence la frappe et la mise en page de ce mémoire ainsi que Madame Jocelyne CELEN pour sa précieuse collaboration. Qu'elles soient assurées de ma reconnaissance et de mon amitié.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à l'Equipe du Laboratoire 107 pour l'ambiance chaleureuse qui y règne.

A tous ceux qui m'ont accordé leur collaboration, leur aide et leur amitié.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL JACQUES	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux

M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie inorganique
Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

ABRÉVIATIONS

Ala : L-Alanine
Arg : L-Arginine
Asp : Acide L-aspartique
Asx : L-Asparagine ou acide L-aspartique
C.I. : "Chemical Ionization"
Cys : L-Cystéine
E.I. : "Electronic Impact"
F.A.B. : "Fast Atom Bombardment"
Gal : D-Galactose
G.L.C. : "Gas Liquid Chromatography"
GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
Glu : Acide L-glutamique
Glx : L-Glutamine ou acide L-glutamique
Gly : L-Glycine
His : L-Histidine
¹H-NMR : "Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance"
HPLC : "High-Performance Liquid Chromatography"
Ile : L-Isoleucine
Leu : L-leucine
Lys : L-Lysine
Man : D-Mannose
Met : L-Methionine
M.S. : "Mass spectrometry"
NeuAc : Acide N-acétylneuraminique
Phe : L-Phénylalanine
Pro : L-Proline
Ser : L-Serine
Thr : L-Thréonine
Tyr : L-Tyrosine
Val : L-Valine

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

p. 6

I. HISTOIRE DE LA DÉCOUVERTE DE L'OVOMUCOÏDE

p. 7

II. MÉTHODES DE PRÉPARATION

p. 9

A - DENATURATION PAR LA CHALEUR

p. 9

1) Méthode de NEUMEISTER

p. 9

2) Procédés de MÖRNER

p. 9

a) Premier procédé

p. 9

b) Deuxième procédé

p. 10

3) Procédé de WERNER et ODIN

p. 10

4) Procédé de LONGSWORTH et coll.

p. 10

B - DENATURATION PAR L'ACIDE TRICHLOROACETIQUE

p. 10

1) Méthode de LINEWEAVER et MURRAY

p. 10

2) Méthode de FREDERICQ et DEUTSCH

p. 11

C - DENATURATION PAR L'ACETONE

p. 11

Méthode de MEYER

p. 11

D - DENATURATION PAR L'ETHANOL

p. 11

Méthode de FORSYTHE et FOSTER

E - DENATURATION PAR LE PHENOL

p. 11

Méthode de MONTREUIL et coll.

p. 11

III. MÉTHODES DE PURIFICATION DE L'OVOMUCOÏDE	p. 12
A - <u>LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	p. 12
B - <u>HETEROGENEITE DE L'OVOMUCOÏDE</u>	p. 13
IV. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE L'OVOMUCOÏDE	p. 16
A - <u>SOLUBILITE</u>	p. 16
B - <u>ULTRACENTRIFUGATION, CONSTANTE DE SEDIMENTATION ET MASSE MOLECULAIRE</u>	p. 16
C - <u>CONSTANTE DE DIFFUSION</u>	p. 18
D - <u>VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL</u>	p. 18
E - <u>POINT ISOELECTRIQUE</u>	p. 18
F - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	p. 20
G - <u>RAPPORT AXIAL ET COEFFICIENT DE FRICTION</u>	p. 20
H - <u>CONFORMATION DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE</u>	p. 20
V. COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET STRUCTURE DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE D'OVOMUCOÏDE DE POULE	p. 25
VI. LE POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTÉINE DANS L'OVOMUCOÏDE DE POULE	p. 31
VII. COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA FRACTION GLUCIDIQUE DE L'OVOMUCOÏDE	p. 39
A - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES DE L'OVOMUCOÏDE</u>	p. 39

B - <u>STRUCTURE DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE L'OVOMUCOÏDE</u>	p. 47
VIII. L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE	p. 66
IX. CONCLUSIONS	p. 77
TRAVAUX PERSONNELS	p. 79
INTRODUCTION	p. 80
ARTICLE 1	p. 82
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR HYDRAZINOLYSE DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE	p. 82
ARTICLE 2	p. 89
DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE STRUCTURE GLYCANNIQUE PRESENTE DANS L'OVOMUCOÏDE DE POULE	p. 89
ARTICLE 3	p. 94
APPLICATION DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON A 500 MHz A L'ETUDE DE NOUVELLES STRUCTURES GLYCANNIQUES DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE	p. 94
ARTICLE 4	p. 103
ANALYSE D'OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE PAR FAB-MS et EI-MS	p. 103

ARTICLE 5

p. 110

FRACTIONNEMENT DE SIALYLOLIGOSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
HAUTE PRESSION. APPLICATION AUX FRACTIONS ACIDES DE L'OVOMUCOÏDE DE
POULE

p. 110

RESULTATS NON PUBLIES

p. 120

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES SUR LA STRUCTURE DES GLYCANNES
SIALYLÉS DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

p. 121

I - ETUDE GLOBALE DES FRACTIONS MONO-(FII), DI-(FIII + IV) ET
TRI-(FV + VI) SIALYLEES DE L'OVOMUCOÏDE

p. 121

II - ETUDE DE LA FRACTION MONOSIALYLEE (FII) DE L'OVOMUCOÏDE DE
POULE

p. 121

III - ETUDE D'UNE FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE CARACTERISEE PAR UNE
RICHESSSE EXCEPTIONNELLE EN ACIDE SIALIQUE

p. 127

IV - CONCLUSIONS DE L'ETUDE DES STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES
SIALYLES

p. 130

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

p. 131

APPENDICE TECHNIQUE

p. 136

I - PRÉPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA MÉTHODE DE
FREDERICQ ET DEUTSCH

p. 137

II - HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'OVOMUCOÏDE SELON LE
PROCÉDÉ DE MONSIGNY

p. 137

- III - PRÉPARATION DES GLYCANNES D'OVOMUCOÏDE PAR
HYDRAZINOLYSE, N-RÉACÉTYLATION ET RÉDUCTION p. 141
- IV - IDENTIFICATION ET COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHA-
RIDES p. 145
- V - PRÉPARATION DE DIMETHYL SULFINYL POTASSIUM p. 145
- VI - MICRO-MÉTHYLATION ET ANALYSE DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES p. 146
- VII - A CONVENIENT METHOD FOR METHYLATION OF GLYCOPROTEIN
GLYCANS IN SMALL AMOUNT USING LITHIUM METHYLSULFINYL
CARBANION p. 148
- VIII - APPLICATION DE LA MÉTHODE DE VALENT ET AL. PAR
WIERUSZESKI À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE L'OLIGO-
SACCHARIDE-ALDITOL FRACTION 11 LIBÉRÉ PAR
HYDRAZINOLYSE DU GLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOÏDE p. 162

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Pendant très longtemps la connaissance de la structure des glycanes des glycoprotéines se limitait à quelques enchaînements oligosaccharidiques simples, comme dans le cas des mucines sous-maxillaires, ou à des glycanes constitués d'unités de répétition comme dans les mucopolysaccharides acides. L'ignorance concernant ces molécules était due au fait, d'une part, que ces glycoprotéines ont été longtemps considérées comme secondaires et, d'autre part, que les chercheurs ne disposaient pas de méthodes analytiques fines pour aborder l'étude de ces structures glycaniques complexes et souvent obtenues en faible quantité. Depuis ces dix dernières années, les glycoprotéines suscitent de la part de nombreux chercheurs une curiosité et un intérêt grandissant au fur et à mesure que se dessine leur rôle biologique. C'est ainsi que des glycoconjugués disposés à la surface des membranes cellulaires constituent des antigènes dont les structures et les fonctions sont modifiées dans les cellules transformées par les virus ou dans les cellules cancéreuses. Ces mêmes glycoconjugués jouent également un rôle dans les phénomènes de reconnaissance et d'association cellulaires. Ils constituent en outre des sites récepteurs pour les virus, les hormones. La fraction glucidique des glycoprotéines protège ces dernières de l'attaque des enzymes protéolytiques. Elle peut aussi influencer la conformation de la chaîne polypeptidique. Pour certains auteurs, le glycanne représente le "passeport de sortie" des glycoprotéines de la cellule. Enfin, le glycanne contrôle la durée de vie et régule le catabolisme des protéines circulantes par différents tissus.

On voit donc que la connaissance de la structure des chaînes glucidiques des glycoprotéines ainsi que leur conformation est indispensable pour comprendre leur mode d'action et également les mécanismes qui président à leur biosynthèse.

A ce point de vue, l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule a toujours constitué, pour notre Laboratoire, un matériel de choix pour l'étude des propriétés physico-chimiques et de la structure des glycoprotéides. En effet, sa préparation relativement facile et rapide conduit à

des rendements élevés. Sa concentration non négligeable en glucides permet d'obtenir des quantités importantes de glycanes.

C'est pour toutes ces raisons que le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lille a utilisé et utilise encore l'ovomucoïde comme substrat pour la mise au point de procédés d'étude de la structure des chaînes glucidiques des glycoprotéines : hydrolyse acide partielle, acétolyse, hydrazinolyse-diazotation, oxydation periodique, perméthylation associée à la spectrométrie de masse, hydrolyse par les exoglycosidases et les endoglycosidases. A cet aspect très méthodologique de la structure des glycanes des glycoprotéines, et en particulier de ceux de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule, s'est ajouté, au fur et à mesure de l'approfondissement de nos connaissances en matière de séquence primaire des glycanes des glycoprotéines, un aspect plus général. En effet, dès 1962, MONTREUIL, à la suite des premiers résultats acquis sur l'ovomucoïde, puis sur d'autres glycoprotéines, émet l'hypothèse qu'il existe un schéma général de structure des glycoprotéines. Cette hypothèse se confirmera d'année en année et conduira à la formulations de concepts relatifs à :

- l'existence d'un "noyau" oligosaccharidique interne commun à toutes les structures glycaniques de chaque classe de glycoprotéines et qui constitue le point de jonction entre la fraction glycanique porteuse de la spécificité biologique et la protéine.

- la mise en évidence dans les glycoprotéines dont les glycanes sont liés N-glycosidiquement à la protéine, de trois types de structure : les structures de type oligomannosidique ("high-mannose type") constituées uniquement de mannose et de glucosamine, les structures de type N-acétyllactosaminique ("complex type") de composition beaucoup plus complexe par la présence d'acide sialique, de galactose, de mannose, de N-acétylglucosamine et parfois de fucose et, enfin, de structures mixtes oligomannosidiques et lactosaminiques ("hybrid type").

- la présence de structures branchées qui amènera MONTREUIL à la notion d'antennes.

Cependant, malgré toutes les études réalisées à ce jour sur l'ovomucoïde et l'existence de méthodes fines d'analyse, comme la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire à haut champ, les structures proposées pour la partie glycanique de l'ovomucoïde de Poule n'étaient toujours, au début des années 1980, que des hypothèses. Certes, nous connaissions avec précision la composition en sucres ainsi que le nombre de glycanes attachés à la protéine, mais en 1980 aucune structure précise n'avait été publiée.

Nos travaux se proposent donc de répondre à cette attente. Nous nous sommes très vite aperçus au Laboratoire que cette méconnaissance était due à la très grande micro-hétérogénéité de la copule glucidique de l'ovomucoïde ; présence de glycanes neutres, de glycanes sialylés et grande variabilité dans chacune de ces deux classes. Ce handicap très important a été vaincu à l'aide de techniques séparatives par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) des glucides qui ont fait leur apparition lorsque nous avons repris les travaux sur l'ovomucoïde.

C'est ainsi que nous exposerons les résultats obtenus au cours de nos recherches sur la séparation des chaînes glycaniques de l'ovomucoïde neutre obtenu par hydrazinolyse de la glycoprotéine native, N-réacétylation et réduction des oligosaccharides libérés. Dans une deuxième partie nous décrirons nos résultats concernant la structure primaire de quatre oligosaccharides majeurs effectuée à l'aide de la micro-perméthylation, la résonance magnétique nucléaire à 500 MHz et la spectrométrie de masse à haute résolution. Dans une dernière partie, nous développerons les résultats préliminaires obtenus sur la fraction acide de l'ovomucoïde, en particulier la description d'un procédé analytique de séparation d'oligosaccharides monosialylés par chromatographie de partition. Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une revue générale sur l'ovomucoïde de Poule.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre général des recherches sur les glycoprotéines réalisées dans le Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217. Ils ont fait l'objet des communications et mémoires suivants :

COMMUNICATIONS

1. J. PAZ PARENTE, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, B. FOURNET, J. MONTREUIL, H. Van HALBEEK, L. DORLAND and J.F.G. Vliegenthart
Structural study of the sugar chains of hen ovomucoid. Primary structure of a major neutral carbohydrate unit.
Communication par affiche présentée au 11th International Carbohydrate Symposium. VANCOUVER, CANADA, August 22-28, 1982
2. J. PAZ PARENTE, G. STRECKER, J. MONTREUIL and B. FOURNET
H. Van HALBEEK and J.F.G. Vliegenthart
Primary structure of a novel N-glycosidic carbohydrate unit derived from Hen ovomucoid.
Communication par affiche présentée au 7th International Symposium on Glycoconjugates. LUND-RÖNNEBY, SWEDEN, July 17-23, 1983

MEMOIRES

1. J. PAZ-PARENTE, G. STRECKER, Y. LEROY, J. MONTREUIL and B. FOURNET
Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatography of oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid.
J. Chromatogr. 249 (1982) 199-204
2. J. PAZ-PARENTE, J.M. WIERUSZESKI, G. STRECKER, J. MONTREUIL and B. FOURNET
H. Van HALBEEK, L. DORLAND and J.F.G. Vliegenthart
A Novel Type of Carbohydrate Structure Present in Hen Ovomucoid
J. Biol. Chem., 257 (1982) 13173-13176
3. J. PAZ-PARENTE, G. STRECKER, Y. LEROY, J. MONTREUIL, B. FOURNET,
H. Van HALBEEK, L. DORLAND and J.F.G. Vliegenthart
Primary structure of a novel N-glycosidic carbohydrate unit, derived from hen ovomucoid
FEBS Lett., 152 (1983) 145-152
4. H. EGGE, J. PETER-KATALINIĆ, J. PAZ-PARENTE, G. STRECKER, J. MONTREUIL and B. FOURNET
Carbohydrate structures of hen ovomucoid. A mass spectrometric analysis
FEBS Lett., 156 (1983) 357-362

5. J. PAZ-PARENTE, Y. LEROY, J. MONTREUIL and B. FOURNET

Separation of sialyl-oligosaccharides by high-performance liquid chromatography. Application to analysis of carbohydrate units of acidic-oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid.

J. Chromatogr., 288 (1984) 147-155

GENERALITES

I. HISTOIRE DE LA DÉCOUVERTE DE L'OVOMUCOÏDE

Les premiers travaux sur la mise en évidence d'une glycoprotéine soluble dans le blanc d'oeuf de Poule sont attribués à BECHAMP (1) qui en 1873 découvrit dans ce matériel biologique une fraction non précipitable par l'éthanol. Peu de temps après, GAUTIER (2) démontra que le blanc d'oeuf renferme deux protéides non coagulables par la chaleur.

En 1888-1889, CORIN et BERARD (3) qui avaient précédemment signalé la présence d'une "peptone" dans le blanc d'oeuf, fractionnent ce dernier et y trouvent cinq protéides qu'ils appellent albumines α , β et γ et ovoglobulines α et β .

Le matériel non précipitable par l'éthanol dilué fut vérifié plus tard par MÖRNER (4), EICHHLOZ (5), OSBORNE et CAMPBELL (6) et LANGSTEIN (7) et on sait à présent qu'il s'agissait de l'ovomucoïde. Plus tard, une protéine résistante à la coagulation par la chaleur et différente de l'ovalbumine a été décrite par NEUMEISTER (8).

En 1892, HEWLETT (9) reprend et critique les travaux de HAYCRAFT et DUGGAN (10), eux-mêmes suggérés par ceux de HALLIBURTON (11) concernant la précipitation des protéides sériques par la chaleur. Il effectue une étude systématique des conditions de fractionnement des protéides de l'oeuf par la chaleur et caractérise au moins trois composants.

En 1894, MÖRNER (12) utilise un procédé analogue à celui qu'avait employé NEUMEISTER quatre ans auparavant et isole un "mucoïde" du filtrat de blanc d'oeuf bouilli. MÖRNER montra que ce protéide non coagulable par la chaleur était une glycoprotéine et lui donna le nom d'ovomucoïde. Plus tard, ce terme fut appliqué d'une manière générale, aux composés restant en solution après l'enlèvement de l'ovomucine et précipitation du lysozyme et des albumines (ovalbumine et conalbumine) par l'acétone (MEYER) (13), l'acétone-acide trichloroacétique (LINEWEAVER et

MURRAY) (14), l'acide trichloroacétique (FREDERICQ et DEUTSCH) (15), l'éthanol (FORSYTHE et FOSTER) (16) et le phénol (MONTREUIL et coll.) (17).

La facilité d'obtention de l'ovomucoïde liée à sa grande stabilité vis-à-vis des agents de dénaturation des protéines ont poussé les chercheurs à en effectuer l'étude si bien que l'ovomucoïde fut l'une des toutes premières glycoprotéines à être isolée et étudiée.

De nombreuses revues générales ont été décrites sur ce sujet : MEYER (18), LINEWEAVER et MURRAY (19), FEVOLD (20), LASKOWSKI et LASKOWSKI (21), WARNER (22), MELAMED (23), LIN et FEENEY (24), ADAM-CHOSSON (25), MONTREUIL et al. (25a) et JAKUBCZAK (26).

II. MÉTHODES DE PRÉPARATION

L'étude de la nature et de la composition de l'ovomucoïde a été retardée par la difficulté de préparation à l'état pur de cette glycoprotéine. Dès 1947, plusieurs chercheurs ont employé le matériel obtenu par précipitation par l'acétone ou par l'alcool à pH 3.5. Ces méthodes ont été décrites par LINEWEAVER et MURRAY (27) et par FREDERICQ et DEUTSCH (28).

Les protéines du blanc d'oeuf sont fractionnées par précipitation en variant la concentration en éthanol, la force ionique (I), le pH et la température d'une manière analogue aux méthodes de fractionnement appliquées aux protéides sériques du plasma (COHN et al. (29)). Selon le procédé de dénaturation employé pour éliminer les autres protéides du blanc d'oeuf, nous distinguerons cinq groupes de méthodes.

A - DENATURATION PAR LA CHALEUR

1) Méthode de NEUMEISTER (30)

Le blanc d'oeuf est additionné de 3 vol. d'eau distillée et la solution ajustée à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique 2N est portée à ébullition pendant 5 minutes sous agitation. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium à pH 4,6. Le précipité est dissous dans de l'eau distillée et l'ovomucoïde est précipité de cette solution par addition de 5 vol. d'éthanol absolu.

2) Procédés de MÖRNER (31)

a) Premier procédé : Le blanc d'oeuf est porté à ébullition dans des conditions identiques aux précédentes. Le filtrat est précipité après concentration de moitié, par de l'éthanol absolu et le précipité est soumis à une nouvelle précipitation alcoolique (4 heures de contact à - 8°C). Le précipité final constitue "l'ovomucoïde de MÖRNER I".

b) Deuxième procédé : Le filtrat d'ébullition du blanc d'oeuf, traité dans les mêmes conditions que précédemment est saturé en sulfate de sodium à pH 7,5 et porté à l'ébullition pendant 2 min. Le précipité gommeux formé est traité par l'eau distillée. Le filtrat est précipité par 5 vol. d'éthanol absolu (4 heures de contact à + 20°C) et le précipité fournit "l'ovomucoïde de MÖRNER II".

3) Procédé de WERNER et ODIN (32)

Le blanc d'oeuf dilué avec 4 vol. d'eau est ajusté à pH 4,7 avec de l'acide chlorhydrique 1N et maintenu à l'ébullition pendant 3 à 4 h sous agitation dans un appareil muni d'un réfrigérant à reflux. Le filtrat est concentré au sixième de son volume et précipité par 6 vol. d'éthanol à - 15°C. Après un contact de 4 h à - 8°C, on recueille un précipité qui est soumis deux fois encore au même fractionnement éthanolique. Le précipité final représente "l'ovomucoïde de WERNER et ODIN".

4) Procédé de LONGSWORTH et coll. (33)

Le blanc d'oeuf dilué au demi avec de l'eau distillée, est précipité par du sulfate d'ammonium (concentration finale : 133 g pour deux litres) à pH 4,6. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium et, après un contact d'une nuit, on recueille un précipité qui est dissous dans l'eau et porté à l'ébullition pendant 15 min. Le filtrat est dialysé et concentré. Sa précipitation à pH 4,4 et à 0°C par 2 vol. d'éthanol conduit à "l'ovomucoïde de LONGSWORTH et coll.".

B - DENATURATION PAR L'ACIDE TRICHLOROACETIQUE

1) Méthode de LINEWEAVER et MURRAY (34)

Le blanc d'oeuf est traité par un volume d'une solution acétonique d'acide trichloroacétique (1 volume de solution aqueuse d'acide trichloroacétique 0,5 M + 2 volumes d'acétone) sous agitation constante à la température ordinaire. Après un contact de 20 min., on élimine le précipité par filtration. La solution restée à 0°C pendant une nuit est

débarrassée éventuellement du précipité formé et additionnée de 2,25 volumes d'acétone. Le précipité est dialysé et soumis de nouveau à une précipitation acétonique. Le produit obtenu est dialysé et lyophilisé.

2) Méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (35)

Les protéides de l'oeuf sont dénaturés par l'acide trichloroacétique et l'ovomucoïde est isolé du filtrat suivant le schéma de la figure 27 p. 138.

C - DENATURATION PAR L'ACETONE

Méthode de MEYER (36)

Le blanc d'oeuf est traité par l'acétone et le précipité obtenu est extrait par une solution aqueuse d'éthanol et d'acide acétique. L'ovomucoïde est précipité de l'extrait par l'addition de 5 vol. d'éthanol à - 20°C.

D - DENATURATION PAR L'ETHANOL

Méthode de FORSYTHE et FOSTER (37)

Les protéides du blanc d'oeuf sont fractionnés par l'éthanol, sur le principe de la méthode de fractionnement des protéides sériques de COHN et coll. (38).

E - DENATURATION PAR LE PHENOL

Méthode de MONTREUIL et coll. (39)

Ces auteurs ont appliqué à la préparation de l'ovomucoïde, la méthode de MICHON (40) de préparation de l'orosomucoïde. Les protéides du blanc d'oeuf sont dénaturés par le phénol. L'ovomucoïde est précipité du filtrat phénolique par le sulfate d'ammonium. Il est ensuite purifié par un fractionnement éthanolique.

III. MÉTHODES DE PURIFICATION DE L'OVOMUCOÏDE

A - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les tentatives de purification de l'ovomucoïde ont porté essentiellement sur les préparations obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY (41) et de FREDERICQ et DEUTSCH (42).

RHODES et al. (43) ont fractionné le blanc d'oeuf sur CM-cellulose (carboxy-methylcellulose) équilibrée dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,3. L'ovomucoïde non retenu par l'échangeur de cation est soumis à un nouveau fractionnement sur la même résine, à l'aide d'un gradient d'élution discontinu en acétate d'ammonium de pH 3,5 à 5,5. FEENEY et al. (44) et RHODES et al. (45) ont appliqué cette méthode au fractionnement des protéides du blanc d'oeuf de diverses espèces d'Oiseaux.

En 1960, MANDELES (46) a utilisé la DEAE-cellulose pour le fractionnement du blanc d'oeuf en utilisant un gradient d'élution continu de phosphate de potassium, de glycine, de chlorure de sodium et d'acide chlorhydrique.

La même année, JEVONS (47) fractionne les ovomucoïdes de LINEWEAVER et MURRAY (48) et de FREDERICQ et DEUTSCH (49) sur TEAE-cellulose. Il applique un gradient d'élution continu en chlorure de sodium de 0 à 1 M dans le tampon phosphate de sodium 0,004 M de pH 6,8 et obtient l'ovomucoïde accompagné de deux autres composés.

En 1962, CHATTERJEE et MONTGOMERY (50) chromatographient sur colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans un tampon phosphate 0,005 M de pH 7, l'ovomucoïde préparée par la méthode de LINEWEAVER et MURRAY (51). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de sulfate de sodium 0 à 1 M dans un tampon phosphate 0,05 M de pH 7.

ADAM-CHOSSON (52) et MONTREUIL et al. (53) ont appliqué différents procédés chromatographiques à la purification de l'ovomucoïde en utilisant la chromatographie d'échange d'ions sur SE-cellulose, la chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Sephadex (G-25, G-50, G-75, G-100, G-200) et la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite.

KANAMORI et KAWABATA (54) ont fractionné sur CM-cellulose des préparations d'ovomucoïde obtenues par un procédé au sulfate d'ammonium et purifiées par chromatographie sur DEAE-cellulose.

En 1971, JAKUBCZAK (55) utilise la purification de l'ovomucoïde obtenu par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (56) pour l'emploi de la DEAE-cellulose associée à un tampon phosphate de pH 8 et à un gradient discontinu de concentration en NaCl. L'auteur conclut à l'isolement d'ovomucoïde pur en une seule étape, de façon reproductible et avec un rendement de 90 p. 100.

B - HETEROGENEITE DE L'OVOMUCOÏDE

L'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde a été vérifiée par LONGSWORTH et al. (57), puis LINEWEAVER et MURRAY (58) et FREDERICQ et DEUTSCH (59).

En 1953, BIER et al. (60) ont repris l'étude électrophorétique détaillée des préparations obtenues par ces deux derniers groupes de chercheurs et concluent que l'ovomucoïde est un complexe de cinq protéides très semblables.

Plus tard, JUTISZ et al. (61) montrent au moyen de l'analyse immunoélectrophorétique que les préparations obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY et de FREDERICQ et DEUTSCH contiennent du lysozyme et des β -globulines.

MONTREUIL et al. (62) ont mis en évidence, dans les préparations d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, jusqu'à 4 arcs de précipitation

possédant des comportements de β_2 -, β_1 -, α_1 -globulines et de préalbumine. En se fondant sur l'isolement, à partir des hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, de 3 glycopeptides différents, ces auteurs avaient posé en hypothèse que 3 des 4 arcs devaient correspondre, l'un à l'ovomucoïde proprement dit, un autre à un "isomère" de celui-ci : l'allo-ovomucoïde et, le dernier, à l'ovoglycoprotéine de KETTERER (63).

JAKUBCZAK et MONTREUIL (64) ont repris les travaux de MONTREUIL et al. (65) et ils montrent que l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde qui est révélée par l'électrophorèse effectuée dans les conditions classiques (en particulier, à des pH alcalins) est due, non pas à l'ovomucoïde lui-même, mais à des contaminants de nature protéidique que révèle l'immuno-électrophorèse. Il s'agit du lysozyme, de l'ovo-inhibiteur, de l'ovoglycoprotéine et de l'ovoflavoprotéine qui accompagnent l'ovomucoïde proprement dit dans des proportions qui varient avec le mode de préparation de ce dernier. Les substances contaminantes existent parfois dans une proportion tellement importante que certaines préparations d'ovomucoïde peuvent servir de matériel de départ en vue de leur isolement : c'est le cas de l'ovo-inhibiteur avec l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY et de l'ovoglycoprotéine avec l'"ovomucoïde" de FORSYTHE et FOSTER.

Cette hétérogénéité électrophorétique des préparations d'ovomucoïde qui se manifeste à des pH alcalins et qui est due uniquement à des impuretés ne doit pas être confondue avec l'hétérogénéité de l'ovomucoïde pur lui-même. Celle-ci se révèle, en effet, seulement en milieu acide et elle est due à la présence de variants qui possèdent la même protéine associée à des groupements glycaniques différents et qui donnent des réactions immunologiques d'identité totale (JAKUBCZAK et al. (66) et BEELEY (67)).

Des études critiques des méthodes de préparation de l'ovomucoïde que nous venons de décrire ont abouti sur la base des résultats de l'immuno-électrophorèse (voir figure 1 p. 15) au choix de la technique de FREDERICQ et DEUTSCH qui permet l'obtention de la glycoprotéine dans un état de pureté convenable. C'est cette technique que nous utiliserons pour nos études sur la fraction glucidique de l'ovomucoïde.

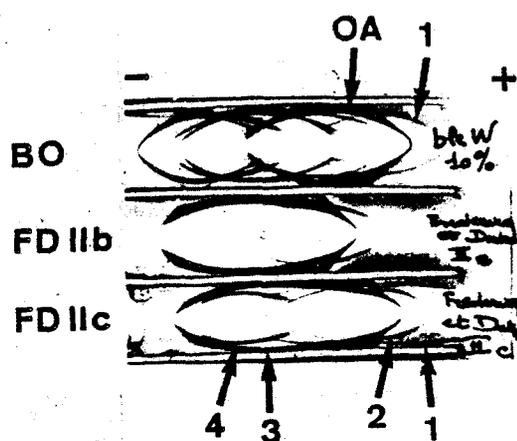


FIGURE 1

Diagramme immunoélectrophorétique du blanc d'oeuf (BO) et des précipités IIb et IIc ("Ovomucoïde purifié") obtenus par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (68) d'après MONTREUIL et al. (69). Tampon véronal de pH 8,6 ; 5V/cm pendant 3 h. OA : ovalbumine ; 1 : arc de la préalbumine ; 2 : arc de la globuline α_1 ; 3 : arc de la globuline β_1 ; 4 : arc de la globuline β_2 .

IV. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE L'OVOMUCOÏDE

Les propriétés physiques de l'ovomucoïde qui ont été décrites par plusieurs auteurs sont en réalité une moyenne statistique de celles des différents composants dont les proportions varient d'un "ovomucoïde" à l'autre suivant le procédé employé pour sa préparation.

Les propriétés physiques qui ont été déterminées pour l'ovomucoïde sont les suivantes :

A - SOLUBILITE

L'ovomucoïde est très soluble dans l'eau et ses solutions aqueuses sont très stables. Il n'est précipité ni par l'ébullition, ni par l'acide trichloroacétique, ni par le phénol. Il est précipité de ses solutions aqueuses par le sulfate d'ammonium à saturation, par quatre volumes d'acétone à pH 3,5 ou par l'éthanol avec une concentration finale en alcool de 42 p. 100.

B - ULTRACENTRIFUGATION, CONSTANTE DE SEDIMENTATION ET MASSE MOLECULAIRE

Quel que soit le procédé de préparation de l'ovomucoïde, les diagrammes d'ultracentrifugation révèlent la présence d'un seul pic à des pH variant de 1,4 à 11,6 : ALDERTON et FEVOLD (70) ; BIER et al. (71) et YOUNG (72). MONTREUIL et al. (73) ont démontré que l'homogénéité des préparations de l'ovomucoïde n'est qu'apparente et que les pics obtenus par ultracentrifugation des différentes préparations sont toujours asymétriques. Les valeurs des constantes de sédimentation obtenues pour diverses préparations de l'ovomucoïde par MONTREUIL et al. (74) sont rassemblées dans le tableau I p. 17.

TABLEAU I

Constantes de sédimentation à 20°C de différentes préparations d'ovomucoïde (MONTREUIL et al. (75)).

PROCEDES DE PREPARATION	AGENT DE DENATURATION	$S^{\circ}_{20} \times 10^{-13}$
NEUMEISTER (76)	chaleur	2,4
MÖRNER I (77)	chaleur	2,3
MÖRNER II (78)	chaleur	1,15
WERNER et ODIN (79)	chaleur	2,3 à 2,4
LONGSWORTH <u>et al.</u> (80)	chaleur	2,6
LINEWEAVER et MURRAY (81)	ATCA (*)	2,35
FREDERICQ et DEUTSCH (82)	ATCA (*)	
Précipité IIc "Ovomucoïde purifié"		2,35
Précipité IIb		2,27
MEYER (83)	Acétone	2,35
MONTREUIL <u>et al.</u> (84)	Phénol	2,4

(*) Acide trichloroacétique

Le diagramme d'ultracentrifugation ne subit pas de modification dans la zone de pH comprise entre 1,4 à 11,6 ainsi que pour des concentrations se situant entre 0,5 et 1,5 p. 100 (FREDERICQ et DEUTSCH (85)).

Les valeurs de la masse moléculaire et de la constante de sédimentation de l'ovomucoïde obtenues par différents auteurs sont rassemblées dans le tableau II p. 19.

C - CONSTANTE DE DIFFUSION (D_{20} , (10^{-7} cm². sec⁻¹)).

La constante de diffusion de l'ovomucoïde (D_{20} , (10^{-7} cm². sec⁻¹)) a été déterminée par FREDERICQ et DEUTSCH (86) : 8,0 ; RHODES et al. (87) : 7,7 ; DEUTSCH et MORTON (88) : 6,01 ; OEGEMA et JOURDIAN (89) ; 6,9 ; WAHEED et SALAHUDDIN (90) : 7,8.

D - VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL (\bar{v} (ml/g))

Le volume spécifique partiel (\bar{v} (ml/g)) de l'ovomucoïde a été déterminé par FREDERICQ et DEUTSCH (91) : 0,685 ; RHODES et al. (92) : 0,71 ; OEGEDA et JOURDIAN (93) : 0,696.

E - POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoélectrique de l'ovomucoïde varie de 3,9 (FREDERICQ et DEUTSCH (94)) à 4,3 (LONGSWORTH et al. (95)), 4,5 (HESSELVIK (96)) et 4,8 (OEGEMA et JOURDIAN (97)). La discordance de ces résultats peut s'expliquer par la présence de constituants différents en quantités variables dans les préparations de l'ovomucoïde. En effet, BIER et al. (98) ont caractérisé dans les ovomucoïdes de FREDERICQ et DEUTSCH et de LINEWEAVER et MURRAY, l'existence de cinq composants dont les points isoélectriques sont 4,41 ; 4,28 ; 4,17 ; 4,01 et 3,83.

TABLEAU II

Masse moléculaire et constante de sédimentation de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule selon différents auteurs

AUTEUR	METHODE DE PREPARATION	MASSE MOLECULAIRE	S_{20}°, w (SVEDBERG)
LINEWEAVER et MURRAY (99)	ATCA et acétone à pH 3,5	28.800 ^a	-
FREDERICQ et DEUTSCH (100)	ATCA et alcool à pH 3,5	27.000 ^b	2,8
RHODES <u>et al.</u> (101)	Chromatographie sur CM-cellulose à pH 3,5 à 4,5	27.000 ^b	2,49
DEUTSCH et MORTON (102)	FREDERICQ et DEUTSCH (107)	31.500 ^b	2,62
CHATTERJEE et MONTGOMERY (103)	LINEWEAVER et MURRAY (108) et purification sur DEAE-cellulose	-	2,8
JAKUBCZAK (104)	FREDERICQ et DEUTSCH (109)	26.700 ^c	2,72
OEGEMA et JOURDIAN (105)	Précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur DEAE-cellulose	27.800 ^d	2,67
WAHEED et SALAHUDDIN (106)	FREDERICQ et DEUTSCH (110), précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur SE-Sephadex	28.300 ± 2.300	-

a : Par pression osmotique ; b : par sédimentation et diffusion ; c : par la méthode de SVEDBERG ;
d : Par électrophorèse en présence de dodecyl sulfate de sodium

En outre, FREDERICQ et DEUTSCH (111) ont montré que la dénaturation par la chaleur se manifestait par une modification du point isoélectrique.

F - PROPRIETES OPTIQUES

Les valeurs du coefficient d'extinction $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 280 nm et du pouvoir rotatoire spécifique $(\alpha)_D^{20}$ de l'ovomucoïde de Poule selon différents auteurs et différentes méthodes de préparation sont rassemblés dans le tableau III p. 21.

G - RAPPORT AXIAL ET COEFFICIENT DE FRICTION

Etant donné le rapport axial de l'ovomucoïde qui est de 6,3 (FREDERICQ et DEUTSCH (112)), JIRGENSONS et al. (113) ont déterminé le coefficient de friction égal à 1,35. D'après ce dernier, ces valeurs correspondent à une molécule globulaire équivalente à un sphéroïde aplati.

En 1961, DEUTSCH et MORTON (114) décrivent une valeur de 12-14 pour le rapport axial de l'ovomucoïde. En 1975, WAHEED et SALAHUDDIN (115) déterminent le rapport axial de l'ovomucoïde et son coefficient de friction comme étant de 5,98 et de 1,31 respectivement.

H - CONFORMATION DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

Les paramètres hydrodynamiques de l'ovomucoïde ont été déterminés par les techniques de viscosimétrie et de gel filtration ; l'étude de sa conformation a été abordée par les techniques optiques : dispersion optique rotatoire, dichroïsme circulaire, fluorescence et différence de spectre (LIN et FEENEY (116)). Les études de dichroïsme circulaire (CD) et de dispersion optique rotatoire (ORD) des inhibiteurs tryptiques ont été réalisées par IKEDA et al. (117). L'ovomucoïde a un effet Cotton négatif avec un creux à 230 nm dans la courbe ORD et des extrêmes négatifs centrés à 210 et

TABLEAU III

Coefficient d'extinction et pouvoir rotatoire spécifique de l'ovomucoïde

AUTEUR	METHODE DE PREPARATION	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	$[\alpha]_D^{20}$ 280 nm
LINEWEAVER et MURRAY (118)	ATCA et acétone à pH 3,5	-	- 56
RHODES <u>et al.</u> (119)	Chromatographie sur CM-cellulose à pH 3,5 à 4,5	6,1	-
DEUTSCH et MORTON (120)	FREDERICQ et DEUTSCH (124)	4,8	-
CHATTERJEE et MONTGOMERY (121)	LINEWEAVER et MURRAY (125) et purification sur DEAE-cellulose	4,1	- 78
JAKUBCZAK (122)	FREDERICQ et DEUTSCH (126)	3,9	- 78
WAHEED et SALAHUDDIN (123)	FREDERICQ et DEUTSCH (127), précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur SE-Sephadex	5,10	-

222 dans le spectre de dichroïsme circulaire. L'ovomucoïde est le seul inhibiteur à avoir une structure hélicoïdale parmi tous les inhibiteurs tryptiques étudiés. Les données de la dispersion optique rotatoire dans l'ultraviolet indiquent que la proportion de structure hélicoïdale de l'ovomucoïde diminue à pH 12,8 ce qui correspond probablement à une dénaturation de la protéine. En présence de 50 p. 100 de 2-chloroéthanol, le spectre de dichroïsme circulaire est probablement modifié, alors que les valeurs de l'ORD n'indiquent aucun changement dans les taux d'hélicité de la protéine.

La conformation de l'ovomucoïde de Poule a été étudiée par DONOVAN en 1967 (128) à l'aide de paramètre hydrodynamique. C'est ainsi qu'il a pu déterminer que le rapport axial de la molécule était proche de l'unité. Par gel de filtration sur colonne de Sephadex, WITAKER (129) indique que l'ovomucoïde est élué plus rapidement qu'une protéine globulaire de même masse moléculaire. ANDREWS (130) suggère que la molécule n'est probablement pas une molécule compacte. DONOVAN (131) conclut également que l'ovomucoïde n'est ni compact, ni hautement asymétrique, mais est très hydraté, phénomène que l'on rencontre très souvent dans les glycoprotéines. Par des mesures de dichroïsme circulaire OEGEMA et JOURDIAN (132) montrent que les pH extrêmes n'altèrent pas d'une façon irréversible la conformation de l'ovomucoïde purifié. Les spectres de dichroïsme circulaire dans le proche ultraviolet et d'absorption de l'ovomucoïde de Poule et de ses dérivés acétylés à 297 et 77°K ont été étudiés par KAY et al. (133). En 1975, WAHEED et SALAHUDDIN (134) définissent les paramètres physiques de l'ovomucoïde de Poule ; viscosité intrinsèque : 5,36 ml/g ; rayon hydrodynamique équivalent : 2,9 nm ; rapport axial : 6,0 ; coefficient de friction : 1,31. A l'aide de la "gel filtration", les auteurs calculent le rayon de Stokes (3,5 nm), le coefficient de diffusion ($7,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$) et le coefficient de friction (1,35). Les résultats suggèrent que l'ovomucoïde se trouve en conformation non globulaire dans les conditions natives et les différences par rapport à une protéine globulaire typique semblent être dues à l'asymétrie et l'hydratation de la molécule.

Des études du comportement de l'ovomucoïde en présence d'urée (WAHEED et al. (135)) et de chlorhydrate de guanidine (BAIG et SALAHUDDIN (136)) ont permis de caractériser la présence de conformations intermédiaires stables. Des études de la structure secondaire de l'ovomucoïde de Poule ont été effectuées par MATSUDA et al. (137) en utilisant la séquence d'acides aminés et la méthode de CHOU et FASMAN (138). Les résultats obtenus par les auteurs sont les suivants : hélice α (7 régions) 33 % ; coude β (11 régions) 23 % et structure statistique ("random coil") 17 %. En appliquant la méthode de CHANG et al. (139), WATANABE et al. (140) déterminent la structure secondaire de l'ovomucoïde par dichroïsme circulaire (CD) comme suit : hélice α : 26 % ; structure β : 46 % ; coude β : 10 % ; structure statistique : 18 %.

Des études de l'action de la température sur la conformation de l'ovomucoïde à l'aide des mesures d'absorbance en ultraviolet ont montré à MATSUDA et al. (141) que les différents domaines de l'ovomucoïde semblent se déplier pour certaine température, indépendamment des autres domaines. Les températures induisant les modifications de conformation sont légèrement différentes d'un domaine à l'autre. La même année, MATSUDA et al. (142) présentent les résultats de la structure secondaire de l'ovomucoïde natif, réduit et réduit-réoxydé : tableau IV p. 24. On peut donc constater à la lecture des résultats sur l'étude de conformation de l'ovomucoïde que l'utilisation de techniques différentes amènent à des résultats semblables sur les taux d'hélicité α , de structure β , de coude β et de structure indéterminée.

TABLEAU IV

Structure secondaire d'ovomucoïde natif, réduit et réduit-réoxydé
(MATSUDA et al. (143))

OVOMUCOÏDE	CONFORMATIONS (en p. cent)			
	hélice- α	structure- β	coude- β	statistique
Natif	26	46	10	18
Réduit	16	34	20	30
Réduit-réoxydé	23	48	8	21

V, COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET STRUCTURE DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE D'OVOMUCOÏDE DE POULE

La composition en acides aminés de l'ovomucoïde préparé par la méthode de LINEWEAVER et MURRAY (144) a été déterminée par LEWIS et al. (145), STEVENS et FEENEY (146) et par MARSHALL et NEUBERGER (147). DEUTSCH et MORTON (148) ont analysé l'ovomucoïde obtenu par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (149) tandis que OSUGA et FEENEY (150) ont étudié l'ovomucoïde obtenu par la même méthode de préparation, suivie d'une purification par chromatographie échangeuse d'ions sur CM-cellulose selon la méthode de RHODES et al. (151). KANAMORI et KAWABATA (152) ont analysé l'ovomucoïde obtenu par leur propre préparation.

La composition en acides aminés de l'ovomucoïde préparé par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (153) et fractionnement par chromatographie sur DEAE-cellulose d'après le procédé de FEENEY et al. (154) a été déterminée par BEELEY (155) et représente la composition la plus cohérente.

A la lecture du tableau V p. 26, nous pouvons constater que les résultats obtenus par BEELEY (156) sont très proches de ceux publiés cinq ans auparavant par JAKUBCZAK (157). Les travaux de FRAENKEL-CONRAT et PORTER (158), NOBLE et al. (159), OSUGA et FEENEY (160), WAHEED et SALAHUDDIN (161), BEELEY (162) et JAKUBCZAK (163) présentent l'alanine comme l'acide aminé N-terminal de la chaîne polypeptidique de l'ovomucoïde de Poule.

L'acide aminé C-terminal a été mis en évidence par PENASSE et al. (164), TURNER et SCHMERZLER (165), WAHEED et SALAHUDDIN (166) et confirmé par BEELEY (167). Il s'agit de la phénylalanine. Ces résultats associés au fait que la rupture de tous les ponts disulfures ne modifie pas la masse moléculaire (DEUTSCH et MORTON (168)) sont en faveur de l'existence d'une seule chaîne peptidique.

TABLEAU V

Composition en acides aminés de l'ovomucoïde selon différents auteurs

NATURE DES ACIDES AMINÉS	JEMIS et al.		STEVENS et FFFNEY		MARSHALL et NEUBERGER		DEUTSCH et HORTON		OSUGA et FLRIEY		KAMAHNI et KAWARATA		JAMBICZAK		OEGRIA et JOUBIZAN		BRELEY *	
	1950 (1169)	1963 (170)	1960 (171)	1961 (172)	1968 (173)	1969 (174)	1971 (175)	1974 (176)	1976 (177)	Résidus/mole de H.M. 20.000	Résidus/mole de H.M. 20.000	Résidus/mole de H.M. 26.700	Résidus/mole de H.M. 29.000	Résidus/mole de H.M. 26.700	Résidus/mole de H.M. 29.000			
Acide aspartique	98	95,2	27	37	31,9	16	28	70,7	29									
Acide glutamique	44	47,1	13	16	14,9	20	13	14,0	14									
Arginine	21	19,2	5	0	6,3	5	6	5,5	6									
Histidine	13,8	15,6	4	5	4,3	6	4	4,4	4									
Lysine	41	41	12	16	13,6	17	14	13,1	13									
Alanine	26	35,6	10	14	11,7	13	10	11,2	11									
Cytidine/2	55	58,4	16	21	17,5	-	17 ou 18	16,0	16									
Glycine	51	49,4	14	18	16,1	10	15	14,0	15									
Isoleucine	11	10,7	3	4	3,2	7	3	2,6	3									
Leucine	39	36,6	10	13	12,2	13	11	11,9	11									
Méthionine	6,4	7	2	2	1,9	3	-	1,5	2									
Phénylalanine	17,6	15,1	4	6	5,3	6	4	4,9	5									
Proline	23,6	20,3	6	8	7,7	8	9	8,0	8									
Sérine	40	35,5	10	15	12,5	16	12 ou 13	12,0	11									
Thréonine	46	45,3	13	17	14,6	10	14	13,0	13									
Tryptophane	1,5	1,5	0	0	0	3	0	< 0,02	0									
Tyrosine	17,6	19	5	8	6,7	5	6	5,6	6									
Valine	51	50	14	18	16	9	13	13,9	16									

* En 1979, FRANÇOIS-GERARD et al. (178) confirment la composition en acides aminés de l'ovomucoïde du Poule.

L'ovomucoïde de Poule contient une seule chaîne polypeptidique à laquelle plusieurs groupements glycaniques sont attachés. Cependant, il y a une très grande hétérogénéité des sucres neutres et d'acide N-acétylneuraminique dans des préparations d'ovomucoïde (BEELEY (179)).

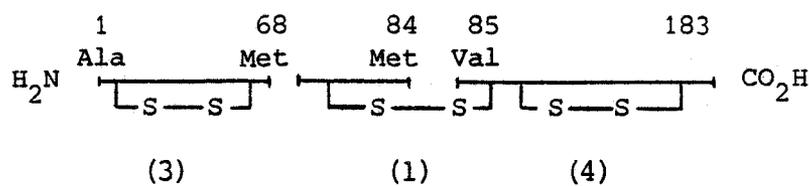
La séquence des 40 premiers acides aminés de la portion N-terminale d'un inhibiteur de la trypsine isolée d'ovomucoïde de poulet a été déterminée par MURTHY et al. (180). Le résultat obtenu par cet auteur est le suivant :

5	10
Ala - Glx - Val - Asx - Cys - Ser - Arg - Phe - Pro -	-
15	20
Ala - Pro - Asx - Lys - Glx - Gly - Lys - Asx - Val - Leu -	-
25	30
Val - Cys - - Lys - Asx - Leu - - Pro - Leu - Cys -	-
35	40
Gly - Thr - Asx - Phe - Val - Pro - Tyr - Gly - - Asx -	-

En 1976, BEELEY (181) par action du bromure de cyanogène sur l'ovomucoïde obtient 2 fragments : le fragment LS de masse moléculaire 16.000 et le fragment M de masse moléculaire 11.000 (Fig. 2 p. 28).

Après réduction et alkylation, la masse moléculaire du fragment M reste inchangée alors que le fragment LS peut être résolu en deux peptides de masse moléculaire 12.000 pour le fragment L et 4.700 pour le fragment S. Chacun des peptides obtenu est glycosylé. Le fragment M a été déterminé comme étant l'extrémité N-terminal de la protéine (Aminoacide Ala¹ à Met⁶⁸), le fragment S constitue la fraction C-terminal (Val⁸⁵ à Phe¹⁸³). Les séquences peptidiques au voisinage des points d'attache des glycannes sur la protéine (Fig. 5 p. 35) ont été déterminées par BEELEY (182) après hydrolyse trypsique. La numérotation des résidus d'acides aminés est fondée sur la séquence d'ovomucoïde de Caille déterminée par KATO et al. (183).

En 1978, KATO et al. (184) déterminent la séquence de l'ovomucoïde de Poule et démontrent que la molécule se présente en trois domaines (domaines I, II et III) dont les séquences primaires en acides aminés sont illustrées dans la figure 3 p. 29.



Fragment... M S L

Composition en sucres
 (mole de résidus par
 mole de peptide)

GlcNAc	11	10	1 ou 4
Hexose	7	6	1 ou 4

FIGURE 2

Disposition des fragments CNBr de l'ovomucoïde de Poule selon BEELEY.

- I Ala-Glu-Val-Asp-Cys-Ser-Arg-Phe-Pro-Asn-Ala-Thr-Asp-Lys-Glu-Gly-Lys-Asp-Val-Leu-Val-Cys-Asn-Lys-Asp-Leu-Arg-Pro-Ile-Cys-Gly-Thr-Asp-Gly-Val-Thr-Tyr-Asn-Asn-Glu-Cys-Leu-Leu-Cys-Ala-Tyr-Ser-Ile-Glu-Phe-Gly-Thr-Asn-Ile-Ser-Lys-Glu-Hys-Asp-Gly-Glu-Cys-Lys-Glu-Thr
- II Val-Pro-Met-Asn-Cys-Ser-Ser-Tyr-Ala-Asn-Thr-Thr-Ser-Glu-Asp-Gly-Lys-Val-Thr-Val-Leu-Cys-Asn-Arg-Ala-Phe-Asn-Pro-Val-Cys-Gly-Thr-Asp-Gly-Val-Thr-Tyr-Asp-Asn-Glu-Cys-Leu-Leu-Cys-Ala-Hys-Lys-Val-Glu-Glu-Gly-Ala-Ser-Val-Asp-Lys-Arg-Hys-Asp-Gly-(Glu-Cys-Arg-Lys-Glu)
- III Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-Asp-Cys-Thr-Ala-Glu-Asp-Arg-Pro-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Hys-Phe-Gly-Lys-Cys

FIGURE 3

Séquence primaire en acides aminés des domaines I, II et III de l'ovomucoïde de Poule (KATO et al. (185)).

En 1980, SIBGHATULLAH (186) par hydrolyse pepsique isole le domaine III de l'ovomucoïde de Poule. L'auteur détermine que ce fragment possède une masse moléculaire de 6.200 ; qu'il est dépourvu de sucre et d'activité antitrypsique. Les aminoacides N- et C-terminaux de ce peptide ont été caractérisés ; il s'agit respectivement de la valine et de la phenylalanine. Ce domaine correspond au fragment Val¹³³-Phe¹⁸² de l'ovomucoïde. Ce résultat est en désaccord avec celui de BEELEY (187) qui, dans le fragment LS, montre que le C-terminal est l'acide aminé 183. D'autre part, KATO (188) indique que l'ovomucoïde de Poule possède 186 aminoacides avec pour C-terminal la Cystéine comme dans l'ovomucoïde de Caille. JAKUBCZAK (189) se fondant sur les résultats de l'hydrazinolyse de l'ovomucoïde d'une part et sur l'inactivité de la carboxypeptidase observée par NOBLE et al. (190) propose la lysine comme l'acide aminé C-terminal. Ce résultat est tout à fait vraisemblable, en effet, par rapport à l'ovomucoïde de Caille qui possède à l'extrémité C-terminal -Lys¹⁸⁵-Cys¹⁸⁶-COOH et 9 ponts disulfures (18 cystéines), l'ovomucoïde de Poule a deux cystéines en moins (8 ponts disulfures) dont l'un pourrait être la Cys¹⁸⁶. Dans ce cas l'acide aminé C-terminal serait bien la lysine.

VI. LE POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTÉINE DANS L'OVOMUCOÏDE DE POULE

Les modalités de la conjugaison des glycanes et de la protéine dans l'ovomucoïde ont fait l'objet de nombreux travaux.

En 1961, TANAKA (191) avait isolé à partir des hydrolysats barytiques de l'ovomucoïde par fractionnement éthanolique et par chromatographie sur des colonnes de charbon-célite, quatre fractions glycoprotidiques riches en acide aspartique. L'étude de la structure de ces fractions avait conduit l'auteur à la conclusion qu'il existait dans l'ovomucoïde des liaisons de l'acide aspartique avec la glucosamine.

En 1962-1963, cette conclusion était infirmée par HARTLEY et JEVONS (192) et par BEELEY et JEVONS (193) dont les travaux étaient en faveur de l'hypothèse de liaison O-thréonyl et O-séryl osidiques sans toutefois en apporter la démonstration. Au contraire, CHATTERJEE et MONTGOMERY (194) et MONTGOMERY et al. (195) précisaient que la liaison glycanne-protéine se faisait par l'intermédiaire de la fonction amide de l'asparagine. Les recherches de ces auteurs ainsi que celles de MARKS et al. (196) et de NEUBERGER et PAPKOFF (197) suggéraient en outre la pluralité du groupement glycanique.

MONTGOMERY et WU (198) ont proposé des groupements glycaniques de composition identique pour 3 glycopeptides obtenus par digestion à l'aide d'enzymes protéolytiques.

ADAM-CHOSSON (199) et MONTREUIL et al. (200, 201) ont décrit trois glycopeptides α_4 , β et γ à partir d'hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH. Les auteurs concluent que le glycopeptide α_4 possède la composition suivante : Asp 1, Gal 1, Man 3, GlcNAc 4, NeuAc 1 ; que le glycopeptide β est constitué de Asp 1, Thr 1, Gal 1, Man 5, GlcNAc 9 et que le glycopeptide γ contient : Asp 1, Cys 1, Gal 1, Man 5, GlcNAc 9.

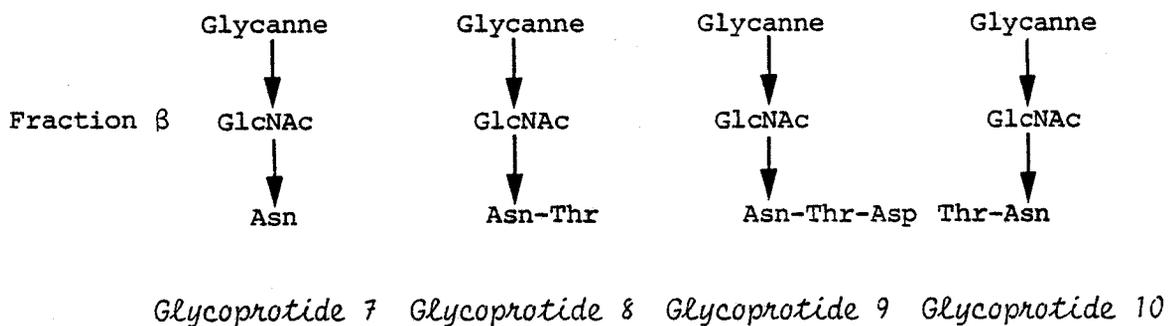


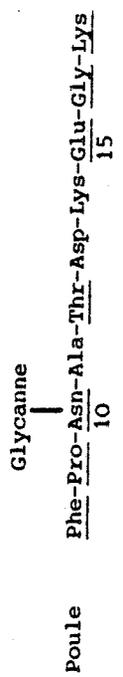
FIGURE 4

Schéma de structure des glycoprotides isolés ou caractérisés dans la fraction β (MONSIGNY et al. (208)).

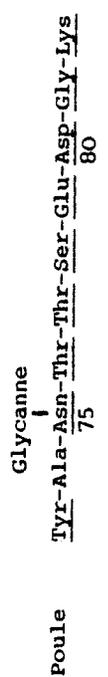
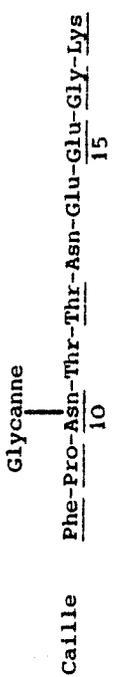
La localisation des sites de conjugaison des glycanes dans l'ovomucoïde de Poule (BEELEY (209)) peut être comparée avec celle de l'ovomucoïde de Caille (KATO et al. (210)). Trois copules glycaniques au moins (site 1, site 2 et site 4) de l'ovomucoïde de Poule (voir figure 5 p. 35) sont en position étroitement semblables ou identiques à la fois dans l'ovomucoïde de Caille et de Poule. En ce qui concerne le site de glycosylation 3, le groupement glycanique est conjugué sur l'asparagine 69 dans l'ovomucoïde de Poule et sur l'asparagine 75 dans l'ovomucoïde de Caille.

La présence d'homologies internes dans les séquences peptidiques de l'ovomucoïde de Poule et de Caille fut proposée sur la base de similitudes entre les séquences adjacentes aux sites d'attache-ments des glycanes numérotés 1 à 4 (BEELEY (211)). L'analyse de la séquence de l'ovomucoïde de Caille confirme cette conclusion et indique la présence de trois domaines homologues (KATO et al. (212)). Chez les deux espèces, le glycanne se greffe sur des séquences peptidiques à homologie interne dans deux des domaines : les domaines I et II. Cette répétition des sites de glycosylation a probablement évolué comme étant une conséquence d'une duplication partielle de gène (KATO et al. (213)). Ce type de processus est d'une importance considérable dans l'évolution des protéines qui possèdent de multiples sites d'attachement glycanique.

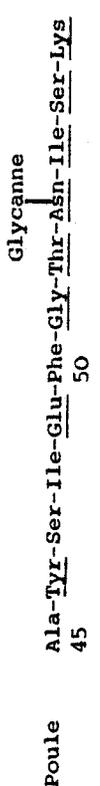
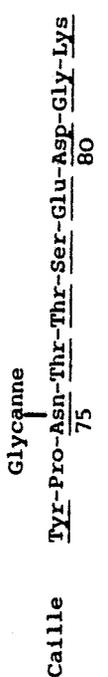
Des études complémentaires des sites de glycosylation de l'ovomucoïde chez différentes espèces seront utiles pour retracer l'évolution du gène (ou des gènes) de l'ovomucoïde et pour évaluer les pressions selectives qui peuvent s'exercer pour la conservation ou l'élimination de séquences peptidiques glycosylées. Un facteur sélectif qui a été envisagé par AUBERT et al. (214, 215) et LOUCHEUX-LEFEBVRE (216) et BEELEY (217) est la structure secondaire de la chaîne peptidique dans la région de conjugaison du glycanne. Les localisations des hélices α , des feuilletts β et des coudes β ont été prédites avec beaucoup de succès pour plusieurs protéines à partir des données de la séquence en appliquant des méthodes empiriques (CHOU et FASMAN (218)). La figure 6 p. 36 montre le résultat du test de probabilité de présence d'un coude β appliqué aux quatre sites majeurs de glycosylation de l'ovomucoïde. Chacun des sites d'attachement



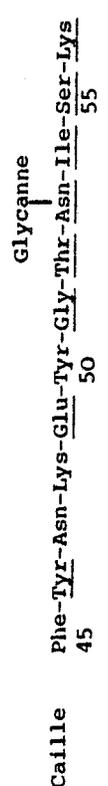
Site 1



Site 4



Site 2



Site 3

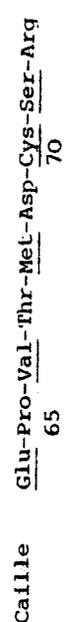


FIGURE 5

Homologies des séquences peptidiques au voisinage des points d'attache glycane-protéine dans l'ovomucoïde de Caillie et l'ovomucoïde de Poule selon BEELEY (219)

* Cys : 2-aminoéthylcystéine.

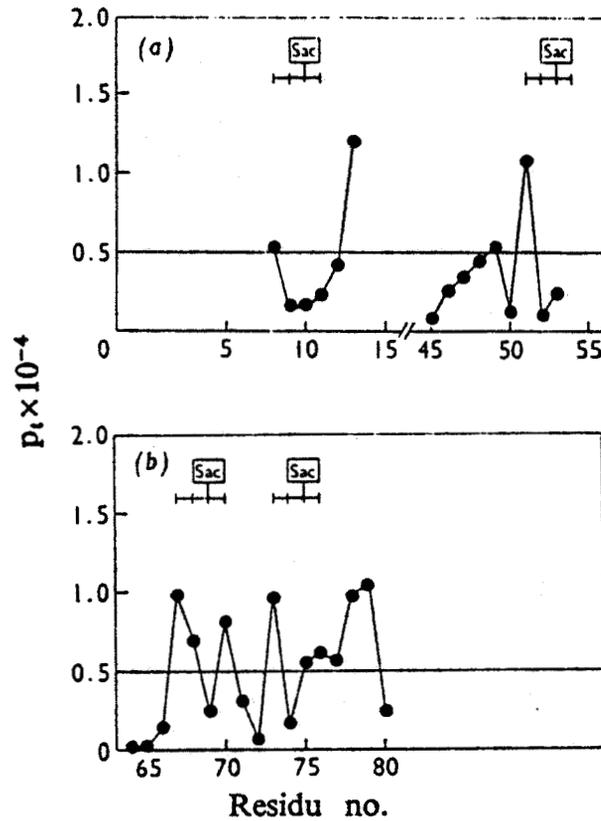


FIGURE 6

Probabilité de coude β et sites de glycosylation dans l'ovomucoïde selon BEELEY (220).

Les valeurs de P_t pour les séquences térapeptidiques ont été calculées selon CHOU et FASMAN (221). $P_t = F_i, F_{i+1}, F_{i+2}, F_{i+3}$, quand $F_i, F_{i+1}, F_{i+2}, F_{i+3}$ représentent la fréquence d'apparition de résidus particuliers d'acides aminés, à la première, deuxième, troisième et quatrième position du coude β . Il y aura coude β lorsque le P_t sera supérieur ou égal à $0,5 \times 10^{-4}$. La figure indique les possibilités de coude β pour les quatre sites de glycosylation.

glycannique se situe dans le même contexte, constitué par quatre résidus pouvant constituer un coude β commençant par (Asn)Glycane à la troisième position du coude. Ainsi, pour autant que la prédiction soit correcte, les résidus Ser/Thr dans la séquence Asn(Carb)-X-Ser/Thr se trouveraient après le coude β . Cependant, certaines prédictions n'ont pas été vérifiées pour des protéines de structure connue (CHOU et FASMAN (222)). C'est pourquoi, on ne peut pas affirmer que les sites de glycosylation interviennent nécessairement au voisinage immédiat des coudes β . Cependant, il est clair que dans l'ovomucoïde, un groupe d'acides aminés rencontrés très fréquemment dans les coudes β sont aussi très proches des sites de glycosylation. Ces résidus peuvent être importants dans la détermination de la conformation de la chaîne peptidique voisine du site de glycosylation (qu'il s'agisse ou non d'un coude β). Cette conformation peut déterminer le processus de l'attachement du glycane, elle peut aussi avoir un rôle dans l'évolution des sites d'attachement du glycane. Il est à noter que BUNTING et al. (223) ont suggéré, à partir d'études sur les immunoglobulines que la préservation des coudes β dans les régions prédites peut être un mécanisme par lequel une contrainte est exercée sur la conformation de la chaîne.

En 1976, AUBERT et al. (224,225) et en 1977, BEELEY (226) étudient la conformation de chaînes peptidiques au voisinage des sites de glycosylation de glycoprotéines à liaisons N-glycosidiques. Sur 31 séquences N-glycosylées étudiées, 30 possèdent une structure coudée. Vingt deux sites de glycosylation possèdent une séquence térapeptidique compatible à une conformation coude β . En ce qui concerne l'ovomucoïde de Poule (Tableau VI p. 38), BEELEY (227) précise les séquences peptidiques au voisinage des quatre sites de glycosylation pour lesquelles un coude β peut être prédit. Les sites de glycosylation 3 (Asn⁶⁹) et 4 (Asn⁷⁵) ont la plus grande probabilité de se situer dans un coude β .

TABLEAU VI

Coude β au voisinage des sites de glycosylation de l'ovomucoïde de Poule.

Les valeurs de P_t sont calculées pour les tétrapeptides en partant du résidu d'asparagine glycosylé (n) et pour les résidus d'acide aminé suivants n-1, n-2 et n-3 vers l'extrémité N-terminale. Les valeurs soulignées indiquent des $P_t > 0,75$ et $(P_\alpha) < (P_t) > P_\beta$. Lorsque plus d'un peptide a une valeur de $P_t > 0,75$, il y aura une grande probabilité pour qu'il y ait un coude β .

GLYCOPROTEINE	SEQUENCE GLYCOSYLEE				$P_t \times 10^{-4}$			
	n-3	n-2	n-1	n	n-3	n-2	n-1	n
Ovomucoïde de Poule	Arg	Phe	Pro	<u>Asn</u> 10	Ala	Thr	Asp	
Ovomucoïde de Poule	Phe	Gly	Thr	<u>Asn</u> 53	Ile	Ser	Lys	
Ovomucoïde de Poule	Val	Pro	Met	<u>Asn</u> 69	Cys	Ser	Ser	
Ovomucoïde de Poule	Ser	Tyr	Ala	<u>Asn</u> 75	Thr	Thr	Ser	

VII. COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA FRACTION GLUCIDIQUE DE L'OVOMUCOÏDE

L'étude de la composition et de la structure de la fraction glycanique de l'ovomucoïde ont fait l'objet de nombreux travaux.

A - COMPOSITION EN GLUCIDES DE L'OVOMUCOÏDE

La glucosamine, grâce à ces propriétés particulières, fut identifiée dès 1896 par WEYDEMAN (228) dans les produits d'hydrolyse alcaline de l'ovomucoïde, puis par ZANETTI (229), accompagnée, précisait l'auteur, d'acide sulfurique dans les hydrolysats chlorhydriques. Ces résultats furent confirmés par LANGSTEIN (230), en 1903, qui infirmait, en outre, la présence d'acide sulfurique et par OSWALD (231), en 1910. Plus tard, la présence de la glucosamine fut définitivement établie grâce à l'application des méthodes plus modernes d'analyse.

La détermination de la nature des oses neutres fut plus longue et plus délicate. Certes, très tôt, la phénylglucosazone avait été identifiée dans les produits de l'action de la phénylhydrazine sur des hydrolysats acides d'ovomucoïde, mais ce résultat ne permettait pas de conclure à la présence de glucose puisque glucose, mannose, fructose, glucosamine et mannosamine fournissent la même osazone. L'existence du mannose fut démontrée pour la première fois, en 1929, par LEVENE et MORI (232) qui l'identifièrent par sa phénylhydrazone. Le galactose fut trouvé dans les hydrolysats d'ovomucoïde par SØRENSEN (233) en 1934, puis par STACEY et WOOLLEY, en 1940-1942 (234). Cependant, en 1945, MEYER infirmait la présence de galactose et attribuait à la fraction glucidique de l'ovomucoïde la composition suivante : mannose et N-acétylglucosamine (1 : 1) (235).

Mais l'application de méthodes de coloration spécifiques et des techniques d'analyse chromatographique ont définitivement établi

que les oses constituant l'ovomucoïde étaient le galactose, le mannose et la N-acétylglucosamine (BRAGG et HOUGH (236) ; LEE et MONTGOMERY (237)). A ces composés est venu s'ajouter, en 1961, l'acide N-acétylneuraminique (LEE et MONTGOMERY (238)).

MONTREUIL et al. (239) ont rassemblé les résultats de différents auteurs concernant les compositions en glucides de l'ovomucoïde dans le tableau VII p. 41 classés par ordre chronologique jusqu'en 1963. Nous avons ajouté sur ce même tableau les résultats plus récents obtenus par d'autres auteurs.

En 1964-1965, ADAM-CHOSSON (240) et MONTREUIL et al. (241) montrent que l'extrême variabilité de la composition en glucides de l'ovomucoïde était corrélative du procédé utilisé pour l'obtenir. Les résultats obtenus par ces auteurs se trouvent dans les tableaux VIII p. 42 et IX p. 43. Deux groupes de préparations peuvent être distingués. Dans un premier groupe, les teneurs en oses et en acides sialiques sont élevées et le rapport mannose/galactose égal à 5. Au premier groupe se rattachent les ovomucoïdes obtenus par des procédés brutaux de dénaturation (ébullition en présence ou en absence de sels minéraux, suivie d'une précipitation par l'éthanol à + 20°C : méthodes de NEUMEISTER, DE MÖRNER et de LONGSWORTH et al.). Au second groupe appartiennent les "ovomucoïdes" isolés par des procédés de dénaturation relativement doux (fractionnement éthanolique à - 15°C du filtrat de défécation trichloroacétique du blanc d'oeuf : méthodes de FREDERICQ et DEUTSCH et de LINEWEAVER et MURRAY).

MONTREUIL et al. (242) ont expliqué le désaccord dans les résultats par la nature même de l'hydrolyse appliquée à l'ovomucoïde. En effet, la plupart des auteurs avaient utilisé les résines échangeuses de cations ou l'acide sulfurique pour libérer les oses constituant les glycoprotéines. Or ce procédé ne conduit jamais à une hydrolyse totale. Tandis que la libération du galactose est quantitative, il n'en est pas de même pour le mannose qui fait partie de la fraction stable de la molécule (BRAGG et HOUGH (243) ; MONTREUIL et al. (244) et ADAM-CHOSSON (245)).

TABLEAU VII

Composition en glucides de l'ovomucoïde selon différents auteurs

REFERENCES	GLUCIDES p. 100	OSÉS p. 100	OSAMINES p. 100	ACIDE SIALIQUE p. 100	OSÉS OSAMINES	COMPOSITION (*)
Hofmeister, 1898 (246)	15	-	-	-	-	
Seemann, 1898 (247)	29,4	-	-	-	-	
Langstein, 1900 (248)	10,5	-	-	-	-	
Pavy, 1907 (249)	21,7	-	-	-	-	
Samuely, 1911 (250)	34,9	-	-	-	-	
Neuberget Schenkel, 1912 (251)	24	-	-	-	-	
Izumi, 1925 (252)	26,3	-	-	-	-	
Needham, 1927 (253)	11,5	-	-	-	-	
Levene et Mori, 1929 (254)	-	-	-	-	0,5	Man, GlcNac (1:2)
Sørensen, 1934 (255)	-	9,2	-	-	-	Gal, Man (1:3)
Karlberg, 1936 (256)	23,7	10,2	13,5	-	0,76	
Masamune et Hoshino, 1936 (257)	25	12,5	12,5	-	1	
Hesselvik, 1938 (258)	12,5	-	-	-	-	
Hewitt, 1938 (259)	-	10,5	9,5	-	1,1	Gal, Man
Gurin et Hood, 1939 (260)	25	12,5	12,5	-	1	
Stacey et Woolley, 1940-42 (261)	-	-	-	-	0,57	Gal, Man, GlcNac (1:3:7)
Meyer, 1945 (262)	22 à 26	10	12 à 16	-	-	Man, GlcNac (1:1)
Lineweaver et Murray, 1947 (263)	21,6	-	-	-	-	
Fredericq et Deutsch, 1949 (264)	26,7	9,7	17	-	0,57	
Dixon, 1955 (265)	19,2	10	9,2	-	1,09	Gal, Man, GlcNac (2:7:9)
Gottschalk et Ada, 1956 (266)	21,8	5,7	14,1	2	0,4	Gal, Man, GlcNac (1:3:10)
Odin, 1958 (267)	23,6 à 25	8,6-9	14-15	1	0,60	Gal, Man, GlcNac (1:3:3,7)
Rhodes <i>et al.</i> , 1960 (268)	-	-	-	0,5	-	
Feeney <i>et al.</i> , 1960 (269)	-	-	-	0,7	-	
Bragg et Hough, 1961 (270)	21	8	12,3	0,65	0,65	Gal, Man, GlcNac (1:3,7:7,2)
Hartley et Jevons, 1962 (271,272)	-	-	-	-	-	Gal, Man, GlcNac (1:3,5:7)
Chatterjee <i>et al.</i> , 1962 (273)	20,7	5,7	14,6	0,40	-	Gal, Man, GlcNac (1:4,7:14)
Harbon, 1963 (274,275)	22,7	8,8	13	0,9	0,68	Gal, Man, GlcNac (1:3:6)
Montreuil <i>et al.</i> , 1963 (276)	23,8	8,8	14,2	0,8	0,62	Gal, Man, GlcNac (1:5:9)
Adam-Chosson, 1964 (277)	23,3	8,2	14,2	0,09	0,62	
Jakubcsak, 1971 (278)	22,43	8,0	13,5	0,93	0,59	Gal, Man, GlcNac (2,19:10,95:17,75)
Conchie et Hay, 1983 (279)	25,74	9,10	16,55	0,09	0,54	Gal, Man, GlcNac (2,4:10,5:21,1)

(*) Gal : galactose ; Man : mannose ; GlcNac : N-acétylglucosamine

TABLEAU VIII

Composition centésimale en glucides de préparations d'ovomucoïde obtenues par différentes méthodes (en g p. 100 de protéide).
Selon MONTREUIL et al. (280)

METHODES	AGENT DE DENATURATION	OSES	GlcNAc (*)	ANAN (**)	GLUCIDES TOTAUX	OSES GlcNAc (*)	OSES ANAN (**)
NEUMEISTER (281)	chaleur	9,1	13,5	1,13	21,35	0,674	8,05
MÖRNER I (282)	chaleur	9,3	15,18	1,16	23,08	0,61	8,02
MÖRNER II (283)	chaleur	2,9	4,80	0,32	7,22	0,60	9,06
WERNER et ODIN (284)	chaleur	9,05	14,17	1,41	22,17	0,64	6,42
LONGWORTH <u>et al.</u> (285)	chaleur	10,7	13,69	2,96	24,62	0,78	3,61
LINEWEAVER et MURRAY (286)	ATCA (***)	9,05	14,62	1,43	22,6	0,62	6,33
FREDERICQ et DEUTSCH (287)							
Ovomucoïde "brut"		8,81	13,27	1,27	21,02	0,66	6,94
Fraction IIb		8,1	12,94	1,23	20,05	0,63	6,53
Fraction IIc (ovomucoïde "pur")		9,2	15,41	1,85	21,44	0,60	4,97
MEYER (288)	acétone	9,7	13,05	1,26	21,61	0,74	7,70
FORSYTHE et FOSTER (289)	éthanol	10,1	13,23	1,54	22,39	0,70	6,55
MONTREUIL <u>et al.</u> (290)	phénol	7,9	11,36	1,29	18,50	0,70	6,12

(*) : N-acétylglucosamine ; (**) : acide N-acétylneuraminique ; (***) : acide trichloracétique

TABLEAU IX

Composition en oses neutres, en N-acétylglucosamine et en acide N-acétylneuraminique de préparations d'ovomucoïde obtenues par différentes méthodes (en moles par rapport au galactose). Selon MONTREUIL et al. (291).

METHODES	AGENT DE DENATURATION	Gal (*)	Man (**)	GlcNAc (***)	ANAN (****)
NEUMEISTER (292)	chaleur	1	4,2	8,9	0,6
MÖRNER I (293)	chaleur	1	4,3	9	0,57
MÖRNER II (294)	chaleur	1	4,3	8	0,84
WERNER et ODIN (295)	chaleur	1	5,2	10	0,40
LONGWORTH <u>et al.</u> (296)	chaleur	1	3,5	7,1	0,6
LINEWEAVER et MURRAY (297)	ATCA (*****)	1	5,1	10,6	0,48
FREDERICQ et DEUTSCH (298)					
Ovomucoïde "brut"	ATCA (*****)	1	5,2	10	0,40
Fraction IIb		1	5,1	10,5	0,30
Fraction IIc (ovomucoïde "pur")		1	4,8	9,2	0,40
MONTREUIL <u>et al.</u> (299)	phénol	1	5	10	0,49

* : Galactose

** : Mannose

*** : N-acétylglucosamine

**** : Acide N-acétylneuraminique

***** : Acide trichloracétique

Dans ces conditions, le rapport mannose/galactose est plus faible que dans le cas d'une hydrolyse complète par l'acide chlorhydrique (MONTREUIL et SCHEPPLER (300) ; MICHON et BOURRILLON (301) ; GOT et al. (302)). Il semble donc bien que la valeur du rapport mannose/galactose dans l'ovomucoïde doit être fixée à 4 ou 5 selon le procédé de préparation.

En 1971, BEELEY (303) a fractionné l'ovomucoïde obtenu par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (304) par chromatographie sur sulphoethyl-Séphadex. Deux fractions ont été obtenues : I et II. La fraction I, riche en acide sialique a été rechromatographiée sur le même support et quatre fractions ont été ainsi obtenues : IA, IB, IC et ID. La fraction II, déficiente en acide sialique, a été aussi rechromatographiée de la même façon et une seule fraction (IIR) a été obtenue. La fraction IIR après chromatographie sur DEAE-cellulose a fourni : IIRA, IIRB et IIRC. La composition en sucre des fractions I(IA, IB, IC et ID) et II(IIR, IIRA, IIRB et IIRC) est donnée dans le tableau X p. 45.

Toutes les espèces d'ovomucoïde ainsi obtenues ont une activité antitrypsique, des propriétés immunochimiques et des compositions en acides aminés identiques. Ces espèces sont donc différentes par leur composition en sucres. L'hétérogénéité en charge a été vérifiée par isoélectrofocalisation sur gel.

Des résultats identiques (tableau XI, p. 46) ont été obtenus par JAKUBCZAK (305) par fractionnement de l'ovomucoïde sur CM-cellulose et sous-fractionnement sur DEAE-cellulose. Le fractionnement de l'ovomucoïde sur CM-cellulose a fourni quatre fractions : I, II, III et IV. Après sous-fractionnement de chaque fraction sur DEAE-cellulose, la fraction I fournit Ovo 5 + 6 et Ovo 6 + 7 ; la fraction II fournit Ovo 3 et Ovo 4 ; la fraction III fournit Ovo 1, Ovo 3 et Ovo 4 ; la fraction IV fournit Ovo 1, Ovo 2 et Ovo 3. Les six fractions (Ovo 1, Ovo 2, Ovo 3, Ovo 4, Ovo 5 + 6 et Ovo 6 + 7) obtenues par JAKUBCZAK à partir d'ovomucoïde pur possèdent la même composition en acides aminés, mais elles se distinguent les unes des autres par la composition centésimale en glucides, par le rapport mannose/galactose et par les nombres de résidus de galactose et d'acide N-acétylneuraminique.

TABLEAU X

Composition en sucres des variants d'ovomucoïde (BEELEY (306))

FRACTION	GlcNac (g/100 g)	Hexoses (g/100 g)	Acide sialique (g/100 g)	GlcNac Hexoses	Man Gal	MOLES DE RESIDUS/27.000 g				
						GlcNac	Hexoses	Man	Gal	Acide sialique
IA	15,9	10,5	2,23	1,51	1,6	23,9	15,8	9,7	6,1	1,95
IB	14,9	10,6	1,32	1,41	2,8	22,5	15,9	11,8	4,1	1,15
IC	14,4	9,3	0,65	1,55	3,4	21,7	14,0	10,8	3,2	0,57
ID	14,5	8,9	0,18	1,62	4,4	21,8	13,4	10,9	2,5	0,16
IIR	14,3	8,3	0,10	1,72	5,1	21,5	12,5	10,5	2,0	0,09
IIRA	17,7	9,6	0,04	1,84	7,9	26,7	14,5	12,9	1,6	0,03
IIRB	14,5	7,9	0,03	1,86	4,3	21,9	11,8	9,6	2,2	0,02
IIRC	9,5	7,8	0,04	1,23	13,5	14,3	11,6	10,8	0,8	0,03

TABLEAU XI

Composition centésimale et molaire (*) en glucides des ovomucoïdes 1,2, 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7 (JAKUBCZAK (307))

	DESIGNATION DES OVOMUCOÏDES					
	Ovo 1	Ovo 2	Ovo 3	Ovo 4	Ovo 5+6	Ovo 6+7
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>						
Oses "neutres"	10	7,60	9,40	9,70	11,50	11,60
N-acétylglucosamine	17	13,60	12,20	10,70	13,30	12,20
Acide N-acétylneuraminique						
Méthode de WERNER et ODIN	0	0	1,30	2	4,10	4,50
Méthode d'AMINOFF (**)	0	0	0,60	1	2,20	3,10
Oses "neutres"/NeuAc	0,58	0,55	0,77	0,90	0,85	0,95
<u>MANNOSE/GALACTOSE</u>	3	9	4,5	3,5	2,7	2
<u>COMPOSITION MOLLAIRE</u>						
Galactose	4	1	2,80	3,50	5,10	6,40
Mannose	12	9	12,60	12,40	13,50	12,70
N-acétylglucosamine	22	18	16	14	20	16
Acide N-acétylneuraminique	0	0	1,20	1,85	3,50	4,10

* : Pour une masse moléculaire de l'ovomucoïde de 26.700

** : Après hydrolyse par la neuraminidase.

JAKUBCZAK (308) a démontré aussi par l'électrophorèse sur acétate de cellulose après digestion par la neuraminidase que l'hétérogénéité électrophorétique et chromatographique de l'ovomucoïde était essentiellement liée au nombre de résidus d'acide sialique de ses constituants.

Les fractions (Ovo 1, Ovo 2, Ovo 3, Ovo 4, Ovo 5 + 6 et Ovo 6 + 7) présentent des activités antitrypsiques et des propriétés physiques identiques.

A la lecture de tous ces résultats de composition en sucres, et avec la connaissance actuelle des structures des chaînes glycaniques de l'ovomucoïde, nous pouvons conclure que la composition en monosaccharides de l'ovomucoïde et de ses principaux variants était connue dès 1964 par les travaux effectués par ADAM-CHOSSON (309) et affinée en 1971 par les travaux des groupes de BEELEY et de MONTREUIL. Pour le prouver, nous avons rassemblé dans le tableau XII (p. 48) les résultats des compositions en sucres des ovomucoïdes neutres fractionnés par chromatographie sur SE-cellulose, CM-cellulose et DEAE-cellulose de l'ovomucoïde natif ou des glycopeptides obtenus après digestion protéinasique. En exprimant les rapports molaires en sucres sur la base de 3 résidus de mannose, on constate la grande homogénéité des résultats obtenus par les différentes équipes et qui se caractérisent par une valeur élevée du rapport GlcNAc/Man indice de la présence de glycannes fortement branchés dans l'ovomucoïde. A titre de comparaison, les glycannes biantennés ont un rapport GlcNAc/Man de 1,33 ; les glycannes tétraantennés ont un rapport GlcNAc/Man de 2.

B - STRUCTURE DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE L'OVOMUCOÏDE

La facilité de préparation, avec de bons rendements, de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule ainsi que sa richesse en sucres (24 p. 100 en moyenne) expliquent les recherches très actives autour de la fraction glycanique de cette glycoprotéine. Dès 1918, LEVENNE et SUAREZ (310) dans leurs travaux sur l'association sucre-protéine dans l'ovomucoïde, infirment l'hypothèse d'une association ionique acide mucoïtine

TABLEAU XII

Rapports molaires en monosaccharides et rapport GlcNAc/Man des ovomucoïdes neutres, calculés sur la base de 3 résidus de mannose

REFERENCES	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc/Man
ADAM-CHOSSON (311) (Glycopeptide neutre β)	0,6	3	5,4	1,8
BAYARD (312) (Glycopeptide neutre β)	0,6	3	6,0	2,0
JAKUBCZAK (313) (Ovo 2)	0,3	3	6,0	2,0
BEELEY (314) (Fraction IIR)	0,6	3	6,1	2,03
OEGEMA et JOURDIAN (315) (Fraction EW-OV)	0,75	3	6,9	2,3
WAHEED et SALAHUDDIN (316) (Fraction IIR)	0,3	3	4,5	1,5
CONCHIE et HAY (317) (Fraction IIB)	0,68	3	6,0	2,0

sulfurique-protéine et propose en 1929 (LEVENNE et MORI (318)) un schéma résultant de l'association de la protéine avec des unités polyosidiques constituées par le triholoside : glucosamine + dimannoside.

La première structure du glycanne de l'ovomucoïde a été proposée dès 1940-1942 par STACEY et WOOLLEY (319, 320). Sur la base des résultats de la méthylation, les auteurs décrivent la molécule comme suit : "By glycosidic attachment, seven N-acetylglucosamine units radiate from a central core of three D-mannose units. It is considered that this compound does not represent a repeating unit but rather that it depicts the whole molecule as being that of a hen dicasaccharide. In regard to the structure of ovomucoïde itself, it would appear that the peptide constituents are mainly attached to the N-acetyl-D-glucosamine terminal residues". Le schéma de structure du groupement glycanne de l'ovomucoïde proposé par STACEY et WOOLLEY (321, 322) est illustré dans la figure 7 p. 50.

En 1945, MEYER (323) indique que la fraction polyosidique est liée à la protéine à l'aide d'un diholoside mannose-glucosamine.

En 1961, BRAGG et HOUGH (324), sur la base de résultats de perméthylation, d'hydrolyse ménagée et d'oxydation périodique confirment la réalité de certains motifs structuraux de STACEY et WOOLLEY (325, 326) en particulier, la position externe du galactose par l'identification du 2,3,4,6-tétra-O-méthylgalactose, l'identification de mannotriose et d'un disaccharide mannosylglucosamine.

Utilisant l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule comme matériel, MONTREUIL et CHOSSON (327) en 1962 étudient la cinétique de l'hydrolyse de cette glycoprotéine par différents agents chimiques. Les auteurs montrent que les acides dilués (HCl à pH 1,6 ; HCl 0,1 N, 1N et 2 N ; H₂SO₄ 0,1 N et 0,5 N) libèrent essentiellement des oses tandis que les résines polystyrène sulfonées (Dowex 50 x 8) fournissent des quantités élevées d'oligo- et de polyosides. Quel que soit l'agent d'hydrolyse utilisé, l'acide sialique, le galactose et une partie de la N-acétylglucosamine apparaissent dès le début de l'hydrolyse. Dès cette époque,

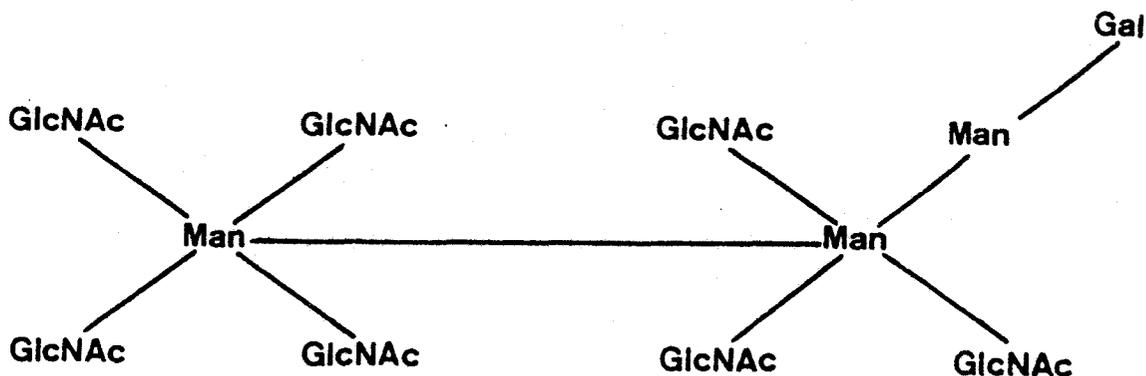


FIGURE 7

Schéma de structure du groupement glycanique de l'ovomucoïde proposé par STACEY et WOOLLEY (328, 329).

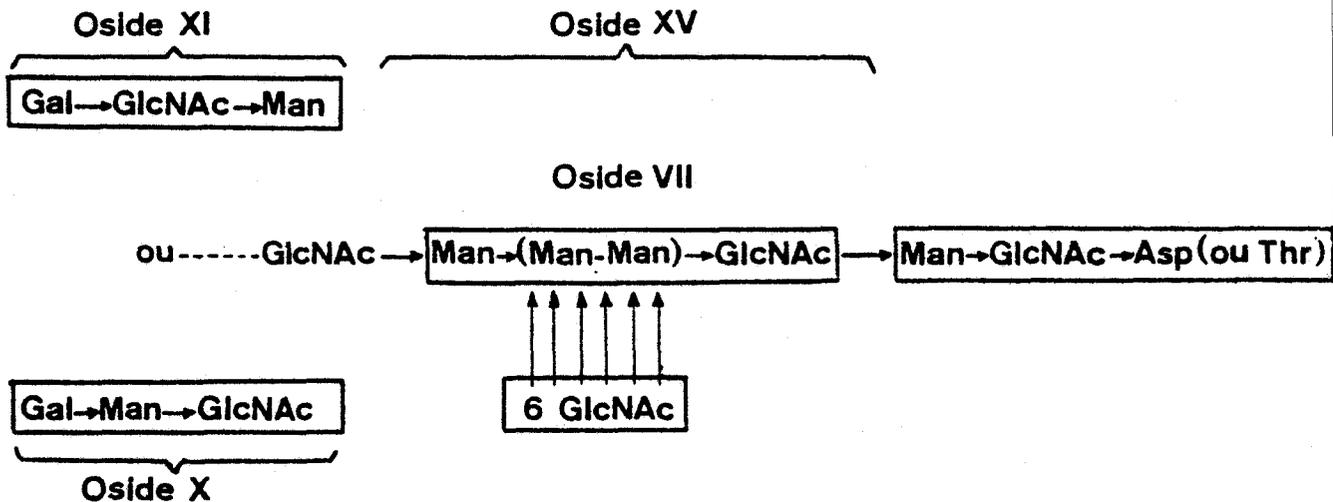


FIGURE 8

Schéma général de structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde selon ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (330).

les auteurs avaient conclu qu'une partie de la N-acétylglucosamine et le mannose font partie de la fraction plus stable de la molécule.

Poursuivant leurs travaux sur la partie polysidique de l'ovomucoïde, CHOSSON et al. (331) et MONTREUIL et al. (332) isolent des hydrolysats partiels de cette glycoprotéine par une résine polystyrène sulfonée, 13 oligosaccharides. Parmi ceux-ci, la lactosamine et le galactosidomannose apparaissent dès le début de l'hydrolyse, ce qui indique qu'ils se situent à l'extrémité des chaînes polysidiques. La caractérisation de polysides riches en mannose dans ces hydrolysats partiels permet de conclure en l'existence de séquences polymannosidiques sur lesquelles se grefferaient des molécules de N-acétylglucosamine. En cela, les auteurs ne sont pas éloignés du schéma de structure proposé par STACEY et WOOLLEY (333, 334). Enfin, la caractérisation de nombreux oligosaccharides à résidus N-acétylglucosamine en position terminale réductrice indique la fragilité des liaisons "N-acétylglucosaminidyl" vis-à-vis de l'action de l'échangeur de cations.

Etendant leurs recherches à d'autres glycoprotéines (uro-mucoïdes et séromucoïdes de l'Homme, du Boeuf, du Cheval, du Porc, du Mouton et du Veau ; Lactomucoïdes totaux du lait de Femme et du lait de Vache ; orosomucoïde ; sidérophiline ; α -globulines humaines et bovines ; lactosidérophiline ; gynolactomucoïde I) MONTREUIL et al. (335) et ADAM-CHOSSON (336) identifient de la N-acétyllactosamine parmi les produits de l'hydrolyse acide partielle de ces différentes glycoprotéines. En outre, ils démontrent que la N-acétylglucosamine et le galactose sont libérés dès le début de l'hydrolyse tandis que le mannose apparaît systématiquement d'une manière tardive. Ces résultats permettent aux auteurs, dès 1962, de poser en hypothèse l'existence d'un schéma général de structure commune à la plupart des glycoprotéides dans lequel l'acide sialique et le fucose occuperaient la position la plus externe suivis du galactose et d'une partie des osamines ; le reste des osamines et le mannose constituant la fraction interne plus stable de la molécule. Ces résultats sont confirmés par ces mêmes auteurs en 1965 (MONTREUIL et al. (337) et l'hypothèse de l'existence d'un schéma général de structure de la fraction glucidique des glycoprotéides d'origine animale est de nouveau formulée sur la base, principalement, des résultats de l'hydrolyse acide partielle de diverses glycoprotéines.

En 1965, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (338) publient les structures partielles de 15 oligosides (tableau XIII, p. 53) isolés des hydrolysats partiels de l'ovomucoïde. Tenant compte de ces résultats, les auteurs proposent un schéma général du groupement polyosidique de l'ovomucoïde (figure 8, p. 50). Le schéma rend compte des résultats obtenus jusqu'à cette date : - le galactose et une partie de la N-acétylglucosamine se trouvent en position externe ;

- la libération immédiate de galactosidomannose et de la N-acétyllactosamine indique que ces osides se trouvent en position externe ;

- l'identification de deux séquences terminales non réductrices Gal → Man → GlcNAC et Gal → GlcNAC → Man ;

- l'isolement d'un mannotriose, la libération tardive du mannose, du mannobiose et du mannotriose, la stabilité du mannose vis-à-vis de l'acide periodique est en faveur de l'existence d'un "noyau" formé essentiellement de mannose sur lequel viendraient se brancher des molécules de N-acétylglucosamine et les séquences Gal → Man → GlcNAC ou Gal → GlcNAC → Man.

Se fondant sur l'hypothèse qu'ils avaient émise (MONTREUIL et al. (339), ADAM-CHOSSON (340) et MONTREUIL et al. (341) de l'existence d'un schéma général de structure de la fraction glucidique de nombreuses glycoprotéines d'origine animale, FOURNET et al. (342) isolent de l'orosomucoïde les mêmes mannobioses I et II qu'ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (343) avaient préparés de l'ovomucoïde. L'application de la perméthylation à ces oligosaccharides permit aux auteurs de préciser la structure de ces deux disaccharides comme étant, pour le mannobiose I : le mannosido 1 → 6 mannose et pour le mannobiose II, le mannosido 1 → 3 mannose.

Reprenant l'étude systématique des procédés de perméthylation des glucides, DUPONT (344) utilise l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule comme substrat pour la mise au point de ces techniques. L'application de la méthode d'HAKOMORI (345) lui permit d'identifier dans les hydrolysats acides du glycopeptide β (MONSIGNY et al. (346)) perméthylé les composés suivants : un dérivé monométhylé du mannose, un dérivé diméthylé du mannose, les 2,4,6 et le 3,4,6-tri-O-méthylmannoses, les 2,3,4,6-tétra-O-méthylmannose

TABLEAU XIII

Composition en oses, schémas de structure et comportement chromatographique d'osides isolés de l'hydrolysate de l'ovomucoïde par un échangeur de cations (ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (347)).

DESIGNATION DES GLUCIDES	R _f GALACTOSE DES OSIDES DANS LES SYSTEMES- SOLVANTS		COMPOSITION ET SCHEMAS DE STRUCTURE DES OSIDES (***)
	1 (*)	2 (**)	
I	0,85	0,75	Gal-β-1,4-GlcNHAc (N-acétyllactosamine)
II	0,80	0,75	Gal → Man
III	0,70	0,60	Man → GlcNHAc
IV	0,70	0,60	GlcNHAc → Man
V	0,68	0,65	Man → Man (mannobiose I)
VI	0,63	-	Man → Man (mannobiose II)
VII	0,50	-	Man → (Man, Man)
VIII	0,48	0,37	Man → Man → GlcNHAc
IX	0,42	0,30	(Man, GlcNHAc) → Man
X	0,38	0,40	Gal → Man → GlcNHAc
XI	0,30	0,30	Gal → GlcNHAc → Man
XII	0,14	0,11	(Man, Man, GlcNHAc) → Man
XIII	0,13	0,05	(Man, Man, GlcNHAc) → GlcNHAc
XIV	0,09	-	Man → (Man → Man) → GlcNHAc
XV	0,05	0,05	GlcNHAc → (Man → (Man → Man) → GlcNHAc)

(*) n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)

(**) pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2)

(***) Gal : galactose ; Man : mannose ; GlcNHAc : N-acétylglucosamine

et galactose, les 3,6-di-O-méthyl et 3,4,6-tri-O-méthylglucosamines. Associés aux résultats de l'hydrolyse acide ménagée et de l'oxydation periodique, DUPONT (348) proposa un schéma fragmentaire de structure pour la fraction neutre de l'ovomucoïde (figure 9 p. 55).

Dans le même temps, dans le groupe de MONTREUIL, BAYARD reprend les études de rupture ménagée des chaînes glycaniques des glycoprotéines. Pour les mêmes raisons qui ont fait choisir l'ovomucoïde par DUPONT (349) pour étudier la méthylation : rapidité de préparation, bon rendement, composition en glucide simple, BAYARD met au point un procédé d'acétolyse partielle sur l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule (BAYARD et MONTREUIL (350) ; BAYARD et MONTREUIL (351) ; MONTREUIL (352) ; BAYARD et al. (353) ; BAYARD (354) ; BAYARD et al. (355) ; MONTREUIL (356) ; MONTREUIL (357) ; BAYARD et MONTREUIL (358) ; BAYARD et al. (359) ; CHAMBERS et al. (360)). Treize oligosaccharides ont pu ainsi être isolés à partir de la fraction neutre des acétolysats de l'asialoglycopeptide β obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde de Poule et leur structure déterminée (tableau XIV, p. 56). La connaissance de la structure de ces oligosaccharides a permis aux auteurs de poser en hypothèse que l'acétolyse coupait 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 possédait un résidu de 2-acétamido-2-déoxy-D-glucose en position terminale réductrice. Malheureusement, les résultats obtenus par BAYARD ne sont pas interprétables du point de vue de la connaissance de la structure de la fraction glycanique de l'ovomucoïde. Nous pouvons cependant dire, actuellement, que l'oligosaccharide M représente une partie importante des molécules de glycannes tri-, tétra- et pentaantennés obtenus à partir de nombreuses glycoprotéines (MONTREUIL (361, 362)). Ces oligosaccharides isolés par BAYARD en quantité importante ont été précieux pour la mise au point de procédés de cartes chromatographiques : chromatographie en phase gazeuse (CHAMBERS et al. (363)) ; chromatographies de partage sur papier comparatives des hydrolysats et des acétolysats (BAYARD et al. (364) ; MONTREUIL (365)) pour l'étude des voies de fragmentation des oligosaccharides par Impact Electronique (E.I.) et Ionisation Chimique (C.I.) en spectrométrie de masse (FOURNET et al. (366)) et pour

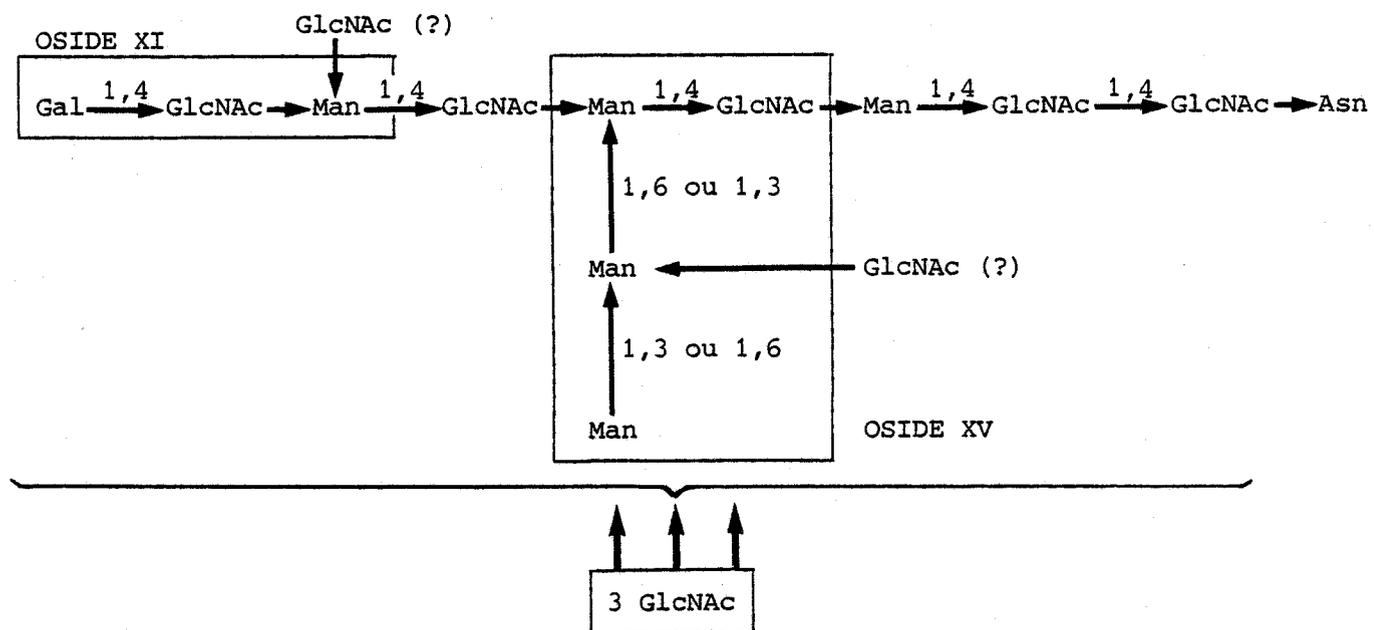


FIGURE 9

Schéma fragmentaire de structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde selon DUPONT (367).

TABLEAU XIV

Structure des 13 oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule selon BAYARD et al. (368).

REFERENCES	STRUCTURES
A	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Man
B	β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc
C	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)-Man
D	α -Man-(1 \rightarrow 3)-Man
E	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 3) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2) \swarrow Man
F	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow Man
G	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -Man-(1 \rightarrow 3)-Man
H	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)-Man
I	α -Man-(1 \rightarrow 3) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow Man
J	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow Man
K	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow α -Man-(1 \rightarrow 3)-Man
L	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -Man-(1 \rightarrow 3) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow Man
M	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2) \searrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -Man-(1 \rightarrow 3) \swarrow β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) \swarrow Man

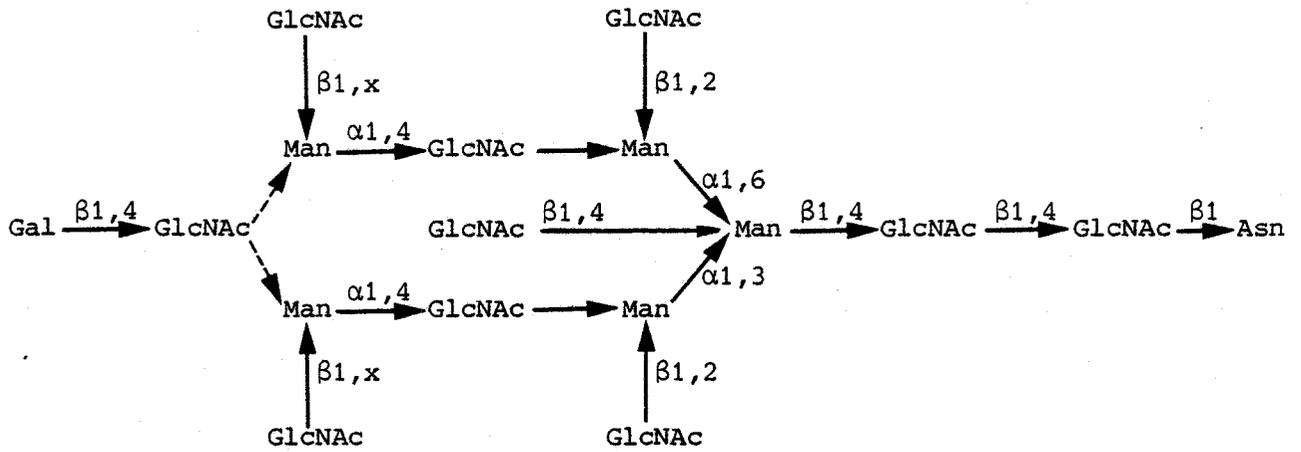


FIGURE 10

Schéma de structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde proposé sur la base des résultats de l'hydrazinolyse selon BAYARD et MONTREUIL (381)

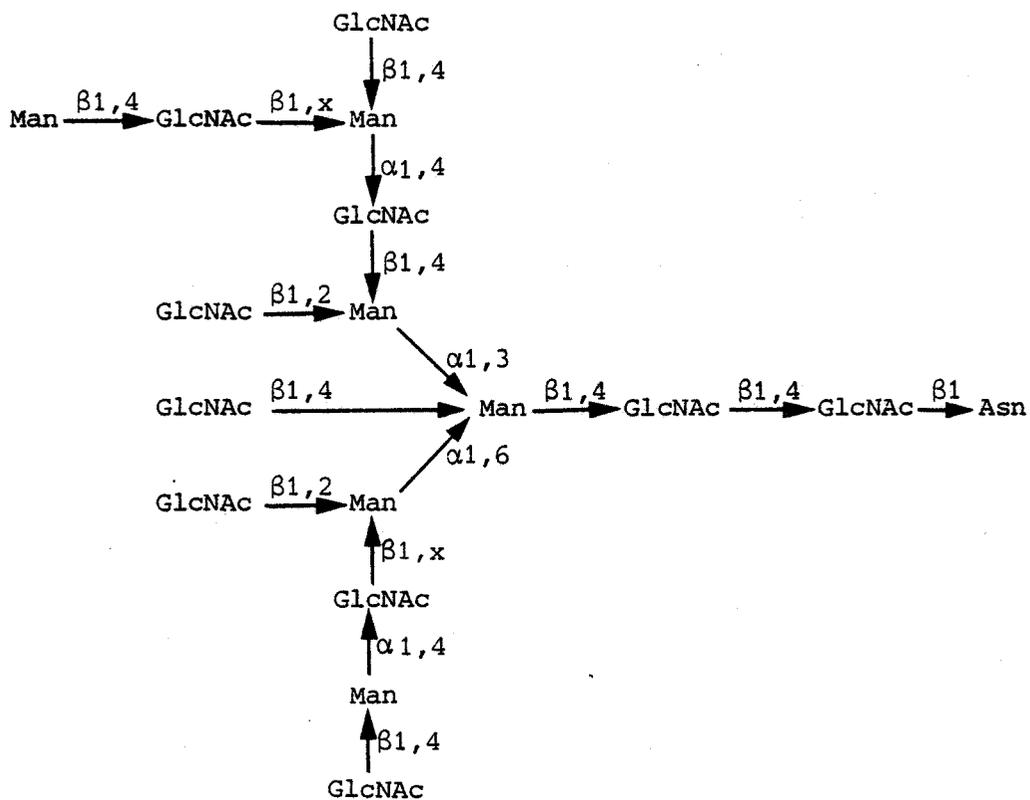


FIGURE 11

Schéma de structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde selon MONTREUIL (382)

Le perfectionnement des techniques d'analyse des éthers méthyliques par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à un spectromètre de masse (g.l.c. - m.s.) a permis au groupe de MONTREUIL de reprendre en 1980 les travaux sur les structures des ovomucoïdes. En effet, travaillant parallèlement sur l'ovomucoïde du blanc de Poule et de Tourterelle, MONTREUIL et al. (383) identifient par g.l.c. - m.s. deux éthers monométhyliques du mannose, le 2-mono-O-méthyl-mannose et le 3-mono-O-méthyl-mannose leur permettant de conclure à "An unusual substitution of α -mannose residues in glycans of N-glycosyl-proteins : ovomucoids" et qu'en particulier un des deux résidus d' α -mannose est trisubstitué, en position C₄ du Man_{1,6} ou en position C₆ du Man_{1,3}. Sur la base des résultats de la composition en sucre, de la méthylation, de l'hydrazinolyse et de l'hydrolyse enzymatique, FRANCOIS-GERARD et al. (384) proposent la première structure pentaantennée pour un des glycopeptides isolé d'un hydrolysate de l'ovomucoïde de Tourterelle et possédant une activité antigénique P₁ (Figure 12 p. 60). Trois ans plus tard, ces mêmes auteurs (FRANCOIS-GERARD et al. (385)) aidés par le groupe de VLIEGENTHART déterminent la structure d'un autre glycopeptide pentaantenné, le glycopeptide P-3 (Figure 13 p. 60).

Reprenant l'ovomucoïde, l'ovalbumine et la fêtuine comme substrats de mise au point de technique concernant l'hydrolyse des perméthylglycannes et l'analyse des éthers méthyliques libérés (CONCHIE et al. (386)) identifient uniquement dans les hydrolysats des glycopeptides perméthylés de l'ovomucoïde, les deux éthers monométhyliques du mannose qu'avaient caractérisés (MONTREUIL et al. (387)).

En 1983, CONCHIE et HAY (388) isolent par DEAE-cellulose un ovomucoïde neutre qu'ils attaquent par la pronase. Par fractionnement sur colonne de résine échangeuse de cation (Dowex 50 x 2) ces auteurs obtiennent 3 fractions qui diffèrent uniquement par leur composition en galactose. La dégradation séquentielle du glycopeptide majeur conduit au pentasaccharide α -D-Man-(α -D-Man)- β -D-Man- β -D-GlcNAc- β -D-GlcNAc-Asn. L'étude par perméthylation et dégradation séquentielle à l'aide d'exoglycosidases (CONCHIE et al. (389)) montre que tous les glycopeptides de l'ovomucoïde possèdent une structure commune illustrée dans la figure 14 p. 62, que l'hétérogénéité

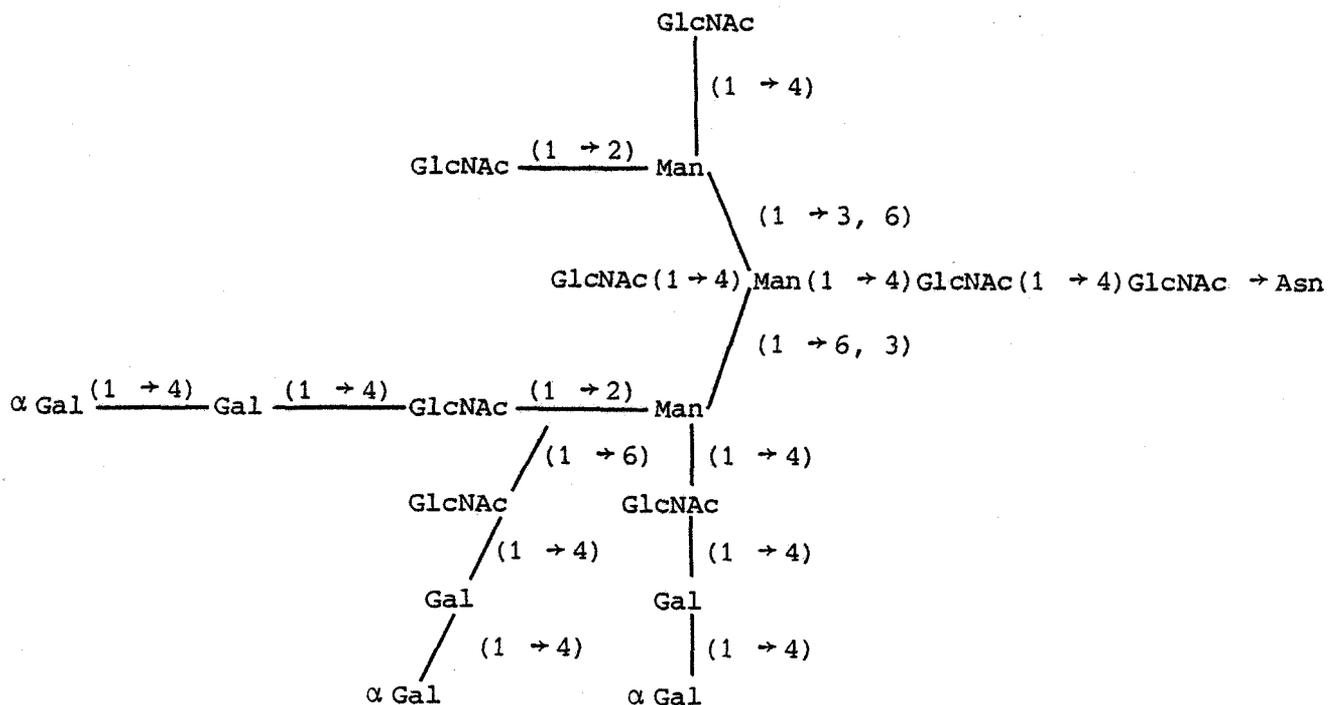


FIGURE 12

Structure d'un glycopeptide isolé d'hydrolysate pronasique d'ovomucoïde de Tourterelle et possédant une activité antigénique P₁ (FRANCOIS-GERARD et al. (390)).

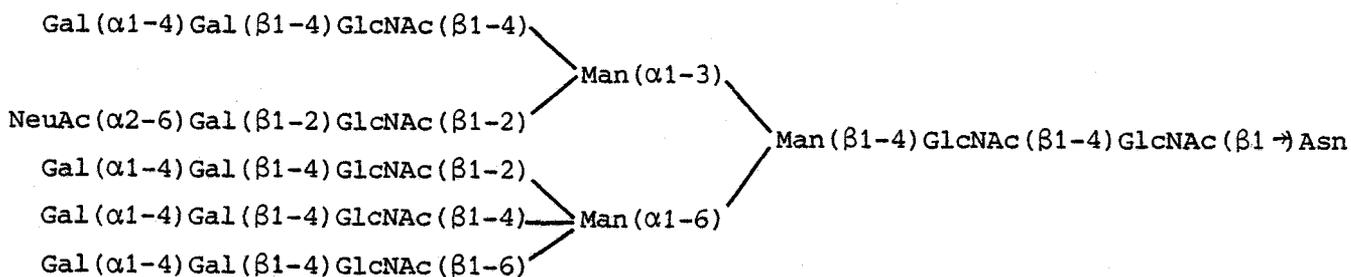


FIGURE 13

Structure primaire du glycopeptide P-3 isolé de l'ovomucoïde de Tourterelle (FRANCOIS-GERARD et al. (391)).

était due à la localisation du galactose terminal non réducteur lié *via* une hexosamine sur le résidu α -D-Man(1 \rightarrow 3) et au nombre d'hexosamines terminales attachées au résidu α -D-Man(1 \rightarrow 6) et que enfin, un glycopeptide possédait des structures inhabituelles (structures 2 et 3), caractérisées par deux résidus de mannose, substitués trois fois. Les structures de ce glycopeptide sont illustrées dans la figure 15, p. 62.

La même année, travaillant sur les oligosaccharides libérés par hydrazinolyse de l'ovomucoïde de Poule, les groupes de KOBATA au Japon et MONTREUIL en France arrivent à la même conclusion de l'existence de structure pentaantennée dans cette glycoprotéine. L'existence d'une telle structure avait été démontrée dès 1980 par MONTREUIL et al. (392,393) par la mise en évidence de deux résidus de mannose trisubstitués dans les hydrolysats de perméthylglycopeptides d'ovomucoïde de Poule et de Tourterelle.

L'hydrazinolyse de l'ovomucoïde de Poule suivie de la N-réacétylation des osamines et de la réduction en présence de borohydrure tritié a conduit YAMASHITA et al. (394) à l'obtention d'un mélange d'oligosaccharides-alditols qu'ils fractionnent, par électrophorèse préparative (figure 16, p. 63) en une fraction neutre (85 % du total des oligosaccharides-alditols) et deux fractions acides. La fraction neutre est chromatographiée sur colonne de Biogel P₄ et fournit huit fractions radioactives N-1 à N-8 (figure 17, p. 63). Les fractions N-1, N-2, N-4 et N-8 se révèlent être homogènes en chromatographie sur papier alors que les fractions N-3, N-5, N-6 et N-7 sont séparées en deux pics appelés : N-3a, N-3b, N-5a, N-5b, N-6a, N-6b, N-7a et N-7b, respectivement. La structure de ces 12 oligosaccharides a été effectuée (YAMASHITA et al. (395)) en associant l'hydrolyse séquentielle par les exoglycosidases, la méthylation et l'oxydation périodique. Nous avons rassemblé dans le tableau XV, p. 64, les structures des différents oligosaccharides alditols déterminés par le groupe de KOBATA (YAMASHITA et al. (396, 397)).

Il est à noter que HASE et al. (398), travaillant sur les hydrazinolysats d'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Caille isolent par H.P.L.C. un oligosaccharide majeur de même structure que l'oligosaccharide N-8 de YAMASHITA (399, 400) correspondant au trimannosido chitobiose $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 6)\{\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 3)\}\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$.

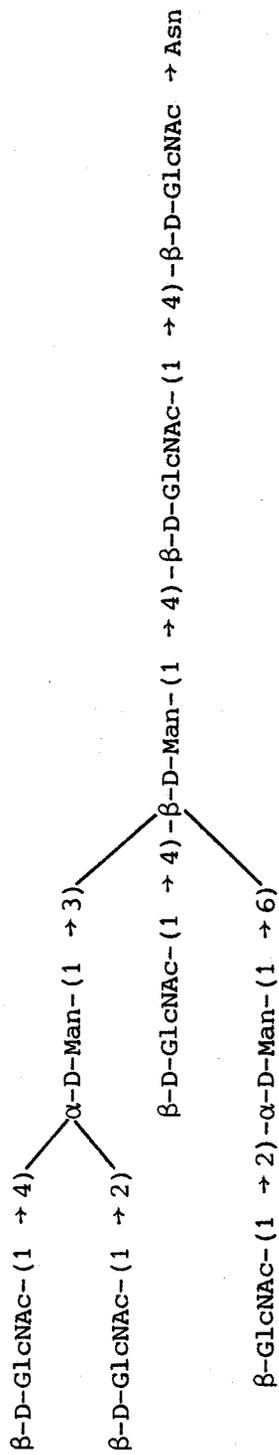


FIGURE 14

Structure de base des glycopeptides isolés de l'ovomucoïde de Poule (CONCHIE et al. (401)).

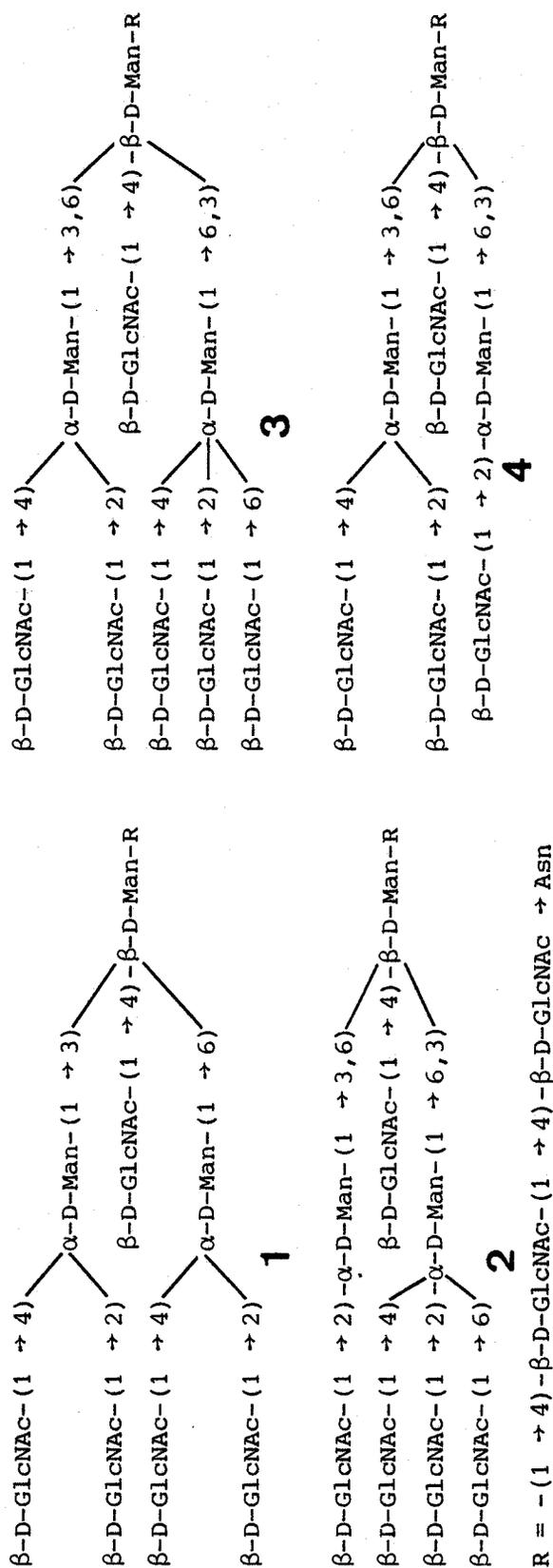


FIGURE 15

Structures proposées par CONCHIE et al. (402) pour le glycopeptide 2.

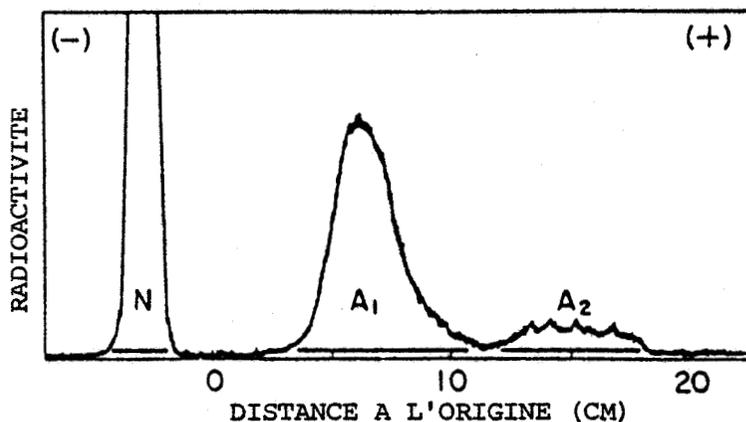


FIGURE 16

Electrophorèse sur papier des oligosaccharides-alditols libérés de l'ovomucoïde de Poule par hydrazinolyse (YAMASHITA et al. (403)).
 N : fraction neutre ; A₁ et A₂ : fractions acides ; tampon pyridine/ acétate pH 5,4 ; 80 V/cm ; 1,5 heures.

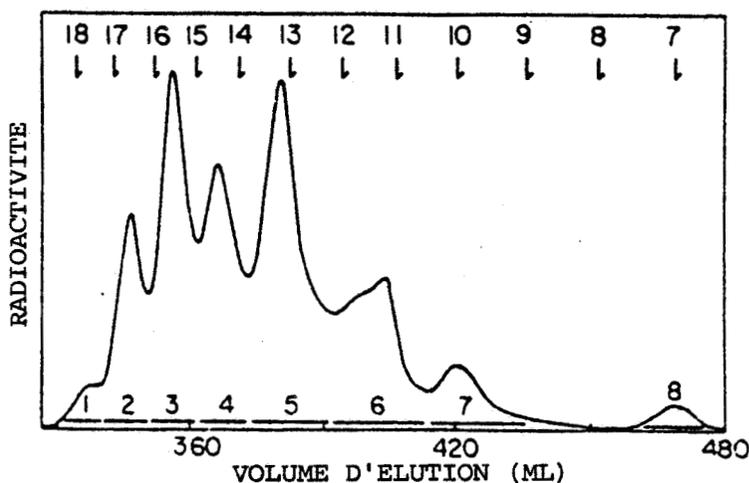
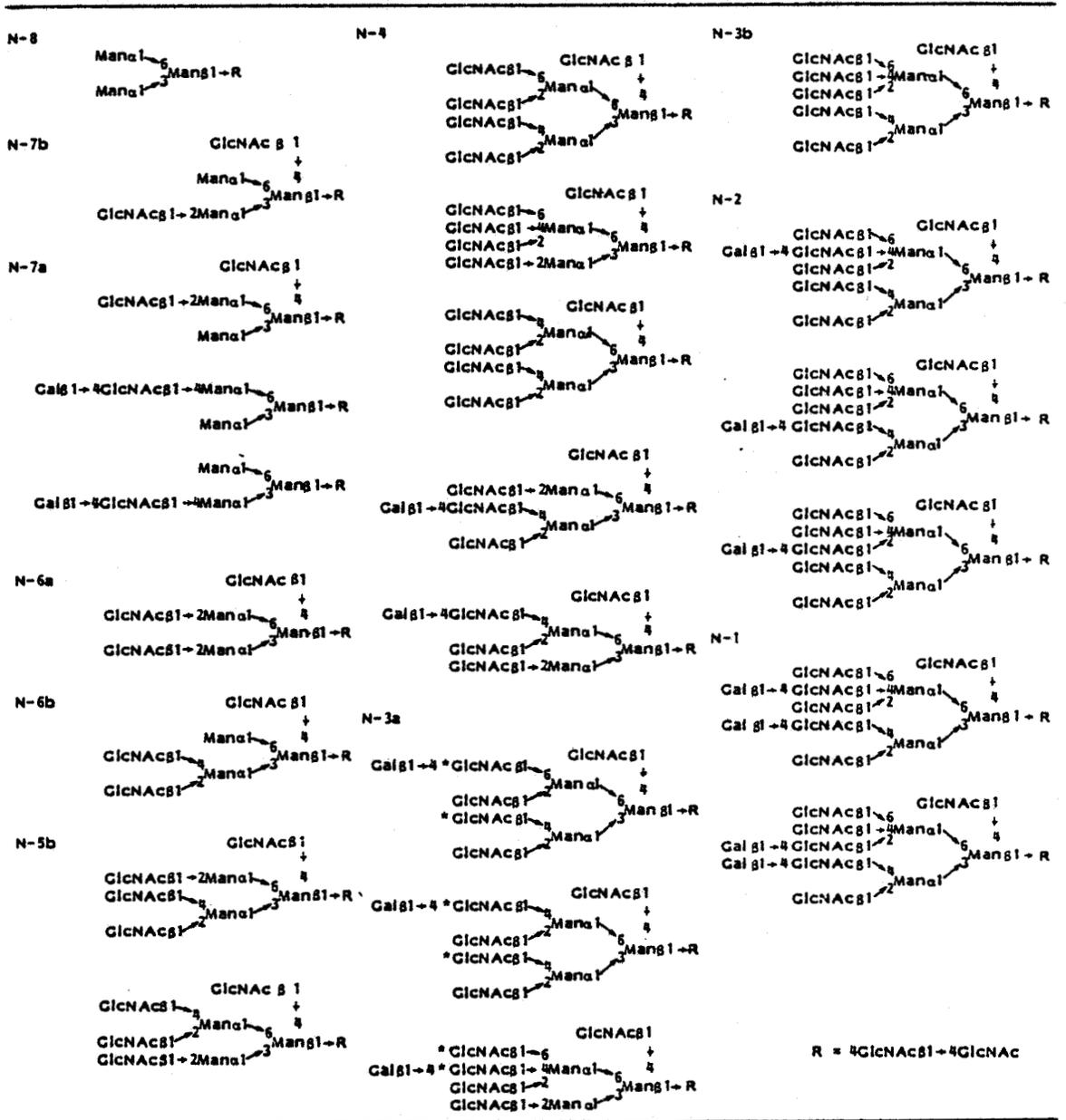


FIGURE 17

Chromatographie sur colonne de Biogel P₄ des oligosaccharides-alditols neutres obtenus par électrophorèse préparative (fig.16). Les flèches au sommet de la figure indiquent les emplacements d'éluion d'oligosaccharides à glucose, dont le nombre de résidus est indiqué par le chiffre placé au dessus. Les chiffres placés en bas de la figure indiquent les fractions collectées.

TABLEAU XV

Structure des oligosaccharides alditols isolés par hydrazinolyse de l'ovomucoïde de Poule (YAMASHITA *et al.* (404, 405, 406)).



Cette étude, ainsi que celle que nous développerons dans le chapitre Travaux Personnels et qui conduiront, à l'aide de techniques différentes à l'isolement d'oligosaccharides de structure identique, indiquent que les chaînes glucidiques de l'ovomucoïde sont tout à fait particulières à cette molécule et qu'en particulier, elles se distinguent très nettement de celle de l'ovalbumine de Poule (MONTREUIL (407, 408)). Nous confrontons nos résultats ainsi que ceux des auteurs mentionnés précédemment dans la conclusion générale de notre mémoire.

VIII. L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE.

L'ovomucoïde inhibe les activités protéolytique et estérasique de la trypsine en formant avec l'enzyme un complexe équimolaire (LINEWEAVER et MURRAY (409) ; RHODES et al. (410)). En cela, l'ovomucoïde ressemble à bon nombre d'autres protéines qui partagent la propriété d'inhiber la trypsine. Les revues générales de LASKOWSKI et LASKOWSKI (411) et de GREEN et NEURATH (412) traitent de ce sujet.

En 1947, LINEWEAVER et MURRAY (413) avaient aussi reconnu à l'ovomucoïde une action sur la chymotrypsine que WU et LASKOWSKI (414) ont infirmée en 1955 et que WEIL et TIMASHEFF (415), au contraire, ont confirmée en 1960. En 1963, FEENEY et al. (416) ont montré que l'inhibition de la chymotrypsine par l'ovomucoïde était due à la contamination de l'ovomucoïde par l'ovoinhibiteur de MATSUSHIMA (417).

L'activité antitrypsique de l'ovomucoïde n'est pas affectée par l'acide trichloroacétique et les sels neutres, mais elle décroît sous l'action de la température, particulièrement en milieu alcalin comme le démontre la figure 18 p. 67. Cette observation suggère une dénaturation partielle de l'ovomucoïde préparé par les procédés à l'ébullition. L'isolement d'un matériel cristallisé inactif contenant des quantités équimoléculaires d'enzyme et d'inhibiteur pour les inhibiteurs du pancréas, du soja et du colostrum de vache a démontré la formation dans ces cas d'un complexe entre l'inhibiteur et la trypsine. Pour l'ovomucoïde l'existence d'un complexe similaire a été suggérée du fait : a) que par électrophorèse un mélange d'ovomucoïde et de trypsine migre comme un composé de mobilité intermédiaire entre celle de l'ovomucoïde et de la trypsine (figure 19, p. 68). b) que l'ultracentrifugation du mélange produit une frontière de sédimentation avec un coefficient de sédimentation de 3,8 à comparer avec la valeur de 2,6 lorsque l'une ou l'autre des molécules est déposée seule (SRI-RAM et al. (418) ; RHODES et al. (419)). Cependant, en première approximation, une relation d'équivalence un pour un est déjà une bonne preuve de l'existence de complexes impliquant plus d'une trypsine par ovomucoïde (mais pas plus d'un ovomucoïde par trypsine ; SRI-RAM et al. (420)).

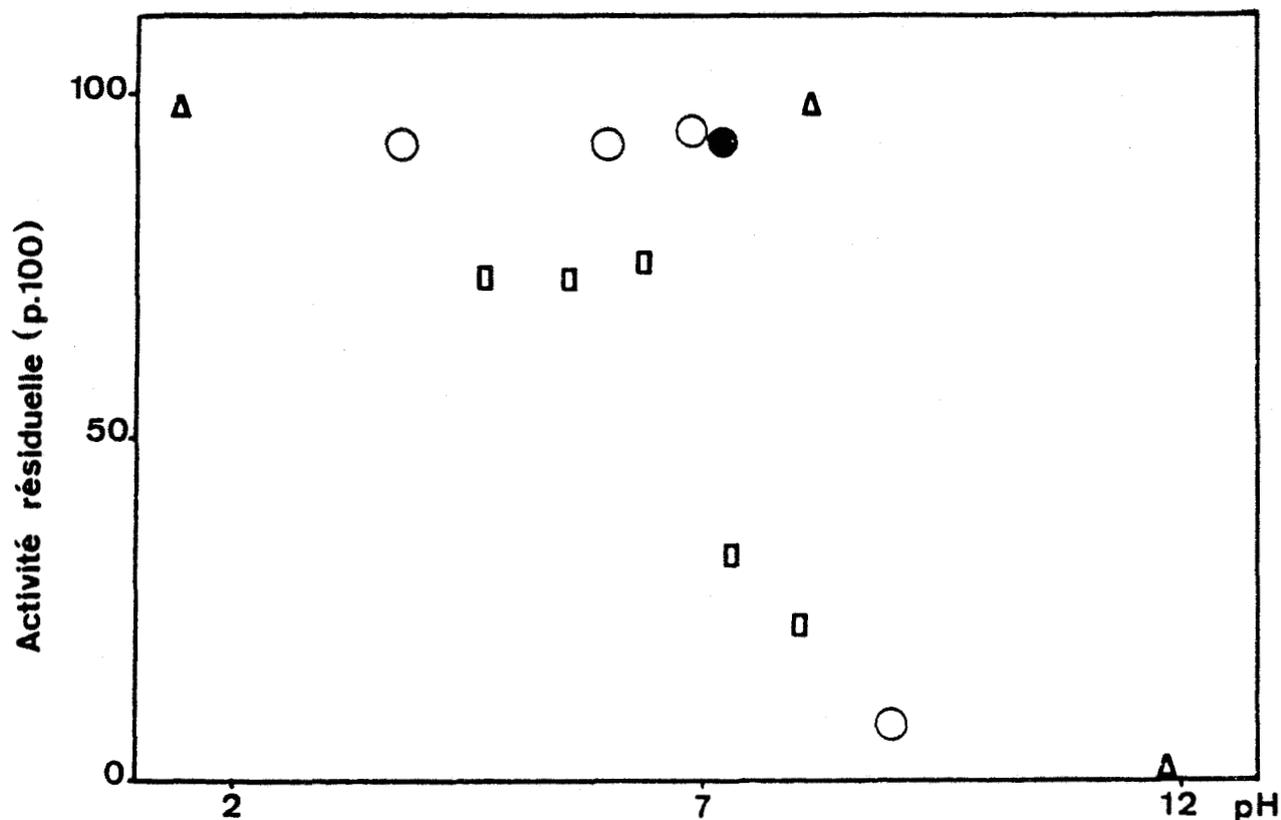


FIGURE 18

Action du pH et de la température sur l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde. Des solutions d'ovomucoïde ont été soumises à diverses conditions de pH et de température. L'activité inhibitrice résiduelle a été mesurée à pH 8.

△ : Température du Laboratoire (JIRGENSON et al. (421)).

○ : Après chauffage à 80°C pendant 30 minutes (LINEWEAVER et MURRAY (422)).

● : Après chauffage à 80°C pendant 30 minutes dans une solution d'urée 9 M (STEVENS et FEENEY (423)).

□ : Après chauffage à 100°C pendant 15 minutes (DEUTSCH et MORTON (424)).

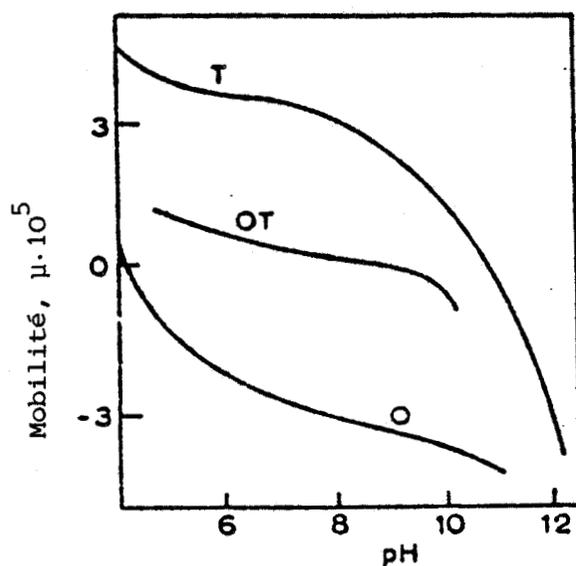


FIGURE 19

Mobilité électrophorétique ($\mu = \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) de trypsine (T), d'ovomucoïde (O) et son complexe équimolaire (OT) en fonction du pH (SRI-RAM *et al.* (425)). Pour l'O et l'OT, la force ionique est égale à 0,10 ; pour T, la force ionique est égale à 0,13.

L'interaction entre la trypsine et l'ovomucoïde en l'absence de substrats survient trop rapidement pour être mesurée directement, mais la constante de dissociation du complexe a été estimée à 5×10^{-9} M. Si les groupements carboxyles de l'ovomucoïde sont bloqués par estérification ou bien si les groupements aminés de la trypsine sont acétylés, la formation du complexe est sévèrement retardée (FRAENKEL-CONRAT et al. (426) ; FRAENKEL-CONRAT et al. (427) ; SRI-RAM et al. (428)). La dissociation du complexe en ses composants à des valeurs de pH inférieures à 3 (GREEN (429) ; SRI-RAM et al. (430)) pourrait suggérer que l'ionisation des groupements carboxylés de l'enzyme ou de l'inhibiteur ou des deux est essentielle pour l'interaction. Cependant, la formation du complexe ne peut pas être expliquée seulement en termes d'attraction électrostatique entre molécules de charge nette opposée parce que :

- a) l'un au moins des inhibiteurs tryptiques (l'inhibiteur pancréatique ; GREEN et WORK (431)) a un point isoélectrique similaire à celui de la trypsine ;
- b) une courte exposition à pH 12 détruit irréversiblement l'activité antitryptique de l'ovomucoïde déterminée à pH 8 mais, comme on peut le supposer, ne doit pas changer beaucoup sa charge nette ;
- c) si le site actif de l'enzyme est occupé par le substrat, l'affinité de l'enzyme pour les protéines inhibitrices est grandement réduite ou supprimée (GREEN (432)) ;
- d) si la trypsine est inactivée par la présence de diisopropyl fluorophosphate, $HgCl_2$ ou l'urée 6M, la formation d'un complexe avec l'ovomucoïde n'a pas lieu (GREEN (433) ; MELAMED (434)).

L'addition graduelle d'ovomucoïde à une quantité donnée de trypsine apporte tout d'abord une réduction de l'activité qui est proportionnelle à la quantité d'ovomucoïde ajoutée. Mais lorsque le point d'équivalence est approché, l'ovomucoïde additionnel a de moins en moins d'effet et même un large excès n'abolit pas entièrement l'activité enzymatique (figure 20, p. 70) ; (GORINI et AUDRAIN (435)).

Ces résultats ont été interprétés de différentes façons et peuvent revêtir une certaine importance si l'action anti-tryptique de l'ovomucoïde fait partie de son rôle naturel dans le développement de l'embryon.

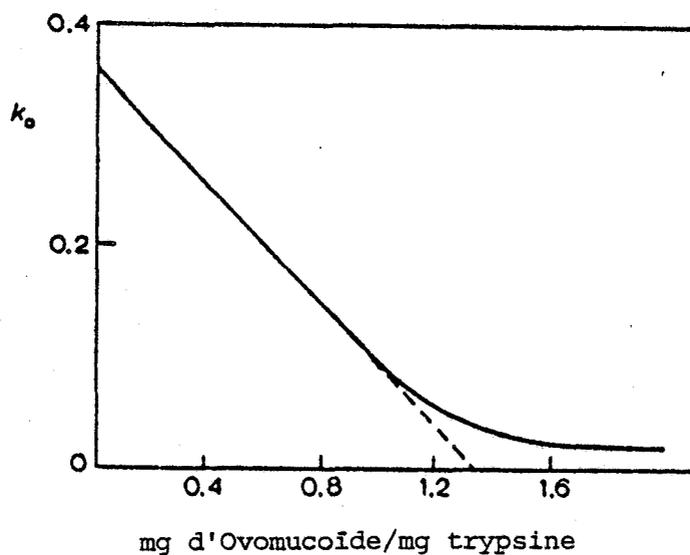


FIGURE 20

L'effet de l'ovomucoïde sur l'activité de la trypsine. K_o = moles de substrat hydrolysé par litre par minute par milligramme d'azote de la trypsine par millilitre dans 0,1 M de tampon borate à pH 7,8 plus 0,01 M CaCl_2 (GREEN (436)).

Substrat : ester éthylique de l'acide arginobenzoïque 0,05 M ; enzyme : 0,72 μM .

Un aspect de l'inhibition qui a été difficile à établir avec certitude est dans quelle mesure cette inhibition est compétitive avec le substrat. Ceci est dû aux constantes de dissociation des inhibiteurs (dans la région de 10^{-9} M) qui sont beaucoup plus faibles que la constante de Michaelis de l'enzyme lorsqu'il agit sur les substrats protéiques habituels (environ 10^{-2} M). Il en résulte qu'une inhibition compétitive ne pourrait pas être démontrée par les méthodes habituelles. Avec l'ester éthylique de l'acide arginobenzoïque (où la trypsine a une constante de Michaelis d'environ 10^{-5} M) il a été montré que les inhibiteurs protéiques pouvaient déplacer le substrat et vice versa, ce qui démontre clairement un type d'inhibition compétitif (GREEN (437)).

Vu la déviation de la linéarité, il n'est pas possible de déterminer le point exact d'équivalence dans la titration de la trypsine avec l'ovomucoïde (figure 20, p. 70). L'activité de l'ovomucoïde est ainsi mieux exprimée comme le double de la quantité requise pour produire 50 p. 100 de l'inhibition d'une activité trypsique donnée, et le substrat doit être aussi précisé puisque ceci affectera le résultat (CASTANADA-AGULLO (438) ; FRAENKEL-CONRAT et al. (439)). Il est bien établi que même une trypsine recristallisée peut contenir une proportion variable de matériel inactif et non trypsique (LIENER (440) ; COLE et KINKADE (441) ; BUCK et al. (442) ; MAROUX et al. (443)). Il n'est donc pas possible de comparer avec précision différentes préparations de trypsine où l'activité est exprimée en terme de poids (ou d'adsorption à 280 nm) de "trypsine". De tels résultats ne sont utilisables que pour une comparaison directe des activités déterminées en parallèle.

L'effet particulier de l'injection du blanc d'oeuf frais à des rats (0,5 à 1,5 ml par adulte), noté en premier par PARKER et PARKER (444), a été décrit en détail par SELYE (445). Le syndrome (qui est aussi provoqué par du dextran de masse moléculaire 100.000) est caractérisé par un prurit général suivi d'un oedème apparent des extrémités, une augmentation de l'hématocrite et une baisse de la température corporelle. L'action est beaucoup plus importante chez des rats adrénalectomisés ou suivant une administration de thyroxine. Le

blanc d'oeuf provoque dans ces cas un choc sévère avec chute de tension (LEGER et MASSON (446) ; HALPERN et BRIOT (447)). Les effets chez des rats normaux sont dûs en grande partie à une augmentation de la perméabilité capillaire qui peut être démontrée directement par le test dermique très sensible, en utilisant le bleu d'Evans. Dans ce cas, 0,05 ml d'une solution protéique contenant 1 µg d'azote suffit à provoquer une réponse (HALPERN (448)). La fraction de l'ovomucoïde de HEKTOEN et COLE (449) : un précipité éthanolique de surnageant de blanc d'oeuf dilué et coagulé par la chaleur a donné une réaction totale à raison de 15 mg par rat adulte, tandis que le reste du blanc d'oeuf était inactif (LEGER et MASSON (450)). Le matériel préparé par précipitation à l'acétone et au trichloroacétate à pH 3,5 (LINEWEAVER et MURRAY (451)) est aussi pleinement actif (ANKIER et WEST (452)). Il est plus que probable que l'ovomucoïde est en fait responsable de ces effets pharmacologiques. Après chauffage en présence d'hydroxyde de barium selon la méthode de STACEY et WOOLLEY (453) aucune activité n'est retenue, ni par la fraction protéique, ni par la fraction glycanique (LEGER et MASSON (454)).

En raison de sa similitude avec l'anaphylaxie, le syndrome a été classé comme anaphylactoïde (LEGER et al. (455)) et il est atténué considérablement par des antihistaminiques de synthèse (LEGER et MASSON (456)). Les corticostéroïdes ne donnent aucune protection chez l'animal intact ou adrénalectomisé, mais l'adrénaline est très efficace dans les deux cas (HALPERN et BRIOT (457)). L'action de l'ovomucoïde chez le rat est souvent attribuée à sa faculté de libération d'histamine (SCHACHTER et TALESNICK (458) ; HALPERN (459)), qui ne semble pas identique à celle obtenue dans la réaction anaphylactique. De plus, une administration préliminaire de réserpine, qui appauvrit l'animal en 5-hydroxytryptamine (serotonine), ou d'acide diéthylamide bromolysérgique (BOL 148), un antagoniste spécifique de la 5-hydroxytryptamine, empêche la réponse anaphylactoïde à l'ovomucoïde ou au dextran (PARRAT et WEST (460)). Il est donc vraisemblable que les effets sont dû davantage à la libération d'histamine. Il a été montré, en 1963, que chez certaines souches de rats, une mutation récessive sur un gène autosomique a pour effet de supprimer la réaction anaphylactoïde. Des souches pures de rats non sensibles ont été reproduites (HARRIS et al. (461)).

Les travaux les plus récents concernant l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde de Poule datent de 1971 (JAKUBCZAK (462)), de 1974 (OEGEMA et JOURDIAN (463)), de 1976 (BEELEY (464)) et de 1983 (CONCHIE et HAY (465)).

Les résultats obtenus par JAKUBCZAK (466) montrent que 7,5 µg d'ovomucoïde réduisent de 50 p. 100 l'activité estérasiqne de 20 µg de trypsine (figure 21 p. 74). En considérant que ses préparations enzymatiques contenaient 71 p. 100 de trypsine active, l'auteur a calculé que le rapport pondéral ovomucoïde/trypsine correspondant à une inhibition théorique totale, était égal à 1,06 et le rapport molaire de combinaison à 1,0 pour des masses moléculaires de 26.700 pour l'ovomucoïde et de 23.800 pour la trypsine. En 1974, OEGEMA et JOURDIAN (467) purifient à partir du blanc d'oeuf de Poule par des procédés successifs comprenant précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- et CM-cellulose, une fraction ressemblant à l'ovomucoïde. Les auteurs montrent que cette fraction, l'ovomucoïde (EW-OV), inhibe la trypsine bovine, en formant un complexe 1 pour 1 sur une base molaire et provoque une réponse "anaphilactoïde" positive chez des rats albinos à des niveaux aussi bas que 0,5 µg d'ovomucoïde (EW-OV) par injection. Aucune activité antichymotrypsique n'a été observée. En 1976, BEELEY (468) a obtenu par action du bromure de cyanogène sur l'ovomucoïde deux fragments : fragment LS de masse moléculaire 16.600 (AA⁶⁹ à Phe¹⁸³) et le fragment M de masse moléculaire 11.000 (Ala¹ à Met⁶⁸). Le fragment LS a présenté une activité antitrypsique de 56 p. 100, par contre le fragment M a été totalement inactif.

En 1983, CONCHIE et HAY (469) expriment l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde par le poids nécessaire pour inhiber complètement 1 mg de trypsine. Cette activité est de 0,674 mg pour l'ovomucoïde natif. La chromatographie sur DEAE-cellulose de l'ovomucoïde natif fournit 3 fractions (figure 22, p. 75). La fraction II rechromatographiée sur DEAE-cellulose donne la fraction IIB. Les compositions molaires en sucres ainsi que l'activité anti-trypsique sont données dans le tableau XVI p. 76. On constate, qu'à l'exception de la fraction I mineure, toutes les autres fractions possèdent des activités anti-trypsiques identiques. Enfin, CONCHIE et HAY (470) démontrent qu'aucune des fractions possèdent d'activité antichymotrypsique.

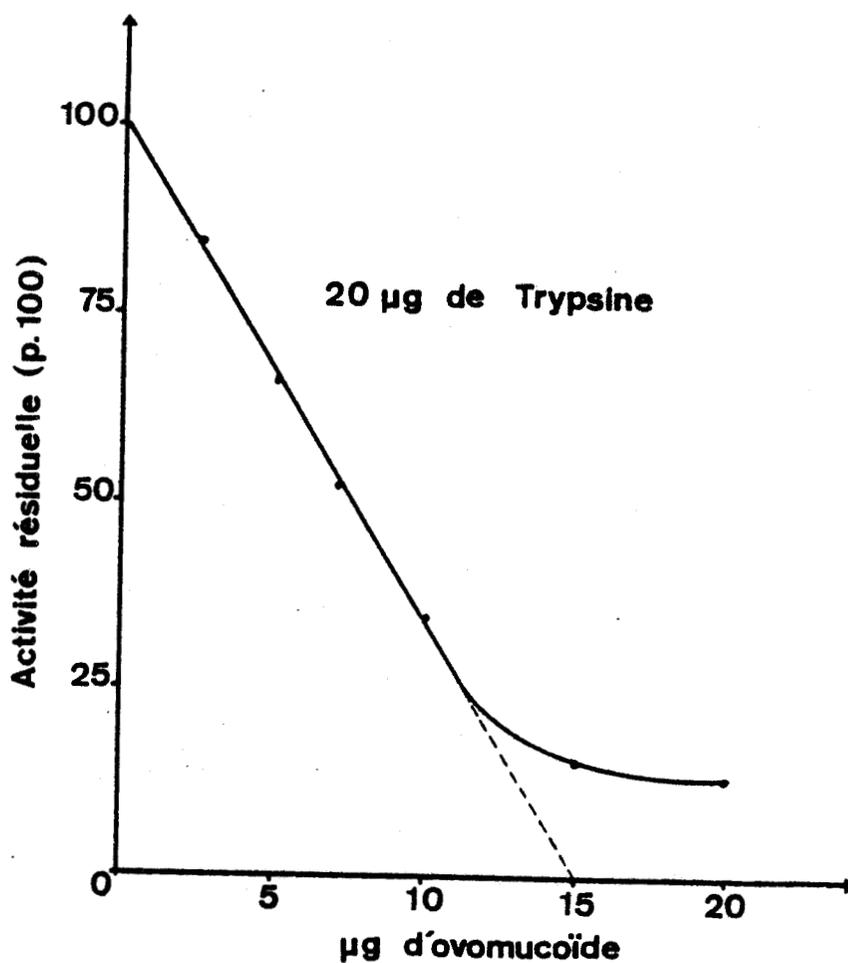


FIGURE 21

Activité estérasique de 20 µg de trypsine en présence de quantités croissantes d'ovomucoïde (JAKUBCZAK (471)). Substrat synthétique utilisé : T A M E : Tosyl arginine méthyl ester.

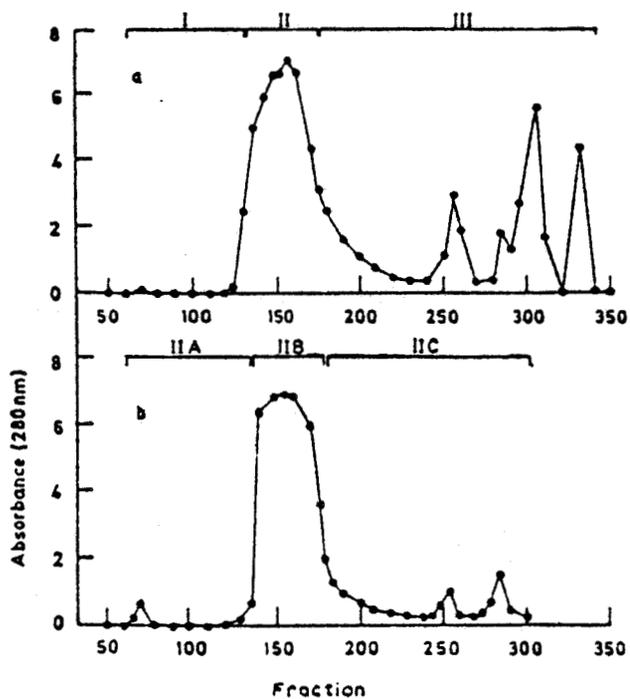


FIGURE 22

Chromatographie de l'ovomucoïde sur DEAE-cellulose. (a) fractionnement d'ovomucoïde natif ; (b) rechromatographie de la fraction II (CONCHIE et HAY (472)).

TABLEAU XVI

Composition en sucres et activité antitrypsique des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose d'ovomucoïde selon CONCHIE et HAY (473).

Fraction	Rendement (p. 100)	Hexose (g/100 g)	GlcNAc (g/100 g)	NANA (g/100 g)	Hexosamine/ Hexose ^a	Activité antitrypsique ^b
Ovomucoïde natif	-	9,10	16,50	0,48	1,47	0,674
I	1,0	2,56	2,76	0,06	0,88	1,015
II	75,6	9,09	16,15	0,34	1,40	0,542
III	17,7	7,85	10,40	0,68	1,08	0,633
IIB	85,7	9,10	16,55	0,09	1,47	0,516

^a Les rapports sont molaires

^b mg d'ovomucoïde pour 1 mg de trypsine

IX. CONCLUSIONS

Nous pouvons conclure, au terme de ces généralités, que les travaux portant sur l'ovomucoïde depuis sa découverte en 1873 ont conduit durant ces dix dernières années à une meilleure connaissance de cette glycoprotéine en teneur de structure, séquence primaire et secondaire de la protéine, structure de la fraction glycanique mais également en ce qui concerne ses propriétés en particulier ses activités antitrypsiques.

Parmi toutes les méthodes de préparation de l'ovomucoïde, celles qui sont fondées sur la dénaturation des protéides du blanc d'oeuf par l'acide trichloroacétique suivie d'une précipitation de l'ovomucoïde par l'acétone ou par l'éthanol fournissent la glycoprotéine avec un rendement maximum tout en respectant les propriétés physico-chimiques et l'activité antitrypsique de la molécule. Les meilleurs résultats concernant la purification de l'ovomucoïde ont été obtenus par chromatographie sur résine échangeuses d'anions.

Les principales caractéristiques physiques de l'ovomucoïde ont été décrites. Les variations dans les valeurs des constantes physiques reflètent les différences que l'on constate dans les méthodes de préparation. C'est ainsi que la constante de sédimentation varie, suivant les auteurs, de 2,49 à 2,8, la masse moléculaire de 26.700 à 31.500, le point isoélectrique de 3,9 à 4,5. Des conclusions très intéressantes ont été apportées ces dernières années sur la conformation de l'ovomucoïde, ainsi que sur sa structure secondaire de la fraction protéique qui est constituée de 26 % d'hélice α , 46 % de structure β , 10 % de coude β et 18 % de structure désordonnée.

La séquence peptidique de l'ovomucoïde est totalement connue. De nombreuses homologies existent entre l'ovomucoïde de Poule et de Caille. Cette glycoprotéine est monocaténaire avec, pour acide aminé N-terminal, l'alanine. Quelques points de désaccord existent encore à propos de l'extrémité C-terminale. Pour certains auteurs, l'ovomucoïde possède

182 aminoacides, la phénylalanine étant l'acide aminé C-terminal. D'autres auteurs trouvent 186 aminoacides avec la cystéine pour acide aminé C-terminal. La lysine, enfin, a été proposée comme acide aminé C-terminal.

L'ovomucoïde de Poule possède 4 sites de glycosylation Asn¹⁰, Asn⁵³, Asn⁶⁹ et Asn⁷⁵. Les séquences peptidiques au voisinage du point d'attache glycanne-protéine ont été déterminées, ce qui a permis de calculer les probabilités de coude β au niveau des sites de glycosylation. C'est ainsi que les sites de glycosylation 3 et 4 ont la plus grande probabilité de se situer dans le coude β .

Les études sur la structure primaire des chaînes glycaniques de l'ovomucoïde ont considérablement progressées ces quatre dernières années bénéficiant des méthodes modernes de séparation par chromatographie liquide haute pression, d'une part, et de détermination des séquences glucidiques, comme la résonance magnétique nucléaire à haut champ et la spectrométrie de masse. Ces technologies ont permis à trois laboratoires de donner les structures primaires des ovomucoïdes neutres avec la description de nouvelles structures pentaantennées et la mise en évidence d'une micro-hétérogénéité très importante. Peu de travaux ont été publiés à ce jour sur les structures oligosaccharidiques sialylées, mais, à la lecture de nos premiers résultats sur le fractionnement de ces composés, nous pouvons nous attendre à la caractérisation de molécules de structure tout à fait particulière, comme des structures polysialylées pentaantennées déjà caractérisées dans l'ovomucoïde de Tourterelle.

L'ovomucoïde possède des propriétés biologiques très intéressantes. Parmi celles-ci, la plus importante concerne la faculté que possède cette glycoprotéine d'inhiber les activités protéolytiques et estérases de la trypsine en formant avec l'enzyme un complexe équimolaire et il sera intéressant dans le futur d'étudier quel rôle jouent les glycannes dans les mécanismes d'inhibition de la trypsine.

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Lorsque nous avons repris en 1981 les études sur la structure primaire des chaînes glycaniques de l'ovomucoïde de Poule, aucune structure établie n'avait été jusqu'alors publiée et ceci malgré les très nombreux travaux, en particulier ceux du groupe de MONTREUIL ; les difficultés provenaient principalement de l'effroyable hétérogénéité des glycanes de l'ovomucoïde et de l'impossibilité d'obtenir à l'état pur des glycopeptides ou des oligosaccharides détachés par voies chimique ou enzymatique.

Nous nous sommes donc attachés, dans un premier temps, à préparer des chaînes glycaniques homogènes. Afin d'éliminer l'hétérogénéité glycanes-neutres glycanes sialylés, nous avons pris comme substrat de départ le mélange de glycopeptides neutres (glycopeptides β de l'ovomucoïde préparés par hydrolyse pronasique suivie de chromatographie sur colonne échangeur de cations selon le procédé de MONSIGNY et al. (474) (voir appendice technique) de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule préparé selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (475) (voir appendice technique). D'autre part, l'hétérogénéité de séquence peptidique au voisinage des quatre sites de glycosylation de la glycoprotéine rendant impossible la préparation de glycopeptides neutres homogènes, nous a conduit à travailler sur les oligosaccharides détachés des glycopeptides neutres par hydrazinolyse. Ces oligosaccharides obtenus ont été enfin réduits et N-réacetylés (voir appendice technique).

Nous avons bénéficié, au moment où nous reprenions ces études, de l'explosion des techniques séparatives par chromatographie liquide haute pression (HPLC) aussi bien au niveau de l'appareillage par l'apparition de pompes de chromatographie binaires et ternaires, que de la technologie des colonnes. Ces développements nous permettent de réaliser en des temps très courts, des chromatographies de partition, d'échanges d'ions, de phases inverses sur des colonnes de gel de Silice modifié de granulométrie passant de 10 à 3 microns, ces derniers mois.

Les oligosaccharides alditols neutres que nous avons ainsi obtenu par hydrazinolyse des glycopeptides β neutres de l'ovomucoïde ont donc été fractionnés par chromatographie de partage sur colonne de silice greffée de type alkylamine à l'aide d'un gradient constitué d'acétonitrile et d'eau.

Les oligosaccharides alditols homogènes obtenus ont été étudiés à l'aide de techniques d'investigation de la séquence primaire des chaînes glucidiques, composition par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoracétylés obtenus par méthanolyse et trifluoracétylation, perméthylation et analyse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse des perméthyl oligosaccharides (voir appendice technique), préparation des bases de méthylation à l'aide du tert-butoxide de potassium et du n-butyllithium, étude des séquences des monosaccharides à l'aide de l'hydrolyse acide partielle des oligosaccharides perméthylés selon la méthode de VALENT et al. (476) suivie de l'analyse des oligosaccharides partiellement méthylés et éthylés par GLC-MS (FOURNET et al. (477)), de la Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (NMR ^1H) à 500 MHz (VLIEGENTHART et al. (478)) et de la spectrométrie de masse (MS) à haute résolution des oligosaccharides alditols perméthylés, ionisés par "Fast Atom Bombardement" (FAB) à l'aide d'atom de Xenon et par impact électronique (EI) (BARBER et al. (479) ; DELL et al. (480, 481)). Ces études ont été réalisées en collaboration avec les groupes des Professeurs J.F.G. VLIEGENTHART à Utrecht (Hollande) et H. EGGE à Bonn (R.F.A.) respectivement.

Enfin, dans une dernière partie, nous décrivons les résultats préliminaires obtenus sur les oligosaccharides alditols sialylés de l'ovomucoïde de Poule. Dans ce travail nous nous sommes attardés, après avoir utilisé les techniques de séparation, par HPLC d'échanges d'ions (BAENZIGER et NATOWICZ (482)), des oligosaccharides selon le nombre de charges (mono, di, tri, tétrasialyloligosaccharides) de mettre au point une nouvelle méthode de fractionnement par chromatographie de partage à haute pression sur colonne de silice greffée de type alkylamine d'oligosaccharides acides, utilisant dans la phase mobile une amine primaire (1,4-diamino-butane DAB) dans un mélange acétonitrile-tampon phosphate.

ARTICLE 1

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION DES OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR HYDRAZINOLYSE DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

La chromatographie liquide haute pression d'oligosaccharides neutres de l'ovomucoïde de Poule sur colonne de silice modifiée de type alkyl-amine conduit à l'isolement de 17 fractions oligosaccharidiques dont 4 ont pu être isolées à l'état pur. Ce travail montre l'hétérogénéité des glycannes neutres de l'ovomucoïde de Poule.

CHROM. 15.156

Note

Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatography of oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid

JOSÉ PAZ PARENTE, GÉRARD STRECKER, YVES LEROY, JEAN MONTREUIL and BERNARD FOURNET*

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au C.N.R.S. No. 217, 59655 - Villeneuve d'Ascq Cédex (France)

(First received June 2nd, 1982; revised manuscript received June 30th, 1982)

Currently, monosaccharides and oligosaccharides are satisfactorily separated by paper, ion-exchange, thin-layer and gel filtration chromatography, however the methods are time-consuming. High-performance liquid chromatography (HPLC) using a column of porous microparticles derivatized with amino groups allows a rapid separation of sugars¹⁻⁵. Since 1980, the HPLC on bonded primary amine packings of sugars derived from glycoprotein glycans have been described: fractionation of oligosaccharides and glycopeptides excreted in the urine of patients with lysosomal diseases⁶; separations of oligosaccharides obtained by digestion with endoglycosidase H⁷ or released by β -elimination of O-glycosylprotein^{8,9}, oligosaccharides derived from dolichol-linked oligosaccharide intermediates¹⁰. Finally, clear separations of sialoglycopeptides or oligosaccharides have been obtained in less than 1 h by HPLC on a Micropak AX-10 ion-exchange column¹¹.

The present report shows that bonded primary amine packings are effective in the rapid separation of the mixture of neutral glycans liberated by hydrazinolysis of a hen ovomucoid neutral glycopeptide.

MATERIALS AND METHODS

Glycoproteins, glycopeptides and oligosaccharides

Ovomucoid was prepared according to Fredericq and Deutsch¹². The asialoglycopeptide β was isolated after pronase hydrolysis of ovomucoid according to Monsigny *et al.*¹³. Oligosaccharides were released from asialoglycopeptide β by hydrazinolysis as previously described¹⁴. The resulting oligosaccharides were N-acetylated according to Reading *et al.*¹⁵ and reduced with NaBH₄.

Liquid chromatography on primary amine bonded silica

Analysis were carried out with a Spectra Physics Model 700 liquid chromatograph, equipped with an UV 8400 variable wavelength detector connected to a 4100 computing integrator.

HPLC was performed on a 5- μ m Amino AS-5A column (0.4 \times 25 cm, Chromatem 33; Touzart et Matignon). A 1-mg amount of oligosaccharides dissolved in 10

NOTES

μ l of distilled water was injected into the column: for preparative chromatography, 3.5 mg of oligosaccharides dissolved in 20 μ l of acetonitrile-water (50:50) were injected. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile-water, 65:35). After the injection, a linear gradient to acetonitrile-water (60:40) was applied for 30 min followed by isocratic conditions during 30 min and then a linear gradient to acetonitrile-water (50:50) for 30 min. The flow-rate was 1 ml/min. The oligosaccharides were detected at 200 nm under the following conditions: sensitivity of detec-

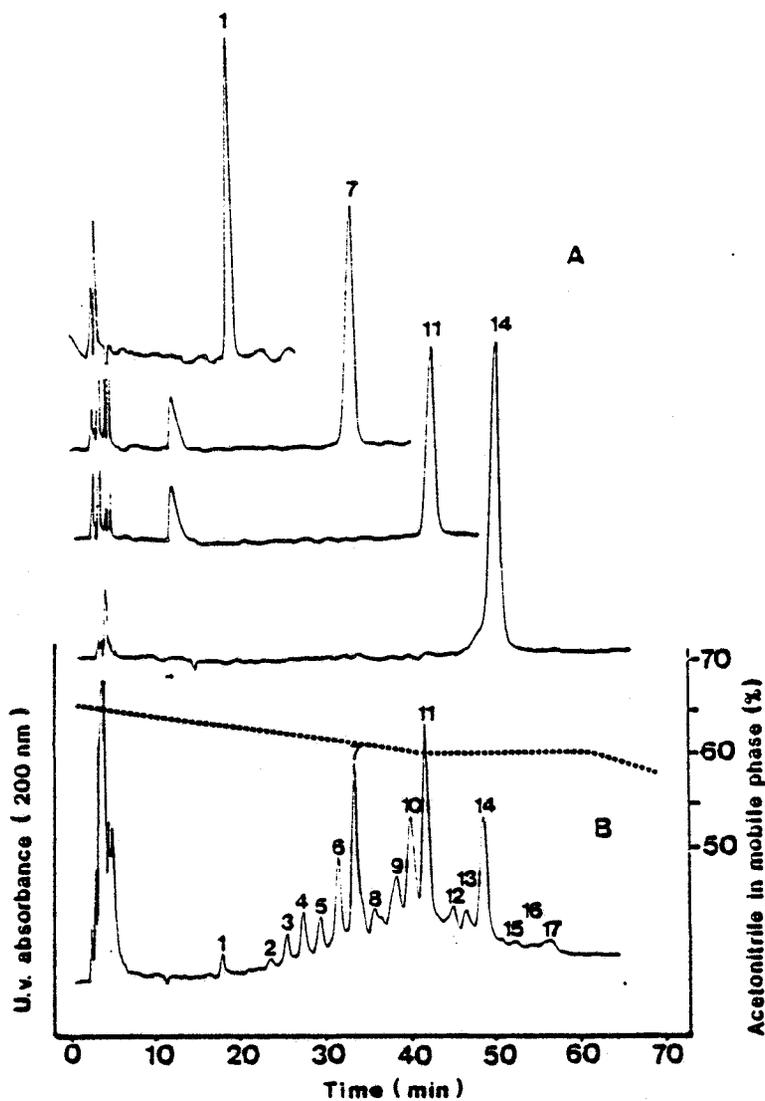


Fig. 1. Analysis (A) of oligosaccharides 1, 7, 11 and 14 obtained by semi-preparative chromatography (B) of oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid neutral glycopeptide β on 5- μ m Amino AS-5A (Chromatem 33, Touzart et Matignon). For chromatographic conditions, see Material and Methods.

NOTES

tor. 0.35; integrator attenuation, 4, for analytical chromatography; sensitivity of detector, 0.32, integrator attenuation, 50, for semi-preparative chromatography.

Molar composition of oligosaccharides

The molar composition of oligosaccharides was determined by gas-liquid chromatography (GLC) of trifluoroacetylated methylglycosides according to Zanetta *et al.*¹⁶.

Thin-layer chromatography (TLC) of oligosaccharides

TLC of oligosaccharides was performed on silica gel plates (pre-coated silica gel 60, Merck) using ethanol-*n*-butanol-pyridine-acetic acid-water (100:10:10:3:30 v/v/v/v/v)¹⁷ during 7 h. Oligosaccharides were revealed with an orcinol-sulphuric acid reagent¹⁸.

RESULTS AND DISCUSSION

The separation of a mixture of reduced oligosaccharides obtained by hydrazinolysis from hen ovomucoid is shown in Fig. 1. The effective separation of seventeen fractions was obtained within 90 min on an Amino AS-5A column (Fig. 1B) and semi-preparative chromatography on the same column allows one to obtain pure fractions 1, 7, 11 and 14 (Fig. 1A). The results of the semi-preparative chromatography of 4.2 mg of ovomucoid-derived oligosaccharides are given in Table I.

TABLE I

WEIGHTS OF FRACTIONS OBTAINED BY SEMI-PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF 4.2 mg OF OLIGOSACCHARIDES LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS FROM OVOMUCOID NEUTRAL GLYCOPEPTIDE β

<i>Fraction number</i>	<i>Weight (μg)</i>
F-0	312.4
F-1	44
F-2	36.3
F-3	95.7
F-4	169.4
F-5	73.7
F-6	265
F-7	510.4
F-8	146.3
F-9	283.8
F-10	400.4
F-11	644.6
F-12	186
F-13	242
F-14	284
F-15	48.4
F-16	36.3
F-17	83.7
Recovered	3862

NOTES

The use of a 0.4×25 cm column filled with silica gel modified by organic amines provides quantitative recovery (92%) of the oligosaccharides without loss of resolution. Each fraction was analysed by TLC (Fig. 2) and the carbohydrate composition was determined by GLC (Table II). Four fractions (1, 7, 11 and 14) are homogeneous on the basis of HPLC and TLC and of the monosaccharide molar composition. The latter is characterized by the absence of the presence in low amounts of galactose and by the relative high content of N-acetylglucosamine. Of interest is the ratio (N-acetylglucosamine + N-acetylglucosaminitol)/mannose, *i.e.*, (GlcNAc + GlcNAc-ol)/Man, the value of which is related to the number of N-acetylglucosamine branches on the mannose residues. The limiting values are 1.35 and 2.7 in the case of classical biantennary structures such as human serum transferrin¹⁹ and of pentaantennary structures such as turtle-dove ovomucoid²⁰, respectively.

CONCLUSIONS

HPLC on bonded primary amine packings gives excellent fractionation of a

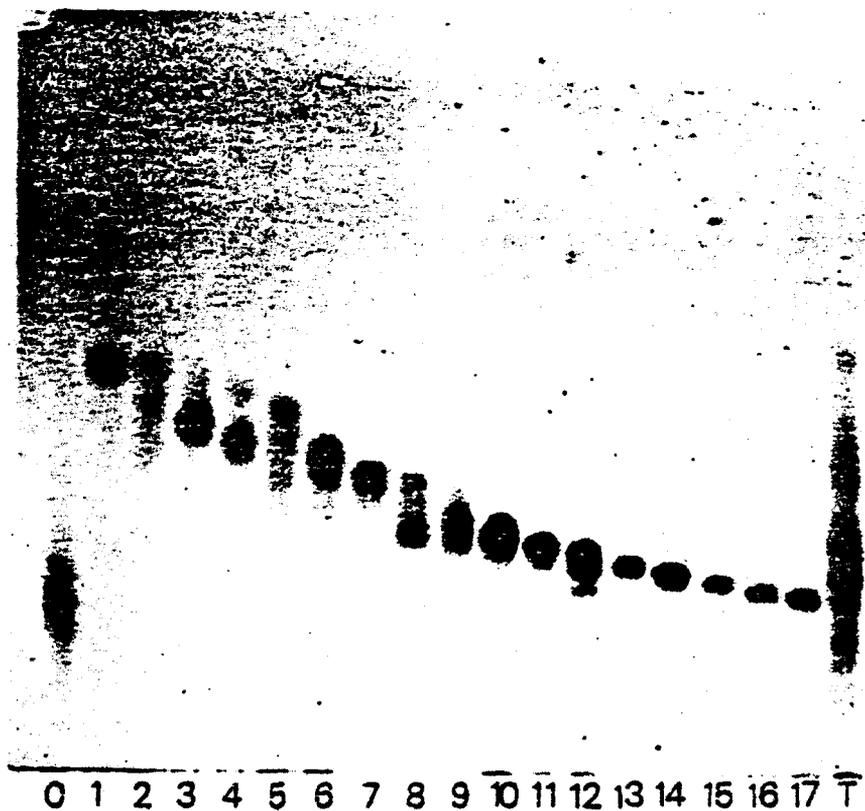


Fig. 2. TLC on silica gel plates (Merck) of seventeen fractions obtained by semi-preparative chromatography of oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid neutral glycopeptide. Solvent: ethanol-*n*-butanol-pyridine-acetic acid-water (100:10:10:3:30 v/v/v/v/v). Development time: 7 h. Oligosaccharides revealed with orcinol-sulphuric acid reagent.

NOTES

TABLE II

CARBOHYDRATE COMPOSITION OF FRACTIONS OBTAINED BY SEMI-PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVOMUCOID NEUTRAL GLYCOPEPTIDES β

Fractions	Molar ratio*				GlcNAc + GlcNAc-ol	
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol	Man	
1	0	3	1.3	0.94	0.74	
2	0	3	2.94	0.81	1.25	
3	0	3	3.4	0.50	1.3	
4	0	3	3.63	0.66	1.43	
5	0	3	3.4	0.2	1.2	
6	0	3	3.9	0.60	1.5	
7	0	3	4.64	0.94	1.86	
8	0.44	3	5.02	0.61	1.87	
9	0.44	3	5.38	0.65	2.01	
10	0.59	3	4.63	0.64	1.75	
11	0.19	3	6.8	1.01	2.6	
12	0.72	3	5.70	0.57	2.09	
13	1.03	3	5.99	0.30	2.09	
14	1.07	3	6.8	1.07	2.62	
15	1.52	3	6.9	0.71	2.53	
16	1.5	3	6.21	0.57	2.26	
17	1.85	3	6.8	0.84	2.54	
Native glycopeptide β	0.6	3	6		2	

* The ratio of mannose (Man) was taken as 3. Gal = Galactose; GlcNAc = N-acetylglucosamine; GlcNAc-ol = N-acetylglucosaminitol.

new class of glycans constituting a complex mixture of about twenty reduced neutral oligosaccharides liberated by hydrazinolysis from hen ovomucoid. These glycans are in general N-acetylglucosamine-rich and highly branched. Our results illustrate again the usefulness of HPLC as a powerful tool to investigate the various compounds encountered in the field of glycoproteins: glycans of the "N-acetyl-lactosaminic type"^{7,11}, of the "oligomannosidic type"⁷, of the "mucin type"^{8,9} and lipid intermediate-derived oligosaccharides¹⁰, dolichyl pyrophosphoryl oligosaccharides²¹ and peracetylated mono- and oligosaccharides²².

The results obtained demonstrate the high microheterogeneity of hen ovomucoid, which was not revealed by our first investigations²³. The primary structure of the numerous glycans isolated is now under investigation in order to understand the significance of their amazing microheterogeneity better and define the characteristics of the new class of glycans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (LA No. 217) and the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (79.7.0669).

NOTES

The authors are grateful to B. Mahieu, G. Tinel and J. Celen for their skilful assistance and to the Spectra Physics Society for their constant cooperation and help during the work.

REFERENCES

- 1 J. C. Linden and C. L. Lawhead, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 125-133.
- 2 J. K. Palmer, *Anal. Lett.*, 8 (1975) 215.
- 3 E. C. Conrad and J. K. Palmer, *Food Technol.*, Oct. (1976) 84.
- 4 R. B. Meagher S.J. and A. Furst, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 211-215.
- 5 K. Aitzetmüller, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 354.
- 6 N. M. K. Ng Ying Kin and L. S. Wolfe, *Anal. Biochem.*, 102 (1980) 213-219.
- 7 S. J. Mellis and J. U. Baenziger, *Anal. Biochem.*, 114 (1981) 276-280.
- 8 A. Boersma, G. Lamblin, P. Degand and P. Rousset, *Carbohydr. Res.*, 94 (1981) C7-C9.
- 9 M. L. E. Bergh, P. Koppen and D. H. van den Eijnden, *Carbohydr. Res.*, 94 (1981) 225-229.
- 10 S. J. Turco, *Anal. Biochem.*, 118 (1981) 278-283.
- 11 J. U. Baenziger and M. Natowicz, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 357-361.
- 12 E. Fredericq and H. F. Deutsch, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- 13 M. Monsigny, A. Adam-Chosson and J. Montreuil, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 857-874.
- 14 B. Bayard and B. Fournet, *Carbohydr. Res.*, 46 (1975) 75-86.
- 15 C. L. Reading, E. Penhoet and C. Ballou, *J. Biol. Chem.*, 253 (1978) 5600-5612.
- 16 J. P. Zanetta, W. C. Breckenridge and G. Vincendon, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291-304.
- 17 B. Bayard, J. P. Kerckaert, D. Roux and G. Strecker, *Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq.*, 27 (1979) 153-156.
- 18 R. Humbel and M. Collaert, *Clin. Chim. Acta.* 60 (1975) 143-145.
- 19 G. Spik, B. Bayard, B. Fournet, G. Strecker, S. Bouquelet and J. Montreuil, *FEBS Lett.*, 50 (1975) 296-299.
- 20 Ch. François-Gérard, J. Brocteur, A. André, C. Gerday, A. Pierce-Crétel, J. Montreuil and G. Spik, *Blood Trans. Immunohaemat.*, 23 (1980) 579-587.
- 21 G. B. Wells, S. J. Turco, B. A. Hanson and R. L. Lester, *Anal. Biochem.*, 110 (1981) 397-406.
- 22 G. B. Wells and R. L. Lester, *Anal. Biochem.*, 97 (1979) 184-190.
- 23 B. Bayard and J. Montreuil, *Actes du Colloque International No. 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, June 20-27, 1973, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1974, pp. 209-218.*

ARTICLE 2

DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE STRUCTURE GLYCANNIQUE PRESENTE DANS L'OVOMUCOÏDE DE POULE

La structure primaire de l'oligosaccharide majeur présent dans la fraction neutre de l'ovomucoïde de Poule est effectuée à l'aide de la perméthylation, l'hydrolyse acide partielle et l'analyse des fragments par GLC-MS et la Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz. L'ensemble de ces techniques conduit à décrire une structure nouvelle de glycanes à cinq antennes avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire.

A Novel Type of Carbohydrate Structure Present in Hen Ovomucoid*

(Received for publication, June 28, 1982)

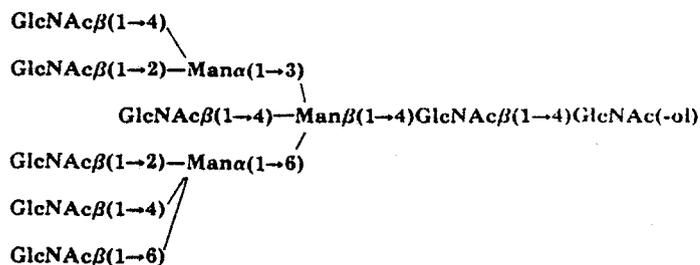
José Paz Parente, Jean-Michel Wieruszkeski,
Gérard Strecker, Jean Montreuil,
and Bernard Fournet‡

From the Laboratoire de Chimie Biologique de
l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et
Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche
Scientifique n° 217, 59655, Villeneuve d'Ascq Cédex,
France

Herman van Halbeek, Lambertus Dorland, and
Johannes F. G. Vliegthart

From the Department of Bio-Organic Chemistry,
University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD
Utrecht, The Netherlands

Hen ovomucoid is characterized by a high degree of microheterogeneity of its carbohydrate moieties, as was recently demonstrated by hydrazinolysis in combination with high performance liquid chromatography (Paz Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., and Fournet, B. (1982) *J. Chromatogr.*, in press). This approach resulted in 17 oligosaccharide-alditol fractions; the major one could be purified to homogeneity. Primary structural analysis of this fraction was carried out by methylation analysis, partial acid hydrolysis, and 500-MHz ¹H NMR spectroscopy. Combination of these techniques enabled the unambiguous determination of a novel type of asparagine-bound carbohydrate chain:



Hydrazinolysis of glycoproteins allows one to obtain mixtures of oligosaccharides which are easily separated by HPLC.¹ In this way, Mellis and Baenziger (1) developed a

* This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé n° 217), the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (79.7.0669), the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and by the Netherlands Foundation for Cancer Research (Grant UUKC-OC 79-13). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom all correspondence should be addressed.

¹ The abbreviations used are: HPLC, high performance liquid chro-

matography; GLC, gas-liquid chromatography; GLC-MS, gas-liquid chromatography combined with mass spectrometry.

method for the separation of neutral oligosaccharides obtained by hydrazinolysis from desialylated orosomucoid by high performance liquid chromatography utilizing a Micropak AX-5 ion exchange column. Recently, the hydrazinolysis products of the neutral, β -glycopeptide fraction from hen ovomucoid were subjected to HPLC; this afforded 17 oligosaccharide-alditol fractions (2). The aim of the present study is the elucidation of the primary structure of the major one among these oligosaccharide-alditols by employment of methylation analysis, partial acid hydrolysis, mass spectrometry, and 500 MHz ¹H NMR spectroscopy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ovomucoid was prepared according to Fredericq and Deutsch (3). The asialoglycopeptide, designated β -glycopeptide, was isolated after pronase digestion of ovomucoid according to Monsigny *et al.* (4) and the oligosaccharides of the β -glycopeptide were released by hydrazinolysis (5). These oligosaccharides were re-*N*-acetylated (6) and then reduced with NaBH₄. The resulting oligosaccharide-alditols were fractionated by semipreparative HPLC on Amino AS.5A (5 μ m, Touzard et Matignon) (2). The major fraction 11 was further analyzed.

The carbohydrate composition of the oligosaccharide alditol fraction 11 was determined by GLC after methanolysis (0.5 M HCl/methanol; 24 h; 80 °C) and perfluoroacetylation (7).

1 mg of oligosaccharide-alditol fraction 11 was methylated according to Finne *et al.* (8). The permethyloligosaccharide-alditol was methanolysed and the products were identified by GLC-MS (9) after peracetylation.

The permethylated oligosaccharide-alditol fraction 11 (1.2 mg) was submitted to partial acid hydrolysis (formic acid 85%; 30 min; 80 °C) followed by reduction with NaBD₄ (0.2 M) and ethylation of the free hydroxyl groups (10). The partially methylated, ethylated products were analyzed by GLC-MS on a capillary column (0.4 mm \times 60 m) of OV 101 (temperature programmed 5 °C/min from 140 to 320 °C; helium pressure, 0.4 bar).

Prior to ¹H NMR spectral analysis, 1 mg of oligosaccharide-alditol fraction 11 was repeatedly exchanged in D₂O (99.96 atom % D, Aldrich) with intermediate lyophilization. ¹H NMR spectroscopic analysis was performed on a Bruker WM-500 spectrometer operating at 500 MHz in the Fourier transform mode at a probe temperature of 300 K (11). Chemical shifts are given relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (indirectly to acetone in D₂O: δ = 2.225 ppm).

RESULTS AND DISCUSSION

The separation of the oligosaccharide-alditols from β -glycopeptide of hen ovomucoid by semipreparative HPLC is illustrated in Fig. 1. The major (~15%) oligosaccharide-alditol fraction 11 is composed of galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine, and *N*-acetylglucosaminitol with molar ratios 0.19, 3, 6.8, and 1.01, respectively. Mannose has been taken as 3. The GlcNAc+GlcNAc-ol/Man ratio is 2.6. A similar, relatively high value of the ratio total GlcNAc:Man, being 2.6, has been found in glycopeptides derived from turtledove ovomucoid (12).

The results of methylation analysis of fraction 11 (see Table I) reveal the presence of two different mono-*O*-methylmannosides in equal amounts: methyl 2-mono-*O*-methylmannoside and methyl 3-mono-*O*-methylmannoside. These derivatives were identified by GLC-MS (9, 12, 13). Assuming the presence of a mannotriose core structure (14), the identifica-

matography; GLC, gas-liquid chromatography; GLC-MS, gas-liquid chromatography combined with mass spectrometry.

Carbohydrate Structure Present in Hen Ovomuroid

tion of the 2-mono-*O*-methyl-3,4,6-tri-*O*-acetylmannoside suggests the occurrence of an intersecting GlcNAc residue, $\beta(1\rightarrow4)$ linked to Man 3. The 3-mono-*O*-methyl-2,4,6-tri-*O*-acetylmannoside points to a trisubstitution either of Man 4 or of Man 4'. Discrimination between these two possibilities was achieved by partial acid hydrolysis of the permethylated oligosaccharide-alditol *11*, followed by identification of the resulting partially ethylated, methylated disaccharide-alditols, Man \rightarrow Man-ol. The mass spectra of the partially ethylated methylated Man-(1 \rightarrow 6)-Man-ol and Man-(1 \rightarrow 3)-Man-ol are given in Fig. 2. The structure of the disaccharide-alditol 2,4,6-tri-*O*-ethyl-3-mono-*O*-methylmannopyranosido-(1 \rightarrow 6)-1,3,4,5-tetra-*O*-ethyl-2-mono-*O*-methylmannitol (Fig. 2A) is characterized by the aA fragments: aA₁ *m/z* 261, aA₂ *m/z* 229 and 215, which show the substitution pattern of the nonreducing hexose (mannose) residue, and the alditol fragment, ald *m/z* 292. The presence of an ald J₁ ion, *m/z* 352, is due to the occurrence of a methyl group at C-3 of the nonreducing hexose, corresponding to 3-mono-*O*-methyl-Man. The fragments *m/z* 220 and 407 allow us to confirm the (1 \rightarrow 6) linkage between mannose and mannitol. The occurrence of the ion *m/z* 104 indicates that the mannitol residue is substituted by a methyl group at C-2 (*m/z* 104,

$C_2H_5OCHD-\overset{+}{C}H-\overset{-}{O}CH_3$). The structure of the disaccharide-alditol 2,4-di-*O*-ethyl-3,6-di-*O*-methylmannopyranosido-(1 \rightarrow 3)-1,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-2-mono-*O*-methylmannitol (Fig. 2B) is confirmed by the aA fragments aA₁ *m/z* 247, aA₂, 215 and 201, reflecting the substitution at the nonreducing hexose, and the alditol fragment, ald *m/z* 292. The fragment *m/z* 175, in combination with 129 (elimination of ethanol), suggests a (1 \rightarrow 3) glycosidic linkage in this disaccharide-alditol. These results lead to the conclusion that the (1 \rightarrow 3)-linked core Man (4) bears 2 GlcNAc residues, namely in (1 \rightarrow 2)-linkage and in

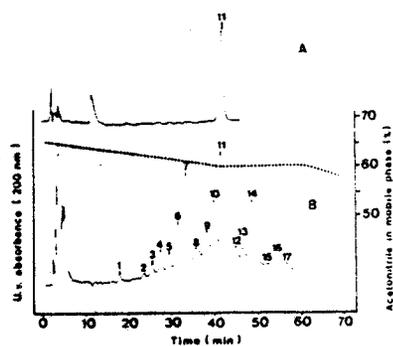


FIG. 1. Chromatographic analysis of oligosaccharide *11* (A) obtained by semipreparative high performance liquid chromatography of oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid neutral glycopeptide and (B) on 5 μ M Amino AS-5A (Touzard and Matignon).

TABLE I

Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated glycopeptides derived from oligosaccharide *11*

Methylated monosaccharides	Molar ratio
	mol/mol oligosaccharide
3,6-di-OMe-Man ^a	1 (0.88)
2-mono-OMe-Man	1 (1.2)
3-mono-OMe-Man	1
3,4,6-tri-OMe-Glc-NAcNMe	6 (5.8)
3,6-di-OMe-Glc-NAcNMe	1 (0.90)
1,3,5,6-tetra-OMe-Glc-ol-NAcNMe	1 (0.93)

^a OMe, *O*-methyl; NAcNMe, acetyl-*N*-methyl.

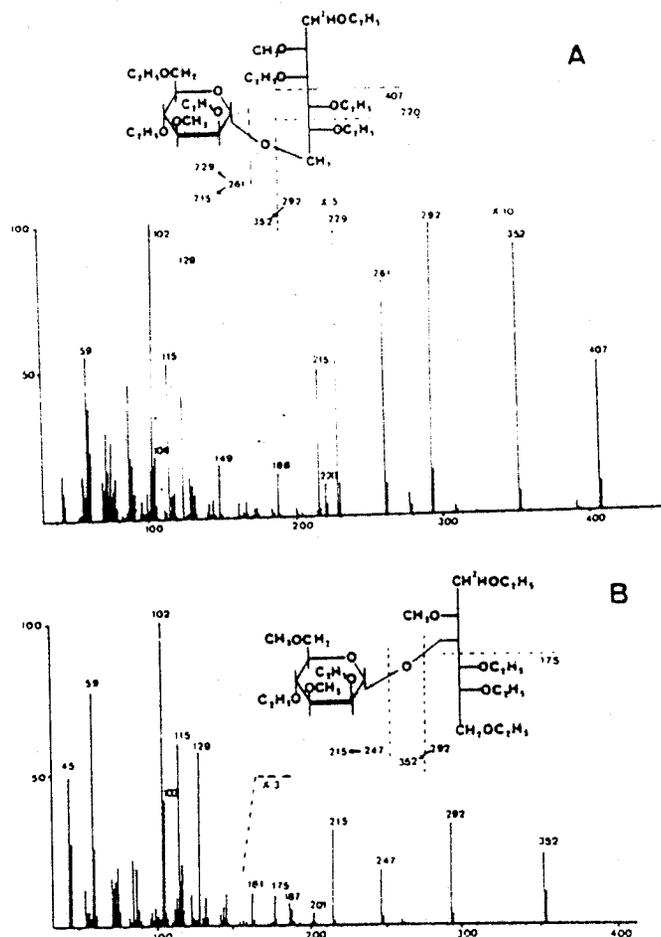


FIG. 2. Mass spectra of 3-*O*-Me-2,4,6-*O*-Et-Man-(1 \rightarrow 6)-2-*O*-Me-1,3,4,5-*O*-Et-Man-ol (A) and of 3,6-*O*-Me-2,4-*O*-Et-Man-(1 \rightarrow 3)-2-*O*-Me-1,4,5,6-*O*-Et-Man-ol (B).

(1 \rightarrow 4)-linkage (GlcNAc 5 and 7, respectively), while the (1 \rightarrow 6)-linked Man residue (4') is trisubstituted by GlcNAc residues, namely in (1 \rightarrow 2)-linkage by GlcNAc 5', in (1 \rightarrow 6)-linkage by GlcNAc 7', and in (1 \rightarrow 4)-linkage by GlcNAc 10'.

In order to obtain independent proof of the structure of fraction *11*, the sample was subjected to 500-MHz ¹H NMR spectroscopy. Pertinent regions of the resolution-enhanced spectrum are depicted in Fig. 3. For the interpretation of the spectrum in terms of primary structural assignments, advantage was taken from the spectral data for a glycopeptide from chicken ovotransferrin (15, 16) and from those for another oligosaccharide-alditol fraction (7) from hen ovomucoid (2). The chemical shifts of the structural reporter groups (11, 16) of fraction *11* and of the two reference substances are compiled in Table II.

Comparison of the data for the ovotransferrin glycopeptide with those for ovomucoid fraction 7 demonstrates the identical branching pattern of the mannotriose core, *i.e.* substitution by GlcNAc 7, 5, 9, and 5', in both structures. Apparently, the spectral features of the peripheral residues are not affected by the transformation of GlcNAc \rightarrow Asn into GlcNAc-ol (see Table II) thereby making this type of reduced oligosaccharide suitable compounds for ¹H NMR investigation.

The presence of the GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc-ol structural element in *11* comes to expression *ir.*: (i) the occurrence of a GlcNAc-ol H-2 signal at $\delta = 4.255$ ppm in the region of the Man H-2 signals; and (ii) an *N*-acetyl signal of GlcNAc-ol at $2.05 < \delta < 2.07$ ppm, instead of $2.00 < \delta < 2.01$ ppm as usual for GlcNAc 1 β -linked to Asn (16). Furthermore, the chemical

Carbohydrate Structure Present in Hen Ovomuroid

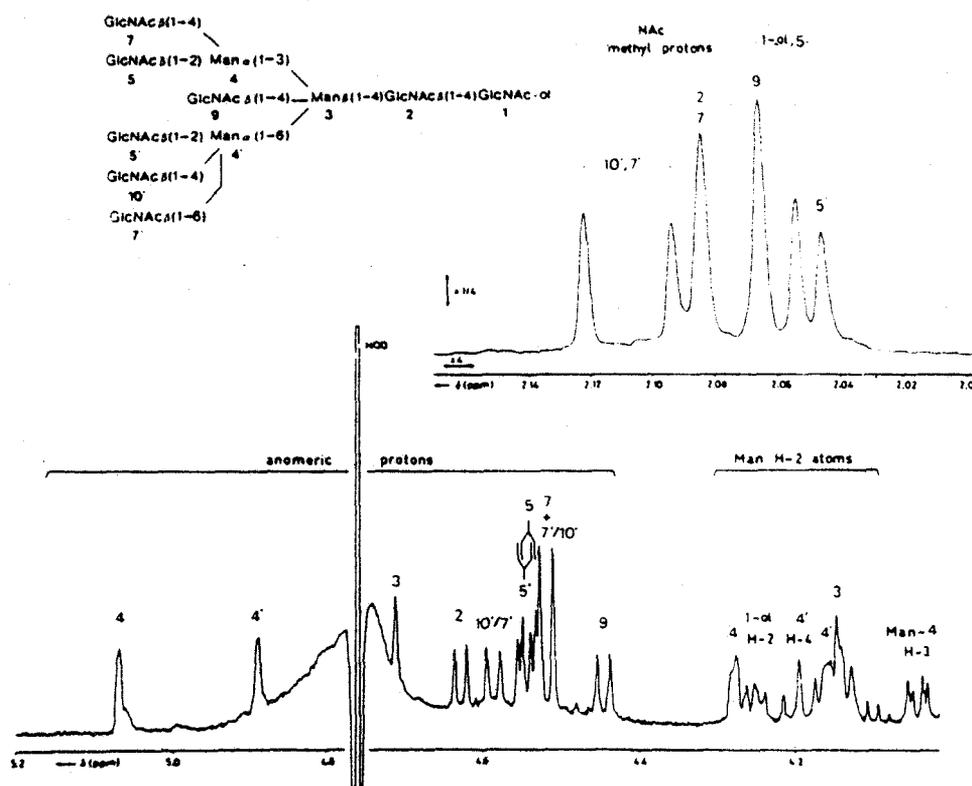


FIG. 3. Structural reporter group regions of the resolution-enhanced, 500 MHz ^1H NMR spectrum of oligosaccharide-alditol *11* derived from hen β -ovomuroid, in D_2O at 300 K. The numbers in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative intensity scale, as well as the chemical shift scale, of the *N*-acetyl proton region (see inset) differ from those of the other part of the spectrum, as indicated.

shifts of H-1 and of the *N*-acetyl signal of GlcNAc 2 are slightly but significantly altered as compared to the values for a glycopeptide (see Table II).

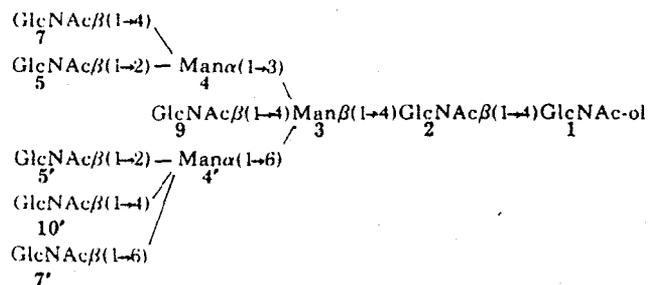
The presence of the mannotriose core is clearly deducible from the occurrence of three Man H-1 signals having $4.7 < \delta < 5.1$ ppm and $J_{1,2} < 2$ Hz, and of three corresponding H-2 signals in the typical spectral region $4.0 < \delta < 4.3$ ppm. The core is extended at the peripheral side with six GlcNAc residues in β -linkage, because the spectrum reveals 7 anomeric doublets ($4.4 < \delta < 4.7$ ppm; $J_{1,2} > 8$ Hz), one of which belongs to GlcNAc 2 of the core. This conclusion is corroborated by the presence of 8 *N*-acetyl signals, two of which are attributed to GlcNAc 2 and GlcNAc-ol.

The H-1 signal at rather high field position ($\delta = 4.443$ ppm), together with one of the *N*-acetyl signals at $\delta = 2.065$ ppm, points to the presence of the intersecting GlcNAc 9 (compare with the ovotransferrin glycopeptide, Table II, and with related substances (16, 17)). This conclusion is supported by the chemical shifts of H-1 and H-2 of Man 4 (see Table II, compare with 7), which further indicate the branching pattern of Man 4 to be as in triantennary structures, that is, with GlcNAc 5 in $\beta(1\rightarrow2)$ -linkage and GlcNAc 7 in $\beta(1\rightarrow4)$ -linkage. The Man 4 H-3 signal, which is a reporter group particularly for this type of disubstitution of Man 4 (16), is found at $\delta = 4.043$ ppm (see Fig. 3), corroborating the presence of this structural element in the upper branch of *11*.

The predominant differences in chemical shift between the reporter groups of fractions *11* and 7 are observed for H-1 and H-2 of Man 4'. The set of values for *11* ($\delta\text{H-1} = 4.889$ ppm; $\delta\text{H-2} = 4.161$ ppm) has not been found, so far, and reflects the trisubstitution of Man 4'. It is well known (16) that the attachment of GlcNAc in $\beta(1\rightarrow4)$ -linkage to an α -Man residue (4) does not influence the chemical shift of H-1 of this Man, but only gives rise to a downfield shift for Man H-2 ($\Delta\delta \approx 0.03$ ppm). Introduction of GlcNAc in $\beta(1\rightarrow6)$ -linkage to an α -Man residue (4') results in upfield shifts both for H-1 ($\Delta\delta \approx -0.07$ ppm) and for H-2 ($\Delta\delta \approx -0.02$ ppm) of the α -Man (16). In the step from 7 to *11* (see Table II), for H-1 of Man 4', an upfield shift is observed ($\Delta\delta = -0.11$ ppm) while H-2 shifts downfield

($\Delta\delta = 0.015$ ppm). The directions of the shift effects on Man 4' H-1 and H-2 are in line with the 2,4,6-trisubstitution of Man 4', revealed by methylation analysis in combination with partial acid hydrolysis. However, due to steric hindrance of the residues 5', 7', and 10', precise values for the chemical shifts of H-1 and H-2 of Man 4' cannot be deduced by starting at the data of 7, and simply adding the aforementioned effects of attachment of $\beta(1\rightarrow4)$ -linked and $\beta(1\rightarrow6)$ -linked GlcNAc to these. Tentative assignments for the H-1 doublets and the *N*-acetyl singlets of GlcNAc residues 5', 7', and 10' are indicated in Table II and Fig. 3.

In summary, the 500-MHz ^1H NMR spectrum clearly shows the detailed branching pattern of the mannotriose core in fraction *11* from hen β -ovomuroid. Owing to the trisubstitution of Man 4', its H-4 signal emerges out of the bulk of the skeleton protons toward $\delta = 4.194$ ppm; this signal can be conceived as a structural reporter group for this particular branching pattern. The differences in the chemical shifts of most of the structural reporter groups of *11*, as compared to 7 (see Table II) suggest a considerable change of spatial structure by the introduction of GlcNAc residues 7' and 10'. The structure of oligosaccharide-alditol *11* appears to be as follows:

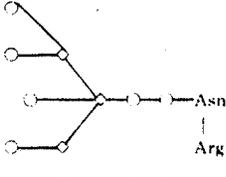
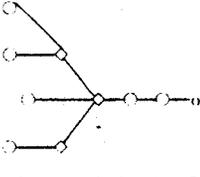
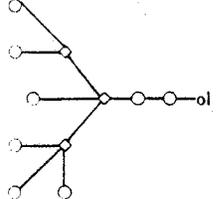


This structure is a novel type of glycoprotein carbohydrate chain. The simultaneous presence of GlcNAc residues 7, 5, 5', and 9 in one structure had been described for chicken ovotransferrin (15, 16). The presence of Man 4', trisubstituted as

Carbohydrate Structure Present in Hen Ovomuroid

TABLE II

¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for two oligosaccharide-alditol fractions (7 and 11) from hen β-ovomuroid and for a glycopeptide from chicken ovotransferrin (15,16)

Reporter group	Residue	Chemical shift* in		
		Ovotransferrin	Ovomucoid fraction 7	Ovomucoid fraction 11
				
			ppm	
H-1 of	1	5.056		
	2	4.613	4.632	4.626
	3	4.687	4.696	4.712
	4	5.057	5.057	5.067
	4'	4.998	4.999	4.889
	5	4.537	4.540	4.539
	5'	4.545	4.543	4.545
	7	4.520	4.516	4.517
	7'			4.517 ^a
	9	4.463	4.464	4.443
10'			4.583 ^a	
H-2 of	1-ol		4.246	4.255
	3	4.146	4.146	4.145
	4	4.282	4.284	4.276
	4'	4.141	4.146	4.161
NAc of	1	2.008		
	1-ol		2.055	2.065 ^c
	2	2.077	2.079	2.084
	5	2.057	2.055	2.054 ^c
	5'	2.048	2.048	2.045
	7	2.082	2.083	2.084
	7'			2.093 ^d
	9	2.063	2.064	2.065
	10'			2.122 ^d

* Chemical shifts were acquired at 500 MHz; they are given in parts/million downfield from sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate in D₂O at 300 K. Compounds are represented by schematic structures (cf. (16)): ○ = GlcNAc; ◊ = Man. For complete structures and numbering of residues, see Fig. 3.

^{a,c,d} Assignments are interchangeable.

shown above, once has been suggested for a glycopeptide mixture from turtledove ovomucoid (12). However, by HPLC it turned out to be possible to purify such a penta-antennary structure with an additional intersecting GlcNAc residue to homogeneity, thereby permitting rapid and reliable structural elucidation by combination of permethylation analysis, partial acid hydrolysis, and 500-MHz ¹H NMR spectroscopy.

The first structure of ovomucoid glycan was proposed by Stacey and Wooley (18), in 1940-1942, and was described by the authors as follows: "By glycosidic attachment, seven N-acetylglucosamine units radiate from a central core of three D-mannose units. It is considered that this compound does not represent a repeating unit but rather that it depicts the whole molecule as being that of a hen deca-saccharide. In regard to the structure of ovomucoid itself, it would appear that the peptide constituents are mainly attached to the N-acetyl-D-glucosamine terminal residues." Reading these sentences, it is amazing that they still remain true 40 years later.

Acknowledgments—Thanks are due to G. Ricart and Y. Leroy (Centre National de la Recherche Scientifique technician) for GLC-MS analysis, and to J. Celen for skillful technical assistance.

REFERENCES

- Mellis, S. J., and Baenziger, J. U. (1981) *Anal. Biochem.* 114, 276-280
- Paz Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., and Fournet, B. (1982) *J. Chromatogr.*, in press
- Fredericq, E., and Deutsch, H. F. (1949) *J. Biol. Chem.* 181, 499
- Monsigny, M., Adam-Chosson, A., and Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 857-874
- Bayard, B., and Fournet, B. (1975) *Carbohydr. Res.* 46, 75-86
- Reading, C. L., Penhoet, E., and Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5600-5612
- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C., and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304
- Finne, J., Krusius, T., and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y., and Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502
- Valent, B. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Robertsen, B. K., and Albersheim, P. (1980) *Carbohydr. Res.* 79, 165-192
- Vliegthart, J. F. G., Van Halbeek, H., and Dorland, L. (1981) *Pure Appl. Chem.* 53, 45-77
- François-Gérard, Ch., Brocteur, J., André, A., Gerday, C., Pierce-Crétel, A., Montreuil, J., and Spik, G. (1980) *Blood Transf. Immunohaemat.* 23, 579-587
- Montreuil, J., Fournet, B., Strecker, G., François-Gérard, Ch., Pierce-Crétel, A., and Spik, G. (1980) *Proceedings of the 13th FEBS Meeting, Jerusalem*, p. 194
- Montreuil, J. (1980) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37, 157-223
- Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Fournet, B., and Montreuil, J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 569-574
- Vliegthart, J. F. G., Dorland, L., and Van Halbeek, H. (1982) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, in press
- Herlant-Peers, M. C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300
- Stacey, M., and Wooley, J. M. (1940) *J. Chem. Soc.* 184; (1942) *J. Chem. Soc.* 550

ARTICLE 3

APPLICATION DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON A 500 MHZ
A L'ETUDE DE NOUVELLES STRUCTURES GLYCANNIQUES DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

L'analyse structurale de 3 oligosaccharides isolés par chromatographie liquide haute pression (h.p.l.c.) des hydrazinolysats de l'ovomucoïde est effectuée par perméthylation et Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz. Le résultat le plus intéressant consiste en la localisation d'un résidu de galactose sur une branche d'un oligosaccharide pentaantenné.

Primary structure of a novel *N*-glycosidic carbohydrate unit, derived from hen ovomucoid

A 500-MHz ¹H-NMR study

J. Paz-Parente, G. Strecker, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournier*, H. van Halbeek, L. Dorland and J.F.G. Vliegthart

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I and Laboratoire Associé au CNRS no. 217, F-59635 Villeneuve d'Ascq Cédex, France and Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht, The Netherlands

Received 30 December 1982

The *N*-glycosidic carbohydrate chains of hen β -ovomucoid were released from the protein by hydrazinolysis, and separated by HPLC. Primary structural analysis of 3 major fractions was conducted by applying 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy in combination with methylation analysis. One of the fractions investigated appeared to consist of an intersected penta-antennary structure extended with one Gal residue. The location of the latter in a certain branch could be established unambiguously by NMR.

This structure is a novel member of the family of *N*-glycosidic carbohydrates of glycoproteins.

<i>Ovomucoid</i>	<i>Carbohydrate structure</i>	<i>(Micro)heterogeneity</i>	<i>Hydrazinolysis</i>
	<i>HPLC</i>	<i>¹H-NMR</i>	

1. INTRODUCTION

In [1] we have described the separation by HPLC of 17 oligosaccharides which were released from hen ovomucoid by hydrazinolysis. Recently, the primary-structural analysis of oligosaccharide 11, the most abundant one, was carried out by methylation analysis, partial acid hydrolysis and 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy [2]. Combination of these techniques enabled to connect unambiguously the primary structure of oligosaccharide 11 to the novel type of pentaantennary *N*-glycosidic glycans discovered in turtle-dove ovomucoid [3,4].

* To whom correspondence should be addressed

Abbreviations: HPLC, high-pressure liquid chromatography; GLC, gas-liquid chromatography; GLC-MS, gas-liquid chromatography combined with mass spectrometer; NMR, nuclear magnetic resonance

Here, we report on the primary structure of oligosaccharides 1, 7 and 14, determined by application of 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy in combination with methylation analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

Hen ovomucoid was prepared as in [5]. After pronase digestion, the asialo glycopeptide designated ' β -glycopeptide' was isolated as in [6]. Oligosaccharides were released from the β -glycopeptide by hydrazinolysis [7]. Subsequently they were re-*N*-acetylated [8] and reduced with NaBH₄. The resulting mixture of oligosaccharide alditols was fractionated by semi-preparative HPLC; 17 fractions were obtained [1]. Here, the oligosaccharides 1, 7 and 14 are further investigated.

Quantitative carbohydrate analysis of the oligosaccharides was carried out by GLC after methanolysis and pertrifluoroacetylation [9].

Permethylation of the oligosaccharides was performed according to [10] and the partially methylated monosaccharides were identified by GLC-MS according to [11].

For $^1\text{H-NMR}$ analysis, the oligosaccharides were repeatedly exchanged in D_2O . $^1\text{H-NMR}$ spectroscopic analysis was performed on a Bruker WM-500 spectrometer (SON hf-NMR facility, Nijmegen) operating at 500 MHz in the Fourier transform mode at a probe temperature of 300 K [12]. Chemical shifts are given in ppm relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) (indirectly to acetone in D_2O : δ 2.225).

3. RESULTS

3.1. Carbohydrate composition; permethylation studies

The molar carbohydrate compositions of oligosaccharides 1, 7 and 14 are reported in table 1. The number of Man residues for each oligosaccharide being set to 3, one residue of GlcNAc-ol is found in each of the 3 oligosaccharides; besides 1, 5 and 7, GlcNAc residues occur in oligosaccharides 1, 7 and 14, respectively. For the latter oligosaccharide, the same relatively high value for the ratio total GlcNAc:Man (2.6) is found, as for the glycopeptides derived from the turtle-dove ovomucoid [4] and oligosaccharide 11 from hen ovomucoid [2].

The molar ratios of the monosaccharide methyl ethers derived from the permethylated oligosaccharides 1, 7 and 14 are compiled in table 2. The results for oligosaccharide 1 are in accord with a trimannosyl-di-*N*-acetylchitobiose core structure, as has been described also for quail ovomucoid

[13]. For oligosaccharide 7, methyl-2-mono-*O*-methyl mannoside is found, which suggests the occurrence of an intersecting GlcNAc residue (1 \rightarrow 4)-linked to Man 3. (For numbering of sugar residues see fig.1-3). The same methyl ethers as for 7 were found previously for glycopeptides obtained from chicken ovotransferrin [14]. Methylation analysis of the oligosaccharide 14, like that of oligosaccharide 11 [2] reveals the presence of two different mono-*O*-methyl-mannosides in equal amounts: methyl 2- and methyl 3-mono-*O*-methyl mannosides. The presence of the two mono-*O*-methyl ethers of mannose had been demonstrated already by methylation analysis of glycopeptides from turtle-dove ovomucoid [4] and of total hen ovomucoid [3,15]. These results indicate that one residue of mannose is substituted at positions 2 and 4, a second mannose at positions 3, 4 and 6 and the third mannose at positions 2, 4 and 6. The difference between oligosaccharides 11 [2] and 14 is the presence of one Gal residue in terminal non-reducing position in 14, witness the presence of methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl galactoside (1 \rightarrow 4)-linked to one of the GlcNAc residues. No indications useful for localization of the Gal residue in a certain branch can be derived from sugar and methylation analysis.

3.2. 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

To elucidate the primary structures of the hen ovomucoid oligosaccharides 1, 7 and 14, 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra of the compounds in D_2O were recorded. Relevant NMR parameters for the 3 fractions are listed in table 3; for reference purposes, those for fraction 11 have been included (*cf.* [2]). The structural-reporter-group regions of the

Table 1
Carbohydrate composition of oligosaccharide 1, 7 and 14 obtained by semi-preparative HPLC of glycans liberated from hen ovomucoid neutral-glycopeptide by hydrazinolysis

Oligosaccharide	Molar ratio ^a of				GlcNAc +
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol	GlcNAc-ol ratio
					Man
1	0	3	1.30	0.94	0.74
7	0	3	4.64	0.94	1.86
14	1.07	3	6.80	1.07	2.62

^a Man taken as 3

Table 2

Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated oligosaccharides 1, 7 and 14

Oligo- saccha- ride	Partially methylated monosaccharide (mol/mol) of oligosaccharides)									
	2,3,4,6- tetra- OMe- Gal ^a	2,3,4,6- tetra- OMe- Man	3,4,6 tri- OMe- Man	2,4-di- OMe- Man	3,6-di- OMe- Man	2-Mono- OMe- Man	3-Mono- OMe- Man	3,4,6- tri- OMe-Glc NAcNMe ^b	3,6-di OMe-Glc NAcNMe	1,3,5,6- tetra- OMeGlc-ol NAcNMe
1	-	1.90	-	$\frac{1}{2}$	-	-	-	-	0.91	0.95
7	-	-	1.1	-	0.87	$\frac{1}{2}$	-	3.88	0.9	0.98
14	0.9	-	-	-	0.92	1.1	$\frac{1}{2}$	4.82	1.9	0.91

^a O-Methyl is abbreviated as OMe

^b N-acetyl-N-methyl is abbreviated as NAcNMe

500-MHz ¹H-NMR spectrum of 14, as a typical example, are depicted in fig.1.

Comparison of the ¹H-NMR data for compounds 1, 7, 11 and 14 reveals that all 4 of them are reduced oligosaccharides having in common the GlcNAc $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc-ol structural element. The spectral features that are characteristic for the presence of this unit are the H-2 signal of GlcNAc-1-ol at $\delta = 4.25$ (seemingly, a broadlined quartet in the Man H-2 region of the spectrum, $4.0 < \delta < 4.3$, see fig.1), the H-1 doublet of GlcNAc-2 at $\delta = 4.63$ (this chemical shift value, in combination with $J_{1,2}$ being 7.85 Hz, points to the $\beta(1 \rightarrow 4)$ -linkage of GlcNAc-2 to reduced GlcNAc-1; see also [2]), and two N-acetyl methyl singlets at $\delta = 2.055$ and $= 2.08$ for GlcNAc-1-ol and GlcNAc-2, respectively. Furthermore, all 4 compounds contain the mannotriose branching core that is usually found in N-glycosidic carbohydrate chains. Evidence for this stems from the occurrence of 3 Man H-1 signals, and also of 3 Man H-2 signals, in each of the spectra (see, for example, fig.1). The characteristic shapes of these signals point to a β -glycosidic linkage for one of the mannoses (designated Man-3) and to α -glycosidic linkages for the other two (designated 4 and 4') [16].

Compound 1 is an incomplete diantennary structure that possesses both Man-4 and Man-4' in terminal, non-reducing position. This can be concluded from comparison of the H-1 and H-2 chemical shifts of these residues in 1 (see table 3) with those for terminal Man-4 and Man-4' residues in the

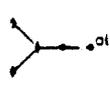
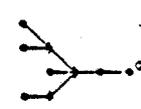
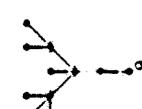
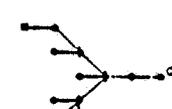
oligomannoside-type glyco-asparagines M₂GP and M₃GP [17], or in oligosaccharides like M₂G from mannosidosis urine [18], Ala and Alb from human meconium [19], and 2a and 2b from urine of patients with Morquio syndrome type B [20]. Therefore, the structure of compound 1 appears to be Man $\alpha(1 \rightarrow 3)$ [(Man $\alpha(1 \rightarrow 6)$)]Man $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNAc-ol.

The resonance positions of the Man-3, -4 and -4' H-1 and H-2 atoms in the spectrum of compound 7 indicate the branching pattern to be intersected triantennary. This can be readily inferred from comparison of these shift data (see table 3) with those described for a glycopeptide derived from chicken ovotransferrin [14,16]. Moreover, the peripheral part of the structure of the ovotransferrin glycopeptide just mentioned and that of compound 7 from hen ovomucoid are identical. The correctness of this conclusion is proved by the perfect accord between the H-1 and also the NAc signals of the 4 terminal GlcNAc residues for these compounds, both as to their number, as well as to their chemical shifts.

The ¹H-NMR spectral features of the intersected pentaantennary structure 11 have been described in detail [2]. It should be mentioned that such a type of branching (i.e., a 2,4-disubstitution of Man-4 and a 2,4,6-trisubstitution of Man-4' besides the presence of the intersecting GlcNAc-2) gives rise to a unique set of Man H-1 and H-2 chemical shifts. In addition, the Man-4 H-3 and Man-4' H-4 signals occupy typical positions. Comparison of the corresponding Man H-1, H-2, H-3 and H-4

Table 3

¹H chemical shifts of structural-reporter groups of constituent monosaccharides for some major carbohydrates from hen β-ovomucoid^a

Reporter group	Residue ^b	Compound and schematic structure ^c			
		<i>1</i>	<i>7</i>	<i>11</i>	<i>14</i>
					
H-1 of	<u>2</u>	4.637	4.632	4.626	4.626
	<u>3</u>	-4.78	4.696	4.712	4.712
	<u>4</u>	5.103	5.057	5.067	5.066
	<u>4'</u>	4.915	4.999	4.889	4.890
	<u>5</u>	-	4.540	4.539	4.538
	<u>5'</u>	-	4.543	4.545	4.545
	<u>7</u>	-	4.516	4.517	4.538
	<u>7'</u>	-	-	4.517 ^d	4.518 ^d
	<u>8</u>	-	-	-	4.471
	<u>9</u>	-	4.464	4.443	4.443
	<u>10'</u>	-	-	4.583 ^d	4.586 ^d
H-2 of	<u>1-ol</u>	4.244	4.246	4.255	4.254
	<u>3</u>	4.259	4.146	4.145	4.145
	<u>4</u>	4.067	4.284	4.276	4.277
	<u>4'</u>	3.974	4.146	4.161	4.158
H-3 of	<u>4</u>	n.d.	4.048	4.043	4.044
H-4 of	<u>4'</u>	n.d.	n.d.	4.194	4.194
NAc of	<u>1-ol</u>	2.055	2.055	2.054 ^e	2.053 ^e
	<u>2</u>	2.076	2.079	2.084	2.084
	<u>3</u>	-	2.055	2.065 ^e	2.064 ^e
	<u>5</u>	-	2.048	2.045	2.045
	<u>5'</u>	-	2.083	2.084	2.079
	<u>7</u>	-	-	2.093 ^f	2.093 ^f
	<u>7'</u>	-	-	-	-
	<u>9</u>	-	2.064	2.065	2.064
	<u>10'</u>	-	-	2.122 ^f	2.121 ^f

^a Chemical shifts are given at 300 K, in ppm downfield from internal DSS in D₂O

^b For numbering of monosaccharide residues and complete structures, see fig.3

^c Compounds are represented by schematic structures (cf. [17]); (●—) GlcNAc; (◐—) Man; (■—) Gal

^{d,e,f} Assignments may have to be interchanged

n.d., value could not be determined

chemical shifts for compounds *7* and *11* (see table 3) reveals that those for Man-4' deviate considerably, while those for Man-4 are essentially the same for both compounds. This led us to the con-

clusion [2] that Man-4' in *11* is the trisubstituted Man residue, the occurrence of which was established by methylation analysis. Apart from the core GlcNAc signals, another seven GlcNAc

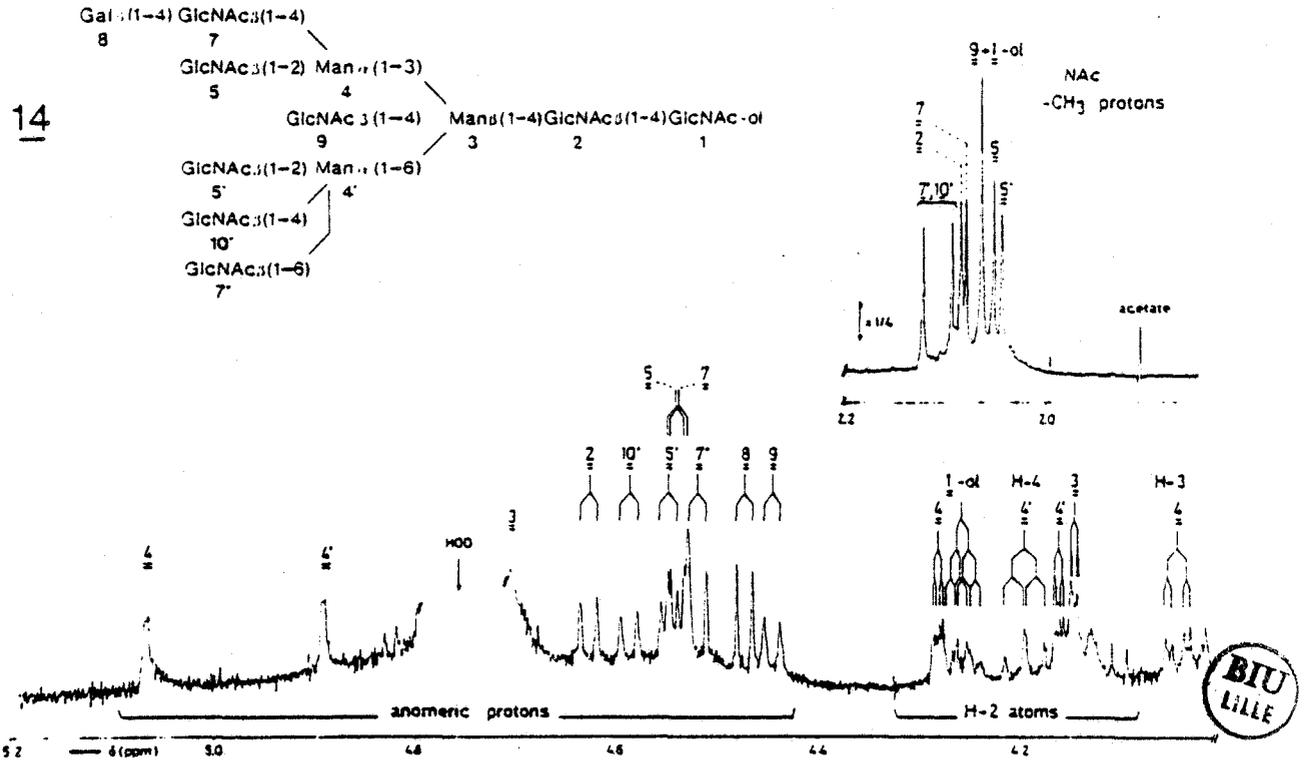


Fig.1. Structural reporter-group regions of the resolution-enhanced 500-MHz ¹H-NMR spectrum of oligosaccharide-alditol 14, derived from hen ovomucoid, in D₂O at 300 K. The numbers in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative-intensity scale of the *N*-acetyl proton region differs from that of the other part of the spectrum, as indicated.

H-1 doublets and NAc singlets are observed:

Methylation analysis of compound 14 (see table 2) suggested that the latter might differ from structure 11 only in the presence of a terminal Gal residue, (1→4)-linked to a GlcNAc. Once this suggestion is verified, the position of Gal in a certain branch remains to be established. In order to facilitate comparison between the 500-MHz ¹H-NMR spectra of fractions 11 and 14, pertinent parts of both are presented in fig.2.

The branching pattern of the mannotriose core in 14 is indeed the same as in 11, as can be readily inferred from the perfect accordance of the Man H-1 and also the H-2 chemical shifts (see also table 3). The resonance position of Man-4 H-3 (δ 4.044) corroborates the 2,4-disubstitution of this residue, that of Man-4' H-4 (δ 4.194) confirms the 2,4,6-trisubstitution of the latter residue. From comparison of the β-anomeric region (4.4 < δ <

4.7) of both spectra (see fig.2), it is obvious that in the spectrum of 14 one additional doublet is present, at δ 4.471 (*J*_{1,2} = 7.8 Hz). This combination of δ- and *J*-value is known to be characteristic for a terminal Gal residue β(1→4)-linked to GlcNAc [10,16]. Thus, compound 14 appears to be an extension of compound 11 with one Gal residue.

The attachment of this Gal residue to structure 11 causes two significant chemical-shift alterations of GlcNAc structural-reporter groups. First, one of the two H-1 doublets at δ 4.517 for 11 is shifted towards δ 4.538 for 14, while the positions of all other anomeric doublets are unchanged, going from 11 to 14. Secondly, one of the two *N*-acetyl singlets, coinciding at δ 2.084 for 11, is shifted towards δ 2.079. The *N*-acetyl signals at δ 2.084 for 11 were unambiguously assigned to GlcNAc-2 and -7 (cf. compound 7, table 3) [2]. The doublets coinciding at δ 4.517 for 11 belong to the H-1 atoms of

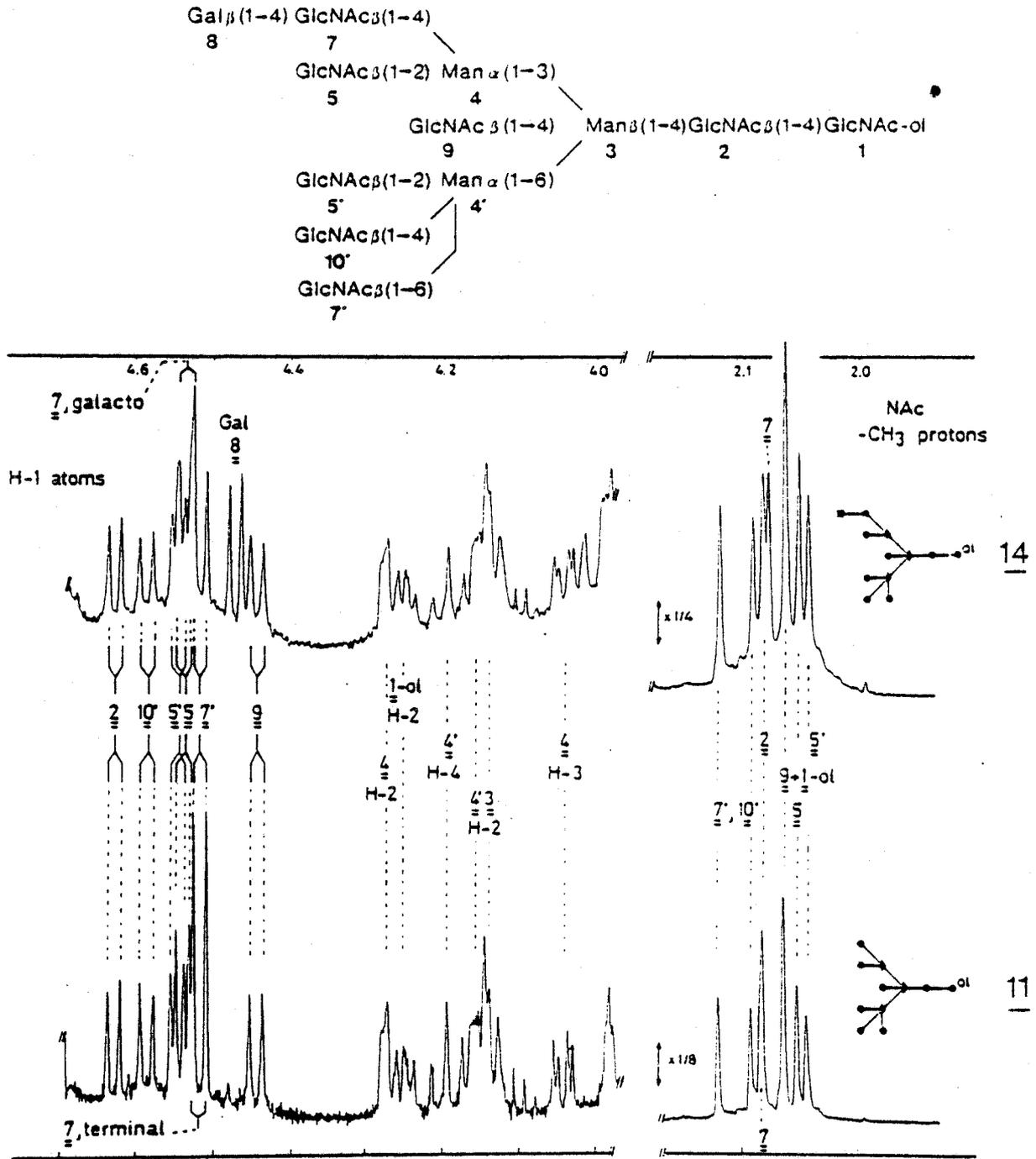


Fig.2. Pertinent structural reporter-group regions of the resolution-enhanced 500-MHz ¹H-NMR spectra of oligosaccharide-alditols 11 (lower trace) and 14 (upper trace) from hen ovomucoid. Compounds are represented by schematic structures; (◐) GlcNAc; (◑) Man; (◒) Gal. The numbers in the spectra refer to corresponding residues in the structures (see fig.1 and 3). The relative-intensity scales of the N-acetyl proton regions differ from those of the other parts of the spectra, as indicated.

GlcNAc-7 and either of GlcNAc-7' or of -10'. The observed shift increments (for H-1, $\Delta\delta = 0.02$ ppm, and for NAc, $\Delta\delta = -0.005$ ppm), if occurring simultaneously, are very typical for the attachment of Gal in $\beta(1 \rightarrow 4)$ -linkage to GlcNAc [16,21]. Since GlcNAc-2 is already substituted by Man-3 in $\beta(1 \rightarrow 4)$ -linkage, only GlcNAc-7 can be considered to be the GlcNAc residue that bears Gal in oligosaccharide 14. Therefore, Gal in fraction 14 has been identified to be Gal-8 (see fig.1).

4. CONCLUSIONS

The structures which can be proposed on the basis of the results of 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy in conjunction with methylation analysis for the oligosaccharides 1, 7 and 14 from hen ovomucoid are summarized in fig.3. Oligosaccharide 1 corresponds to the core structure of *N*-glycosidic glycans of glycoprotein; the same primary structure has been isolated from quail

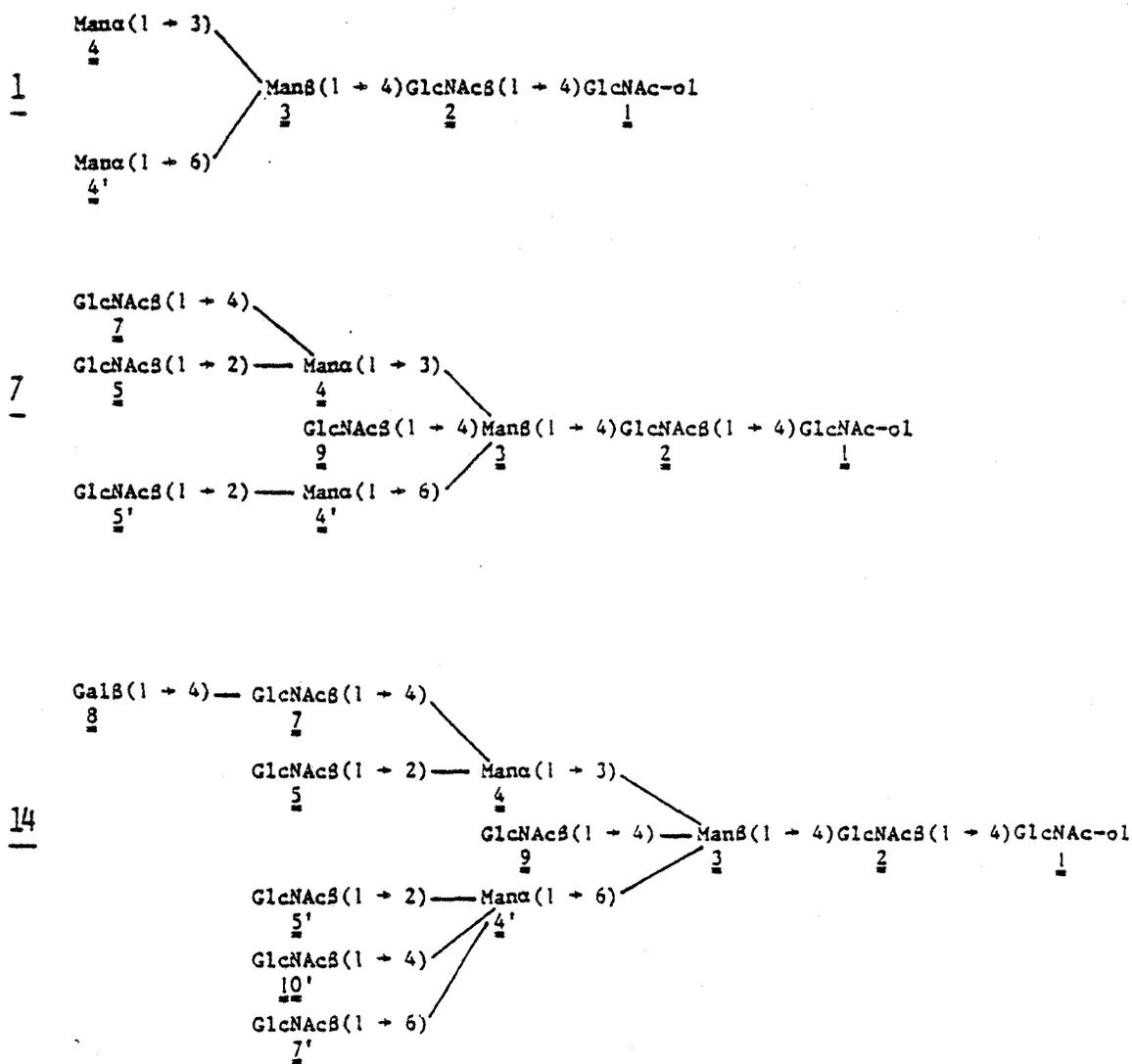


Fig.3. Structures of oligosaccharide-alditols 1, 7 and 14, isolated from hen ovomucoid.

ovomucoid [13]. Oligosaccharide 7 is essentially identical to the carbohydrate moiety of chicken ovotransferrin [14]. Oligosaccharide 14 possesses a pentaantennary structure with an intersecting GlcNAc residue and one Gal residue $\beta(1\rightarrow4)$ -linked to GlcNAc-7. It is an extension of oligosaccharide 11, the NMR parameters of which were described in [2]. The subtle differences between the NMR parameters of the structural-reporter groups of GlcNAc 7 for oligosaccharide 14 as compared to 11, enabled to establish that Gal in 14 is linked to GlcNAc-7. It is remarkable that in hybrid type, *N*-glycosidic oligosaccharides containing a Gal residue, this Gal has been found to occur also in $\beta(1\rightarrow4)$ -linkage to GlcNAc-7 [22]. This novel pentaantennary structure was also demonstrated in turtle-dove ovomucoid [3,4].

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé no. 217); the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (79.7.0669), the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and by the Netherlands Foundation for Cancer Research (Grant UUKC-OC 79-13). Thanks are due to M.G. Ricart for GLC-MS analysis and to B. Mahieu, G. Tinel and J. Celen for skillful technical assistance.

REFERENCES

- [1] Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1982) *J. Chromatogr.* 249, 199-204.
- [2] Paz-Parente, J., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Montreuil, J., Fournet, B., Van Halbeek, H., Dorland, L. and Vliegthart, J.F.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13173-13176.
- [3] Montreuil, J., Fournet, B., Strecker, G., François-Gérard, Ch., Pierce-Crétel, A. and Spik, G. (1980) *Proc. 13th FEBS-Meeting, Jerusalem*, p.194.
- [4] François-Gérard, Ch., Brocteur, J., André, A., Gerday, C., Pierce-Crétel, A., Montreuil, J. and Spik, G. (1980) *Blood Transf. Immunohaemat.* 23, 579-587.
- [5] Fredericq, E. and Deutsch, H.F. (1949) *J. Biol. Chem.* 181, 499.
- [6] Monsigny, M., Adam-Chosson, A. and Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 857-874.
- [7] Bayard, B. and Fournet, B. (1975) *Carbohydr. Res.* 46, 75-86.
- [8] Reading, G.L., Penhoet, E. and Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5600-5612.
- [9] Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304.
- [10] Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.
- [11] Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 486-502.
- [12] Vliegthart, J.F.G., Van Halbeek, H. and Dorland, L. (1981) *Pure Appl. Chem.* 53, 45-77.
- [13] Hase, S., Okawa, K. and Ikenaka, T. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* 91, 735-737.
- [14] Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J.F.G., Spik, G., Fournet, B. and Montreuil, J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 569-574.
- [15] Conchie, J., Hay, A.J. and Lomax, J.A. (1982) *Carbohydr. Res.* 103, 129-132.
- [16] Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. and Van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, in press.
- [17] Van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Michalski, J.-G., Montreuil, J., Strecker, G. and Hull, W.E. (1980) *FEBS Lett.* 121, 65-70.
- [18] Van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Strecker, G., Michalski, J.-C., Montreuil, J. and Hull, W.E. (1980) *FEBS Lett.* 121, 71-77.
- [19] Heriant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300.
- [20] Michalski, J.-C., Strecker, G., Van Halbeek, H., Dorland, L. and Vliegthart, J.F.G. (1982) *Carbohydr. Res.* 100, 351-363.
- [21] Carver, J.P. and Grey, A.A. (1981) *Biochemistry* 20, 6607-6616.
- [22] Yamashita, K., Tachibana, Y. and Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3862-3869.

ARTICLE 4

ANALYSE D'OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE PAR FAB-MS et EI-MS

L'analyse d'oligosaccharides perméthylés par FAB-MS et EI-MS permet de confirmer les séquences primaires de glycannes obtenus par perméthylation et Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz. Cette technique conduit en outre à préciser la masse moléculaire des constituants et à caractériser des oligosaccharides mineurs qui souillent les préparations.

Carbohydrate structures of hen ovomucoid

A mass spectrometric analysis

Heinz Egge, Jasna Peter-Katalinić, José Paz-Parente*, Gerard Strecker*, Jean Montreuil* and Bernard Fournet*

*Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn, FRG and *Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I and Laboratoire Associé au CNRS no.217, 59655 Villeneuve D'Ascq Cédex, France*

Received 19 April 1983

The apparently homogenous *N*-glycosidically-linked glycans 1, 7, 11 and 14 released by hydrazinolysis from hen ovomucoid were analysed by fast atom bombardment and electron-impact mass spectrometry after reduction and permethylation. The spectra support the primary structures established independently [FEBS Letters (1983) 152, 145–152] using methylation analysis, partial acid hydrolysis and 500 MHz ¹H NMR spectroscopy. In addition to the major constituents present in fractions 1, 7, 11 and 14, four minor components not detected by other methods could be characterized with the aid of the mass spectrometry data as: Man₂GlcNAcGlcNAc-ol, GlcNAc₄Man₃GlcNAc-ol, GlcNAc₆Man₃GlcNAc-ol and GalGlcNAc₆Man₃GlcNAc-ol. Our results show that the physical techniques used provide valuable data on the structure of complex glycans. In addition they can be employed to ascertain the homogeneity of the compounds examined as well as to detect trace amounts of homologs that might not be noticed by other methods.

Ovomucoid Carbohydrate structure Fast atom bombardment Heterogeneity
Mass spectrometry

1. INTRODUCTION

The multibranched structures of the glycans of hen ovomucoid were first recognized by Stacey and Wooley [1,2]. The heterogeneity of the oligosaccharide moieties linked *N*-glycosidically to hen ovomucoid is well documented [3]. After hydrazinolysis 17 major fractions could be separated by HPLC. The structures of several of

the major components were determined by combined methylation analysis, partial acid hydrolysis and 500 MHz ¹H NMR spectroscopy [4,5]. Fast atom bombardment and electron-impact mass spectrometry [6–8] of the 4 permethylated fractions 1, 7, 11 and 14 [3] homogenous by chromatographic criteria furnished additional data supporting the proposed structures [4,5] but showing also the presence of minor amounts of homologs that were not yet detected by other methods.

Dedicated to Professor Eckhard Buddecke on the occasion of his 60th birthday

Abbreviations: amu, atomic mass units; FAB, fast atom bombardment; EI, electron impact; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; MIKES, mass analysed ion kinetic energy spectrometry

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation, purification and permethylation

The preparation, purification and permethylation of the fractions 1, 7, 11 and 14 from hen ovomucoid followed the procedures in [3,9–13].

Published by Elsevier Science Publishers B.V.

00145793/83/\$3.00 © Federation of European Biochemical Societies

2.2. Mass spectrometry

Mass spectrometry was performed on a VG analytical ZAB-HF reversed geometry mass spectrometer. For fast atom bombardment [7,8], samples were dissolved in methanol to $\sim 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. The stainless steel target was first loaded with $1 \mu\text{l}$ of a 0.1% solution of sodium acetate in methanol. After drying, 3–4 μl 1-mercapto-2,3-propanediol (EGA Chemie, Steinheim) and 0.5–1.0 μl sample solution was applied to the target. The target was bombarded with xenon atoms having a kinetic energy equivalent to 9.0–9.5 kV. Spectra were recorded routinely at 7 kV acceleration voltage giving a mass range of ~ 3800 amu in a mass-controlled scan. The resolution was set to 250 ppm. Normally, 5 μg sample furnished molecular or pseudo-molecular ions with a 1000-fold intensity as compared to that of the background signals produced by the thioglycerol matrix. Spectra were recorded in the positive ion mode by a mass controlled scan of 100–500 s duration depending on the M_r of the sample. The spectra were evaluated by counting thus giving whole mass numbers that are presented in section 3. The mass numbers indicated are therefore lower by about one mass unit at M_r 2000 than calculated ones based on: C = 12.000; H = 1.008; O = 15.995; and N = 14.003.

Electron impact spectra were obtained on the same instrument. The samples were heated indirectly by raising the temperature of the ion source (150–350°C) until relevant spectra were obtained. Spectra were recorded at an ionization energy of 20 eV. Fomblin oil was used for the calibration of the mass marker. For linked-scan measurements mass analysed ion kinetic energy spectrometry [14], B/E and B^2/E measurements were used.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The FAB spectra of the fractions 1, 7, 11 and 14 showed intense pseudo-molecular ions $M + \text{Na}^+$ besides ions produced by the reduced and non-reducing terminal carbohydrate constituents like mannose, *N*-acetyl-D-galactosamine, D-galactose and *N*-acetyl-D-glucosaminol.

Structurally important ions were also produced by the cleavage of the glycosidic bond of the chitobiose unit with the positive charge remaining

on the large non-reducing oligosaccharide fragment, thus furnishing another series of ions of diagnostic value.

The major fragment ions obtained by FAB MS from the 4 permethylated fractions are gathered in table 1.

Thanks to the high intensity of the pseudo-molecular ions, FAB MS is especially sensitive and well-suited for the detection of accompanying homologs that are not easily revealed by other spectroscopic or degradative methods. This is exemplified by the pseudo-molecular ions at m/e 983, m/e 1922, m/e 2412 and m/e 2616 in fractions 1, 7, 11 and 14, respectively, which indicate the presence of lower homologs in all 4 fractions. In 1 the pseudo-molecular ion m/e 983, 204 amu below the major component, is accompanied by m/e 668, which is produced by fission of the chitobiose moiety, thus indicating that here one of the terminal mannose residues is missing. In 7, 11 and 14 the pseudo-molecular ions of the lower homologs all differ by 245 amu from the major components, thus indicating a difference of one *N*-acetyl-D-glucosamine residue. Whereas in 7, 11 and 14 all 3 major pseudo-molecular ions are accompanied by ions 315 amu lower than are produced by fission of the chitobiose linkage, no such ions were found for the lower homologs. Hence, it is concluded that in these components one of the *N*-acetyl-D-glucosamine residues of the chitobiose moiety has been lost.

The EI spectrum of 1 furnishes valuable additional structural information. The base peak m/e 182 indicates a 4-substituted GlcNAc residue. Like in the FAB spectrum the ion m/e 521 represents the chitobiose residue. The branched structure of the mannotriose can be deduced from the absence of dihexosyl fragments (m/e 423, 391). A typical feature of EI spectra of oligomannosides is the high intensity of the $M-45$ ion m/e 1119 [15]. Like in the higher oligomannosides the α -1-6 bond of one of the terminal mannose residues is documented by the rearrangement ion m/e 989 as in fig. 1a. The fragment m/e 1034 is produced by cleavage of the C_2-C_3 bond of the reduced GlcNAc residue.

For the lower homolog $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ detected in the FAB spectrum only weak signals are present in the EI spectrum obtained at 250°C. From the relative intensity of the fragment m/e 785 over 725

Table 1

Carbohydrate composition and relative intensity of major ions of diagnostic importance observed in the FAB MS spectra of reduced and permethylated oligosaccharide fractions 1, 7, 11 and 14 obtained after hydrazinolysis from hen ovomucoid glycopeptides

Carbohydrate composition	Atomic mass number (amu)	Relative intensity (%) of base peak			
		1	7	11	14
Gal ⁺	219	33			
Man ⁺	219				
GlcNAc ⁺	260		100	100	100
GlcNAc-ol ⁺	276	32	6	7	6
GlcNAcMan ⁺	464				
GalGlcNAc ⁺	464		1		22
GlcNAcGlcNAc-ol ⁺	521	4	0.5	1	0.5
Man ₂ GlcNAc ⁺	668		8		
Man ₃ GlcNAc ⁺	872		24		
Man ₂ GlcNAcGlcNAc-ol + Na ⁺	983		26		
Man ₃ GlcNAcGlcNAc-ol + Na ⁺	1187		90		
GlcNAc ₄ Man ₃ GlcNAc ⁺	1852		1		
GlcNAc ₄ Man ₃ GlcNAc-ol + Na ⁺	1922		1		
GlcNAc ₄ Man ₃ GlcNAcGlcNAc-ol + Na ⁺	2167		3		
GlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAc ⁺	2342			3	
GlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAc-ol + Na ⁺	2412			7	
GalGlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAc ⁺	2546				0.5
GalGlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAc-ol + Na ⁺	2616				1
GlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAcGlcNAc-ol + Na ⁺	2657			10	
GalGlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAcGlcNAc-ol + Na ⁺	2861				2

found however in EI spectra obtained at 230°C probe temperature a preponderance of the structure shown in fig.1b can be deduced.

The EI spectra of fractions 7, 11 and 14 are, as a consequence of the highly branched structure, extremely complex. In contrast to EI spectra of permethylated oligosaccharides with linear chains which show series of intense sequence ions produced by fission of the glycosidic linkages, here secondary fragmentation and recombination mechanisms are prevailing. As an example, the EI spectrum of fraction 11 is shown in fig.2. The terminal constituents are easily recognized by m/e 260, 228 and m/e 276. The reduced chitobiose unit gives rise to m/e 521. In the middle and high mass range only a few and not always the most intense fragments are produced by fission of one of the glycosidic bonds like m/e : 709; 1419; 1664; 2113; 2342; and 2358. The primary fragments in the high mass range furnish series of secondary ions that are produced predominantly by loss of GlcNAc residues with concomitant elimination or recombination of

hydrogen, oxygen or methyl groups leading to ions 2, 14 or 16 amu apart (schemes 1a,b). Thus instead of producing a series of intense ions as in linear chains, clusters of ions are present whose centers are 260 amu apart. The lower homolog GlcNAc₆-Man₃GlcNAc-ol, shown to be present by the FAB MS can hardly be recognized in the EI spectrum by specific fragments because in some cases they are coinciding with or are buried in the ion clusters produced by the major compound.

In oligosaccharides containing 1-6 bonds, rather intense rearrangement ions are normally observed 60 amu higher than the ions produced by the cleavage of the glycosidic bond [15]. In fig.2, two such pairs can be recognized at m/e 2113; 2173 and m/e 2358; 2418, respectively, which can be attributed to the two components present in 11. Some of the major degradative pathways are depicted in the schemes 1a and 1b.

FAB MS combined with EI MS provides valuable data on the structure of complex glycans. Certainly the complete structural elucidation has

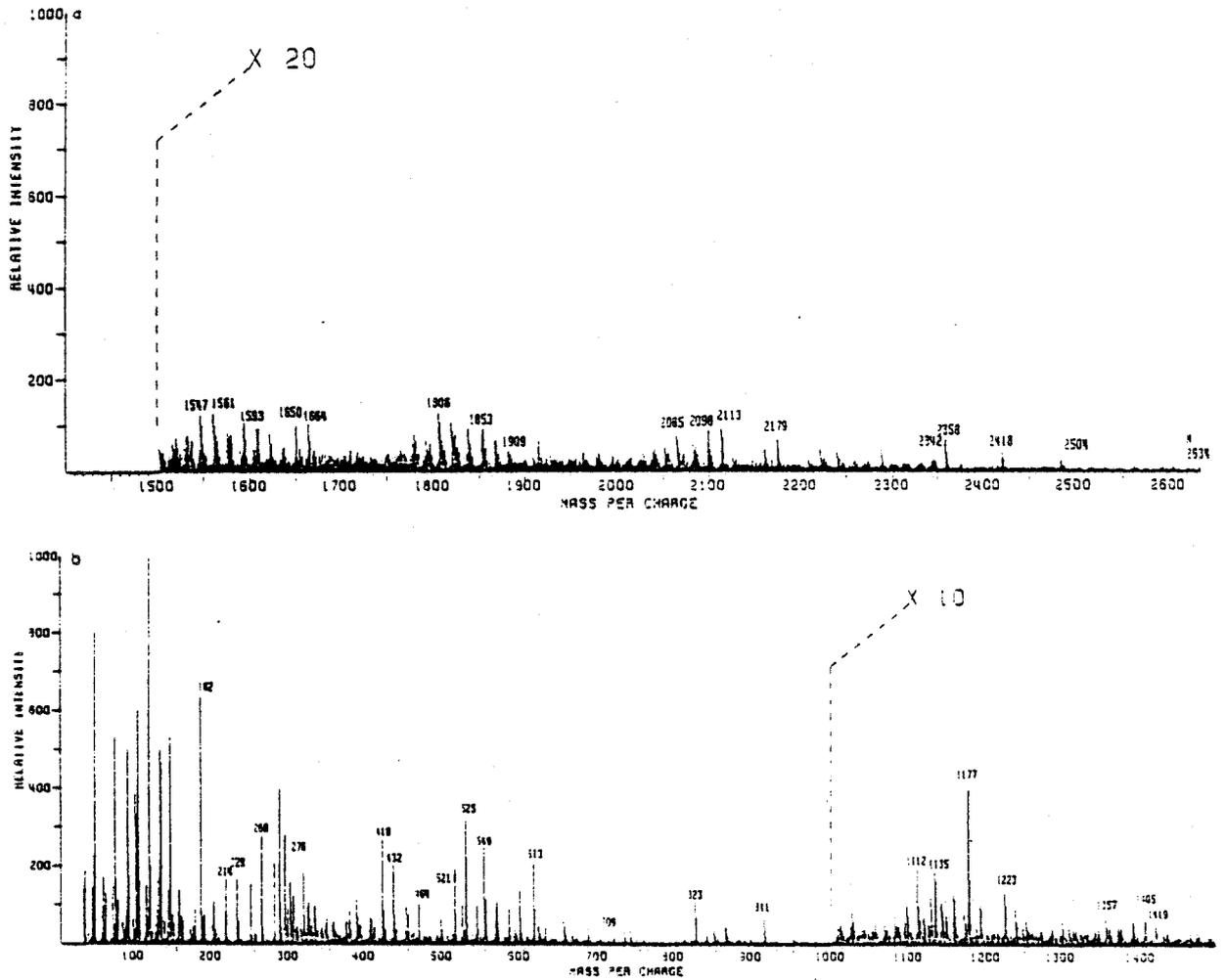
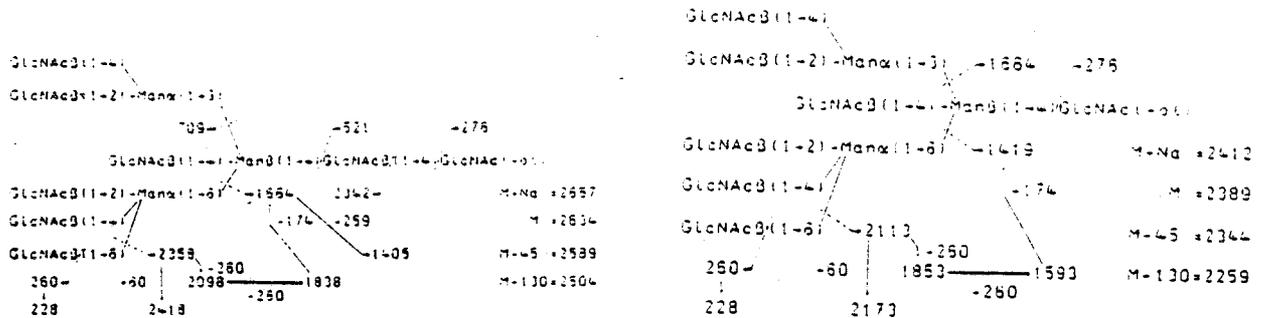


Fig.2. EI mass spectrum of compound 11 obtained at 20 eV ionization energy and 300°C probe temperature.



Schemes 1a, b

Major fragmentation pathways of the two components present in fraction 11, as observed under electron impact

ACKNOWLEDGEMENTS

The skilful assistance of B. Barnhusen and M. Pflüger is gratefully acknowledged. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Deutschen Chemischen Industrie.

REFERENCES

- [1] Stacey, M. and Wooley, J.M. (1940) *J. Chem. Soc.* 184-191.
- [2] Stacey, M. and Wooley, J.M. (1942) *J. Chem. Soc.* 550-555.
- [3] Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1982) *J. Chromatogr.* 249, 199-204.
- [4] Paz-Parente, J., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Montreuil, J., Fournet, B., Van Halbeck, H., Dorland, L. and Vliegthart, J.F.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13173-13176.
- [5] Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., Van Halbeck, H., Dorland, L. and Vliegthart, J.F.G. (1983) *FEBS Lett.* 152, 145-152.
- [6] Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D. and Tyler, A.N. (1981) *Chem. Commun.* 325-327.
- [7] Dell, A., Morris, H.R., Egge, H., Strecker, G. and v. Nicolai, H. (1983) *Carbohydr. Res.* 115, 41-52.
- [8] Dell, A., Oates, J.E., Morris, H.R. and Egge, H. (1983) *Int. J. Mass. Spec. Ion Phys.* 46, 415-418.
- [9] Fredericq, E. and Deutsch, H.F. (1949) *J. Biol. Chem.* 181, 499.
- [10] Monsigny, M., Adam-Chosson, A. and Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 857-874.
- [11] Bayard, B. and Fournet, B. (1975) *Carbohydr. Res.* 46, 75-86.
- [12] Reading, G.L., Penhoer, E. and Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5600-5612.
- [13] Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.
- [14] Brenton, A.G. and Beynon, J.H. (1980) *Eur. Spectrosc. News* no.29.
- [15] Egge, H., Michalski, J.C. and Strecker, G. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 318-326.

ARTICLE 5

FRACTIONNEMENT DE SIALYLOLIGOSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION. APPLICATION AUX FRACTIONS ACIDES DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

Les glycanes acides de l'ovomucoïde de Poule obtenus par hydrazinolyse sont isolés par classe (mono, di, tri, tétra, polysialyloligosaccharides) par H.P.L.C. sur colonne de silice greffée de type amine quaternaire. Le travail original présenté dans cet article consiste en la séparation d'oligosaccharides monosialylés par chromatographie de partition sur colonne de silice greffée de type alkyl-amine en utilisant dans la phase mobile (acétonitrile et KH_2PO_4) une base le 1,4-diamino-butane (DAB).

Journal of Chromatography, 288 (1984) 147-155
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 16,504

SEPARATION OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

APPLICATION TO ANALYSIS OF CARBOHYDRATE UNITS OF ACIDIC OLIGOSACCHARIDES OBTAINED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVO-MUCOID

JOSÉ PAZ PARENTE, YVES LEROY, JEAN MONTREUIL and BERNARD FOURNET*

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au C.N.R.S. No. 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France)

(Received December 6th, 1983)

SUMMARY

Sialyl-oligosaccharides derived from hen ovomucoid by hydrazinolysis have been separated by liquid chromatography on quaternary amine bonded silica and alkylamine modified silicas. By using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate with 0.01% of 1,4-diaminobutane, effective resolution of high-molecular-weight monosialylated oligosaccharides was achieved in less than 2 h.

INTRODUCTION

Hen ovomucoid is a glycoprotein with a molecular weight of 28,000 and carbohydrate content of 25% which plays a role in the inhibitory activity proteolytic enzymes¹. The glycoprotein is characterized by a high degree of microheterogeneity of its carbohydrate moieties^{2,3}. Because of the difficulty of obtaining homogeneous glycopeptides, few investigations have been made of the structures of the carbohydrate fractions of ovomucoid. Montreuil and co-workers studied extensively the structure of asialo-ovomucoid by partial hydrolysis⁴, acetolysis⁵ and methylation analysis⁶ and presented a complete structure⁷. Yamashita *et al.*⁸ isolated, by hydrazinolysis and chromatography on Bio-Gel P₄, eight fractions and showed that penta-antennary complex type asparagine-linked sugar chains occur in a pure glycoprotein. In a later paper⁹ they reported the results of structural studies of the remaining smaller oligosaccharides and indicated that the sugar chains of hen ovomucoid may be synthesized by a pathway different from the general processing pathway. Conchie and co-workers¹⁰⁻¹² established on the asialo-ovomucoid glycopeptides the existence of the unusual feature of two different, triply-substituted mannosyl residues occurring in a single glycopeptide.

We have described¹³ the preparation by high-performance liquid chromato-

J. PAZ PARENTE *et al.*

graphy (HPLC) on a bonded-phase amine column of 17 fractions of oligosaccharide alditols obtained by hydrazinolysis, N-reacetylation and reduction of asialo-ovomucoid. The primary structural analyses of the major fractions were conducted by applying 500 MHz ^1H NMR spectroscopy in combination with methylation analysis^{14,15} and mass spectrometric analysis¹⁶. Novel types of asparagine-bonded carbohydrate chain were determined and appeared to consist of an intersected pentantennary structure with zero, one and two galactose residues.

We describe here an HPLC method for the separation of acidic oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid on bonded primary amine packings with solvents containing 1,4-diaminobutane.

EXPERIMENTAL

Glycoprotein and oligosaccharides

Ovomucoid was prepared according to Fredericq and Deutsch¹⁷. Oligosaccharides were released from 900 mg of ovomucoid by hydrazinolysis as previously described¹⁸. The resulting oligosaccharides were N-reacetylated according to Reading *et al.*¹⁹ and reduced with potassium borohydride.

Purification of oligosaccharides by gel filtration

A 1-mg amount of oligosaccharides was N-reacetylated with [^{14}C]acetic anhydride and reduced with potassium borohydride. Oligosaccharides were purified by gel filtration on Bio-Gel P-2 (200–400 mesh) (Bio-Rad Labs.) columns (92 × 2 cm I.D.), eluting with 0.5 M acetic acid at a flow-rate of 20 ml/h. The volume of each fraction was 4 ml. The total oligosaccharides liberated from ovomucoid by hydrazinolysis were subjected to gel filtration chromatography under similar conditions.

Separation of oligosaccharides from Bio-Gel P₂ fractions of hydrazinolysate of hen ovomucoid by HPLC on quaternary amine bonded silica²⁰

HPLC was performed on a 10- μm Micro-PAK AX-10 column (50 × 0.8 cm I.D.; Varian) with a Spectra-Physics Model 700 liquid chromatograph equipped with Model 8400 variable-wavelength detector connected to a Model 4100 computing integrator.

For preparative chromatography, 20 mg of Bio-Gel P₂ fraction (26–33) dissolved in 60 μl of distilled water were subjected to HPLC using a gradient of 500 mM potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid) as follows: elution with distilled water for 15 min, linear gradient to 2.5% KH_2PO_4 (500 mM) for 10 min, isocratic elution for 20 min, linear gradient to 5% KH_2PO_4 (500 mM) for 10 min, isocratic elution for 20 min and linear gradient to 40% KH_2PO_4 (500 mM) for 40 min. The flow-rate was 2 ml/min. The oligosaccharides were detected at 200 nm with a detector sensitivity 0.32 and integrator attenuation 16. The chart speed of the integrator was 0.5 cm/min.

For semi-preparative chromatography, 1 mg of Bio-Gel P₂ fraction (34–44) dissolved in 20 μl of distilled water was subjected to HPLC using a gradient of 500 mM potassium dihydrogen phosphate (adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid) as follows: elution with distilled water for 25 min, linear gradient to 2.5% KH_2PO_4 (500 mM) for 10 min, isocratic elution for 10 min, linear gradient to 5% KH_2PO_4 (500

HPLC OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES

mM) for 10 min, isocratic elution for 10 min, linear gradient to 40% KH_2PO_4 (500 mM) for 40 min. The oligosaccharides were detected at 200 nm with a detector sensitivity of 0.16 and integrator attenuation 16. The chart speed of the integrator was 0.5 cm/min.

Each fraction, except neutral oligosaccharides F-I and F-A eluted with water, was purified by gel filtration on Bio-Gel P-2 as previously described. The fractions were revealed with orcinol-sulphuric acid reagent²¹ on silica gel plates (pre-coated silica gel 60; Merck). The phosphate salts eluted from the Bio-Gel column were identified by precipitation with silver nitrate.

Separation of monosialyl-oligosaccharides (F-II) by liquid chromatography on primary amine bonded silica

HPLC was performed on three columns in series: two columns of 5- μm Amino AS 5A (25 \times 0.4 and 15 \times 0.4 cm I.D., Chromatem 33; Touzard et Matignon) and one column of 3- μm amino column (7.5 \times 0.4 cm I.D., Chromatem 33; Touzard et Matignon). For semi-preparative chromatography 2 mg of oligosaccharides dissolved in 20 μl of 50 mM potassium dihydrogen phosphate containing 0.01% of 1,4-diaminobutane (DAB) were injected into the column. The column was equilibrated with the initial solvent (solvent A), consisting of a mixture of acetonitrile (70%) and a 50 mM potassium dihydrogen phosphate containing 0.01% of 1,4-diaminobutane (30%). After the injection, isocratic conditions were applied for 30 min with solvent A, followed by a linear gradient to solvent A-water (85:15) for 60 min and then isocratic conditions for 60 min. The flow-rate was 1 ml/min. The oligosaccharides were detected at 200 nm with a detector sensitivity of 0.16 and integrator attenuation 16. The chart speed of the integrator was 0.5 cm/min.

Each collected fraction containing oligosaccharides, potassium dihydrogen phosphate and 1,4-diaminobutane was purified by rapid gel filtration on Bio-Gel P-6 DG (Bio-Rad Labs.; 90-180 μm ; 25 \times 1.6 cm I.D. column) and a Spectra-Physics Model 8770 liquid chromatograph with a 500- μl sample loop. Oligosaccharides were detected with a UV detector (LKB 2138 Uvicord S) at 206 nm. The flow-rate of distilled water was 0.4 ml/min.

Molar composition of oligosaccharides

The molar composition of oligosaccharides was determined by gas-liquid chromatography (GLC) of trifluoroacetylated methylglycosides according to Zanetta *et al.*²².

RESULTS AND DISCUSSION*

The separation of a mixture of reduced N-[¹⁴C]acetylated oligosaccharides obtained by hydrazinolysis from hen ovomucoid on a Bio-Gel P-2 column is shown in Fig. 1. The purification of the hydrazinolysate of 900 mg of hen ovomucoid gives two fractions: 210 mg of F(26-33), and 5 mg of F(33-44). The yield of oligosaccharides was 95.5%. The carbohydrate composition of these fractions was determined

* Abbreviations: Gal = galactose; Man = mannose; GlcNAc = N-acetylglucosamine; GlcNAc-ol = N-acetylglucosaminitol; NeuAc = N-acetylneuraminic acid.

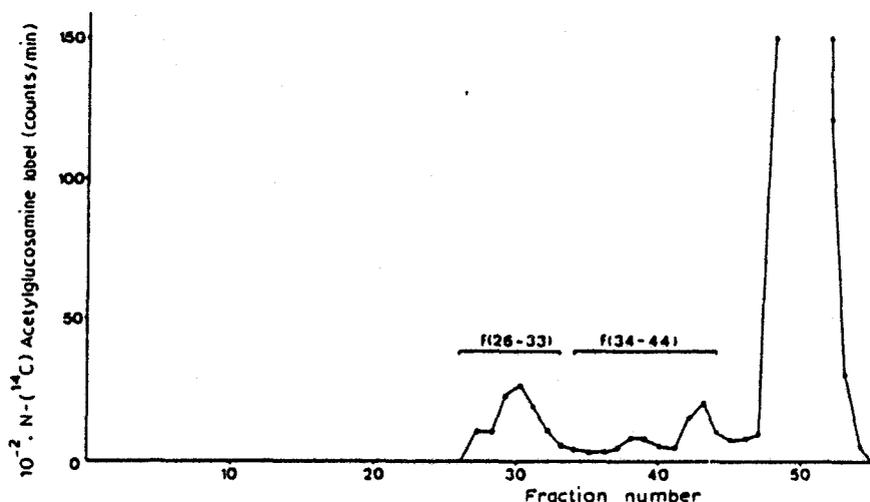
J. PAZ PARENTE *et al.*

Fig. 1. Gel filtration of oligosaccharides liberated from hen ovomucoid by hydrazinolysis on Bio-Gel P-2.

by GLC (Table I). The major fraction (F26-33) is characterized by a high GlcNAc/Man ratio (2.01) already found in total ovomucoid by Conchie and Hay¹¹ and by our group in oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid neutral glycopeptides¹³. The minor fraction (F33-44) is characterized by a high content of sialic acid with a low GlcNAc/Man ratio (1.46).

HPLC on quaternary amine packings of the major fraction F(26-33) obtained by Bio-Gel P-2 chromatography of the hydrazinolysate of hen ovomucoid gives excellent separations of oligosaccharides containing zero, one, two, three and four sialic acid residues (Fig. 2). Eight fractions were obtained within 120 min. The results of the preparative chromatography of 210 mg of ovomucoid-derived oligosaccharides F(26-33) and the carbohydrate compositions of the fractions are given in Table II. The use of a 50 × 0.8 cm I.D. column filled with silica modified by an organic quaternary amine provides a quantitative recovery (98.64%) of the oligosaccharides. The major fraction is consisted of neutral oligosaccharides (F-I, 82.3%), and for the sialylated part of ovomucoid (17.65%) the monosialylated fraction (F-II) represented

TABLE I

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND WEIGHTS OF FRACTIONS OBTAINED BY BIO-GEL P-2 CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVOMUCOID

Fractions	Molar ratio*				GlcNAc Man	Weight (mg)
	Gal	Man	GlcNAc	NeuAc		
Ovomucoid	0.67	3	6	0.07	2	900
F(26-33)	0.67	3	6.04	0.07	2.01	210
F(34-44)	0.45	3	3.95	0.43	1.31	5

* The molar ratio of mannose (Man) was taken as 3.

HPLC OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES

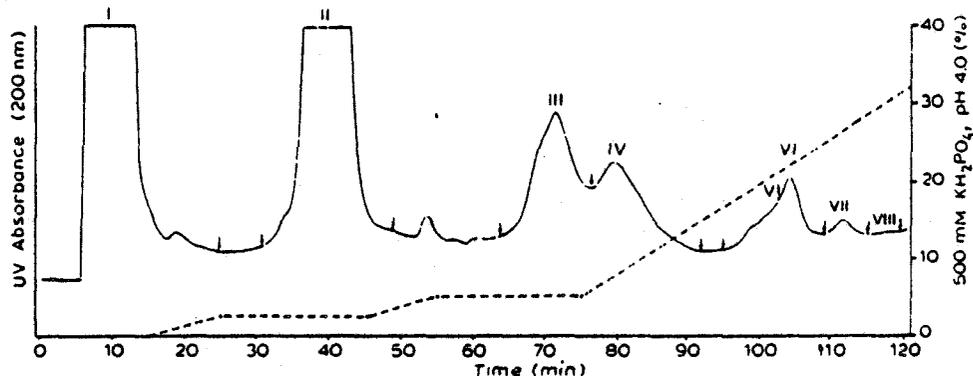


Fig. 2. Analysis of oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid F(26-33) on 10- μ m AX-10.

TABLE II

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND WEIGHTS OF FRACTIONS OBTAINED BY PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVO-MUCOID F(26-33)

Fractions	Molar ratio*					GlcNAc + GlcNAc-ol Man	Weight (mg)
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol	NeuAc		
Total oligosaccharides, F(26-33)	0.67	3	6.04		0.07	2.01	210
Neutral oligosaccharides, F-I	0.49	3	5.68	0.27	0	1.98	170.59
Monosialyl-oligosaccharides, F-II	1.10	3	4.62	0.40	1	1.67	27.17
Disialyl-oligosaccharides, F-III	2.15	3	4.88	0.27	2	1.71	5.79
Disialyl-oligosaccharides, F-IV	1.96	3	5.86	0.46	2	2.10	1.30
Trisialyl-oligosaccharides, F-V	2.85	3	4.72	0.50	3	1.74	0.46
Trisialyl-oligosaccharides, F-VI	3.1	3	5.16	0.37	3	1.84	1.36
Tetrasialyl-oligosaccharides, F-VII	3.9	3	5.55	0.52	4	2.02	0.37
Tetrasialyl-oligosaccharides, F-VIII	3.95	3	4.53	0.71	4	1.74	0.11
Recovered							207.15

* The molar ratio of mannose (Man) was taken as 3.

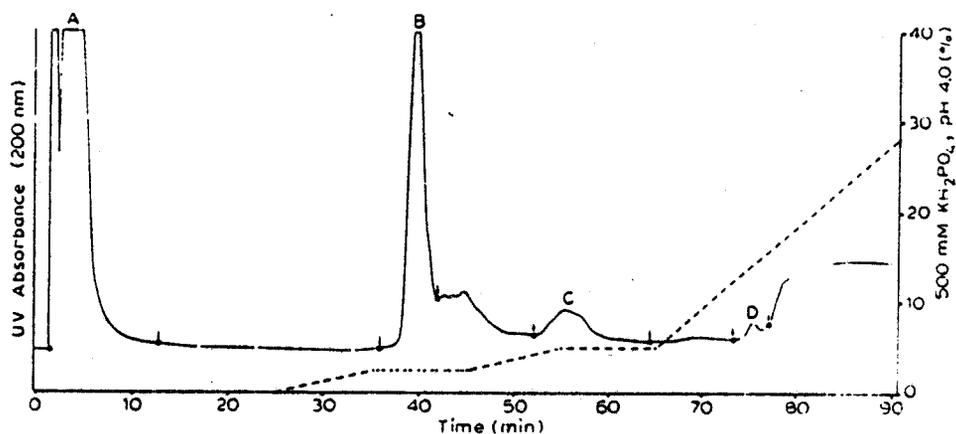
J. PAZ PARENTE *et al.*

Fig. 3. Analysis of oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid F(34 44) on 10- μ m AX-10.

13.1% of total ovomucoid. These results are in agreement with values found by Yamashita *et al.*⁸ by paper electrophoresis of oligosaccharides released by hydrazinolysis from hen ovomucoid (85% for the neutral component). Except for the monosialylated fraction, each acidic fraction gives two classes of compounds separated according to the number of branches linked to the trimannosido core, which is related to the GlcNAc + GlcNAc-ol/Man ratio. The monosialylated fraction (F-II) was

TABLE III

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND WEIGHTS OF FRACTIONS OBTAINED BY PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVO-MUCOID F(34 44)

Fractions	Molar ratio*					GlcNAc + GlcNAc-ol Man	Weight (μ g)
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol	NeuAc		
Total oligosaccharides, F(34 44)	0.45	3	3.95		0.43	1.31	5000
Neutral oligosaccharides, F-A	0	3	3.4		0	1.13	1840
Monosialyl-oligosaccharides, F-B	1	3	2.60		1	0.86	886
Disialyl-oligosaccharides, F-C	1.95	3	2.80	0.33	2	1.04	972
Oligosaccharides, F-D	6.09	3	7.5		5.83	2.50	50
Recovery							3748

* The molar ratio of mannose (Man) was taken as 3.

HPLC OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES

further submitted to HPLC on an alkylamine column with acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate-diaminobutane as the eluent.

HPLC of oligosaccharides F(34-44) was performed on a Micropak AX-10 column (Fig. 3). Four fractions were obtained and the carbohydrate composition and weight of each fraction were determined by GLC (Table III). Table III shows that the neutral oligosaccharides fraction (F-A), the monosialylated oligosaccharides fraction (F-B) and the disialylated oligosaccharides fraction (F-C) contain few oligosaccharides with a low GlcNAc + GlcNAc-ol/Man ratio. In contrast, oligosaccharides fraction F-D shows a surprising carbohydrate composition: Gal 6.09, Man 3, GlcNAc 7.5 and NeuAc 5.83 with a high GlcNAc/Man ratio of 2.50, similar to that described for sialylated penta-antennary oligosaccharides by François-Gérard *et al.*²³ in turtledove ovomucoid.

The monosialylated fraction (F-II) from the AX-10 chromatography of oligosaccharides F(26-33) was subjected to HPLC using acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate-diaminobutane and alkylamine-modified silicas. The effective separation of seventeen fractions was obtained in 90 min (Fig. 4). The carbohydrate composition and weight of each fraction are given in Table IV. Four major fractions were obtained: oligosaccharides F II-11, F II-12, F II-16 and F II-17. The oligosaccharide F II-11 possesses the same carbohydrate composition as neutral oligosaccharide 6 obtained by HPLC on an alkylamine column of neutral oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid¹³ with additional galactose and sialic acid residues. The oligosaccharide F II-12 is an extension of hen ovomucoid neutral oligosaccharide 7^{13,15} and N-5b⁹ or chicken ovotransferrin glycopeptide²⁴ by one residue of galactose and N-acetylneuraminic acid. The oligosaccharide F II-16, with seven GlcNAc residues corresponds to a penta-antennary oligosaccharide like neutral oligosaccharide 14^{13,15} and N-2⁸ with an additional sialic acid residue. The oligosaccharide F II-17 is a sialylated isomer of N-3a oligosaccharide described by Yamashita *et al.*⁹ in neutral oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid.

Until now, the separation of sialyloligosaccharides was performed on alkylamine bonded columns: oligosaccharides and glycopeptides extracted from the urine of patients with lysosomal diseases with acetonitrile-sodium acetate buffer (pH 5.8)

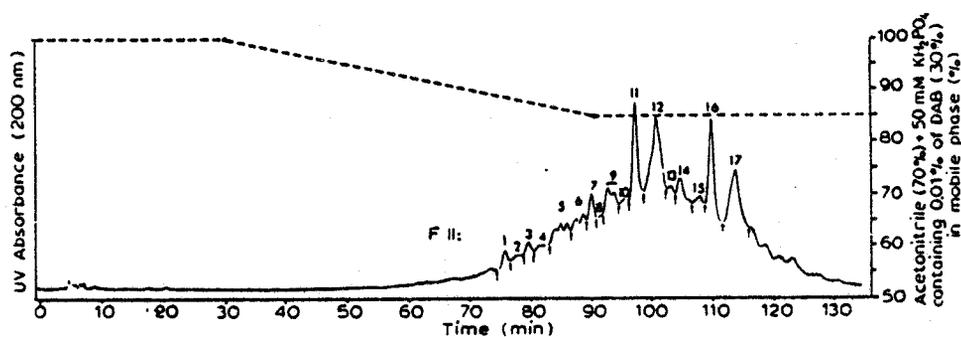


Fig. 4. Analysis of monosialyl oligosaccharides from the hydrazinolysis of hen ovomucoid F-II in Fig. 2 by liquid chromatography on primary amine bonded silica with acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate-diaminobutane as eluent.

J. PAZ PARENTE *et al.*

TABLE IV

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND WEIGHTS OF FRACTIONS OBTAINED BY SEMI-PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF MONOSIALYL-OLIGOSACCHARIDES (F-II) LIBERATED BY HYDRAZINOLYSIS OF HEN OVOMUCOID

Fractions	Molar ratio*					GlcNAc + GlcNAc-ol Man	Weight (μ g)
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol	NeuAc		
Total monosialyl-oligosaccharides, F-II	1.10	3	5		1	1.66	18,000.0
F-II-1	0.90	3	3.99	0.20	1	1.39	258.76
F-II-2	0.99	3	3.97	0.20	1	1.39	226.29
F-II-3	0.90	3	3.46	0.037	1	1.16	286.95
F-II-4	0.95	3	3.90	0.25	1	1.38	623.02
F-II-5	0.95	3	3.47	0.024	1	1.16	1281.41
F-II-6	0.95	3	4.50	0.36	1	1.62	395.40
F-II-7	1.08	3	5.57	0.09	1	1.88	912.38
F-II-8	1.05	3	6.54	0.512	1	2.35	285.50
F-II-9	0.92	3	3.54		1	1.18	2186.65
F-II-10	1.10	3	5.13	0.20	1	1.77	564.28
F-II-11	1.00	3	4.25	0.85	1	1.70	1726.00
F-II-12	1.09	3	5.11	0.818	1	1.97	2422.00
F-II-13	1.20	3	4.85	0.16	1	1.67	529.28
F-II-14	1.25	3	5.91	0.12	1	2.01	1562.84
F-II-15	1.20	3	4.72	0.15	1	1.62	663.88
F-II-16	1.07	3	6.96		1	2.32	966.36
F-II-17	1.12	3	5.72	0.84	1	2.18	1070.00
Recovery							15,961.05

* The molar ratio of mannose (Man) was taken as 3.

(11:9, v/v)²⁵, mucine-derived saccharides with linear-gradient elution acetonitrile-phosphate buffer (pH 5.2) (4:1-2:3, v/v)^{26,27}, alkali-labile sialylated oligosaccharides from Cad glycoprotein A²⁸ with the chromatographic conditions described by Bergh *et al.*²⁶, cervical mucus oligosaccharides with acetonitrile-water containing 25 mM ammonium hydrogen carbonate²⁹. Using an anion-exchange resin with a concave gradient of aqueous sodium chloride, Tsuji *et al.*³⁰ separated sugar chains of porcine and bovine submaxillary mucins, human glycoprotein A and porcine thyroglobulin. The procedure described herein allows the fractionation of sialo-oligosaccharides of higher molecular weight. This study has shown that when the mobile phase contains only potassium dihydrogen phosphate in acetonitrile, the separation of high-molecular-weight oligosaccharides containing neuraminic acid is not effective. The addition of 0.01% of 1,4-diaminobutane to the potassium dihydrogen phosphate solution increases the separation of these oligosaccharides on primary amino bonded silica. Under the same conditions, neutral oligosaccharides derived from dolichol-linked oligosaccharide intermediates have been separated by Turco³¹ on silica with 0.05% 1,4-diaminobutane in the mobile phase.

HPLC OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (LA No. 217). We are grateful to J. Celen for skilful assistance and to Spectra-Physics for their constant cooperation and help during the work. J.P.P. is a Brazilian Fellow.

REFERENCES

- 1 H. Lineweaver and C. W. Murray, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 565-581.
- 2 E. Jakubczak and J. Montreuil, *C.R. Acad. Sci.*, 271 (1970) 537-540.
- 3 E. Jakubczak, *Thesis*, Université des Sciences, Lille, 1971.
- 4 B. Bayard, G. Strecker and J. Montreuil, *Biochimie*, 57 (1975) 155-160.
- 5 B. Bayard, B. Fournet, S. Bouquelet, G. Strecker, G. Spik and J. Montreuil, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 445-456.
- 6 B. Fournet, Y. Leroy and J. Montreuil, in J. Montreuil (Editor), *Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués*, CNRS, Paris, 1974, pp. 111-129.
- 7 J. Montreuil, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 8 K. Yamashita, J. P. Kamerling and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 12809-12814.
- 9 K. Yamashita, J. P. Kamerling and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 3099-3106.
- 10 J. Conchie, A. J. Hay and J. A. Lomax, *Carbohydr. Res.*, 103 (1982) 129-132.
- 11 J. Conchie and A. J. Hay, *Carbohydr. Res.*, 112 (1983) 261-279.
- 12 J. Conchie, A. J. Hay and J. A. Lomax, *Carbohydr. Res.*, 112 (1983) 281-295.
- 13 J. Paz Parente, G. Strecker, Y. Leroy, J. Montreuil and B. Fournet, *J. Chromatogr.*, 249 (1982) 199-204.
- 14 J. Paz Parente, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, J. Montreuil, B. Fournet, H. van Halbeek, L. Dorland and J. F. G. Vliegthart, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 13173-13176.
- 15 J. Paz Parente, G. Strecker, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, H. van Halbeek, L. Dorland and J. F. G. Vliegthart, *FEBS Lett.*, 152 (1983) 145-152.
- 16 H. Egge, J. Peter-Katalinié, J. Paz Parente, G. Strecker, J. Montreuil and B. Fournet, *FEBS Lett.*, 156 (1983) 357-362.
- 17 E. Fredericq and H. F. Deutsch, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499-510.
- 18 B. Bayard and B. Fournet, *Carbohydr. Res.*, 46 (1975) 75-86.
- 19 C. L. Reading, E. Penhoet and C. Ballou, *J. Biol. Chem.*, 253 (1978) 5600-5612.
- 20 J. U. Baenziger and M. Natowicz, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 357-361.
- 21 R. Humbel and M. Collaert, *Clin. Chim. Acta*, 60 (1975) 143-145.
- 22 J. P. Zanetta, W. C. Brekenridge and G. Vincendon, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291-304.
- 23 Ch. François-Gérard, J. Brocteur, A. André, G. Gerday, A. Pierce-Créteil, J. Montreuil and G. Spik, *Blood Trans. Immunohaemat.*, 23 (1980) 579-587.
- 24 L. Dorland, J. Haverkamp, J. F. G. Vliegthart, G. Spik, B. Fournet and J. Montreuil, *Eur. J. Biochem.*, 100 (1979) 569-574.
- 25 N. M. K. Ng Ying Kim and L. S. Wolfe, *Anal. Biochem.*, 102 (1980) 213-219.
- 26 M. L. E. Bergh, P. Koppen and D. H. van den Eijnden, *Carbohydr. Res.*, 94 (1981) 225-229.
- 27 M. L. E. Bergh, P. Koppen and D. H. van den Eijnden, *Biochem. J.*, 201 (1982) 411-415.
- 28 B. Fournet, F. Herkt, D. Blanchart, H. van Halbeek, J. F. G. Vliegthart, M. Monis and J. P. Cartron, in J. P. Cartron, P. Rouger and Ch. Salmon (Editors), *Red Cell Membrane Glycoconjugates and Related Genetic Markers*, Librairie Arnette, Paris, 1983, pp. 65-75.
- 29 G. Lamblin, A. Klein, A. Boersma, N. Ud-Din and P. Roussel, *Carbohydr. Res.*, 118 (1983) C1-C4.
- 30 T. Tsuji, K. Yamamoto, Y. Konami, T. Irimura and T. Osawa, *Carbohydr. Res.*, 109 (1982) 259-269.
- 31 S. J. Turco, *Anal. Biochem.*, 118 (1981) 278-283.

RESULTATS NON PUBLIES

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES SUR LA STRUCTURE DES GLYCANNES SIALYLÉS DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

I - ETUDE GLOBALE DES FRACTIONS MONO-(F_{II}), DI-(F_{III} + IV) ET TRI-(F_V + VI) SIALYLEES DE L'OVOMUCOÏDE

Les oligosaccharides sialylés présents dans les trois fractions mono-, di- et trisialylées (F_{II}, F_{III} + IV, F_V + VI) ont été étudiés par perméthylation et analyse des éthers méthyliques par couplage GLC-MS. Les résultats sont illustrés dans le tableau XVII p. 122. Comparés à l'analyse des éthers méthyliques obtenus à partir de la fraction neutre de l'ovomucoïde nous pouvons constater que si la fraction neutre possède presque uniquement des structures à N-acétylglucosamine intercalaire (0,07 résidu de 2,4-di-O-méthyl-mannose pour 1 résidu de 2-mono-O-méthyl-mannose), toutes les fractions sialylées possèdent une dualité de structure glycanique avec et sans N-acétylglucosamines intercalaires (présence dans les trois fractions de 2,4-di-O-méthyl-mannose et de 2-mono-O-méthyl-mannose). D'autre part, nous constatons que la majeure partie des résidus d'acide sialique est liée en α -2,3 sur les résidus de galactose, dans les trois fractions : 0,79 résidu de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose dans la fraction monosialylée (F_{II}), 1,85 résidus de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose dans la fraction disialylée (F_{III} + IV) et 2,9 résidus de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose dans la fraction trisialylée (F_V + VI). Ce dernier résultat a été confirmé par les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz.

II - ETUDE DE LA FRACTION MONOSIALYLEE (F_{II}) DE L'OVOMUCOÏDE DE POULE

Trois fractions monosialylées de l'ovomucoïde ont été étudiées par perméthylation suivie de l'analyse des éthers méthyliques par GLC-MS et par Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz. Il s'agit des oligosaccharides F_{II-11}, F_{II-12} et F_{II-17}.

TABLEAU XVII

Composition en éthers méthyliques du glycopeptide β et des fractions mono (A_{II}), di (FIII + IV), tri (FV + VI) sialylées de l'ovomu-
coïde de Poule.

Ethers méthyliques	2,3,4,6- Man	2,3,4,6- Gal	3,4,6- Man	2,3,4- Gal	2,4,6- Gal	3,6- Man	3,4- Man	2,4- Man	3- Man	2- Man	3,4,6- GlcNAC	3,6- GlcNAC	3,4- GlcNAC	4,7,8,9- NeuAc
Glycopeptide β (fraction neutre)	0,14	0,57	0,75	-	-	1,65	0,40	0,07	0,70	1,00	4,20	1,47	-	0
Monosialyl-ovo (FII)	0,19	0,17	0,74	0,05	0,79	1,12	0,11	0,30	0,60	0,90	3,30	2,07	-	1
Disialyl-ovo (FIII + IV)	0,08	0,20	0,24	0,15	1,85	0,68	0,15	0,45	0,45	0,60	1,30	1,23	-	2
Trisialyl-ovo (FV + VI)	0,05	0,80	0,57	0,44	2,9	2,00	0,46	1,20	1,00	1,56	3,18	4,35	1,03	3

Les compositions en éthers méthyliques des oligosaccharides perméthylés F_{II-11} , F_{II-12} et F_{II-17} sont données dans le tableau XVIII p.124. La fraction F_{II-11} est constituée d'un mélange de deux structures oligosaccharidiques (figure 23, p. 125). La présence de 2-mono-O-méthyl mannose associée au 3,6-di-O-méthyl-mannose et au 3,4,6-tri-O-méthyl-mannose suggère une structure triantennée à N-acétylglucosamine intercalaire (figure 23A, p.125). Cette hypothèse fondée sur les résultats de la méthylation a été confirmée par Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz. D'autre part, la présence d'une quantité non négligeable de 2,4-di-O-méthyl mannose (0,58 résidu) associée à une proportion importante de 3,6-di-O-méthyl-mannose (2,56 résidus) suggère la présence dans cette fraction d'un oligosaccharide tétraantenné sans N-acétylglucosamine intercalaire (figure 23B, p.125). Ces deux isomères oligosaccharidiques possèdent une composition identique et sont en conséquence très difficile à séparer. Enfin, ces deux oligosaccharides possèdent un résidu NeuAc(α 2,3)-Gal(β 1,4)- lié sur une N-acétylglucosamine externe ; à l'heure actuelle, il n'a pas été possible de déterminer sur quelle N-acétylglucosamine ce résidu disaccharidique est lié.

La structure tétraantennée monosialylée (figure 23B, p.125) se rapproche des structures glycaniques d'ovomucoïde neutre décrites par CONCHIE et al. (483) (oligosaccharide 1) et par YAMASHITA et al. (484) (fraction N-4), qui ont observé des structures tétraantennées mais, à la différence avec nos résultats, possédant une N-acétylglucosamine intercalaire.

La fraction F_{II-12} possède, comme la fraction $F_{II-11-A}$, une structure monosialylée triantennée à N-acétylglucosamine intercalaire (figure 24A, p.126). Les séparations observées entre ces deux oligosaccharides de structures identiques sont dues à un artefact d'hydrazinolyse qui modifierait le résidu de N-acétylglucosamine terminal (GlcNAc-1). Cet oligosaccharide majeur dans la fraction F_{II-12} serait en mélange avec un oligosaccharide tétraantenné (figure 24B, p.126) ne possédant pas de N-acétylglucosamine intercalaire comme l'atteste la présence dans les mêmes proportions de 2,4-di-O-méthyl- et 3-mono-O-méthyl-mannoses (0,30 résidu). Une structure identique, mais avec une N-acétylglucosamine intercalaire a été décrite dans l'ovomucoïde neutre par CONCHIE et al. (485) (oligosaccharide 2) et par YAMASHITA et al. (486) (fraction N-4). Comme dans le cas de la fraction

TABLEAU XVIII

Composition en éthers méthyliques des fractions mono (FII-11), mono (FII-12) et mono (FII-17) sialylées de l'ovomucoïde de Poule.

Ethers méthyliques	2,3,4,6- Man	2,3,4,6- Gal	3,4,6- Man	2,3,4- Gal	2,4,6- Gal	3,6- Man	3,4- Man	2,4- Man	3- Man	2- Man	3,4,6- GlcNAc	3,6- GlcNAc	4,7,8,9- NeuAc
Monosialyl-ovo (F II-11)	-	-	0,84	-	1,38	2,56	-	0,58	-	1,00	3,20	1,50	0,90
Monosialyl-ovo (F II-12)	0,07	0,14	0,13	0,04	0,90	0,82	0,06	0,30	0,30	1,00	2,73	1,35	1,02
Monosialyl-ovo (F II-17)	-	0,10	-	-	0,94	1,40	0,10	-	1,30	1,00	4,60	2,00	1,0

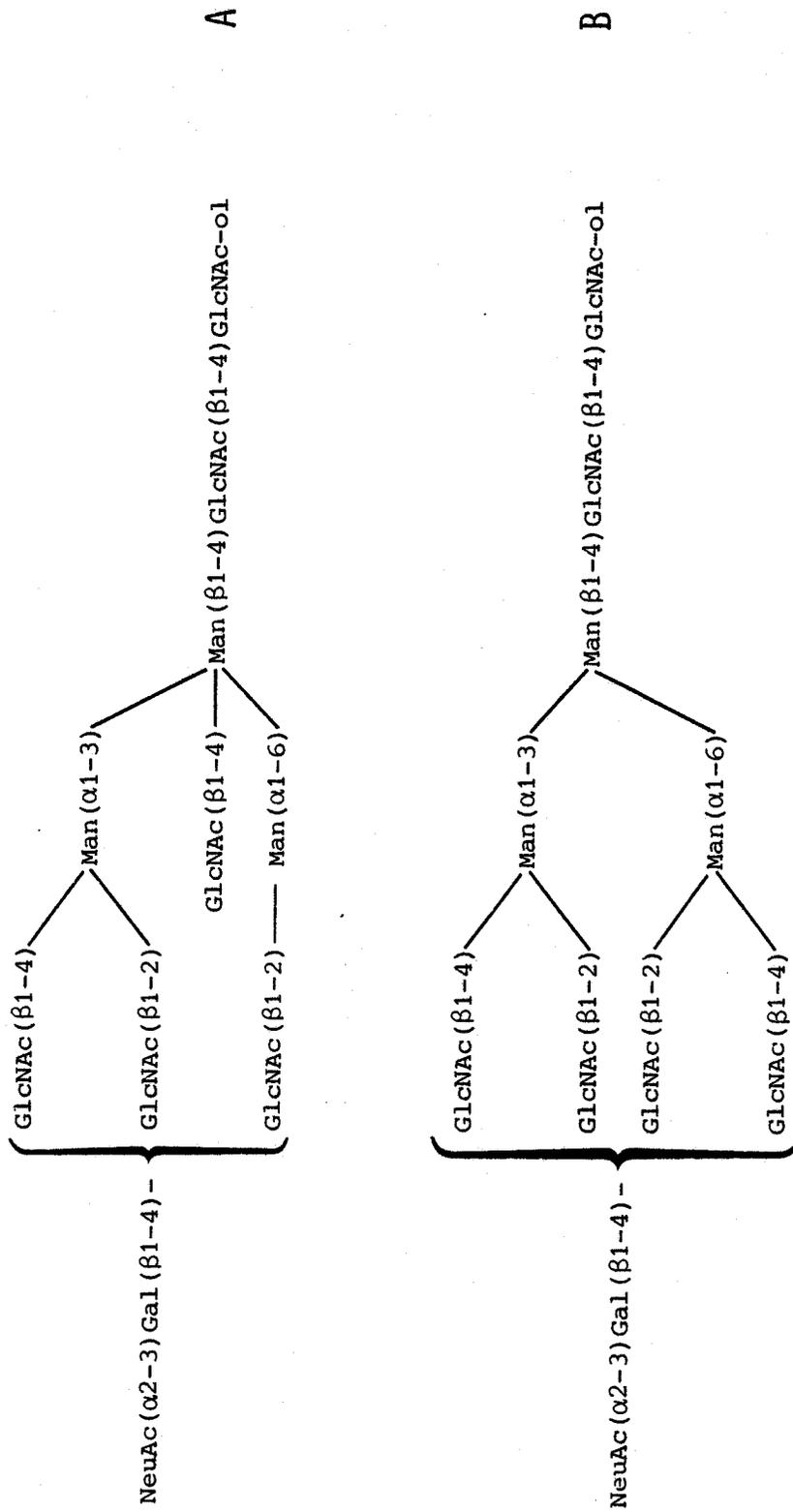


FIGURE 23

Hypothèse de structure des oligosaccharides présents dans la fraction F_{II-11} de l'ovomucoïde de Poule

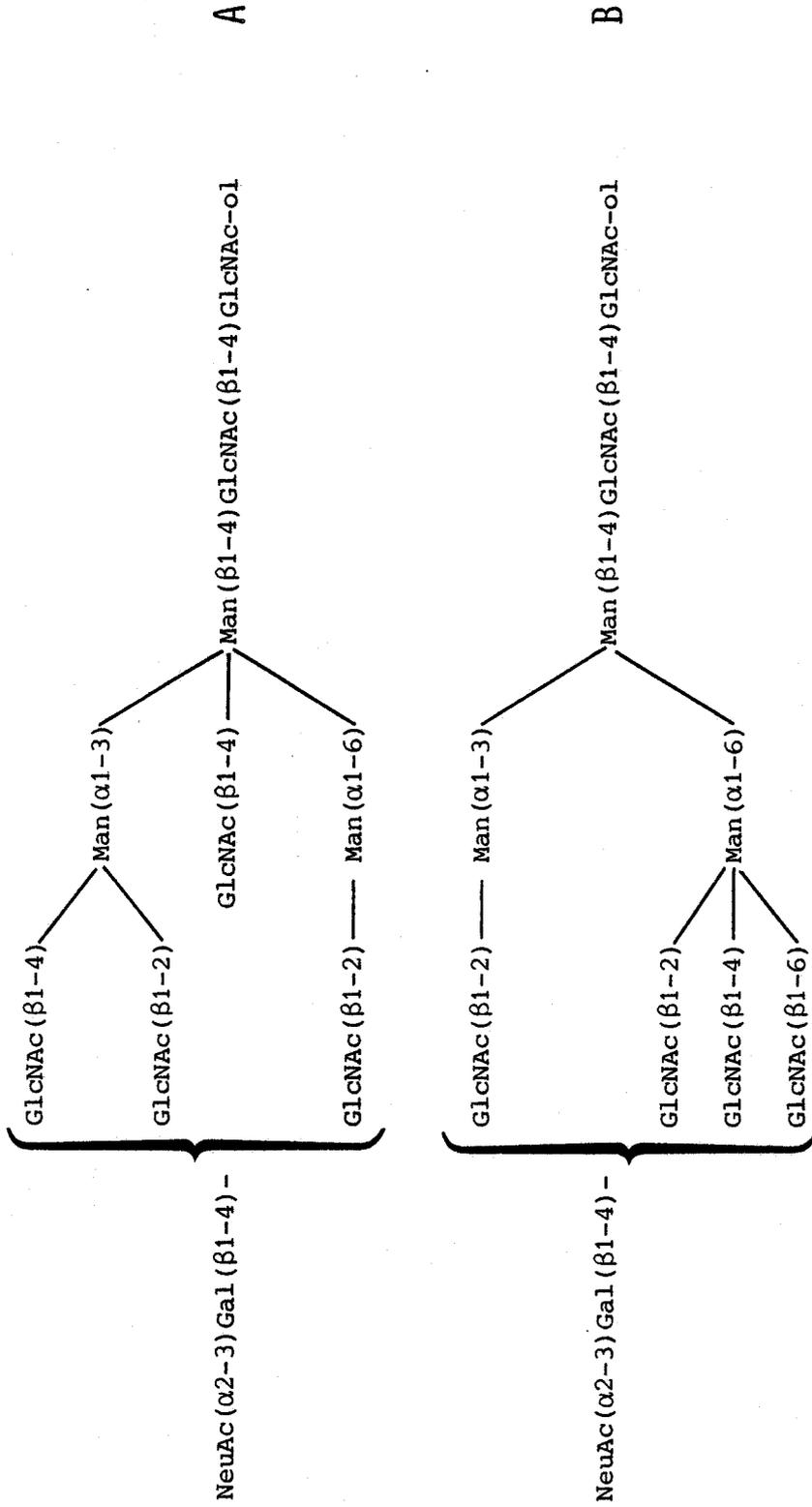


FIGURE 24

Hypothèse de structure des oligosaccharides présents dans la fraction F_{II-12} de l'ovomucoïde de Poule

F_{II-11}, nous ne savons pas sur quel résidu de N-acétylglucosamine externe est lié en β 1,4 le disaccharide NeuAc(α 2,3)Gal-.

La fraction F_{II-17} est beaucoup plus simple (figure 25, p.128), elle est constituée d'un oligosaccharide pentaantenné avec une N-acétylglucosamine intercalaire et possédant un résidu disaccharidique NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4) : présence de 2 et 3-mono-O-méthyl-mannoses et de 3,6-di-O-méthyl-mannose, absence de 2,4-di-O-méthyl-mannose. Ce résultat a été confirmé par Résonance Magnétique Nucléaire du Proton. Il est à noter que la fraction F_{II-16} de structure identique à la fraction F_{II-17} est également un artefact d'hydrazinolyse par l'absence de N-acétylglucosaminitol (voir composition des oligosaccharides monosialylés, p.118).

III - ETUDE D'UNE FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE CARACTERISEE PAR UNE RICHESSE EXCEPTIONNELLE EN ACIDE SIALIQUE

Lors de notre étude sur le fractionnement des oligosaccharides acides de l'ovomucoïde, une fraction très riche en acide sialique a retenue notre attention, il s'agit de la fraction F-D. Cette fraction mineure en quantité provient du deuxième pic d'élution en Biogel P₂ du mélange d'oligosaccharides obtenus après hydrazinolyse de l'ovomucoïde (F₃₄₋₄₄, p.114), suivi d'un fractionnement en HPLC sur colonne d'échangeur d'anions de type AX-10 (fraction F_D, p.116). La composition en sucre de cette fraction (tableau III, p.116) montre qu'elle est constituée, pour 3 résidus de mannose, de 6 résidus de galactose, de 6 résidus d'acide sialique et de 7,5 résidus de N-acétylglucosamine. Etudié par méthylation, l'oligosaccharide a fourni les éthers méthyliques suivants : 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose, 2,4-di-O-méthyl-mannose, 3-mono-O-méthyl-mannose, 2-mono-O-méthyl-mannose, 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine, 3,6-di-O-méthyl-glucosamine, 4,7,8,9-tétra-O-méthyl NeuAc. Nous constatons également l'absence totale de 3,6-di-O-méthyl mannose. La résonance Magnétique Nucléaire du Proton confirme la présence d'une proportion très importante d'acide sialique tous liés en α -2,3 sur des résidus de galactose. Ces quelques résultats fragmentaires mais néanmoins démonstratifs nous permettent de donner en hypothèse (figure 26, p.129) les structures de deux oligosaccharides hexaantennés qui constituent la fraction

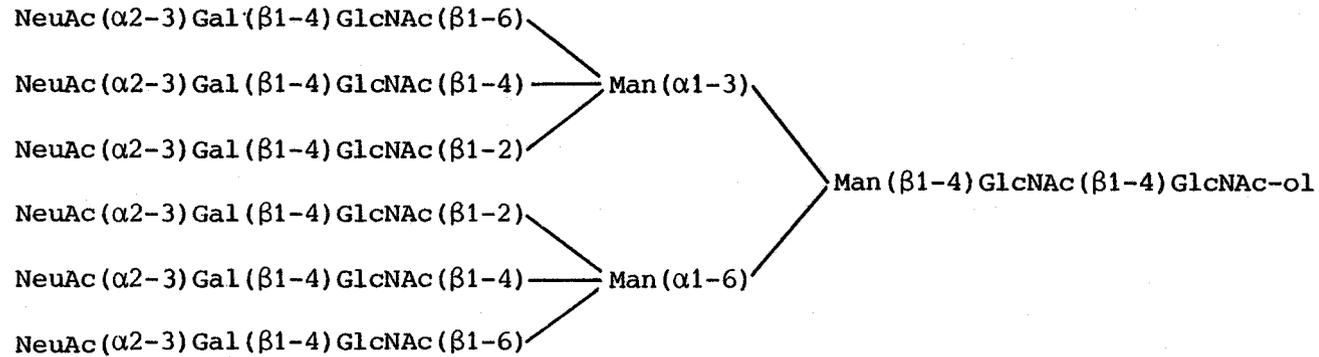
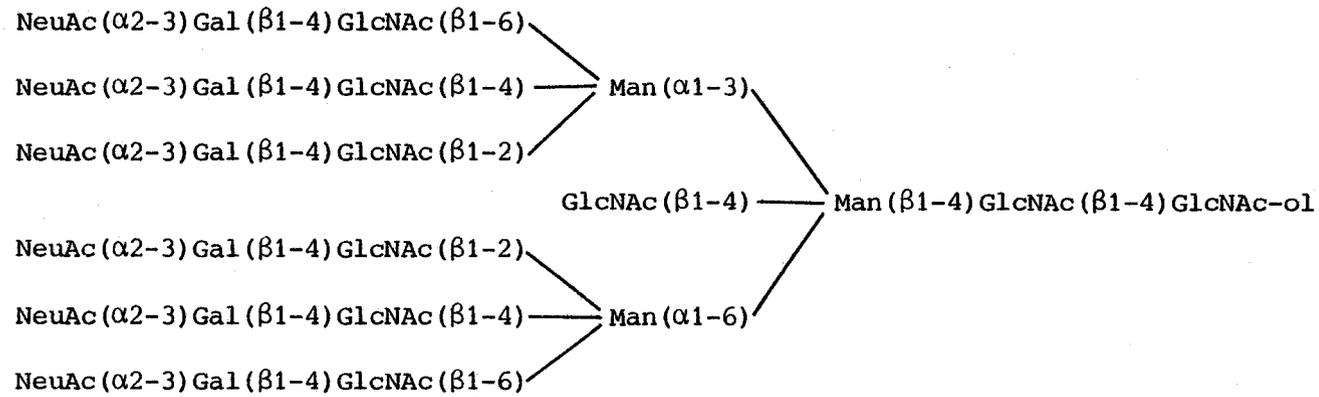


FIGURE 26

Hypothèse de structure des oligosaccharides hexaantennés contenus dans la fraction F_D de l'ovomucoïde de Poule.

F_D. Ces deux oligosaccharides hexaantennés se distinguent l'un de l'autre par la présence ou l'absence d'une N-acétylglucosamine intercalaire.

IV - CONCLUSIONS DE L'ETUDE DES STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES SIALYLES

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude préliminaire sur les glycanes sialylés de l'ovomucoïde sont les suivantes :

1 - La fraction sialylée de l'ovomucoïde représente 18,82 p. 100 de l'ovomucoïde total, la fraction monosialylée étant la plus importante et représente à elle seule 13,1 % de l'ovomucoïde total soit 69,3 p. 100 de la fraction sialylée totale de l'ovomucoïde.

2 - Les oligosaccharides sialylés de l'ovomucoïde sont constitués d'une dualité de structure glycanique avec et sans N-acétylglucosamine intercalaire. Ce résultat contraste avec ceux concernant les oligosaccharides des fractions neutres, qui à l'exception de l'oligosaccharide 1 (p. 101) possèdent tous une N-acétylglucosamine intercalaire (absence de 2,4-di-O-méthyl-mannose dans toutes les fractions neutres). A ce sujet, on peut penser que les deux oligosaccharides neutres sans N-acétylglucosamine intercalaire de la fraction N-7a isolée par YAMASHITA et al. (487) constituent un artefact de désialylation d'oligosaccharides monosialylés.

3 - Tous les résidus d'acide N-acétylneuraminique sont liés sur du galactose par une liaison α -2,3.

4 - Une fraction monosialylée homogène, la fraction F_{II-17} a été caractérisée comme étant une structure pentaantennée monosialylée. Dans tous les cas, nous ne savons pas sur quel résidu de N-acétylglucosamine externe est lié le disaccharide NeuAc(α 2,3)Gal.

5 - Une fraction mineure caractérisée par une richesse exceptionnelle en acide sialique a pu être isolée. Elle serait constituée d'un mélange de deux oligosaccharides hexaantennés avec et sans N-acétylglucosamine intercalaire. Ce serait à notre connaissance la première structure hexaantennée découverte à ce jour.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les recherches que nous avons effectuées sur la structure des chaînes glycaniques de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule s'inscrivent dans la thématique du Laboratoire Associé sur la structure et le métabolisme des glycoprotéines. Elles constituent une étape supplémentaire dans la série de travaux importants déjà réalisés sur cette glycoprotéine au Laboratoire depuis plus d'une vingtaine d'années.

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

- 1 - La présence dans la glycoprotéine de quatre sites de glycosylation et les difficultés d'obtenir des glycopeptides homogènes par hydrolyse pronasique nous ont conduit à travailler sur les chaînes glycaniques détachées de la glycoprotéine par hydrazinolyse. Cette technologie permet d'obtenir rapidement et avec de bons rendements (95,5 p. cent) les glycannes de l'ovomucoïde.
- 2 - Nos études sur les procédés de chromatographie de partage en H.P.L.C. sur colonnes de silice de type alkyl-amine de composés glucidiques nous ont permis d'obtenir d'excellentes séparations d'une vingtaine d'oligosaccharides présents dans les hydrazinolysats d'ovomucoïde neutre de Poule. Les chaînes glycaniques, dont quelques unes ont pu être isolées à l'état pur dès la première chromatographie, sont généralement riches en N-acétylglucosamine et présentent un rapport GlcNAc/Man plus élevé que la moyenne indiquant l'existence de nombreux branchements. Ces premiers travaux démontrent de nouveau la grande microhétérogénéité des glycannes de l'ovomucoïde déjà constatée au Laboratoire et confirmée par les travaux des équipes de KOBATA et CONCHIE. Nos résultats illustrent la puissance séparative des nouvelles techniques de chromatographie liquide sous haute pression qui ont pu être adaptées à l'étude des glycannes de type N-acétyllactosaminique (MELLIS et BAENZIGER (488) ; BAENZIGER et NATOWICZ (489)), de

type oligomannosidique (MELLIS et BAENZIGER (490)), de glycanes isolés de mucines par β -élimination (BOERSMA et al. (491) ; BERGH et al. (492)) ainsi que de chaînes oligosaccharidiques isolées d'intermédiaires lipidiques (TURCO (493)).

3 - L'application des techniques d'approche des séquences primaires des glycanes à quatre oligosaccharides purs (oligosaccharides 1, 7, 11 et 14) : perméthylation et analyse des éthers méthyliques par G.L.C.-M.S., spectrométrie de masse des produits d'hydrolyse partielle, Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à hauts champs et spectrométrie de masse des oligosaccharides ionisés par "Fast Atom Bombardment" et par "Electron-Impact" nous a apporté les résultats suivants :

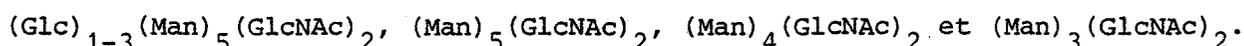
a) Identification parfaite et reproductible des éthers méthyliques par G.L.C.-M.S. sur colonne capillaire de silicone OV 101 permettant notamment la séparation des deux éthers monométhyliques du mannose (2- et 3-mono-O-méthyl-mannoses). Ce premier résultat avait permis dès 1980, à MONTREUIL et al. (494) de conclure sur les ovomucoïdes du blanc d'oeuf de Poule et de Tourterelle, à la présence de structures branchées particulières notamment la trisubstitution du résidu Mannose 4 ou Mannose 4'.

b) L'étude des produits d'hydrolyse partielle obtenus sur le perméthyl-oligosaccharide alditol 11 par G.L.C.-M.S. des disaccharides alditols Man \rightarrow Man-ol partiellement éthylés et méthylés nous a permis de déterminer que le mannose lié en $\alpha 1,3$ est substitué par deux résidus de N-acétylglucosamine, tandis que le mannose lié en $\alpha 1,6$ est trisubstitué par trois résidus de N-acétylglucosamine.

c) Les études de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz confirment la structure pentaantennée de l'oligosaccharide 11 et permettent l'élucidation de l'oligosaccharide 14. En particulier l'étude des déplacements chimiques des protons H-1 et H-2 indiquent que ceux du mannose lié en $\alpha 1,6$ (Man 4') deviennent considérables alors que ceux du mannose lié en $\alpha 1,4$ (Man 4) ne varient pratiquement pas. D'autre part, l'étude des déplacements chimiques des protons des groupements N-acétylés

des résidus de N-acétylglucosamine permet de déterminer sans ambiguïté sur quelle branche le résidu de galactose est lié. La comparaison des déplacements chimiques des groupements des N-acétylglucosamines des oligosaccharides 11 et 14 N-acétylés montrent clairement la perturbation engendrée par l'attache du galactose sur la N-acétylglucosamine 7 (N-acétyl du GlcNAc 7 de l'oligosaccharide 11 à $\delta = 2,084$, N-acétyl du GlcNAc 7 de l'oligosaccharide 14 à $\delta = 2,079$). L'oligosaccharide 14 a donc le galactose lié sur la N-acétylglucosamine 7. L'isolement à l'état pur de ce nouveau type d'oligosaccharide pentaantenné nous a permis de compléter les données de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton des structures glycaniques en particulier au niveau des résidus du mannose constituant le "Core" des glycanes.

La Résonance Magnétique Nucléaire du Proton à 500 MHz associée à la perméthylation nous a permis également d'identifier dans le mélange des glycanes de l'ovomucoïde un oligosaccharide alditol (oligosaccharide 1) de structure trimannosidochitobiose. Ce résultat constitue, après la découverte par HASE et al. (495) du même trimannosido-chitobiose dans les glycanes de l'ovomucoïde de Caille, le deuxième exemple d'une structure minimale qui échappe au schéma classique de la biosynthèse des glycanes des glycoprotéines (GIBSON et al. (496)). Cette découverte indique que la biosynthèse des glycanes des ovomucoïdes pourrait s'effectuer par une voie de synthèse décrite par KORNFELD et al. (497) sur des cellules de lymphome de souris de type Classe E Thy-1. En effet, ces auteurs identifient comme intermédiaires de la biosynthèse les structures suivantes :



Une autre possibilité consisterait en une mannosylation directe de chitobiosylprotéine préformé comme le suggère HOFACK et al. (498) qui n'exigerait pas le préassemblage par la voie des dolichols. La formation de chitobiosylprotéine pourrait se faire également selon la voie décrite par KHALKHALI et MARSHALL (499) et récemment confirmée par ARAKAWA et MOOKERJEA (500).

Enfin, l'oligosaccharide 7 qui représente après l'oligosaccharide 11 une structure moyenne de l'ovomucoïde est identique au glycanne de l'ovotransferrine de Poule (DORLAND et al. (501)).

d) La spectrométrie de masse des oligosaccharides alditols perméthylés 1, 7, 11 et 14 ionisés par "Fast Atom Bombardment" ou par "Electronic Impact" nous a permis, outre de visualiser les pseudo-ions moléculaires $M + Na^+$, de détecter dans les fractions oligosaccharidiques des composés mineurs que nous n'avions pu caractériser comme les oligosaccharides $(Man)_2GlcNAC-GlcNAC-ol$, $(GlcNAC)_4(Man)_3-GlcNAC-ol$, $(GlcNAC)_6(Man)_3-GlcNAC-ol$ et $Gal(GlcNAC)_6(Man)_3-GlcNAC-ol$. Ces trois derniers oligosaccharides homologues inférieurs d'une GlcNac des oligosaccharides 7, 11 et 14 pourraient provenir d'une réaction secondaire lors de l'action de l'hydrazine sur la glycoprotéine ou les glycopeptides.

4 - Les études sur la fraction acide des glycanes de l'ovomucoïde nous ont conduit aux résultats suivants :

a) La fraction acide de l'ovomucoïde de Poule qui représente 18,82 p. 100 de l'ensemble des glycanes est constituée de 69,30 p. 100 de monosialyl-glycanes, de 24,86 p. 100 de disialyloglycanes, de 4,50 p. 100 de trisialyloglycanes, de 1,18 p. 100 de tétrasialyloglycanes et 0,12 p. 100 d'hexasialyloglycanes.

b) La chromatographie HPLC sur colonne échangeuse d'anions du mélange des oligosaccharides alditols préparés à partir de l'ovomucoïde par hydrazinolyse nous a permis d'obtenir la fraction monosialylée avec de bons rendements. L'hétérogénéité de cette fraction a pu être démontrée par chromatographie liquide haute pression de partage sur colonne de silice modifiée de type alkylamine en présence d'une base de type diamino butane dans le solvant de chromatographie. Cet artifice de chromatographie nous a conduit à décrire une méthode de séparation d'oligosaccharides sialylés lourds, les techniques publiées jusqu'à ce jour ne permettant que le fractionnement par H.P.L.C. d'oligosaccharides sialylés de type mucine (BERGH et al. (502, 503).

c) Les études préliminaires de structure des oligosaccharides alditols, monosialylés préparés par H.P.L.C. nous ont permis de signaler :

- la présence d'une dualité de structure oligosaccharidique avec et sans N-acétylglucosamine intercalaire. Ceci contraste avec la fraction neutre presque uniquement constituée d'oligosaccharides à N-acétylglucosamine intercalaire.

- l'attache des résidus de NeuAc en $\alpha 2,3$ sur le galactose.

- une structure pentaantennée avec N-acétylglucosamine intercalaire monosialylée ($F_{II-17} = F_{11} + \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal-}$).

d) Une fraction mineure (0,12 p. 100 de l'ensemble des glycanes sialylés de l'ovomucoïde) qui se caractérise par sa richesse en acide sialique, est constituée de deux oligosaccharides hexaantennés et hexasialylés avec et sans N-acétylglucosamine intercalaire.

Toutes les techniques que nous venons de décrire permettent actuellement de préparer à partir de l'ovomucoïde des oligosaccharides qui pourront servir d'accepteurs dans les études de biosynthèse en particulier de l'antennarisation des glycanes. Les données chromatographiques que nous avons développées seront utilisées à l'identification des oligosaccharides néoformés. Ce travail de séquence primaire d'oligosaccharides obtenus à partir de glycanes de l'ovomucoïde, qui a bénéficié des technologies modernes de chromatographie (H.P.L.C.) et d'investigation des structures ($^1\text{H-NMR}$ à haut champ, Fast Atom Bombardment - MS) a conduit à la description de nouvelles structures glycaniques polyantennées dont les mécanismes de biosynthèse restent à élucider.

APPENDICE TECHNIQUE

I - PRÉPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA MÉTHODE DE FREDERICQ ET DEUTSCH (504)

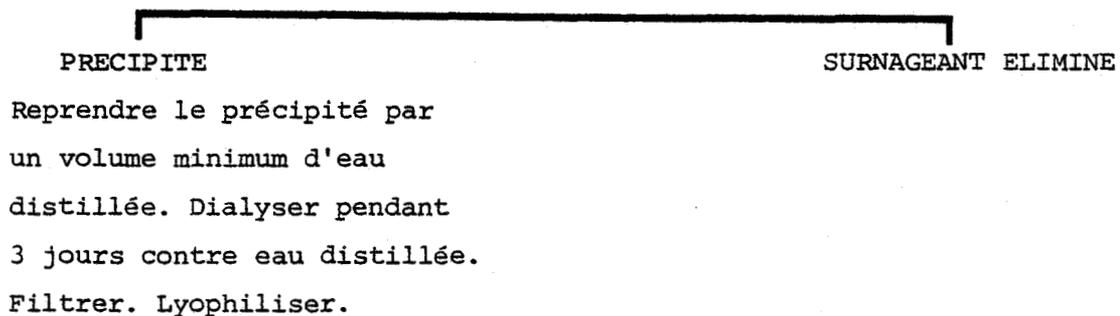
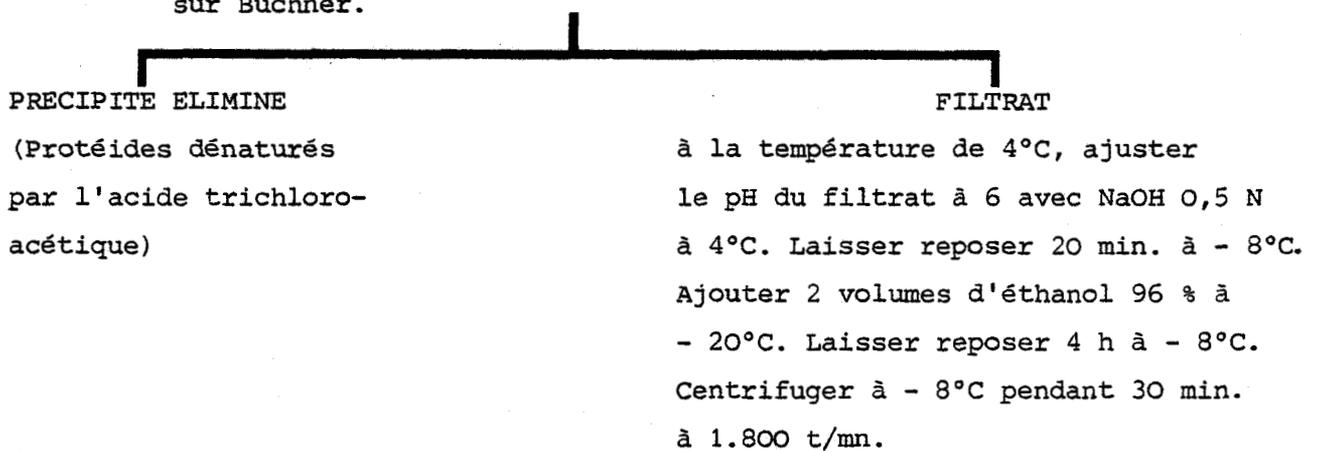
La méthode de préparation de l'ovomucoïde qui a servi de matériel d'étude à ADAM-CHOSSON (505), à MONTREUIL et al. (506), à MONSIGNY et al. (507) et à JAKUBCZAK (508) est décrite dans la figure 27 p.138. L'ovomucoïde ainsi préparé a été analysé par électrophorèse sur acétate de cellulose et le résultat que nous avons obtenu est illustré par la figure 28 p.139.

II - HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'OVOMUCOÏDE SELON LE PROCÉDÉ DE MONSIGNY (509)

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 40°C, sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat TTT1C Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate 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 2 heures à la température du Laboratoire, puis à 2°C pendant 18 heures. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole expérimental est répété encore deux fois (+), à la différence

(+) Fréquemment, à partir de la 3ème précipitation éthanolique, le mélange se gélifie et il est nécessaire d'ajouter un volume d'éther sulfurique pour sédimenter le précipité par centrifugation.

Homogénéiser 1.500 ml de blanc d'oeuf (50 oeufs) pendant 1 minute à l'aide d'un mixer. Ajouter un volume d'une solution aqueuse de trichloroacétate de sodium à 10 g p. 100 ml ajustée à pH 3 avec une solution d'acide trichloroacétique 0,3 N. Ajuster le pH à 3,5 avec NaOH 0,5 N. Laisser reposer une nuit à 4°C. Filtrer sur Büchner.



Rendement : 12 g d'ovomucoïde/1.500 ml de blanc d'oeuf

FIGURE 27

Schéma de préparation de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule selon FREDERICQ et DEUTSCH (510).

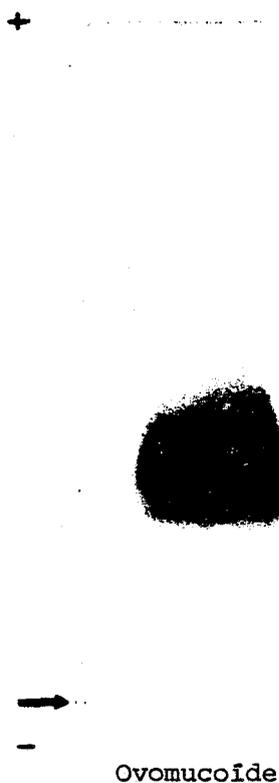


FIGURE 28

Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'ovomucoïde (ovo) obtenu par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH dans le tampon véronal à pH 8,65 ; concentration : 5 mg d'ovomucoïde/100 μ l du tampon véronal ; dépôt 5 μ l ; tension de 125 V/cm ; durée 2 h 30.

près que le précipité obtenu à partir du 4ème hydrolysate est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous. Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique I".

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES GLYCOPEPTIDES

Purification sur échangeur d'ions

La "fraction glycopeptidique I" est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique 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 ; forme acide), puis d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). Le liquide effluent auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (1 litre) est concentré à 20 ml, dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu. Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique II"

Purification par chromatographie sur gel de dextran

La fraction glycopeptidique II est débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus par les échangeurs d'ions, par une chromatographie sur colonne (2 x 35 cm) de gel de Sephadex G-25. La quantité de précipité chromatographié est de l'ordre de 400 mg et le déplacement des composés est effectué avec de l'eau distillée. Le repérage des constituants présents dans l'effluent est réalisé en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (511) et les protides par le procédé à la ninhydrine de MOORE et STEIN (512) ou par la technique aux dinitrophényl dérivés de GHUYSEN et al. (513). On obtient de cette manière (figure 29 , p.142) une fraction enrichie en glycopeptides. Il s'agit de la "fraction Sephadex".

Fractionnement par chromatographie sur résine échangeuse de cations

350 mg de la fraction Sephadex en solution dans 2 ml d'eau distillée, sont soumis à la chromatographie sur colonne (2 x 40 cm) de Dowex 50 W x 2 ("mesh" 200-400 ; forme acide) et le repérage des constituants

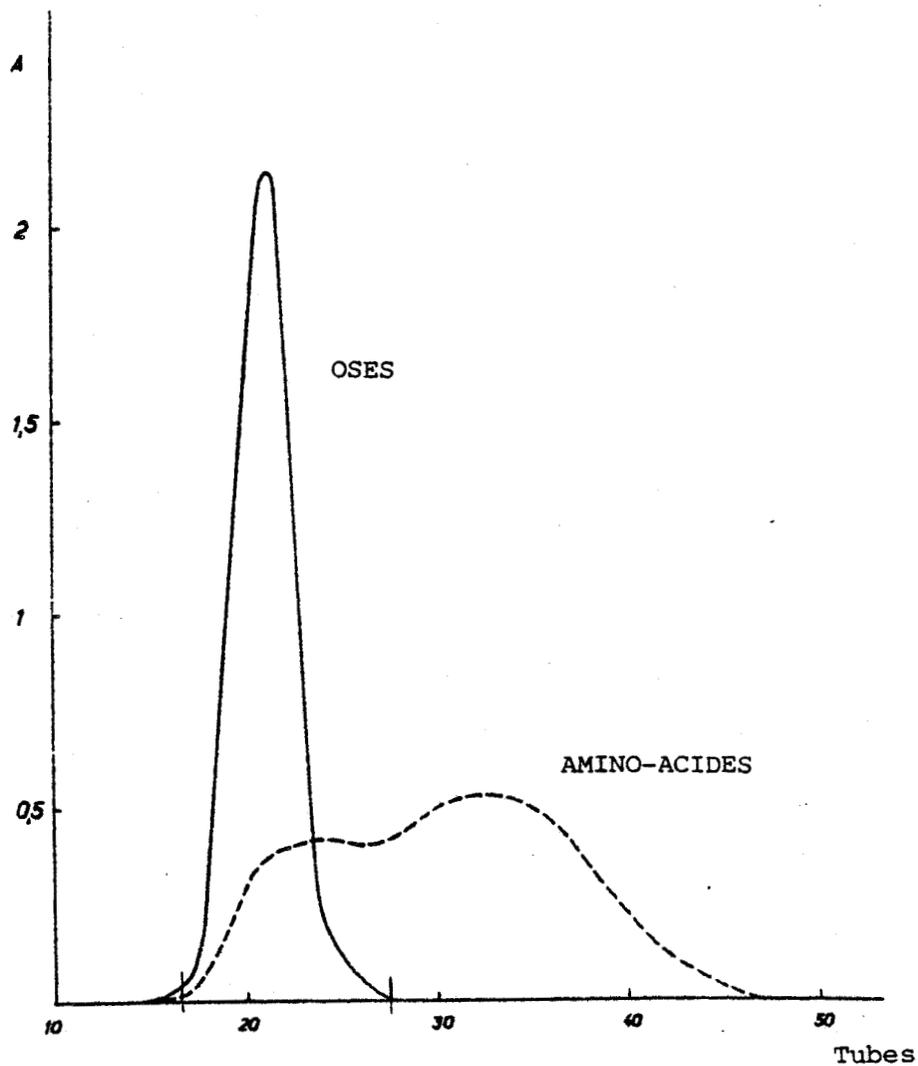
des fractions d'élution est effectué en appliquant le procédé de dosage colorimétrique des glucides de DUBOIS et al. (514). Le passage d'un litre d'eau distillée fournit une première fraction ("Fraction α) (figure 30, p.143) qui est constituée par deux pics d'élution. Le déplacement des glycopeptides fixés sur la colonne est ensuite réalisé, à pH 3,0 à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine (système à deux réservoirs cylindriques 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 (figure 30, p.143) que l'on débarrasse du formiate de pyridine par simple évaporation sous vide à l'évaporateur rotatif, suivie d'une lyophilisation poussée.

III - PRÉPARATION DES GLYCANNES D'OVOMUCOÏDE PAR HYDRAZINOLYSE, N-RÉACÉTYLATION ET RÉDUCTION

HYDRAZINOLYSE

Nous avons utilisé le procédé de BAYARD (515). 900 mg d'ovomucoïde sont recouverts d'hydrazine anhydre : le tube bouché est introduit dans une étuve à 105°C pendant 20 heures. A la fin de la réaction, l'hydrazine est évaporée à l'évaporateur rotatif en présence de toluène. Le culot est repris par du toluène et concentré de nouveau. L'opération est répétée 3 fois. L'hydrazine est piégée par du toluène placé dans le ballon de récupération de l'évaporateur.

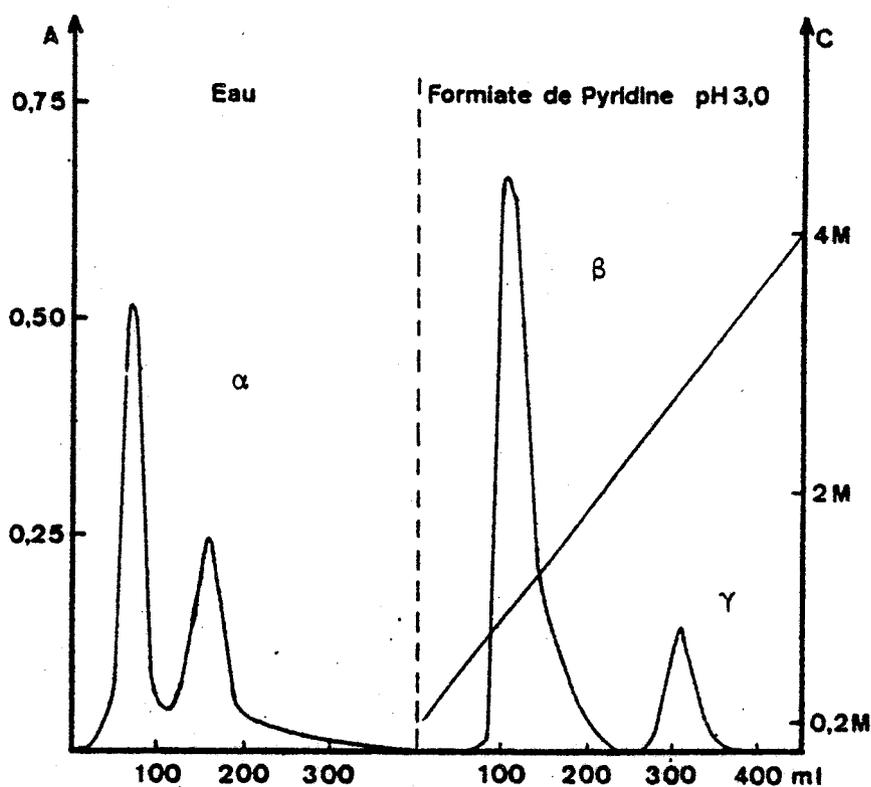
Le résidu sec est solubilisé dans 1 volume d'eau (10 ml) et précipité par 10 volumes d'éthanol absolu (100 ml). Les glycanes ainsi précipités sont récupérés par centrifugation à 3.000 t/mn, pendant 20 min. Ce procédé de précipitation des glycanes par l'éthanol est répété 3 fois.



Selon MONSIGNY

FIGURE 29

Diagramme d'élution sur Sephadex G-25 d'un hydrolysate pronasique d'ovomucoïde. Colonne de 2 x 35 cm pour 400 mg de préparation ; élution par l'eau ; fractions de 2 ml ; débit : 0,5 ml/mn. En traits pleins : dosage des oses "neutres" par le phénol-sulfurique ; en traits pointillés : dosage des protides par la ninhydrine.



Selon MONSIGNY

FIGURE 30

Diagramme de fractionnement des glycoprotides de l'ovomucoïde (350 mg) préalablement purifiés par chromatographie sur Sephadex G-25, sur colonne (2 x 40 cm) de Dowex 50W x 2 ("mesh" 200-400 ; forme acide ; fractions de 10 ml ; débit : 0,5 ml/mn). Repérage des composés glycoprotidiques par le phénol sulfurique. En ordonnées : A : absorbance ; C : concentration en formiate de pyridine. En abscisses : volumes d'élution.

N-REACETYLATION

Nous avons appliqué la méthode de ROSEMAN (516). Les oligosaccharides sont repris dans 5 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium et addition de 500 μ l d'anhydride acétique pur toutes les 20 minutes et ce pendant 2 heures à température ambiante. En cas de baisse du pH (pH < 7), on ajoute du bicarbonate de sodium jusqu'à insolubilisation.

REDUCTION

La solution oligosaccharidique est ajustée à pH 9 au moyen d'ammoniaque 0,05 N. Sont alors introduits 100 mg de borohydrure de potassium. La réduction est arrêtée au bout de 2 heures, à l'aide de résine Dowex 50 x 8 (forme H⁺, Bio-Rad) qui piège les cations (K⁺, Na⁺). Cette opération effectuée sous agitation magnétique dans un bain de glace est suivie au pH mètre.

L'addition de Dowex 50 x 8 est arrêtée lorsque l'on atteint un pH de 4,0. Après filtration sur laine de verre et rinçage de la résine par 15 ml d'eau, la solution oligosaccharidique (20 ml) est chromatographiée sur une colonne de Biogel P-2 (200-400 mesh) (Bio-Rad Labs) (2 x 92 cm I.D.) stabilisée dans une solution aqueuse d'acide acétique 0,5 M à un débit de 20 ml/h en vue d'éliminer les sels. Le volume de chaque fraction collectée est de 4 ml. Après élution, 5 μ l de chaque fraction sont déposés sur une plaque de silice (Kiesegel-Merck) et révélés par l'orcinol sulfurique. Les fractions positives sont confirmées par la radioactivité des oligosaccharides N-(¹⁴C)-acétylglucosaminiques déterminée par comptage en scintillation liquide. Les fractions contenant des sucres sont rassemblées, puis concentrées et lyophilisées.

IV - IDENTIFICATION ET COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES

Méthanolyse et trifluoroacétylation selon la technique employée par ZANETTA et al. (517). 100 µg de produit sont méthanolysés en présence de 10 µg de témoin interne (méso-inositol) par 0,5 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 heures. Après séchage sous azote, le résidu est trifluoroacétylé par 200 µl de mélange dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique (volume/volume) dans un bain de sable porté à 150°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, le trifluoroacétylat est réchauffé 5 minutes à 150°C.

Analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV 210

Les méthylglycosides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur varoport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100°C à 220°C à raison de 2°C par minute, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml/mn.

V - PRÉPARATION DE DIMETHYL SULFINYL POTASSIUM

PREPARATION DU TERT-BUTOXYDE DE POTASSIUM

Nous avons utilisé le procédé de JOHNSON et SCHNEIDER (518). Un morceau de potassium est placé dans un bécher de 50 ml et lavé sous courant d'hélium par 25 ml de n-pentane. Ensuite, le potassium est mis dans 25 ml d'alcool tertbutylique pendant le temps nécessaire pour qu'il devienne 100 p. 100 métallique. Le potassium est de nouveau placé dans un bécher de 50 ml avec 25 ml d'alcool tertbutylique pendant 1 à 2 minutes. Toutes ces opérations sont réalisées sous atmosphère d'hélium à l'aide d'un entonnoir.

Le potassium (4,7 g) est introduit dans un ballon à reflux contenant 100 ml d'alcool tertbutylique sous atmosphère anhydre. Le mélange est chauffé à 40°C pendant 30 mn, puis amené à reflux (80°C) et le potassium laissé en contact avec l'alcool tertbutylique pendant le temps nécessaire à la formation de tert-butoxyde de potassium et totale disparition de potassium. Après refroidissement, l'excès d'alcool tert-butylque est éliminé à l'évaporateur rotatif, sous pression réduite, à température ambiante et piégé par un mélange d'acétone et carboglace à -78°C. Le tert-butoxyde de potassium ainsi obtenu est saturé d'hélium et protégé de toute trace d'humidité. Le tert-butoxyde de potassium contenant encore de l'alcool tert-butylque est ensuite lyophilisé afin d'obtenir 100 p. 100 de tert-butoxyde de potassium. Le rendement est de 23,2 g.

SYNTHESE DU DIMETHYL SULFINYL CARBANION (519)

Un mélange contenant 42 ml de DMSO et 14 g de tert-butoxyde de potassium est placé 30 mn au bain ultrasonique. La concentration de la base ainsi obtenue est de 3 M.

VI - MICRO-METHYLATION ET ANALYSE DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES

METHYLATION

1 à 10 µg d'oligosaccharides sont lyophilisés dans un microtube (6 mm x 80 mm) placé dans un tube Sovirel. Sont alors additionnés sous atmosphère d'azote, 50 µl de DMSO et 50 µl de diméthyl sulfinyl carbanion potassique préalablement chauffés 15 mn à 60°C. Le tube est agité, bouché et placé 45 mn dans un bain ultrasonique contenant de l'éthanol absolu. Après refroidissement à - 20°C, 100 µl d'iodure de méthyle sont ajoutés. Une nouvelle sonication est effectuée pendant 45 mn. La méthylation est arrêtée par addition d'1 ml d'eau contenant du thiosulfate de sodium. Après 3 extractions par 0,5 ml de chloroforme des perméthyl oligosaccharides, les

phases chloroformiques sont lavées 5 fois par 1 ml d'eau et séchées par du sulfate de sodium anhydre. La partie chloroformique est filtrée sur laine de verre et évaporée sous courant d'azote.

Le résidu sec est lyophilisé puis les perméthyloligosaccharides sont méthanolysés 24 heures à 80°C par 100 µl de méthanol chlorhydrique 0,5 N.

Les éthers méthyliques méthylglycosylés sont peracétylés par un mélange de pyridine et d'anhydride acétique (v : v ; 1 : 1 ; 50 µl) pendant une nuit à 20°C. Après évaporation sous azote, ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon la méthode de FOURNET et al. (520).

ANALYSE DES ETHERS METHYLIQUES PERACETYLES

C'est par couplage d'une colonne capillaire imprégnée de silicone OV 101 (0,3 mm x 25 m) au spectromètre de masse Riber-Mag-10-10 (énergie d'ionisation : 70 eV) que les analyses sont effectuées.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- température du détecteur et de l'injecteur : 220°C ;
- gradient de température : 100 à 240°C à 5°C/mn ;
- gaz vecteur : hélium à 0,05 bar.

VII - A CONVENIENT METHOD FOR METHYLATION OF GLYCOPROTEIN
GLYCANS IN SMALL AMOUNT USING LITHIUM METHYLSULFINYL
CARBANION

José PAZ PARENTE, Pascal CARDON, Yves LEROY, Jean MONTREUIL and
Bernard FOURNET*

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et
Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au Centre National
de la Recherche Scientifique n° 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex,
France.

Guy RICART

Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université des Sciences
et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

* To whom all correspondence should be addressed.

Soumis à Carbohydrate Research

ABSTRACT

Treatment of dimethylsulfoxide with n-butyllithium leads to the rapid formation of lithium methylsulfinyl carbanion. Reaction products tend to be significantly free from impurities when lithium methylsulfinyl carbanion is used in comparison with sodium or potassium methylsulfinyl carbanion. This reagent gives less background in g.l.c. and thus, can be used to methylate micro-quantities of glycoprotein glycans (down to 10 μ g) without the necessity to identify methyl ether by m.s.

INTRODUCTION

Methylation analysis combined with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy is the most powerful method for the structural analysis of the oligosaccharidic parts of glycoproteins¹⁻⁴. During the past twenty years, Hakomori procedure⁵ using sodium hydride and methylsulfoxide to produce a more powerful nucleophile than the bases previously used⁶ was applied to obtain a rapid and complete methylation of all free hydroxyl groups as well as N-methylation of the acetamido group of hexosamine residues without any loss of N-acetyl groups⁷ in complex carbohydrates. Because the reagent contains impurities (sodium hydride is dispersed in oil), methods were developed to increase the sensitivity in the chromatographic analysis of methylated sugars. In this way, gas-liquid chromatography coupled to mass spectrometry allows to identify small amounts of partially methylated sugars as well as chemical ionization mass spectrometry was used to greatly enhance the sensitivity of detection of methylated sugars by removing background from gas chromatograms⁸⁻¹¹.

In order to obtain a cleaner reagent to perform the methylation of small amounts of sample, Finne, Krusius and Rauvala¹² reported a new methylation reagent prepared from potassium tert-butoxide and demonstrated that tert-butoxide in methylsulfoxide tended to give less background in g.l.c., was more rapidly, conveniently and safely prepared and could afford less interfering impurities in the analysis of methylated carbohydrates.

In 1981, Phillips and Fraser¹³ developed a method to methylate carbohydrates with dimethyl potassium in methylsulfoxide and obtained significant improvements in the preparation of the reagent and in the purity of the product.

n-butyllithium was prepared primarily by Jones and Gilman¹⁴ from n-butylbromide and lithium wire in ether at an initial temperature of -10° and then at $0-10^{\circ}$ in a total time of about 3 hrs. This reagent can be prepared as well by using n-butylchloride¹⁵. By reaction with n-butyllithium in DMSO followed by treatment with an alkylhalide, Chaykovsky¹⁶ described a method for the N^8 -alkylation of 2,4-diamino-7,8-dihydropteridine. In his paper, the author precise that n-butyllithium reacts with DMSO to form lithium methylsulfinyl carbanion which is probably the actual nucleophile which causes deprotonation of the 7,8-dihydropteridine. n-butyllithium is a carbanion widely used in organic chemistry¹⁷⁻²⁵. In the field of carbohydrate chemistry, butyllithium was used to prepare carbohydrate phosphate²⁶. Hoppe and Schöllkopf²⁷ demonstrated that methyl magnesium bromide, phenylmagnesium bromide, as well as n-butyllithium react on isopropylidene-D-galactodialdehyde to give diastereomeric adducts.

MATERIALS AND METHODS

Materials. - The following reagents were obtained from the companies indicated : n-butyllithium 1.6 M solution in hexane from Janssen Chimica (Beerse, Belgium) ; methyl iodide for synthesis from Merck

(Darmstadt, G.F.R.) ; acetic anhydride R.P. Normapur, pyridine R.P. Normapur and sodium thiosulfate R.P. Normapur from Prolabo Rhône-Poulenc (Paris, France). The solvents were : chloroform for chromatography, methanol for spectroscopy and dimethylsulfoxide p.a. and dried from Merck (Darmstadt, G.F.R.). Dimethylsulfoxide was re-dried again using molecular sieve 3 Å beads about 2 mm (LAB) from Merck (Darmstadt, G.F.R.) and distilled under reduced pressure of about 12 mm under nitrogen. The water used was type milli Q (Millipore, Mass). All the glassware was stored in chromium oxide/conc.sulfuric acid, washed and dried.

α -methyl-D-mannoside was obtained from K and K Labs (Plainview, N.Y.). Oligosaccharide-alditol 11 was prepared from hen ovomucoid by hydrazinolysis in combination with HPLC chromatography on bonded primary amine packings as described by Paz Parente et al.^{28,29}

Synthesis of lithium methylsulfinyl carbanion. - The apparatus for the preparation of lithium methylsulfinyl carbanion consists of a 500 ml two-necked flask provided with a magnetic stirrer, fitted with a 250 ml dropping funnel and a distillation system equipped with a drying tube packed with calcium chloride, and with a manometer and a 1 l. one necked trapflask. All apparatus is connected to a water pump. Before the reaction procedure, the system is purged with helium stream.

Under helium, dimethylsulfoxide freshly dried and distilled (120 ml) is placed in the two-necked flask and n-butyl-lithium 1.6 M solution in hexane (250 ml) is placed in the dropping

funnel. At room temperature and under reduced pressure (30 mm) n-butyllithium in hexane is gradually added under effective stirring. The n-butane produced during the reaction of n-butyllithium with dimethylsulfoxide and hexane is eliminated by water pump. The addition is made in the course of about 2 hrs after which the color of the reaction mixture changes to dark green . After the n-butyllithium 1.6 M solution in hexane has been totally added, the mixture is allowed to stand for 2 hrs at room temperature. After 4 hrs, the system is put back at atmospheric pressure with admission of helium stream. The reagent was stored under helium atmosphere in Teflon-lined screw-cap tubes (13 x 100 mm, Sovirel, France) at 4°.

Methylation procedure.

i. - In order to assay the method, 1 mg of α -methyl-D-mannoside was dissolved in dimethylsulfoxide (200 μ l) in Teflon-lined screw-cap tube (13 x 100 mm, Sovirel, France). 200 μ l of lithium methylsulfinyl carbanion was added under inert atmosphere and the mixture was sonicated during 60 min. After cooling at -4°, cold methyl iodide (400 μ l) was then added. The sonication was carried out in sonicated bath (20°) during 45 min.

The methylation was stopped by addition of water (4 ml) with sodium thiosulfate and the permethylated product extracted by chloroform (3 x 2 ml). The chloroformic phase was washed with water (6 x 4 ml) and dried by sodium sulfated, filtered and concentrated.

ii. - Micromethylation procedure : 10 μ g of oligosaccharide alditol 11 isolated from hen ovomucoid were methylated in a small glass tube (6 x 80 mm) placed in Teflon-lined screw-cap tubes (13 x 100 mm, Sovirel, France) in the same experimental conditions except the quantities of solvents and reagents which were dimethylsulfoxide, 20 μ l ; lithium sulfinyl carbanion, 20 μ l : methyl iodide ; 40 μ l. It is very important to alkylate at room temperature to avoid the decomposition of methyl iodide in iodine. The methylation is stopped by addition of water (0.4 ml) containing thiosulfate and the permethylated oligosaccharide-alditol is extracted by chloroform (3 x 0,4 ml). After washing of the chloroformic phase with water (5 x 0.5 ml) it was dried, filtered, concentrated and freeze dried at 10^{-3} mm pressure at 25°.

Analysis of methyl ethers. - The permethyl oligosaccharide alditol was treated with 0.5 M methanol-HCl (150 μ l) for 20 hrs at 80°. The methyl ethers were analyzed after peracetylation in pyridine-acetic anhydride (1/1, 40 μ l, 37°, 24 hrs) according to Fournet et al.⁹

RESULTS AND DISCUSSION

Reaction of n-butyllithium with dimethylsulfoxide give quantitatively lithium methylsulfinyl carbanion. The base concentration of the reagent was 3.33 M. This base was stable several months when stored at 4° under helium.

Results of methylation of methyl- α -D-mannoside are presented in Fig. 1. On total ionizing current chromatogram one peak is observed with the retention time of methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl- α -D-mannoside. In order to examine the eventual presence of under-methylation products, this compound was acetylated and analysed by g.l.c.-m.s. using fragmentometry technic at m/e 247 (A_1 fragment of trimethylated derivatives) and at m/e 275 (A_1 fragment of dimethylated derivatives)⁹. No trace amounts of under-methylated species of methyl- α -D-mannoside could be observed.

About the permethylation of 10 μ g of oligosaccharide alditol 11 isolated from hen ovomucoid^{28,29}, the analysis by g.l.c. on Silicone OV 101 capillary column of methyl ethers using an injected quantity of 0.15 to 0.8 μ g/peak is presented in Fig. 2. It can be observed that g.l.c. on Silicone OV 101 capillary column with flame ionization detector allows to identify all methyl ethers without the use of m.s. showing that the reagent give less background in g.l.c. Of course, using chemical ionization (ammonia) mass spectrometry with specific ions ; $(M + 18)^+$ for neutral methyl ethers (m/e 268 for permethyl derivatives, m/e 296 for tri-O-methyl mono-O-acetyl derivatives, m/e 324 for di-O-methyl-di-O-acetyl derivatives, m/e 352 for mono-O-methyl-tri-O-acetyl derivatives) ; $(M + 1)^+$ for osamine methyl ethers (m/e 292 for permethyl derivatives, m/e 320 for di-O-methyl-mono-O-acetyl derivatives, m/e 348 for mono-O-methyl-di-O-acetyl derivatives) ; $(M + 1)^+$ for methyl ether, of N-acetyl neuraminic acid (m/e 408) we allow to analyse complex carbohydrate with samples containing less than 1 μ g of total sugars.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (L.A. n° 217), the Université des Sciences et Techniques de Lille I, the Ministère de l'Industrie et de la Recherche (contracts 82-L-1099 and 830157) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contracts 134.012 and CRE 832.029).

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. - Total ion current recording of methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl- α -D-mannoside and under methylation products recording at m/e 247 (A_1 fragment of trimethylated derivatives) and m/e 275 (A_1 fragment of dimethylated derivatives). G.l.c.-m.s. (Ribermag R 10-10 mass spectrometer apparatus) on glass capillary column wall coated with OV 101.

Fig. 2. - Gas chromatogram (glass capillary column wall coated with OV 101 ; F.I.D. detection) of partially methylated and acetylated methylglycosides obtained after methylation and methanolysis of 10 μ g of oligosaccharide-alditol 11 from hen ovomucoid (Injection of 1/6 of initial sample).

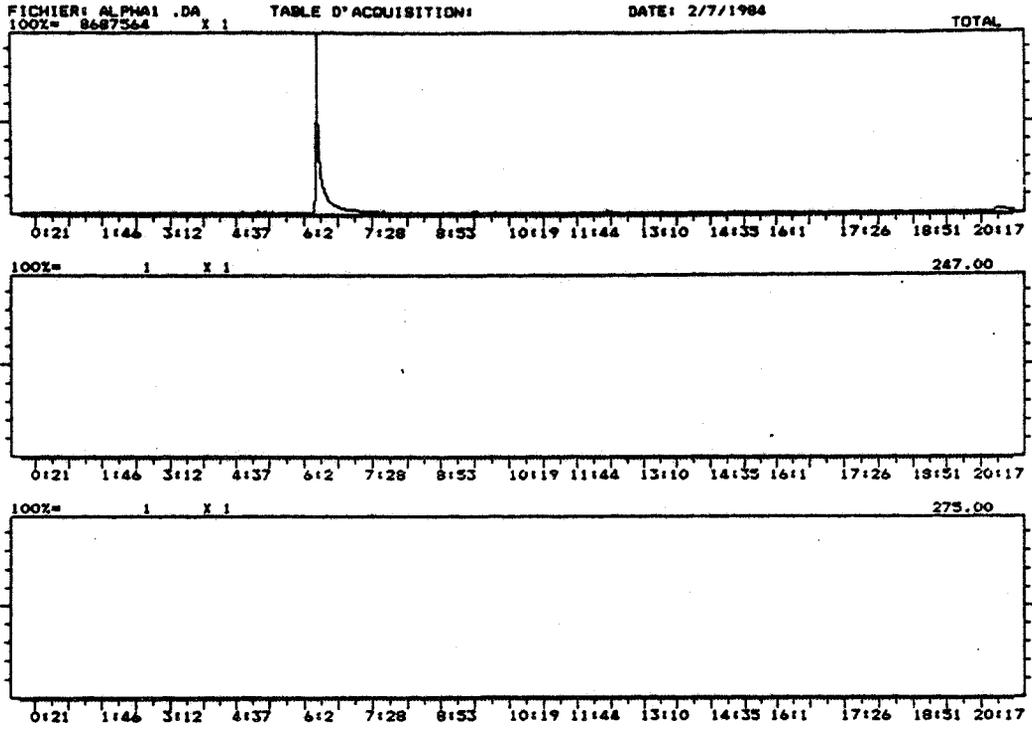


FIGURE 1

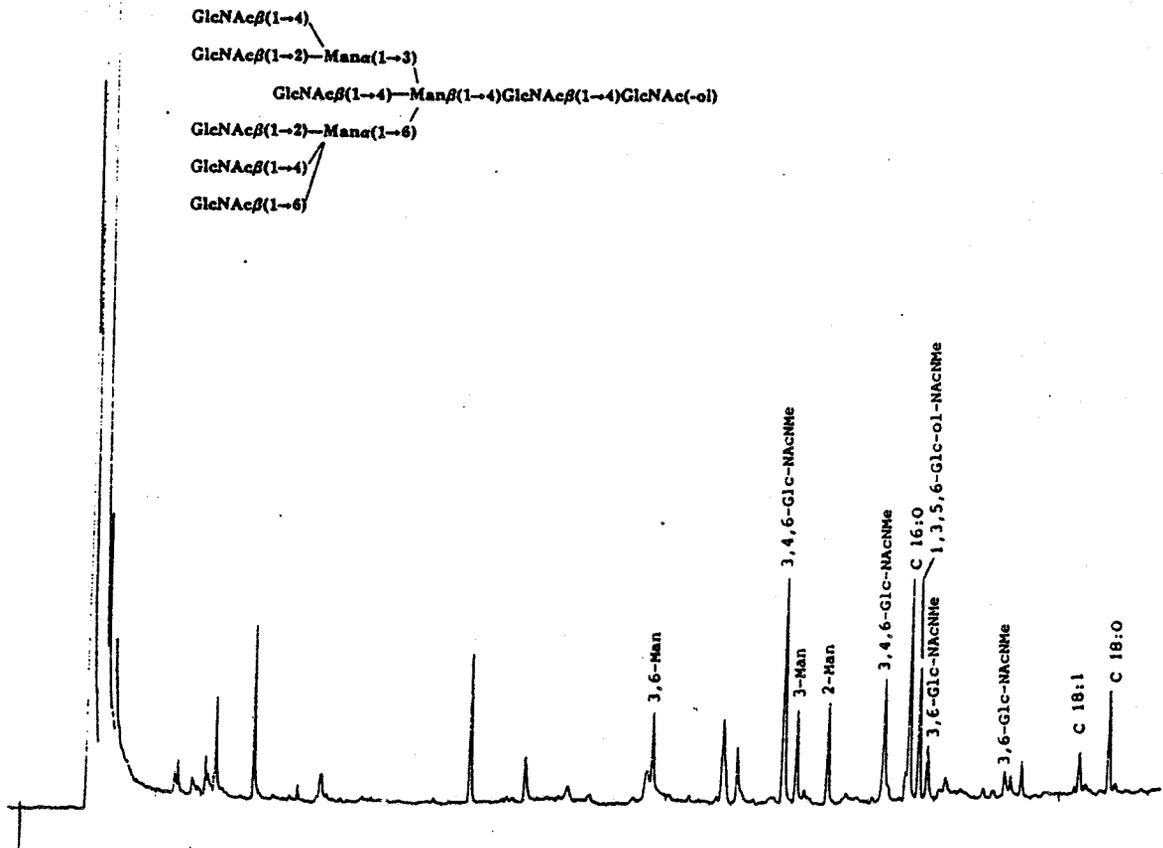


FIGURE 2

REFERENCES

- 1 - B. FOURNET, J. MONTREUIL, G. STRECKER, L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J.F.G. Vliegenthart, J.P. BINETTE and K. SCHMID, *Biochemistry*, 17 (1978) 5206-5214.
- 2 - J. MONTREUIL, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 3 - J.F.G. Vliegenthart, H. van HALBEEK and L. DORLAND, *Pure Appl. Chem.*, 53 (1981) 45-77.
- 4 - J.F.G. Vliegenthart, L. DORLAND and H. van HALBEEK, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.
- 5 - S. HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205-208.
- 6 - E.J. COREY and M. CHAYKOVSKY, *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (1965) 1345-1353.
- 7 - A. STOFFYN, P.J. STOFFYN and J.C. ORR, *Carbohydr. Res.*, 23 (1972) 251-260.
- 8 - R.A. LAINE, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 383-388.
- 9 - B. FOURNET, G. STRECKER, Y. LEROY and J. MONTREUIL, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502.
- 10 - R. GEYER, H. GEYER, S. KÜHNHARDT, W. MINK and S. STIRM, *Anal. Biochem.*, 121 (1982) 263-274.

- 11 - R. GEYER, H. GEYER, S. KÜHNHARDT, W. MINK and S. STIRM, *Anal. Biochem.*, 133 (1983) 197-207.
- 12 - J. FINNE, T. KRUSIUS and H. RAUVALA, *Carbohydr. Res.*, 80 (1980) 336-339.
- 13 - L.R. PHILLIPS and B.A. FRASER, *Carbohydr. Res.*, 90 (1981) 149-152.
- 14 - R.G. JONES and H. GILMAN, *Org. Reactions*, 6 (1951) 352.
- 15 - R.A. BARNES and W.M. BUSH, *Am. Soc.*, 81 (1959) 4705.
- 16 - M. CHAYKOVSKY, *J. Org. Chem.*, 40 (1975) 145-146.
- 17 - L.F. FIESER and M. FIESER (Eds.), *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 1, Wiley, New York, 1967, pp. 95-96.
- 18 - M. FIESER and L. FIESER (Eds.), *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, 1969, pp. 51-53.
- 19 - M. FIESER and L.F. FIESER (Eds.), *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 4, Wiley-Interscience, New York, 1974, pp. 60-63.
- 20 - M. FIESER and L.F. FIESER (Eds.), *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 5, Wiley-Interscience, New York, 1975, p. 78.
- 21 - M. FIESER and L.F. FIESER (Eds.), *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 6, Wiley-Interscience, New York, 1976, pp. 85-91.

- 22 - M. FIESER and L.F. FIESER (Eds.) Reagents for Organic Synthesis, Vol. 7, Wiley-Interscience, New York, 1979, pp. 45-47.
- 23 - M. FIESER (Ed.), Reagents for Organic Synthesis, Vol. 8, Wiley-Interscience, New York, 1980, pp. 65-66.
- 24 - M. FIESER, R.L. DANHELSER and W.R. ROUSH (Ed.), Reagents for Organic Synthesis, Vol. 9, Wiley-Interscience, New York, 1981, pp. 83-87.
- 25 - M. FIESER (Ed.), Reagents for Organic Synthesis, Vol. 10, Wiley-Interscience, New York, 1982, pp. 68-75.
- 26 - M. INAGE, H. CHAKI, S. KUSUMOTO and T. SHIBA, Chem. Lett., 8 (1982) 1281-1284.
- 27 - I. HOPPE and V. SCHOLLKOPF, Liebigs Ann. Chem., 3 (1983) 372-377.
- 28 - J. PAZ PARENTE, G. STRECKER, Y. LEROY, J. MONTREUIL and B. FOURNET, J. Chromatogr., 249 (1982) 199-204.
- 29 - J. PAZ PARENTE, J.M. WIERUSZESKI, G. STRECKER, J. MONTREUIL and B. FOURNET, H. van HALBEEK, L. DORLAND and J.F.G. VLIEGENTHART, J. Biol. Chem., 257 (1982) 13173-13176.

VIII - APPLICATION DE LA MÉTHODE DE VALENT ET AL. (521) PAR
WIERUSZESKI (522) À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE L'OLIGO-
SACCHARIDE-ALDITOL FRACTION 11 LIBÉRÉ PAR HYDRAZINOLYSE
DU GLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOÏDE

Hydrolyse partielle d'oligosaccharide-alditol F11 perméthylé par l'acide formique.

Les conditions expérimentales sont voisines de celles de VALENT et al. (523) : acide formique à 90 et 85 p. 100. L'hydrolyse de l'oligosaccharide-alditol F11 perméthylé a été effectuée à l'aide de l'acide formique à 85 p. 100 (CARLO ERBA) pendant 30 mn à 80°C. L'acide formique est éliminé à l'évaporateur rotatif sous pression réduite. L'acide formique résiduel est coévaporé par du méthanol (3 x 3 ml). L'hydrolyse est contrôlée par chromatographie de couche mince sur gel de silice (Kieselgel G-Merck) dans le système solvant benzène/éthanol (85 : 15, v/v).

REDUCTION DE L'HYDROLYSAT

L'hydrolysat est dissous dans 1 ml d'une solution NaOH 0,05 N : MeOH (50/50, v/v). 8,36 mg de borodutérure de sodium sont ajoutés et la solution est laissée une nuit à température ambiante. La réduction est arrêtée par de la Dowex 50 x 8 (forme H⁺). L'acide borique est éliminé après plusieurs codistillations avec le méthanol. L'éthylation des groupements hydroxyles libres des hydrolysats réduits est réalisée selon la méthode de méthylation de FINNE et al. (524). La seule modification de ce procédé consiste en la substitution de l'iodure de méthyle par l'iodure d'éthyle.

BIBLIOGRAPHIE

	Références	Pages
ADAM-CHOSSON A.	25	8
Thèse Doct. Sci., Lille (1964)	52	13
	199	31
	202	32
	240	40
	245	40
	277	41
	309	47
	311	48
	336	51
	340	52
	505	137
ADAM-CHOSSON A., MONTREUIL J.		
J. Bull. Soc. Chim. Biol., 47 (1965) 1881-1890	330	50
	338	52
	343	52
	347	53
ALDERTON G., FEVOLD H.L.	70	16
J. Biol. Chem., 164 (1946) 1		
ANDREWS P.	130	22
Biochem. J., 96 (1965) 595-606		
ANKIER S.I., WEST G.B.	452	72
J. Pharm. Pharmacol., 16 (1964) 129		
ARAKAWA H., MOOKERJEA S.	500	133
Eur. J. Biochem., 140 (1984) 297-302		
AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H.	215	34
Arch. Biochem. Biophys., 175 (1976) 410-418	225	37
AUBERT J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H.	214	34
Arch. Biochem. Biophys., 175 (1976) 400-409	224	37
BAENZIGER J.U., NATOWICZ M.	482	81
Anal. Biochem., 112 (1981) 357-361	489	131
BAIG M.A., SALAHUDDIN A.	136	23
Biochem. J., 171 (1978) 89-97		
BARBER M., BORDOLI R.S., SEDGWICK R.D., TYLER A.N.	479	81
Chem. Commun., (1981) 325-327		
BAYARD B.	312	48
Thèse Doct. 3ème Cycle, Lille (1970)	354	54

	Références	Pages
BAYARD B.	376	57
Thèse Doct. Sci., Lille (1974)	378	57
	515	141
BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J.	359	54
Carbohydr. Res., 24 (1972) 445-456	368	56
BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G.	353	54
Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., (1971) p. 219		
BAYARD B., MONTREUIL J.	351	54
Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 77 (1969) n° 3, p. 564-565. Société Belge de Biochimie, Bruxelles, 68ème réunion		
BAYARD B., MONTREUIL J.	350	54
Sonderdruck aus HOPPE-SEYLER's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 350 (1969) 3		
BAYARD B., MONTREUIL J.	358	54
Carbohydr. Res., 24 (1972) 427-443		
BAYARD B., MONTREUIL J.	375	57
"Specific cleavage of N-acetylglucosaminidic bonds" In J. MONTREUIL, Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Vol. 1, p. 209-218. Ed. CNRS, Paris (1974)	381	58
BAYARD B., STRECKER G., MONTREUIL J.	355	54
C.R. 6ème Symp. Intern. Chromat. Electroph., Bruxelles, 1970, Presses Acad. Europ. Ed., Bruxelles, 1971, p. 240		
BAYARD B., STRECKER G., MONTREUIL J.	364	54
Biochimie, t. 57 n° 2 (1975) 155-160		
BEARPARK T., BOUQUELET S., FOURNET B., MONTREUIL J., SPIK G., STIRLING J., STRECKER G.	369	57
FEBS-Lett., 84 (1977) 379-384		
BECHAMP M.A.	1	7
C.R. Soc. Biol., 77 (1873) 1525		
BEELEY J.G.	67	14
J. Biochem., 123 (1971) 399-405	179	27
	206	32
	303	44
	306	45
	314	48

BEELEY J.G. Biochem. Soc. Symp., 40 (1974) 27-36	211	34
BEELEY J.G. Biochem. J., 155 (1976a) 345-351	155 156 162 167 177 181 187 464 468	25 25 25 25 26 27 30 73 73
BEELEY J.G. Biochem. J., 159 (1976) 335-345	182 205 207 209 217 219 220	27 32 32 34 34 35 36
BEELEY J.G. Biochem. Biophys. Res. Comm., 76 (1977) 1051-1055	226 227	37 37
BEELEY J.G., JEVONS F.R. Biochem. J., 88 (1963) 15	193	31
BERGH M.L.E., KOPPEN P., Van den EIJNDEN D.H. Carbohydr. Res., 94 (1981) 225-229	492 502	132 134
BERGH M.L.E., KOPPEN P., Van den EIJNDEN D.H. Biochem. J., 201 (1982) 411-415	503	134
BIER M., DUKE J.A., GIBBS R.J., NORD F.F. Arch. Biochem. Biophys., 37 (1952) 491	71	16
BIER M., TERMINIELLO L., DUKE J.A., GIBBS R.J., NORD F.F. Arch. Biochem. Biophys., 47 (1953) 465	60 98	13 18
BOERSMA A., LAMBLIN G., DEGAND P., ROUSSEL P. Carbohydr. Res., 94 (1981) C7-C9	491	132
BRAGG P.D., HOUGH L. Biochem. J., 78 (1961) 11	236 243 270 324	40 40 41 49
BUCK F.F., NITHAYATHIL A.J., BIER M., NORD F.F. Arch. Biochem. Biophys., 97 (1963) 417	442	71
BUNTING J.R., ATHEY T.W., CHATOU R.E. Biochim. Biophys. Acta, 285 (1972) 60-71	223	37

	Références	Pages
CASTANADA-AGULLO M. Anales Escuela Nacl. Cienc. Biol. (Mexico) 6 (1950) 65	438	71
CHAMBERS R., CLAMP J.R., BAYARD B., MONTREUIL J. Biochimie, t.55 n° 10 (1973) 1195-1198	360 363	54 54
CHANG C.T., WU C.S.C., YANG J.T. Anal. Biochem., 91 (1978) 13-31	139	23
CHATTERJEE A.K., MONTGOMERY R. Arch. Biochem. Biophys., 99 (1962) 426	50 103 121 194 273	12 19 21 31 41
CHOSSON A., MONTREUIL J., SCHEPPLER N. C.R. Acad. Sci. Paris, 255 (1962) 3261-3262	331	51
CHOU P.Y., FASMAN G.D. Biochemistry, 13 (1974) 222-245	138 218 221 222	23 34 36 37
COHN E.J., BARNES B.A., BROWN R.K., DESROUAUX G., GILLESPIE J.M., GURD F.R.N., KAHNT F.W., LEVER W.F., LIU C.M., MITTELMAN D., MOUTON R., SCHMIDT K., SURGENOR D.M., UROMA B. J. Am. Chem. Soc., 72 (1950) 465	29 38	9 11
COLE D.R., KINKADE J.M. J. Biol. Chem., 236 (1961) 2443	441	71
CONCHIE J., HAY A.J. Carbohydr. Res., 112 (1983) 261-279	279 317 388 465 469 470 472 473	41 48 59 73 73 73 75 76
CONCHIE J., HAY A.J. Carbohydr. Res., 112 (1983) 281-295	389 401 402 483 485	59 62 62 123 123
CONCHIE J., HAY A.J., LOMAX J.A. Carbohydr. Res., 103 (1982) 129-132	386	59
CORIN G., BERARD E. Bull. Acad. Roy. Belg., 15 (1888) 617	3	7

	Références	Pages
DELL A., MORRIS H.R., EGGE H., STRECKER G., NICOLAI H. Carbohydr. Res., 115 (1983) 41-52	480	81
DELL A., OATES J.E., MORRIS H.R., EGGE H. Int. J. Mass. Spec. Ion Phys., 46 (1983) 415-418	481	81
DEUTSCH H.F., MORTON J.I. Arch. Biochem. Biophys., 64 (1956) 19	424	67
DEUTSCH H.F., MORTON J.I. Arch. Biochem. Biophys., 93 (1961) 654	88 102 114 120 148 168 172	18 19 20 21 25 25 26
DIXON A.S.J. Biochem. J., 60 (1955) 165	265	41
DONOVAN J.W. Biochemistry, 6 (1967) 3918-3927	128 131	22 22
DORLAND L., HAVERKAMP J., Vliegenthart J.F.G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., 100 (1979) 569-574	501	133
DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. Anal. Chem., 28 (1956) 350	511 514	140 141
DUPONT P. D.E.A., Biochimie, Lille (1969)	344 348 349 367	52 54 54 55
EICHHOLZ A. J. Physiol., 23 (1898) 163	5	7
FEENEY R.E., OSUGA D.T., MAEDA H. Arch. Biochem. Biophys., 119 (1967) 124-132	154	25
FEENEY R.E., RHODES M.B., ANDERSON J.S. J. Biol. Chem., 235 (1960) 2633	269	41
FEENEY R.E., STEVENS F.C., OSUGA D.T. J. Biol. Chem., 238 (1963) 1415	44 416	12 66
FEVOLD H.L. Adv. Prot. Chem., 6 (1951) 187-252, Academic Press Inc, New York	20	8

	Références	Pages
FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H.	519	146
Carbohydr. Res., 80 (1980) 336-339	524	162
FORSYTHE R.H., FOSTER J.F.	16	8
J. Biol. Chem., 184 (1950) 377 et 385	289	42
FOURNET B.	371	57
Thèse Doct. Sci., Lille (1973)		
FOURNET B., DHALLUIN J.M., STRECKER G., MONTREUIL J., BOSSO C., DEFAYE J.	366	54
Anal. Biochem., 108 (1980) 35-56		
FOURNET B., LEROY Y., MONTREUIL J.	372	57
"General procedure of identification of methylated monosaccharides present in permethylated glycans", In J. MONTREUIL, Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Vol. 1, p. 111-130. Ed. CNRS, Paris (1974)		
FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J.	477	81
Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502	520	147
FOURNET B., TAKERKART G., BROHON J., MONTREUIL J.	342	52
Bull. Soc. Chim. Biol., t. 50 n° 7-8 (1968) 1351-1353		
FRAENKEL-CONRAT H., BEAN R.S., DUCAY E.D., ALCOTT H.S.	427	69
Arch. Biochem. Biophys., 37 (1952) 393	439	71
FRAENKEL-CONRAT H., BEAN R.S., LINEWEAVER H.	426	69
J. Biol. Chem., 177 (1949) 385		
FRAENKEL-CONRAT H., PORTER R.R.	158	25
Biochim. Biophys. Acta 9 (1952) 557		
FRANÇOIS-GERARD C., BROCTEUR J., ANDRE A., GERDAY C., PIERCE-CRETEL A., MONTREUIL J., SPIK G.	384	59
Blood Trans. Immunohaemat., 23 (1980) 579-587	390	60
	393	61
FRANÇOIS-GERARD C., GERDAY C., BEELEY J.G.		
Biochem. J., 177 (1979) 679-685	178	26
FRANÇOIS-GERARD C., PIERCE-CRETEL A., ANDRE A., DORLAND L., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G., MONTREUIL J., SPIK G.	385	59
In Glycoconjugates (Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates) CHESTER, M.A., HEINEGÅRD, D., LUNDBLAD, A. et SVENSSON, S. (Eds.) Lund-Ronneby, July 17-23 (1983) pp. 169-170. Ed. Rahms i Lund, Sweden (1983)	391	60

FREDERICQ E., DEUTSCH H.F.	15	8
J. Biol. Chem., 181 (1949) 499-510	28	9
	35	11
	42	12
	49	12
	56	13
	59	13
	68	15
	82	17
	85	18
	86	18
	91	18
	94	18
	100	19
	107	19
	109	19
	110	19
	111	20
	112	20
	124	21
	126	21
	127	21
	149	25
	153	25
	204	32
	264	41
	287	42
	298	43
	304	44
	475	80
	504	137
	510	138
GAUTIER A.	2	7
C.R. Acad. Sci., Paris 79 (1874) 227		
GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H., STROMINGER J.L.	513	140
Biochemistry, 4 (1965) 2245		
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S.	496	133
Trends Biochem. Sci., 5 (1980) 290-293		
GORINI L., AUDRAIN L.	435	69
Biochim. Biophys. Acta, 10 (1953) 570		
GOT R., BOURRILLON R., MICHON J.	302	44
Bull. Soc. Chim. Biol., 42 (1960) 41		
GOTTSCHALK A., ADA G.L.	266	41
Yale J. Biol. Med., 28 (1956) 525		

	Références	Pages
GREEN N.M.	429	69
J. Biol. Chem., 205 (1953) 535	432	69
	433	69
	436	70
	437	71
GREEN N.M., NEURATH H.	412	66
In the Proteins, NEURATH, H. et BAILEY, K. (Eds.),		
Vol. IIB, Academic Press, New York, 1954, p. 1057		
GREEN N.M., WORK E.	431	69
Biochem. J., 54 (1953) 257		
GURIN S., HOOD D.B.	260	41
J. Biol. Chem., 131 (1939) 211		
HAKOMORI S.I.	345	52
J. Biochem., 55 (1964) 205-208		
HALLIBURTON W.	11	7
J. Physiol., 13 (1892) 159		
HALPERN B.N.	448	72
Ciba Found. Symp. Histamine, (1956) 92	459	72
HALPERN B.N.	447	72
Arch. Intern. Pharmacodyn., 82 (1950) 247	457	72
HARBON S.	274	41
Thèse Doct. Sci., Paris (1963)		
HARBON S., HERMANN-BOUSSIER G., CLAUSER H.	275	41
Bull. Soc. Chim. Biol., 45 (1963) 1279		
HARRIS J.M., KALMUS H., WEST G.B.	461	72
Genet. Res., 4 (1963) 346		
HARTLEY F.K., JEVONS F.R.	192	31
Biochem. J., 82 (1962) 1P	271	41
HARTLEY F.K., JEVONS F.R.	272	41
Biochem. J., 84 (1962) 134		
HASE S., OKAWA K., IKENAKA K.	398	61
J. Biochem., 91 (1982) 735-737	495	133
HAYCRAFT J., DUGGAN J.	10	7
Proc. Roy. Soc. (1889) 351 ; Brit. Med. J., 1 (1890) 167		
HEKTOEN L., COLE A.G.	449	72
J. Infect. Diseases, 42 (1928) 1		

	Références	Pages
HESELVIK L.	96	18
Z. Physiol. Chem., 254 (1938) 144	258	41
HEWITT L.F.	259	41
Biochem. J., 32 (1938) 1554		
HEWLETT R.T.	9	7
J. Physiol., 13 (1892) 493		
HOFACK B., DEBEIRE P, CACAN R., MONTREUIL J., VERBERT A.	498	133
Eur. J. Biochem., 124 (1982) 527-531		
HOFMEISTER F.	246	41
Z. Physiol. Chem., 14 (1890) 165 ; 24 (1898) 159		
IKEDA K., HAMAGUCHI K., YAMAMOTO M., IKENAKA T.	117	20
J. Biochem. (Tokyo), 63 (1968) 521-531		
IZUMI S.	252	41
Z. Physiol. Chem., 142 (1925) 175		
JAKUBCZAK E.	26	8
Thèse Doct. Sci., Lille (1971)	55	13
	104	19
	122	21
	157	25
	163	25
	175	26
	189	30
	278	41
	305	44
	307	46
	308	47
	313	48
	462	73
	466	73
	471	74
	508	137
JAKUBCZAK E., CHARET P., MONSIGNY M., MONTREUIL J.	66	14
Z. Physiol. Chem., 350 (1969) 14		
JAKUBCZAK E. et MONTREUIL J.		
Comptes rendus, 271, Série D, 1970, p. 537		
JAKUBCZAK E., Thèse Doct. Sci., Lille (1971)		
JAKUBCZAK E., MONTREUIL J.	64	14
C.R. Acad. Sci., Paris, t. 273, p. 1430-1433		
(18 octobre 1971) Série D.		
JEVONS F.R.	47	12
Nature 181 (1958) 1346 ;		
Biochim. Biophys. Acta, 45 (1960) 384		

	Références	Pages
JIRGENSONS B., IKENAKA T., GORGURAKI V. Makromol. Chem., 39 (1960) 149	113 421	20 67
JOHNSON W.S., SCHNEIDER W.P. Org. Syn. Coll., 4 (1963) 132	518	145
JUTISZ M., KAMINSKI M., LEGAULT-DEMARE J. Biochim. Biophys. Acta, 23 (1957) 173	61	13
KANAMORI M., KAWABATA M. Agr. Biol. Chem., 33 (1969) 75	54 152 174	13 25 26
KARLBERG O. Z. Physiol. Chem., 240 (1936) 55	256	41
KATO I., KOHR W.J., LASKOWSKI M. Jr. (1978) In Regulatory Proteolytic Enzymes and their Inhibitors, 11th FEBS meeting (MAGNUSSON, S., OTTESEN, M., FOLTMANN, B., DANØ, K., NEURATH, H., Eds.), pp. 197-206, Pergamon Press, Oxford	184 185 188	27 29 30
KATO I., SCHRODE J., WILSON K.A., LASKOWSKI M. Jr Protides Biol. Fluids Proc. Colloq., 23 (1975) 235-243	183 210 212 213	27 34 34 34
KAY E., STRICKLAND E.H., BILLUPS C. J. Biol. Chem., 249 (1974) 797-802	133	22
KETTERER B. Life Sc., 5 (1962) 163 Biochem. J., 96 (1965) 372	63	14
KHALKHALI Z., MARSHALL R.D. Biochem. J., 146 (1975) 299-307	499	133
KORNFELD S., GREGORY W., CHAPMAN A. J. Biol. Chem., 254 (1979) 11649-11654	497	133
LANGSTEIN L. Z. Physiol. Chem., 31 (1900) 49 ; HOFMEISTER F., Beitr., 3 (1903) 510	7 230 248	7 39 41
LASKOWSKI M., LASKOWSKI M. Jr. Adv. Prot. Chem., 9 (1954) 203	21 411	8 66
LEE Y.C., MONTGOMERY R. Arch. Biochem. Biophys., 95 (1961) 263 ; 97 (1962) 9	237 238	40 40
LEGER J., MASSON G. Am. J. Med. Sci., 214 (1947) 305	456	72

	Références	Pages
LEGER J., MASSON G.	446	72
Ann. Allergy, 6 (1948) 131	450	72
	454	72
LEGER J., MASSON G., PRADO J.L.	455	72
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 64 (1947) 366		
LEVENE P.A., MORI T.	232	39
J. Biol. Chem., 84 (1929) 49	254	41
	318	49
LEVENE P.A., SUAREZ L.J.	310	47
J. Biol. Chem., 36 (1918) 103		
LEWIS J.C., SNELL N.S., HIRSCHMANN D.J., FRAENKEL-CONRAT H.	145	25
J. Biol. Chem., 186 (1950) 23	169	26
LIENER I.E.	440	71
Arch. Biochem. Biophys., 88 (1960) 216		
LIN Y., FEENEY R.E.	24	8
In Glycoproteins, their composition, structure and function. Part B. GOTTSCHALK, A. (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 762	116	20
LINEWEAVER H., MURRAY C.W.	14	8
J. Biol. Chem., 171 (1947) 565	19	8
	27	9
	34	10
	41	12
	48	12
	51	12
	58	13
	81	17
	99	19
	108	19
	118	21
	125	21
	144	25
	263	41
	286	42
	297	43
	409	66
	413	66
	422	67
	451	72
LONGWORTH L.G., CANNAN A.K., Mc INNES D.A.	33	10
J. Am. Chem. Soc., 62 (1940) 2580	57	13
	80	17
	95	18
	285	42
	296	43

	Références	Pages
LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. L'Actualité Chimique (1980) 12-27	216	34
MANDELES S. J. Chromatogr., 3 (1960) 256	46	12
MARKS G.S., MARSHALL R.D., NEUBERGER A., PAPKOFF H. Biochim. Biophys. Acta, 63 (1962) 340	196	31
MAROUX S., ROVERY M., DESNUELLE P. Biochim. Biophys. Acta, 56 (1962) 202	443	71
MARSHALL R.D., NEUBERGER A. Nature, 186 (1960) 311	147 171	25 26
MASAMUNE H., HOSHINO S. J. Biochem., 24 (1936) 219	257	41
MATSUDA T., WATANABE K., SATO Y. Agric. Biol. Chem. (Eng.), 45 (1981) 417-423	137	23
MATSUDA T., WATANABE K., SATO Y. Biochim. Biophys. Acta, 669 (1981) 109-112	141	23
MATSUDA T., WATANABE K., SATO Y. FEBS-Lett., 124 (1981) 185-188	142 143	23 24
MATSUSHIMA K. Science, 127 (1958) 1178	417	66
MATSUSHIMA Y., FUJII N. Bull. Chem. Soc. (Japan), 30 (1957) 45	374	57
MELAMED M.D. Biochem. J., 92 (1964) 12 P.	434	69
MELAMED M.D. In Glycoproteins, their composition, structure and function. GOTTSCHALK, A. (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 317	23	8
MELLIS S.J., BAENZIGER J.U. Anal. Biochem., 114 (1981) 276-280	488 490	131 132
MEYER K. Adv. Prot. Chem., 2 (1945) 249	13 18 36 83 235 262 288 323	7 8 11 17 39 41 42 49
MICHON J. Nature, 193 (1962) 1077	40	11

MICHON J., BOURRILLON R. Bull. Soc. Chim. Biol., 41 (1959) 277	301	44
MONSIGNY M. Thèse Doct. Sci., Lille (1968)	474 509	80 137
MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A., MONTREUIL J. Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 857-866	203 208 346 507	32 33 52 137
MONTGOMERY R., WU Y. J. Biol. Chem., 238 (1963) 3547-3554	198	31
MONTGOMERY R., WU Y.C., LEE C. Biochemistry, 4 (1965) 578	195	31
MONTREUIL J. C.R. Vè Symposium International sur la Chimie des Glucides, Paris (1970) Vol. XLII, p. 1-16	352	54
MONTREUIL J. "Procédés chimiques et enzymatiques d'exploration de la structure des isoglycannes", Pure Appl. Chem., 27 (1971) 549-573	356	54
MONTREUIL J. Les Glycoprotides. Procédés de détermination de la composition et de la structure de la fraction glucidique, In P. BOULANGER et J. POLONOWSKI (Eds.), Problèmes Actuels de Biochimie Générale, Masson et Cie, Paris (1972) 175-269	357	54
MONTREUIL J. Pure Appl. Chem., Vol. 42 n° 3 (1975) 431-477	365 373 377 379	54 57 57 57
MONTREUIL J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37 (1980) 157-223	361 382 407	54 58 65
MONTREUIL J. In Comprehensive Biochemistry, Vol. 19B Part II, NEUBERGER A., VANDEEN L.L.M. (Eds.) Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York (1982)	362 408	54 65
MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A., SPIK G. Bull. Soc. Chim. Biol., t. XLVII n° 10 (1965) 1867-1880	337 341	51 52
MONTREUIL J., BISERTE G., CHOSSON A. C.R. Acad. Sci., Paris, 256 (1963) 3372-3375	200 276	31 41

	Références	Pages
MONTREUIL J., CASTIGLIONI B., ADAM-CHOSSON A., CANER F., QUEVAL J.	17 25a	8 8
J. Biochem., 57 (1965) 514-528. "Biochemistry of sulfur and glycoproteins".	39 53	11 13
ANDO T., EGAMI F. and TAMIYA N. (Eds.), Tokyo, (1965) p. 81	62 65 69 73 74 75 84	13 14 15 16 16 17 17
	239 241 242 280 290 291 299 506	40 40 40 42 42 43 43 137
MONTREUIL J., CHOSSON A.	244	40
C.R. Acad. Sci., Paris, 255 (1962) 3071-3072	327	49
MONTREUIL J., FOURNET B., STRECKER G., FRANÇOIS-GERARD Ch., PIERCE-CRETEL A., SPIK G.	383 387	59 59
(1980) Proceedings of the 13th FEBS Meeting, Jérusalem, p. 194	392 494	61 132
MONTREUIL J., SCHEPPLER N.	300	44
Bull. Soc. Chim. Biol., 41 (1959) 13		
MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A.	335	51
C.R. Acad. Sci., Paris, 255 (1962) 3493-3494	339 380	52 57
MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E., SCHEPPLER N.	201	31
Chromatographie, Symposium II, p. 47, Sté Belge des Sciences Pharmaceutiques, éd., (1963) ; J. Pharm. Belg., 18 (1963) 529	332	51
MOORE S., STEIN W.H.	512	140
J. Biol. Chem., 211 (1954) 893		
MÖRNER C.T.	4	12
Z. Physiol. Chem., 18 (1894) 525 et	12	7
Z. Physiol. Chem., 80 (1912) 430	31 77 78	9 17 17
	282	42
	283	42
	293	43
	294	43

	Références	Pages
MURTHY G.S., GILARDEAU C., CHRETIEN M. Can. J. Biochem., 51 (1973) 1548-1551	180	27
NEEDHAM J. Biochem. J., 21 (1927) 733	253	41
NEUBERG G., SCHENKEL O. Biochem. Z., 44 (1912) 491	251	41
NEUBERGER A., PAPKOFF H. Biochem. J., 87 (1963) 581	197	31
NEUMEISTER R. Z. Biol., 27 (1890) 309	8 30 76 281 292	7 9 17 42 43
NOBLE E., LEGAULT-DEMARE J., JUTISZ M. Bull. Soc. Chim. Biol., 39 (1957) 1077	159 190	25 30
ODIN L. Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. Churchill (Ed.) London (1958) p. 234	267	41
OEGEMA Jr T.R., JOURDIAN G.W. Arch. Biochem. Biophys., 160 (1974) 26-39	89 93 97 105 132 176 315 463 467	18 18 18 19 22 26 48 73 73
OSBORNE T.B., CAMPBELL G.F. J. Am. Chem. Soc., 22 (1900) 422	6	7
OSUGA D.T., FEENEY R.E. Arch. Biochem. Biophys., 124 (1968) 560	150 160 173	25 25 26
OSWALD A. Z. Physiol. Chem., 65 (1910) 175	231	39
PARKER J.T., PARKER F. J. Med. Res., 44 (1924) 263	444	71
PARRATT J.R., WEST G.B. J. Physiol., 139 (1957) 27	460	72
PAVY F.W. Proc. Roy. Soc., 54 (1893) 53 ; Physiology of the Carbohy- drates, London, 1894, p. 53 ; Carbohydrate Metabolism, 1907, p. 44	249	41

	Références	Pages
PENASSE L., JUTISZ M., FROMAGEOT C., FRAENKEL-CONRAT H. Biochim. Biophys. Acta, 9 (1952) 551	164	25
RHODES M.B., AZARI P.R., FEENEY R.E. J. Biol. Chem., 230 (1958) 399	43 151	12 25
RHODES M.B., BENNETT N., FEENEY R.E. J. Biol. Chem., 235 (1960) 1686	45 87 92 101 119 268 410 419	12 18 18 19 21 41 66 66
ROSEMAN S., LUDOWIEG J. J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 301	516	144
SAMUELY F. Biochem. Handb., 4 (1911) 147	250	41
SCHACHTER M., TALESNICK J. J. Physiol., 118 (1952) 258	458	72
SEEMANN J. Dissert., Marburg, 1898	247	41
SELYE M. Endocrinology, 21 (1937) 169	445	71
SIBGHATULLAK Indian J. Biochem. Biophys., 17 (1980) 21-23	186	30
SØRENSEN M. Biochem. Z., 289 (1934) 271 ; SØRENSEN M., Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 20 (1934) n° 3	233 255	39 41
SPIK G., STIRLING J., BEARPARK T., BOUQUELET S., COURTIN D., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J. Glycoconjugate Research Vol. II (Proceedings of the 4th International Symposium on Glycoconjugates) Academic Press (1979) p. 937-940	370	57
SRI-RAM J., TERMINIELLO L., BIER M., NORD F.F. Arch. Biochem. Biophys., 52 (1954a) 451	418 420 425 430	66 66 68 69
SRI-RAM J., TERMINIELLO L., BIER M., NORD F.F. Arch. Biochem. Biophys., 52 (1954b) 464	428	69

	Références	Pages
STACEY M., WOOLLEY J.M.	234	39
J. Chem. Soc. (1940) 184 ; (1942) 550	261	41
	329	50
	334	51
STACEY M., WOOLLEY J.M.	319	49
J. Chem. Soc. (1940) 184	321	49
	325	49
	328	50
	333	51
	453	72
STACEY M., WOOLLEY J.M.	320	49
J. Chem. Soc. (1942) 550	322	49
	326	49
STEVENS F.C., FEENEY R.E.	146	25
Biochemistry, 2 (1963) 1346	170	26
	423	67
TANAKA M.	191	31
J. Pharm. Soc. (Japan), 81 (1961) 1460; 1464; 1467; 1470		
TURCO S.J.	493	132
Anal. Biochem., 118 (1981) 278-283		
TURNER R.A., SCHMERZLER G.	165	25
Biochim. Biophys. Acta 11 (1953) 586		
VALENT B.S., DARVILL A.G., McNEIL M., ROBERTSEN B.K., ALBERSHEIM P.	476	81
Carbohydr. Res., 79 (1980) 165-192	521	162
	523	162
VLLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., Van HALBEEK H.	478	81
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41 (1983) 209-374		
WAHEED A., QASIM M.A., SALAHUDDIN A.	134	22
Eur. J. Biochem., 76 (1977) 383-390	135	23
WAHEED A., SALAHUDDIN A.	90	18
Biochem. J., 147 (1975) 139-144	106	19
	115	20
	123	21
	161	25
	166	25
	316	48
WARNER R.C.	22	8
In The Proteins, Vol. IIA, NEURATH H. and BAILEY K. (Eds.) Academic Press, New York, 1954, p. 435		
WATANABE K., MATSUDA T., SATO Y.	140	23
Biochim. Biophys. Acta 667 (1981) 242-250		

	Références	Pages
WEIL L., TIMASHEFF S.N. Arch. Biochem. Biophys., 87 (1960) 135	415	66
WERNER I., ODIN L. Upsala Läkare foreminger Föhranliger, 54 (1949) 69 ; Acta Soc. Med. Upsaliensis, 57 (1952) 230	32 79 284 295	10 17 42 43
WEYDEMAN Dissert., Marburg, 1896	228	39
WIERUSZESKI J.M. D.E.A. Biochimie, Lille (1982)	522	162
WITAKER J.R. Anal. Chem., 35 (1963) 1950	129	22
WU F.C., LASKOWSKI M. J. Biol. Chem., 213 (1955) 609	414	66
YAMASHITA K., KAMERLING J.P., KOBATA A. J. Biol. Chem., 257 (1982) 12809-12814	394 395 396 399 403 404	61 61 61 63 63 64
YAMASHITA K., KAMERLING J.P., KOBATA A. In Glycoconjugates (Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates), CHESTER M.A., HEINEGÅRD D., LUNDBLAD A. et SVENSSON S. (Eds.), Lund-Ronneby, July 17-23 1983, pp. 166-167. Ed. Rahms i Lund : Sweden (1983)	406	64
YAMASHITA K., KAMERLING J.P., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 3099-3106	397 400 405 484 486 487	61 61 64 123 123 130
YOUNG E. Nature, 145 (1940) 1021	72	16
ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G. J. Chromatogr., 69 (1972) 291-304	517	145
ZANETTI C. Ann. Chim. Pharm. (1897) 12	229	39



RESUME

L'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule est une glycoprotéine constituée de 25 p. cent de sucre et douée d'activité antitrypsique. Cette glycoprotéine qui possède quatre sites de glycosylation de type N-glycosidique se caractérise par une très grande microhétérogénéité de sa fraction glycannique.

Les chaînes glycanniques de l'ovomucoïde détachées de la glycoprotéine par hydrazinolyse ont été analysées après réduction et N-réacétylation par chromatographie liquide haute pression sur colonne de Silice modifiée de type alkylamine. 17 oligosaccharides alditols ont ainsi pu être identifiés et les structures de 4 oligosaccharides déterminées à l'aide de méthodes chimiques (méthanololyse, hydrolyse partielle, perméthylation) et spectrométriques (spectrométrie de masse à haute résolution, spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton à 500 MHz).

Un nouveau type de glycanne pentaantenné a été caractérisé et constitue la structure majeure de la fraction glycannique neutre de l'ovomucoïde.

Les sialoglycannes ont également été étudiés. Ils sont constitués de mono, di, tri, tétra et hexasialylogoligosaccharides. La fraction monosialylée qui représente 70 p. cent des glycannes acides de l'ovomucoïde renferme également des structures nouvelles de type pentaantenné.

MOTS CLEFS : glycoprotéine, glycanne, ovomucoïde, oeuf, poule, oligosaccharide, H.P.L.C., GLC-MS, ¹H-NMR, hydrazinolyse, méthylation.

