

N° d'ordre : 1015

50376
1992
276

50376
1992
276

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET

TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

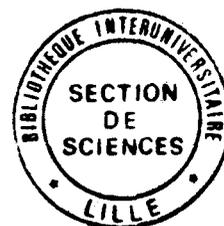
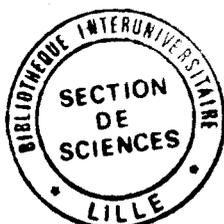
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

SOPHIE HAEUW-FIEVRE



**ETUDE D'OLIGOSACCHARIDES
DU LAIT DE FEMME PORTEURS
D'EPITOPES D'ANTIGENES
DE GROUPES TISSULAIRES
ET D'ANTIGENES MARQUEURS
DE CANCERISATION**

Présentée le 11 Décembre 1992 devant la
Commission d'Examen

Président :	Professeur André VERBERT
Rapporteur :	Professeur Heinz EGGE
Rapporteur :	Docteur Rafaël ORIOL
Examinateur :	Docteur Klaus IRMSCHER
Examinateur :	Professeur Jean MONTREUIL
Examinateur :	Docteur Gérard STRECKER



50376
1992
276

62203

- 2 -

50376
1992
276

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte du CNRS n°111, Directeur : Professeur André VERBERT) sous la direction de Gérard STRECKER, Directeur de Recherches au CNRS. Il a fait l'objet d'une allocation du Ministère de la Recherche et de la Technologie.



030 042889 7

Ce travail a fait l'objet de plusieurs publications et communications :

*** Publications**

- Primary structure of a trisialylated oligosaccharide of human milk. Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C., Lemoine J., Montreuil J. & Strecker G.

Biochemical and Biophysical Research Communications (1991) 177, 720-725.

- Primary structure of four human milk octa, nona and undecasaccharides established by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. Strecker G., Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C. & Montreuil J. *Carbohydrate Research* (1992) 226, 1-14.

- Primary structure of human milk octa-, dodeca- and tridecasaccharides determined by a combination of ^1H -Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and Fast Atom Bombardment Mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the *para*-lacto-N-octaose. Haeuw-Fièvre S., Wieruszeski J-M., Plancke Y., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1992) soumis pour publication

- Primary structure of five oligosaccharide-alditols released from pseudomyxoma peritonei by reductive β -elimination. Presence of NeuAc (α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc sequence in the mucoid substance. Haeuw-Fièvre S., Haeuw J-F., Wieruszeski J-M., Michalski J-C. & Strecker G.

Cancer Research (1992) soumis pour publication

*** Communication orale**

- Etude structurale d'oligosaccharides porteurs d'épitopes antigéniques "onco-foetaux" isolés du lait de Femme et d'un pseudomyxome humain. Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G. XIX^e Forum des Jeunes Chercheurs, Biochimie et Biologie Moléculaire. CAEN, 7-10 Juillet 1992.

*** Communications par affiche**

- **Analyse complète des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (^1H et ^{13}C) de 10 oligosaccharides du lait de Femme.** Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G.

XVII^e Forum des Jeunes Chercheurs, Biochimie et Biologie Moléculaire.
VILLENEUVE D'ASCQ, 3-6 Juillet 1990.

- **Isolement et analyse structurale d'oligosaccharides supérieurs du lait de Femme.** Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G.

XVIII^e Forum des Jeunes Chercheurs, Biochimie et Biologie Moléculaire.
TOURS, 3-6 Septembre 1991.

- **NMR spectroscopy (^1H / ^{13}C) and FAB-MS analysis of neutral and acidic oligosaccharides (DP < 16) isolated from human milk.** Fièvre S., Wieruszeski J-M., Lemoine J., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G.
Joint Meeting of the "Nederlandse vereniging voor the bestudering van glycoconjugaten" and the "Studiengruppe Glykokonjugate der gesellschaft für Biologische Chemie". VILLENEUVE D'ASCQ, 26 et 27 Septembre 1991.

- **Analyse structurale par RMN et FAB-MS d'oligosaccharides neutres et acides isolés du lait de Femme.** Fièvre S., Wieruszeski J-M., Michalski J-C., Montreuil J. & Strecker G.

Congrès de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire.
VILLEPINTE, 2-4 Décembre 1991.

*** Collaboration**

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de P. ROUSSEL (U16 INSERM, Lille) nous avons également participé aux travaux qui ont abouti à la publication suivante:

- ***Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal β 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) disaccharide units.** Ramphal R., Carnoy C., Fièvre S., Michalski J-C., Houdret N., Lamblin G., Strecker G. & Roussel P.

Infection and Immunity (1991) 59, 700-704.

ABREVIATIONS

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

DP : Degré de polymérisation

FAB-MS : "Fast Atom Bombardment - Mass spectrometry"

Fuc : Fucose

Gal : Galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

Glc : Glucose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

HPLC : "High Performance Liquid Chromatography"

LBF : *Lactobacillus bifidus* Factor

Le : Lewis

LS (tétrasaccharide) : Lactiminic Säure

NeuAc : Acide-5-N-acétylneuraminique

NMR : "Nuclear Magnetic Resonance"

ppm : Partie par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	12
<u>GENERALITES</u>	15
<i>LES GLUCIDES DU LAIT DE FEMME</i>	
<u>I - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES GLUCIDES DU LAIT DE FEMME</u>	16
<u>A - ORIGINE DES TRAVAUX</u>	16
1) <u>Les travaux d'ESBACH et DENIGES</u>	16
2) <u>Les travaux de POLONOVSKI et LESPAGNOL</u>	17
a - L'allolactose	17
b - Le gynolactose	18
3) <u>Les travaux de MONTREUIL et KUHN</u>	19
<u>B - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME ET CLASSIFICATION</u>	20
1) <u>Etude structurale</u>	20
a - Caractérisation des premiers oligosaccharides du lait de Femme	20
b - Evolution des méthodes d'isolement et de purification des oligosaccharides	22
1° <i>Chromatographie de "gel-filtration"</i>	22
2° <i>Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)</i>	23
3° <i>Chromatographie d'affinité</i>	24
c - Evolution des méthodes d'analyse structurale	25
1° <i>Méthodes enzymatiques</i>	26
2° <i>Méthodes physiques</i>	27
2) <u>Classification</u>	28
3) <u>Tableau récapitulatif des oligosaccharides isolés du lait de Femme</u>	30
<u>II - ETUDES BIOLOGIQUES DES GLUCIDES DU LAIT DE FEMME</u>	48
<u>A - ACTIVITE BIFIDIGENE</u>	48
1) <u>Origine des travaux</u>	49

* <i>Primary structure of human milk octa-, dodeca- and trideca-saccharides determined by a combination of ^1H-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and Fast Atom Bombardment-Mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the para-lacto-N-octaose</i>	92
B - <u>FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE ACIDE</u>	131
* <i>Primary structure of a trisialylated oligosaccharide of human milk</i>	133
C - <u>CONCLUSION</u>	139
II - <u>ETUDE STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS ISOLES D'UN PSEUDOMYXOME HUMAIN</u>	143
* Introduction	143
* <i>Primary structure of five oligosaccharide-alditols released from pseudomyxoma peritonei by reductive β-elimination. Presence of NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GlcNAc sequence in the mucoid substance</i>	144
* Conclusion	165
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	168
<u>REFERENCES</u>	170
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	
<u>LES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME</u>	I
I - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT	I
A) <u>Isolement des oligosaccharides neutres</u>	I
B) <u>Isolement des oligosaccharides acides</u>	I
II - HYDROLYSE MENAGEE DE LA FRACTION OLIGOSACCHARIQUE NEUTRE	II
A) <u>Conditions d'hydrolyse</u>	II
B) <u>Analyse des produits d'hydrolyse</u>	II

III - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	II
A) <u>La chromatographie sur papier</u>	II
B) <u>La chromatographie sur couche mince</u>	III
C) <u>La chromatographie liquide haute performance</u>	III
1) <i>Isolement des oligosaccharides neutres</i>	III
2) <i>Isolement des oligosaccharides acides</i>	IV
D) <u>La chromatographie liquide d'échange d'ion haute performance</u>	IV
IV - LES METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE	V
A) <u>La spectrométrie de masse</u>	V
1) <i>Methylation</i>	V
2) <i>Spectrométrie de masse par bombardement d'atomes accélérés</i>	VI
3) <i>Spectrométrie de masse par désorption laser (MALD : Matrix Assisted Laser Desorption)</i>	VI
B) <u>La résonance magnétique nucléaire</u>	VI
<u>LE PSEUDOMYXOME HUMAIN</u>	VIII
I - PREPARATION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE A PARTIR DE LA SUBSTANCE GELATINEUSE PROVENANT D'UN PSEUDOMYXOME HUMAIN	VIII
II - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES REDUITS	VIII
III - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	IX
IV - ANALYSE STRUCTURALE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	IX

INTRODUCTION

Des changements dans la glycosylation des glycoconjugués membranaires interviennent à différents stades de la différenciation cellulaire et du développement tissulaire.

Cette glycosylation anormale se traduit par l'apparition à la surface des cellules "d'antigènes associés aux tumeurs" ou "antigènes onco-foetaux".

L'apparition de ces structures glycaniques particulières, à un stade donné de l'embryogénèse ou leur résurgence dans les cellules tumorales, fait actuellement l'objet de nombreuses recherches tant sur le plan fondamental que sur le plan des applications biomédicales. A ce titre, l'utilisation d'anticorps monoclonaux "anti-sucres" ou de lectines, protéines reconnaissant spécifiquement des motifs glycaniques particuliers, s'est avérée être une méthode de choix pour la détection et l'isolement des glycoconjugués de membrane des cellules transformées.

L'élaboration d'un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène nécessite l'isolement et la purification de cet antigène en quantité suffisante.

Malheureusement, les quantités de glycannes isolés à partir de cellules en culture sont généralement très faibles (de l'ordre de quelques microgrammes), ce qui limite l'utilisation de ce matériel à des fins d'études biologiques.

Or, il a pu être démontré que certains milieux biologiques comme le lait de Femme, le méconium ou encore les oeufs ou les liquides de sécrétion de certaines espèces animales (poissons, oiseaux, batraciens) renfermaient des quantités non négligeables de ces néoantigènes. Ceux-ci

peuvent y être présents soit sous forme libre (oligosaccharides), soit sous forme conjuguée (glycolipides ou glycoprotéines).

Dans ce contexte, notre travail s'est inscrit en suite des travaux entrepris au Laboratoire, depuis plusieurs années, par le groupe de **Gérard STRECKER**, à savoir l'isolement et la purification de glycannes à partir de divers milieux biologiques. Nous nous sommes plus particulièrement intéressée à l'isolement et la caractérisation structurale d'oligosaccharides porteurs de déterminants onco-foetaux dans la fraction glucidique du lait de Femme. Comme nous le détaillerons dans le chapitre "Généralités", le lait de Femme se caractérise en effet par la présence d'un grand nombre d'oligosaccharides libres, constituant le "gynolactose", et synthétisés par des glycosyltransférases utilisant le lactose comme accepteur. Bon nombre de ces oligosaccharides ont déjà été décrits comme porteurs d'épitopes antigéniques.

L'association de méthodes chromatographiques très efficaces, comme la chromatographie liquide haute performance, à des méthodes physiques d'analyse structurale, telles la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse, nous a permis de réaliser l'isolement, la purification et l'analyse structurale d'oligosaccharides souvent présents en faible quantité dans le lait de Femme.

Leur isolement en quantité pondéralement appréciable (plusieurs dizaines de milligrammes) permet d'envisager leur utilisation pour la fabrication de substances immunogènes (néoglycolipides et néoglycoprotéines).

Enfin, dans le but de compléter cette recherche d'antigènes de

type onco-foetal, notre intérêt s'est également porté sur la fraction glycannique d'une substance gélatineuse provenant d'une tumeur du péritoine humain, le pseudomyxome. Nous avons pu ainsi déterminer la structure des principaux antigènes glucidiques présents dans cette substance mucoïde.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une brève revue concernant les glucides du lait de Femme, les études physico-chimiques et biologiques dont ils ont fait l'objet.

GENERALITES

A. LESPAGNOL écrivait en 1930 : "Notre thèse, loin de clore un chapitre de la chimie du lait de Femme, ouvre au contraire le champ à de nombreux travaux. L'étude de la constitution des nouveaux glucides exigera probablement de longues recherches. Peut-être même d'autres sucres viendront-ils s'ajouter à ceux que nous avons déjà découverts!"

62 ans plus tard, ces lignes prennent toute leur signification puisque 71 oligosaccharides ont, à ce jour, été isolés du lait de Femme.

Les travaux sur le lait de Femme ont débuté, à la fin du siècle dernier, sur la base de deux observations. La première, d'ordre chimique, consistait en l'existence dans le lait de Femme d'un indosé (ESBACH, 1888). La seconde, d'ordre physiologique, montrait la présence d'une bactérie anaérobie particulière (*Bifidobacterium bifidum*) dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme (TISSIER, 1900). Ainsi, l'activité bifidigène est la signification biologique qui sera très tôt attribuée au lait de Femme.

Le lait de Femme devient ainsi le support à la fois d'études physico-chimiques et biologiques.

Les recherches portant plus particulièrement sur la fraction glucidique du lait de Femme ont, quant à elles, été entreprises d'un point de vue chimique par l'école de Michel POLONOVSKI et, d'un point de vue physiologique, par l'école de Richard KUHN. L'introduction de diverses méthodologies permettant l'isolement et la purification des oligosaccharides (chromatographie liquide haute performance, chromatographie d'affinité...) de même que leur analyse structurale (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse...) vont contribuer à la caractérisation de nombreux oligosaccharides libres du lait de Femme. Actuellement, il est établi que le métabolisme de ces glucides est en relation avec celui des substances à activité de groupe

sanguin. Toutefois, en plus d'être porteurs de déterminants de groupe sanguin, ces oligosaccharides peuvent présenter des structures identiques à celles des glycanes des glycoprotéines ou des glycolipides présents à la surface des cellules tumorales.

I - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES GLUCIDES DU LAIT DE FEMME

A - ORIGINE DES TRAVAUX

Les travaux sur les glucides du lait de Femme ont évolué de façon discontinue et trois phases peuvent ainsi être chronologiquement distinguées :

- **ESBACH** et **DENIGES** : en fin de siècle dernier,
- **POLONOVSKI** et **LESPAGNOL** : de 1928 à 1933,
- **MONTREUIL *et al.*** et **KUHN *et al.*** : à partir de 1950.

1) Les travaux d'ESBACH et DENIGES

Ces auteurs se sont heurtés, les premiers, à ce qui devait représenter pendant plus de cinquante années, "la double énigme du lait de Femme", à savoir :

- l'existence d'un indosé atteignant des taux de 3 à 13 grammes par litre de lait,

- l'anomalie optique du lait de Femme : le lactosérum observé au polarimètre fournit en effet une déviation dextrogyre (pouvoir rotatoire, $[\alpha]_D$, variant de $+ 37^\circ$ à $+ 47^\circ$) inférieure à celle que laisse prévoir la quantité de lactose dosé par les méthodes de réduction ($[\alpha]_D = 52^\circ 53$).

ESBACH (1888) conclut, dans un premier temps, qu'il y a dans

chaque lait un mélange de lactoses, autres que le lactose type isolé par cristallisations fractionnées du lait de Vache, et aux propriétés très différentes. En particulier, le lait de Femme, quand il est comparé au lait de Vache, est le plus irrégulièrement composé de ce point de vue.

Mais DENIGES (1892) démontre que les lactoses du lait de Femme et du lait de Vache sont identiques et conclut que l'indosé du lait de Femme est responsable de l'anomalie optique.

2) Les travaux de POLONOVSKI et LESPAGNOL

En 1928, POLONOVSKI et LESPAGNOL reprennent les travaux de DENIGES sur l'indosé et la "substance lévogyre" accompagnant le lactose dans le lait de Femme.

Les auteurs peuvent rapidement préciser la nature glucidique de cette "substance lévogyre" (voir revue générale de MONTREUIL, 1960 et GRIMMONPREZ, 1971).

Par une méthode de cristallisation fractionnée dans le méthanol fondée sur la grande insolubilité du lactose dans cet alcool, POLONOVSKI et LESPAGNOL parviennent à isoler :

- une substance lévogyre et réductrice qu'ils nomment "gynolactose",

- un autre oside presque aussi réducteur que le lactose mais moins dextrogyre : "l'allolactose".

a - L'allolactose

POLONOVSKI et LESPAGNOL (1933) l'isolent des eaux-mères de la cristallisation du "gynolactose" et décrivent ce sucre dextrogyre ($[\alpha]_D = + 25^\circ$) et soluble dans l'alcool méthylique comme un isomère du

lactose: le 6-O-(β -D-galactosido)-D-glucose.

En 1949, Michel POLONOVSKI demanda à Jean MONTREUIL de reprendre ses travaux afin de vérifier l'existence de l'allolactose en utilisant les techniques modernes de chromatographie. Au terme de 10 années de travail, LESPAGNOL, MONTREUIL et SEGARD (1960) ne purent caractériser cet oside et démontrèrent que l'allolactose ne préexistait pas dans le lait de Femme, mais correspondait à un mélange de lactose et de deux fucosido-lactoses lévogyres, ces derniers étant responsables du phénomène de solvation du lactose dans l'alcool méthylique.

Parallèlement à ces travaux, ceux de KUHN (1958) infirmèrent également l'existence de "l'allolactose" dans le lait de Femme.

b - Le gynolactose

Quand POLONOVSKI et LESPAGNOL (1930) isolent cette substance lévogyre ($[\alpha]_D = -12^\circ$) du lait de Femme, ils ne peuvent ni déterminer la composition chimique et la structure, ni préciser les constantes physiques et chimiques de ce glucide. En particulier, les auteurs ne parviennent pas à éliminer du gynolactose ce qu'ils considèrent comme une impureté azotée et dont l'existence s'explique maintenant par la présence d'osamines dans les différents oligosaccharides.

En 1933, POLONOVSKI et LESPAGNOL mettent en doute l'homogénéité de ce glucide et parviennent à la conclusion que le gynolactose est un mélange complexe d'oligosaccharides qu'il leur était impossible à l'époque de fractionner.

Cette hypothèse sera confirmée ultérieurement par l'isolement de nombreux polyosides du lait de Femme réalisé à l'aide de méthodes

chromatographiques

- sur colonne de cellulose ou de charbon par **KUHN**,
- sur papier par **MONTREUIL**.

3) Les travaux de MONTREUIL et KUHN

En utilisant les techniques précédemment décrites, **MONTREUIL** (1955) et **KUHN** (1958) arrivent à la même conclusion : le gynolactose est un mélange complexe d'oligosaccharides. La composition de ces glucides du lait de Femme, réalisée par dépôt sur papier des hydrolysats acides purifiés sur colonne échangeuse d'ions, révèle que ceux-ci sont constitués essentiellement et en proportion variable de résidus de D-galactose, D-glucose, N-acétyl-D-glucosamine, L-fucose et/ou acide N-acétylneuraminique.

En effet, **HOOVER et al.** (1953), **ZILLIKEN et al.** (1955a, 1956) mettent en évidence la présence d'un acide sialique dans le lait de Femme et l'appellent "acide gynaminique". En même temps, **KUHN et BROSSMER** (1956a) isolent "l'acide lactaminique" du lait de Femme et du lait de Vache. En fait, il s'agit dans les deux cas du même acide sialique : l'acide N-acétylneuraminique (**KUHN et BROSSMER**, 1956b).

KUHN classe alors les oligosaccharides du lait de Femme en trois groupes, selon leur composition en sucres :

- Les glucides neutres azotés
- Les glucides neutres non-azotés
- Les glucides contenant de l'acide N-acétylneuraminique.

B - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME ET CLASSIFICATION

La dénomination de "gynolactose" est actuellement conservée pour définir le mélange complexe d'oligosaccharides, à l'exception du lactose (60 g/l), présents dans le lait de Femme. En effet, le lait maternel est caractérisé par le taux important de cette fraction : 8 à 10 g/l de lait stabilisé et jusqu'à 30g/l de colostrum (MONTREUIL et MULLET, 1959, 1960). Comparativement, celle-ci n'est présente, dans le lait de Vache, qu'à un taux plus faible : 1 à 2 g/l (MONTREUIL et KOBUS, 1960).

1) Etude structurale

Actuellement, plus de 70 oligosaccharides ont été décrits dans le lait de Femme. Leur isolement et la détermination de leur structure ont considérablement évolué, au cours de ces quarante dernières années, grâce à l'apparition de technologies de plus en plus performantes.

a - Caractérisation des premiers oligosaccharides du lait de Femme

C'est par cristallisations successives que POLONOVSKI et LESPAGNOL (1933) tentent d'isoler les glucides du lait de Femme. A chaque étape du fractionnement, les auteurs suivent leur expérimentation par :

- la détermination du pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$,
- le pouvoir réducteur avant et après hydrolyse acide.

Cependant, les trop faibles quantités de matériel obtenues en fin

de fractionnement et l'imperfection des méthodes analytiques ne permirent pas à **POLONOVSKI et LESPAGNOL** de continuer avec efficacité les études de constitution des glucides.

La chromatographie sur papier (**MONTREUIL**, 1955) ou sur colonne de charbon (**KUHN**, 1958) devait donc donner un essor nouveau à la chimie des glucides et permettre de continuer des travaux que les difficultés analytiques n'avaient pas permis de poursuivre.

Ainsi, **MONTREUIL** et **KUHN** ont pu élucider les premières structures primaires des glucides libres du lait de Femme, grâce à l'association de cette nouvelle méthode de fractionnement à des techniques chimiques comme :

- les hydrolyses acides partielle et totale,
- la dégradation alcaline,
- l'étude chromatographique des produits d'hydrolyse,
- les dosages colorimétriques spécifiques,
- le dosage des sucres réducteurs, avant et après hydrolyse,
- l'oxydation bromique.

Quelques oligosaccharides ont alors une constitution bien établie. Néanmoins, la structure de ces glucides ne devient incontestable qu'après perméthylation, réaction permettant enfin de déterminer la nature des liaisons entre les différents résidus de sucre.

De cette façon, les premières structures oligosaccharidiques du lait de Femme ont été établies. Il s'agit des 3-fucosyllactose (**MONTREUIL**, 1956), 2'-fucosyllactose, lacto-N-tétraose, lacto-N-fucopentaose I (**KUHN et al.**, 1956a,b,c), lacto-difucotétraose, lacto-N-fucopentaose II, lacto-N-fucohexaose I (**KUHN et al.**, 1958a,b,c), 3'- et 6'-sialyllactoses (**KUHN**, 1959; **KUHN et al.**, 1959), lacto-N-fucohexaose

II (KUHN *et al.*, 1960), lacto-N-néotétraose, LS tétrasaccharide c (KUHN *et al.*, 1962a,b) et LS tétrasaccharides a et b (KUHN *et al.*, 1965) [Voir tableau récapitulatif des oligosaccharides du lait de Femme, pages 31 à 47]. A chaque oligosaccharide isolé, les auteurs ont attribué un nom "trivial" afin de reconnaître simplement si ce glucide contient de l'azote, du fucose ou de l'acide N-acétylneuraminique, ou s'il s'agit d'un tri-, tétra-, penta- ou hexasaccharide.

b - Evolution des méthodes d'isolement et de purification des oligosaccharides

1° Chromatographie de gel-filtration

A la fin des années 60, KOBATA et ses collaborateurs se lancent, à leur tour, dans l'étude des oligosaccharides du lait de Femme. Ils décrivent alors une nouvelle méthode de séparation de ces sucres : la chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-25 (KOBATA *et al.*, 1969a; KOBATA, 1972). Cette dernière technique permet aux auteurs :

- de séparer les oligosaccharides neutres des oligosaccharides acides (ces derniers étant exclus de la colonne),
- de sous-fractionner les glucides neutres en trois groupes, ce qui facilite, par la suite, l'isolement et la purification des sucres par chromatographie descendante ou électrophorèse sur papier.

De cette façon, ont été isolés et caractérisés de nombreux autres oligosaccharides, à savoir : des dérivés monofucosylés du lacto-N-neotétraose (KOBATA *et al.*, 1969b) et du lacto-N-tétraose (GINSBURG *et al.*, 1976), des hexasaccharides dépourvus de fucose et d'acide sialique, les lacto-N-hexaose et lacto-N-néohexaose (KOBATA & GINSBURG, 1972a,b) et

des sucres de masse moléculaire plus élevée (nonasaccharides) fucosylés et/ou sialylés (GRIMMONPREZ *et al.*, 1975; YAMASHITA *et al.*, 1976a,b).

En 1977, KOBATA et ses collaborateurs affinent une nouvelle fois le pré-fractionnement des oligosaccharides neutres de la manière suivante : chaque sous-fraction obtenue après Sephadex G-25 est soumise à une nouvelle chromatographie de gel-filtration sur Biogel P4 (KOBATA *et al.*, 1978). Cette technique, fondée sur le fait que la GlcNAc réagit comme 2 moles d'hexose et le Fuc comme 0,7 mole, se révèle alors très utile pour séparer les dérivés fucosylés de 8, 10 et 12 sucres (YAMASHITA *et al.*, 1977a,b; TACHIBANA *et al.*, 1978 et revue générale de YAMASHITA *et al.*, 1982).

Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que la chromatographie liquide haute performance et la chromatographie d'affinité redonneront un nouvel essor à la recherche sur les oligosaccharides libres du lait de Femme. Ces nouvelles méthodologies permettent, en effet, après une première chromatographie préparative sur papier, d'isoler à l'état pur des glucides parfois présents en très faible quantité (<1 mg/litre).

2° Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Cette technique chromatographique permet sur un support hydrophile, hydrophobe ou chargé, de séparer des oligosaccharides de même masse moléculaire (CHEETHAM *et al.*, 1983). En effet, WIERUSZESKI *et al.* (1985) parviennent de cette façon à séparer les sialyl-fucopentaoses I et II qui ne diffèrent que par la position du fucose et de l'acide sialique. Puis la CLHP, appliquée aux premières fractions glucidiques du lait de Femme obtenues par chromatographie sur papier, permet d'isoler et de purifier plus rapidement les premiers oligosaccharides décrits,

fréquemment utilisés comme témoins (KONAMI *et al.*, 1987). Par la suite, de nombreux autres oligosaccharides de haute masse moléculaire, fucosylés (STRECKER *et al.*, 1988, 1989; BRUNTZ *et al.*, 1988) ou fucosylés et sialylés (GRONBERG *et al.*, 1989, 1990), ont pu être isolés par CLHP afin d'en établir la structure.

3° Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est une méthode très efficace pour séparer des oligosaccharides. Cette technique est fondée sur des interactions spécifiques avec des molécules immobilisées qui reconnaissent les structures stéréochimiques des sucres. Dans l'isolement des glucides du lait de Femme, deux types de support chromatographique ont été utilisés :

- La chromatographie d'affinité sur lectine immobilisée qui permet à SMITH *et al.* (1987) d'isoler sur RCA_I (*Ricinus communis* agglutinin) un dérivé fucosylé du LS tétrasaccharide c, grâce à l'affinité préférentielle de cette lectine pour les oligosaccharides présentant la séquence NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc-, par rapport à la même séquence sialylée en α -2,3 (BAENZIGER *et al.*, 1979). De la même manière, TARRAGO *et al.* (1988) purifient un dérivé sialylé en α -2,6 du lacto-N-néohexaose par chromatographie d'affinité liquide haute performance sur colonne de WGA (*Wheat Germ* Agglutinin) immobilisée, en se fondant sur l'observation de KRONIS et CARVER (1982) que la WGA présente une plus forte affinité pour le 3'-sialyllactose que pour le 6'-sialyllactose.

En raison de leur grande diversité, les oligosaccharides du lait de Femme sont par ailleurs souvent utilisés comme modèles dans l'étude

de la spécificité de certaines lectines (YAMASHITA *et al.*, 1985).

- La chromatographie d'affinité sur anticorps monoclonal immobilisé. En 1988, KITAGAWA *et al.* (1988a) décrivent un anticorps monoclonal, le MSW113, reconnaissant les glycanes porteurs du déterminant sialyl Le^a (NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc-). Au cours de l'étude structurale de l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal, les auteurs remarquent que la fraction oligosaccharidique acide du lait de Femme inhibe de façon significative la réaction antigène-anticorps. Par chromatographie d'immunoaffinité sur cet anticorps monoclonal MSW113 immobilisé, KITAGAWA *et al.* (1988b) isolent, dans un premier temps, ce qu'ils pensent être le seul oligosaccharide inhibiteur de cette réaction : le sialyl-fucopentaose I, déjà décrit en 1985 (WIERUSZESKI *et al.*). Mais, cette méthodologie va leur permettre par la suite d'isoler un grand nombre d'oligosaccharides mineurs plus ou moins retenus sur la colonne d'affinité, porteurs ou non du déterminant sialyl Le^a (KITAGAWA *et al.*, 1989, 1990, 1991a,b).

c - Evolution des méthodes d'analyse structurale

Les méthodes chimiques mises au point par MONTREUIL et KUHN représenteront longtemps "la voie classique" d'analyse structurale des oligosaccharides du lait de Femme. En 1969, KOBATA et ses collaborateurs complètent cette étude par une analyse chromatographique des oligosaccharides en phase gazeuse (KOBATA *et al.*, 1969a) et par une étude de leurs produits d'hydrolyse acide par diffraction aux rayons X, afin de comparer les spectres obtenus à ceux des témoins lacto-N-tétraose et lacto-N-néotétraose (KOBATA & GINSBURG, 1969b).

Dans le groupe de MONTREUIL, GRIMMONPREZ réalise l'étude physico-

chimique complète de nombreux oligosaccharides (GRIMMONPREZ & MONTREUIL, 1968; GRIMMONPREZ, 1972).

Cependant, l'introduction des techniques enzymatiques et l'essor de méthodologies nouvelles comme la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) constituent les deux étapes principales dans l'évolution de l'étude structurale des glucides libres du lait de Femme.

1° Méthodes enzymatiques

En 1972, parallèlement aux méthodes chimiques, l'étude enzymatique des oligosaccharides réduits au tritium permet de déterminer plus facilement leur structure (KOBATA & GINSBURG, 1972a). Les premiers enzymes utilisés sont une β -galactosidase et une N-acétyl- β -glucosaminidase (KOBATA & GINSBURG, 1972a,b) puis une α -fucosidase (GRIMMONPREZ *et al.*, 1975). L'intérêt de cette méthode repose sur les propriétés particulières de certains enzymes. Par exemple, la β -galactosidase isolée de "Jack bean meal" (LI & LI, 1968) présente, dans certaines conditions différentes des conditions standards, une affinité pour la séquence Gal(β 1-3)GlcNAc- 30 fois inférieure à celle pour la séquence Gal(β 1-4)GlcNAc-. Cette particularité de l'enzyme se révèle très utile pour distinguer ces deux types de liaison présents dans les sucres du lait. Par la suite, d'autres enzymes spécifiques d'un type de liaison particulier sont nécessaires pour établir sans ambiguïté les structures de ces glucides qui s'avèrent être de plus en plus complexes.

2° Méthodes physiques

En 1974, la spectrométrie de masse contribue, pour la première fois, à l'établissement de la structure d'un oligosaccharide du lait de Femme : le 6'-galactosyllactose (YAMASHITA & KOBATA, 1974). Ce n'est qu'en 1985 (WIERUSZESKI *et al.*) que cette technique sera réutilisée, couplée au bombardement d'atome accéléré (abréviation utilisée : FAB-MS, pour Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry), technique destructive permettant d'obtenir, pour un oligosaccharide donné, l'ion moléculaire correspondant et, par cassure de la molécule à des endroits préférentiels, des fragments caractéristiques. A partir de 1988, parallèlement à la FAB-MS, une autre méthode d'analyse structurale non destructive cette fois, la résonance magnétique nucléaire (RMN) à haut champ, fondée sur le comportement d'une molécule dans un champ magnétique, est systématiquement utilisée pour déterminer la structure des glucides du lait (BRUNTZ *et al.*, 1988; DONALD & FEENEY, 1988; KITAGAWA *et al.*, 1988b, 1989, 1990, 1991a,b; STRECKER *et al.*, 1988, 1989; TARRAGO *et al.*, 1988).

Ces méthodes d'analyse structurale présentent l'énorme avantage de pouvoir être appliquées sur des quantités de sucre de l'ordre de 10 à 100 microgrammes, selon la taille de la molécule étudiée, et permettent d'établir des banques de données.

En raison de leur similitude avec des molécules ayant un rôle biologique important, l'analyse de la structure primaire des oligosaccharides du lait de Femme a déjà été complétée par une étude conformationnelle (BISWAS & RAO, 1980; BREG *et al.*, 1988; CAGAS & BUSH, 1990).

2) Classification

L'étude structurale des nombreux oligosaccharides du lait de Femme a permis de mettre en évidence l'existence de "noyaux" composés de galactose, glucose et N-acétylglucosamine et selon lesquels est définie une nouvelle classification, différente de celle de KUHN (KOBATA, 1977). Tous ces "noyaux" possèdent du lactose en position terminale réductrice, exception faite des tétra- et pentasaccharides récemment isolés par KITAGAWA *et al.* (1990). En effet, la caractérisation de ces deux glucides : NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc et NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal constitue la première mise en évidence d'un résidu de galactose ou de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice des sucres du lait.

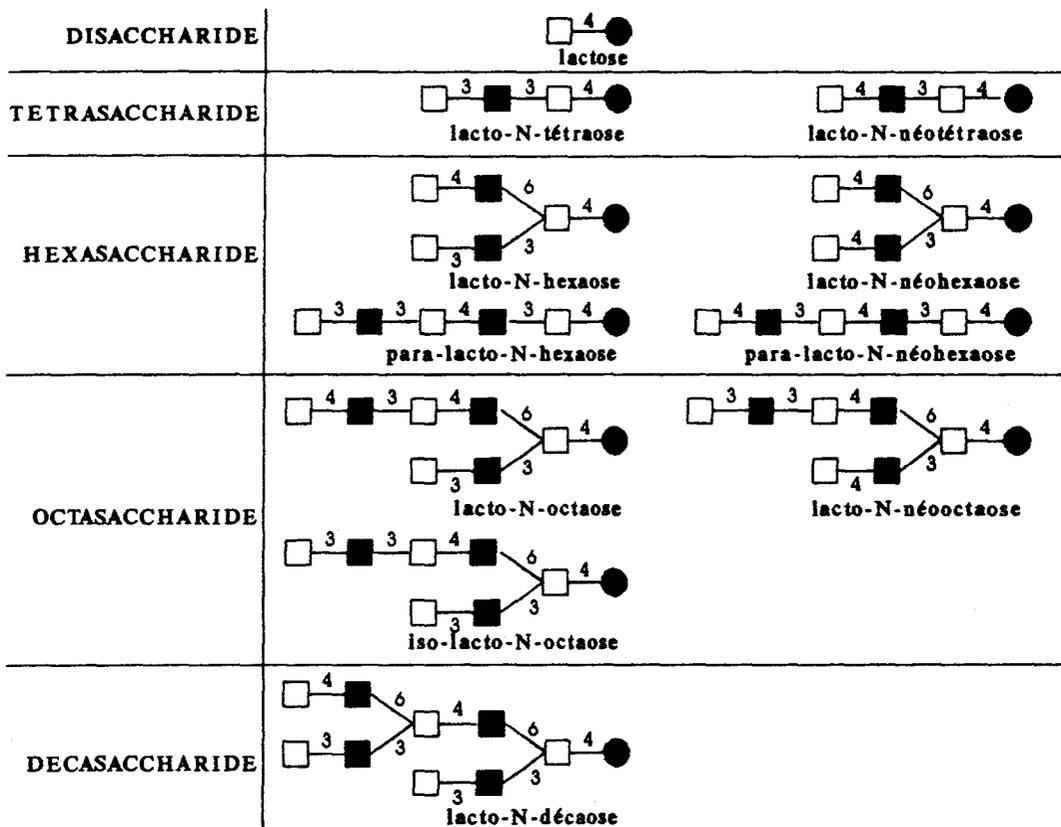
Les schémas de structure des onze "noyaux" différents sont précisés dans le tableau I (p. 29). Ces "noyaux", composés de deux à dix sucres résultent de branchements en β -1,3 ou β -1,6 d'unités disaccharidiques, à savoir :

- * l'iso-N-acétyllactosamine ou chaîne de type 1 : Gal(β 1-3)GlcNAc,
- * la N-acétyllactosamine ou chaîne de type 2 : Gal(β 1-4)GlcNAc.

Sur ces "noyaux", peuvent venir se greffer en nombre variable des résidus de fucose et/ou d'acide N-acétylneuraminique. Pour le fucose, quatre types de liaisons ont été mis en évidence :

- * en α -1,2 sur le galactose,
- * en α -1,3 sur le glucose,
- * en α -1,3 sur la N-acétylglucosamine,
- * en α -1,4 sur la N-acétylglucosamine.

Tableau I : Structure des onze différents "noyaux" rencontrés dans les oligosaccharides du lait de Femme



LEGENDE

3 : β 1-3

4 : β 1-4

6 : β 1-6

□ GALACTOSE

■ N-ACETYLGLUCOSAMINE

● GLUCOSE

De la même façon, l'acide-N-acétylneuraminique peut être engagé dans trois types de liaisons :

- * en α -2,3 sur le galactose,
- * en α -2,6 sur le galactose,
- * en α -2,6 sur la N-acétylglucosamine.

A l'exception des 3'-sialyllactose et 3-fucosyl-3'-sialyllactose, l'acide N-acétylneuraminique est lié :

- * en α -2,3 sur les chaînes de type 1 : Gal(β 1-3)GlcNAc,
- * en α -2,6 sur les chaînes de type 2 : Gal(β 1-4)GlcNAc.

3) Tableau récapitulatif des oligosaccharides isolés du lait de Femme

Dans le tableau II (p. 31 à 47), sont répertoriées les structures développées des différents oligosaccharides isolés du lait de Femme, leur nomenclature et la référence correspondante, ainsi que leur nom trivial lorsqu'il existe.

Les oligosaccharides sont classés en dix groupes, correspondant à dix des onze "noyaux" précédemment décrits: lactose, lacto-N-tétraose, lacto-N-néotétraose, lacto-N-hexaose, lacto-N-néohexaose, *para*-lacto-N-hexaose, *para*-lacto-N-néohexaose, lacto-N-octaose, lacto-N-néooctaose et *iso*-lacto-N-octaose. En effet, aucun oligosaccharide dérivé du "noyau" décasaccharidique n'a été décrit jusqu'à présent.

Seuls les deux oligosaccharides sus-cités et isolés par **KITAGAWA et al.** (1990) ne sont pas répertoriés dans ce tableau récapitulatif, puisqu'ils ne correspondent à aucune des sous-classes. Nous rappelons ici leur structure développée :

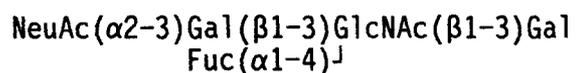
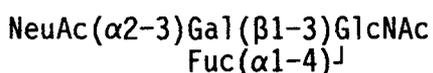


Tableau II : Structures des oligosaccharides caractérisés dans le lait de Femme

SERIE LACTOSE			
STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$Fuc(\alpha 1-2)Gal(\beta 1-4)Glc$	2'-fucosyllactose	$II^2\alpha FucLac$	[1]
$Gal(\beta 1-4)Glc$ $Fuc(\alpha 1-3)$	3-fucosyllactose	$I^3\alpha FucLac$	[2]
$Fuc(\alpha 1-2)Gal(\beta 1-4)Glc$ $Fuc(\alpha 1-3)$	Lacto-difucotétraose	$I^3\alpha FucII^2\alpha FucLac$	[3]
$Gal(\beta 1-3)Gal(\beta 1-4)Glc$	3'-galactosyllactose	$II^3\beta GalLac$	[4]
$Gal(\beta 1-6)Gal(\beta 1-4)Glc$	6'-galactosyllactose	$II^6\beta GalLac$	[5]
$NeuAc(\alpha 2-3)Gal(\beta 1-4)Glc$	3'-sialyllactose	$II^3\alpha NeuAcLac$	[6]
$NeuAc(\alpha 2-6)Gal(\beta 1-4)Glc$	6'-sialyllactose	$II^6\alpha NeuAcLac$	[7]
$NeuAc(\alpha 2-3)Gal(\beta 1-4)Glc$ $Fuc(\alpha 1-3)$	3-fucosyl-3'-sialyllactose	$I^3\alpha FucII^3\alpha NeuAcLac$	[8]

[1] Kuhn, Baer & Gauhe (1956a); [2] Montreuil (1956); [3] Kuhn & Gauhe (1958); [4] Donald & Feeney (1988); [5] Yamashita & Kobata (1974); [6] Kuhn & Brossmer (1959); [7] Kuhn (1959); [8] Grönberg *et al.* (1989).

SERIE LACTO-N-TETRAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$	Lacto-N-tétraose	LcOse_4	[9]
$\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$	Lacto-N-fucopentaose I	$\text{IV}^2\alpha\text{FucLcOse}_4$	[10]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ $\text{Fuc}(\alpha 1-4)$	Lacto-N-fucopentaose II	$\text{III}^4\alpha\text{FucLcOse}_4$	[11]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$	Lacto-N-fucopentaose V	$\text{I}^3\alpha\text{FucLcOse}_4$	[12]
$\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ $\text{Fuc}(\alpha 1-4)$	Lacto-N-fucohexaose I	$\text{III}^4\alpha\text{FucIV}^2\alpha\text{FucLcOse}_4$	[13]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ $\text{Fuc}(\alpha 1-4)$ $\text{Fuc}(\alpha 1-3)$	Lacto-N-fucohexaose II	$\text{I}^3\alpha\text{FucIII}^4\alpha\text{FucLcOse}_4$	[14]
$\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$	LS tétrasaccharide a	$\text{IV}^3\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[15]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ $\text{NeuAc}(\alpha 2-6)$	LS tétrasaccharide b	$\text{III}^6\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[15]

[9] Kuhn & Baer (1956); [10] Kuhn, Baer & Gauhe (1956b); [11] Kuhn, Baer & Gauhe (1958a); [12] Ginsburg *et al.* (1976); [13] Kuhn, Baer & Gauhe (1958b); [14] Kuhn & Gauhe (1960); [15] Kuhn & Gauhe (1965)

(Série Lacto-N-tétraose suite)

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \downarrow \end{array}$	Disialyllacto-N-tétraose	$\text{III}^6\alpha\text{NeuAcIV}^3\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[16]
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \downarrow \end{array}$	Sialyllacto-N-fucopentaose II	$\text{III}^4\alpha\text{FucIV}^3\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[17]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \downarrow \end{array}$	Sialyllacto-N-fucopentaose I	$\text{III}^6\alpha\text{NeuAcIV}^2\alpha\text{FucLcOse}_4$	[17]
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \downarrow \end{array}$		$\text{III}^6\alpha\text{NeuAcIII}^4\alpha\text{FucIV}^3\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[18]
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \text{Fuc}(\beta 1-3) \downarrow \end{array}$		$\text{I}^3\alpha\text{FucIII}^6\alpha\text{NeuAcIV}^3\alpha\text{NeuAcLcOse}_4$	[18]

[16] Grimmonprez *et al.* (1967, 1968); [17] Wieruszeski *et al.* (1985); [18] Grönberg *et al.* (1990)

SERIE LACTO-N-NEOTETRAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	Lacto-N-néotétraose	nLcOse ₄	[19]
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3) [↓]	Lacto-N-fucopentaose III	III ³ αFucnLcOse ₄	[20]
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	LS-tétrasaccharide c	IV ⁶ αNeuAcnLcOse ₄	[21]
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3) [↓]	Sialyllacto-N-fucopentaose III	I ³ αFucIV ⁶ αNeuAcnLcOse ₄	[22]
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3) [↓] Fuc(α1-3) [↓]		I ³ αFucIII ³ αFucnLcOse ₄	[4]

[19] Kuhn & Gauhe (1962a); [20] Kobata & Ginsburg (1969b); [21] Kuhn & Gauhe (1962b); [22] Smith *et al.* (1987)

SERIE LACTO-N-HEXAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$	Lacto-N-hexaose	LcOse_6	[23]
$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$	Fucosyllacto-N-hexaose I	$\text{IV}^2\alpha\text{FucLcOse}_6$	[24]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$	Fucosyllacto-N-hexaose IV	$\text{III}'^3\alpha\text{FucLcOse}_6$	[25]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$	Difucosyllacto-N-hexaose I	$\text{IV}^2\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucLcOse}_6$	[24]

[23] Kobata & Ginsburg (1972a); [24] Yamashita *et al.* (1977a); [25] Yamashita *et al.* (1976a)

(Série Lacto-N-hexaose suite)

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $	Difucosyllacto-N-hexaose	$\text{III}^4\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucLcOse}_6$	[26]
$ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $		$\text{III}^4\alpha\text{FucLcOse}_6$	[27]
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $	Trifucosyllacto-N-hexaose	$\text{III}^4\alpha\text{FucIV}^2\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucLcOse}_6$	[28]
$ \begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array} $	Monosialyllacto-N-hexaose	$\text{IV}'^6\alpha\text{NeuAcLcOse}_6$	[29]

[26] Bruntz *et al.* (1988); [27] Grimmonprez *et al.* (1975); [28] Strecker *et al.* (1989); [29] Kobata & Ginsburg (1972b)

(Série Lacto-N-néohexaose suite)

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \phantom{\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)} \left. \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \right\} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \phantom{\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \phantom{\text{Gal}(\beta 1-4)} \left. \phantom{\text{Glc}} \right\} \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$		$\text{IV}'^6\alpha\text{NeuAcnLcOse}_6$	[29]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \phantom{\text{Fuc}(\alpha 1-3)} \left. \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \right\} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \phantom{\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)} \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \left. \phantom{\text{Glc}} \right\} \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$		$\text{IV}^6\alpha\text{NeuAcIII}'^3\alpha\text{FucnLcOse}_6$	[8]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \phantom{\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{Fuc}(\alpha 1-2)} \left. \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \right\} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \phantom{\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-4)} \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \left. \phantom{\text{Glc}} \right\} \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$		$\text{IV}^6\alpha\text{NeuAcIII}'^3\alpha\text{Fuc}$ $\text{IV}'^2\text{FucnLcOse}_6$	[8]
$\begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \phantom{\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)} \left. \phantom{\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \right\} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \phantom{\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)} \phantom{\text{Gal}(\beta 1-4)} \left. \phantom{\text{Glc}} \right\} \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array}$		$\text{IV}^6\alpha\text{NeuAcIV}'^6\alpha\text{NeuAcnLcOse}_6$	[18]

SERIE para LACTO-N-HEXAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-3)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}}$	Fucosyllacto-N-hexaose IIa	$\text{III}^3\alpha\text{FucpLcOse}_6$	[26]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-4)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}}$	Fucosyllacto-N-hexaose IIIb	$\text{V}^4\alpha\text{FucpLcOse}_6$	[26]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-4)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-3)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}}$		$\text{III}^3\alpha\text{FucV}^4\alpha\text{FucpLcOse}_6$	[34]
$\text{Gal}(\beta 1-3)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-4)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-3)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-3)}{\text{Glc}}}$		$\text{I}^3\alpha\text{FucIII}^3\alpha\text{FucV}^4\alpha\text{FucpLcOse}_6$	[26]
$\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-4)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\overset{\text{Fuc}(\alpha 1-3)}{\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}}$		$\text{III}^3\alpha\text{FucV}^4\alpha\text{FucV}^2\alpha\text{FucpLcOse}_6$	[35]

SERIE *para* LACTO-N-NEOHEXAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \end{array} \text{GlcNAc}(\beta 1-3) \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \end{array} \text{GlcNAc}(\beta 1-3) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{Glc}$		$\text{III}^3 \alpha \text{FucV}^3 \alpha \text{FucpnLcOse}_6$	[34]
$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \end{array} \text{GlcNAc}(\beta 1-3) \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \end{array} \text{GlcNAc}(\beta 1-3) \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \end{array} \text{Glc}$		$\text{I}^3 \alpha \text{FucIII}^3 \alpha \text{FucV}^3 \alpha \text{FucpnLcOse}_6$	[26]

SERIE LACTO-N-OCTAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \end{array} $	Fucosyllacto-N-octaose	$\text{III}'^3\alpha\text{FucLcOse}_8$	[25]
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \quad \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \quad \quad \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \end{array} $	Difucosyllacto-N-octaoseI	$\text{III}'^3\alpha\text{FucV}'^3\alpha\text{FucLcOse}_8$	[36]
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $	Difucosyllacto-N-octaoseII	$\text{III}^4\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucLcOse}_8$	[36]

[36] Tachibana *et al.* (1978)

(Série Lacto-N-octase suite)

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $	Trifucosyllacto-N-octase	$ \text{III}^4\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{Fuc} \\ \text{V}'^3\alpha\text{FucLcOse}_8 $	[36]
$ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array} $	$ \text{III}^4\alpha\text{FucIV}^3\alpha\text{NeuAcV}'^3\alpha\text{FucLcOse}_8 $	[37]	

[37] Kitagawa et al. (1991b)

SERIE LACTO-N-NEOCTAOSE

STRUCTURE	NOM TRIVIAL	NOMENCLATURE	REFERENCE
$ \begin{array}{l} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array} $	Fucosyllacto-N-néooctase	$\text{III}'^3\alpha\text{FucnLcOse}_8$	[25]
$ \begin{array}{l} \text{Fuc}(\alpha 1-4) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \end{array} $	Difucosyllacto-N-néooctase I	$\text{III}'^3\alpha\text{FucV}'^4\alpha\text{FucnLcOse}_8$	[36]
$ \begin{array}{l} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} $	Difucosyllacto-N-néooctase II	$\text{III}'^3\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucnLcOse}_8$	[36]
$ \begin{array}{l} \text{Fuc}(\alpha 1-4) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} $	Trifucosyllacto-N-néooctase	$\text{III}'^3\alpha\text{FucIII}'^3\alpha\text{FucV}'^4\alpha\text{FucnLcOse}_8$	[36]

II - ETUDES BIOLOGIQUES DES GLUCIDES DU LAIT DE FEMME

La signification biologique qui, très tôt, a été attribuée au lait de Femme est l'activité bifidigène.

Puis, quand **MONTREUIL** (1955) et **KUHN** (1958) démontrèrent l'hétérogénéité de la fraction glucidique du lait maternel, une question fut rapidement soulevée : quelle est l'origine de ces nombreux oligosaccharides? Une première relation métabolique est établie avec le lactose par **MONTREUIL** et **MULLET** (1959, 1960), qui constatent l'évolution en sens inverse des taux de lactose et de gynolactose au cours de la lactation. Plus tard, des tentatives de relation avec les nucléotides de transfert, glycoprotéines et glycolipides du lait resteront infructueuses (**GRIMMONPREZ**, 1971, 1972, 1977).

Actuellement, il est établi que le métabolisme de ces oligosaccharides du lait de Femme est en relation avec celui des substances à activité de groupe sanguin. Toutefois, en plus d'être porteurs de déterminants de groupe sanguin, ces glucides peuvent présenter des structures identiques à celles des glycannes des glycoprotéines ou glycolipides présents à la surface de cellules tumorales.

A - ACTIVITE BIFIDIGENE

L'allaitement au sein est reconnu comme bénéfique pour la santé de l'enfant car il diminue considérablement la mortalité infantile.

Suivant le mode d'alimentation, la flore intestinale du nourrisson diffère :

* En cas d'alimentation au sein, la flore bifide est prédominante. Il y

a en effet 30 fois plus de bifides que d'autres germes et il n'y a pas de bacilles anaérobies Gram négatifs (Gram (-)).

* En cas d'alimentation artificielle, les bifides sont peu nombreux et ne représentent que 1% de la flore totale. Le nombre de coliformes est très important et les anaérobies Gram (-) sont présentes en grande quantité (HAENEL *et al.*, 1970).

L'effet protecteur du bifide s'ajoute à celui de nombreuses substances présentes dans le lait de Femme : le lysozyme, la lactotransferrine et les immunoglobulines (IgA de sécrétion ayant une activité antivirale et antibactérienne). Dans le lait maternel, le gynolactose de POLONOVSKI et LESPAGNOL (1930) serait responsable de l'activité bifidigène.

1) Origine des travaux

En 1900, les premiers travaux de TISSIER et de MORO montrent que les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme sont caractérisées par la prépondérance d'une bactérie anaérobie particulière appelée *Bacillus bifidus communis*, puis *Lactobacillus bifidus* et récemment *Bifidobacterium bifidum* tandis que les selles de nourrissons alimentés au lait de Vache en sont dépourvues. D'autre part, les taux de mortalité et de morbidité sont plus faibles chez les enfants nourris au sein que chez les enfants nourris au lait de Vache.

A partir de ces deux observations est émise l'hypothèse d'une relation entre la flore bifide et la résistance du nourrisson, en particulier la protection du nourrisson vis-à-vis des infections intestinales. En effet, *Lactobacillus bifidus*, en décomposant le lactose en acide lactique et acide acétique, provoque une diminution du pH du milieu intestinal et des matières fécales et protègerait ainsi le

nourrisson en s'opposant à la prolifération des germes pathogènes exogènes, sensibles aux pH acides.

En 1926, **SCHÖNFELD** démontre l'existence d'un facteur de croissance pour *Lactobacillus bifidus* dans le lait de Femme. Ce facteur se trouve comme le lactose dans la fraction non protéique du petit lait et n'est ni de nature minérale, ni de nature lipidique.

En 1957, **PETUELY** attribue cet effet bifidigène à une substance thermolabile, le lactulose, disaccharide constitué de galactose et de fructose. Toutefois, cette activité bifidigène mise en évidence *in vivo* n'est pas reproductible *in vitro*. De plus, ce lactulose n'existe pas à l'état libre dans le lait, mais résulte de la transformation du lactose par chauffage du lait en milieu légèrement alcalin.

En 1954, **GYORGY** et ses collaborateurs isolent une souche *Lactobacillus bifidus variant Pennsylvanicus (var. Penn.)* ne proliférant qu'en présence de lait de Femme (**GYORGY et al.**, 1954a,b,c; **GAUHE et al.**, 1954). Ces auteurs attribuent alors l'effet bifidigène de ce lait au "Gynolactose".

2) Identification des facteurs bifidigènes

Les facteurs bifidigènes sont des facteurs de croissance nécessaires au développement des Bifidobactéries. Les différents types de facteurs de croissance sont définis par leur capacité à stimuler spécifiquement une espèce de Bifidobactéries.

a - Quelques rappels sur *Lactobacillus bifidus*

Ce bacille, décrit pour la première fois par **TISSIER** en 1900 dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme, est un

bacille Gram positif (Gram(+)), immobile, asporulé et non cilié, de 2 à 5 µm de long et de 0,5 à 0,7 µm d'épaisseur. Son nom vient de la forme en deux branches, V ou Y, qu'il montre dans certaines conditions. Il possède une morphologie très variable (petite et régulière, longue avec des renflements distaux, incurvée...).

Lactobacillus bifidus est une bactérie anaérobie stricte dont la sensibilité à l'oxygène peut toutefois varier selon les souches. Il existe en effet une certaine tolérance à l'oxygène en présence de CO₂. Comme la plupart des bactéries d'origine humaine, *Lactobacillus bifidus* possède une température optimale de 37°C et un pH optimal de 7. Sa croissance n'est plus détectable lorsque la température est inférieure à 20°C et que le pH est inférieur à 5 ou supérieur à 8.

b - Existence de plusieurs groupes de facteurs bifidigènes

MORO (1907) et SCHÖNFELD (1926) ont montré qu'il existait dans le lait de Femme écrémé des constituants provoquant la croissance des Bifidobactéries. Ces facteurs bifidigènes sont de nature complexe et il a fallu plus de vingt ans pour les identifier. En effet, *Lactobacillus bifidus var. a*, retrouvé essentiellement chez l'adulte, nécessite des facteurs de croissance de nature protéique alors que *Lactobacillus bifidus var. b*, décrit chez l'enfant, nécessite des facteurs de croissance de nature oligosaccharidique, les facteurs de croissance d'un variant ne permettant pas forcément la croissance de l'autre.

Outre le lactulose ou facteur de PETUELY (1957) auquel RAYNAUD (1959) a refusé le nom de facteur de croissance, trois groupes de facteurs sont décrits dans la littérature :

* les oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine ou LBF1 (*Lactobacillus bifidus* Factor 1) de GYORGY,

* les peptides obtenus par digestion enzymatique de caséines, ou BF2 ou facteur de RAYNAUD (1959),

* des constituants divers.

Seul le premier de ce trois groupes de facteurs sera développé.

3) Le facteur bifidigène (LBF1) de GYORGY

a - Mise en évidence

L'identification des facteurs bifidigènes de nature oligosaccharidique débute avec la découverte par GYORGY *et al.* en 1954 (1954a) de la souche *Lactobacillus bifidus var. Penn.*, souche variante ne proliférant qu'en présence de lait de Femme. Ce facteur n'est ni détruit, ni altéré par la chaleur. GYORGY *et al.* (1954b) montrent que les laits d'espèces variées et les sécrétions humaines en sont des sources naturelles (colostrum de Femme et colostrum de Ratte, puis lait de Femme et lait de Ratte par ordre d'activité décroissante). Les laits de ruminants sont faiblement actifs, mais il existe toutefois une concentration appréciable de facteurs de croissance dans le colostrum de Vache.

Les facteurs bifidigènes des lait et colostrum humains sont de deux types (GYORGY *et al.*, 1954c):

* les uns, de faible masse moléculaire, correspondent aux oligosaccharides dialysables du lait et représentent 40 à 75% de l'activité totale.

* les autres, de masse moléculaire élevée, se classent dans les polysides de groupe sanguin et mucines. Ils correspondent aux oligosaccharides non-dialysables du lait et représentent 25 à 60% de l'activité totale.

b - Relation structure / activité bifidigène

Les études de KUHN et GYORGY sur la souche *Lactobacillus bifidus* var. Penn. ont démontré que le gynolactose, mélange complexe d'oligosaccharides neutres et acides, était le support de l'activité bifidigène du lait de Femme.

GAUHE *et al.* (1954) émettent l'hypothèse que seuls les oligosaccharides azotés, c'est-à-dire contenant de la N-acétylglucosamine, ont une activité bifidigène, hypothèse confirmée par GYORGY & ROSE en 1955 (1955a,b). Toutefois, la présence de N-acétylglucosamine ne suffit pas à l'expression de l'activité. En effet, les oligosaccharides sialylés, contenant donc de l'acide-N-acétylneuraminique, sont inactifs sur la souche *Lactobacillus bifidus* var. Penn. (Tableau III, p. 54)(NICOLAI *et al.*, 1972; GYORGY *et al.*, 1974). Mais si ces oligosaccharides sont traités par une neuraminidase, la croissance des Bifidobactéries est alors fonction de la quantité de N-acétylglucosamine.

Diverses études ont été réalisées pour établir l'importance de la N-acétylglucosamine dans l'activité bifidigène. TOMARELLI *et al.* (1954) isolent, après hydrolyse douce de mucine de Porc, un disaccharide fortement actif composé de galactose et de N-acétylglucosamine : il s'agit de la N-acétyllactosamine Gal(β 1-4)GlcNAc. Ces résultats sont confirmés par les travaux de ZILLIKEN *et al.* (1955b,c). Ces auteurs constatent que la N-acétylglucosamine libre est peu efficace par rapport à la N-acétyllactosamine. De la même façon, le lacto-N-néotétraose présente une activité bifidigène supérieure à celle du lacto-N-tétraose, car il possède, contrairement au second, un résidu de N-acétyllactosamine.

Par la suite, de nombreux travaux ont été réalisés à l'aide de

Tableau III : Relation structure/activité bifidigène des Oligosaccharides du lait de Femme

NOMENCLATURE	STRUCTURE	ACTIVITE BIFIDIGENE
<u>Oligosaccharides neutres dépourvus d'azote</u>		
<i>Lactose</i>	Gal(β1-4)Glc	(-)
<i>2' Fucosido-lactose</i>	Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) [↓]	(-)
<i>3 Fucosido-lactose</i>	Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-3) [↓]	(-)
<i>Lactodifucotétraose</i>	Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) [↓] Fuc(α1-3) [↓]	(-)
<u>Oligosaccharides neutres azotés</u>		
<i>Lacto-N-tétraose</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	(+++)
<i>Lacto-N-néotétraose</i>	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	(+++)
<i>Lacto-N-fucopentaose I</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) [↓]	(+++)
<i>Lacto-N-fucopentaose II</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-4) [↓]	(+++)
<i>Lacto-N-difucohexaose</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fuc(α1-2) [↓] Fuc(α1-4) [↓]	(+++)
<u>Oligosaccharides acides azotés et non azotés</u>		
<i>3' Sialyllactose</i>	Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-3) [↓]	(-)
<i>6' Sialyllactose</i>	Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-6) [↓]	(-)
<i>Sialyllacto-N-tétraose A</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-3) [↓]	(-)
<i>Sialyllacto-N-tétraose B</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-6) [↓]	(-)
<i>Sialyllacto-N-tétraose C</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-6) [↓]	(-)
<i>Disialyllacto-N-tétraose</i>	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-3) [↓] NeuAc(α2-6) [↓]	(-)

dérivés de la D-glucosamine, afin d'étudier leurs activités bifidigènes respectives. ROSE *et al.* (1954) et ZILLIKEN *et al.* (1955d) constatent que les méthyl-, éthyl- et n-propyl-N-acétyl- β -D-glucosaminides sont des facteurs de croissance pour *Lactobacillus bifidus var. Penn.* alors que les anomères α correspondants sont inactifs. D'après GYORGY & ROSE (1955a), les éthyl- et propyl-N-acétyl- β -D-glucosaminides, plus actifs que le dérivé méthylé, ont une activité comparable à la N-acétyl-lactosamine. O'BRIEN *et al.* (1960) et LAMBERT *et al.* (1965a,b) ont démontré, en utilisant des composés synthétiques marqués dérivés de la N-acétylglucosamine, que celle-ci est incorporée dans la muréine de la paroi. Ceci expliquerait la différence d'activité entre la N-acétylglucosamine libre et ses dérivés, la N-acétylglucosamine libre étant rapidement convertie en fructose-6-phosphate lui-même métabolisé en acétate et lactate. Sa disparition rapide serait alors défavorable à son incorporation dans la paroi.

Toutefois, toutes ces études n'ont été réalisées que sur *Lactobacillus bifidus var. Penn.*, souche qui a perdu la capacité de synthétiser la glucosamine. En effet, d'autres facteurs de croissance sont nécessaires pour les souches habituelles, en particulier le facteur de RAYNAUD (RAYNAUD, 1959; RAYNAUD et BIZZINI, 1971) ou LBF2 de nature protéique.

4) Conclusion

Les facteurs bifidigènes sont de nature complexe puisque les différents variants de *Lactobacillus bifidus* requièrent des facteurs de croissance différents. Le variant b, retrouvé chez l'enfant, nécessite des facteurs de croissance de nature oligosaccharidique. Ces facteurs sont des substances dérivées de la D-glucosamine.

Les qualités du lait de Femme en font un aliment de choix pour le nourrisson. Ainsi, beaucoup de travaux ont été réalisés en vue de materniser les autres laits, en particulier, le lait de Vache (MONTREUIL, 1971; ROMOND *et al.*, 1980).

B - RELATION AVEC LES SUBSTANCES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN

La biosynthèse des oligosaccharides du lait de Femme est en relation étroite avec celle des substances à activité de groupe sanguin. En effet, ces glucides libres du lait peuvent présenter des structures chimiques identiques à celles de la partie glucidique terminale des substances de groupe sanguin.

1) Les substances spécifiques de groupe sanguin

Nous nous limiterons dans cette brève revue aux antigènes de groupe sanguin des systèmes ABH et Lewis puisque ce sont les seuls déterminants rencontrés dans le lait de Femme.

a - Structure

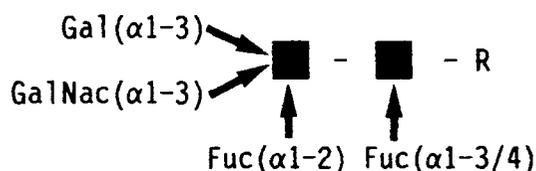
Les substances à activité de groupe sanguin sont très riches en sucres. Ce sont des glycolipides et glycoprotéines associés aux membranes ou excrétés sous forme soluble dans divers produits de sécrétion comme le suc gastrique, le lait, l'urine et le méconium.

Les spécificités sérologiques caractérisant les systèmes ABO, H et Lewis sont associées à la structure chimique de l'extrémité terminale non réductrice des chaînes glycaniques de ces glycoconjugués. Quatre

monosaccharides entrent toujours dans la composition de ces glycanes : le galactose, le fucose, la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine.

La structure des différents déterminants de groupe sanguin est élucidée par des méthodes enzymatiques, chimiques et par des tests d'inhibition d'agglutination et de précipitation, en utilisant les oligosaccharides du lait de Femme dont les structures sont connues (voir LLOYD *et al.*, 1967, 1968a,b et revues de WATKINS, 1966a,b; 1972; KABAT, 1970; MORGAN, 1970).

Les épitopes de groupe sanguin sont donc des épitopes oligosaccharidiques dont la structure générale est la suivante (ORIOU *et al.*, 1986) :



Les deux carrés (■) représentent la chaîne disaccharidique précurseur. Ces chaînes précurseurs sont actuellement au nombre de six :

- * Type 1 : Gal(β1-3)GlcNAc(β1-)R
- * Type 2 : Gal(β1-4)GlcNAc(β1-)R
- * Type 3 : Gal(β1-3)GalNAc(β1-)R
- * Type 4 : Gal(β1-3)GalNAc(β1-)R
- * Type 5 : Gal(β1-3)Gal(β1-)R
- * Type 6 : Gal(β1-4)Glc(β1-)R

Seuls les types 1,2 et 6 existent dans le lait de Femme.

Chaque chaîne précurseur peut recevoir un premier résidu de fucose en α-1,2 sur le galactose terminal pour former le déterminant H (voir Tableau IV, p. 58). Ces structures peuvent ensuite recevoir un résidu de N-acétylgalactosamine ou de galactose en α-1,3 pour former les épitopes A et B, respectivement. Eventuellement, ces structures ABH

Tableau IV : Principales structures glucidiques porteuses de déterminants antigéniques ABO et Lewis

DETERMINANT	STRUCTURE	PRECURSEUR
H	Fuc(α1-2)Gal(β1-3/4)GlcNAc-R	Type 1 ou 2
A	GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc-R Fuc(α1-2) ^J	Type 1 ou 2
B	Gal(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc-R Fuc(α1-2) ^J	Type 1 ou 2
Le ^a	Gal(β1-3)GlcNAc-R Fuc(α1-4) ^J	Type 1
Le ^b	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc-R Fuc(α1-4) ^J	Type 1
Le ^x	Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α1-3) ^J	Type 2
Le ^y	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α1-3) ^J	Type 2
i	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-)	Type 2
I	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) ₇ Gal(β1-) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) ^J	Type 2

peuvent être transformées par addition d'un second résidu de fucose en α -1,3 ou α -1,4 sur le second sucre de la chaîne précurseur pour former les structures ABH difucosylées qui, sur les chaînes de type 1 sont appelées ALe^b , BLe^b et Le^b et sur les chaînes de type 2 sont appelées ALe^y , BLe^y et Le^y . L'addition de ce dernier résidu de fucose directement sur les chaînes précurseurs de type 1 ou de type 2 aboutit aux antigènes Le^a et Le^x , respectivement. Ces structures Lewis monofucosylées ne peuvent pas être transformées par la suite en antigènes ABH (WATKINS, 1980). De la même manière, l'addition d'acide N-acétylneuraminique en α -2,3 sur le galactose terminal des chaînes précurseurs, de type 1 ou de type 2, empêche toute transformation de ces structures en antigènes ABH. Cependant, ces substances sialylées peuvent être des accepteurs pour le transfert de résidu de fucose en α -1,3 ou α -1,4 sur la N-acétylglucosamine. Ces structures Lewis mono- et difucosylées ont seulement été décrites pour les chaînes de type 1 et 2.

b - Génétique des groupes sanguins

Les antigènes relatifs aux groupes sanguins sont de nature glucidique. La biosynthèse de ces épitopes glycaniques est réalisée par l'intervention de plusieurs glycosyltransférases spécifiques (voir revues de GINSBURG, 1972 et WATKINS, 1966a, 1970). Chacune d'elles, en additionnant l'unité monosaccharidique correspondante, contribue à former les glycolipides et glycoprotéines de groupe sanguin (CLAUSEN & HAKOMORI, 1989).

Chaque enzyme est codé par différents gènes pouvant être localisés à différents endroits du génome (voir revue de WATKINS, 1987). Par conséquent, les antigènes glucidiques ont un contrôle génétique plus

complexe que les antigènes polypeptidiques. En 1987, **ORIO**L propose un contrôle de l'expression des antigènes ABH en relation avec l'origine embryonnaire du tissu.

Puisque la synthèse des glycanes nécessite la participation de plusieurs enzymes, et, par conséquent, de plusieurs gènes (voir revues de **FEIZI**, 1990 et **ORIO**L, 1990), le concept classique "un gène / un antigène" ne peut être appliqué aux déterminants glucidiques.

Chaque enzyme utilise un substrat accepteur spécifique. Cependant, dans certains cas, il y a "redondance", c'est-à-dire que plusieurs enzymes peuvent catalyser le transfert d'un même résidu monosaccharidique sur le même accepteur. Dans d'autres cas, il y a "dégénérescence" de la spécificité de l'enzyme : un seul enzyme peut utiliser deux substrats récepteurs différents et peut alors générer deux épitopes différents.

1° *Les α -2-fucosyltransférases*

En catalysant le transfert d'un résidu de fucose en α -1,2 sur le galactose terminal de la chaîne glycanique précurseur, les α -2-fucosyltransférases génèrent le déterminant antigénique H.

20 % de la population n'expriment pas les antigènes ABH dans la salive et sont dits "non-sécréteurs". Au contraire, les 80 % restant de la population, dits "sécréteurs", expriment les antigènes ABH dans leur salive.

Deux modèles génétiques pour l'expression de l'antigène H ont été proposés :

- Le modèle comportant un seul gène structural : H

Tous les globules rouges expriment les antigènes ABH, à

l'exception de ceux des rares individus décrits à Bombay en 1952 (**BHENDE et al.**). Ces individus, dits H-déficients ou de phénotype Bombay, sont en général également dépourvus de déterminant H dans leur salive.

L'enzyme responsable de la formation de l'antigène H au niveau des globules rouges est codé par le gène *H*. Ce gène est situé sur le chromosome 19 et présente un allèle actif *H* et un allèle muet *h*.

La présence de l'antigène H dans la salive est connue pour être sous le contrôle du gène sécréteur *Se*, locus dimorphique consistant en un allèle actif *Se* et un allèle muet *se*.

En 1955, **LEVINE et al.** décrivent une famille H-déficente dans laquelle un enfant sécréteur ABH est issu d'un père non-sécréteur et d'une mère de phénotype Bombay non-sécréteur. Pour expliquer ce phénomène sans remettre en question la paternité, il est nécessaire que la mère ait un gène sécréteur muet, régulateur, non exprimé à cause de l'absence du gène structural *H*, puisqu'elle est de phénotype Bombay (*h/h*). Le gène muet chez la mère serait alors pleinement exprimé chez l'enfant qui a hérité du gène structural *H* normal.

Ainsi, ce gène sécréteur *Se* a longtemps été considéré comme un gène régulateur de l'expression du gène *H* dans les sécrétions seulement.

Plus tard, l'analyse génétique de nombreuses autres familles de phénotype Bombay devait montrer que cette famille décrite par **LEVINE et al.** était une exception. Dans ce cas, **ORIOU et al.** (1981) conclurent à la non paternité. En effet, toutes les autres familles répondent à un autre modèle génétique consistant en deux gènes de structure *H* et *Se*.

De plus, ce phénotype H-déficient découvert à Bombay (en Inde) a ensuite été décrit à Natal (en Afrique du Sud), puis à l'île de la Réunion (**GERARD et al.**, 1982; **LE PENDU et al.**, 1983a). Deux variants de phénotype H-déficient ont été trouvés à la Réunion :

- un variant d'origine indienne, identique au phénotype Bombay,

avec une complète déficience en antigène H,

- un variant décrit parmi les familles blanches, avec une délétion partielle de l'antigène H et appelé phénotype de la Réunion et appartenant à la série des phénotypes para-Bombay (LE PENDU *et al.*, 1983b).

La ségrégation des deux gènes *Se* et *H* dans toutes ces familles étudiées confirme que le modèle génétique comportant deux gènes de structure (*Se* et *H*) est plus approprié que le modèle classique proposé par MORGAN et WATKINS (voir revue de WATKINS, 1980) comportant un seul gène structural *H* et deux gènes de régulation, *Se* pour la salive et *Z* pour les globules rouges.

- Le modèle comportant deux gènes de structure : *H* et *Se*

En 1965, SOLOMON *et al.* décrivent une famille déficiente en antigène H au niveau des globules rouges, mais sécrétant normalement cet antigène dans la salive. Ce nouveau phénomène, répertorié comme H-déficient sécréteur, suggère que l'expression de l'antigène H au niveau des globules rouges et dans la salive est sous des contrôles génétiques différents. Ainsi, un nouveau modèle génétique est proposé (ORIOU *et al.*, 1981) comportant deux gènes structuraux étroitement liés *H* et *Se*, chacun codant pour une α -2-fucosyltransférase différente. D'après ce modèle, la descendance d'un couple non sécréteur (*se/se* x *se/se*) ne pourra être que non-sécréteur indépendamment du génotype H des parents.

De plus, les différences stéréochimiques existant entre les chaînes précuseurs de type 1 et de type 2 suggèrent que les α -2-fucosyltransférases responsables des antigènes H de type 1 et H de type 2 sont différentes (LEMIEUX, 1978). En effet, l'accessibilité du carbone 2 du galactose terminal est tout à fait différente dans les deux types

de chaînes glucidiques précurseurs. Dans la chaîne de type 1 (Gal β 1-3)GlcNAc-), le carbone 2 du galactose terminal est masqué par le groupement N-acétyl de la N-acétylglucosamine. Dans la chaîne de type 2 (Gal(β 1-4)GlcNAc-), il est au contraire tout à fait accessible.

Dans ce modèle à deux gènes de structure, les deux loci sont étroitement liés sur le chromosome 19. Le gène *H* code pour l' α -2-fucosyltransférase exprimée au niveau des globules rouges et le gène *Se* code pour l' α -2-fucosyltransférase exprimée dans les glandes salivaires.

En règle générale, les cellules exprimant l'enzyme produit par le gène *Se* possèdent des antigènes H de type 1 et de type 2, tous deux sous contrôle du gène *Se*, alors que les cellules exprimant le produit du gène *H* possèdent uniquement des antigènes de type 2. En effet, il n'est pas surprenant que l'enzyme codée par le gène *Se*, attendu pour favoriser les chaînes de type 1, puisse aussi utiliser les chaînes de type 2 comme accepteur puisque celles-ci offrent un meilleur accès au site réactif de l'enzyme.

L'existence de ces deux α -2-fucosyltransférases distinctes, *H* et *Se*, a été confirmée par la suite dans plusieurs laboratoires (KUMAZAKI & YOSHIDA, 1984; BETTERIDGE & WATKINS, 1985; LE PENDU *et al.*, 1985).

2° Les α -3-fucosyltransférases

Quatre α -3-fucosyltransférases sont actuellement décrites (voir revue de MACHER *et al.*, 1991) :

- l' α -3-fucosyltransférase myéloïde présente dans les leucocytes et le cerveau. Elle transfère le fucose sur les chaînes de type 2 non sialylée,
- l' α -3-fucosyltransférase de type plasma (SCHENKEL-BRUNNER *et al.*, 1972) présente dans le sérum ou le plasma et dans le foie. Première

α -3-fucosyltransférase décrite, elle transfère le fucose sur les chaînes de type 2, sialylées ou non,

- l' α -3/4-fucosyltransférase ou Lewis fucosyltransférase présente dans les sécrétions exocrines tels le lait (PRIEELS *et al.*, 1981) et la salive (JOHNSON *et al.*, 1981). Elle peut transférer un résidu de fucose sur les chaînes de type 1 et de type 2, et sur les antigènes H sialylés. Cet enzyme, codé par le gène *Le*, est responsable de la formation des déterminants Lewis dans le lait de Femme. Le gène *Le*, polymorphique, est également localisé sur le chromosome 19,

- l' α -3-fucosyltransférase du poumon. Celle-ci n'a été décrite que dans les lignées cellulaires cancéreuses du poumon humain.

MOLLICONE *et al.* (1990) ont étudié la spécificité des accepteurs et la distribution tissulaire des trois premiers types de α -3-fucosyltransférase.

3° Les interactions épistatiques

Plusieurs systèmes génétiques polymorphiques participent à la synthèse des déterminants à activité de groupe sanguin. L'expression de certains de ces antigènes résulte de l'interaction entre les produits de deux gènes, chaque gène codant pour une fucosyltransférase différente (voir revue de ORIOL, 1980).

En effet, la formation de la substance H est une étape intermédiaire nécessaire à la formation des substances de groupe A et B. De la même manière, les antigènes Lewis résultent de l'interaction des produits du gène *Se* (α -2-fucosyltransférase) et du gène *Le* (α -3/4-fucosyltransférase). Ces deux gènes ont chacun un allèle actif et un allèle muet et les combinaisons de ces quatre allèles définissent les antigènes suivants :

* Individu se/se et Le/-

Précurseur de type 1 : Le^a Gal(β1-3)GlcNAc-
Fuc(α1-4)^J

Précurseur de type 2 : Le^x Gal(β1-4)GlcNAc-
Fuc(α1-3)^J

* Individu Se/- et Le/-

Précurseur de type 1 : Le^b Gal(β1-3)GlcNAc-
Fuc(α1-2)^JFuc(α1-4)^J

Précurseur de type 2 : Le^y Gal(β1-4)GlcNAc-
Fuc(α1-2)^JFuc(α1-3)^J

* Individu se/se et le/le

Précurseur de type 1 : Le^c Gal(β1-3)GlcNAc-

Précurseur de type 2 : I Gal(β1-4)GlcNAc-

* Individu Se/- et le/le

Précurseur de type 1 : Le^d Gal(β1-3)GlcNAc-
Fuc(α1-2)^J

Précurseur de type 2 : H Gal(β1-4)GlcNAc-
Fuc(α1-2)^J

Ainsi les déterminants Le^a, Le^b, Le^c et Le^d sont les isomères des déterminants Le^x, Le^y, I et H respectivement.

2) Relation entre les oligosaccharides du lait de Femme et les substances à activité de groupe sanguin

La présence dans le lait de Femme de certains oligosaccharides est en relation étroite avec les substances à activité de groupe sanguin (GROLLMAN *et al.*, 1970). En effet, il a été mis en évidence que les oligosaccharides présents dans les échantillons de lait individuels pouvaient varier en fonction du groupe sanguin du donneur. Les enzymes responsables de la biosynthèse de ces oligosaccharides du lait sont également responsables de la formation des déterminants de groupe sanguin. Ainsi, la présence ou l'absence de certains oligosaccharides dans les échantillons de lait reflète l'habilité du donneur à

synthétiser les chaînes glycaniques des glycoconjugués membranaires et présents dans les sécrétions.

En effet, les femmes "non-sécréteurs" (se/se) sont dépourvues de l' α -2-fucosyltransférase responsable de la formation du déterminant H dans les sécrétions. Ainsi, le lait de ces femmes ne renferme aucun oligosaccharide présentant le déterminant Fuc(α 1-2)Gal- puisqu'elles ne peuvent le synthétiser (GROLLMAN *et al.*, 1967; SHEN *et al.*, 1968). De la même façon, les femmes le/le n'ont pas la α -3/4fucosyl-transférase codée par le gène *Le* et par conséquent leur lait est totalement dépourvu des oligosaccharides contenant ce type de liaison (GROLLMAN *et al.*, 1969). Ainsi, il est possible d'isoler du lait de ces femmes certains oligosaccharides toujours obtenus en mélange dans le lait de Femme Se/- et Le/- (KOBATA & GINSBURG, 1972a).

En 1970, JARKOVSKY *et al.* purifient partiellement une fucosyltransférase du lait de Femme et en précisent les conditions d'action. Cet enzyme, non seulement catalyse la biosynthèse d'oligosaccharides à activité Le^a et Le^b, mais est capable de former une substance à activité Lewis à partir d'une glycoprotéine inactive : il s'agit d'une activité α -4-fucosyltransférasique. Cet enzyme est absent du lait des individus le/le.

En 1981, PRIEELS *et al.* copurifient à partir du lait de Femme une α -3- et une α -4-fucosyltransférase du lait de Femme. La caractérisation structurale des produits de réaction indique que les enzymes forment les déterminants Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- et Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]Glc. L'activité α -4-fucosyl-transférasique est en relation avec le type Lewis du donneur alors que l'activité α -3-fucosyltransférasique est présente chez tous les individus indépendamment du type Lewis du donneur.

En 1989, **EPENBERGER-CASTORI *et al.*** parviennent à isoler une α -3/4-fucosyltransférase ou Lewis fucosyltransférase à l'état pur à partir du lait de Femme. Cette fucosyltransférase était contaminée par une α -3-fucosyltransférase de type plasma (**JOHNSON & WATKINS, 1982**), cette dernière s'exprimant indépendamment du locus *Le* et ayant un contrôle génétique indépendant.

3) Conclusion

Les oligosaccharides du lait de Femme peuvent donc être porteurs de déterminants antigéniques relatifs aux systèmes ABH et Lewis. La nature de ces déterminants dépend essentiellement du phénotype du donneur.

Ces glucides libres du lait de Femme ont non seulement contribué à élucider la structure chimique des déterminants antigéniques de groupe sanguin mais se sont également révélés très utiles, en qualité d'accepteurs, dans l'étude de différentes glycosyltransférases (**CHESTER & WATKINS, 1969; KOBATA *et al.*, 1968, 1970**).

C - RELATION AVEC LES ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS

Ces dernières années, l'étude des oligosaccharides du lait de Femme a connu un regain d'intérêt, puisqu'il a été démontré que bon nombre d'entre eux étaient porteurs de déterminants antigéniques identiques à ceux exprimés au niveau des glycoconjugués des membranes des cellules cancéreuses ou foetales. L'apparition de ces antigènes glucidiques au sein des cellules cancéreuses est liée, comme nous le verrons plus loin, à l'expression "anormale" de certaines

glycosyltransférases, notamment fucosyl- et sialyltransférases. Ces mêmes activités glycosyltransférales sont présentes au niveau des tissus de la glande mammaire, et expliquent l'apparition de ces oligosaccharides dans le lait de Femme. A ce titre, le lait de Femme représente une source appréciable pour l'isolement de ces oligosaccharides en quantité suffisante afin de pouvoir les utiliser par la suite en tant que modèles biologiques, notamment dans la production d'anticorps dirigés contre les antigènes tumoraux.

Avant de décrire les antigènes glucidiques de type onco-foetal découverts à ce jour dans le lait de Femme, nous nous proposons de passer brièvement en revue les principales modifications affectant les chaînes glycaniques lors de la transformation cancéreuse.

1) Antigènes glucidiques associés aux tumeurs

L'utilisation d'anticorps monoclonaux et de lectines a permis de montrer l'existence de nombreuses altérations au niveau des glycoconjugués des cellules malignes. Ces modifications, essentiellement dues à des phénomènes de glycosylation aberrante, sont pour la majeure partie localisées à la surface de ces cellules. En effet, des changements profonds dans la composition et le métabolisme des glycoconjugués et plus particulièrement des glycolipides ont été observés non seulement au niveau des cellules transformées par des virus mais aussi au niveau des tumeurs spontanées incluant un grand nombre de cancers humains (voir revues générales de HAKOMORI, 1983, 1985a,b, 1989; HAKOMORI & YOUNG, 1983; SMETS & VAN BEEK, 1984; FEIZI, 1985; RITTENHOUSE *et al.*, 1985; DENNIS & LAFERTE, 1987; ALHADEFF, 1989; SINGHAL & HAKOMORI, 1990; DUMONTET & PORTOUKALIAN, 1991).

Les modifications affectant la glycosylation sont essentiellement de 3 types :

a - Une synthèse incomplète

Celle-ci est due au blocage d'un ou de plusieurs glycosyltransférases (suppression ou répression) (HAKOMORI, 1975) plutôt qu'à l'action de glycosidases (KEENAN & MORRE, 1973; SIDDIQUI *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 1982).

b - Une néosynthèse

La synthèse des nouveaux glycanes absents des cellules normales est réalisée par l'activation de glycosyltransférases spécifiques caractéristiques des cellules tumorales et absentes ou présentes en infime quantité dans les cellules normales correspondantes (PUKEL *et al.*, 1982; HAKOMORI & KANNAGI, 1983) (voir figures 1 et 2, p. 70 et 71).

c - Un passage de la synthèse de glycolipides d'une série à une autre série

Chaque type de cellule est caractérisé par un pourcentage déterminé des différentes séries glycolipidiques, proportion modifiée dans les cellules tumorales (KANNAGI *et al.*, 1983a,b).

La synthèse incomplète et la néosynthèse entraînent l'accumulation de marqueurs glucidiques (antigènes associés aux tumeurs) pouvant être caractérisés par des anticorps monoclonaux. Le tableau V, page 73 se propose d'illustrer quelques épitopes glycaniques de type

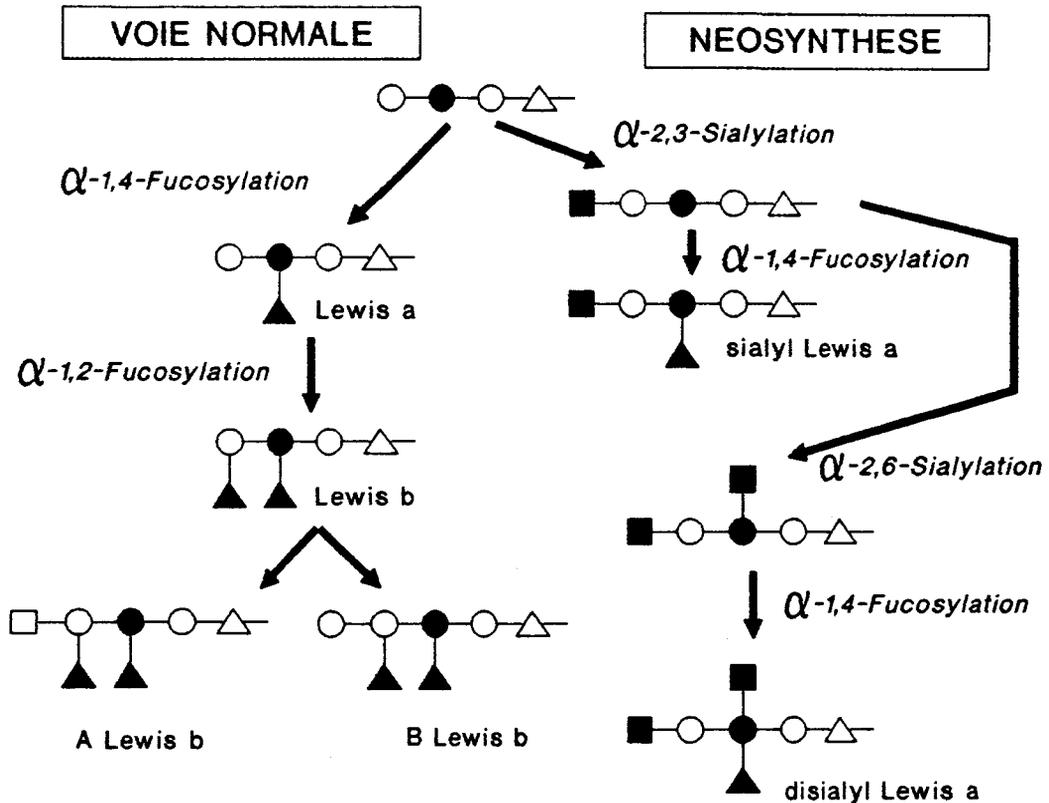


Figure 1 : Synthèse normale et néosynthèse des chaînes glycaniques de type 1 : Gal(β 1-3)GlcNAc- (d'après SINGHAL & HAKOMORI (1990))

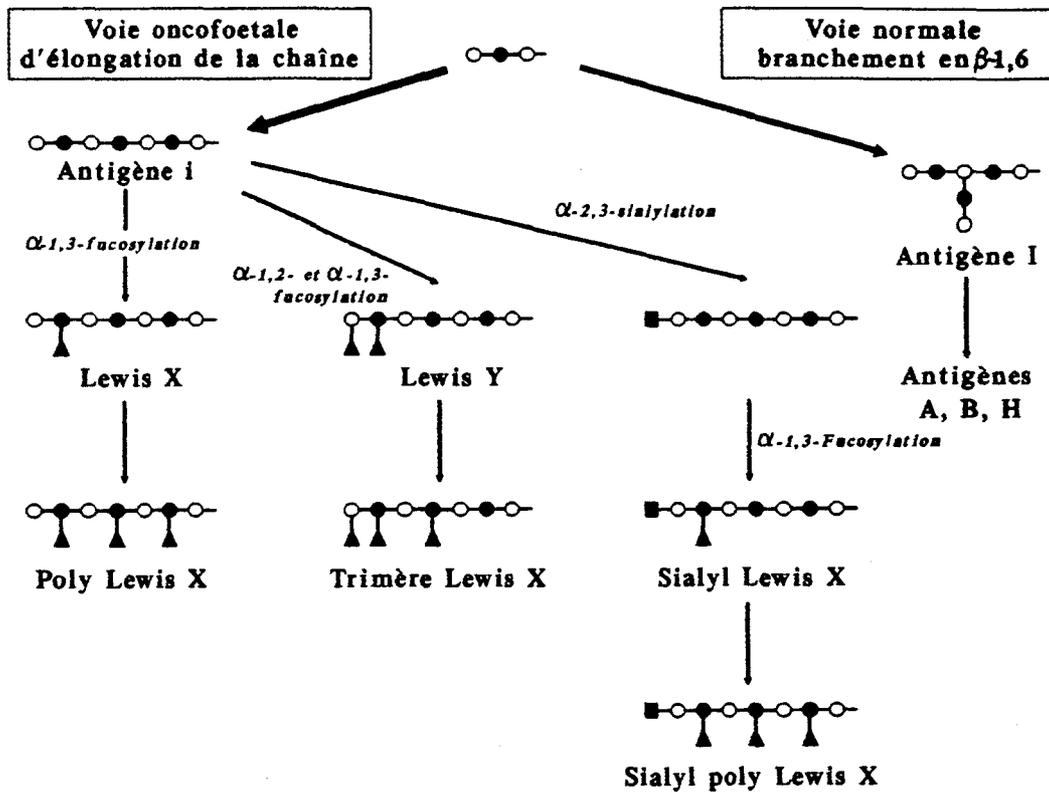


Figure 2 : Synthèse normale et néosynthèse des chaînes glycaniques de type 2 : Gal(β1-4)GlcNAc- (d'après SINGHAL & HAKOMORI (1990))

- galactose
- ▲ fucose
- N-acétylglucosamine
- acide N-acétylneuraminique

onco-foetal reconnus par des anticorps monoclonaux. Il convient de noter que bon nombre de ces séquences glycaniques porteront des épitopes antigéniques de type Le^a, Le^b, Le^x et Le^y préalablement décrits dans les tableaux IV et V pages 58 et 73. Nous illustrerons plus en détail ce chapitre des antigènes oncofoetaux à la lumière du travail que nous avons réalisé sur le pseudomyxome (tumeur gélatineuse abdominale) et qui sera traité en dernière partie de notre thèse.

2) Antigènes glucidiques onco-foetaux retrouvés dans le lait de Femme

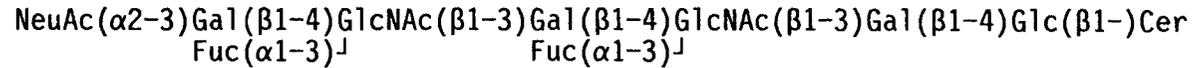
YAMASHITA *et al.* (1977b) ont caractérisé dans le lait de Femme le difucosyl *para*-lacto-N-néohexaose porteur du déterminant dimère Le^x décrit sous forme de glycolipide par HAKOMORI *et al.* (1984) dans divers adénocarcinomes humains et défini par l'anticorps monoclonal FH4 (FUKUSHI *et al.*, 1984a).

Plus récemment, au Laboratoire, dans le groupe de STRECKER, WIERUSZESKI *et al.* (1985) ont isolé et caractérisé le sialylfucopentaose I ou (sialyl Le^a), antigène décrit également dans divers adénocarcinomes humains (MAGNANI *et al.*, 1982). De la même façon, la copule oligosaccharidique du disialyllacto-N-tétraosylcéramide, décrite comme un antigène associé aux tumeurs par FUKUSHI *et al.* (1986) a également été caractérisée dans le lait de Femme sous forme d'oligosaccharide libre par GRIMMONPREZ & MONTREUIL (1968).

De plus, bien d'autres oligosaccharides porteurs des déterminants sialyl Le^a et Le^x ont été décrits dans le lait de Femme (se reporter au tableau II récapitulatif des oligosaccharides du lait de Femme, p. 31 à 47).

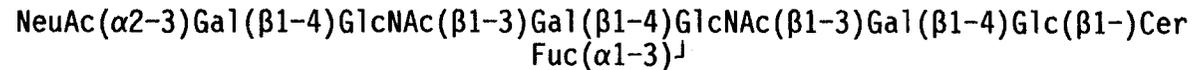
Tableau V : Quelques épitopes glycaniques "onco-foetaux" portés par des glycolipides

Fucoganglioside 6B



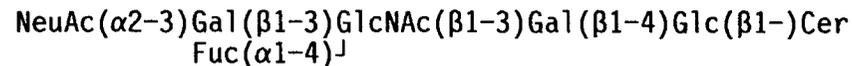
- > Accumulé dans les cancers du colon humains
- > Anticorps monoclonal spécifique : FH6
(FUKUSHI *et al.*, 1984b)

Fucoganglioside 6C



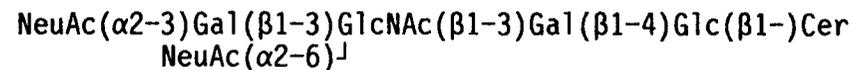
- > Accumulé dans les cancers du foie et du poumon humains
(HAKOMORI *et al.*, 1983)

Sialosyllactofucopentaosyl(II)céramide (Sialyl Le^a)



- > Accumulé dans les cancers du colon, du pancréas, de l'estomac et du poumon humains
(MAGNANI *et al.*, 1982; FALK *et al.*, 1983; ATKINSON *et al.*, 1982; FUKUSHIMA, 1991)
- > Anticorps monoclonaux spécifiques : NS 19-9, CSLEA1 et MSW113
(KOPROWSKI *et al.*, 1979; CHIA *et al.*, 1985; KITAGAWA *et al.*, 1988a)

Disialosyllacto-N-tétraosyl-céramide



- > Accumulé dans divers adénocarcinomes humains
- > Anticorps monoclonal spécifique : FH9
(FUKUSHI *et al.*, 1986)

TRAVAUX PERSONNELS

Dans ce chapitre, nous présenterons, dans un premier temps, l'étude structurale que nous avons réalisée sur les fractions oligosaccharidiques neutres et acides du lait de Femme. Les résultats de ces travaux sont rapportés dans trois articles, dont un soumis pour publication à *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Ensuite, nous exposerons les résultats de l'étude structurale que nous avons menée sur des oligosaccharide-alditols libérés par β -élimination d'une substance mucoïde provenant d'une tumeur du péritoine humain. Ceux-ci sont rapportés dans un article soumis pour publication à *Cancer Research*.

I - ETUDE STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES NEUTRES ET ACIDES ISOLES DU LAIT DE FEMME

Au Laboratoire, le lait de Femme fait depuis plusieurs années l'objet de nombreuses recherches. En effet, outre le lactose (55 grammes par litre) le lait de Femme renferme 8 à 10 grammes d'oligosaccharides libres par litre. Après les travaux de **MONTREUIL** et **KUHN** montrant l'hétérogénéité de cette fraction glucidique, de nombreux oligosaccharides neutres et acides ont été isolés et caractérisés. Ces glucides possèdent pour la plupart des structures en tous points identiques à la copule glucidique des glycoconjugués (glycolipides et glycoprotéines) des tissus de sécrétion et portent en particulier les déterminants antigéniques de groupe sanguin H, Le^a et Le^b. Cependant, de nombreux oligosaccharides présents en très faibles quantités restaient à caractériser.

L'évolution des techniques d'isolement, de purification (chromatographie d'affinité, chromatographie liquide haute performance) et de détermination structurale (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse) a donné un regain d'intérêt à l'étude des glucides libres du lait et a conduit différents groupes de recherche à s'intéresser aux constituants mineurs. Ainsi, quelques auteurs ont montré que ces oligosaccharides pouvaient présenter des structures identiques à celles de la copule glycanique de glycolipides ou de glycoprotéines présents à la surface des cellules tumorales, dans le sérum de certains patients atteints d'adénocarcinomes, ou encore dans les tissus foetaux (voir chapitre des généralités sur le lait de Femme).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressée à la recherche d'autres structures onco-foetales et à leur isolement à l'état pur afin d'en étudier la structure chimique et d'en établir les paramètres RMN du proton et du carbone. Nous allons donc présenter successivement les

études que nous avons réalisées sur les fractions oligosaccharidiques neutre et acide.

A - FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE NEUTRE

La fraction oligosaccharidique neutre du lait de Femme obtenue après chromatographie sur résine échangeuse d'anions (voir appendice technique) est soumise à une chromatographie sur papier de trois jours. Cette chromatographie permet d'éliminer les oligosaccharides de faible masse moléculaire qui sont quantitativement les plus importants. Ainsi, les oligosaccharides de masse moléculaire élevée, restés à l'origine lors de la première chromatographie, sont élués et soumis à une nouvelle chromatographie sur papier de 12 jours. Onze fractions sont ainsi obtenues (voir figure A, page 77).

Chacune de ces fractions, analysée par chromatographie liquide haute performance, se révèle très hétérogène. L'application de cette technique chromatographique aux fractions III, V, VI, VIII, X et XI, nous a permis :

- d'isoler et purifier de nombreux oligosaccharides,
- de réaliser une attribution complète des paramètres RMN de quelques oligosaccharides précédemment décrits dans la littérature,
- de caractériser 4 nouveaux oligosaccharides,
- d'isoler à l'état pur 2 octasaccharides précédemment caractérisés en mélange par YAMASHITA *et al.* (1977b), l'un d'eux ayant la particularité de posséder un déterminant de type onco-foetal,
- de décrire un nouveau "noyau" oligosaccharidique : le *para*-lacto-N-octaosé.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les 2 articles qui suivent cette brève introduction (le second étant soumis pour publication à *Archives of Biochemistry and Biophysics*).



Fig. A : Chromatographie sur papier des oligosaccharides neutres de haute masse moléculaire. Durée : 12 jours

Primary structure of four human milk octa-, nona-, and undeca-saccharides established by ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy

Gérard Strecker*, Sophie Fièvre, Jean-Michel Wieruszkeski, Jean-Claude Michalski, and Jean Montreuil

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. No 111), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq (France)

(Received August 19th, 1990; accepted in revised form July 21st, 1991)

ABSTRACT

The structures of two octasaccharides, one nonasaccharide, and one undecasaccharide, isolated from human milk, have been investigated by ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy. The structures of these oligosaccharides are: $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glc}$; $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glc}$; $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{6)-}\{\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)}\}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glc}$; and $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{6)-}[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glc}$. The two octasaccharides have been previously isolated from human milk as a mixture, and in a pure form from new-born feces, but the n.m.r. data were not provided. These two octasaccharides display the di-Lewis X and the composite Lewis A-Lewis X antigenic determinant, previously described as neo-antigens of adenocarcinoma cell lines.

INTRODUCTION

The combination of gel filtration, preparative paper chromatography, and high performance liquid chromatography on reverse-phase octadecyl column recently led us to characterize about 70 neutral human milk oligosaccharidic fractions¹. Despite the ability of h.p.l.c. to separate compounds having similar composition, numerous fractions remained heterogenous. Nevertheless, by recycling the material, we have been able to isolate new isomers. The present paper describes the isolation of four oligosaccharides and the assignment of most of their ^1H - and ^{13}C -n.m.r. parameters.

MATERIALS AND METHODS

Fractionation of milk oligosaccharides that led to the isolation of the so-called "Fractions V, VI, and VIII" has been previously described¹. The data of the n.m.r.

* Author for correspondence.

spectroscopy, f.a.b.-mass spectrometry, and methylation analysis have been published previously¹.

RESULTS

Isolation of the four oligosaccharides. — Fractions V, VI, and VIII, obtained by preparative paper chromatography¹, were respectively fractionated into 8, 3, and 17 peaks (Fig. 1) on a 5- μ m ODS Zorbax column (25 \times 0.95 cm), with water as eluent. Compounds V-1,2 and V-3,5 were recycled two times on the same column, until total purification. Finally, 17 mg of V-1,2, 6 mg of V-3,5, 112 mg of VI-2, and 5 mg of VIII-16,17 were obtained from 20 L of combined samples of milk. Two h.p.l.c. peaks were obtained for each oligosaccharide, which correspond to the β (first peak) and the α anomer (second peak) of the compound. The other fractions remained too heterogeneous for structural analysis.

Structure of compound V-1,2. — From the ¹H-n.m.r. spectrum of oligosaccharide V-1,2 (Fig. 2 and Table I), it could be concluded that it is an octasaccharide (I) containing two fucose units (δ 5.132 and 5.111), H-1, three galactose units (δ 4.464, H-1, 3.494, H-2; 4.442, H-1, 3.502, H-2; 4.432, H-1, 3.578, H-2), two 2-acetamido-2-deox-

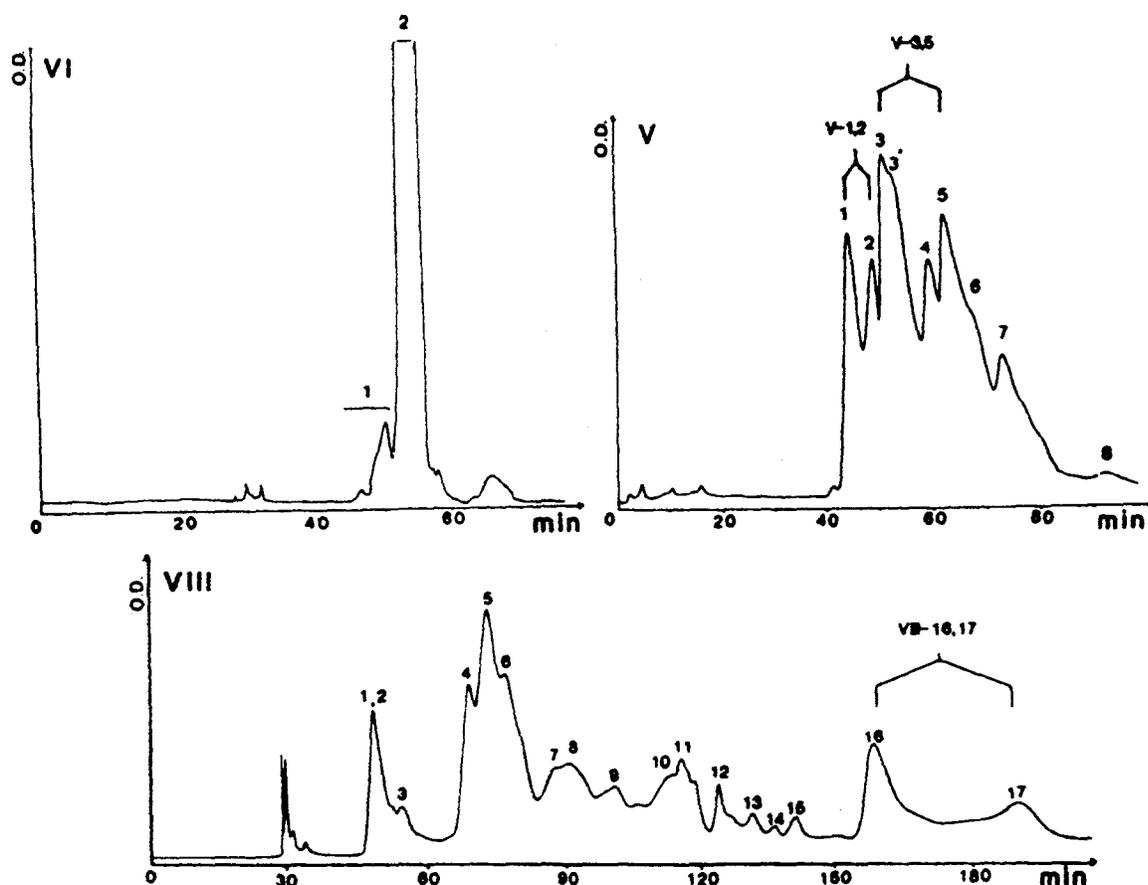


Fig. 1. H.p.l.c. chromatogram of Fractions V, VI, and VIII using a 5 μ m ODS Zorbax column (25 \times 0.95 cm) (Du Pont Instruments, Paris) with water as eluent; flow rate, 0.5 mL/min.

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES

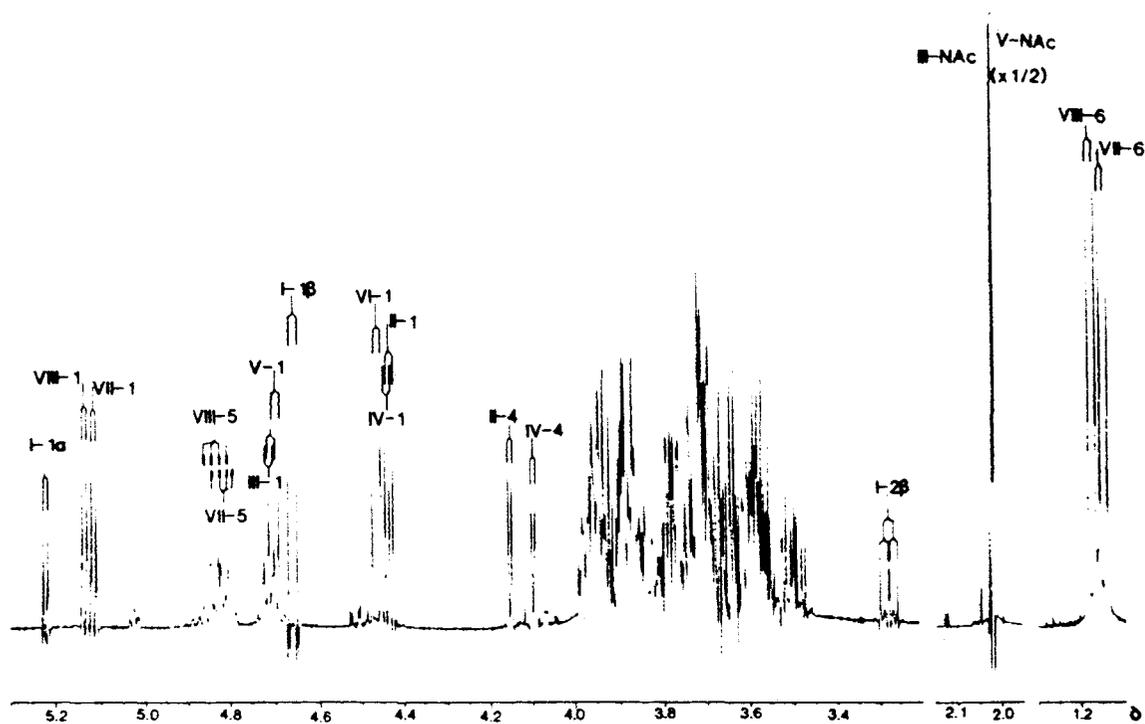


Fig. 2. 400-MHz ¹H-n.m.r. spectrum of compound V-1,2 (I).

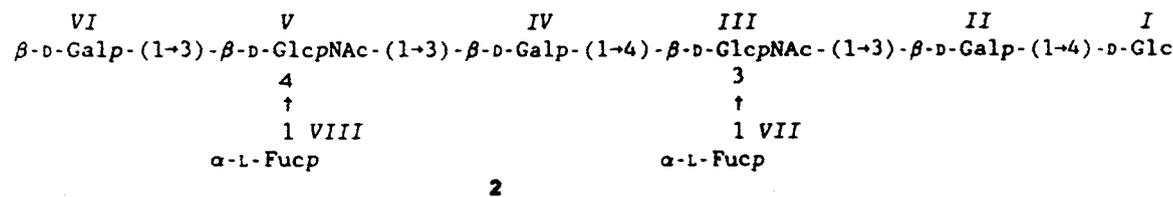
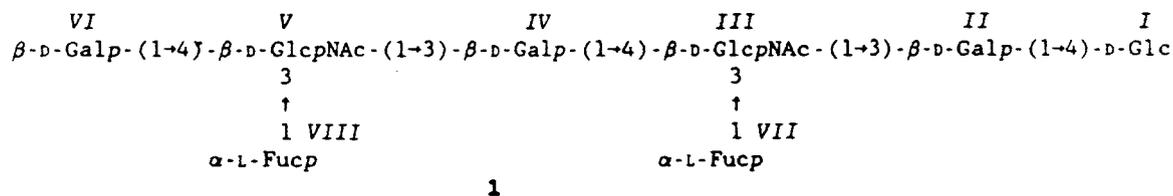
TABLE I

¹H- and ¹³C-n.m.r. data for compound V-1,2 (I)

Residue or group	Linkage	Chemical shift (δ)							
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NHCOCH ₃	
VI β-Gal	1→4	4.464	3.494	3.648	3.897	3.600	3.718		
VIII α-Fuc	1→3	5.132	3.687	3.906	3.788	4.835	1.175		
V β-GlcNAc	1→3	4.701	3.956	3.868	3.956	3.569	3.823	2.016	
							3.982		
IV β-Gal	1→3	4.442	3.502	3.700	4.097	3.587	3.718		
VII α-Fuc	1→3	5.111	3.687	3.882	3.770	4.812	1.147		
III β-GlcNAc	1→3	4.714(α)	3.956	3.868	3.938	3.569	3.823	2.020	
		4.711(β)					3.982		
II β-Gal	1→4	4.432	3.578	3.709	4.154	3.701	3.762		
I α-Glc		5.218	3.573	3.825	3.636	3.946	3.859		
I β-Glc		4.660	3.276	3.630	3.636	3.596	3.815		
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
VI β-Gal	1→4	103.04	72.35	73.77	69.65	76.21	62.81		
VIII α-Fuc	1→3	99.99	69.00	70.48	73.21	67.99	16.59		
V β-GlcNAc	1→3	103.79	57.26	76.05	74.32	76.38	60.94	175.97	23.57
IV β-Gal	1→4	103.04	71.82	82.92	69.55	75.74	62.76		
VII α-Fuc	1→3	99.87	68.94	70.48	73.16	67.99	16.63		
III β-GlcNAc	1→3	103.79	57.26	76.05	74.08	76.40	60.94	175.91	23.57
II β-Gal	1→4	104.22(α)	71.03	83.35	69.65	76.16	62.27		
		71.27(β)							
I α-Glc		93.11	72.43	72.70	79.67	71.42	61.24		
I β-Glc		97.02	75.08	75.65	79.55	76.10	61.38		

yglucose units (δ 4.701, H-1, 3.956, H-2; 4.711, H-1, 3.956, H-2), and one glucose unit (δ 5.218, H-1 α , 4.460, H-1 β).

The H-1, H-5, and H-6 resonances of the two L-fucosyl groups are characteristic for α -L-(1 \rightarrow 3)-linked residues and consequently, the octasaccharide displays two Lewis X determinants. In addition, the presence of two galactose H-4 signals, deshielded at δ 4.097 and 4.154, respectively, showed that the compound contains two galactose units substituted at O-3, allowing the definition of oligosaccharide **1** as a linear structure. The value of the Gal^{II} H-4 resonance is remarkably constant in the series of lactose-containing milk oligosaccharides previously analyzed by ¹H-n.m.r. spectroscopy (δ 4.12–4.15)^{2,3}, and this well-known parameter allowed us to establish the H-1 and H-4 resonances of Gal^{II} and Gal^V through a COSYDR spectrum, and the Gal^{II} H-4 signal, which occurred at δ 3.897, was correlated with the corresponding H-1 β resonance at δ 4.464. The anomeric protons of the two 2-acetamido-2-deoxyglucose units were distinguished on the previous observations²⁻⁵ that the anomerization effect affects the H-1 signal of GlcNAc^{III} owing to the spatial proximity of this H-1 to the reducing end of the oligosaccharide. The GlcNAc^{III} H-1 resonance was also deduced from a comparison of the spectrum with that of compound V-3,5 (Table I). Concerning the fucosyl groups, one of the H-1 resonance (δ 5.111) was absolutely identical to that observed for the α -L-fucosyl group (1 \rightarrow 3)-linked to GlcNAc^{III} in oligosaccharides bearing the X determinant^{1,4,5} (see also below compound V-3,5). Consequently, the n.m.r. parameters of the two L-fucosyl groups VII and VIII (see Fig. 2) could be ascribed without ambiguity. According to this ¹H-n.m.r. spectroscopy analysis, the structure of V-1,2 was established as **1**.



The ¹H-¹³C COSY spectrum of compound V-1,2 (Fig. 3) showed all the ¹H- and ¹³C-n.m.r. resonances of the compound, which are reported in Table I. This structure was confirmed by f.a.b.-m.s. (Fig. 4), which showed a pseudomolecular ion (M + 1) at *m/z* 1701. The primary-sequence ion (*m/z* 1261) and the secondary ion (*m/z* 1055) arising by preferential elimination of the substituent at O-3 of the 2-acetamido-2-deoxyglucose unit indicated that GlcNAc^{III} was substituted at O-3 by a fucosyl group. The other ions

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES

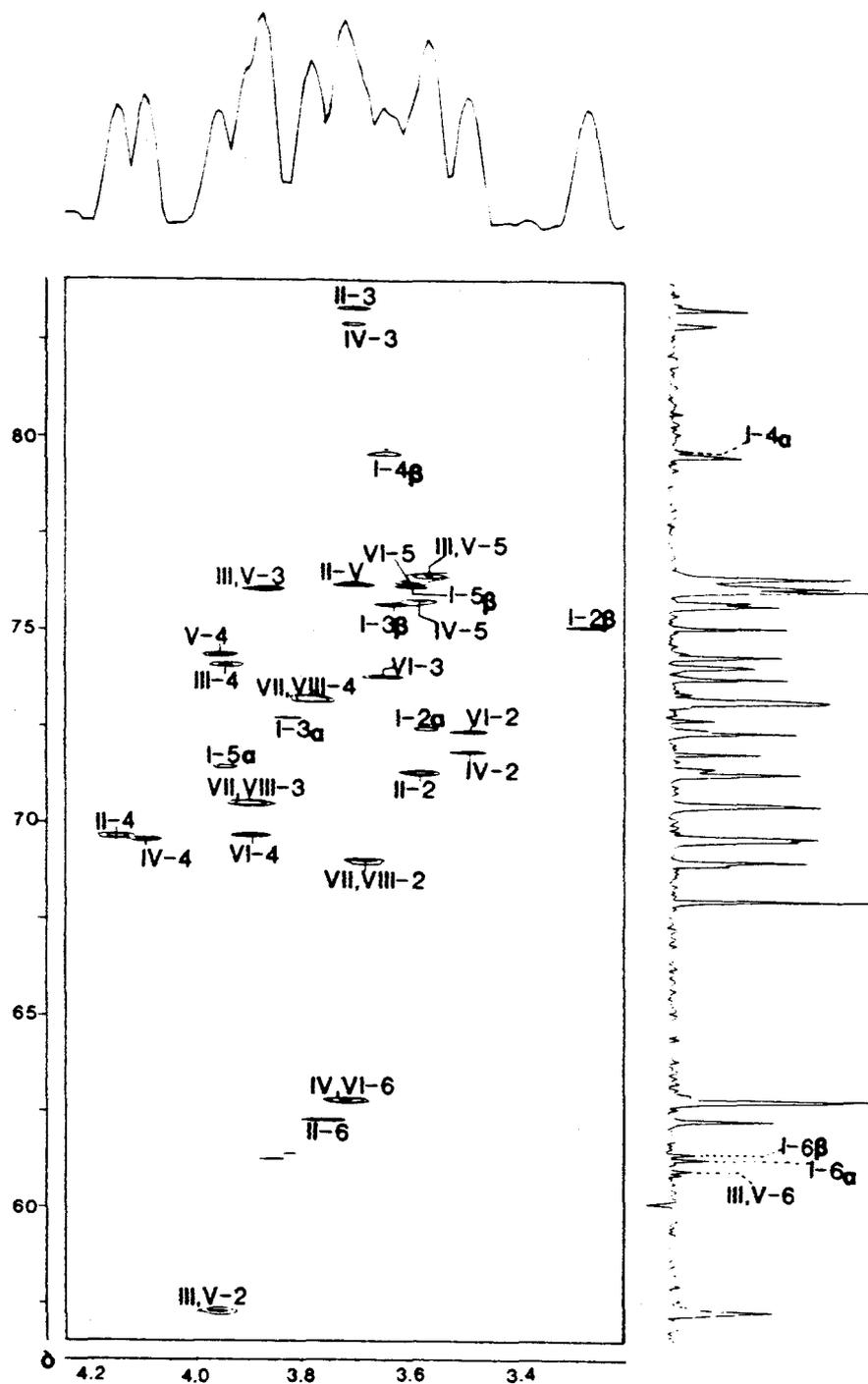


Fig. 3. Heteronuclear-correlated n.m.r. spectrum of compound V-1,2 (I).

having m/z 638 and 432 indicated the sequence, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)]- α -D-GlcpNAc. The partially methylated and acetylated methyl glycosides obtained by methanolysis of the permethylated compound are listed in Table II. Therefore, the structure deduced by ^1H - and ^{13}C -n.m.r. analysis was fully confirmed by f.a.b.-m.s. and methylation analysis.

TABLE II

Partially methylated methyl glycoside acetates obtained from the methanolyzates of permethylated milk oligosaccharides

Sugar derivative	Compound			
	V-1,2 (1)	V-3,5 (2)	VI-2 (3)	VIII-16,17 (4)
2,3,4-Me ₃ -Fuc	1.8	1.7	2.6	2.6
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	0.9	0.9	0.9	0
2,4,6-Me ₃ -Gal	2.0 ^a	2.0 ^a	0	1 ^a
3,4,6-Me ₃ -Gal	0	0	1 ^a	2.1
2,4-Me ₂ -Gal	0	0	1.1	0.9
2,3,6-Me ₃ -Glc	0.9	0.9	0.9	0.9
4,6-Me ₂ -GlcN(Me)Ac	0	0	0	1.8
6-Me-GlcN(Me)Ac	0.7	0.8	0.8	0.8

^a Values taken as basis of calculation. The response factors were obtained by methylation analysis of known milk oligosaccharides.

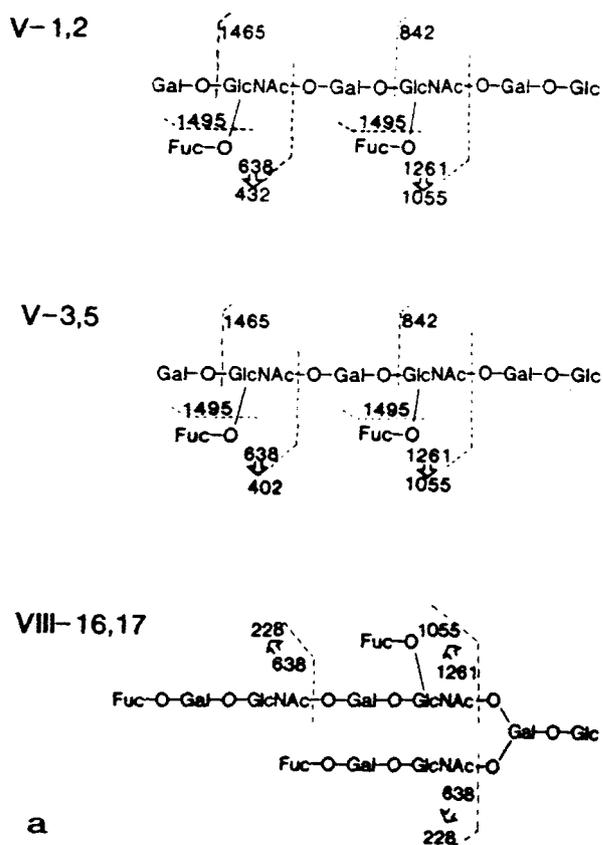
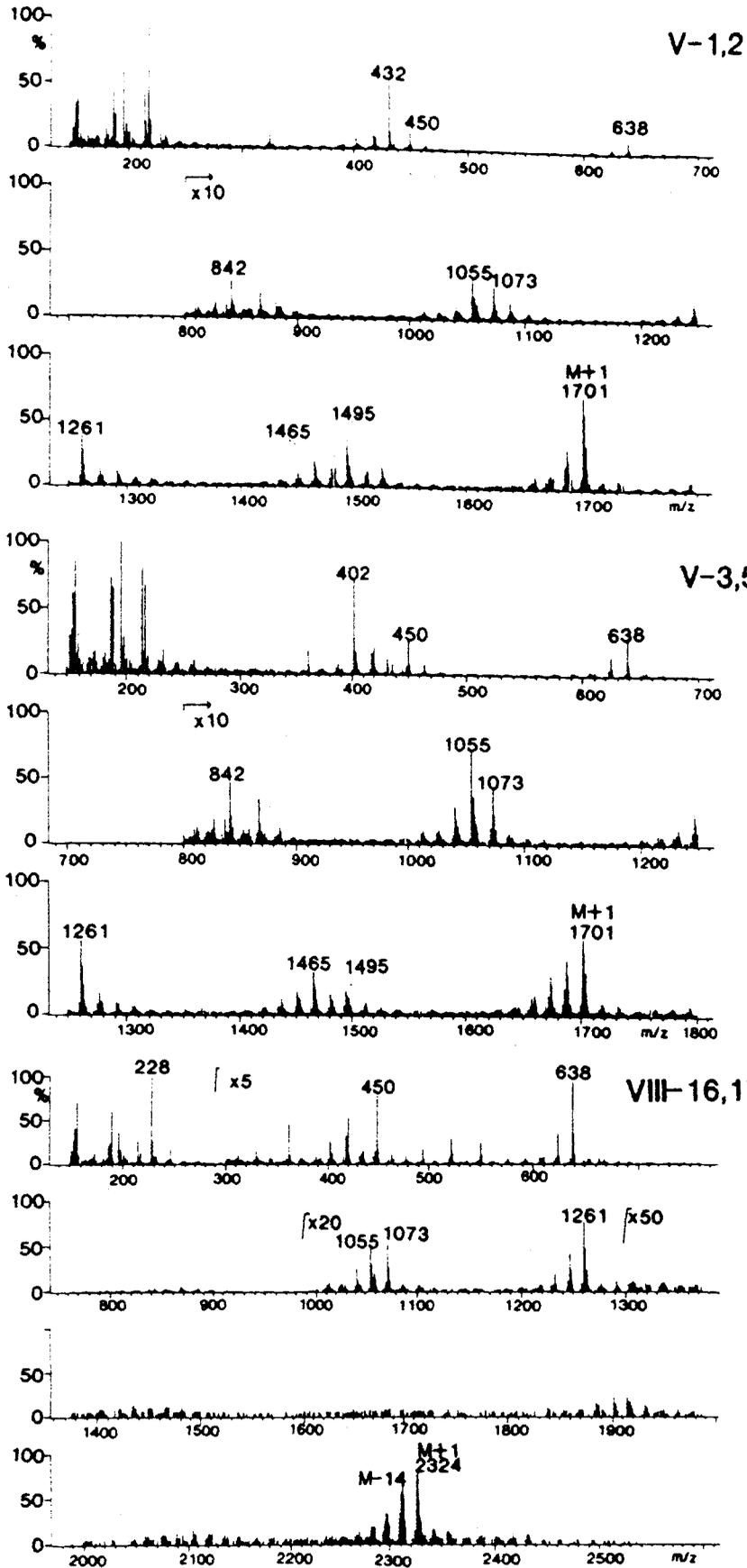


Fig. 4. (a and b) F.a.b.-m.s. of compounds V-1,2 (1), V-3,5 (2), and VIII-16,17 (4).

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES



b

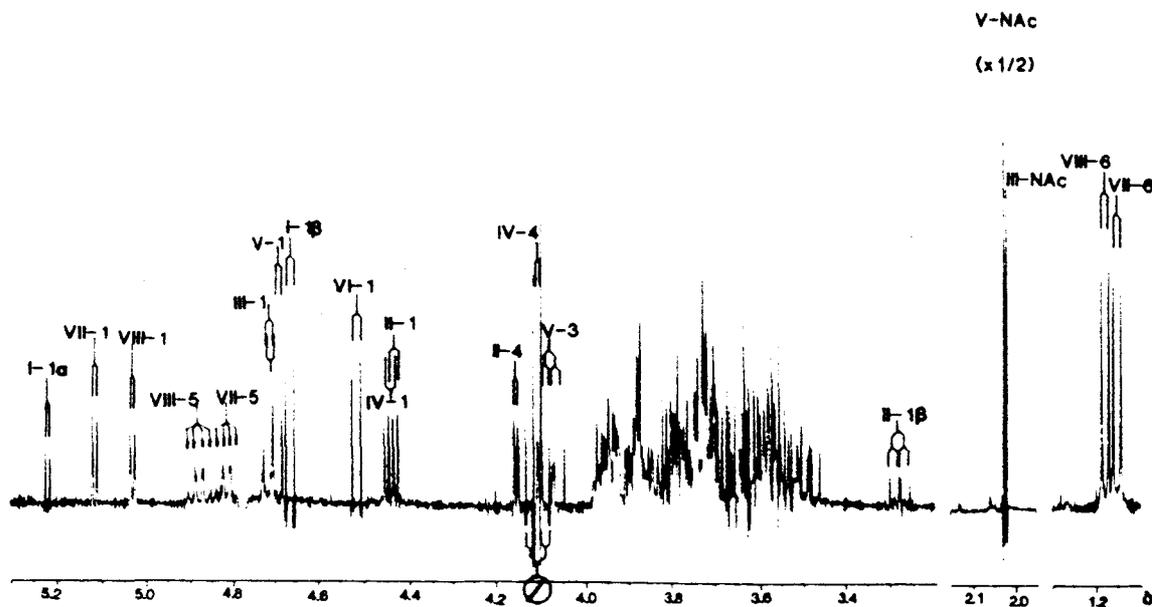


Fig. 5. 400-MHz ¹H-n.m.r. spectrum of compound V-3.5 (2).

TABLE III

¹H- and ¹³C-n.m.r. data for compound V-3.5 (2)

Residue or group	Linkage	Chemical shifts (δ)							
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NHCOCH ₃	
VI β-Gal	1→3	4.512	3.482	3.616	3.874	^a	^a		
VIII α-Fuc	1→4	5.026	3.796	3.884	3.788	4.875	1.178		
V β-GlcNAc	1→3	4.691	3.946	4.070	3.946	^a	^a	2.027	
IV β-Gal	1→4	4.443	3.511	3.704	4.098	^a	^a		
VII α-Fuc	1→3	5.112	3.686	3.886	3.783	4.811	1.152		
II β-GlcNAc	1→3	4.718(α) 4.713(β)	3.941	3.866	3.941	^a	^a	2.020	
II β-Gal	1→4	4.433	3.574	3.700	4.150	^a	^a		
I α-Glc		5.218	3.572	3.832	3.636	^a	^a		
I β-Glc		4.660	3.277	3.654	3.654	^a	^a		
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
VI β-Gal	1→3	104.29	71.92	73.74	69.77	75.88	63.07		
VIII α-Fuc	1→4	99.41	69.22	70.56	73.37	68.26	16.80		
V β-GlcNAc	1→3	103.96	57.41	77.35	73.53	76.61	61.04	176.09	23.72
IV β-Gal	1→4	103.14	71.92	83.46	69.77	75.76	62.87		
VII α-Fuc	1→3	100.88	69.08	70.61	73.28	68.10	16.72		
III β-GlcNAc	1→3	104.34	57.29	76.16	74.25	76.27	61.08	176.09	23.09
II β-Gal	1→4	104.23	71.39	83.09	69.64	75.76	62.38		
I α-Glc		93.22	72.37	72.55	79.80	71.53	61.38		
I β-Glc		97.14	75.06	75.21	79.69	75.16	61.51		

^a Not determined.

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES

Structure of compound V-3,5. — The ^1H -n.m.r. spectrum of compound V-3,5 (Fig. 5) indicated the presence of two fucose, three galactose, two 2-acetamido-2-deoxyglucose, and one glucose units. The H-1, H-5, and H-6 resonances of the α -L-fucosyl groups showed that they are (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 4) linked. The H-1 and H-4 resonances of Gal'' could be easily identified owing to the characteristic chemical shift values (see above for compound V-1,2). The second Gal H-4 signal at δ 4.098 is significant for another

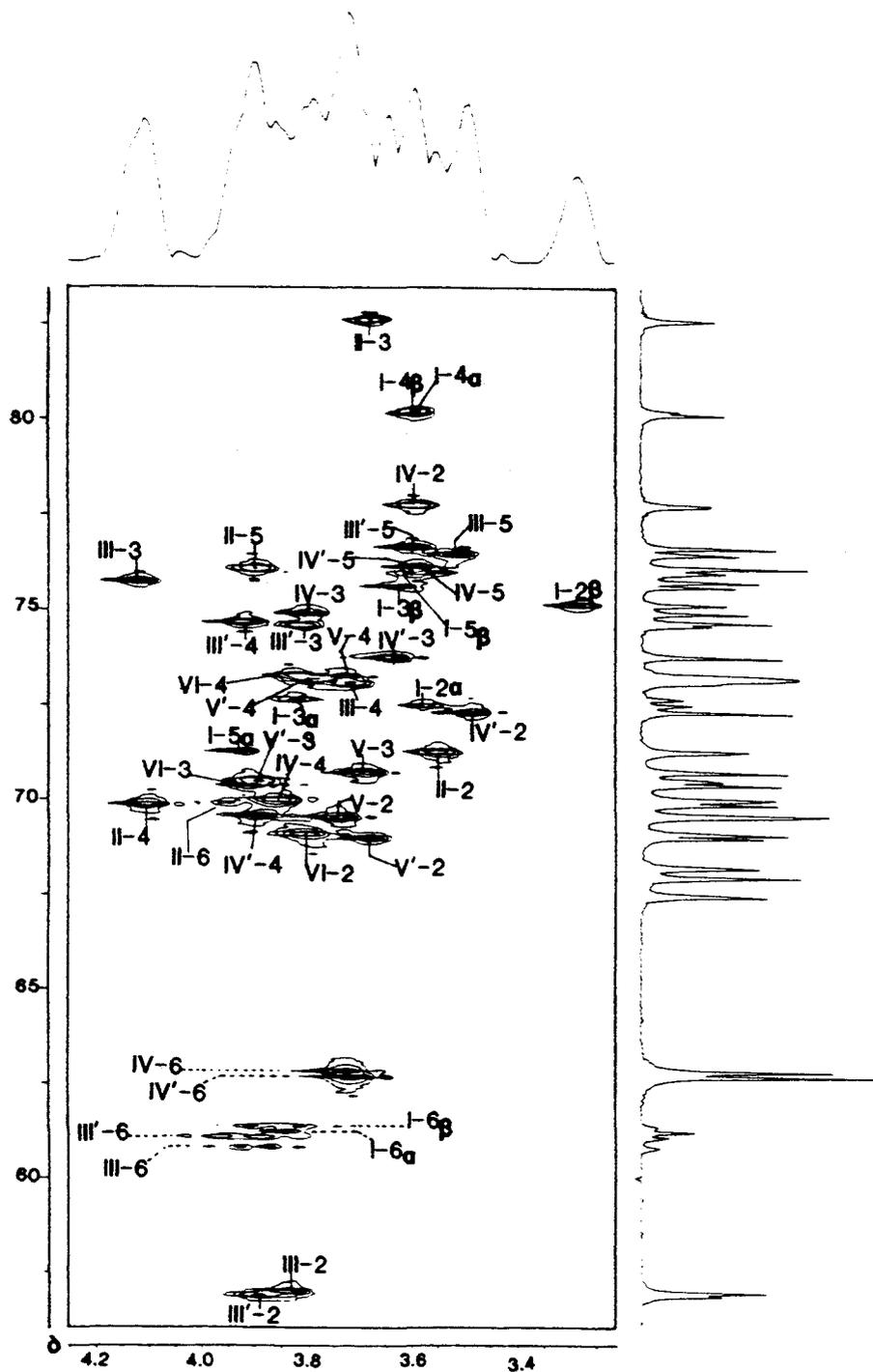


Fig. 6. Heteronuclear-correlated n.m.r. spectrum of compound VI-2 (2).

O-3-substituted galactose unit (Gal^{IV}). Consequently, compound V-3,5 also possesses a linear structure. The H-1 signal of GlcNAc^{III} is affected by the anomerization effect, which allowed us to distinguish this unit from GlcNAc^V. The H-3 signal of GlcNAc^V is deshielded at δ 4.070, thus confirming the substitution at C-4 by a fucosyl group (Le^a determinant)⁵. On the basis of these results, the structure of compound V-3,5 was established as 2, which harbors the Le^a-Le^x hybride determinant.

The ¹³C-n.m.r. parameters of compound V-3,5 are listed in Table III. As shown in Fig. 4b, the f.a.b.-m.s. spectrum confirmed this structure; it indicated, *inter alia*, the position of the two fucosyl groups, respectively linked to O-3 of GlcNAc^{III} (*m/z* 1261 \rightarrow 1055) and to O-4 of GlcNAc^V (*m/z* 638 \rightarrow 402).

Structure of compound VI-2. — Compound VI-2 was previously isolated from the paper chromatogram of Fraction VII, in an amount too low to obtain meaningful

TABLE IV

¹H- and ¹³C-n.m.r. data for compound VI-2 (3)

Residue or group	Linkage	Chemical shift (δ)							NHCOCH ₃	
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6			
IV' β -Gal	1 \rightarrow 4	4.446	3.489	3.642	3.888	3.590	3.721			
V' α -Fuc	1 \rightarrow 3	5.097	3.678	3.897	3.783	4.828	1.170			
III' β -GlcNAc	1 \rightarrow 6	4.630	3.897	3.812	3.923	3.598	3.844(6a) 4.003(6b)	2.044(α) 2.049(β)		
V α -Fuc	1 \rightarrow 2	5.145	3.748	3.686	3.739	4.335	1.270			
IV β -Gal	1 \rightarrow 3	4.651	3.598	3.801	3.853	3.555	3.730			
VI α -Fuc	1 \rightarrow 4	5.024	3.801	3.915	3.818	4.863	1.254			
III β -GlcNAc	1 \rightarrow 3	4.598(α) 4.594(β)	3.836	4.123	3.725	3.511	3.844(6a) 3.959(6b)	2.055		
II β -Gal	1 \rightarrow 4	4.403	3.546	3.686	4.114	3.897	3.94(6a) (6b) ^a			
I α -Glc		5.215	3.851	3.818	3.598	3.932	3.844			
I β -Glc		4.661	3.284	3.634	3.598	3.598	3.774(6a) 3.941(6b)			
			C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
IV' β -Gal	1 \rightarrow 4	103.10	72.29	73.71	69.60	76.16	62.76			
V' α -Fuc	1 \rightarrow 3	99.89	68.97	70.48	73.17	67.99	16.61			
III' β -GlcNAc	1 \rightarrow 6	102.07	56.92	74.61	74.61	76.63	61.04	175.51	23.78(α) 23.80(β)	
V α -Fuc	1 \rightarrow 2	100.81	69.53	70.70	73.24	67.51	16.61			
IV β -Gal	1 \rightarrow 3	101.88	77.74	74.88	70.00	76.01	62.87			
V α -Fuc	1 \rightarrow 4	99.03	69.06	70.36	73.24	68.29	16.66			
III β -GlcNAc	1 \rightarrow 3	104.45	57.00	75.73	73.02	76.43	60.73	175.38	23.46	
II β -Gal	1 \rightarrow 4	104.32	71.28	82.56	69.93	76.10(α) 76.13(β)	69.95			
I α -Glc		93.05	72.46	72.65	80.18	71.28	61.18			
I β -Glc		96.95	75.12	75.61	80.09	76.01	61.31			

^a Not determined.

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES

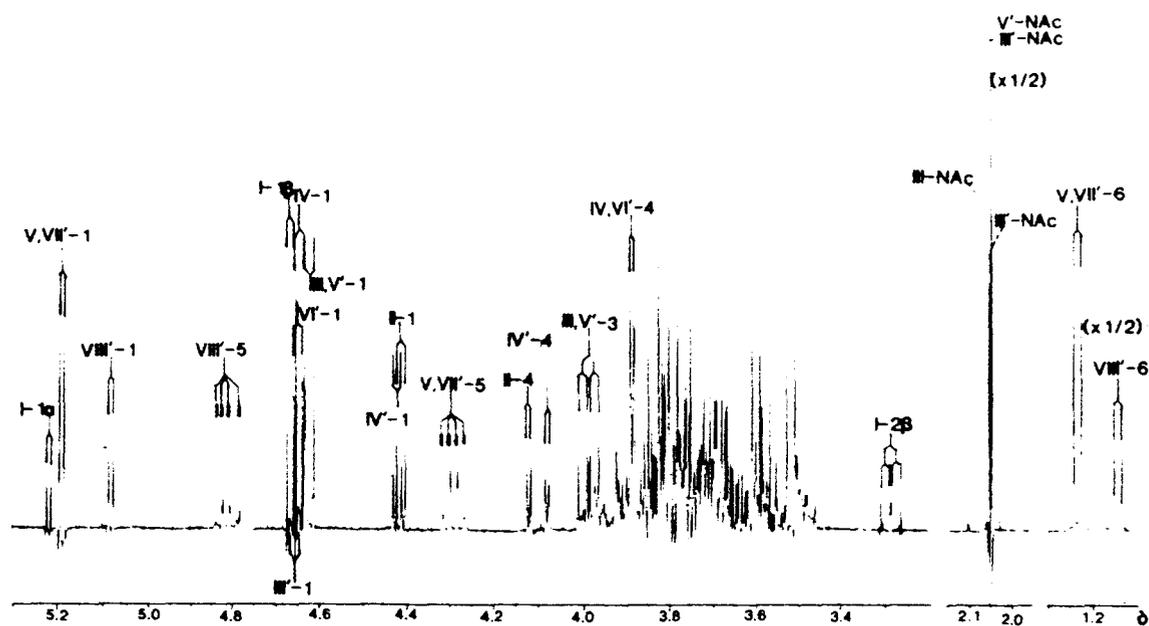
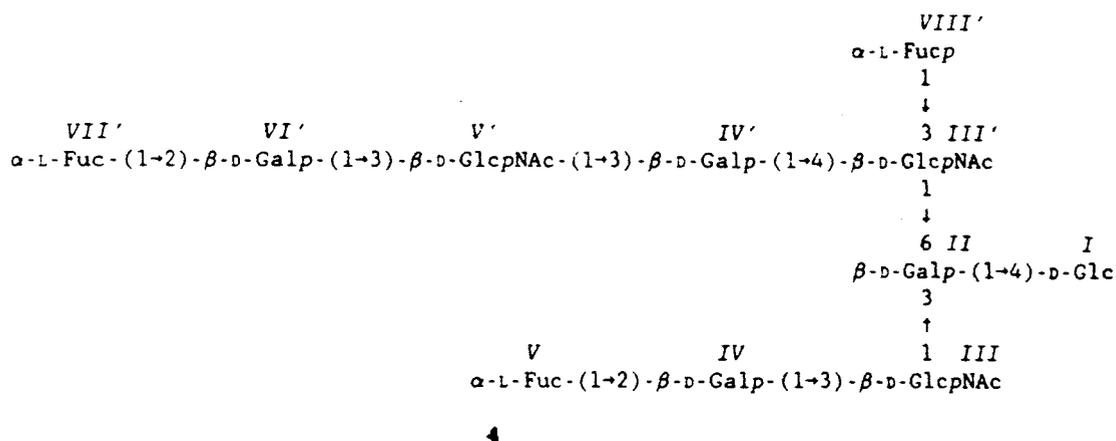
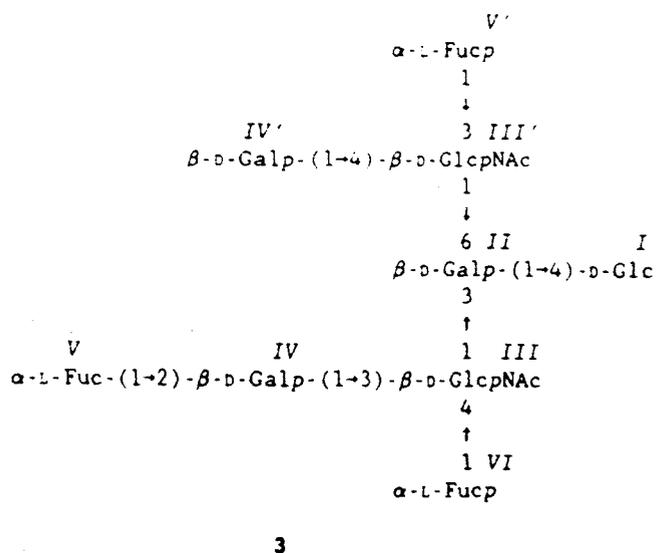


Fig. 7. 400-MHz ^1H -n.m.r. spectrum of compound VIII-16,17 (4).

^{13}C -n.m.r. data⁴. Its isolation in an higher amount from Fraction VI allowed us to fully assign the ^1H - and ^{13}C -n.m.r. parameters (Fig. 6 and Table IV), which correspond to structure 3.

Structure of compound VIII-16,17. — Compound VIII-16,17 contains three fucose, four galactose, three 2-acetamido-2-deoxyglucose, and one glucose units according to the 1D ^1H -n.m.r. spectrum (see Fig. 7). Two fucosyl groups are linked to O-2 of a galactose unit (H determinant), and one to O-3 of a 2-acetamido-2-deoxyglucose units (Le^x determinant), as shown by the chemical shift values of H-1, H-5, and H-6 (Table V), and the relative intensity of these signals. The ^1H -n.m.r. COSY spectrum showed that H-3 atoms of both $\text{GlcNAc}^{\text{III}}$ and GlcNAc^{V} are deshielded and possess the same chemical shift value (δ 3.987), which is characteristic of a 2-acetamido-2-deoxyglucose unit substituted at O-3 by a galactose unit. The third $\text{GlcNAc}^{\text{III}}$ residue is substituted with an (1 \rightarrow 3)-linked α -L-fucosyl group and displays the ^1H -n.m.r. parameters of a (1 \rightarrow 6)-linked β -D-GlcNAc unit, observed in similar oligosaccharides^{4,7}. The two H-4 resonances for Gal^{II} (δ 4.118) and Gal^{IV} (δ 4.078) are indicative of a galactose unit substituted at O-3, one of them being characteristic of the Gal^{II} unit of lactose^{4,7}. The ^1H -n.m.r. parameters of Gal^{IV} and $\text{GlcNAc}^{\text{III}}$ are identical to those observed for $\text{IV}^2\text{FucLnOse}_4$ (ref. 5) and, consequently, were attributed to the sugar unit of the (1 \rightarrow 3) branch. Finally, the oligosaccharide contains two α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3) units as chain terminals, associated with the inner Le^x determinant, R-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 6). Therefore, the structure of compound VIII-16,17 could be established as 4.



The ¹H- and ¹³C-n.m.r. signals of compound VIII-16,17 were assigned by use of DEPT, multistep ¹H-¹H COSY, and ¹H-¹³C COSY experiments (Table IV). The structure was confirmed by f.a.b.-mass spectrometry, which gave primary fragments having *m/z* 1261 and 638 (Fig. 4), together with the pseudomolecular ion (M + 1) at *m/z* 2324.

DISCUSSION

Milk oligosaccharides V-1,2 (V³FucIII³FucpLc₆) and V-3,5 (V⁴FucIII³FucpnLc₆) have been previously characterized as a mixture⁶, and more recently compound V-3,5 was isolated from feces of preterm infants fed on breast milk⁷. Compound VI-2 (III³FucIV²FucIII⁴FucLc₆) has also been described^{4,8}, but its ¹H- and ¹³C-n.m.r. signals are fully assigned in the present work. Compound VIII-16,17 (VI²FucIII³FucIV²FucLc₈) is a novel milk oligosaccharide.

HUMAN MILK OCTA-, NONA-, AND UNDECA-SACCHARIDES

TABLE V

¹H- and ¹³C-n.m.r. data for compound VIII-16.17 (4)

Residue or group	Linkage	Chemical shift (δ)								
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	NHCOCH ₃	
α-Fuc ^a	1→2	5.186	3.772	3.656	3.729	4.288	1.232			
VI'β-Gal	1→3	4.647	3.587	3.83	3.886	^a	^a	^a		
V'β-GlcNAc	1→3	4.620	3.80	3.987	3.527	3.52	3.78	3.90	2.046	
IV'β-Gal	1→4	4.419	3.480	3.707	4.078	^a	^a	^a		
VIII'α-Fuc	1→3	5.080	3.690	3.875	3.768	4.811	1.144			
III'β-GlcNAc	1→6	4.655	^b	^b	^a	^a	^a	^a	2.046(α) 2.049(β)	
α-Fuc ^a	1→2	5.186	3.772	3.656	3.729	4.288	1.232			
IV β-Gal	1→3	4.642	3.587	3.83	3.886	^a	^a			
III β-GlcNAc	1→3	4.623(α) 4.620(β)	3.80	3.987	3.527	3.52	3.78	3.90	2.052	
II β-Gal	1→4	4.411	3.553	3.707	4.118	3.84	^a	^a		
I α-Glc		5.215	3.583	3.832	3.636	^a	^a	^a		
I β-Glc		4.662	3.286	3.630	3.60	^a	^a	^a		
			C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
α-Fuc ^a	1→2	100.76	69.24	70.71	73.13	67.73	16.51 ^c			
VI'β-Gal	1→3	101.51	77.90	74.77	70.39	76.34	62.38			
V'β-GlcNAc	1→3	104.43	56.23	78.50	69.74	76.48	61.72	175.42	23.43	
IV'β-Gal	1→4	103.04	72.04	82.50	69.74	75.63	62.67			
VIII'α-Fuc	1→3	100.02	68.91	70.48	73.31	67.95	16.57			
III'β-GlcNAc	1→6	102.02	56.96	74.67(α) 74.61(β)	74.23	75.63	61.07	175.55	23.73(α) 23.76(β)	
α-Fuc ^a	1→2	100.76	69.33	70.71	73.13	67.73	16.54 ^c			
IV β-Gal	1→3	101.51	77.90	74.77	70.39	76.34	62.38			
III β-GlcNAc	1→3	104.43	56.28	78.50	69.88	76.55	61.72	175.42	23.43	
II β-Gal	1→4	104.32	71.31	82.58	69.74	76.19	69.92			
I α-Glc		93.07	72.47	72.66	80.25	71.28	61.22			
I β-Glc		96.77	75.13	75.63	80.18	75.98	61.36			

^a VII'Fuc or V'Fuc. ^b Not determined. ^c These values may be interchanged.

Oligosaccharide V-1,2 displays the dimeric Lewis X determinant, previously found in glycolipids isolated from human colonic and liver adenocarcinoma⁹. A rat monoclonal antibody against this oligosaccharide (624 H 12) was recently found to detect the presence of lung cancer two years prior to its detection by conventional diagnostic techniques^{10,11}. The chemical synthesis of the dimeric Lewis X hexasaccharide has been also achieved¹².

Oligosaccharide V-3,5 (Lewis A-Lewis X hybrid determinant) corresponds to the carbohydrate structure recognized by the mouse monoclonal antibody ST-421, which is highly specific for human stomach adenocarcinoma¹³. These tumor-associated carbohydrate structures can only be obtained in small amounts from tumor cells. Although they are generally absent, or present in undetectable levels in normal cells, they are easily obtainable as free oligosaccharides from human milk and thus, can be used for further immunological experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported, in part, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte No 111: "Relations structure-fonction des constituants membranaires"; Director: Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, and by the Ministère de l'Éducation Nationale.

The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord Pas-de-Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Éducation Nationale, and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400-MHz n.m.r. instrument. They are indebted to Miss Catherine Alonso (C.N.R.S. technician) for her skilful technical assistance and to Mr. Jérôme Lemoine for the mass spectrometric analyses. They thank Prof. P. Maubois (I.N.R.A. Rennes) and Dr. V. Barrois (Lactarium, Paris) for providing human milk samples.

REFERENCES

- 1 G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. C. Michalski, and J. Montreuil, *Glycoconjugate J.*, 5 (1988) 385-396.
- 2 S. Sabesan and J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 2068-2080.
- 3 G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. C. Michalski, and J. Montreuil, *Glycoconjugate J.*, 6 (1989) 67-83.
- 4 G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. C. Michalski, and J. Montreuil, *Glycoconjugate J.*, 6 (1989) 169-182.
- 5 J. Breg, D. Romijn, J. F. G. Vliegthart, G. Strecker, and J. Montreuil, *Carbohydr. Res.*, 183 (1988) 19-34.
- 6 K. Yamashita, Y. Tachibana, and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 5408-5411.
- 7 H. Sabharwal, B. Nilsson, G. Grönberg, M. A. Chester, J. Dakour, S. Sjöblad, and A. Lundblad, *Arch. Biochem. Biophys.*, 265 (1988) 390-406.
- 8 H. Sabharwal, B. Nilsson, M. A. Chester, F. Lindh, G. Grönberg, S. Sjöblad, and A. Lundblad, *Carbohydr. Res.*, 178 (1988) 145-154.
- 9 S. Hakomori, E. Nudelman, S. B. Lavery, and R. Kannagi, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 4672-4680.
- 10 M. Kyogashima, J. Mulshine, R. I. Linnoila, S. Jensen, J. L. Magnani, E. Nudelman, S. Hakomori, and V. Ginsburg, *Arch. Biochem. Biophys.*, 275 (1989) 309-314.
- 11 M. S. Tockman, P. K. Gupta, J. D. Myers, J. K. Frost, S. B. Baylin, E. B. Gold, A. M. Chase, P. H. Wilkinson, J. L. Mulshine, *J. Clin. Oncol.*, 6 (1988) 1685-1693.
- 12 M. Nilsson and T. Norberg, *Carbohydr. Res.*, 183 (1988) 71-82.
- 13 M. R. Stroud, E. Nudelman, S. B. Lavery, M. E. K. Salyan, M. Watanabe, S. Hirohashi, and S. Hakomori, *Xth Int. Symp. Glycoconjugates, Abstr.*, (1989) 263-264.

Primary structure of human milk octa-, dodeca- and tridecasaccharides determined by a combination of ^1H -Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and Fast Atom Bombardment Mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the *para*-lacto-N-octaose.

Sophie HAEUW-FIEVRE, Jean-Michel WIERUSZESKI, Yves PLANCKE, Jean-Claude MICHALSKI, Jean MONTREUIL and Gérard STRECKER

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'ascq (FRANCE)

Correspondence to : Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte du C.N.R.S. n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

Submitted to *Archives of Biochemistry and Biophysics*

SUMMARY

Two octasaccharides, two dodecasaccharides and a tridecasaccharide have been isolated from human milk by combination of paper chromatography, high performance liquid chromatography and high performance anion exchange chromatography. Their structural analysis investigated by 400 MHz ^1H -, ^{13}C -NMR spectroscopy and by mass spectrometry led to the following structures : Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6){Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)}Gal(β 1-4)Glc; Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6){Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)}Gal(β 1-4)Glc; Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc; Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6){Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)}Gal(β 1-4)Glc; Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6){Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)}Gal(β 1-4)Glc. The two octasaccharides have been previously characterized in human milk, and the complete assignment of the ^1H and ^{13}C spectra is here reported. One of the dodecasaccharides is a tetrafucoyl derivative with a new core : *para*-lacto-N-octaose. The two others oligosaccharides are respectively tetra- and pentaflucoyl derivatives of *iso*-lacto-N-octaose. These oligosaccharides display simultaneously Lewis^b and Lewis^x determinants or Lewis^a, Lewis^b and Lewis^x determinants.

INTRODUCTION

Human milk is an abundant source of oligosaccharides which have structural homologies with glycoprotein and glycolipid glycans [1-3]. The secretor and Lewis phenotypes of the lactating woman determine the structure of the periphery of these carbohydrate chains, which were used to characterize the Le^a and Le^b blood group determinants [4]. In order to decrease the complexity of the mixtures of oligosaccharides, the studies were often carried out on milks from women of the non-secretor phenotype [5]. Recent advances in chromatographic techniques, like HPLC and affinity chromatography, have provided new possibilities for the separation of complex mixtures of isomers and the number of identified oligosaccharides has since increased [2, 3, 6-13]. Despite the extension of these techniques, numerous oligosaccharides, ranging in size from decasaccharides to larger than dodecasaccharides remained unidentified. The present paper describes the structural studies of three new oligosaccharides: two dodecasaccharides and a tridecasaccharide, and furnishes the complete assignment of the ¹H and ¹³C-NMR spectra of two octasaccharides which have been previously isolated [2, 14].

MATERIAL AND METHODS

Material

Fractionation of pooled human milk oligosaccharides leading to the isolation of the so-called fractions III, X and XI has been previously described [3].

Analytical methods

Preparative reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) of native oligosaccharides was performed on a 5 μm ODS Zorbax column (25 cm x 0.94 cm I.D., Du Pont Instruments, Paris, France) using distilled water as eluant. Oligosaccharides were detected at 206 nm.

However, preparation of the compound XI-1 was only achieved by high performance alkaline anion exchange chromatography (HPAEC) in 0.1 M NaOH under isocratic condition with pulsed amperometric detection (PAD). The apparatus was from Dionex (Dionex Corp., Sunny Vale, CA). The following pulse potentials and durations were used :

$E_1 = 0.05 \text{ V}$ ($t_1 = 300 \text{ ms}$); $E_2 = 0.65 \text{ V}$ ($t_2 = 180 \text{ ms}$); $E_3 = -0.65 \text{ V}$ ($t_3 = 60 \text{ ms}$). The column was a semi preparative Carbo Pac PA 1 (9 x 250 mm) with the same pellicular stationary phase than the analytical column (4 x 250 mm) which was used for setting the elution condition. For setting of the conditions of purification, 10 μg of sample were loaded and the detection sensitivity was 300 nA full scale, whereas for preparation from 1 to 5 mg could be loaded and the detection was to 10 μA full scale. No post column addition was used as no baseline drift was observed under isocratic conditions. The purified fractions were

collected manually after the detection cell with a tubing of known volume and were neutralized with a cation exchange resin : Dowex 50x2, H⁺ form, 200-400 mesh from Biorad (Richmond CA), and then desalted on a Biogel P2 column (Biorad).

Experimental conditions of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, Fast Atom Bombardment- Mass Spectrometry (FAB-MS) and methylation analysis have been previously described [3].

The matrix assisted Laser Desorption mass spectrometry was performed on a mass spectrometer Finnigan Lasermat. Light from a pulsed nitrogen laser (337 nm) is focused onto the sample target using a fused silica lens. Each pulse of desorbed ions is accelerated to 20 KeV energy and directed along axis of a 0.5 m drift tube towards an electron multiplier. The ions all receive the same kinetic energy , so that their velocity is inversely proportional to the square root of their mass. Mass analysis is simply achieved by monitoring the detector signal as a function of time.

RESULTS

Isolation of the five oligosaccharides

Paper chromatography of milk oligosaccharides with a degree of polymerization from 8 to 12 or 13 has led to the characterization of eleven fractions (Fractions I to XI) [3].

HPLC of fraction III (Fig. 1a) furnished 2 major compounds III-1 (20 mg) and III-2 (60 mg). Fraction III-3 is assumed to be a complex mixture and remains to be further investigated. Fractions X and XI were subfractionated into 6 and 2 major peaks respectively (Fig. 1b, c). Compounds X-1 and X-3,5 were recycled on the same column until total

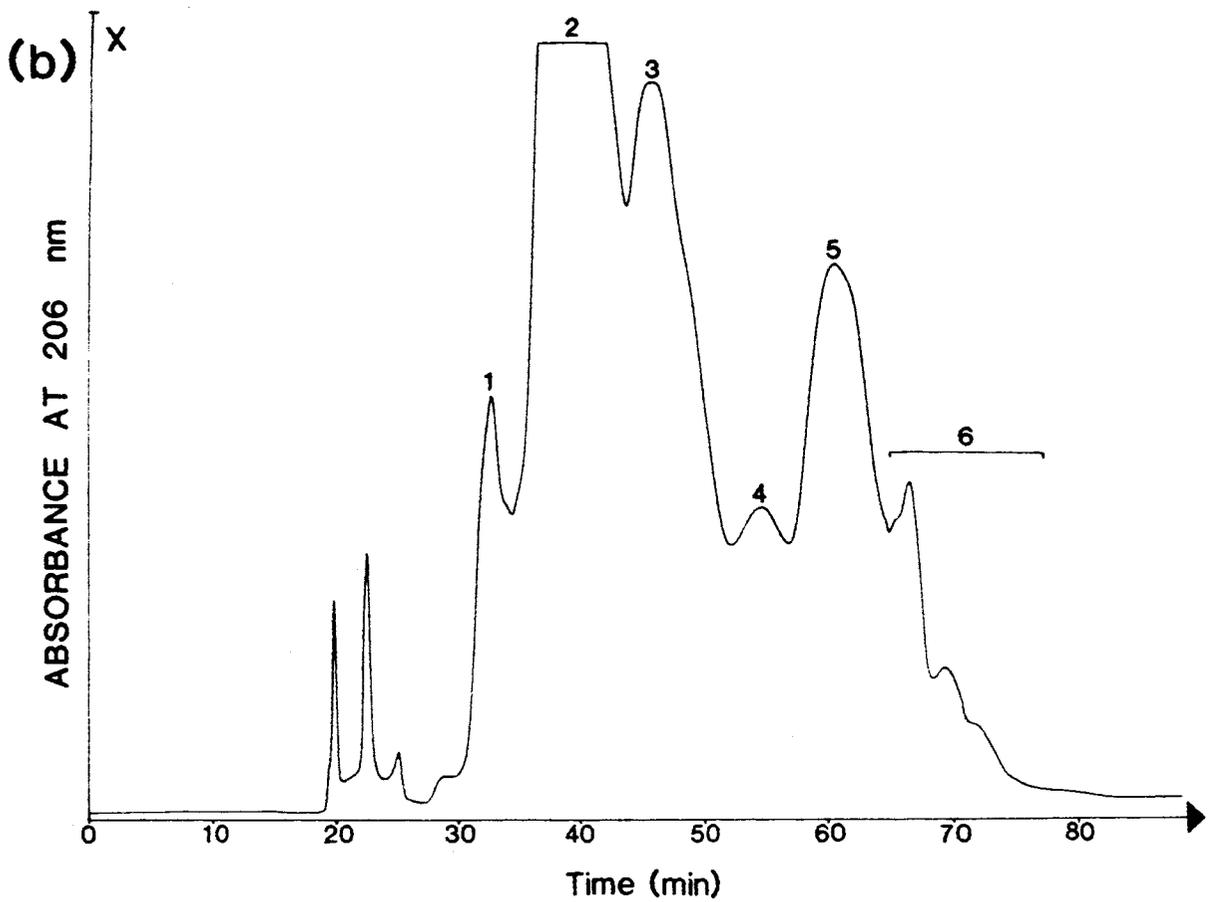
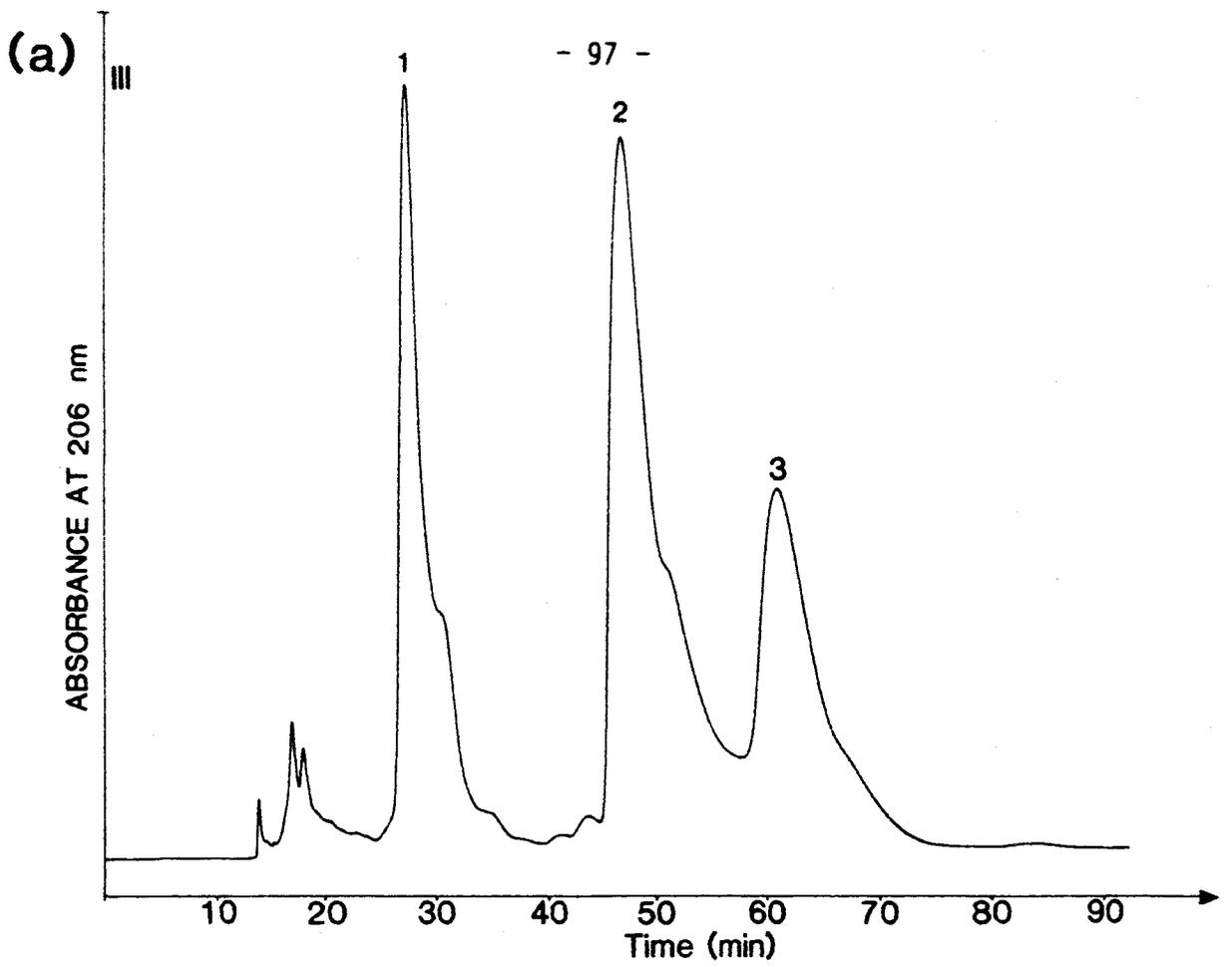


Fig. 1 : HPLC chromatograms of fractions III (a) and X (b) with water as eluent; Flow rate : 1 ml/minute.

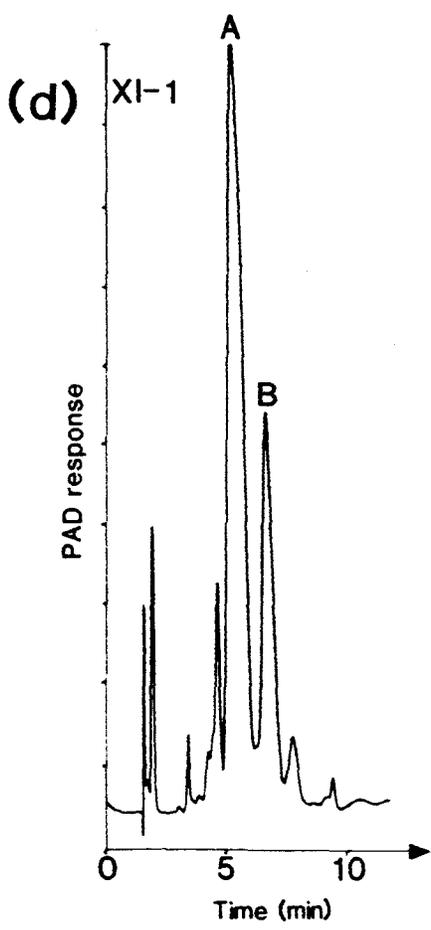
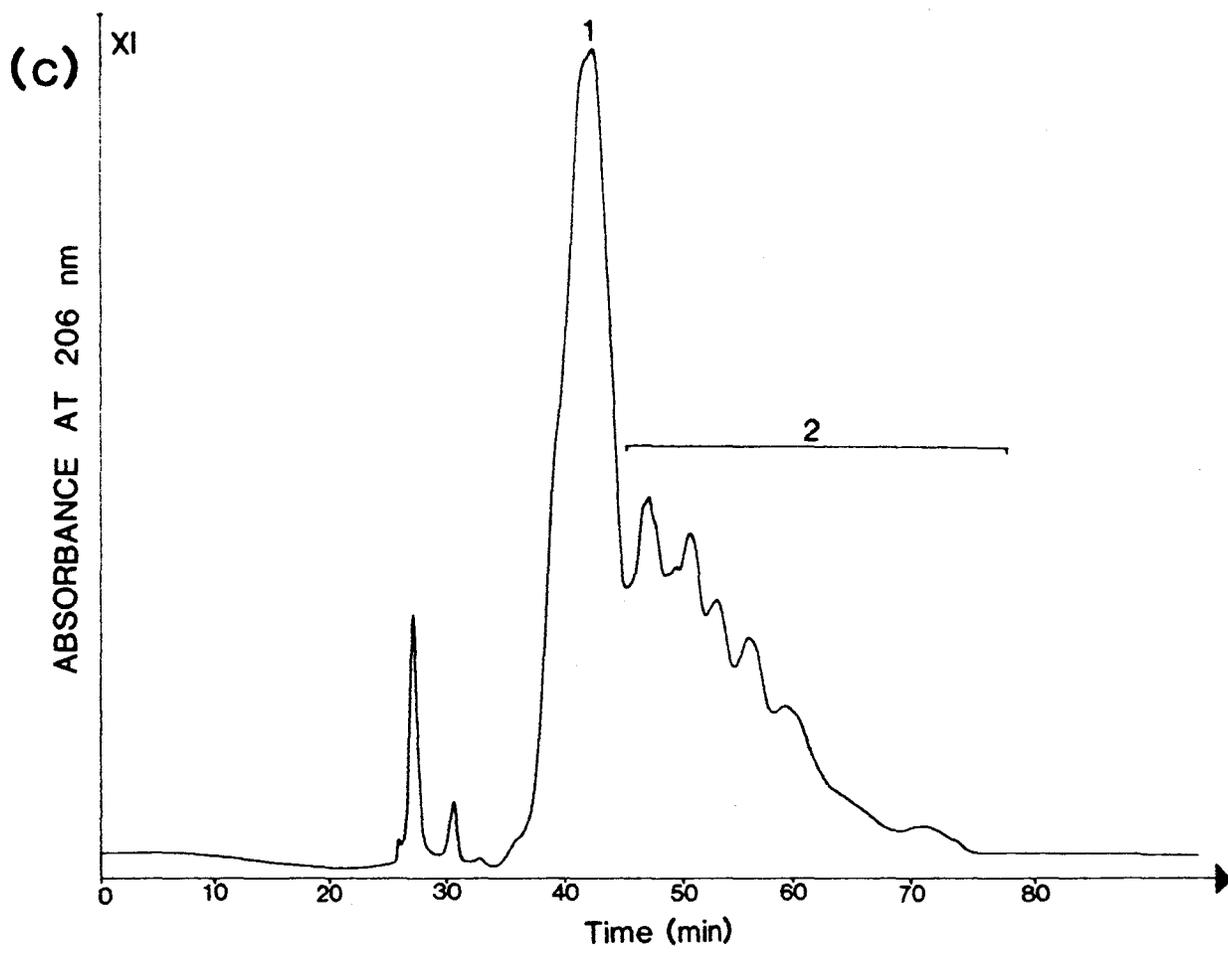


Fig. 1 (continued) : HPLC chromatogram of fraction XI (c) with water as eluent; Flow rate : 1 ml/minute.

(d) : HPAEC of compound XI-1 with 0.1 M NaOH as eluent; Flow rate : 4 ml/minute.



purification. Fraction XI-1 obtained by the HPLC procedure was furtherly subfractionnated in XI-1A and XI-1B by HPAEC (Fig. 1d).

Finally, 4 mg of X-1, 30 mg of X-3,5, 6 mg of XI-1A and 1 mg of XI-1B were obtained starting from 20 l of combined samples of milk.

Two HPLC peaks were obtained for each oligosaccharide, which correspond to the β (first peak) and the α anomer (second peak) of the compound. The other fractions remained too heterogenous for structural analysis and will be further investigated.

Structure of compound III-1

According to the $^1\text{H-NMR}$ spectrum, compound III-1 contains two fucose, three galactose, two 2-acetamido-2-deoxyglucose and one glucose residues. The two fucose residues were recognized on the basis of the presence of the anomeric protons at $\delta = 5.102$ and 5.123 ppm ($J_{1,2} = 3.7$ Hz, α -anomer), correlated with a methyl signal ($\delta = 1.173$ ppm) via the successive correlations H-1 H-4, H-4 H-5 and H-5 H-6 (methyl group). 2-acetamido-2-deoxyglucose, glucose and galactose residues were identified on the basis of their coupling constant patterns ($J_{1,2}$, $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$). The presence of two α -1,3-linked fucose residues was inferred by comparing their H-1, H-5 and H-6 chemical shifts with those of other milk oligosaccharides [15, 16]. The H-1 resonance of Fuc^3 attached to GlcNAc III was found to be downfield shifted in regard to that of Fuc^3 attached to GlcNAc III', as shown by compilation of data obtained from compounds having only one α -1,3-linked fucose residue attached either to GlcNAc III or III' [3, 7, 8, 15].

The assignment of the H-3 resonances of the three galactose residues was obtained from the double relayed COSY spectrum. Then the corresponding resonances were reported from the $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ heteronuclear

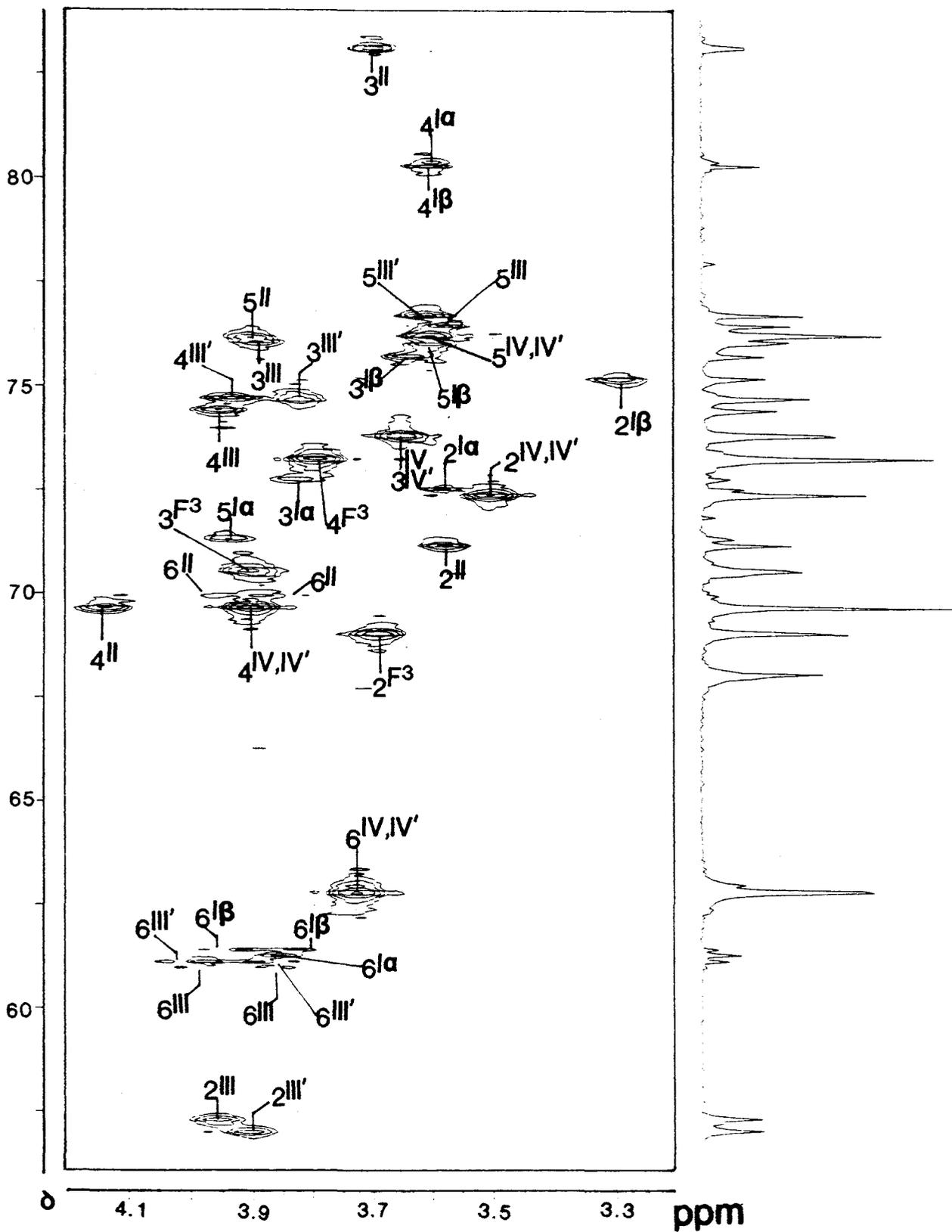


Fig. 2 (a) : Heteronuclear ^1H - ^{13}C COSY spectrum of compound III-1.

TABLE I : ^1H and ^{13}C -NMR data for compound III-1

Chemical shift (δ)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6,6'	NAc
Gal(β 1-4) IV	4.464	3.494	3.654	3.900	3.608	3.78 3.68	-
Fuc(α 1-3)	5.123	3.690	3.903	3.791	4.829	1.173	-
GlcNAc(β 1-3) III	4.718(α) 4.715(β)	3.944	3.892	3.960	3.576	3.96 3.85	2.020
Gal(β 1-4) IV'	4.450	3.494	3.654	3.900	3.608	3.78 3.68	-
Fuc(α 1-3)	5.102	3.690	3.903	3.791	4.821	1.173	-
GlcNAc(β 1-6) III'	4.642	3.896	3.824	3.934	3.608	4.01 3.86	2.051
Gal(β 1-4) II	4.426	3.580	3.702	4.135	3.900	3.99 3.84	-
Glc α I	5.218	3.583	3.828	3.600	3.943	3.86	-
β I	4.663	3.288	3.642	3.608	3.600	3.95 3.77	-

Table I continued

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
Gal(β1-4) IV	103.08	72.36	73.79	69.66	76.21	62.78	-	-
Fuc(α1-3)	99.88	69.04	70.54	73.22	67.99	16.60	-	-
GlcNAc(β1-3) III	103.77	57.29	76.05	74.40	76.45	60.98	175.98	23.57
Gal(β1-4) IV'	103.16	72.36	73.79	69.66	76.21	62.78	-	-
Fuc(α1-3)	99.92	69.04	70.54	73.22	68.03	16.60	-	-
GlcNAc(β1-6) III'	102.11	56.98	74.66	74.70	76.69	61.11	175.60	23.79(α) 23.82(β)
Gal(β1-4) II	104.35	71.15	83.11	69.66	76.16	69.93	-	-
Glc α I	93.09	72.51	72.73	80.38	71.31	61.26	-	-
β I	97.02	75.16	75.71	80.29	76.03	61.40	-	-

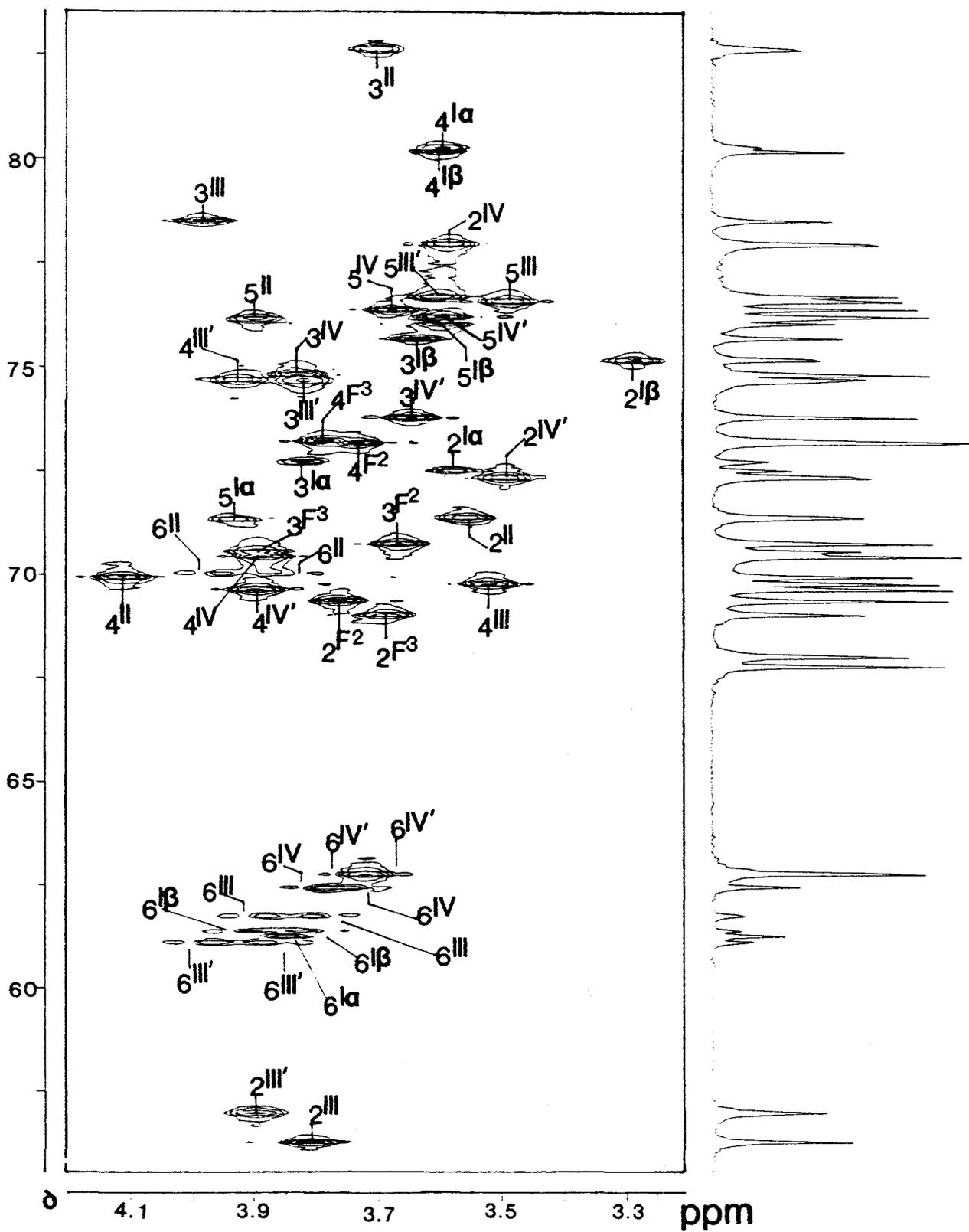


Fig. 2 (b) : Heteronuclear ^1H - ^{13}C COSY spectrum of compound III-2.

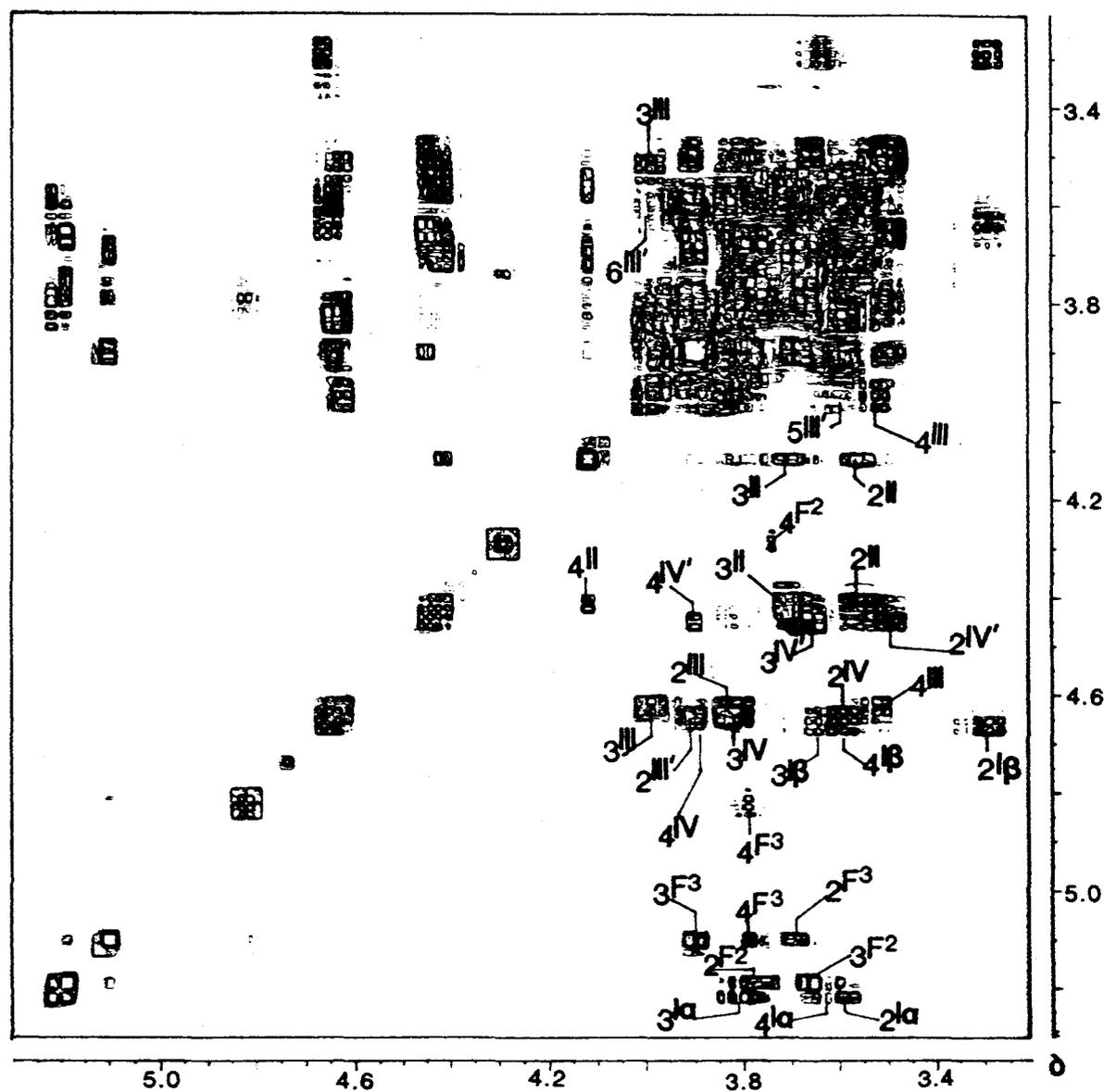
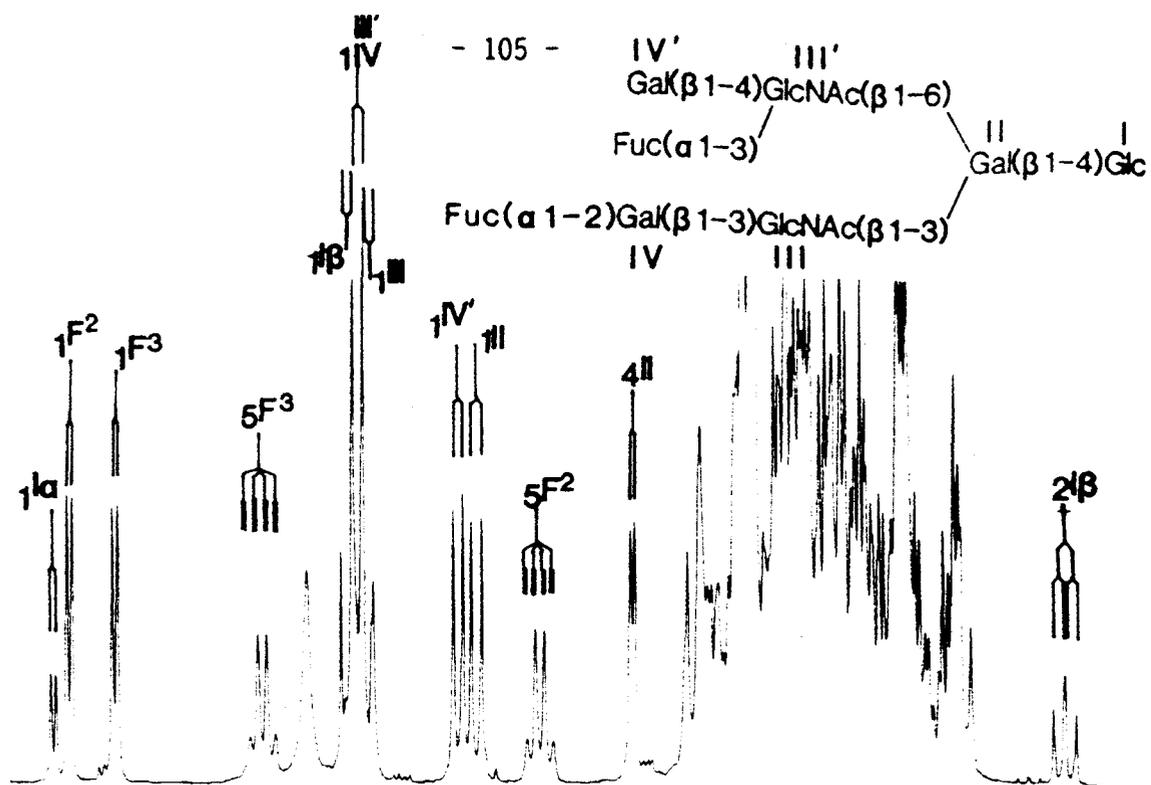


Fig. 3 : Double-relayed COSY spectrum of compound III-2

TABLE II : ^1H and ^{13}C -NMR data for compound III-2

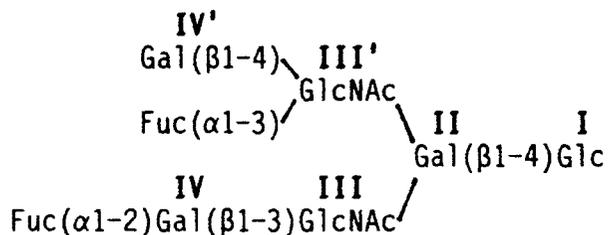
Chemical shift (δ)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6,6'	NAc
Fuc(α 1-2)	5.186	3.768	3.664	3.738	4.288	1.229	-
Gal(β 1-3) IV	4.640	3.587	3.828	3.886	3.676	3.83	-
						3.71	
GlcNAc(β 1-3) III	4.624(α)	3.810	3.988	3.523	3.488	3.91	2.051
	4.619(β)					3.77	
Gal(β 1-4) IV'	4.446	3.488	3.652	3.902	3.591	3.77	-
						3.67	
Fuc(α 1-3)	5.097	3.690	3.896	3.789	4.819	1.170	-
GlcNAc(β 1-6) III'	4.640	3.896	3.823	3.928	3.600	4.00	2.049(α)
						3.85	2.051(β)
Gal(β 1-4) II	4.410	3.557	3.707	4.116	3.900	3.99	-
						3.83	
Glc α I	5.217	3.583	3.923	3.600	3.935	3.85	-
β I	4.661	3.287	3.642	3.600	3.594	3.95	-
						3.78	

Table II continued

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
Fuc(α 1-2)	100.79	69.35	70.73	73.14	67.77	16.56	-	-
Gal(β 1-3) IV	101.53	77.93	74.80	70.43	76.36	3.92	-	-
						3.71		
GlcNAc(β 1-3) III	104.46	56.26	78.49	69.77	76.59	3.91	175.48	23.46
						3.78		
Gal(β 1-4) IV'	103.15	72.33	73.78	69.63	76.19	3.77	-	-
						3.67		
GlcNAc(β 1-6) III'	102.08	56.96	74.63	74.68	76.67	4.00	175.57	23.79(α)
						3.85		23.82(β)
Gal(β 1-4) II	104.34	71.38(α)	82.59(α)	69.92	76.15	3.99	-	-
		71.35(β)	82.62(β)			3.83		
Glc α I	93.08	72.50	72.69	80.26	71.31	3.85	-	-
β I	97.00	75.16	75.67	80.18	76.01	3.95	-	-
						3.78		

sequence Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GlcNAc (H determinant) was deduced from the comparison of the NMR data with those of reference compound IV²FucLnOse₄ in [15]. The comparison of the ¹H-NMR spectrum with that of III-1 also reveals the occurrence of Le^x trisaccharide determinant, attached at C-6 of Gal II. Consequently, the structure of oligosaccharide III-2 was determined as :



H-1 signals of Gal IV and GlcNAc III' possess identical chemical shifts as it can be observed on the COSY spectrum (Fig. 3). H-1 to H-4 resonances of Gal and GlcNAc residues were assigned on the 2D-COSY spectrum, while H-5 and H-6 resonances were extracted from the ¹H-¹³C heteronuclear COSY spectrum (Fig. 2b) by comparison with data obtained from compound III-1 (Tables I and II).

Structure of compound X-1

The ¹H-NMR spectrum of compound X-1 (Fig. 4a and Table III) indicated the presence of 4 fucose, 4 galactose, 3 2-acetamido-2-deoxyglucose and 1 glucose residues, according to the examination of the signals related to the anomeric protons, the H-5 atoms of Fuc, the NAc-methyl and methyl groups of GlcNAc and Fuc, respectively. The presence of the Le^b determinant was also deduced from the NMR spectrum, owing to the characteristic chemical shifts of Fuc² and Fuc⁴ H-6 signals at 1.272 and 1.235 ppm, and Gal VIII and GlcNAc VII anomeric protons at 4.661 and 4.600 ppm, respectively [15].

The presence of 3 galactose H-4 signals deshielded at $\delta = 4.150$ ppm,

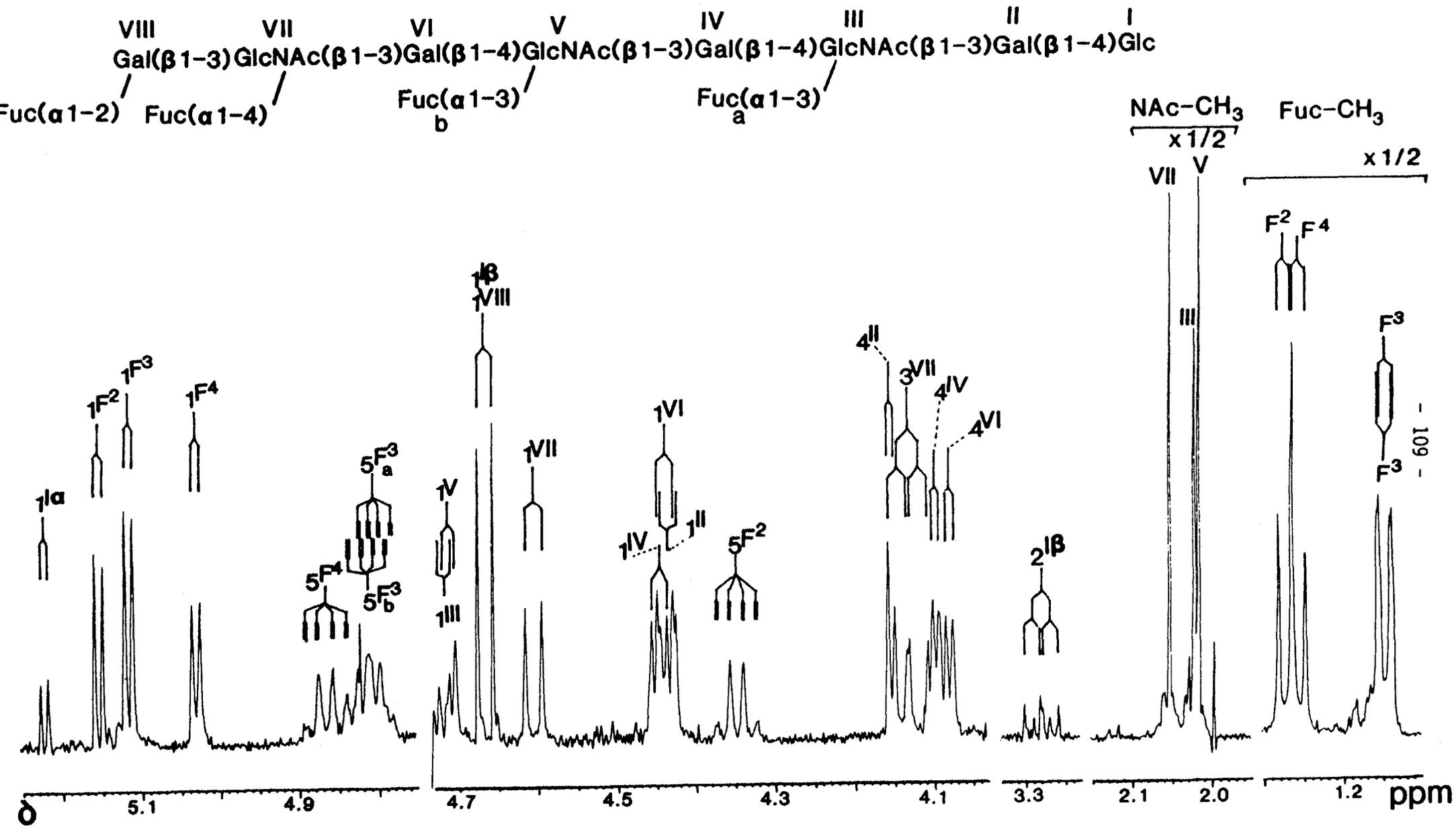


Fig. 4 (a) : 400 MHz ¹H-NMR spectrum of compound X-1.

TABLE III : ^1H and ^{13}C -NMR data for compound X-1

Chemical shift (δ)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NHCOCH ₃
Fuc(α 1-2)	5.151	3.755	3.673	3.716	4.343	1.272	-
Gal(β 1-3)VIII	4.663	3.604	3.806	3.84	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-4)	5.026	3.806	3.922	3.820	4.853	1.235	-
GlcNAc(β 1-3)VII	4.601	3.830	4.129	3.730	3.550	N.D.	2.052
Gal(β 1-4)VI	4.435	3.475	3.694	4.095	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-3)	5.112	3.690	3.875	3.780	4.812	1.149	-
GlcNAc(β 1-3)V	4.710	3.950	3.870	N.D.	N.D.	N.D.	2.015
Gal(β 1-4)IV	4.442	3.574	3.694	4.102	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-3)	5.112	3.690	3.875	3.780	4.812	1.146	-
GlcNAc(β 1-3)III	4.721(α)	3.950	3.870	N.D.	N.D.	N.D.	2.020
	4.718(β)						
Gal(β 1-4)II	4.431	3.548	3.694	4.150	N.D.	N.D.	-
Glc α I	5.216	3.583	3.823	3.610	N.D.	N.D.	-
β I	4.663	3.286	3.620	3.620	N.D.	N.D.	-

Table III continued

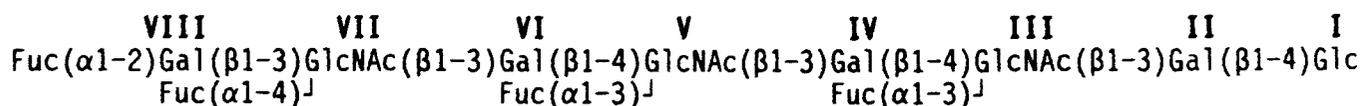
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ³
Fuc(α 1-2)	100.87	69.50	70.76	73.32	67.53	16.63	-	-
Gal(β 1-3)VIII	101.93	77.81	74.96	70.06	76.05	62.87	-	-
Fuc(α 1-4)	99.08	69.15	70.43	73.32	68.31	16.67	-	-
GlcNAc(β 1-3)VII	104.50	57.12	75.81	73.13	76.52	60.83	175.44	23.51
Gal(β 1-4)VI	103.04	72.04	82.53	69.60	76.06	62.43	-	-
Fuc(α 1-3)	100.12	68.97	70.54	73.19	67.99	16.63	-	-
GlcNAc(β 1-3)V	103.72	57.29	76.05	74.27	76.52	61.11	176.00	23.57
Gal(β 1-4)IV	103.04	71.84	82.92	69.90	76.06	62.74	-	-
Fuc(α 1-3)	99.96	68.97	70.54	73.19	67.99	16.63	-	-
GlcNAc(β 1-3)III	103.79	57.29	76.05	74.27	76.45	60.98	175.91	23.57
Gal(β 1-4)II	104.25	71.33	83.36	69.82	76.17	62.25	-	-
Glc α I	93.11	72.52	72.70	79.76	71.33	61.26	-	-
β I	97.05	75.18	75.67	79.67	76.05	61.40	-	-

$\delta = 4.102$ ppm and $\delta = 4.095$ ppm proves that the compound contains 3 galactose units substituted at C-3 (the fourth being substituted at C-2) and consequently allows to define compound X-1 as a linear oligosaccharide.

H-1, H-5 and H-6 resonances of 2 L-fucosyl groups are characteristic for α -1,3-linked residues and consequently, the dodecasaccharide displays two Le^X determinants [8].

The anomeric protons of GlcNAc III and GlcNAc V are distinguished on the previous observations [15, 16] that the anomerization effect influences the H-1 signal of GlcNAc III owing to the spatial proximity of this H-1 to the reducing end of the oligosaccharide. The GlcNAc III H-1 resonance can be also deduced by comparing of the spectrum with those of another milk oligosaccharides carrying the dimer Le^X determinant [8].

On the basis of these results, the structure of oligosaccharide X-1 originates from a new octaose core, proposed to be named "*para* lacto-N-octaose" :



The structure of this oligosaccharide was also verified by FAB-MS analysis. The pseudo-molecular ions observed at m/z 2523 and 2499 for $M + Na^+$ and $M + H^+$ (calculated chemical mass : 2520 and 2497) confirmed the molar composition established by 1H -NMR. The primary fragments at m/z 1435 ($Fuc_3Gal_2GlcNAc_2$) and m/z 812 ($Fuc_2GalGlcNAc$) together with the secondary fragments at m/z 1259 and 402 formed by elimination of C-3-linked Fuc and Fuc-Gal, respectively, confirm the proposed linear sequence (Fig. 5a).

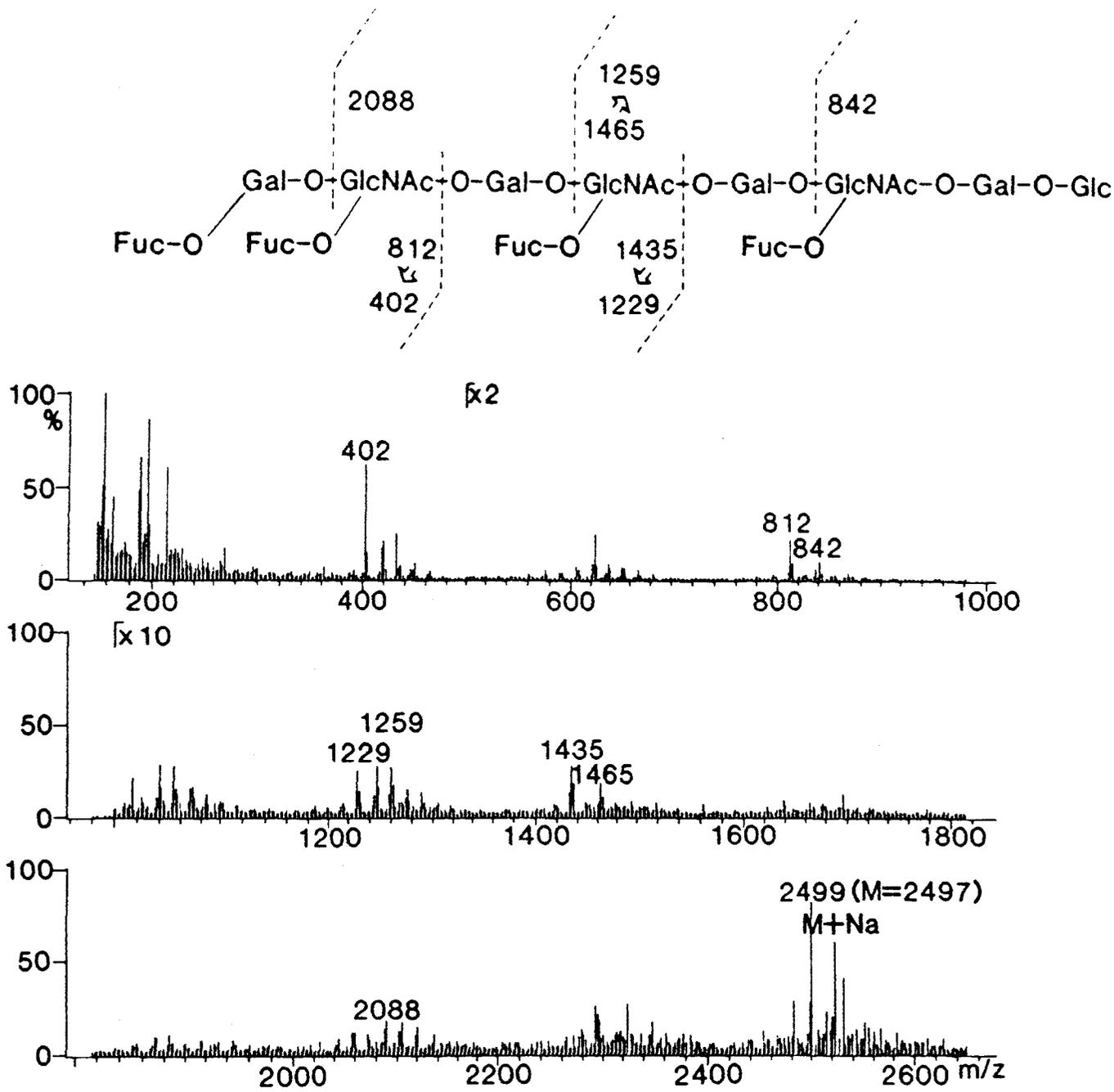


Fig. 5 (a) : FAB-MS of compound X-1.

Structure of compound X-3,5

From the $^1\text{H-NMR}$ spectrum, oligosaccharide X-3,5 (Fig. 4b and Table IV) was defined as a dodecasaccharide containing four fucose ($\delta = 5.186, 5.150, 5.081$ and 5.027 ppm, H-1), four galactose ($\delta = 4.662$, H-1, 3.605 , H-2, 4.643 , H-1, 3.588 , H-2, 4.416 , H-1, 3.472 , H-2, 4.410 , H-1, 3.552 , H-2), three 2-acetamido-2-deoxyglucose ($\delta = 4.635$, H-1, 3.89 , H-2, 4.620 , H-1, 3.811 , H-2, 4.598 , H-1, 3.816 , H-2) and one glucose residues ($\delta = 5.216$, H-1 α , 4.662 , H-1 β).

The $^1\text{H-NMR}$ COSY spectrum shows that H-3 atoms of both GlcNAc III and GlcNAc V' residues are deshielded and possess chemical shift values $\delta = 4.130$ and 3.987 ppm, respectively, which are characteristic of a 2-acetamido-2-deoxyglucose residue substituted at C-3 by a galactose residue.

One fucosyl group is linked to the C-2 of a galactose unit (H determinant) and one to the C-3 of a 2-acetamido-2-deoxyglucose unit (Le^X determinant), as shown by the chemical shift values of their H-1, H-5 and H-6 atoms (Table IV). The set of the chemical shifts of Fuc(1-2) and Fuc(1-4) H-6 atoms ($\delta = 1.272$ and $\delta = 1.255$ ppm) and GlcNAc III, Gal IV H-1 atoms ($\delta = 4.598$ and $\delta = 4.662$ ppm) is typical of the Le^b determinant [15].

The presence of two galactose H-4 signals, shifted downfield at $\delta = 4.075$ and 4.118 ppm, respectively, is significant of C-3 substitution. As the two other Gal residues are C-2 substituted with terminal Fuc residues, the oligosaccharide X-3,5 consequently possesses a branched structure.

According to this NMR spectroscopy analysis, the structure of X-3,5

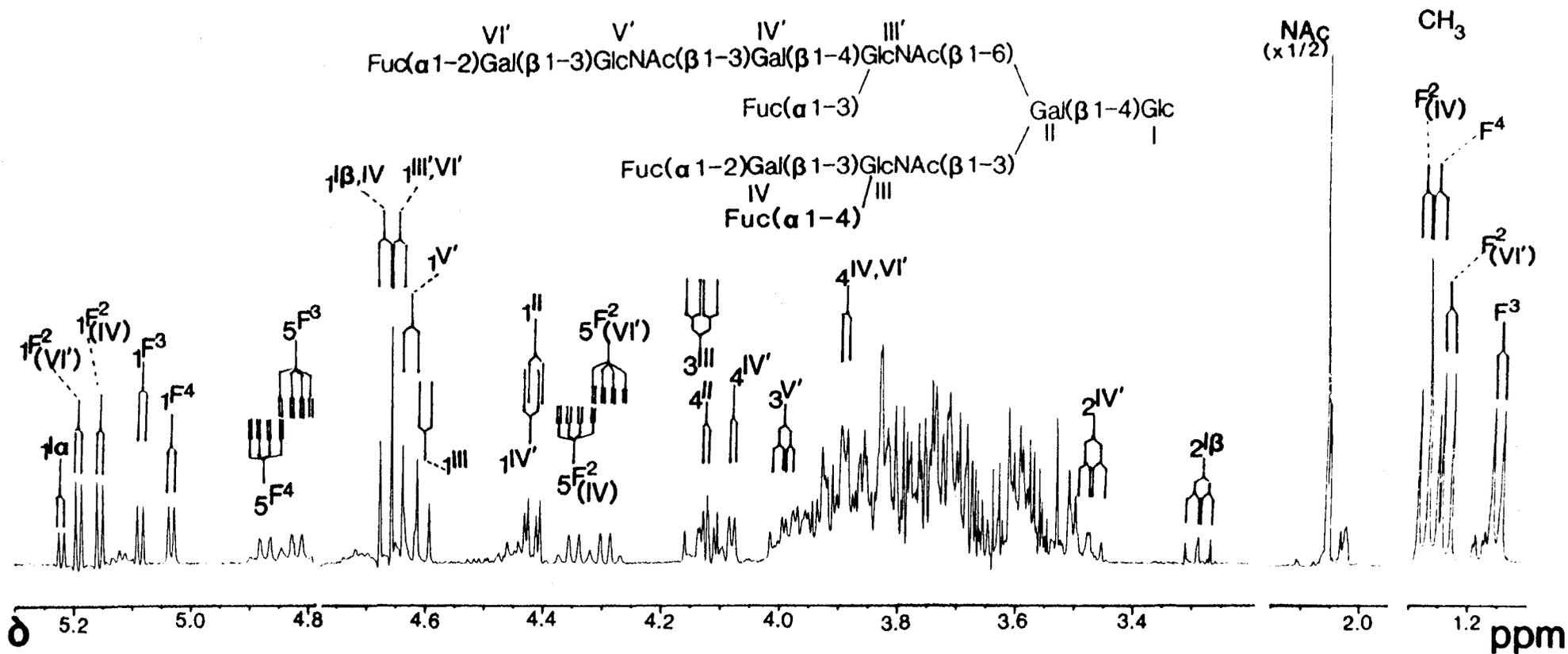


Fig. 4 (b) : 400 MHz ¹H-NMR spectrum of compound X-3,5.

TABLE IV : H^1 and C^{13} -NMR data for compound X-3,5

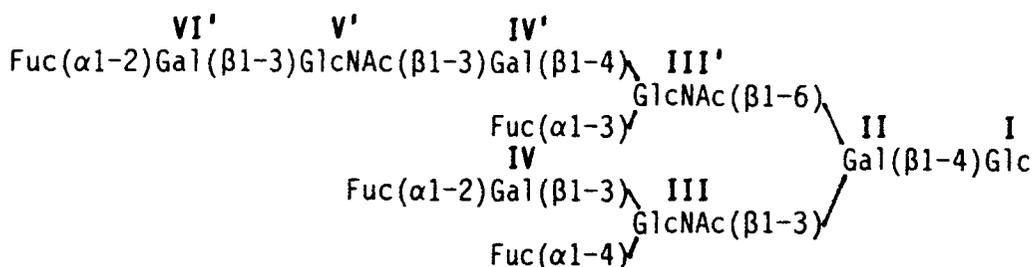
Chemical shift (δ)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NHCOCH ₃
Fuc(α 1-2)	5.150	3.754	3.670	3.720	4.342	1.272	-
Gal(β 1-3)IV	4.662	3.605	3.807	3.850	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-4)	5.027	3.803	3.921	3.820	4.868	1.255	-
GlcNAc(β 1-3)III	4.598	3.816	4.130	3.732	N.D.	N.D.	2.052
Fuc(α 1-2)	5.186	3.754	3.666	3.735	4.290	1.231	-
Gal(β 1-3)VI'	4.643	3.588	3.846	3.880	N.D.	N.D.	-
GlcNAc(β 1-3)V'	4.620	3.811	3.987	3.530	N.D.	N.D.	2.052
Gal(β 1-4)IV'	4.416	3.472	3.700	4.075	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-3)	5.081	3.688	3.881	3.780	4.814	1.145	-
GlcNAc(β 1-6)III'	4.635	3.890	3.810	3.920	3.590	N.D.	2.049
Gal(β 1-4)II	4.410	3.552	3.710	4.118	N.D.	N.D.	-
Glc α I	5.216	3.583	3.816	3.610	N.D.	N.D.	-
β I	4.662	3.286	3.630	3.610	N.D.	N.D.	-

Table IV continued

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ³
Fuc(α 1-2)	100.86	69.47	70.75	73.39	67.54	16.65	-	-
Gal(β 1-3)IV	101.93	77.79	74.95	70.05	76.05	62.90	-	-
Fuc(α 1-4)	99.08	69.12	70.44	73.39	68.33	16.67	-	-
GlcNAc(β 1-3)III	104.51	57.13	75.79	73.08	76.44	60.78	175.49	23.49
Fuc(α 1-2)	100.84	69.37	70.75	73.18	67.80	16.58	-	-
Gal(β 1-3)VI'	101.57	77.98	74.81	70.44	76.39	69.45	-	-
GlcNAc(β 1-3)V'	104.51	56.29	78.49	69.96	76.59	61.74	175.53	23.47
Gal(β 1-4)IV'	103.11	72.05	82.52	69.85	75.68	62.77	-	-
Fuc(α 1-3)	100.14	68.96	70.53	73.18	68.02	16.65	-	-
GlcNAc(β 1-6)III'	102.10	57.00	74.65	74.23	76.68	61.09	175.65	23.78(α) 23.82(β)
Gal(β 1-4)II	104.38	71.38	82.62	69.78	76.05	69.66	-	-
Glc α I	93.11	72.51	72.72	80.27	71.33	61.24	-	-
β I	97.02	75.17	75.68	80.19	76.05	61.38	-	-

has been established as :



Structure of this tetrafucoyl *iso* lacto-N-octaose is confirmed by FAB-MS analysis (Fig. 5b) which shows a pseudo-molecular ion $M+\text{Na}^+$ at a value of m/z 2523 and two primary fragments at m/z 812 ($\text{Fuc}_2\text{GalGlcNAc}$) and m/z 1261 ($\text{Fuc}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2$). Secondary ions m/z 402 and m/z 1055 can be considered as a result of the preferred elimination of $\text{FucGal}(1-3)$ from m/z 812 and $\text{Fuc}(1-3)$ from m/z 1055, respectively. The ion m/z 228 arises by preferential elimination of $\text{FucGal}(1-3)$ from the fragment m/z 638 [$\text{FucGalGlcNAc}(1-3)$]. Moreover, the occurrence of fragment m/z 1261 clearly shows that the $\text{Fuc}(1-2)$ and $\text{Fuc}(1-3)$ residues are carried by the same branch.

Structure of compound XI-1

NMR spectroscopy analysis of compound XI-1 shows that this compound is a mixture of two oligosaccharides which differ in a fucose unit.

This observation was confirmed by the laser desorption time-of-flight mass analysis (Fig. 6), since two molecular ions respectively m/z 2660 (75%) and m/z 2487 (25%) were observed.

Oligosaccharides XI-1A and XI-1B were furthermore obtained in pure state by HPAEC (Fig. 1d) and studied by NMR spectroscopy and FAB-MS.

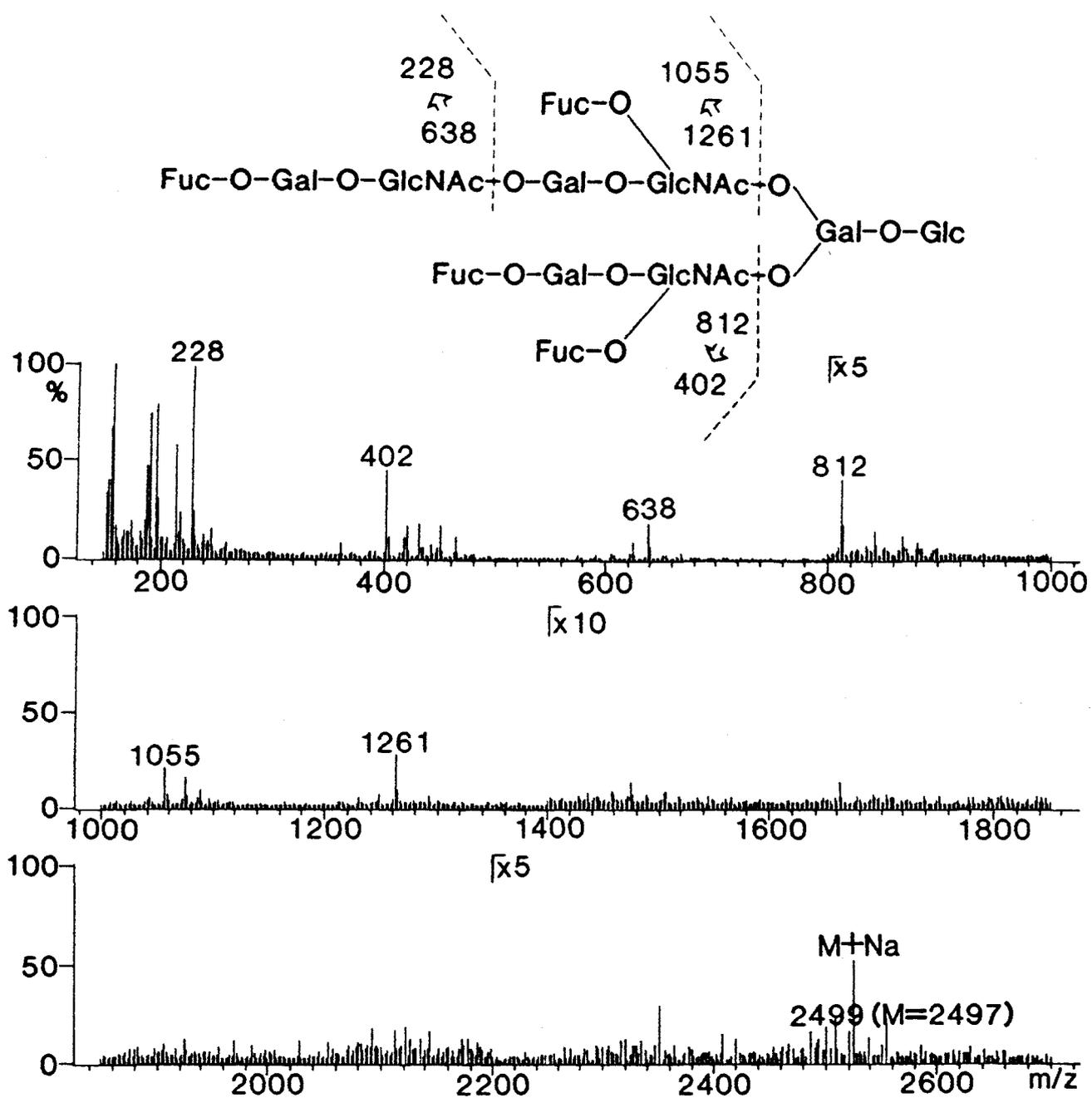


Fig. 5 (b) : FAB-MS of compound X-3,5.

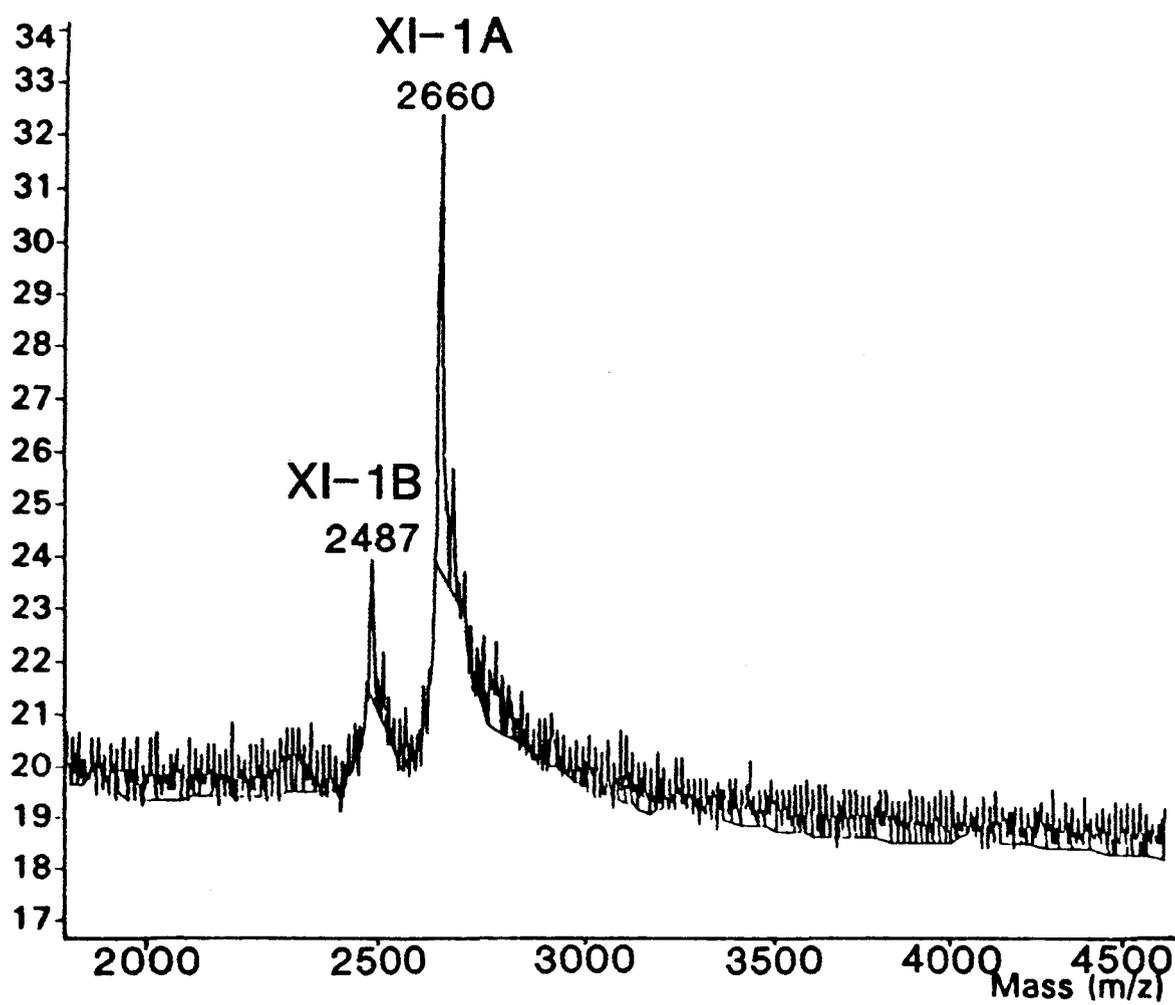
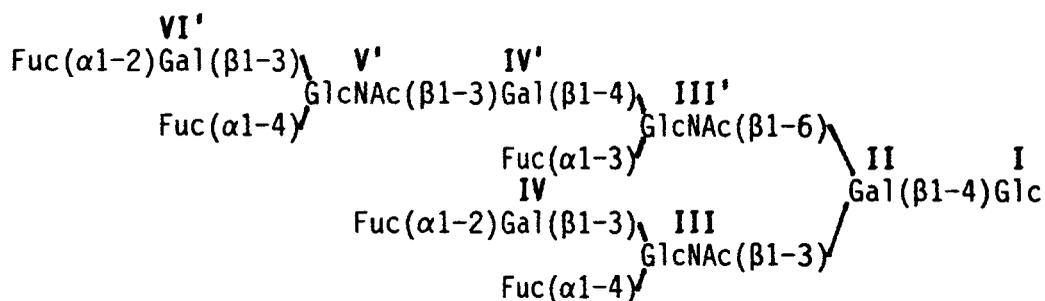


Fig. 6 : Laser desorption time-of-flight mass analysis of the mixture of compound XI-1A (MM : 2671) and XI-1B (MM : 2497)

* Compound XI-1A

According to the $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 4c) compound XI-1A contains 5 Fucose, 4 Galactose, 3 N-Acetylglucosamine and 1 Glucose residues. The intensity of the H-1, H-5 and H-6 signals relative to Fuc^2 , Fuc^3 and Fuc^4 are in the ratio 2:1:2, and the chemical shifts of H-1 and H-6 clearly indicate the presence of two Le^b determinants and one Le^x determinant (see above). The NMR parameters relative to Gal IV and GlcNAc III are identical to those observed for compound X-3,5 and similar analogies were found for the residues III' and IV' from XI-1A and compounds described in [7, 8]. On the basis of these results and those of FAB-MS (Fig. 5c), the structure of the tridecasaccharide was established as :



* Compound XI-1B

FAB-MS and NMR spectra of XI-1B are identical to those of the tetra fucosyl derivative of *iso*-lacto-N-octaose, corresponding to compound X-1.

^1H and $^{13}\text{C-NMR}$ data for oligosaccharides X-1 and XI-1

The 2D-COSY spectrum of the mixture X-1, XI-1 was recorded before the material was recognized to be a mixture of two oligosaccharides. According to the results obtained from the 1D-NMR of the pure compound

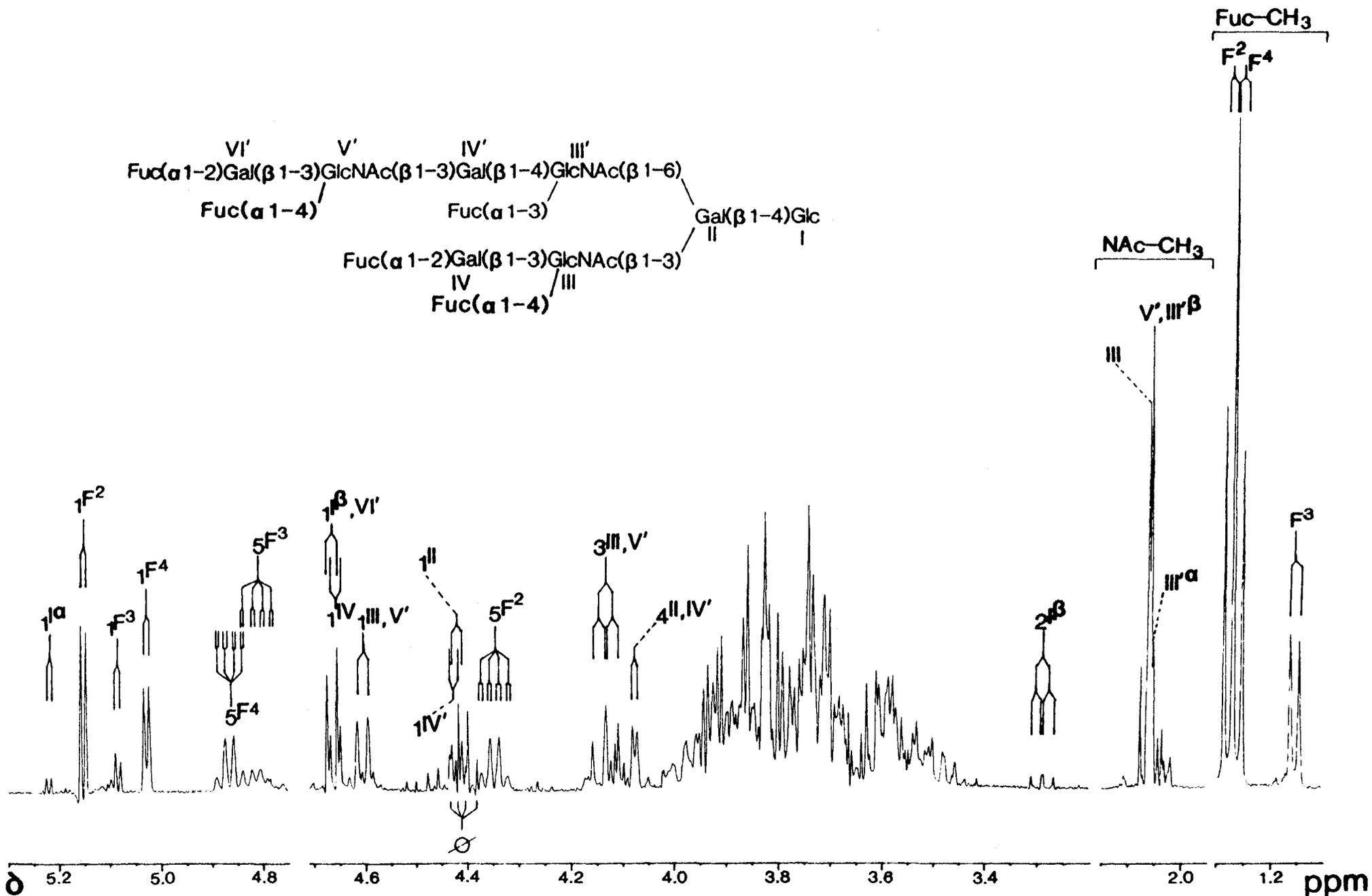


Fig. 4 (c) : 400 MHz ¹H-NMR spectrum of compound XI-1A.

TABLE V : ^1H and ^{13}C -NMR data for compound XI-1

Chemical shift (δ)

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NAc
Fuc(α 1-2)	5.151	3.755	3.673	3.716	4.343	1.272	-
Gal(β 1-3)IV	4.654	3.604	3.806	3.840	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-4)	5.026	3.806	3.922	3.820	4.853	1.235	-
GlcNAc(β 1-3)III	4.601	3.836	4.129	3.730	3.550	N.D.	2.058
Fuc(α 1-2)	5.151	3.755	3.673	3.716	4.343	1.272	-
Gal(β 1-3)VI'	4.663	3.604	3.806	3.840	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-4)	5.026	3.806	3.922	3.820	4.853	1.235	-
GlcNAc(β 1-3)V'	4.601	3.836	4.129	3.730	3.550	N.D.	2.052
Gal(β 1-4)IV'	4.419	3.475	3.694	4.076	N.D.	N.D.	-
Fuc(α 1-3)	5.082	3.690	3.875	3.770	4.800	1.147	-
GlcNAc(β 1-6)III'	4.641	3.890	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.046(α) 2.049(β)
Gal(β 1-4)II	4.409	3.548	3.694	4.076	N.D.	N.D.	-
Glc α I	5.216	3.583	3.823	3.61	N.D.	N.D.	-
BI	4.663	3.286	3.620	3.620	N.D.	N.D.	-

Table V continued

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
Fuc(α 1-2)	100.87	69.50	70.76	73.32	67.53	16.63	-	-
Gal(β 1-3)IV	101.93	77.81	74.96	70.06	76.05	62.87	-	-
Fuc(α 1-4)	99.08	69.15	70.43	73.32	68.31	16.67	-	-
GlcNAc(β 1-3)III	104.50	57.12	75.81	73.12	76.45	60.83	175.44	23.51
Fuc(α 1-2)	100.87	69.50	70.76	73.32	67.53	16.63	-	-
Gal(β 1-3)VI'	101.93	77.81	74.96	70.06	76.05	62.87	-	-
Fuc(α 1-4)	99.08	69.15	70.43	73.32	68.31	16.67	-	-
GlcNAc(β 1-3)V'	104.50	57.12	75.81	73.12	76.45	60.83	175.44	23.51
Gal(β 1-4)IV'	103.10	72.04	82.63	69.95	75.67	62.74	-	-
Fuc(α 1-3)	100.10	68.97	70.51	73.19	67.99	16.63	-	-
GlcNAc(β 1-6)III'	102.08	57.05	74.63	74.27	75.67	61.01	175.61	23.79(α) 23.82(β)
Gal(β 1-4)II	104.38	71.33	82.53	69.82	76.17	69.95	-	-
Glc α I	93.11	72.52	72.70	80.29	71.33	61.26	-	-
β I	97.01	75.18	75.67	80.22	76.05	61.40	-	-

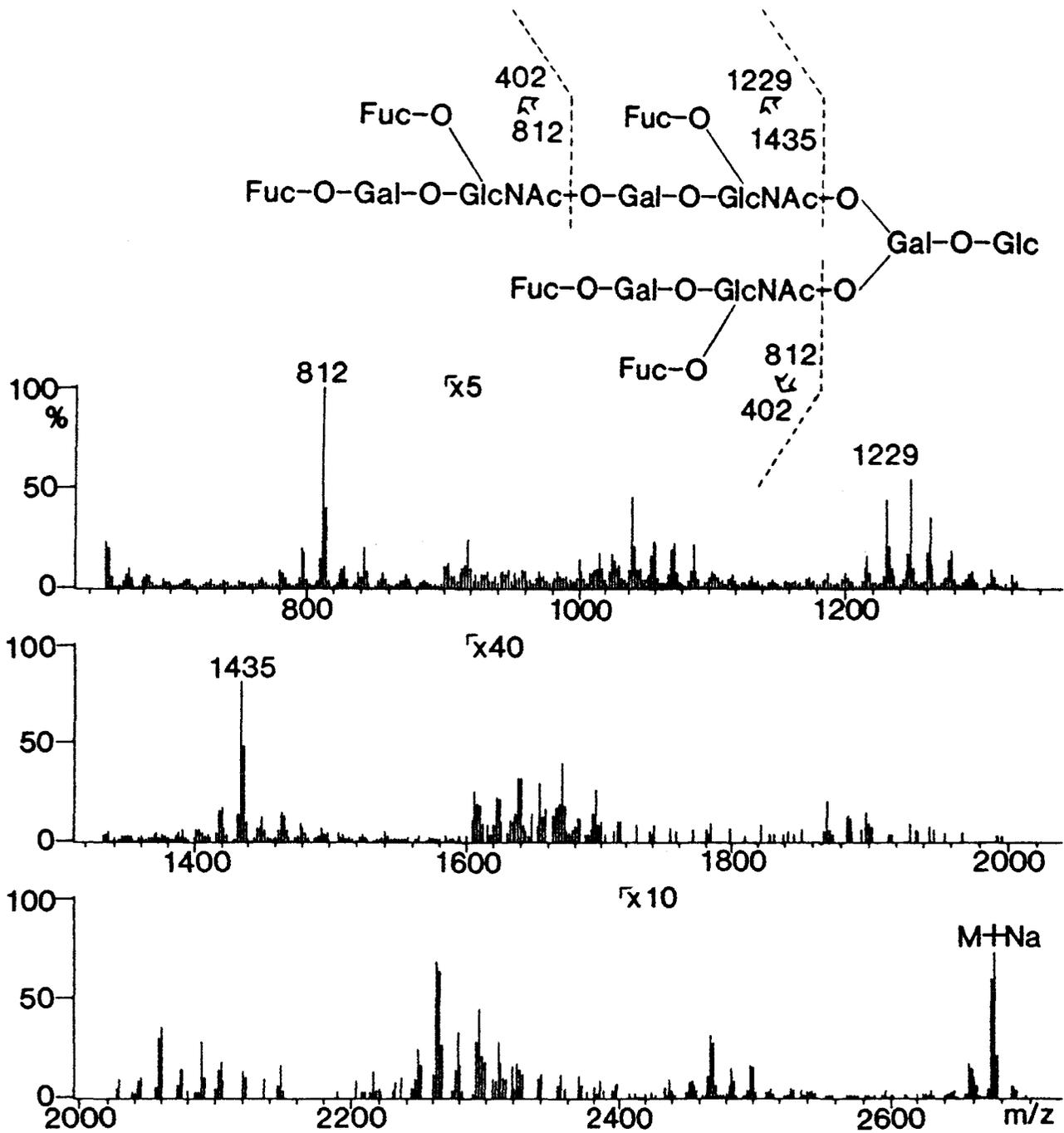


Fig. 5 (c) : FAB-MS of compound XI-1A.

(Fig. 4c), most of the ^1H resonances were assigned and reported in Tables III and V. The ^{13}C -NMR data for the two compounds, obtained by comparing their ^{13}C spectrum with those of reference compounds [3, 7, 8] are reported in Tables III and V.

CONCLUSION

In the present study 5 oligosaccharides were characterized starting from a pool of human milks. Three of them were novel structures and a new core (*para*-lacto-N-octaose) has been described.

According to the possible phenotype of the donors, compounds having H, Le^{a} , Le^{b} and Le^{x} determinants are present in the samples, and despite the combination of various chromatographic technics, only some of them were isolated in a pure state. As demonstrated and discussed before [2, 8, 9, 15], NMR and MS appear to be the best methods for structural elucidation of complex carbohydrate structures.

The list of the twelve "core" oligosaccharides found in milk is given in Fig. 7. All the fucosyl-octaoses recently isolated from human milk possess the *iso*-lacto-N-octaose core [7, 8, 12] instead of the classical cores previously described as lacto-N-octaose and lacto-N-neo-octaose. Despite the fact that these structures were established 20 years ago using conventional technics and not yet verified by NMR or MS, it is too early to refute the existence of such a core, since we have not yet been extensively analyzed all the octaose core-containing fractions of human milk.

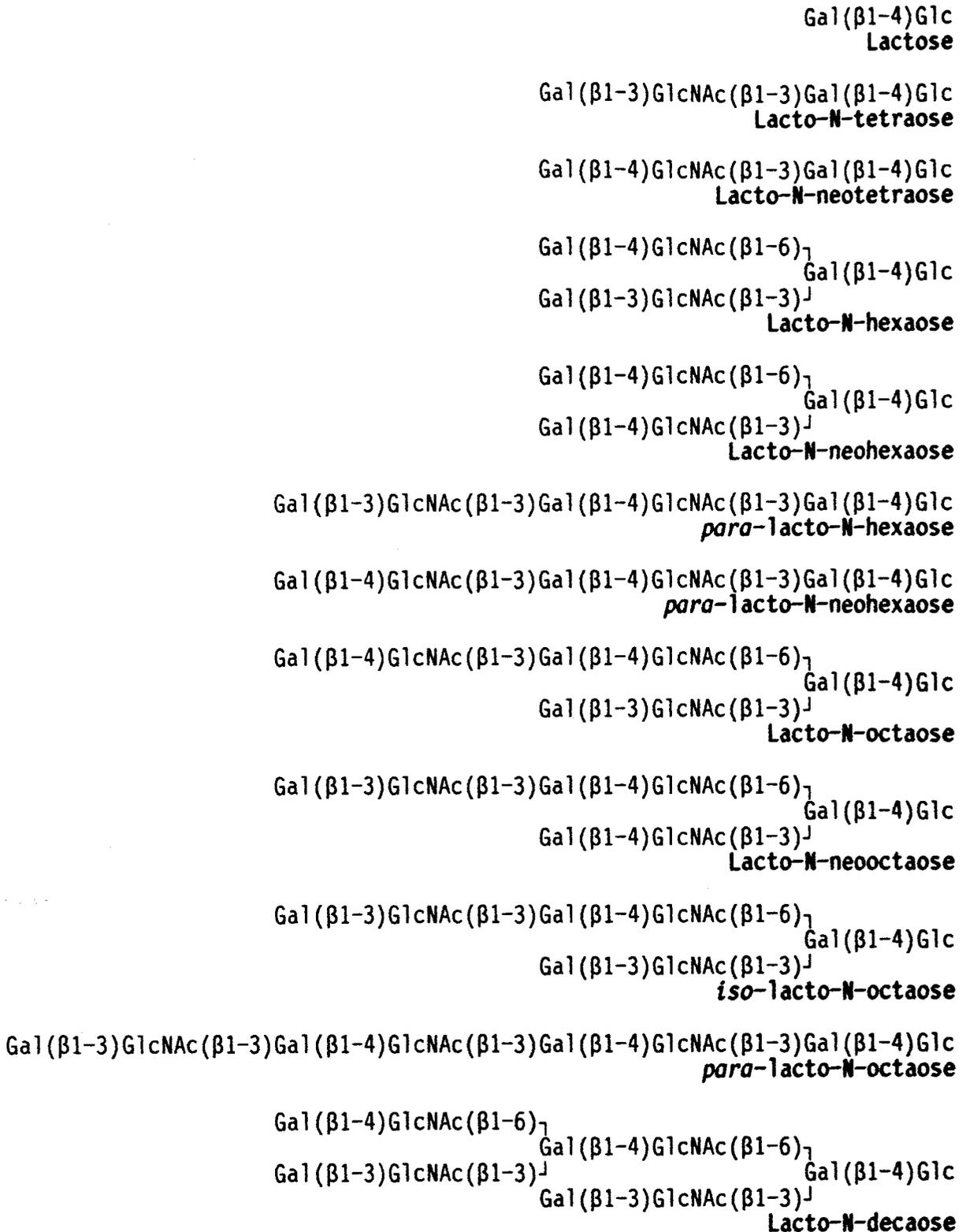


Fig. 7 : List of the twelve "core" oligosaccharides found in human milk
(see References : 1, 2 and 7)

AKNOWLEDGMENTS

This research was supported, in part, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte n°111 : "Relations structure - fonction des constituants membranaires"; Director : Professor André VERBERT), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and the Ministère de l'Education Nationale.

The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord - Pas de Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale, and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR instrument. They are indebted to Miss Catherine ALONSO (CNRS Technician) for her skilful technical assistance, to Mr. Yves LEROY for the mass spectrometric analyses and the Society Finnigan for Laser Desorption Mass Spectrometry.

REFERENCES

1. Kobata, A., Yamashita, K. & Tachibana, Y. (1978) *Methods Enzymol.* **50**, 216-220.
2. Bruntz, R., Dabrowski, U., Dabrowski, A., Ebersold A., Peter-Katalinic, J. & Egge H. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 257-273.
3. Strecker, G., Wieruszeski, J.M., Michalski, J.C. & Montreuil, J. (1988) *Glycoconjugate J.* **5**, 385-396.
4. Watkins, W.M. (1966) in "*glycoproteins*" (Gottschalk Ed.) **5**, 462-512.
5. Kobata, A. & Ginsburg, V. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1525-1529.
6. Wieruszeski, J.M., Chekkor, A., Bouquelet, S., Montreuil, J., Strecker G., Egge, H. & Peter-Katalinic J. (1985) *Carbohydr. Res.* **137**, 127-138.
7. Strecker, G., Wieruszeski, J.M., Michalski, J.C. & Montreuil, J. (1989) *Glycoconjugate J.* **6**, 169-182.
8. Strecker, G., Fièvre, S., Wieruszeski, J.M., Michalski, J.C. & Montreuil, J. (1992) *Carbohydr. Res.* **226**, 1-14.
9. Fièvre, S., Wieruszeski, J.M., Michalski, J.C., Lemoine, J., Montreuil, J. & Strecker, G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 720-725.
10. Tarrago, M.T., Toker, K.H., van Halbeek, H. & Smith, D.F. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 353-362.
11. Smith, D.F., Prieto, P.A., McCrumb, D.K. & Wang, W.C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12040-12047.
12. Kitagawa, H., Nakada, H., Kurosaka, A., Hiraiwa, N., Numata, Y., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Shimada, K. & Inagaki, F. (1989) *Biochemistry* **28**, 8891-8897.

13. Kitagawa, H., Nakada, Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Tate, S. & Inagaki, F. (1991) *Biochemistry* **30**, 2869-2876.
14. Yamashita, K., Tachibana, Y. & Kobata, A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 546-555.
15. Breg, J., Romijn, D., Vliegenthart, J.F.G., Strecker, G. & Montreuil, J. (1988) *Carbohydr. Res.* **183**, 19-34.
16. Sabesan, S. and Paulson, J.C. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2068-2080.

B - FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE ACIDE

Les oligosaccharides acides, retenus sur la résine échangeuse d'ions lors du fractionnement des glucides du lait de Femme (voir appendice technique), sont élués par des concentrations croissantes d'acétate de pyridine de 5 à 500 mM. La fraction 200 mM est soumise à une première chromatographie sur papier de 2 jours afin d'éliminer le disialyl-lacto-N-tétraose, composé acide majeur du lait de Femme. Les oligosaccharides de masse moléculaire plus élevée, restés à l'origine lors de cette première chromatographie, sont soumis à une nouvelle chromatographie sur papier de 2 semaines. 7 fractions sont ainsi obtenues (voir figure B, page 132).

L'association de la chromatographie sur papier et de la chromatographie liquide haute performance à la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse nous a permis, à partir de la fraction VI, d'isoler et de caractériser le premier oligosaccharide trisialylé du lait de Femme.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article qui suit.



Fig. B : Chromatographie sur papier de la fraction 200 mM (d'acétate de pyridine) des oligosaccharides acides du lait de Femme.

1 : Fraction 200 mM totale (I = Disialyl-lacto-N-tétraose)

2 : Fraction contenant le trisialyl-oligosaccharide, obtenue par chromatographie sur papier

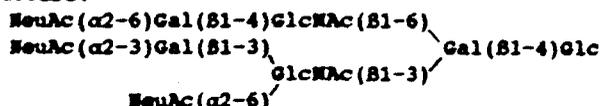
PRIMARY STRUCTURE OF A TRISIALYLATED OLIGOSACCHARIDE
FROM HUMAN MILK

Sophie FIEVRE, Jean-Michel WIERUSZESKI, Jean-Claude MICHALSKI,
Jérôme LEMOINE, Jean MONTREUIL and Gérard STRECKER*

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS
n°111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois,
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received April 18, 1991

A novel oligosaccharide has been isolated from human milk and identified as a trisialylated derivative of lacto-N-hexaose. This compound was purified by combining ion-exchange chromatography, preparative paper chromatography and high performance liquid chromatography. Structural analyses by methylation, fast atom bombardment-mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy are consistent with the following structure:



© 1991 Academic Press, Inc.

Human milk contains numerous fucosylated and sialylated oligosaccharides the structure of which is related to cell surface antigens epitopes [1-9]. Up to now, more than 70 oligosaccharides have been characterized. The introduction of HPLC has made possible the separation of new isomers that could not be purified by traditional technics of gel-filtration, ion-exchange chromatography or paper chromatography.

In the present paper, we describe the isolation of the first trisialylated oligosaccharide found in human milk.

MATERIALS AND METHODS

Fractionation of milk sialylated oligosaccharides : Fractionation of milk oligosaccharides leading to the isolation of sialylated oligosaccharides has been previously described [10]. The sialylated oligosaccharides were eluted from an anion-exchanger (Dowex 1x2; 200-400 mesh; HCOO⁻ form) with a discontinuous gradient of pyridine-acetate buffer (pH 5.5) from 5 to 500 mM.

* Author for correspondence.

Abbreviations: HPLC, high performance liquid chromatography; FAB-MS, fast atom bombardment-mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; GLC-MS, gas-liquid chromatography-mass spectrometry.

Analytical procedures : Descending paper chromatography was performed on Whatman n°3 paper using the solvent pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (5:5:1:3, by vol.) and sugars were detected with an aniline oxalate reagent [11]. Preparative reversed phase HPLC of native sialylated oligosaccharides was carried out on two 5µm ODS Zorbax columns (0.94 cm x 25 cm ; du Pont Instrument, Paris, France). The HPLC apparatus was equipped with a refractometer. The solvent used was a triethylamine-acetic buffer (10 mM, pH 5) [5].

Methylation analysis : The oligosaccharide was methylated and then methanolysed (methanol-0.5M HCl, 24 h at 80°C). The partially methylated methyl glycosides were acetylated [12] (1:1 pyridine-acetic anhydride, 0.2ml) and the products were analysed by GLC-MS using a capillary column (0.33 mm x 25 m) coated with fused silica CP-SIL 5CB (temperature program : 100 to 240°C, at 4°/min).

FAB-MS : FAB-MS was performed on a Kratos Concept II HH mass spectrometer using xenon as the bombarding atom (operating conditions : 7.3 kV, 1.2 ms). The spectra were recorded in positive-ion mode at 8 kV acceleration voltage. The permethylated oligosaccharide (5-10 µg), dissolved in 1 µl of methanol, was added to the thioglycerol matrix with previous coating with sodium acetate.

NMR spectroscopy : The 400 MHz ^1H -NMR experiments were performed on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mixed probe-head, operating in the pulse Fourier transform mode and controlled by an aspect 3000 computer. Each oligosaccharide was dissolved in 0.4 ml H_2O after three exchanges with H_2O (99.96% atom ^1H , Aldrich, Milwaukee, WI, USA) and intermediate lyophilisations. The products were analysed at 300 K with a spectral width of 3000 Hz for 16 K frequency domain points and time domain data points giving a final digital resolution of 0.365 Hz/ point. The 2D homonuclear COSY 45 experiments were performed using the standard Bruker pulse programme COSY.

RESULTS AND DISCUSSION

The acidic oligosaccharides eluted from anion-exchanger by 200 mM pyridine-acetate buffer were submitted to a first preparative paper chromatography of 2 days in order to isolate the disialyllacto-N-tetraose which constituted the major compound. The material remaining at the starting point was further fractionated by paper chromatography developed during 2 weeks. The compound having a migration rate of 0.14 relative to disialyllacto-N-tetraose was obtained as an homogeneous spot (Fig. 1) but was further fractionated into 5 peaks by HPLC chromatography (Fig. 2). Finally, 2 mg of compound 1 were isolated in a pure state, starting from 10 l of human milk.

Sugar analysis of the sialyloligosaccharide 1 indicated the presence of 3 Gal, 1 Glc, 2 GlcNAc and 3 NeuAc residues. This result was confirmed by the FAB-MS analysis of the permethylated compound which furnished a pseudo-molecular ion m/z 2459.3 (Fig. 3), corresponding to the formula $\text{C}_{108}\text{H}_{189}\text{O}_{55}\text{N}_5\text{Na}$ (chemical mass : 2458). Moreover, the two primary fragments at m/z 825 (NeuAc;Gal;GlcNAc) and 1186 (NeuAc₂;Gal;GlcNAc) are significant of the occurrence of two branches, respectively mono and disialylated (Fig. 4). Analysis by GLC-MS of the methylated

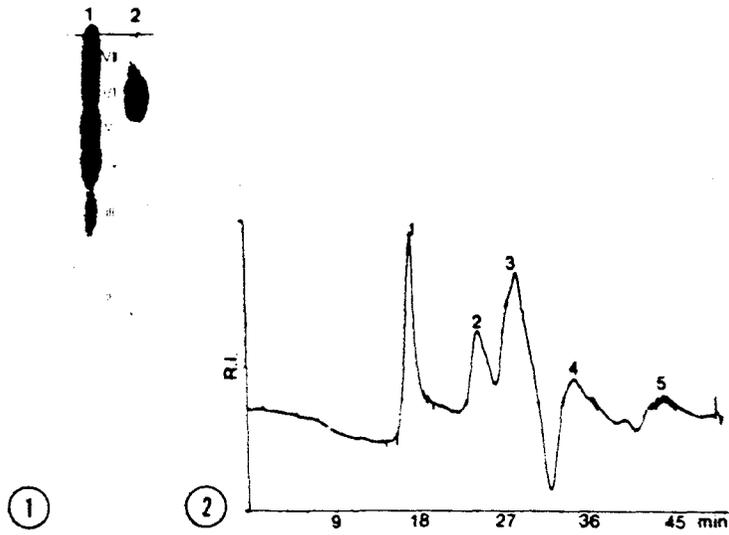


Fig. 1 . Paper chromatography of the sialyloligosaccharides obtained by anion exchange chromatography. For experimental conditions, see Materials and Methods. 1 : Total fraction; 2 : Fraction containing the trisialyloligosaccharide, obtained by preparative paper chromatography.

Fig. 2 . HPLC of fraction VI. For experimental conditions, see Materials and Methods. R.I. : refractive index. Peak 1 corresponds to the trisialyloligosaccharide.

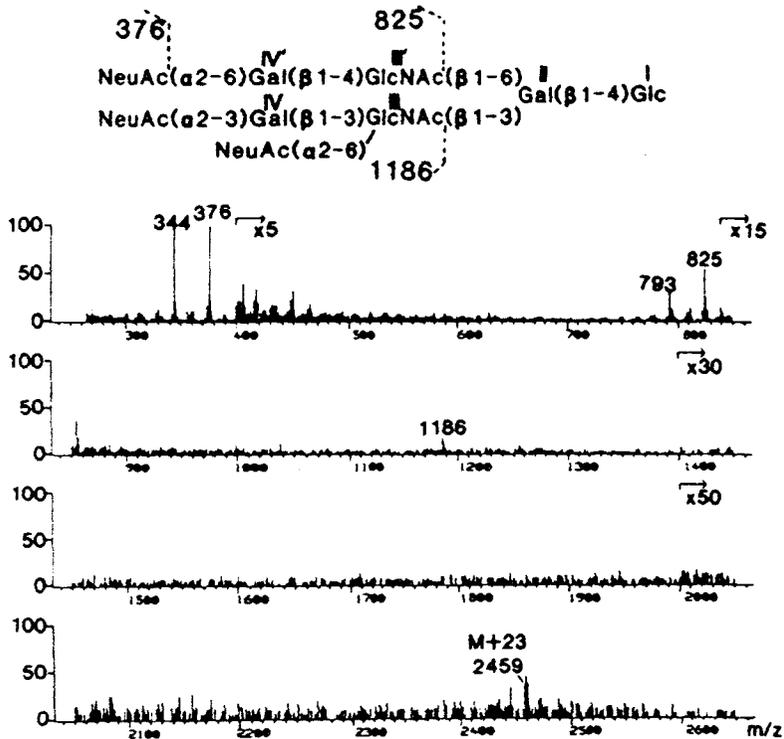


Fig. 3 . FAB-MS of the permethylated trisialyloligosaccharide.

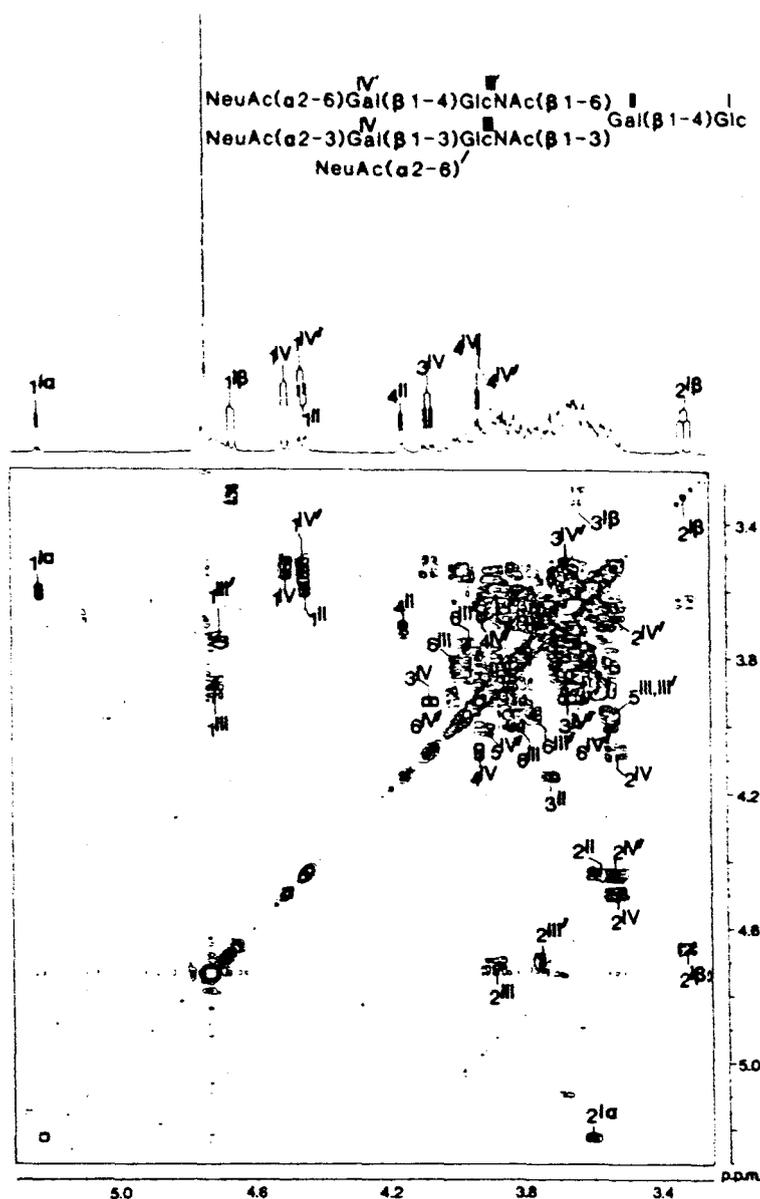


Fig. 4 . 2D-COSY spectrum of the trisialyloligosaccharide.

monosaccharides showed the presence of 4,7,8,9 Me₄Neu(Me)Ac; 2,3,4 Me₃Gal; 2,4,6 Me₃Gal; 2,4 Me₂Gal; 3,6 Me₂GlcN(Me)Ac; 4 Me GlcN(Me)Ac and 2,3,6 Me₃Glc in the ratio 3:1:1:1:1:1:1, respectively.

The ¹H-NMR data are given in Table 1 and in Fig. 4. The H-1 signals of Gal and GlcNAc residues can be easily distinguished on the COSY spectrum according to the upfield resonances of the Gal H-2 atoms, in opposition with the downfield resonances of the GlcNAc H-2 atoms. The H-1 signal of Glc B is correlated with the H-2 signal at 3.320 ppm.

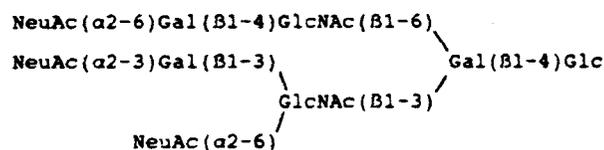
Table 1. ¹H- chemical shifts (ppm) for trisialyloligosaccharide

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAC
NeuAc(α2-6)	-	-	1.714(ax) 2.672(eq)	3.647	N.D.	N.D.	-	2.027
IV' Gal(β1-4)	4.443	3.533	3.669	3.926	3.94	4.01	3.55	-
III' GlcNAc(β1-6)	4.692	3.757	N.D.	N.D.	3.54	3.92	3.79	2.091(α) 2.088(β)
NeuAc(α2-3)	-	-	1.783(ax) 2.758(eq)	3.678	N.D.	N.D.	-	2.027
IV Gal(β1-3)	4.496	3.529	4.078	3.931	N.D.	N.D.	N.D.	-
NeuAc(α2-6)	-	-	1.684(ax) 2.746(eq)	3.678	N.D.	N.D.	-	2.037
III GlcNAc(β1-3)	4.726	3.889	N.D.	N.D.	3.54	3.96	3.82	2.019
II Gal(β1-4)	4.439	3.581	3.717	4.153	N.D.	N.D.	N.D.	-
I Glc α	5.223	3.608	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
B	4.659	3.320	3.640	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-

The structural feature NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GlcNAc(β1-3) is characterized by significant Gal H-1 resonances observed at δ=4.499 ppm and δ= 4.726 ppm, as inferred by comparison with reference compound disialyllacto-N-tetraose [7]. It can be also deduced from the characteristic chemical shifts of the H-3ax and H-3eq of NeuAc residue α-2,6-linked to GlcNAc-III [7], and the lowfield shifted value of GalIV H-3 at δ=4.078 ppm, correlated with the H-1 and H-2 resonances on the COSY spectrum.

The structure of the β-1,6-linked branch can be also confirmed by the relevant NMR parameters of the NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) sequence previously described in compounds S2:10:6 and S2:11:4 by Grönberg et al. [5].

The combination of sugar analysis methylation, FAB-MS and NMR spectroscopy allows to propose the following structure for the new oligosaccharide:



In spite of the relative low amount of this trisialyloligosaccharide in human milk, it may be assumed that it represents the major compound of this new series of sialylated material. Indeed, it possesses the lacto-N-hexaose core [13], which predominates among the hexaose series.

The Gal(B1-3)GlcNAc branch (type I) is sialylated at the C-3 and C-6 position of Gal and GlcNAc, respectively, as in disialyllacto-N-tetraose which is the major disialylated oligosaccharide of human milk. The Gal(B1-4)GlcNAc branch is α -2,6-sialylated, and this branch of type II had not yet been found to bear an α -2,3-linked sialic acid residue.

Acknowledgments : This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte n°111: Relations structure-fonction des constituants membranaires; Director: Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by the Ministère de l'Education Nationale. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR apparatus. We are indebted to Miss Catherine Alonso (CNRS technician) for her skillful technical assistance.

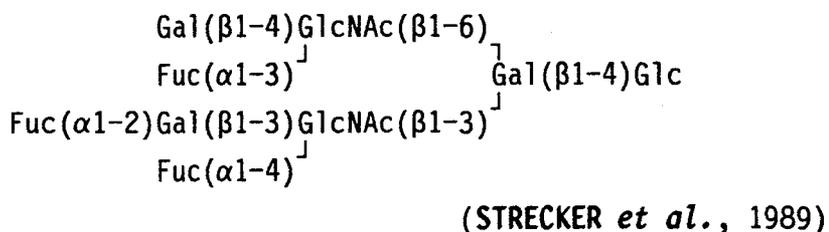
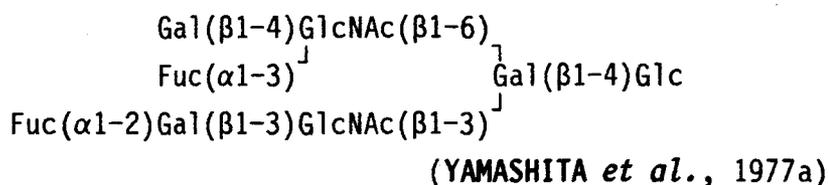
REFERENCES

- [1] Kobata, A. (1977) in "The Glycoconjugates" (Horowitz, J. and Pigman, W. Eds) I, 423-440, Academic Press New York.
- [2] Smith, D.F., Prieto, P.A., McCrumb, D.K. and Wang, W.C. (1987) J. Biol. Chem. 262, 12040-12047.
- [3] Bruntz, R., Dabrowski, U., Dabrowski, J., Ebersold, A., Peter-Katalinic, J. and Egge, H. (1988) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 257-273.
- [4] Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C. and Montreuil, J. (1988) Glycoconjugate J. 5, 385-396.
- [5] Grönberg, G., Lipniunas, P., Lundgren, T., Erlansson, K., Lindh, F. and Nilsson, B. (1989) Carbohydr. Res. 191, 261-278.
- [6] Kitagawa, H., Nakada, H., Kurosaka, A., Hiraiwa N., Numata, Y., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Shimada, I. and Inagaki, F. (1989) Biochemistry 28, 8891-8897.
- [7] Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C. and Montreuil, J. (1989) Glycoconjugate J. 6, 67-83.
- [8] Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C. and Montreuil, J. (1989) Glycoconjugate J. 6, 169-182.
- [9] Grönberg, G., Lipniunas, P., Lundgren, T., Lindh, F. and Nilsson, B. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 278, 297-311.
- [10] Wieruszkeski, J.M., Chekkor, A., Bouquelet, S., Montreuil, J., Strecker, G., Peter-Katalinic, J. and Egge, H. (1985) Carbohydr. Res. 137, 127-138.
- [11] Partridge, S.M. (1950) Biochem. Soc. Symp. 3, 52-61.
- [12] Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489-502.
- [13] Kobata, A. and Ginsburg, V. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1525-1529.

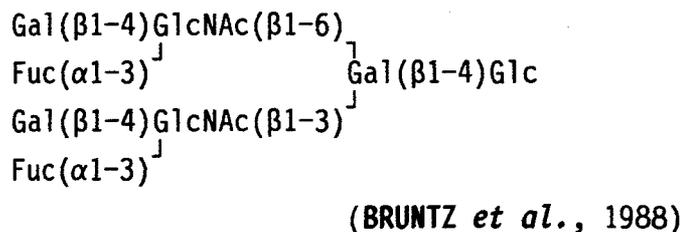
C - CONCLUSION

L'étude des fractions oligosaccharidiques neutre et acide du lait de Femme nous a permis, d'une part, de faire une attribution complète des paramètres RMN de 5 oligosaccharides précédemment caractérisés par d'autres auteurs. Dans le cas des glucides récemment décrits, les quantités de matériel isolé étaient alors trop faibles pour réaliser une telle étude. Ces oligosaccharides sont répertoriés ci-dessous selon la nature de leur "noyau".

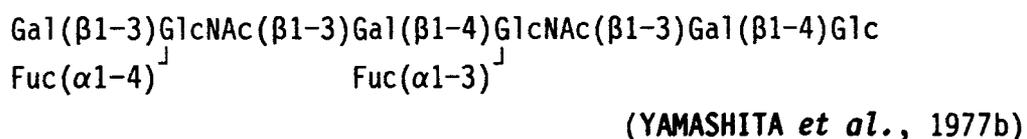
LACTO-N-HEXAOSE



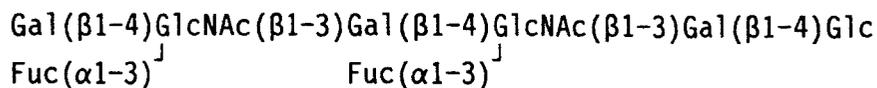
LACTO-N-NEOHEXAOSE



Para-LACTO-N-HEXAOSE



Para-LACTO-N-NEOHEXAOSE

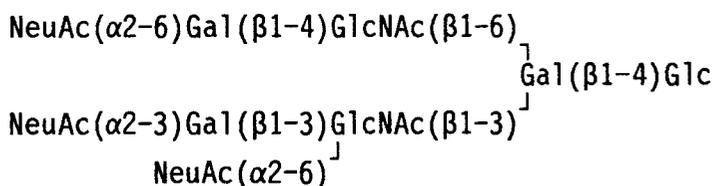


(YAMASHITA *et al.*, 1977b)

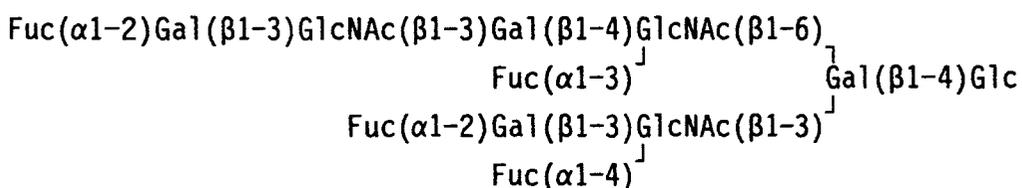
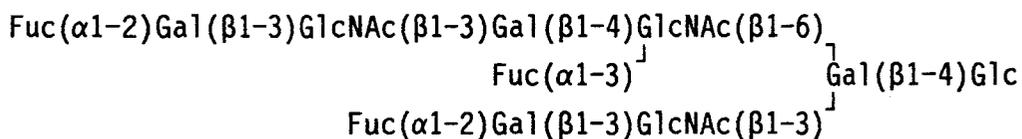
Ces deux derniers oligosaccharides dérivés des noyaux *para*-lacto-N-hexaose et *para*-lacto-N-néo-hexaose avaient été caractérisés en mélange. L'oligosaccharide porteur du déterminant dimère Le^x a été décrit, associé à un lipide, dans des adénocarcinomes du colon et du foie humain (HAKOMORI *et al.*, 1984; ITZKOWITZ *et al.*, 1986). Il est reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal FH4 (FUKUSHI *et al.*, 1984a).

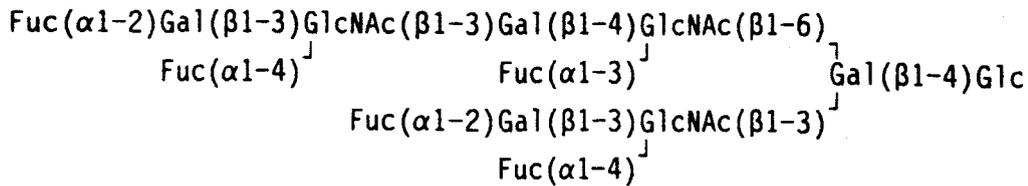
D'autre part, nous avons pu, par l'association de la résonance magnétique nucléaire à la spectrométrie de masse, élucider la structure de 5 nouveaux oligosaccharides de haute masse moléculaire. Ces oligosaccharides porteurs des déterminants H, Le^b ou Le^x sont répertoriés ci-dessous selon la nature de leur "noyau".

LACTO-N-HEXAOSE

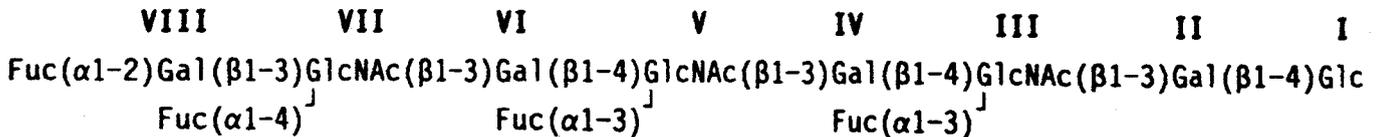


Iso-LACTO-N-OCTAOSE





Para-LACTO-N-OCTAOSE



Le *para*-Lacto-N-octaose est un nouveau "noyau" octasaccharidique.

La description de cette nouvelle structure porte maintenant à 12 le nombre de noyaux rencontrés dans les glucides du lait de Femme. Nous pouvons remarquer qu'à ce stade de l'étude, les oligosaccharides isolés dérivent essentiellement du "noyau" *iso*-Lacto-N-octaose, caractérisé par **STRECKER *et al.*** en 1989. Nous n'avons effectivement pas retrouvé de glucides dérivés des noyaux Lacto-N-octaose et Lacto-N-néooctaose décrits par le groupe de **KOBATA (YAMASHITA *et al.*, 1976b; TACHIBANA *et al.*, 1978).**

Nous avons alors réalisé une hydrolyse partielle de la fraction oligosaccharidique neutre du lait de Femme (voir appendice technique) afin de vérifier l'existence de ces 2 noyaux (voir Figure C, page 142). L'hydrolyse partielle entraîne la perte des résidus de fucose, dont les liaisons sont plus fragiles. Nous voyons ainsi apparaître, dans le cas du gynolactose hydrolysé, des "bandes" correspondant à chaque famille de noyaux (di- (A), tétra- (B), hexa- (C), octa- (D) et décasaccharides (E); voir Figure C, page 142 et Tableau I, page 29). L'étude par chromatographie liquide haute performance et résonance magnétique nucléaire de la fraction contenant les octasaccharides ne nous a pas permis de caractériser ces 2 noyaux. Par contre, nous avons pu isoler et caractériser l'*iso*-Lacto-N-octaose. Cependant, avant de mettre totalement en doute leur existence, une étude plus approfondie des fractions mono- et disialylées devra être poursuivie.

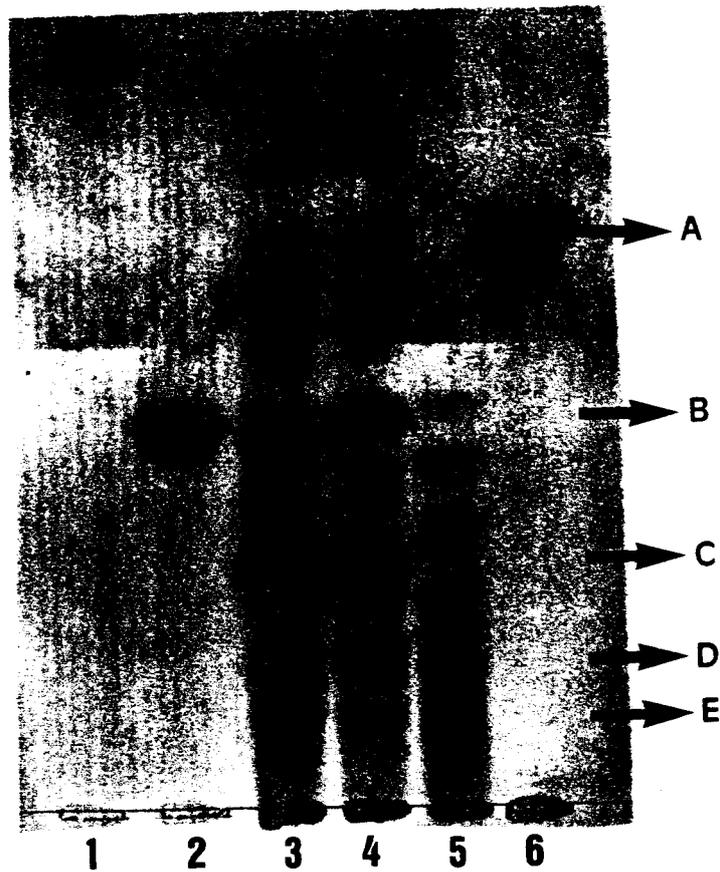


Fig. C : Chromatographie sur couche mince de la fraction neutre hydrolysée (3 migrations)

1 : Témoin Fucose; 2 : Témoin Lacto-N-tétraose; 3 et 4 : Fraction neutre hydrolysée; 5 : Fraction neutre native; 6 : Témoin lactose.

II - ETUDE STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS ISOLES D'UN PSEUDOMYXOME HUMAIN

Comme nous l'avons vu précédemment, les oligosaccharides du lait de Femme peuvent être porteurs de déterminants identiques aux épitopes glycaniques des glycoprotéines ou des glycolipides membranaires des cellules tumorales, comme le Le^x, le dimère Le^x ou encore le sialyl Le^a.

Parallèlement à notre étude sur ces glucides libres du lait de Femme, nous avons eu la possibilité d'étudier une substance gélatineuse provenant d'une tumeur du péritoine humain appelée pseudomyxome. Celle-ci nous a été donnée par le Docteur GROSLAMBERT du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Grenoble.

A notre connaissance, aucune étude sur la nature des antigènes présents dans cette substance mucoïde n'avait été faite.

Ainsi, l'étude de la fraction glycanique nous a permis de déterminer la structure des principaux antigènes glucidiques. L'épitope de l'un de ces antigènes majeurs est curieusement identique à celui porté par un des oligosaccharides majeurs du lait de Femme, à savoir la séquence disialylée NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc-.

Primary structure of five oligosaccharide-alditols released from pseudomyxoma peritonei by reductive β -elimination.

Presence of NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc sequence in the mucoïd substance.

Sophie HAEUW-FIEVRE, Jean-François HAEUW, Jean-Michel WIERUSZESKI,
Jean-Claude MICHALSKI and Gérard STRECKER

*Laboratoire de Chimie Biologique, UMR du CNRS n°111, Université des
Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq (FRANCE)*

Correspondence to : Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte du
C.N.R.S. n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

Submitted to *Cancer Research*

ABSTRACT

Five oligosaccharide-alditols released from the *Pseudomyxoma peritonei* mucoid substance by reductive β -elimination were studied by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. Among the major components analyzed, sialyl Lewis X and disialyl isolactosamine-O-containing carbohydrate determinants were characterized. The disialyl isolactosamine determinant, previously found to be associated to the carbohydrate moiety of adenocarcinoma specific glycolipids, is here isolated for the first time from mucus glycoprotein.

INTRODUCTION

Pseudomyxoma peritonei is a rare disease which may develop in patients with a benign or a low grade malignant intestinal tumor. It is characterized by an intraperitoneal hypersecretion of gelatinous substance rich in carbohydrates which could be identified as a mucin, on the basis of the sugar composition and the alkali-lability of the glycan-protein linkages [1]. In the present report, we describe the isolation and structural characterization of five major O-glycosidic oligosaccharides released by reductive β -elimination.

MATERIAL AND METHODS

* Preparation of oligosaccharide-alditols

The delipidated dry material (6 g) was submitted to alkaline reductive degradation in 50 mM NaOH containing 1M NaBH₄ (400 ml) at 37°C for 24 h. The reaction was stopped by acetic acid, followed by centrifugation. After evaporation, boric acid was removed by distillation in the presence of methanol. The material was then desalted on a Biogel P4 column. Neutral and acidic oligosaccharide-alditols were fractionated on anion exchanger (Dowex 1 x 2; mesh 200-400; HCOO⁻ form; 2 x 40 cm) which was stepwise eluted by water, then by 30, 100 and 200 mM pyridine acetate buffer (pH 6.0) (1 l of each). Each fraction was desalted on Biogel P2 and fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC).

* Analytical procedures

Oligosaccharide-alditols were isolated by HPLC on primary-amine-bonded silica (Supelcosil LC-NH₂, 4.6 mm x 25 cm; Supelco Inc., Bellefonte, USA) using acetonitrile / 30 mM phosphate (pH 7.0) gradient, with a flow rate of 1.5 ml/min. Oligosaccharides were detected by UV spectroscopy at 206 nm.

* NMR spectroscopy

The 400 MHz ¹H-NMR experiments were performed on a Bruker AM-400

WB spectrometer equipped with a 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - mixed probe head, operating in the pulse Fourier transform mode and controlled by an Aspect 3000 computer. After three exchanges with $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.95% atoms ^2H , Aldrich) and intermediate lyophilisations, the products were analysed with a spectral width of 3000 Hz for 16 K frequency domain points and the time domain data points giving a final digital resolution of 0.365 Hz/point. The chemical shifts are given relative to sodium-4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured to the methyl of internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm for ^1H) in $^2\text{H}_2\text{O}$ at 27°C.

The 2-D homonuclear-correlated spectroscopy (2D COSY) experiments were performed using the standard Bruker pulse library.

RESULTS

* Fractionation of reduced oligosaccharides

Four fractions, Neutral (NF), 30, 100 and 200 mM, eluted from the anion exchanger were analysed by HPLC using a LC-NH₂ column. All the fractions exhibited an extreme complexity (di to dodecasaccharide-alditols). Moreover the high molecular weight components gave a very bad resolution by HPLC. For this reason, we used in the present study a gradient CH₃CN : Phosphate buffer which separated the low molecular weight components (up to hexasaccharides) and furnished the higher isomers in one piece, by increasing the proportion of water (Fig. 1). These fractions will be subjected to further analysis. This study concerns the structural investigation of the five major oligosaccharide-alditols isolated from the fractions NF, 100 and 200.

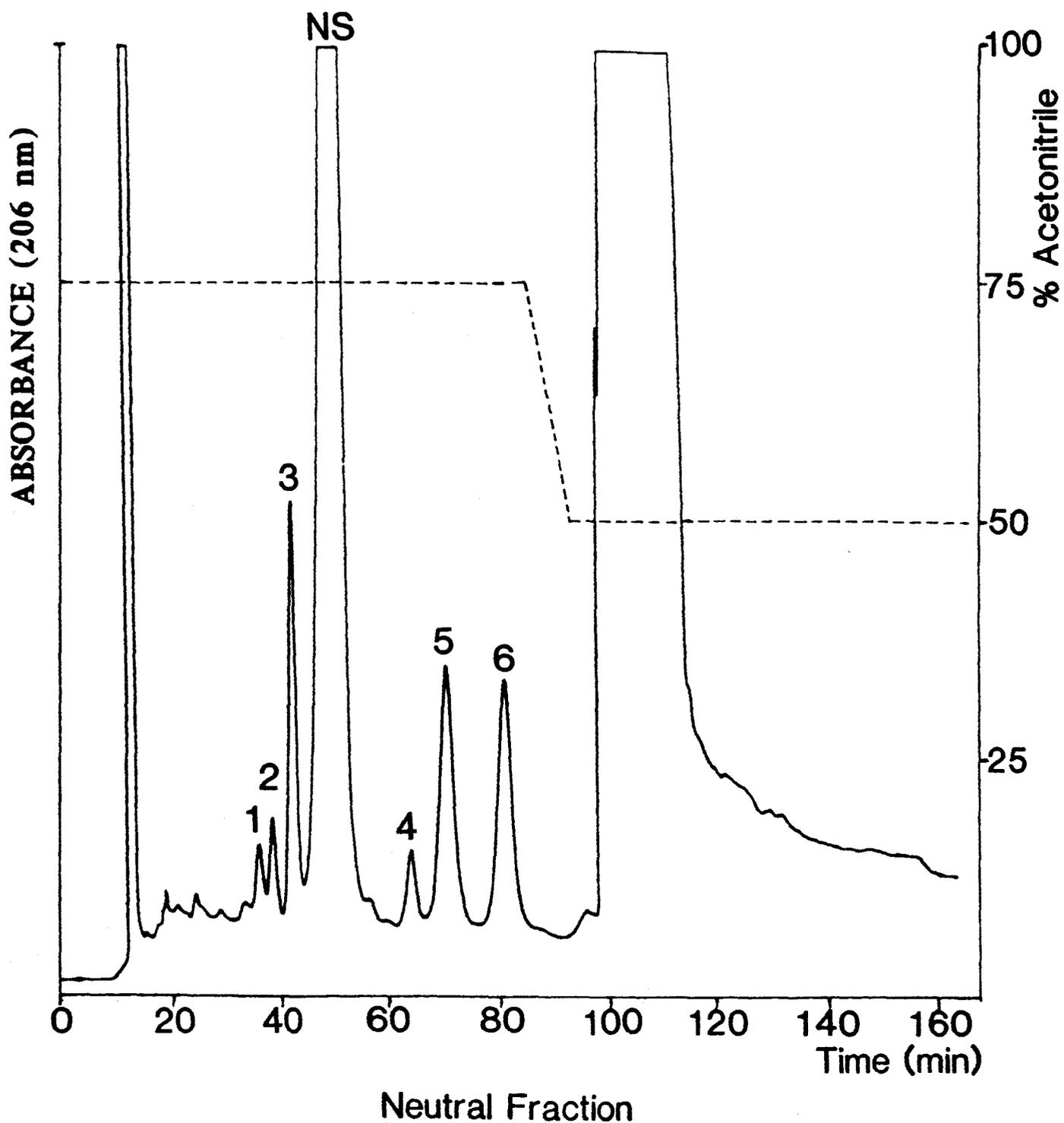


Fig. 1 : HPLC chromatogram of fraction NF (Neutral fraction)
NS = Non sugar material; Flow rate : 1.5 ml/minute.
(Acetonitrile/Phosphate buffer gradient).

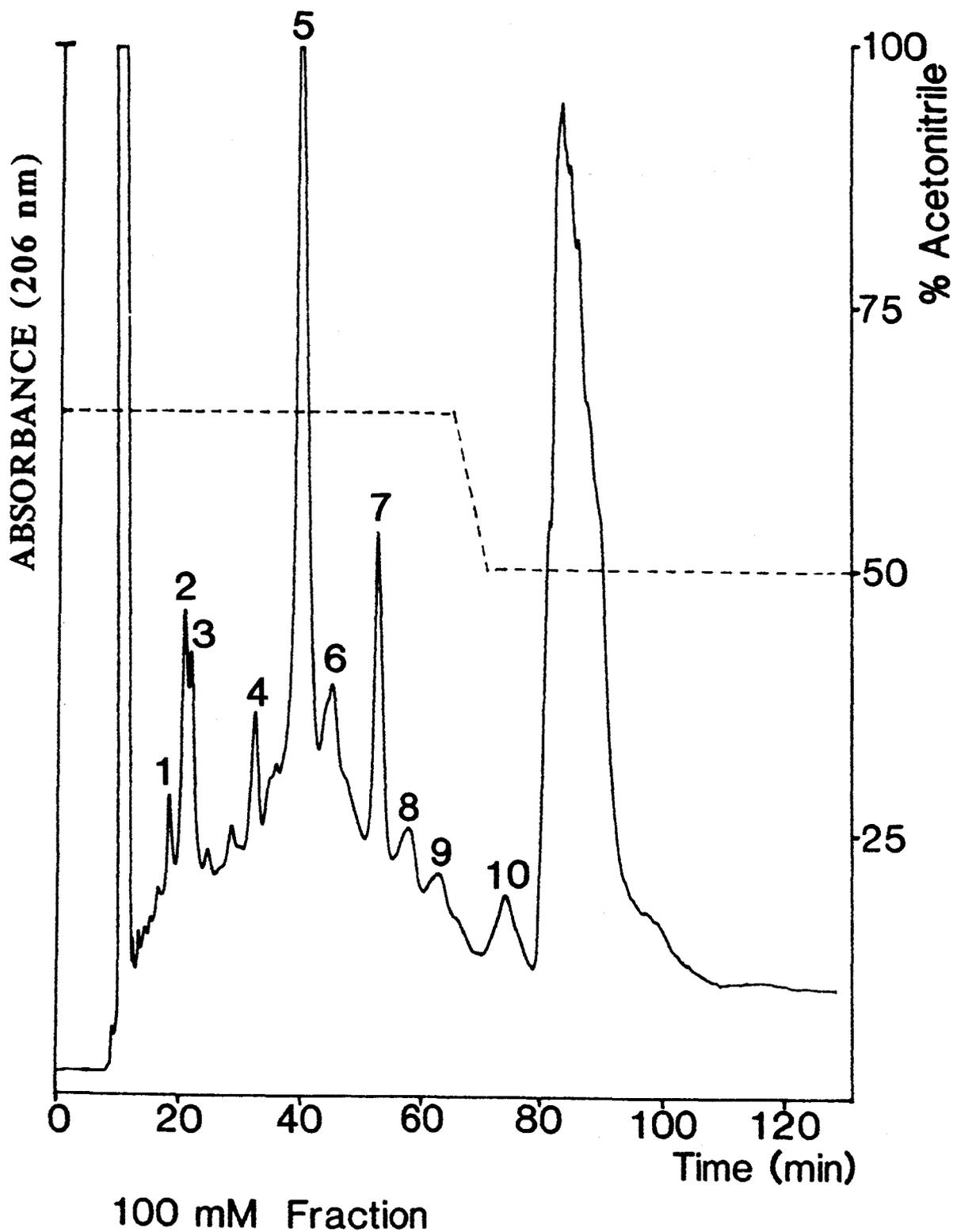
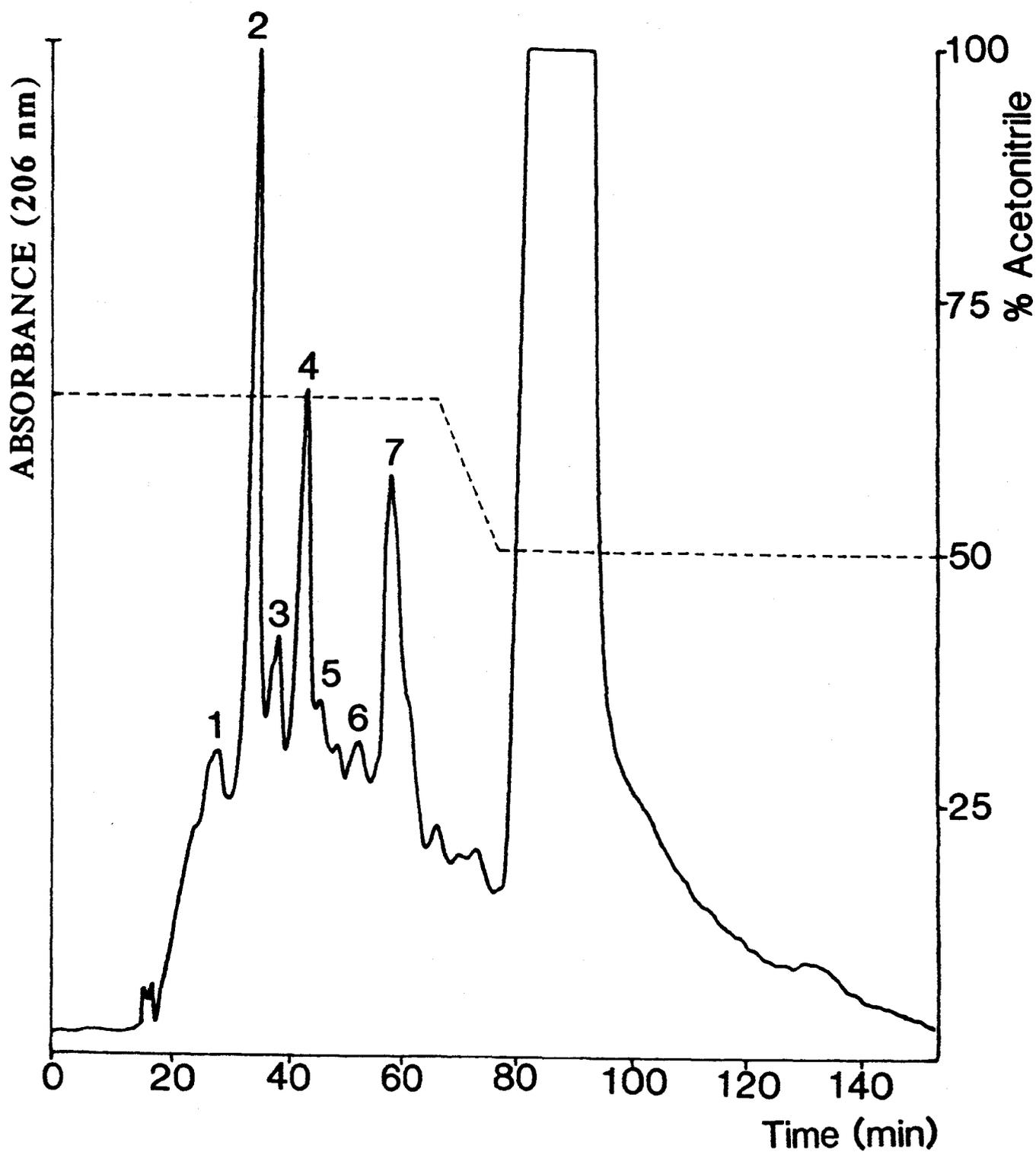


Fig. 1 (continued) : HPLC chromatogram of fraction 100 (100 mM PyrAc)
Flow rate : 1.5 ml/minute.
(Acetonitrile/Phosphate buffer gradient).



200 mM Fraction

Fig. 1 (continued) : HPLC chromatogram of fraction 200 (200 mM PyrAc)

Flow rate : 1.5 ml/minute.

(Acetonitrile/Phosphate buffer gradient).

* NMR analyses

- FRACTION NF-5 (39 mg)

The ^1H -NMR spectrum of NF-5 indicated a disaccharide-alditol structure with the GlcNAc unit β ($J_{1,2} \sim J_{2,3} \sim J_{3,4} \sim J_{4,5} \sim 10$ Hz) and the GalNAc-ol unit (δ H-2 = 4.283 ppm; δ H-5 = 4.135 ppm; δ NAc = 2.038 ppm). The chemical shifts of ^1H resonances (Table I) accord exactly with those of the reference compound GlcNAc(β 1-3)GalNAc-ol [2,3] (Fig.2). The complete ^{13}C -NMR assignments of the compound are reported in Table II.

- FRACTION NF-6 (32 mg)

The ^1H -NMR data for fraction FN-6 are quite superposable to those described for the classical Gal(β 1-3)GalNAc-ol structure isolated from various sources [3-5]. The complete ^1H - and ^{13}C -NMR assignments for this compound are reported in Tables I and II.

- FRACTION 100-5 (6.7 mg)

The ^1H -NMR spectrum of component 100-5 (Fig. 3) shows three doublets in the anomeric region, together with the Fuc H-5 quadruplet and two NeuAc H-3ax and two NeuAc H-3eq resonances. The H-1 resonances observed at 4.508 and 4.646 ppm were easily related to Gal and GlcNAc residues, according to their $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ vicinal coupling constants observed on the two-relayed COSY spectrum. The sequence GlcNAc(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GalNAc-ol was deduced from the GalNAc-ol H-3

TABLE I - ¹H chemical shifts of oligosaccharide alditols

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	NAc
GlcNAc(β1-3)	4.611	3.735	3.617	3.348	3.486	3.948	-	-	-	2.088
GalNAc-o1	3.614 ^a	4.283	3.993	3.540	4.135	3.658	-	-	-	2.038
						3.618				
Gal(β1-3)	4.476	3.563	3.688	3.915	3.729	3.74	-	-	-	-
GalNAc-o1	3.787	4.386	4.053	3.500	4.189	3.677	-	-	-	2.056
	3.739					3.626				
NeuAc(α2-3)	-	-	1.798(ax) 2.772(eq)	3.688	3.859	3.678	3.597	3.891	3.877 3.645	2.031
Gal(β1-3)	4.540	3.606	4.116	3.927	3.706	3.80 3.72	-	-	-	-
[NeuAc(α2-6)]	-	-	1.692(ax) 2.721(eq)	3.674	3.821	3.713	3.576	3.884	3.877 3.631	2.031
GalNAc-o1	3.808	4.374	4.066	3.522	4.238	3.855 3.481	-	-	-	2.041
	3.739									
NeuAc(α2-3)	-	-	1.796(ax) 2.759(eq)	3.682	3.853	3.666	3.604	3.894	3.88 3.64	2.034
Gal(β1-4)	4.508	3.524	4.092	3.939	3.604	3.76 3.71	-	-	-	-
[Fuc(α1-3)]	5.124	3.682	3.893	3.779	4.804	1.169	-	-	-	-
GlcNAc(β1-3)	4.642	3.981	3.903	3.903	3.616	4.038 3.980	-	-	-	2.063
[NeuAc(α2-6)]	-	-	1.697(ax) 2.734(eq)	3.676	3.827	3.701	3.586	3.894	3.88 3.64	2.030
GalNAc-o1	3.612	4.249	3.984	3.625	4.176	3.827 3.488	-	-	-	2.024
	3.581									
NeuAc(α2-3)	-	-	1.781(ax) 2.760(eq)	3.661	3.846	3.701	3.58	3.87	3.87 3.64	2.029
Gal(β1-3)	4.484	3.526	4.080	3.931	3.68	3.72	-	-	-	-
[NeuAc(α2-6)]	-	-	1.721(ax) 2.730(eq)	3.675	3.846	3.701	3.57	3.87	3.87	2.029
GlcNAc(β1-3)	4.609	3.873	3.784	3.539	3.57	3.92 3.86	-	-	-	2.054
Gal-o1	3.697	4.126	3.798	3.890	3.994	3.671 3.636	-	-	-	-
	3.666									

Table II - ^{13}C chemical shifts of oligosaccharide-alditols

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	CO	CH ₃
GlcNAc(β 1-3)	103.69	57.18	74.48	71.28	76.73	62.11	-	-	-	176.29	23.59
GalNAc-ol	61.59	52.57	78.11	70.56	70.83	64.22	-	-	-	175.49	23.39
Gal(β 1-3)	105.18	72.27	73.68	69.69	76.30	62.25	-	-	-	-	-
GalNAc-ol	61.79	52.66	77.64	70.30	70.56	64.14	-	-	-	175.96	23.19
NeuAc(α 2-3)	175.98	101.01	41.09	69.54	53.00	74.26	69.42	73.09	63.90	176.33	23.35
Gal(β 1-3)	104.93	70.60	76.86	68.66	76.28	62.15	-	-	-	-	-
[NeuAc(α 2-6)]	174.87	101.65	41.46	69.54	53.19	73.86	69.60	72.98	63.96	176.33	23.35
GalNAc-ol	61.83	52.61	77.35	70.48	69.11	66.89	-	-	-	175.90	23.20
NeuAc(α 2-3)	175.19	101.02	41.08	69.63	53.05	74.23	69.43	73.13	63.93	176.37	23.36
Gal(β 1-4)	102.90	70.60	76.93	68.66	76.17	62.77	-	-	-	-	-
[Fuc(α 1-3)]	99.87	69.09	70.51	73.24	68.03	16.62	-	-	-	-	-
GlcNAc(β 1-3)	102.90	57.54	76.11	73.13	76.28	61.24	-	-	-	175.50	23.67
[NeuAc(α 2-6)]	174.87	101.71	41.51	69.59	53.21	73.90	69.63	73.04	64.01	176.33	23.36
GalNAc-ol	61.67	52.75	78.10	71.01	69.46	66.78	-	-	-	175.74	23.43
NeuAc(α 2-3)	175.15	100.98	41.13	69.70	52.99	74.13	69.39	73.13	63.82	176.30	23.36
Gal(β 1-3)	104.81	70.43	76.98	68.61	76.41	62.32	-	-	-	-	-
[NeuAc(α 2-6)]	174.68	101.66	41.40	69.66	53.13	73.84	66.66	73.01	63.82	176.26	23.36
GlcNAc(β 1-3)	102.81	56.08	83.50	69.70	75.19	64.80	-	-	-	176.07	23.72
Gal-ol	63.93	71.07	79.41	70.78	70.17	64.21	-	-	-	-	-

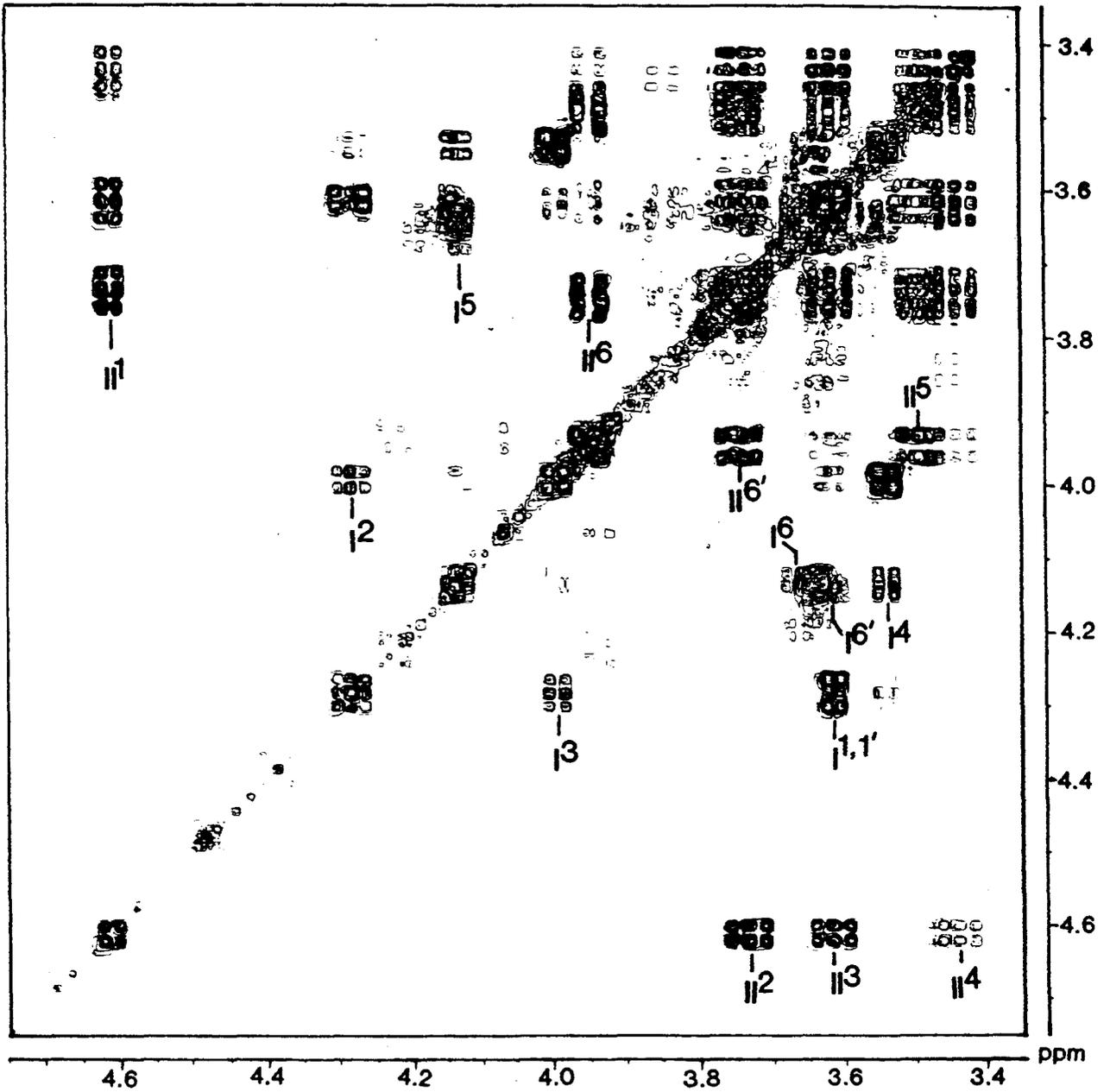
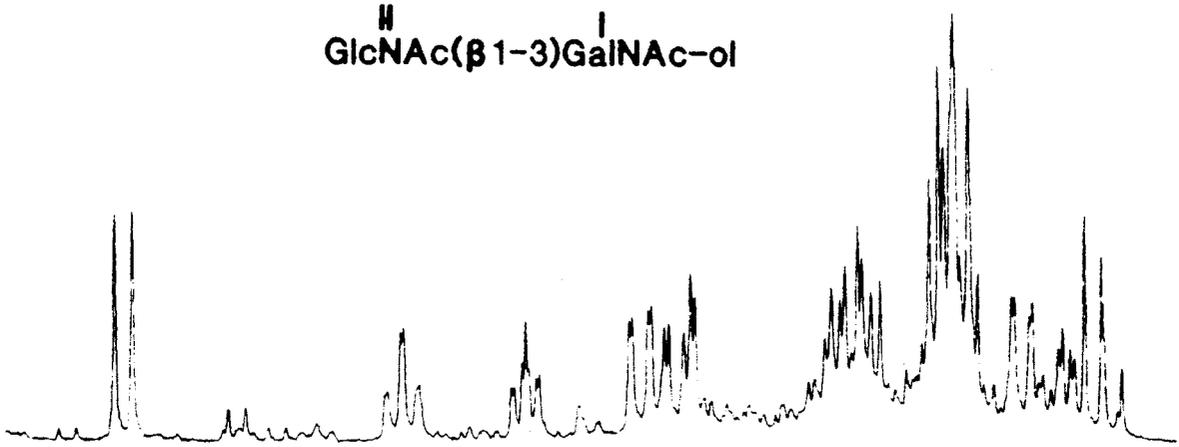
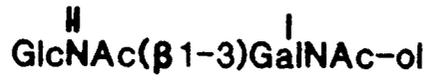


Fig. 2 : Double-relayed COSY spectrum of compound NF-5. II¹, II²
indicate the chemical shifts of H-1, H-2 of sugar II.

(3.984 ppm) and H-6 (3.488; 3.487 ppm) resonances [6]. The H-1, H-5 and CH₃ Fuc resonances at δ = 5.124; 4.804 and 1.169 ppm, respectively, indicated for Fuc an $\alpha(1\rightarrow3)$ linkage to GlcNAc [6]. The H-3ax and H-3eq signals of one of the NeuAc residues were observed at δ = 1.796 and 2.759 ppm, respectively and indicated the presence of a α -2,3-linked NeuAc residue to Gal, the H-3 of which being deshielded at δ = 4.092 ppm. These findings determine the structure of component 100-5 as :
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GalNAc-ol.

The combination of 2D homonuclear and heteronuclear spectroscopy led to the complete ¹H and ¹³C-NMR assignments for the oligosaccharide-alditol (Fig. 3 and 4; Tables I and II).

- FRACTION 200-2 (40 mg)

The ¹H-NMR spectrum of 200-2 is quite superposable to that of NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GalNAc-ol [5] (Fig. 5). The complete ¹H and ¹³C-NMR assignments for the compound are reported in Tables I and II.

- FRACTION 200-4 (3 mg)

The double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide-alditol 200-4 is shown in Fig. 6, from which a near-complete assignment of the signals could be made. The region of NAc signals indicates the presence of NeuAc (δ NAc = 2.029 ppm) and GlcNAc (δ NAc = 2.054 ppm), while NAc signal related to GalNAc-ol residue is not present. The set of the H-2 to H-6 resonances of residue I (see Fig. 6 for nomenclature) are

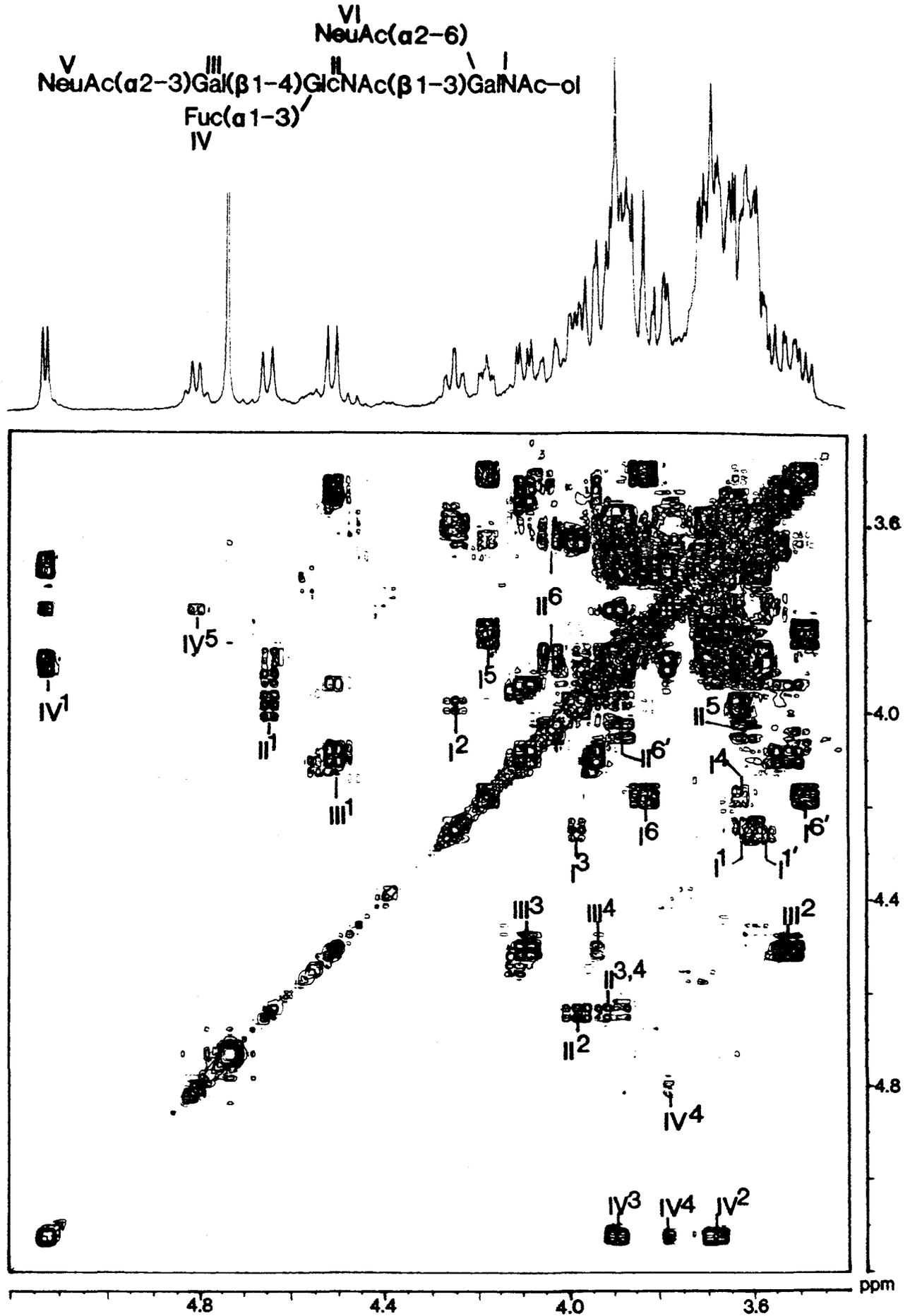


Fig. 3 : Double-relayed COSY spectrum of compound 100-5.

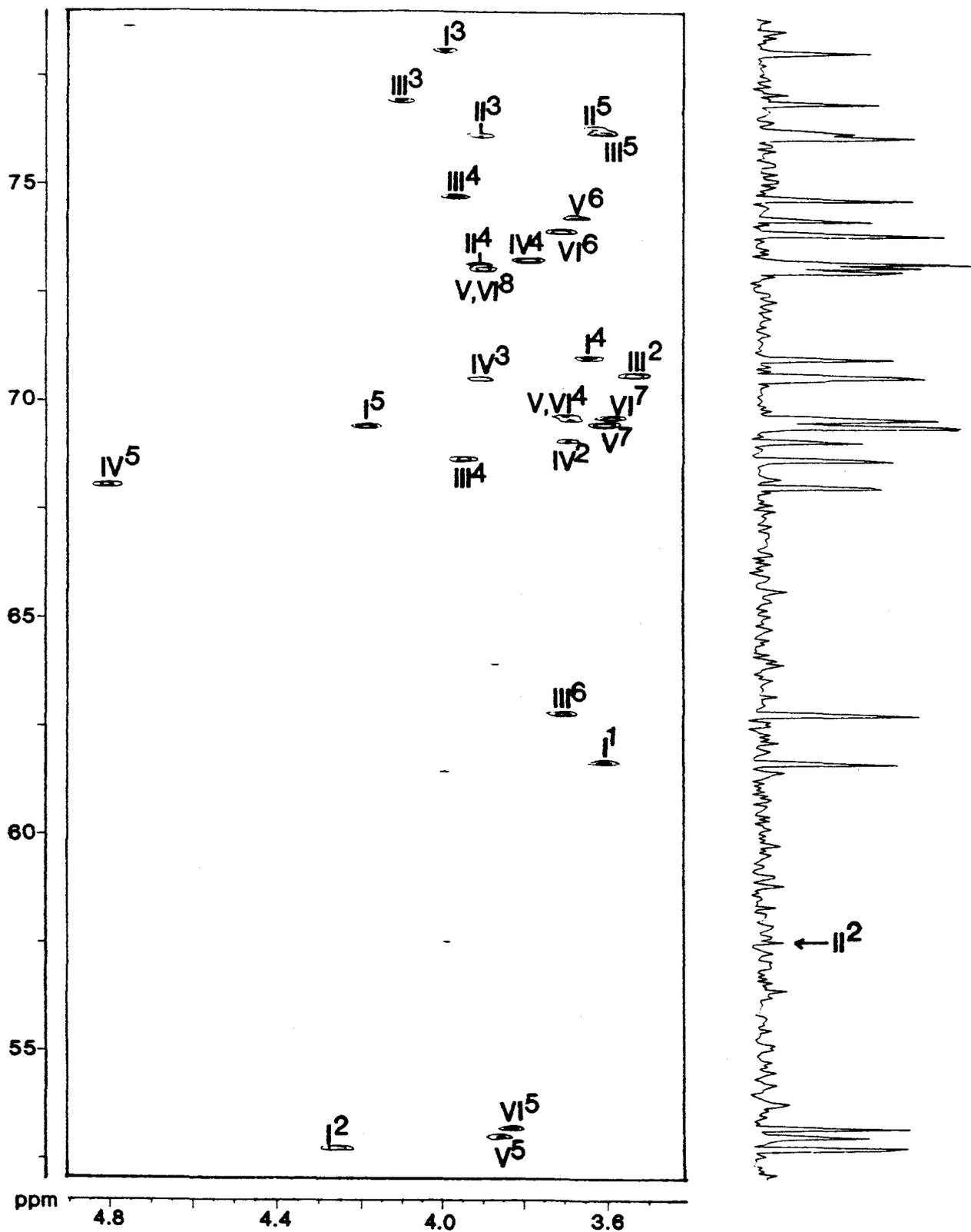


Fig. 4 : Heteronuclear-correlated NMR spectrum of compound 100-5.

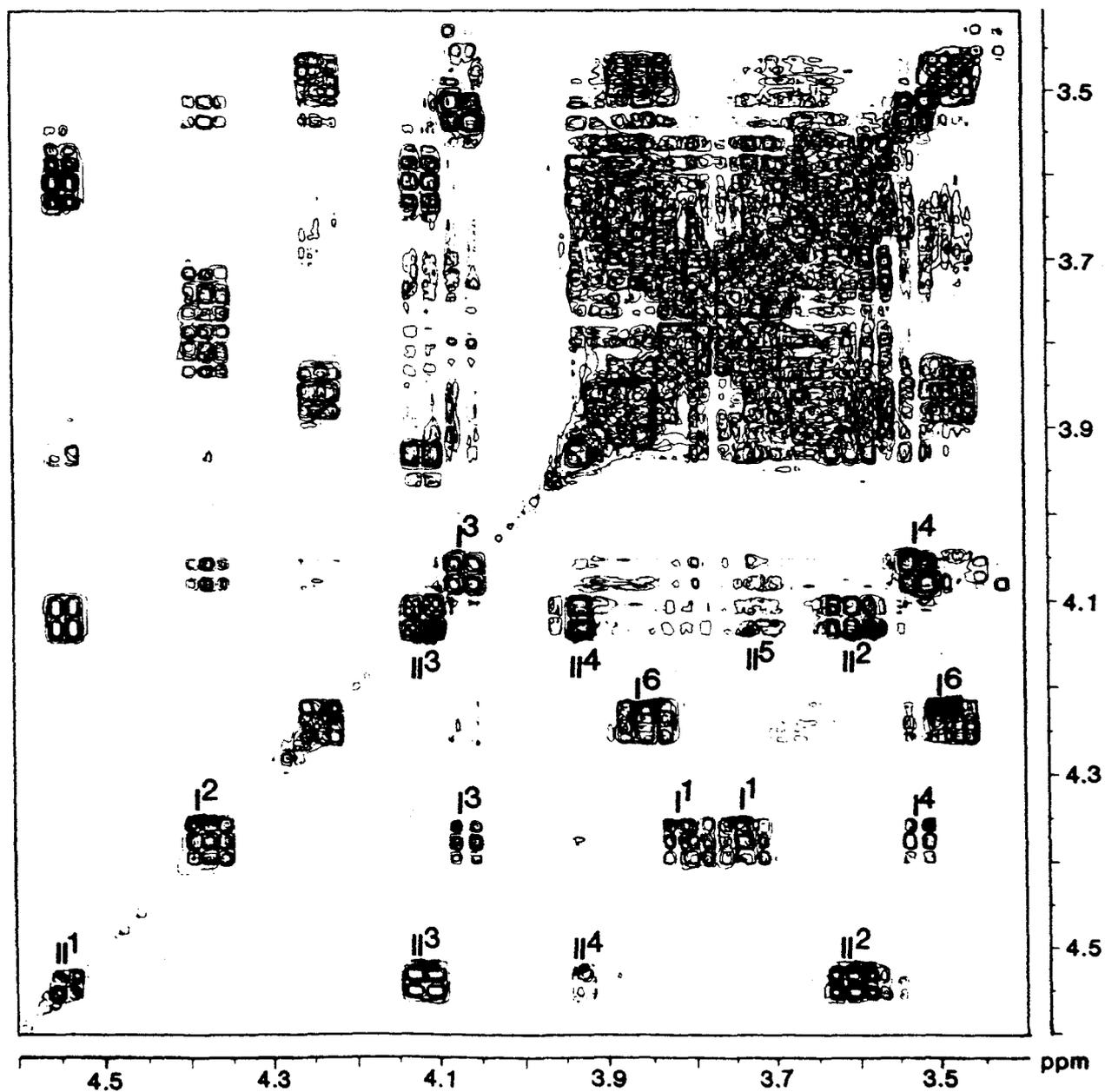
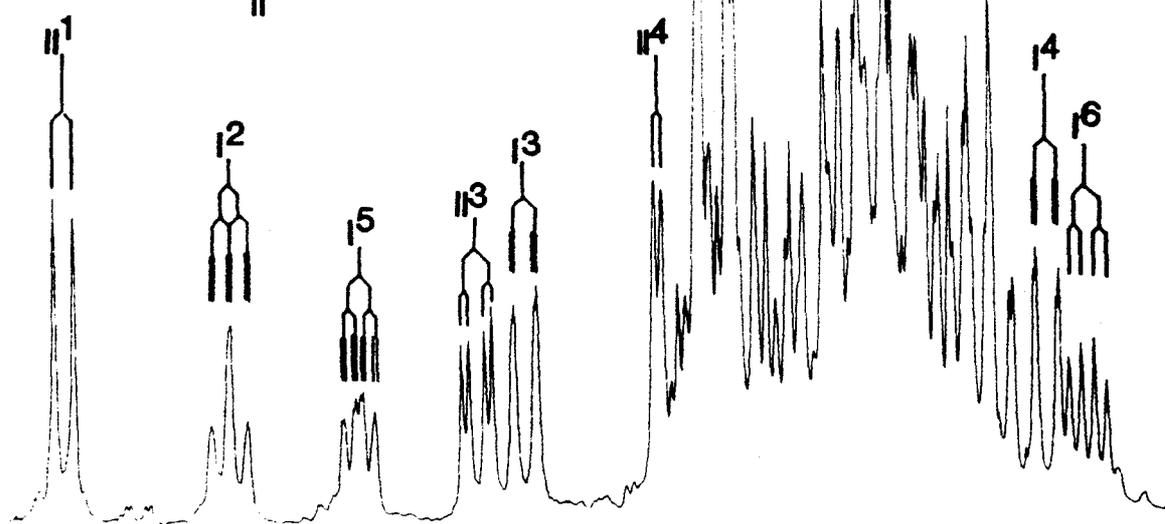
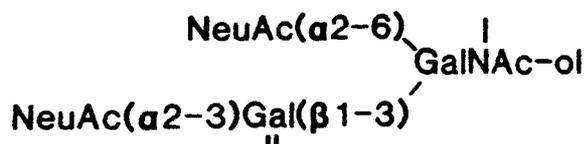
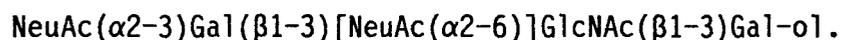


Fig. 5 : Double-relayed COSY spectrum of compound 200-2.

significant of galactitol substituted at C-3 position, as confirmed by the deshielded value of C-3 observed at 79.41 ppm on the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ heteronuclear spectrum. According to the vicinal coupling constants $J_{1,2}$, $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ of residues II and III corresponding sugars were identified as GlcNAc and Gal, respectively. Two NeuAc residues are present, one α -2,3-linked to Gal (δ H-3 = 4.080 ppm), the second α -2,6-linked to GlcNAc (δ C-6 = 64.21 ppm). The complete assignment of ^1H and ^{13}C -NMR spectra of component 200-4 is reported in Tables I and II. On the basis of these findings the structure of oligosaccharide-alditol 200-4 was determined as :



DISCUSSION

The 400 MHz ^1H - and 100 MHz ^{13}C -NMR spectra of five oligosaccharide-alditols released from the mucoid substance of pseudomyxoma peritonei have been interpreted in full detail. The cores type 1 [$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$] and type 3 [$\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$] were characterized as main components. In the case of component 100-5, in the branch linked to C-3 of GalNAc-ol, the sialyl Lewis X determinant was found. This complete disialyl glycanic chain of core type 3 has been previously described, for the first time, in new-born meconium mucoid substance [7], but the corresponding type 3 monosialyl Lewis X determinant is also present in bronchial mucus glycoproteins [6].

The oligosaccharide-alditol 200-4, which possesses Gal-ol as a reducing end, probably results from a peeling process occurring during the reductive β -elimination. Consequently, the native product should be $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{NeuAc}(\alpha 2-6)]\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc-ol}$.

A glycolipid having the disialyl $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}$ sequence has

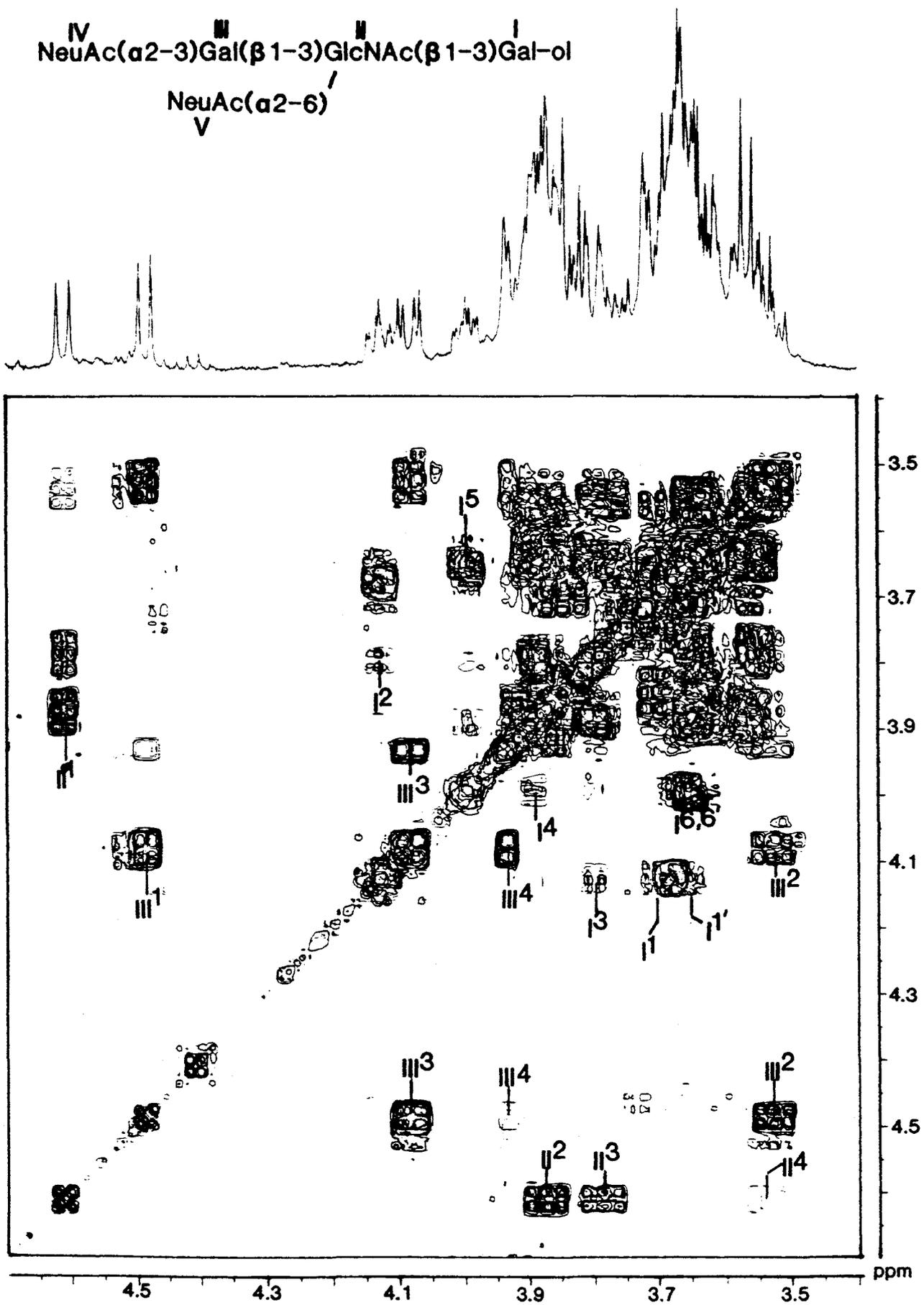


Fig. 6 : Double-relayed COSY spectrum of compound 200-4.

been previously described as a marker of an adenocarcinoma cell line [8]. To our knowledge, this sequence has never been described as being associated to human mucus glycoprotein. Nevertheless, the analogous compound disialyllacto-N-tetraose is the major sialyl-oligosaccharide present in human milk [9].

Numerous oligosaccharide-alditols from the pseudomyxoma still remain to be fractionated. According to the HPLC analyses, compounds with a DP 8 to 12 are present. These components are very heterogenous, therefore other approaches should be undergone to analyse them.

AKNOWLEDGMENTS

This research was supported, in part, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte n°111 : "Relations structure-fonction des constituants membranaires"; Director : Professor André VERBERT), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and the Ministère de l'Education Nationale.

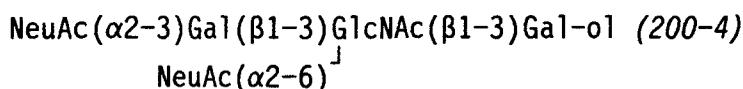
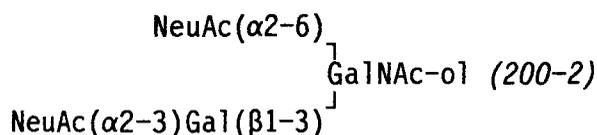
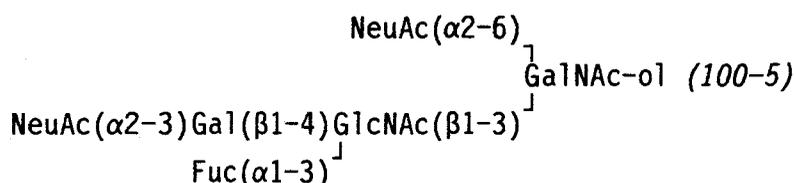
The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord - Pas de Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale, and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR instrument. They are indebted to Miss Catherine ALONSO (CNRS technician) for her skilful technical assistance.

REFERENCES

- [1] Chevillotte, G., Choux, R., Spik, G., Sahel, J., Scheiner, C., Montreuil, J., Lebreuil, G. and Sarles, H. (1983) *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 7, 445-450.
- [2] Lamblin, G., Boersma, A., Lhermitte, M., Roussel, P., Mutsaers, J.H.G.M., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 143, 227-236.
- [3] Mutsaers, J.F.G.M., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Wu, A.M. and Kabat, E.A. (1986) *Eur. J. Biochem.*, 157, 139-146.
- [4] Dua, V.K., Dube, V.E., LI, Y.T. and Bush, C.A. (1985) *Glycoconjugate J.*, 2, 17-30.
- [5] van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Fiat, A.M. and Jolles, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 623, 295-300.
- [6] Breg, J., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Lamblin, G., Houvenaghel, M.C. and Roussel, P. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 168, 57-68.
- [7] Capon, C., Leroy, Y., Wieruszkeski, J.M., Ricart, G., Strecker, G., Montreuil, J. and Fournet, B. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 182, 139-152.
- [8] Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S.B., Higuchi, T. and Hakomori, S.I. (1986) *Biochemistry*, 25, 2859-2866.
- [9] Grimmonprez, L., Takerkart, G., Monsigny, M. and Montreuil, J. (1967) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 265, 2124-2126.

Conclusion

La fraction glycoprotéinique de la substance gélatineuse provenant du pseudomyxome a été soumise à une réaction de β -élimination en milieu réducteur. L'étude des oligosaccharide-alditols ainsi libérés nous a permis de déterminer la structure de 5 déterminants glucidiques présents dans cette substance mucoïde :



Trois de ces structures retiennent particulièrement notre attention :

* Le disaccharide-alditol $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc-ol}$ (NF-5), isolé à partir de la fraction neutre et communément appelé antigène T (Thomsen-Friedenreich) correspond au core 1 des O-glycosylprotéines de type mucine (voir revues de HOUNSELL & FEIZI, 1982; FEIZI *et al.*, 1984; ROUSSEL *et al.*, 1988; LAMBLIN *et al.*, 1991; STROUS & DEKKER, 1992).

L'antigène T a précédemment été décrit comme "antigène associé aux tumeurs" (voir revue de SPRINGER, 1984). En effet l'accumulation,

dans des adénocarcinomes humains, de cet antigène porté par des O-glycosylprotéines est un exemple remarquable de synthèse incomplète de la chaîne glycanique avec accumulation du précurseur.

Cet oligosaccharide-alditol a également été caractérisé dans le méconium de nouveau-né (**HOUNSELL *et al.***, 1985).

* L'oligosaccharide-alditol 100-5 possède l'épitope sialyl Le^X, décrit comme étant un antigène onco-foetal.

En effet, cet antigène foetal, caractérisé sous forme de glycoprotéine dans le méconium de nouveau-né (**CAPON *et al.***, 1989), est également décrit associé à un lipide dans des adénocarcinomes du poumon et du colon humains (**FUKUSHIMA**, 1991; **BLASZCZYK *et al.***, 1984).

Cet épitope sialyl Le^X est spécifiquement reconnu par l'anticorps monoclonal CSLEX1 (**FUKUSHIMA *et al.***, 1984).

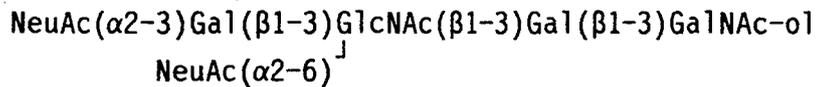
Il est toutefois intéressant de noter que cet antigène a été décrit pour la première fois sous forme de glycolipide dans le rein humain sain (**RAUVALA**, 1976).

* L'oligosaccharide-alditol 200-4 possède l'épitope NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc, caractérisé pour la première fois à partir d'une mucine d'adénocarcinome et donc associé à une protéine. Cette séquence disialylée est identique à celle présente au niveau d'un oligosaccharide libre majeur du lait, isolé par **GRIMMONPREZ & MONTREUIL** en 1968, le Disialyllacto-N-tétraose.

Toutefois, cet épitope a été décrit associé à un lipide dans des cellules de carcinomes embryonnaires (**FUKUDA *et al.***, 1986) et est spécifiquement reconnu par l'anticorps monoclonal FH9 (**FUKUSHI *et al.***, 1986).

Cet oligosaccharide présente la particularité de posséder non pas un résidu de N-acétylgalactosaminitol en position terminale réductrice,

mais un résidu de galactitol. Un phénomène de "peeling" au cours de la β -élimination est certainement responsable de la formation de cet oligosaccharide-alditol. Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus à caractériser l'oligosaccharide natif, dont la structure devrait être la suivante :



Cependant, nous n'avons étudié que quelques uns des antigènes glucidiques présents dans cette substance mucoïde et bon nombre de glycannes restent à isoler.

Les 5 structures glycaniques que nous avons décrites ne sont pas spécifiques du pseudomyxome puisqu'elles ont déjà été caractérisées dans d'autres milieux biologiques et plus particulièrement dans des adénocarcinomes humains. L'étude des glycannes présents en plus faible quantité dans cette substance mucoïde permettrait probablement de caractériser de nouveaux épitopes glucidiques spécifiques de ces types de tumeurs.

CONCLUSION

L'association de différentes techniques chromatographiques, comme la chromatographie sur papier et la chromatographie liquide haute performance, à des méthodes physiques d'analyse structurale, telles la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, nous a permis d'isoler et d'établir la structure de 5 nouveaux oligosaccharides du lait de Femme et de réaliser l'attribution complète des paramètres RMN de ^{13}C de ces glucides libres.

Deux des nouvelles structures que nous avons élucidées sont particulièrement intéressantes. En effet, nous avons caractérisé le premier oligosaccharide trisialylé du lait de Femme, et nous avons établi la structure d'un nouveau "noyau" octasaccharidique : le *para*-lacto-N-octaose. Ainsi, ces "noyaux" présents dans les glucides libres du lait de Femme sont maintenant au nombre de 12. Néanmoins, les oligosaccharides de haute masse moléculaire que nous avons isolés dérivent essentiellement du noyau *iso*-lacto-N-octaose. En effet, aucun d'eux ne présente les "noyaux" lacto-N-octaose et lacto-N-néooctaose précédemment décrits par le groupe de KOBATA. L'hydrolyse partielle que nous avons réalisée sur la fraction oligosaccharidique neutre du lait de Femme n'a pas permis de caractériser ces 2 noyaux. Cependant, avant de mettre totalement en doute leur existence, une analyse approfondie de la fraction oligosaccharidique acide serait nécessaire.

Ces glucides que nous avons isolés du lait de Femme sont porteurs des déterminants H, Le^b et/ou Le^x . L'oligosaccharide présentant l'épitope dimère Le^x a précédemment été décrit sous forme de glycolipide dans des adénocarcinomes humains. Cet oligosaccharide présentant un déterminant antigénique associé aux tumeurs s'ajoute à ceux déjà décrits dans le lait de Femme, comme le sialyl Le^a ou encore la séquence disialylée $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{NeuAc}(\alpha 2-6)]\text{GlcNAc}$. Ces oligosaccharides

isolés en quantité appréciable peuvent être couplés à des lipides ou à des protéines afin de les rendre immunogéniques, et être utilisés à des fins d'études immunochimiques.

L'étude structurale des oligosaccharides du lait de Femme et la comparaison entre leur structure et celle des antigènes associés aux tumeurs a été complétée par l'étude de la fraction glycanique d'une substance gélatineuse provenant d'une tumeur péritonéale humaine, le pseudomyxome. Nous avons ainsi pu caractériser 5 glycannes majeurs de cette substance mucoïde. L'un d'eux est porteur du déterminant onco-foetal sialyl Le^X et un autre possède la séquence NeuAc(α 2-3)Gal (β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc caractérisée pour la première fois à partir d'une mucine d'adénocarcinome. Cette séquence disialylée constitue également un oligosaccharide majeur du lait de Femme.

L'origine de ces oligosaccharides du lait de Femme peut s'expliquer par l'existence dans les tissus de la glande mammaire d'activités glycosyltransférasiques à caractère "foetal", ou bien encore par une activité différente des glycosyltransférases normalement rencontrée dans les tissus différenciés ou les milieux biologiques. En effet, dans le cas des oligosaccharides du lait de Femme, ces glycosyltransférases utilisent le Lactose comme accepteur et non des glycolipides ou des glycoprotéines.

REFERENCES

- ALHADEFF J.A.

Malignant cell glycoproteins and glycolipids

Crit. Rev. Oncol./ Hematol. (1989) 9, 37-107.

(p 68)

- ATKINSON B.F., ERNST C.S., HERLYN M., STEPLEWSKI Z., SEARS H.F. & KOPROWSKI H.

Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay

Cancer Res. (1982) 42, 4820-4823.

(p 73)

- BAENZIGER J.U. & FIETE D.

Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin ant toxin specificity for oligosaccharides

J. Biol. Chem. (1979) 254, 9795-9799.

(p 24)

- BETTERIDGE A. & WATKINS W.M.

Variant forms of α -2-L-fucosyltransferase in human submaxillary glands from blood group ABH "secretor" and "non secretor" individuals

Glycoconjugate J. (1985) 2, 61-78.

(p 63)

- BHENDE Y.M., DESHPANDE C.K. BHATIA H.M., SANGER R., RACE R.R., MORGAN W.T.J. & WATKINS W.M.

A "new" blood group character related to the ABO system

Lancet (1952) i, 903-904.

(p 61)

- BISWAS M. & RAO V.S.R.

Conformational analysis of the milk oligosaccharides

Biopolymers (1980) 19, 1555-1566.

(p 27)

- BLASZCZYK M., HANSSON G., KARLSSON K.A., LARSON G., STROMBERG N., THURIN J., HERLYN M., STEPLEWSKI Z. & KOPROWSKI H.

A fetal glycolipid expressed on adenocarcinomas of the colon

Int. J. Cancer. (1984) 33, 313-318.

(p 166)

- BREG J., ROMIJN D., Vliegenthart J.F.G., STRECKER G. & MONTREUIL J.

Scope and limitations of rotating-frame nuclear overhauser enhancement spectroscopy applied to oligosaccharides

Carbohydr. Res. (1988) 183, 19-34.

(p 27)

- BRUNTZ R., DABROWSKI U., DABROWSKI J., EBERSOLD A., PETER-KATALINIC J. & EGGE H.

Fucose-containing oligosaccharides from human milk from a donor of blood group O Le(a) non secretor

Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1988) 369, 257-273. (p 24, 27, 36, 139)

- CAGAS P. & BUSH C.A.

Determination of the conformation of Lewis blood group oligosaccharides by simulation of two-dimensional nuclear overhauser data

Biopolymers (1990) 30, 1123-1138. (p 27)

- CAPON C., LEROY Y., WIERUSZESKI J.M., RICART G., STRECKER G., MONTREUIL J. & FOURNET B.

Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins

Eur. J. Biochem. (1989) 182, 139-152. (p 166)

- CHEETHAM N.W. & DUBE V.E.

Preparation of lacto-N-neotetraose from human milk by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. (1983) 262, 426-430. (p 23)

- CHESTER M.A. & WATKINS W.M.

α -L-fucosyltransferases in human submaxillary gland and stomach tissues associated with the H, Le^a and Le^b blood-group characters and ABH secretor status

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1969) 34, 835-842. (p 67)

- CHIA D., TERASAKI P.I., SUYAMA N., GALTON J., HIROTA M. & KATZ D.

Use of monoclonal antibodies to sialylated Lewis^x and sialylated Lewis^a for serological tests of cancer

Cancer Res. (1985) 45, 435-437. (p 73)

- CLAUSEN H. & HAKOMORI S.I.

ABH and related histo-blood group antigens; Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution

Vox Sang. (1989) 56, 1-20. (p 59)

- DENIGES G.
Contribution à l'étude des lactoses
Thèse Pharm. Sup., Paris (1892) (p 17)
- DENNIS J.W. & LAFERTE S.
Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype
Cancer and metastasis reviews (1987) 5, 185-204. (p 68)
- DONALD A.S.R. & FEENEY J.
Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography
First isolation of lacto-N-neo-difucohexaose II and 3'-galactosyllactose
Carbohydr. Res. (1988) 178, 79-91. (p 27, 31)
- DUMONTET C. & PORTOUKALIAN J.
Gangliosides et cancer
Bull. Cancer (1991) 78, 789-799. (p 68)
- EPPENBERGER-CASTORI S., LÖTSCHER H. & FINNE J.
Purification of the N-acetylglucosaminide $\alpha(1-3/4)$ fucosyltransferase of human milk
Glycoconjugate J. (1989) 6, 101-114. (p 67)
- ESBACH G.
Sur la lactose et l'unification des lactoses
J. Pharm. et Chim. (1888) 17, 533. (p 15, 16)
- FALK E.K., KARLSSON K.A., LARSON G., THURIN J., BLASZCZYK M.,
STEPLEWSKI Z. & KOPROWSKI H.
Mass spectrometry of a human tumor glycolipid antigen being defined by mouse monoclonal antibody NS 19-9.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 110, 383-391. (p 73)
- FEIZI T.
Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens
Nature (1985) 314, 53-57. (p 68)
- FEIZI T.
The major blood group ABO(H) determining genes are isolated
Trends Biochem. Sci. (1990) 15, 330-331. (p 60)

- FEIZI T., GOOI H.C., CHILDS R.A., PICARD J.K., UEMURA K., LOOMES L.M., THORPE S.J. & HOUNSELL E.F.

Tumour-associated and differentiation antigens on the carbohydrate moieties of mucin-type glycoproteins

Biochem. Soc. Trans. (1984) 12, 591-596. (p 165)

- FUKUDA M., BOTHNER B., LLOYD K.O., RETTIG W.J., TILLER P.R. & DELL A.

Structures of glycosphingolipids isolated from human embryonal carcinoma cells. The presence of mono- and disialosyl glycolipids with blood group type 1 sequence

J. Biol. Chem. (1986) 261, 5145-5153. (p 166)

- FUKUSHI Y., HAKOMORI S.I., NUDELMAN E. & COCHRAN N.

Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma -II- Selective isolation of hybridoma antibodies that differentially recognize mono-, di- and trifucosylated type 2 chain

J. Biol. Chem. (1984a) 259, 4681-4685. (p 72, 140)

- FUKUSHI Y., NUDELMAN E., LEVERY S.B., HAKOMORI S.I. & RAUVALA H.

Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma -III- a hybridoma antibody (FH6) defining a human cancer-associated difucoganglioside (VI^3 NeuAcV³III³Fuc₂nLc₆)

J. Biol. Chem. (1984b) 259, 10511-10517. (p 73)

- FUKUSHI Y., NUDELMAN E., LEVERY S.B., HIGUCHI T. & HAKOMORI S.I.

A novel disialoganglioside (IV^3 NeuAcIII⁶NeuAcLc₄) of human adenocarcinoma and the monoclonal antibody (FH9) defining this disialosyl structure

Biochemistry (1986) 25, 2859-2866. (p 72, 73, 166)

- FUKUSHIMA K.

Expression of Lewis X, sialylated Lewis X, Lewis^a and sialylated Lewis^a antigens in human lung carcinoma

Tohoku J. Exp. Med. (1991) 163, 17-30. (p 73, 166)

- FUKUSHIMA K., HIROTA M., TERASAKI P.I., WAKISAKA A., TOGASHI H.,
CHIA D., SUYAMA N., FUKUSHI Y., NUDELMAN E. & HAKOMORI S.I.

Characterization of sialosylated Lewis^X as a new tumor associated
antigen

Cancer Res. (1984) 44, 5279-5285. (p 166)

- GAUHE A., GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R., ROSE C.S., RUELIUS
H.W. & ZILLIKEN F.

Bifidus factor. IV - preparations obtained from human milk

Arch. Biochem. Biophys. (1954) 48, 214-224. (p 50, 53)

- GERARD G., VITRAC D., LE PENDU J., MULLER A. & ORIOL R.

H-deficient blood group (Bombay) of Reunion Island

Am. J. Hum. Genet. (1982) 34, 937-947. (p 61)

- GINSBURG V.

Enzymatic basis for blood groups in man

in "Advances in Enzymology" (A. MEISTER Ed) (1972) 36, 131-149. (p 59)

- GINSBURG V., ZOPF D.A., YAMASHITA K. & KOBATA A.

Oligosaccharides of human milk. Isolation of a new pentasaccharide,
lacto-N-fucopentaose V

Arch. Biochem. Biophys. (1976) 175, 565-568. (p 22, 32)

- GRIMMONPREZ L.

Les glucides du lait

Ann. Nutr. Alim. (1971) 25, A39-A79. (p 17, 48)

- GRIMMONPREZ L.

Isolément et étude des propriétés physico-chimiques et de la structure
de 30 nouveaux oligosaccharides. Recherches sur leur origine et leur
signification biologique.

Thèse de Sciences Physiques, Lille (1972). (p 26, 48)

- GRIMMONPREZ L.

Les glucides du lait de Femme

Med. Nutr. (1977) 13, 343-348. (p 48)

- GRIMMONPREZ L., DELAUTRE M., BOUQUELET S. & MONTREUIL J.
Détermination de la structure d'un heptasaccharide isolé du lait de
Femme : le lacto-N-fucoheptaose
FEBS Lett. (1975) 54, 221-223. (p 23, 26, 36)
- GRIMMONPREZ L. & MONTREUIL J.
Etude physico-chimique de six nouveaux oligosides isolés du lait de
Femme
Bull. Soc. Chim. Biol. (1968) 50, 843-855. (p 26, 33, 72, 166)
- GRIMMONPREZ L., TAKERKART G., MONSIGNY M. & MONTREUIL J.
Structure d'un hexaose isolé du lait de Femme : le di-lactaminyllacto-
N-tétraose
C. R. Acad. Sci. Paris (1967) 265, 2124-2126. (p 33)
- GROLLMAN E.F. & GINSBURG V.
Correlation between secretor status and the occurrence of 2'-fucosyl-
lactose in human milk
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1967) 28, 50-53. (p 66)
- GROLLMAN E.F., KOBATA A. & GINSBURG V.
An enzymatic basis for Lewis blood types in man
J. Clin. Invest. (1969) 48, 1489-1494. (p 66)
- GROLLMAN E.F., KOBATA A. & GINSBURG V.
Enzymatic basis of blood types in man
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1970) 169, 153-158. (p 65)
- GRÖNBERG G., LIPNUNIAS P., LUNDGREN T., ERLANSSON K., LINDH F. &
NILSSON B.
Isolation of monosialylated oligosaccharides from human milk and
structural analysis of three new compounds
Carbohydr. Res. (1989) 191, 261-278. (p 24, 31)
- GRÖNBERG G., LIPNUNIAS P., LUNDGREN T., LINDH F. & NILSSON B.
Isolation and structural analysis of three new disialylated
oligosaccharides from human milk
Arch. Biochem. Biophys. (1990) 278, 297-311. (p 24, 33)

- GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R. & ZILLIKEN F.
Bifidus factor. III - The rate of dialysis
Arch. Biochem. Biophys. (1954c) 48, 209-213. (p 50, 52)
- GYORGY P., JEANLOZ R.W., VON NICOLAI H. & ZILLIKEN F.
Undialysable growth factors for *Lactobacillus bifidus* var. *Penn.*
Eur. J. Biochem. (1974) 43, 29-33. (p 53)
- GYORGY P., KUHN R., ROSE C.S. & ZILLIKEN F.
Bifidus factor. II - Its occurrence in milk from different species and in
other natural products
Arch. Biochem. Biophys. (1954b) 48, 202-208. (p 50, 52)
- GYORGY P., NORRIS R.F. & ROSE C.S.
Bifidus factor. I - A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a
special growth factor
Arch. Biochem. Biophys. (1954a) 48, 193-201. (p 50, 52)
- GYORGY P. & ROSE C.S.
Microbiological studies on growth factor for *Lactobacillus bifidus* var.
Pennsylvanicus
Proc. Soc. Exp. Biol. (1955a) 90, 219-223. (p 53, 55)
- GYORGY P. & ROSE C.S.
Further observations on metabolic requirement of *Lactobacillus bifidus*
var. *Pennsylvanicus*
J. Bact. (1955b) 69, 483-490. (p 53)
- HAENEL H., MULLER BENTHOW W. & GRÜTTE F.K.
Faecal microecology of the young infant in relation to nutrition :
composition of microflora
Zbl. Bakt. (1970) 215, 333-337. (p 49)
- HAKOMORI S.I.
Structures and organization of cell surface glycolipids dependency on
cell growth and malignant transformation
Biochim. Biophys. Acta (1975) 417, 55-89. (p 69)

- HAKOMORI S.I.

Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis

in "*Handbook of lipid research*", Vol 3 : Sphingolipid biochemistry (HANAHAN D.J. Ed) Plenum Press, New York (1983) 327-379. (p 68)

- HAKOMORI S.I.

Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids : overview and perspectives

Cancer Res. (1985a) 45, 2405-2414. (p 68)

- HAKOMORI S.I.

Glycosphingolipids as differentiation and tumor markers and as regulators of cell proliferation

in "*Molecular biology of tumor cells*" (WAHREN B. et al. Eds.) Raven Press, New York (1985b) 139-156. (p 68)

- HAKOMORI S.I.

Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens

Adv. Cancer Res. (1989) 52, 257-331. (p 68)

- HAKOMORI S.I. & KANNAGI R.

Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers

J. Natl. Cancer Inst. (1983) 71, 231-251. (p 69)

- HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S.B. & KANNAGI R.

Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. I- glycolipids with di- or tri- fucosylated type 2 chain

J. Biol. Chem. (1984) 259, 4672-4680. (p 72, 140)

- HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S.B. & PATTERSON C.M.

Human cancer-associated gangliosides defined by a monoclonal antibody (IB9) directed to sialosyl α -2,6-galactosyl residue : a preliminary note

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 113, 791-798. (p 73)

- HAKOMORI S.I. & YOUNG W.W.

Glycolipid antigens and genetic markers
in "*Handbook of lipid research*", Vol 3 : Sphingolipid biochemistry
(HANAHAN D.J. Ed) Plenum Press, New York (1983) 381-436. (p 68)

- HOOVER J.R.E., BRAUN G.A. & GYORGY P.

Neuraminic acid in mucopolysaccharides of human milk
Arch. Biochem. Biophys. (1953) 47, 216-217. (p 19)

- HOUNSELL E.F. & FEIZI T.

Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their
carbohydrate chains in health and disease
Med. Biol. (1982) 60, 227-236. (p 165)

- HOUNSELL E.F., LAWSON A.M., FEENEY J., GOOI H.C., PICKERING N.J.,
STOLL M.S., LUI S.C. & FEIZI T.

Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region
oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express
oncofoetal antigens
Eur. J. Biochem. (1985) 148, 367-377. (p 166)

- ITZKOWITZ S.H., YUAN M., FUKUSHI Y., PALEKAR A., PHELPS P.C.,
SHAMSUDDIN A.M., TRUMP B.F., HAKOMORI S.I. & KIM Y.S.

Lewis^X and sialylated Lewis^X-related antigen expression in human
malignant and nonmalignant colonic tissues
Cancer Res. (1986) 46, 2627-2632. (p 140)

- JARKOVSKY Z., MARCUS D.M. & GROLLMAN A.P.

Fucosyltransferase found in human milk. Product of the Lewis blood group
gene
Biochemistry (1970) 9, 1123-1128. (p 66)

- JOHNSON P.H. & WATKINS W.M.

Separation of an α -3-fucosyltransferase from the blood-group-Le-gene
specified α -3/4-L-fucosyltransferase in human milk
Biochem. Soc. Trans. (1982) 10, 445-446. (p 67)

- JOHNSON P.H., YATES A.D. & WATKINS W.M.

Human salivary fucosyltransferases : evidence for two distinct α -3-L-fucosyltransferase activities one of which is associated with the Lewis blood group *Le* gene

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981) 100, 1611-1618. (p 64)

- KABAT E.A.

The carbohydrate moiety of the water-soluble human A, B, H, Le^a and Le^b substances

in "*Blood and tissue antigens*" (D. AMINOFF Ed) Academic Press New York (1970), 187-203. (p 57)

- KANNAGI R., LEVERY S.B. & HAKOMORI S.I.

Sequential change of carbohydrate antigen associated with differentiation of murine leukemia cells : i-I antigenic conversion and shifting of glycolipid synthesis

Proc. Natl. Acad. Sci. (1983a) 80, 2844-2848. (p 69)

- KANNAGI R., STROUP R., COCHRAN N.A., URDAL D.L., YOUNG W.W. & HAKOMORI S.I.

Factors affecting expression of glycolipid tumor antigens : influence of ceramide composition and coexisting glycolipid on the antigenicity of gangliotriaosylceramide in murine lymphoma cells

Cancer Res. (1983b) 43, 4997-5005. (p 69)

- KEENAN T.W. & MORRE D.J.

Mammary carcinoma : enzymatic block in disialoganglioside biosynthesis

Science (1973) 182, 935-937. (p 69)

- KITAGAWA H., NAKADA H., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T., YAMASHINA I., TATE S. & INAGAKI F.

Novel oligosaccharides with the Sialyl- Le^a structure in human milk

Biochemistry (1991b) 30, 2869-2876. (p 25, 27, 44)

- KITAGAWA H., NAKADA H., KUROSAKA A., HIRAIWA N., NUMATA Y., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T., YAMASHINA I., SHIMADA K. & INAGAKI F.

Three novel oligosaccharides with the Sialyl- Le^a structure in human milk:isolation by immunoaffinity chromatography

Biochemistry (1989) 28, 8891-8897. (p 25, 27, 38)

- KITAGAWA H., NAKADA H., NUMATA Y., KUROSAKA A., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T., SHIMADA K., INAGAKI F. & YAMASHINA I.

Immunoaffinity isolation of a Sialyl-Le^a oligosaccharide from human milk
J. Biochem. (1988b) 104, 591-594. (p 25, 27)

- KITAGAWA H., NAKADA H., NUMATA Y., KUROSAKA A., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T., SHIMADA K., INAGAKI F. & YAMASHINA I.

Occurrence of tetra- and pentasaccharides with the Sialyl-Le^a structure in human milk

J. Biol. Chem. (1990) 265, 4859-4862. (p 25, 27, 28, 30)

- KITAGAWA H., NAKADA H., NUMATA Y., KUROSAKA A., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T. & YAMASHINA I.

A monoclonal antibody that recognizes Sialyl-Le^a oligosaccharide, but is distinct from NS 19-9 as to epitope recognition

J. Biochem. (1988a) 104, 817-821. (p 25, 73)

- KITAGAWA H., TAKAOKA M., NAKADA H., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T., TATE S.I., INAGAKI F. & YAMASHINA I.

Isolation and structural studies of human milk oligosaccharides that are reactive with a monoclonal antibody MSW113

J. Biochem. (1991a) 110, 598-604. (p 25, 27, 37)

- KOBATA A.

Isolation of oligosaccharides from human milk

in "*Methods in enzymology*" (Ginsburg V., Ed.) Academic Press, New York (1972) 28, 262-271. (p 22)

- KOBATA A.

Milk glycoproteins and oligosaccharides

in "*The Glycoconjugates*" (HOROWITZ M.I. & PIGMAN W., Ed.) (1977), 1, 423-440. (p 28)

- KOBATA A. & GINSBURG V.

Oligosaccharides of human milk, Lacto-N-fucopentaose III

J. Biol. Chem. (1969b) 244, 5496-5502. (p 22, 25, 34)

- KOBATA A. & GINSBURG V.

Uridine diphosphate-N-acetyl-D-galactosamine : D galactose α -3-N-acetyl-D-galactosaminyl transferase, a product of the gene that determines blood type A in man

J. Biol. Chem. (1970) 245, 1484-1490. (p 67)

- KOBATA A. & GINSBURG V.

Oligosaccharides of human milk. III- Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-hexaose

J. Biol. Chem. (1972a) 247, 1525-1529. (p 22, 26, 35, 66)

- KOBATA A. & GINSBURG V.

Oligosaccharides of human milk. IV- Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-neohexaose

Arch. Biochem. Biophys. (1972b) 150, 273-281. (p 22, 26, 36)

- KOBATA A., GINSBURG V. & TSUDA M.

Oligosaccharides of human milk. I- Isolation and characterization

Arch. Biochem. Biophys. (1969a) 130, 509-513. (p 22, 25)

- KOBATA A., GROLLMAN E.F. & GINSBURG V.

An enzymatic basis for blood type B in humans

Biochem. Biophys Res. Commun. (1968), 32, 272-277. (p 67)

- KOBATA A., YAMASHITA K. & TACHIBANA Y.

Oligosaccharides from human milk

in "*Methods in Enzymology*" (Ginsburg V., Ed.) Academic Press, New York

(1978) 50, 216-220. (p 23)

- KONAMI Y., YAMAMOTO K., TSUJI T. & OSAWA T.

Fractionation of human milk oligosaccharides by High-Performance Liquid Chromatography

Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1987) 368, 309-314. (p 24)

- KOPROWSKI H., STEPLEWSKI Z., MITCHELL K., HERLYN D. & FUHRER P.

Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies

Somatic Cell Genet. (1979) 5, 957-972. (p 73)

- KRONIS K.A. & CARVER J.P.

Specificity of isolectins of Wheat germ agglutinin for sialyloligosaccharides : a 360 MHz-Proton Nuclear Magnetic Resonance binding study
Biochemistry (1982) 21, 3050-3057. (p 24)

- KUHN R.

Les oligosaccharides du lait
Bull. Soc. Chim. Biol. (1958) 40, 297-314. (p 18, 19, 21, 48)

- KUHN R.

Naturwissenschaften (1959) 46, 43-50. (p 21, 31)

- KUHN R. & BAER H.H.

Die Konstitution der Lacto-N-tetraose
Chem. Ber. (1956) 89, 504. (p 21, 32)

- KUHN R., BAER H.H. & GAUHE A.

Kristallisierte Fucosido-lactose
Chem. Ber. (1956a) 89, 2513. (p 21, 31)

- KUHN R., BAER H.H. & GAUHE A.

Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-N-fucopentaose I
Chem. Ber. (1956b) 89, 2514. (p 21, 32)

- KUHN R., BAER H.H. & GAUHE A.

Die Konstitution der Lacto-N-fucopentaose II
Chem. Ber. (1958a) 91, 364. (p 21, 32)

- KUHN R., BAER H.H. & GAUHE A.

2- α -L-Fucopyranosyl-D-galaktose und 2- α -L-Fucopyranosyl-D-talose
Justus Liebigs Ann. Chem. (1958b) 611, 242-249. (p 21, 32)

- KUHN R. & BROSSMER R.

O-Acetyllactaminic acid lactose from cow colostrum and its cleavability by the influenza virus
Chem. Ber. (1956a) 89, 2013-2025. (p 19)

- KUHN R. & BROSSMER R.

Degradation of lactaminic acid to N-acetyl-D-glucosamine
Chem. Ber. (1956b) 89, 2471-2475.

(p 19)

- KUHN R. & BROSSMER R.

Über das durch Viren der Influenza-Gruppe spaltbare Trisaccharid der Milch

Chem. Ber. (1959) 92, 1667-1674.

(p 21, 31)

- KUHN R. & GAUHE A.

Über die Lacto-difuco-tetraose der Frauenmilch. Ein Beitrag zur Strukturspezifität der Blutgruppensubstanz Le^b

Justus Liebigs Ann. Chem. (1958) 611, 249-253.

(p 21, 31)

- KUHN R. & GAUHE A.

Über ein kristallisiertes, Le^a-aktives Hexasaccharid aus Frauenmilch

Chem. Ber. (1960) 93, 647-651.

(p 22)

- KUHN R. & GAUHE A.

Über drei saure Pentasaccharide aus Frauenmilch

Chem. Ber. (1962b) 95, 513.

(p 22, 34)

- KUHN R. & GAUHE A.

Die Konstitution der Lacto-N-neotetraose

Chem. Ber. (1962a) 95, 518-522.

(p 22, 34)

- KUHN R. & GAUHE A.

Bestimmung der Bindungsstelle von Sialinsäureresten in Oligosacchariden mit Hilfe von Perjodat

Chem. Ber. (1965) 98, 395-413.

(p 22, 32)

- KUMAZAKI T. & YOSHIDA A.

Biochemical evidence that secretor gene ,Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 4193-4197.

(p 63)

- LAMBERT R., SAITO Y. & VEERKAMP J.H.
Incorporation of labeled derivatives of 2-deoxy-2-amino-D-glucose into the cell walls of *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*
Arch. Biochem. Biophys. (1965) 110, 341-345. (p 55)
- LAMBERT R. & ZILLIKEN F.
Novel growth factors for *Lactobacillus bifidus* Var. *Penn.*
Arch. Biochem. Biophys. (1965) 110, 544-550. (p 55)
- LAMBLIN G., LHERMITTE M., KLEIN A., PERINI J.M. & ROUSSEL P.
Diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines et défense antimicrobienne de la muqueuse bronchique
Médecine/Sciences (1991) 7, 1031-1040. (p 165)
- LEE W.M.F., WESTRICK M.A. & MACHER B.A.
Neutral glycosphingolipids of human acute leukemias
J. Biol. Chem. (1982) 257, 10090-10095. (p 69)
- LEMIEUX R.U.
Human blood groups and carbohydrate chemistry
Chem. Soc. Rev. (1978) 7, 423-452. (p 62)
- LE PENDU J., CARTRON J.P., LEMIEUX R.U. & ORIOL R.
The presence of at least two different H-blood-group-related β -D-Gal α -2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances
Am. J. Hum. Genet. (1985) 37, 749-760. (p 63)
- LE PENDU J., CLAMAGIRAND-MULET C., CARTRON J.P., GERARD G., VITRAC D. & ORIOL R.
H-deficient blood groups of Reunion Island.III: α -2-L-fucosyltransferase activity in sera of homozygous and heterozygous individuals
Am. J. Hum. Genet. (1983a) 35, 497-507. (p 61)
- LE PENDU J., GERARD G., VITRAC D., JUSZCZAK G., LIBERGE G., ROUGER S., SALMON C., LAMBERT F., DALIX A.M. & ORIOL R.
H-deficient blood group of Reunion Island.II: Differences between Indians (Bombay phenotype) and Whites (Reunion phenotype)
Am. J. Hum. Genet. (1983b) 35, 484-496. (p 62)

- **LESPAGNOL A.**

Les glucides du lait de Femme

Thèse Pharm. Sup., Lille (1930).

(p 15)

- **LESPAGNOL A., MONTREUIL J. & SEGARD E.**

Le problème de l'allolactose du lait de Femme

C. R. Soc. Biol. (1960) 154, 130-132.

(p 18)

- **LEVINE P., ROBINSON E., CELANO M., BRIGGS O. & FALKINBURG L.**

Gene interaction resulting in supression of blood group substances B

Blood (1955) 10, 1100-1108.

(p 61)

- **LI Y.T. & LI S.C.**

Studies on the glycosidases in Jack bean meal - II - Separation of various glycosidases by isoelectric fucosing

J. Biol. Chem. (1968) 243, 3994-3996.

(p 26)

- **LLOYD K.O., BEYCHOK S. & KABAT E.A.**

Immunochemical studies on blood groups. XXXVII. The structures of difucosyl and other oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group A, B and H substances. Optical rotatory dispersion and circular dichroism spectra of these oligosaccharides

Biochemistry (1967) 6, 1448-1454.

(p 57)

- **LLOYD K.O. & KABAT E.A.**

Immunochemical studies on blood groups. XLI. Proposed structures for the carbohydrate portions of blood group A, B, H, Lewis a and Lewis b substances

Proc. Natl. Acad. Sci. (1968) 61, 1470-1477.

(p 57)

- **LLOYD K.O., KABAT E.A. & LICERIO E.**

Immunochemical studies on blood groups. XXXVIII. Structures and activities of oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group Lewis a substance. Proposed structure of the carbohydrate chains of human blood-group A, B, H, Lewis a and Lewis b substances.

Biochemistry (1968) 7, 2976-2990.

(p 57)

- MACHER B.A., HOLMES E.H., SWIEDLER S.J., STULTS C.L.M. & SRNKA C.A.
Human α 1-3 fucosyltransferases
Glycobiology (1991) 1, 577-584. (p 63)

- MAGNANI J.L., NILSSON B., BROCKHAUS M., ZOPF D., STEPLEWSKI Z.,
KOPROWSKI H. & GINSBURG V.
A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal
cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II
J. Biol. Chem. (1982) 257, 14365-14369. (p 72, 73)

- MOLLICONE R., GIBAUD A., FRANCOIS A., RATCLIFFE M. & ORIOL R.
Acceptor specificity and tissue distribution of three human α -3-fucosyl-
transferases
Eur. J. Biochem. (1990) 191, 169-176. (p 64)

- MONTREUIL J.
Quelques applications de la chromatographie sur papier à l'étude des
glucides et glycoprotéides des milieux biologiques
3^e Coll. Hop. St Jean Bruges (1955) 209-228. (p 19, 21, 48)

- MONTREUIL J.
Structure de deux triholosides isolés du lait de Femme
C. R. Acad. Sci. (1956) 242, 192-193. (p 21, 31)

- MONTREUIL J.
Les glucides du lait
Bull. Soc. Chim. Biol. (1960) 42, 1399-1427. (p 17)

- MONTREUIL J.
La maternisation des laits. Etat actuel de la question
Ann. Nutr. Alim. (1971) 25, A1-A37. (p 56)

- MONTREUIL J. & KOBUS W.
Variations des constituants glucidiques du lait de Vache au cours de la
lactation
C. R. Soc. Biol. (1960) 154, 2075-2078. (p 20)

- MONTREUIL J. & MULLET S.

Evolution de la constitution glucidique du lait de Femme au cours de la lactation

C. R. Soc. Biol. (1959) 153, 1364-1366. (p 20, 48)

- MONTREUIL J. & MULLET S.

Etude des variations des constituants glucidiques du lait de Femme au cours de la lactation

Bull. Soc. Chim. Biol. (1960) 42, 365-377. (p 20, 48)

- MORGAN W.T.J.

Molecular aspects of human blood-group specificity

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1970) 169, 118-130. (p 57)

- MORO E.

Über die nach Gram färbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles

Wien. Klin. Wochenschr. (1900) 13, 114-115. (p 49)

- MORO E.

Weitere Untersuchungen betreffend die endogene Infektion des Säuglingsdarmes

M Schr. Kinderheilk (1907) 6, 550-563. (p 51)

- NICOLAI (VON) H. & ZILLIKEN F.

Neuraminidase from *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. (1972) 353, 1015-1016. (p 53)

- O'BRIEN P.J., GLICK M.C. & ZILLIKEN F.

Acid aminosugars from bacteria. Incorporation of C¹⁴ α, β, methyl-N-acetyl-D-glucosaminide into muramic acid

Biochem. Biophys. Acta (1960) 37, 357-360. (p 55)

- ORIOL R.

Interactions of ABO, Hh, Secretor and Lewis systems

Blood Transf. Immunohaemat. (1980) 23, 517-526. (p 64)

- **ORIOLE R.**

ABH and related tissue antigens

Biochem. Soc. Trans. (1987) 15, 596-598. (p 60)

- **ORIOLE R.**

Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues

J. Immunogenetics (1990) 17, 235-245. (p 60)

- **ORIOLE R., DANILOVS J., HAWKINS B.R.**

A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene

Am. J. Hum. Genet. (1981) 33, 421-431. (p 61, 62)

- **ORIOLE R., LE PENDU J. & MOLLICONE R.**

Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens

Vox Sang. (1986) 51, 161-171. (p 57)

- **PETUELY F.**

Bifidus Flora bei flaschen Kindern durch bifidogene Substanzen (Bifidus Faktor)

Z. Kinderheilk (1957) 79, 174-179. (p 50, 51)

- **POLONOVSKI M. & LESPAGNOL A.**

Un nouveau constituant du lait de Femme : le Gynolactose

C. R. Soc. Biol. (1930) 104, 553-555. (p 18, 49)

- **POLONOVSKI M. & LESPAGNOL A.**

Nouvelles acquisitions sur les composés glucidiques du lait de Femme

Bull. Soc. Chim. Biol. (1933) 15, 320-349. (p 17, 18, 20)

- **PRIEELS J.P., MONNON D., DOLMANS M., BEYERT A. & HILL R.L.**

Co-purification of the Lewis blood-group N-acetylglucosaminide α 1-4 fucosyltransferase and an N-acetylglucosaminide α 1-3fucosyltransferase from human milk

J. Biol. Chem. (1981) 256, 10456-10463. (p 64, 66)

- PUKEL C.S., LLOYD K.O., TRAVASSOS L.R., DIPPOLD W.G., OETTGEN H.F.
& OLD L.J.

G_{D3}, a predominant ganglioside of human melanoma. Detection and
characterization by mouse monoclonal antibody

J. Exp. Med. (1982) 155, 1133-1147. (p 69)

- RAUVALA H.

Gangliosides of human kidney

J. Biol. Chem. (1976) 251, 7517-7520. (p 166)

- RAYNAUD M.

Le facteur bifidus 2

Ann. Pédiat. (1959) 35, 8-23 (240-255). (p 51, 52, 55)

- RAYNAUD M. & BIZZINI B.

Purification et propriétés du facteur bifidus 2

Ann. Nutr. Aliment. (1971) 25, A209-A223. (p 55)

- RITTENHOUSE H.G., MANDERINO G.L. & HASS M.

Mucin type glycoproteins as tumor markers

Laboratory Medicine (1985) 16, 556-560. (p 68)

- ROMOND C., BEERENS H., NEUT C. & MONTREUIL J.

Contribution à l'étude de la maternisation des laits : influence "in
vitro" du lait maternel, du lait de Vache et de laits maternisés sur la
croissance de *Bifidobacterium*

Ann. Microbiol.(Inst. Pasteur) (1980) 131A, 309-314. (p 56)

- ROSE C.S., KUHN R., ZILLIKEN F. & GYORGY P.

The activity of α - and β -methyl-N-acetyl-glucosaminides

Arch. Biochem. Biophys. (1954) 49, 123-129. (p 55)

- ROUSSEL P., LAMBLIN G., LHERMITTE, HOUDRET M., LAFITTE J.J., PERINI
J.M., KLEIN A. & SCHARFMAN A.

The complexity of mucins

Biochimie (1988) 70, 1471-1482. (p 165)

- **SCHENKEL-BRUNNER H., CHESTER M.A. & WATKINS W.M.**
 α -L-fucosyltransferases in human serum from donors of different ABO,
Secretor and Lewis blood-group phenotypes
Eur. J. Biochem. (1972) 30, 269-277. (p 63)
- **SCHÖNFELD H.**
Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur
Bifidusflora
Jahrb. Kinderh. (1926) 113, 19-24. (p 50, 51)
- **SHEN L., GROLLMAN E.F. & GINSBURG V.**
An enzymatic basis for secretor status and blood group substance
specificity in humans
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1968) 59, 224-230. (p 66)
- **SIDDIQUI B., WHITEHEAD J.S. & KIM Y.S.**
Glycosphingolipids in human colonic adenocarcinoma
J. Biol. Chem. (1978) 253, 2168-2175. (p 69)
- **SINGHAL A. & HAKOMORI S.I.**
Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer
Bio Essays (1990) 12, 223-229. (p 68, 70, 71)
- **SMETS L.A. & VAN BEEK W.P.**
Carbohydrates of the tumor cell surface
Biochem. Biophys. Acta (1984) 738, 237-249. (p 68)
- **SMITH D.F., PRIETO P.A., MC CRUMB D.K. & WANG W.C.**
A novel sialylfucopentaose in human milk. Presence of this
oligosaccharide is not dependent on expression of the Secretor or Lewis
fucosyltransferases
J. Biol. Chem. (1987) 262, 12040-12047. (p 24, 34)
- **SOLOMON J.M., WAGGONER R. & LEYSHON W.C.**
A quantitative immunogenetic study of gene suppression invoking A1 and H
antigens of the erythrocyte without affecting secreted blood group
substances
Blood (1965) 25, 470-485. (p 62)

- **SPRINGER G.F.**

T and Tn, general carcinoma autoantigens

Science (1984) 224, 1198-1206.

(p 165)

- **STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., MICHALSKI J.C. & MONTREUIL J.**

Structure of a new oligosaccharide isolated from human milk : VI²Fuc, V⁴Fuc, III³Fuc-*p*-lacto-N-hexaose

Glycoconjugate J. (1988) 5, 385-396.

(p 24, 27, 41)

- **STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., MICHALSKI J.C. & MONTREUIL J.**

Primary structure of human milk nona- and decasaccharides determined by a combination of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry and ¹H-/¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Evidence for a new core structure, *iso*-lacto-N-octaose.

Glycoconjugate J. (1989) 6, 169-182.

(p 24, 27, 36, 139, 141)

- **STROUS G.J. & DEKKER J.**

Mucin-type glycoproteins

(p 165)

Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology (1992) 27, 57-92.

- **TACHIBANA Y., YAMASHITA K. & KOBATA A.**

Oligosaccharides of human milk : structural studies of di- and trifucosyl derivatives of Lacto-N-neo-octaose

Arch. Biochem. Biophys. (1978) 188, 83-89.

(p 23, 27, 43, 141)

- **TARRAGO M.T., TUCKER K.H., VAN HALBEEK H. & SMITH D.F.**

A novel sialylhexasaccharide from human milk : purification by affinity chromatography on immobilized wheat germ agglutinin

Arch. Biochem. Biophys. (1988) 267, 353-362.

(p 24, 39)

- **TISSIER H.**

Recherche sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson
Thèse de l'Université de Paris (1900).

(p 15, 49, 50)

- **TOMARELLI R.M., HASSINEN J.B., ECKARDT E.R., CLARK R.H. & BERNAHRT F.M.**

The isolation of a crystalline growth factor for a strain of *Lactobacillus bifidus*

Arch. Biochem. Biophys. (1954) 48, 225-232.

(p 53)

- WATKINS W.M.

Blood-group substances : in the ABO system the genes control the arrangement of sugar residues that determines blood-group specificity
Science (1966a) 152, 172-181. (p 57, 59)

- WATKINS W.M.

Blood-group specific substances
in "*Glycoproteins*" (GOTTSCHALK A. Ed) Elsevier Press, Amsterdam (1966b)
462-515. (p 57)

- WATKINS W.M.

Biosynthesis of blood group substances. Current concepts and results
in "*Blood and tissue antigens*" (D. AMINOFF Ed) Academic Press N.Y.
(1970) 441-459. (p 59)

- WATKINS W.M.

in "*Glycoproteins*" (GOTTSCHALK A. Ed) Elsevier, Amsterdam (1972) 830-891
(p 57)

- WATKINS W.M.

Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems
in "*Advances in human genetics*" (HARRIS H. & HIRSHHORN K. Ed) Plenum
Publishing Co, New York (1980) 10, 1-136 et 379-385. (p 59, 62)

- WATKINS W.M.

Biochemical genetics of blood group antigens : retrospect and prospect
Biochem. Soc. Trans. (1987) 15, 620-624. (p 59)

- WIERUSZESKI J.M., CHEKKOR A., BOUQUELET S., MONTREUIL J., STRECKER
G., EGGE H. & PETER-KATALINIC J.

Structure of two new oligosaccharides isolated from human milk :
sialylated Lacto-N-fucopentaoses I and II
Carbohydr. Res. (1985) 137, 127-138. (p 23, 25, 27, 33, 72)

- YAMASHITA K. & KOBATA A.

Oligosaccharides of human milk. V- Isolation and characterization of a
new trisaccharide, 6'-Galactosyllactose
Arch. Biochem. Biophys. (1974) 161, 164-170. (p 27, 31)

- YAMASHITA K., KOCHIBE N., OHKURA T., UEDA I. & KOBATA A.
Fractionation of L-Fucose-containing oligosaccharides on immobilized
Aleuria aurantia lectin
J. Biol. Chem. (1985) 260, 4688-4693. (p 25)
- YAMASHITA K., MIZUOCHI T. & KOBATA A.
Analysis of oligosaccharides by gel-filtration
in "*Methods in Enzymology*" (Ginsburg V. ed.) Academic Press, New York
(1982) 83, 105-126. (p 23)
- YAMASHITA K., TACHIBANA Y. & KOBATA A.
Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization of three
new disialylfucosyl hexasaccharides
Arch. Biochem. Biophys. (1976b) 174, 582-591. (p 23, 37, 141)
- YAMASHITA K., TACHIBANA Y. & KOBATA A.
Oligosaccharides of human milk : isolation and characterization of two
new nonasaccharides, Monofucosyllacto-N-octaose and Monofucosyllacto-N-
neoctaose
Biochemistry (1976a) 15, 3950-3955. (p 23, 35)
- YAMASHITA K., TACHIBANA Y. & KOBATA A.
Oligosaccharides of human milk : structural studies of two new
octasaccharides, difucosyl derivatives of para-Lacto-N-hexaose and
para-Lacto-N-neohexaose
J. Biol. Chem. (1977b) 252, 5408-5411. (p 23, 41, 72, 76, 139, 140)
- YAMASHITA K., TACHIBANA Y. & KOBATA A.
Oligosaccharides of human milk : structures of three Lacto-N-hexaose
derivatives with H-haptenic structure
Arch. Biochem. Biophys. (1977a) 182, 546-555. (p 23, 35, 139)
- ZILLIKEN F., BRAUN G.A. & GYORGY P.
Gynaminic acid, a naturally occurring form of neuraminic acid in human
milk
Arch. Biochem. Biophys. (1955a) 54, 564-566. (p 19)

- ZILLIKEN F., BRAUN G.A. & GYORGY P.
Gynaminic acid and other naturally occurring forms of N-acetylneuraminic acid
J. Biol. Chem. (1956) 63, 394-402. (p 19)
- ZILLIKEN F., ROSE C.S., BRAUN G.A. & GYORGY P.
Preparation of alkyl-N-acetyl- α - and β -D-glucosaminides and their microbiological activity for *Lactobacillus bifidus* var. *Penn.*
Arch. Biochem. Biophys. (1955d) 54, 392-397. (p 55)
- ZILLIKEN F., SMITH P.N., ROSE C.S. & GYORGY P.
Synthesis of 4-O- β -D-galactopyranosyl-N-acetyl-glucosamine by intact cells of *Lactobacillus bifidus* var. *Penn.*
J. Biol. Chem. (1955c) 217, 79-82. (p 53)
- ZILLIKEN F., SMITH P.N., TOMARELLI R.M. & GYORGY P.
4-O- β -D-galactopyranosyl-N-Acetyl-D-glucosamine in hog mucine
Arch. Biochem. Biophys. (1955b) 54, 398-405. (p 53)

APPENDICE TECHNIQUE

LES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME

I - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT

Après délipidation du lait par centrifugation à 3000g pendant une heure à 4°C, les oligosaccharides sont isolés par ultrafiltration sur membrane AN 69 (hémodialyseur Hospal, Sodip, Meysieur, France). Les oligosaccharides sialylés sont retenus sur un échangeur d'anions (Dowex 1x2, 200-400 mesh, forme bicarbonate). La solution neutre ainsi obtenue est concentrée et les oligosaccharides sont séparés du lactose par gel filtration sur Biogel P2 (140x8cm, Bio-Rad, Richmond, USA).

A) Isolement des oligosaccharides neutres

La fraction oligosaccharidique neutre est soumise à une chromatographie préparative sur papier Whatman n°3 pendant 3 jours. Par ce procédé, les oligosaccharides majeurs sont isolés alors que les oligosaccharides de haut poids moléculaire restent à l'origine. Après élution du papier, cette dernière fraction est soumise à une nouvelle chromatographie préparative sur papier pendant douze jours. Onze fractions sont ainsi obtenues, chacune d'entre elles étant hétérogène après analyse par chromatographie liquide haute performance.

B) Isolement des oligosaccharides acides

Les oligosaccharides acides, retenus sur la résine échangeuse d'anions lors du fractionnement des glucides du lait, sont élués par des concentrations croissantes d'acétate de pyridine de 5 mM à 500 mM.

II - HYDROLYSE ACIDE MENAGEE DE LA FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE NEUTRE

A) Conditions d'hydrolyse

Après lyophilisation de la fraction oligosaccharidique neutre, 2 grammes de ce mélange sont ajoutés à 100 ml d'acide sulfurique 0,05 N. L'hydrolyse ménagée est réalisée en portant cette solution à 100°C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par refroidissement sous courant d'eau. L'hydrolysate est ensuite neutralisé par une solution d'ammoniaque à 15 % et déssalé sur une colonne de Biogel P2.

B) Analyse des produits d'hydrolyse

1) *Analyse par chromatographie sur papier*

2) *Analyse par chromatographie sur couche mince*

3) *Analyse structurale par Résonance Magnétique Nucléaire*

Ces techniques d'analyses chromatographiques et structurales sont détaillées dans le paragraphe suivant.

III - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

A) La chromatographie sur papier

Les chromatographies descendantes sont réalisées sur papier Whatman n°3. Le solvant utilisé est le mélange Pyridine/ Acétate

d'éthyle/ Acide acétique/ Eau (5:5:1:3, v/v). La détection des oligosaccharides, réalisée après séchage de la feuille de papier, est obtenue par pulvérisation du réactif à l'oxalate d'aniline (PARTRIDGE, 1950) et chauffage à 200°C pendant 20 minutes. Dans le cas d'une chromatographie préparative, seules les bandes latérales sont révélées et les fractions oligosaccharidiques sont éluées par de l'eau (une nuit), désalées sur Biogel P2 et concentrées.

B) La chromatographie sur couche mince

Différentes analyses chromatographiques ont été réalisées sur couche mince de silice. Sur une plaque Silicagel-60 (Merck, Allemagne) sont déposées des quantités correspondant à 10 à 20 µg de matériel oligosaccharidique. Deux ou trois migrations successives, avec séchages intermédiaires, sont réalisées dans le solvant n-butanol/ acide acétique/ eau (2:1:1,5, v/v). La plaque est révélée par le réactif à l'orcinol sulfurique (solution à 0,2% d'orcinol dans H₂SO₄ 20%).

C) La chromatographie liquide haute performance

1) Isolement des oligosaccharides neutres

La chromatographie préparative des oligosaccharides natifs est réalisée par chromatographie liquide haute performance en phase réverse sur deux colonnes ODS Zorbax (5µm, 25 x 0,94cm I.D., Du Pont Instruments, Paris, France). Le solvant utilisé est l'eau distillée. Le débit varie de 0,5 à 2 ml/minute selon la fraction étudiée. Les oligosaccharides sont détectés à 206nm.

2) Isolement des oligosaccharides acides

La chromatographie préparative des oligosaccharides acides est réalisée sur les mêmes colonnes que précédemment. Le solvant utilisé dans ce cas est un tampon triéthylamine 10 mM ajusté à pH 5,0 par l'acide acétique. Selon la fraction étudiée, le débit varie de 0,5 à 2 ml/minute. Les oligosaccharides sont détectés par réfractométrie.

D) Chromatographie liquide d'échange d'ions haute performance

La purification de certains oligosaccharides est réalisée par chromatographie liquide d'échange d'anions (Dionex, Sunny Vale, Californie). L'élution est réalisée de façon isocratique par une solution de soude 100 mM. Les oligosaccharides sont détectés par ampérométrie pulsée.

Les potentiels utilisés et leurs durées respectives sont les suivants :

$E_1 = 0,05 \text{ V}$ ($t_1 = 300 \text{ ms}$); $E_2 = 0,65 \text{ V}$ ($t_2 = 180 \text{ ms}$); $E_3 = - 0,65 \text{ V}$ ($t_3 = 60 \text{ ms}$).

La colonne est une Carbo Pac PA 1 semi préparative (9 x 250 mm) avec la même phase stationnaire pelliculaire que la colonne analytique (4 x 250 mm) qui a été utilisée pour la mise au point des conditions d'élution. Pour élaborer les conditions de purification, 10 μg de l'échantillon sont injectés avec une sensibilité de détection de 300 nA pleine échelle. Pour les préparatives, 1 à 5 mg de l'échantillon peuvent être injectés et la sensibilité de détection est alors de 10 μA pleine échelle. Du fait que la ligne de base ne dérive pas en conditions isocratiques, il ne sera pas ajouté de Post-colonne.

Les échantillons sont collectés manuellement après la cellule

de détection, neutralisés avec une résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 2, forme H⁺, 200-400 mesh, Biorad (Richmond) et déssalés sur colonne de Biogel P2.

IV - LES METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE

A) La spectrométrie de masse

1) Méthylation

Les composés sont méthylés selon la méthode décrite par PAZ PARENTE et al. (1984).

Les composés (100 à 200 µg) sont dissous dans 200 µl de diméthylsulfoxyde dans un tube en verre et la solution est placée dans un bain ultrasonique pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 200 µl de base (lithium méthylsulfinyl carbanion) à la solution que l'on place de nouveau au bain ultrasonique pendant une heure. Après congélation, 400 µl d'iodeure de méthyle sont additionnés et l'alkylation se déroule pendant 1 heure au bain ultrasonique. 1 ml d'eau distillée contenant quelques cristaux de thiosulfate de sodium est ajouté, et le composé perméthylé est extrait par 3 fois 1 volume de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, lavées abondamment à l'eau, évaporées sous courant d'azote et lyophilisées.

Le composé perméthylé est méthanolysé pendant 24 heures à 80°C à l'aide de 0,5ml de méthanol chlorhydrique 0,5N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides partiellement méthylés sont acétylés par 10 µl de pyridine et 100 µl d'anhydride acétique pendant une nuit à température ambiante.

2) *Spectrométrie de masse par bombardement d'atomes accélérés*

Les expériences sont réalisées sur un spectromètre de masse Kratos Concept II HH en utilisant le xénon comme atome ionisant (conditions d'opération: 7,3 kV; 1,2 ms). Les spectres sont obtenus en mode ion-positif sous une accélération de 8 kV. Les oligosaccharides perméthylés (5 à 10 µg dissous dans 1 µl de méthanol) sont ajoutés à une matrice de thioglycérol avec un "coating" préalable avec de l'acétate de sodium.

3) *Spectrométrie de masse par désorption laser (MALD : Matrix Assisted Laser Desorption)*

Les analyses ont été réalisées sur un appareil Lasermat de Finnigan, dans les Laboratoires d'application d'Orsay.

Le rayonnement obtenu à partir d'un laser pulsé à azote (337 nm) est focalisé sur l'échantillon déposé sur une matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque à l'aide d'une lentille en silice fondue. Les ions désorbés à chaque pulse d'ionisation sont accélérés à une énergie de 20 KeV dans la direction du multiplicateur d'électrons. Tous les ions reçoivent la même énergie cinétique et leur vitesse est donc inversement proportionnelle à la racine carrée de leur masse. La mesure des masses est donc réalisée par un simple enregistrement du signal en fonction du temps.

B) La résonance magnétique nucléaire

Les expériences de résonance magnétique nucléaire du proton à 400MHz ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à transformée de

Fourier BRUKER AM-400 WB équipé d'une sonde 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et contrôlé par un ordinateur Aspect 3000.

Après trois échanges avec $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,95%, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) et lyophilisations intermédiaires, les échantillons sont repris par 0,5 ml de $^2\text{H}_2\text{O}$ et analysés avec une fenêtre spectrale de 3000Hz (résolution digitale = 0,365Hz/point).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 ont été obtenus en utilisant le programme standard POWGATE avec découplage large-bande du proton. Dans tous les cas, la fenêtre spectrale est de 20000Hz (0-200ppm) avec une résolution digitale de 1,221Hz/point.

Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés par rapport au groupement méthylé du 2,2-diméthyl-2-silapentane sulfonate de sodium et indirectement par rapport au groupement méthylé de l'acétone: $\delta = 2,225$ ppm pour le proton et $\delta = 31,55$ ppm pour le carbone 13.

Les expériences bidimensionnelles de corrélation homonucléaire ont été réalisées en utilisant les programmes de la librairie BRUKER (COSY et COSY relayés). Les spectres de corrélation carbone/proton ont été obtenus en utilisant le programme standard XHCORRD, le délai de refocalisation étant choisi de manière à correspondre à une constante de couplage moyenne: $J_{\text{C-H}} = 142\text{Hz}$.

LE PSEUDOMYXOME

I - PREPARATION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE A PARTIR DE LA SUBSTANCE GELATINEUSE PROVENANT D'UN PSEUDOMYXOME

Après lyophilisation de la substance gélatineuse et extraction des lipides par un mélange chloroforme : méthanol , 2 : 1 (v/v), le matériel est traité dans un litre d'une solution de NaCl 9 pour mille auquel est ajouté 1 ml de toluène afin d'éviter toute prolifération. Après une nuit sous agitation, la suspension est soumise à une dialyse contre de l'eau distillée. La substance mucoïde est alors obtenue par centrifugation.

II - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES REDUITS

La fraction glycannique ainsi obtenue est lyophilisée et soumise à une dégradation alcaline en milieu réducteur dans une solution de NaOH 50 mM contenant du NaBH_4 1 M, à 37°C pendant 24 heures. La réaction est stoppée par addition d'acide acétique puis centrifugation. L'acide borique est éliminé par distillation en présence de méthanol. Le matériel est ensuite fractionné sur une colonne de Biogel P4. Les oligosaccharide-alditols neutres et acides sont ensuite fractionnés sur une résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 2, 200-400 mesh, forme HCOO^-) éluée par de l'eau puis par concentrations croissantes d'acétate de pyridine (20 à 500 mM) avant d'être purifiés par chromatographie liquide haute performance.

III - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Les oligosaccharide-alditols sont purifiés par chromatographie liquide haute performance su colonne NH_2 (Supelcosil LC- NH_2 ; 4,5 mm x 25 cm; Supelco, Bellefonte, USA) en utilisant un gradient Acétonitrile / Tampon Phosphate (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ; pH 7) avec un débit de 1 à 1,5 ml par minutes selon les fractions étudiées. Les oligosaccharide-alditols sont détectés à 206 nm.

IV - ANALYSE STRUCTURALE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Se référer au paragraphe IV-B, page VI, du chapitre sur les sucres du lait de Femme.



RESUME

Le lait de Femme renferme une centaine d'oligosaccharides fucosylés et sialylés qui résultent de l'action de glycosyltransférases spécifiques des tissus glandulaires sur le Lactose. Ces constituants ont bénéficié d'un regain d'intérêt lorsqu'il est apparu qu'ils portaient parfois des épitopes glucidiques marqueurs de la cancérisation, tels que le Lewis X, ou encore le sialyl Lewis a. Les progrès réalisés dans le domaine des méthodes chromatographiques nous ont incitée à poursuivre l'analyse des oligosaccharides de haute masse moléculaire afin de rechercher de nouveaux épitopes d'intérêt biologique.

Les structures d'une dizaine d'oligosaccharides ont été établies en se fondant sur la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone, et sur la spectrométrie de masse. Nous avons ainsi identifié un nouveau "noyau" oligosaccharidique, le *para*-lacto-N-octaose, et décrit l'ensemble des paramètres de résonance magnétique nucléaire de toutes les molécules étudiées.

La comparaison entre les structures oligosaccharidiques du lait de Femme et celles des antigènes associés aux tumeurs a été poursuivie par l'étude de la substance mucoïde d'une tumeur du péritoine humain, à partir de laquelle nous avons caractérisé cinq glycanes majeurs, dont un porteur du déterminant sialyl Lewis X. En outre, la séquence disialylée NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GlcNAc- a pu être pour la première fois caractérisée à partir d'une mucine issue d'un adénocarcinome. Cet épitope glucidique, associé à un lipide, était connu comme l'un des marqueurs principaux de l'adénocarcinome colique, mais constitue également l'oligosaccharide acide majeur du lait de Femme.

Ces glucides du lait de Femme peuvent être rendus immunogéniques par couplage à des protéines ou des lipides et constituent alors un matériel de choix pour des études immunologiques.