\$0376 1997 359

N° d'ordre : 2137



Laboratoire de Chimie Biologique UMR 111 du CNRS Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d 'Ascq



THESE

Présentée par

Emmanuel MAES

Pour I 'obtention du grade de

DOCTEUR DE L 'UNIVERSITE Sciences de la Vie et de la Santé Spécialité : Biochimie

BIODIVERSITE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES MUCINES OVIDUCALES D'AMPHIBIENS Etude par résonance magnétique nucléaire de la structure primaire des oligosaccharide-alditols libérés par β-élimination

Soutenue le 9 décembre 1997 devant la Commission d'examen

Président : Professeur A. VERBERT Rapporteurs : Professeur J.F.G. VLIEGENTHART Professeur M. RIVIERE Examinateurs : Professeur Ph. ROUSSEL Professeur B. BOILLY Directeur de Thèse : Docteur G. STRECKER



N° d'ordre :



Laboratoire de Chimie Biologique UMR 111 du CNRS Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d 'Ascq

wrocobarb









Emmanuel MAES

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L 'UNIVERSITE Sciences de la Vie et de la Santé Spécialité : Biochimie

BIODIVERSITE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES MUCINES OVIDUCALES D'AMPHIBIENS Etude par résonance magnétique nucléaire de la structure primaire des oligosaccharide-alditols libérés par β-élimination

Soutenue le 9 décembre 1997 devant la Commission d'examen

Président : Professeur A. VERBERT Rapporteurs : Professeur J.F.G. VLIEGENTHART Professeur M. RIVIERE Examinateurs : Professeur Ph. ROUSSEL Professeur B. BOILLY Directeur de Thèse : Docteur G. STRECKER

A Delphine, Antoine et Elizabeth A ma Mère A la mémoire de mon Père A mes frères et sœurs A ma famille Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, dirigé par Monsieur le Professeur André Verbert et sous la direction scientifique du Docteur Gérard Strecker.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le Professeur André Verbert qui m'a fort justement orienté vers l'équipe du Docteur Strecker lors de mon arrivée dans son Laboratoire. Je vous remercie également pour l'honneur que vous me faites à présider le Jury de cette Thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Johannes F. G. Vliegenthart et Monsieur le Professeur Michel Rivière de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe Roussel et Monsieur le Professeur Benoni Boilly d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements et ma profonde reconnaissance au Docteur Gérard Strecker pour avoir dirigé mes recherches durant ces quatre dernières années. Merci Gérard pour ta générosité scientifique et ton enthousiasme.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur J. F. G. Vliegenthart et à toute son équipe de m'avoir accueilli dans son Laboratoire.

Je voudrais également remercier chaleureusement le Docteur Jean-Claude Michalski et Catherine Alonso pour leur amitié, leur soutien constant et la confiance qu'ils m'ont manifestés.

Un merci tout particulier à mon compagnon d'étude Stéphane et à Saïd pour l'amitié sincère qu'ils me donnent.

Merci à toutes celles et à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail et notamment, Florence, Doïna, Alexandra, Calliope, Bernadette, Jean-Pierre, Henri, Ossarath, Christophe, Denis, Yann, Yves, Willy et Rabih. Je tiens également à associer Messieurs Jean-Michel Wieruszeski et Bernard Mouchel pour leurs compétences et leur enseignement des manipulations sur l'appareil R.M.N.

Enfin, j'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Mesdames Francine Cabestaing et Monique Crunelle pour leur soutien et leurs encouragements durant ces huit années universitaires.

CE TRAVAIL A FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS SUIVANTES :

- ✓ Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive β-elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*. Characterization of the sequence $HSO_3(3)GlcA(\beta 1-3)Gal$, *C. Research*, 302, 179-189
- Maes E., Florea D., Delplace F., Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G. (1997) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β-elimination from oviducale mucins of *Rana temporaria*. *Glycoconj. J.*, 14, 127-146
- Maes E., Wieruszeski J. M., Plancke Y. and Strecker G. (1995) Structure of three Kdncontaining oligosaccharide-alditols released from oviducale secretions of *Ambystoma tigrinum* : characterization of the carbohydrate sequence Fuc(α1-5)[Fuc(α1-4)]Kdn(α2-3/6) FEBS-Letters, 358, 205-210
- ✓ Maes E., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Primary Structure of Oligosaccharide-alditols derived from the Jelly coat of Ambystoma tigrinum. Eur. J. Biochem., 230, 146-156

Des Communications orales suivantes :

✓ Strecker, E. Maes, W. Morelle, F. Delplace, Y. Plancke and D. Florea.

"NEW GLYCOSYLATION PATHWAYS INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF SPECIES-SPECIFIC GLYCAN MOIETIES OF AMPHIBIAN MUCINS".

Glyco XIV - XIV International symposium on Glycoconjugates, Zurich, Switzerland, September 7-12, 1997.

✓ Maes E., Delplace F., Florea D., Plancke Y., Cousin F., Lemoine J. and Strecker G.

"STRUCTURE OF SULFATE OLIGOSACCHARIDES FROM OVIDUCAL MUCINS OF RANA TEMPORARIA".

7th Joint Meeting of the "Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten", the "Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie" and the "groupe Lillois de Glycobiologie" Nuland, The Netherland. November 20 and 21, 1995

Des Communications ecrites suivantes :

✓ Maes E., Florea D., Coppin A. and Strecker G.

PRIMARY STRUCTURES OF 35 OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS RELEASED FROM OVIDUCAL MUCINS OF *Rana temporaria* and *Rana palustris*

9th European Carbohydrate Symposium, Utrecht : eurocarb₉, Netherlands, July 6-11 1997.

✓ Maes E., Florea D., Plancke Y., Delplace F., Wieruszeski J.M., Boilly B. and Strecker G.

N.M.R. ANALYSIS OF OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS RELEASED FROM THE JELLY COAT SURROUNDING THE EGGS OF AMPHIBIANS.

6th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. Villeneuve d'Ascq du 3 au 8 Septembre 1995.

✓ Maes E., Delplace F., Plancke Y., Cousin F., Florea D. and Strecker G.

ETUDE STRUCTURALE DES MUCINES DES GANGUES OVULAIRES DE DIVERSES ESPECES D'AMPHIBIENS.

XXII^{ième} Forum des jeunes chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Grenoble 4-7 Juillet 1995

EN MARGE DE CETTE THEMATIQUE, CERTAINES COLLABORATIONS ONT DONNE LIEU AUX PUBLICATIONS SUIVANTES :

- ✓ Faugeron C., Lhernould S., Maes E., Lerouge P., Strecker G. and Morvan H. (1997) Tomato plant leaves also contain unconjugated N-glycans. *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 73-79
- Plancke Y., Delplace F., Wieruszeski J. M., Maes E. and Strecker G. (1996) Isolation and structure of glycoprotein-derived free oligosaccharides from the unfertilized eggs of *Scyliorhinus caniculus*. : characterization of the sequence Galactose (α1-4) Galactose (β1-3) *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylneuraminic acid (α2-6) Galactose (β1-3) Nacetylglucosamine. *Eur. J. Biochem.*, 235, 199-206

La passion ne s'explique pas, elle se vit...

.



TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

CHAPITRE I GENERALITES SUR LES AMPHIBIENS ET LEUR REPRODUCTION

1. DEFINITION	
2. CLASSIFICATION	3
3. LA REPRODUCTION DES AMPHIBIENS	8
4. CONCLUSION GENERALE	26

CHAPITRE II LES MUCINES

1.	DEFINITION	28
2.	ORGANISATION GENERALE DES MUCINES	29
3.	ROLES ET FONCTIONS DES MUCINES	45
4.	REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES MUCINES	49
5.	CONCLUSION	50

CHAPITRE III O-GLYCANNES

1. INTRODUCTION	
2. STRUCTURE GENERALE	53
3. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES	60
4. LES GLYCOSYLTRANSFERASES	64
5. GLYCOSYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS L'ELONGATION DES NOYAUX	67
6. ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DE LA PERIPHERIE DES O-GLYCAN	NNES 68

7. ROLE DE LA O-GLYCOSYLATION	1
-------------------------------	---

CHAPITRE IV R. M. N.

1. INTRODUCTION	
2. SCHEMA GENERAL D'UNE EXPERIENCE R.M.N.	76
3. PRINCIPE DE BASE	
4. PRINCIPE GENERAL	
5. ETUDE D'UN EXEMPLE	
6. CONCLUSION	

MATERIELS ET METHODES

RESULTATS ET DISCUSSIONS	
CHAPITRE V	AMBYSTOMA TIGRINUM117
CHAPITRE VI	RANA TEMPORARIA131
CHAPITRE VII	Rana temporaria (Suite)165
CHAPITRE VIII	RANA PALUSTRIS

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE



La biodiversité s'applique parfaitement à la classe des Amphibiens. Ces animaux sont en effet représentés par un très grand nombre de classes, de familles et de sous-familles contenant elles-mêmes une multitude d'espèces et de genres. Certains d'entre eux n'existent d'ailleurs que sur quelques mètres carrés de forêt tropicale. Cette diversité se traduit aussi par leurs modes de reproduction aussi complexes que variés mais qui perpétuent, comme chez toutes les êtres vivants, l'espèce.

Certaines études récentes montrent l'intérêt des chaînes glycanniques dans les mécanismes de reproduction puisqu'elles interviennent dans la spécificité de reconnaissance des gamètes homologues. Les ovocytes d'Amphibiens constituent un excellent modèle pour l'étude de tels glycannes. En effet ces ovocytes sont abondamment recouverts de gangues concentriques essentiellement composées de glycoprotéines de type mucine hautement glycosylées. Des études structurales sur les glycannes libérés par β -élimination réductrice des mucines, ont été réalisées dans notre laboratoire. Celles-ci ont montré que dans toutes les espèces étudiées, il existe une hétérogénéité structurale des glycannes intrinsèque à l'espèce. Ces résultats suggèrent des activités glycosyltransférasiques particulièrement actives et parfois originales. Cette diversité structurale peut encore définir la biodiversité de ces animaux.

Dans ce travail nous proposons, dans un premier temps, une revue générale qui s'articule autour des 4 mots clés qui résument ce travail; Amphibiens, Mucines, Oligosaccharides et enfin Résonance Magnétique Nucléaire.

Cette revue sera suivie des résultats obtenus qui ont consistés à isoler et définir la structure primaire des oligosaccharide-alditols majeurs contenus dans les gangues ovulaires de 3 espèces d'Amphibiens : *Axolotl tigrinum* (Urodèle), *Rana temporaria* et *Rana palustris* (Anoures). Ces travaux ont fait l'objet de 4 publications et de 2 autres qui seront prochainement soumis à référer. Les structures primaires des oligosaccharide-alditols ont pu être déterminées essentiellement à partir des données de la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone ; cette technique se révèle particulièrement puissante pour l'analyse de telles molécules biologiques.

Enfin, les différentes structures isolées de chaque espèce sont en faveur d'une biodiversité basée sur le polymorphisme des chaînes glycanniques des mucines sécrétées du tractus oviducal.



CHAPITRE I

GENERALITES SVR LES AMPHIBIENS ET LEVRS REPRODUCTIONS



TABLE DES MATIERES

1. DEFINITION	. 3
2. CLASSIFICATION	. 3
2.1 ORDRE DES APODES OU GYMNOPHIONES: 2.2 ORDRE DES URODELES. 2.3 ORDRE DES ANOURES 2.4 CONCLUSION	5 5 6 7
3. LA REPRODUCTION DES AMPHIBIENS	8
3.1 L'OVIDUCTE 3.2 L'OVOCYTE 3.2.1 L'espace périvitellin	.9 12 13
3.2.2 Le Chorion	[4
3.2.2.1 L'enveloppe ovarienne 1 3.2.2.2 L'enveloppe ccelomique 1 3.2.2.3 L'enveloppe vitelline 1 3.2.2.4 Enveloppe de fertilisation 1 3.2.2.5 Les gangues ovulaires 1 3.2.2.5.1 Description des gangues 1 3.2.2.5.2 Composition des gangues 1 3.2.2.5.3 Rôles des gangues dans la fertilisation 1	14 14 15 16 17 18 19 20
4. CONCLUSION GENERALE	27

1. DEFINITION

Amphibien est un nom d'origine grecque qui signifie double existence faisant référence à une vie aquatique et à une vie terrestre. C'est Linné (1707-1778) qui utilisa le premier le terme Amphibien, désignant ainsi un ensemble de vertébrés disparates dont le seul caractère commun est une nécessité de retourner dans le milieu aquatique pour s'y reproduire, alors qu'ils possèdent une morphologie plutôt adaptée à la vie terrestre. Brongniart (1801-1876) leur donna le nom de Batraciens après que ce groupe de vertébrés inférieurs eût été plus amplement étudié et connu. Enfin en 1806, Duméril distingua les deux types d'Amphibiens en les définissant Anoures pour les *ecaudata* et Urodèles pour les *caudata*.

Ainsi la définition (générale) actuelle des Amphibiens ou Batraciens correspond à : des vertébrés à température variable, à peau nue, à circulation sanguine double et à respiration pulmonaire chez l'adulte. Ils sont pourvus, chez certains ordres, de quatre membres adaptés à la marche et ont un développement embryonnaire marqué par l'absence d'amnios et d'allantoïde et en général à larve aquatique subissant une métamorphose pour donner l'adulte. Ils sont encore dit anamniens et anallantoïdiens

2. CLASSIFICATION

En 1974, les herpétologistes estimaient à environ 2000 le nombres des espèces d'Amphibiens, qui par ailleurs n'étaient pas toutes répertoriées ni classées. En 1992, W. Duellman en recensait environ 3800, soit environ deux fois plus qu'il y a vingt ans. Ceci s'explique par le fait qu'il existe de nombreux phénomènes de convergences entraînant une morphologie assez semblable de la plupart d'entre eux.

Ainsi la classe des Amphibiens se divise en trois sous-classes : les Labyrinthodontes, les Lepospondyles et les Lissamphibiens mais seule cette dernière est représentée aujourd'hui, les deux autres étant fossiles. La classification est basée essentiellement sur la phénotypie des espèces (principalement sur le squelette) et se divise en trois ordres d'importance variable.



+ Fossile

Les noms en rouge représentent la phylogènie des espèces étudiées au laboratoire

Figure 1 : Représentation schématique de la classification des Amphibiens.

2.1 Ordre des Apodes ou Gymnophiones:



Gymnophis multiplicata

Les apodes se caractérisent par l'absence de membres et par leur physionomie vermiforme. Leur reproduction est différente suivant les espèces ainsi les apodes peuvent être aussi bien vivipares qu'ovipares. Cependant les mâles possèdent un organe copulateur qui permet alors une fécondation interne. Cet ordre comprend six familles distinctes : Les *lchthyophiidae*, les *Rhinatremidae*, les *Scolecomorphidae*,

les *Dermophidae*, les *Caeciliidae* et les *Typhlonectidae*. Il est à souligner que ces apodes ne sont présents que dans les régions chaudes du globe.

2.2 Ordre des Urodeles



Ambystoma tigrinum

Cet ordre est caractérisé par le fait que ces vertébrés inférieurs possèdent des vertèbres caudales durant toute leur existence. Cet ordre est constitué de cinq sous-ordres (**figure** 1) dont les caractéristiques varient d'un sousordre à l'autre.

- Cryptobranchoidea : Fécondation externe, taille importante, ovipare et métamorphose avec séquelles embryonnaires (dents larvaires). Ils sont représentés par deux familles.
- Ambystomoidea : Fécondation interne par un spermatophore, mais leur principale caractéristique reste, pour certaines espèces, leur possibilité de néoténie. Ce sous-ordre est représenté par quatre familles, dont une, fossile.
- ✓ Salamandroidea : ce sous-ordre ne comporte qu'une famille divisée en trois sousfamilles et représente la majorité des Urodèles européens. Cette famille se caractérise par une ponte réduite (une vingtaine d'œufs) cependant les ovocytes sont volumineux, et se reproduisent par fécondation externe.
- Proteoidea : Ce sont des animaux à néoténie obligatoire ne représentant qu'un petit groupe d'Urodèles ; ils sont ovipares et essentiellement cavernicoles. Ce sous ordre est restreint à deux familles dont l'une est fossile.

✓ Sirenoidea : Représentés par une seule famille, les Sirenoidea sont néoténiques, anguilliformes, à branchies externes persistantes et ne possédent pas de membres postérieurs. Bien que classé chez les Urodèles, ce sous-ordre reste "énigmatique" tant leur morphologie et leur mode de vie sont particuliers.

2.3 ORDRE DES ANOURES



Rana temporaria

Les Anoures représentent la plus grande des familles de Batraciens et sont vulgairement appelés grenouilles, crapauds et autres rainettes. La principale différence avec l'ordre des Urodèles est que ces Amphibiens ne possèdent pas de queue à l'état adulte. Leur classification n'est pas aisée en raison de l'évolution parallèle et convergente des différentes divisions. C'est pourquoi ces

Anoures se divisent en trois sous-ordres qui comprennent de nombreuses super-familles, familles, sous- familles et une multitude de genres :

SOUS-ORDRE DES ARCHEOBATRACHIA

✓ *Discoglossoidea* : Cette super-famille se divise en deux familles, les *Discoglossidae* qui sont représentés sur tout le continent et sont de petite taille et les *Leiopelmatidae* qui représentent la forme la plus primitive des Anoures ; leur fécondation est interne.

SOUS-ORDRE DES MESOBATRACHIA

 \checkmark *Pipoidea* : Cette super-famille est représentée par les *Pipidea* qui vivent et se reproduisent exclusivement dans l'eau. Ces Batraciens ont une perception chimique hautement développée contrairement aux autres où la perception est essentiellement visuelle. Le genre le plus connu est *Xenopus*, leur aptitude à supporter la captivité en a fait un animal de laboratoire par excellence. Les deux autres familles sont *Rhinophrynidae* et *Paleobatrachiadae* (cependant cette dernière est fossile).

✓ Pelobatoidea : Autre super-famille des Mesobatrachia, ces animaux sont présents sur tout les continents et les espèces ont un développement tout à fait classique.

SOUS-ORDRE DES NEOBATRACHIA

Par le nombre d'espèces qu'il comporte, c'est le plus important des sous-ordres des Anoures, il est d'ailleurs représenté par trois super-familles et de nombreuses familles (Fig. 1).

- ✓ Bufonidae : Cette super-famille est la plus importante, par le nombre de ses représentants, et renferme une très grande diversité d'espèces réparties en douze familles. Celles ci renferment notamment le genre Phyllomedusa, Bufo ainsi que le genre Sminthillus, qui est le plus petit des Batraciens, ne mesurant que quelques centimètres.
- *Ranoidea* : Celle-ci est également très bien représentée et se divise en trois familles. On retrouve notamment le genre *Rana* qui à lui seul renferme plus de 200 espèces connues. Ces *Ranoidea* présentent une grande variabilité morphologique mais également écologique.
- ✓ Microhyloidea : Cette super-famille est représentée par une famille et neuf sousfamilles. Les espèces sont morphologiquement proches des Ranoidea, ce qui a valu aux taxinomistes de nombreuses difficultés à les classer.

2.4 CONCLUSION

Au terme de cette brève présentation, nous pouvons conclure que de par leur diversité, dans leur morphologie, leur habitat, leur mode de reproduction, les Amphibiens représentent l'ordre des vertébrés le plus complexe, ce qui en fait un modèle de choix dans de nombreuses études scientifiques. La taxinomie de ces espèces s'est faite, entre autres, par la phénotypie, et en particulier, par l'étude morphologique du squelette. Les travaux de génie génétique et biochimique vont probablement conduire à de nombreux bouleversements dans cette classification, d'autant plus que les herpétologistes découvrent régulièrement de nouvelles espèces alors que d'autres tombent en synonymie ou disparaissent. Ils estiment ainsi que de nombreuses espèces inconnues existent dans certaines régions non encore explorées, notamment en Asie centrale et en Amérique du sud. Pour de plus amples informations, le lecteur pourra se référer aux ouvrages spécialisés ; notamment le traité de zoologie de Pierre-P. Grassé (1986).

3. LA REPRODUCTION DES AMPHIBIENS

Fait assez rare dans le règne animal, les Amphibiens ont la particularité de posséder des modes de reproductions extrêmement variés. Ainsi ils peuvent être ovipares (cas le plus fréquent) ou vivipares suivant les ordres ; cependant tous les ovocytes ont la particularité d'être entourés par une gelée nécessaire et indispensable à leur fertilisation. Chez les espèces ovipares les ovocytes sont pondus de différentes manières, ainsi ils peuvent être émis en grappe comme chez les Ranidés, ou en cordons comme chez les Bufonidés (Fig. 2a,b). De plus la quantité d'œufs est très variable suivant les ordres et les espèces. Ainsi le nombre d'ovocytes chez les Anoures varie de 1 chez *Sminthillus* de Cuba à plus de 12000 chez le crapaud vert et ceci pour une seule ponte, alors que les Urodèles en émettent de 3-5 (*Hydromantes*) à environ 400 chez les Tritons.

Dans cette partie nous expliquerons succinctement le devenir des ovocytes, de l'ovulation à la fécondation. Nous insisterons sur l'importance des gangues ovulaires entourant les ovocytes



Figure 2a : Représentation schématique des différents types de gangues chez les Urodèles. 1- Hynobius lichenatus, 2-Cryptodranchus alleganiensis, 3-Ambystoma jeffersonianum, 4-Ambystoma maculatum, 5-Siren lacertina, 6-Necturus maculosus, 7-Taricha granulosa, 8-Triturus vulgaris, 9-Amphiuma means, 10-Desmognatus fuscus, 11-Pseudoeurycea belli. D'après Salthe (1963)



Figure 2b : Représentation schématique de la morphologie des différentes gangues d'Anoures. 1-Xenopus laevis, 2-Pipa pipa, 3-Bombina variegata, 4-Alytes obstetricans, 5-Scaphiopus hammondi, 6-Kyarranus sphagnicolus, 7-Adelotus brevis, 8-Pseudophryne dendyi, 9-Eleutherodactylus abbotti, 10-Bufo bufo, 11-Bufo terrestris, 12-Hyla crucifer crucifer, 13-Acris crepitans, 14-Rana pipiens, 15-Rana temporaria. D'après Salthe (1963)

3.1 L'OVIDUCTE

L'organe reproducteur femelle (ou canal de Müller) des Amphibiens (Figure 3) se présente comme une structure tubulaire pouvant atteindre de 3 à 4 fois (tous segments confondus) la longueur du tronc de l'animal. Il se décompose en trois parties : la *pars recta* qui est courte et transparente, la *pars convoluta* représente la plus grande partie (chez les ovipares) et prend une forme large et contournée et enfin la *pars uterina* assez courte et curviligne.



Figure 3 : Représentation schématique du canal de Müller

La pars convoluta est responsable de la sécrétion des différentes gangues entourant l'œuf (Boisseau 1975, Shivers & James 1969, Steinke & Benson 1970) et constitue la plus grande partie de l'oviducte. Celui-ci est divisé en trois parties, l'oviducte antérieur (O.A.), l'oviducte moyen (O.M) et l'oviducte postérieur (O.P.) (Boisseau & Joly 1972). Mais certains auteurs (Shivers & James 1969) décomposent ces parties en segments reliant ainsi le nombre de gangues avec ces différentes régions. (Fig. 4). Cependant chez les espèces vivipares (*Typhlonectes compressicaudus*, Apode) la pars convoluta est peu développée et plus ou moins rectiligne laissant place à une pars uterina qui est beaucoup plus importante permettant ainsi à l'embryon de s'y développer, on parle alors d'utérus ou d'ovisac.



Figure 4 : représentation schématique du trajet des ovocytes de la ponte à la maturation. La nomenclature des régions de l'oviducte est faite en fonction de la synthèse des gangues. (inspiré de Katagiri 1986)

Les ovocytes nouvellement pondus par les ovaires sont transportés vers les trompes. Ce transport cœlomique est effectué grâce à des cellules ciliées, réparties sur plusieurs organes (péricarde, foie et mésovarium) (Fig. 5). Les cils sont disposés de telle manière qu'ils convergent tous vers la trompe (Rught 1935). Les ovocytes, qui ne sont pourvus que de leur seul chorion (ou enveloppe vitelline), arrivent donc dans l'oviducte antérieur ou ils vont subir une maturation. Le transport intra-oviducal est également assuré par des cellules ciliées (Rught 1935, Low *et al* 1976) qui sont disposées de différentes manières suivant les classes d'Amphibiens. Ce transport n'est pas spécifique et il n'est pas dû à des phénomènes de péristaltisme. Par ailleurs de nombreuses expériences ont montré que des billes de verre et des œufs d'espèces phylogéniquement éloignées ou non peuvent être transportés (Arnold & Shaver 1962; Houillon 1972; Lavin 1964); et de façon trés surprenante les billes et les œufs hétérologues ont été pourvus de gangues parfaitement concentriques et uniformes.En effet, les études histologiques ont montré que la paroi de l'oviducte est pauvre en muscles lisses, muscles responsables du péristaltisme.



Figure 5: Coupe transversale d'un Amphibien, Rana pipiens, selon Rugh (1935).

L'ovocyte qui a atteint la trompe n'est pourvu que de son seul chorion et c'est au niveau de l'oviducte moyen (*pars convoluta*) et de ses différents segments que cet ovocyte se voit entouré de gangues régulièrement déposées de manière concentrique. Plusieurs auteurs ont étudié ce mécanisme chez différentes espèces (Shivers & James 1969: Boisseau *et al* 1974; Humphries A. A. Jr. 1966), ils en ont conclu que seule la rotation de l'ovocyte est responsable de l'uniformité des dépôts de produits de sécrétion. Les ovocytes ainsi pourvus de leurs gangues peuvent soit séjourner dans l'ovisac soit être expulsés via le cloaque. L'expulsion peut être induite par plusieurs phénomènes tels que des contractions musculaires, contrôlées par des hormones hypophysaires (Abalain 1977), ou par l'amplexus du mâle (Heller *et al* 1970). Le rôle de l'oviducte se résume donc au transport cœlomique des ovocytes et à leur maturation. Toutefois la fonctionnalité de cet organe est étroitement contrôlée par différentes hormones en fonction du cycle ovarien (Adams 1940, Jørgensen & Vijayakumar 1970). Ce sont essentiellement les hormones sexuelles de type œstrogènes et notamment l'œstradiol et la progestérone (Lodge & Smith 1960, Joly & Picheral 1972, Boisseau 1975, Jego 1977, Maack *et al* 1985) qui contrôlent les fonctions des différents types cellulaires (Ovaire, cellules ciliées, cellules mucosécrétrices) responsables de l'ovulation et de la maturation des ovocytes avant leur expulsion. Toutefois certains travaux (Thornthon & Evenett 1969, Jego & Abalin 1978) montrent que certaines hormones hypophysaires (prolactine) peuvent provoquer la sécrétion du matériel mucilagineux même en l'absence d'ovocyte. Enfin l'expulsion des ovocytes matures est conditionnée par certaines hormones neuro-hypophysaires (Heller 1970), telle que la vasotocine, mais surtout par certains stimuli extérieurs.



Schéma 1 : Représentation de la régulation hormonale de la vitellogenèse à la maturation.

3.2 L'OVOCYTE

L'ovocyte est donc constitué de l'ovocyte cœlomique enfoui dans une matrice extracellulaire (M.E.C.) abondante, insoluble et très hydrophile (Yurewicz *et al* 1975). Cette dernière est déposée lors du passage des ovocytes dans l'oviducte (Rught 1935, Humphries 1966, Shivers & James 1969, Jørgensen & Vijayakumar 1970, Gusseck & Hendrick 1971, Boisseau *et al* 1974, Low *et al* 1976, Picheral 1977a, Hedrick 1991) et elle est caractéristique de tout Amphibien (Salthe 1963, Yurewicz *et al* 1975). Cette M.E.C. est composée de plusieurs couches de composition et de morphologie bien distinctes suivant le groupe et l'espèce d'Amphibien (Katagiri *et al* 1987, Elinson 1986, Caroll *et al* 1991a,b) (Fig.6). C'est Salthe (1963) qui a réalisé l'étude descriptive la plus complète à ce jour puisqu'elle repose sur 33 espèces d'Urodèles et 41 espèces d'Anoures. C'est ainsi que les ovocytes d'Urodèles peuvent être classés en deux groupes, l'un possédant une chambre capsulaire, l'autre, mineur, n'en possède pas ; néanmoins leur morphologie est assez semblable. Les ovocytes d'Anoures sont quant à eux difficiles à classer tant leur diversité morphologique est très grande ce qui rend complexe une comparaison par espèce. Le seul point commun des Anoures est qu'ils ne possèdent pas de chambre capsulaire, hormis les espèces les plus primitives : *Discoglossus* et *Pipa* (Salthe 1963).

L'architecture globale de la matrice extra-cellulaire (Fig. 6) est définie par l'espace périvitellin qui isole l'ovocyte de l'enveloppe vitelline (ou chorion), le chorion qui est relativement mince, et enfin les gangues ovulaires qui sont présentes en nombre variable suivant les espèces (Salthe 1963, Freeman 1968, Shivers & James 1969, Yurewicz *et al* 1975, Campanella 1975, Mc Laughlin & Humphries 1978, Yoshizaki 1985).

Les rôles de ces enveloppes sont nombreux et divers ; elles sont indispensables, *in vivo*, à une fertilisation réussie (Rught 1935, Kambara 1953, Katagiri 1966, 1973, Hendrick & Nishihara 1991, Omata 1993) et à un développement normal de l'embryon résultant (Humphries 1961). De nombreuses études de la matrice extra-cellulaire, essentiellement sur *Xenopus laevis*, ont été réalisées permettant ainsi d'en définir la composition, la structure et l'importance biologique. Ainsi la microscopie électronique (Dumont & Brumett 1977 ; Grey *et al* 1974,1977 ; Larabell & Chandler 1989) a révélé l'organisation quaternaire des macro-molécules qui composent cette dernière et les techniques immunologiques, enzymatiques et chimiques ont permis d'en déterminer la composition (Yurewicz *et al* 1975 ; Gerton & Hedrick 1986a,b ; Lindsay & Hedrick 1989 ; Bakos *et al* 1990a ; Takamune *et al* 1986). Tous ces éléments ont permis aux auteurs de définir un certain nombre de mécanismes impliqués dans le processus complexe de la fertilisation, de la reconnaissance des gamètes homologues à la fécondation.

3.2.1 L'ESPACE PERIVITELLIN

Larabell & Chandler (1989) ont été les premiers à caractériser l'espace périvitellin comme étant un réseau dense de fibres reliant la surface de l'ovocyte au chorion.

3.2.2 LE CHORION

Cette enveloppe a été étudiée de manière approfondie chez *Xenopus laevis*, néanmoins elle existe chez tout les ovocytes d'Amphibiens. Le chorion possède une ultrastructure et une composition macromoléculaire différente suivant le stade de maturation de l'ovocyte. Alors que l'ovocyte est encore dans l'ovaire, ce chorion est appelé enveloppe ovarienne, il est appelé enveloppe cœlomique lorsqu'il est associé à l'ovocyte nouvellement pondu. Cette enveloppe cœlomique est convertie en enveloppe vitelline lorsque l'ovocyte a franchi la *pars recta* de l'oviducte et enfin cette dernière se transforme en enveloppe de fertilisation sous l'action du contenu des granules corticaux.

3.2.2.1 L'enveloppe ovarienne

Bien étudiée en microscopie électronique (Dumont & Brumett 1977, Grey *et al* 1977), cette enveloppe est composée de macromolécules fibrillaires formant une ultrastructure tubulaire organisée en réseau tridimensionnel complexe. Gerton & Hedrick (1986a,b) ont décrit six glycoprotéines différentes possédant des masses moléculaires de 37 à 120 kDa. Une déglycosylation chimique a mis en évidence une glycosylation importante (Lindsay & Hedrick 1988, Bakos *et al* 1990a,b).

3.2.2.2 L'enveloppe cælomique

Associée à l'ovocyte nouvellement expulsé de l'ovaire, la composition en glycoprotéines de l'enveloppe cœlomique est la même que celle de la précédente (Gerton & Hedrick 1986, Takamune *et al* 1986) seule leur organisation est différente. Elles sont associées pour former des paquets de fibres, eux-même regroupés en réseau tubulaire mais beaucoup plus lâche que dans l'enveloppe ovarienne (Larabell & Chandler 1989, Dumont & Brumett 1977, Grey *et al* 1977). Ces fibres sont reliées à la membrane plasmique *via* l'espace périvitellin. D'autres auteurs ont étudié l'ultrastructure de cette même enveloppe chez d'autres espèces d'amphibiens telles que *Rana japonica* (Yoshizaki & Katagiri 1981) ou encore *Bufo arenarum* (Mariano *et al* 1984) et montrent ainsi une similarité avec celle décrite chez *Xenopus laevis*. Dans les conditions *in vivo*, un ovocyte pourvu uniquement de cette enveloppe n'est pas fécondable (Barbieri & Brudeger de Atenor 1973) ; néanmoins Elinson (1971 ;1973a,b) a réussi à fertiliser, *in vitro*, des ovocytes cœlomiques à condition que ceux-ci soient mis en suspension avec des extraits de l'enveloppe vitelline traités préalablement avec des agents réducteurs et enzymatiques (trypsine). Katagiri (1974) a quant à lui réussi à faire féconder, des ovocytes vitellins de *Rana* par des spermatozoïdes de *Bufo* en présence d'extraits diffusibles des gangues de *Bufo*, et ceci à haute fréquence. Cependant il convient de noter que les œufs ainsi fécondés ne se développent que jusqu'au stade de la *gastrula*.

3.2.2.3 L'enveloppe vitelline

L'ovocyte cœlomique est transporté vers l'oviducte par le réseau ciliaire décrit précédemment, il traverse alors la *pars recta*. C'est à ce niveau que l'enveloppe cœlomique va subir de profondes modifications. La composition en glycoprotéines y est différente (Takamune *et al* 1986). Ces auteurs y ont recensé 7 glycoprotéines dont une nouvelle et une autre modifiée par dégradation enzymatique (Gerton & Hedrick 1986a ; Lindsay & Hedrick 1988 ; Bakos *et al* 1990b). Hedrick et Nishihara (1991) ont suggèré que la nouvelle GP (57kDa) est synthétisée par les cellules de l'oviducte. En outre les propriétés physiques de ces molécules sont fondamentalement différentes, puisque leur sensibilité à différents agents chimiques et enzymatiques est totalement modifiée. (Wolf 1974 ; Nishihara *et al* 1983 ; Bakos *et al* 1990a,b ; Hedrick & Nishihara 1991). De même la microscopie électronique montre une modification de leur organisation. Celles-ci sont toujours associées en fibres mais forme un réseau tubulaire plus mince et beaucoup plus uniforme que celui observé dans l'enveloppe cœlomique (Larabell & Chandler 1988, 1989). Ceci a également été observé chez *Rana japonica* (Yoshizaki & Katagiri 1981) *Bufo japonicus* (Katagiri *et al* 1982) et *Bufo arenarum* (Mariano *et al* 1984)

Toutes ces modifications sont donc reliées au passage de l'ovocyte dans la partie *pars recta* de l'oviducte. Miceli *et al* (1978 a,b) ont montré l'existence d'une protéase sécrétée par les cellules de l'oviducte, alors que Cabada *et al* (1978) l'ont isolée et décrite comme étant une glycoprotéine (retenue sur concanavaline A Sépharose) ayant une activité trypsique. Miceli et Fernandez (1982) qui ont partiellement purifié cette enzyme chez *Bufo arenarum*, suggèrent également que cette protéase possède effectivement une activité trypsique qui induit les modifications physico-chimiques de l'enveloppe cœlomique. Cette enzyme relarguée dans le tractus oviducal sous forme de granules de sécrétions, est appelée oviductine. Chez l'espèce *Bufo japonicus*, Takamune et Katagiri (1987) ont également purifié, à partir de ces granules de sécrétion, une protéase qui hydrolyse spécifiquement une glycoprotéine (GP43) de l'enveloppe cœlomique. De plus ils ont mis en évidence que seul un extrait brut de ces granules est à même de rendre fertilisable un ovocyte vitellin.

La principale fonction de cette enveloppe est de présenter les ligands nécessaires aux récepteurs des spermatozoïdes, et c'est la raison pour laquelle elle est encore appelée enveloppe de réception des spermatozoïdes (Larabell & Chandler 1988). Lindsay & Hedrick (1988) ont pu mettre en évidence les interactions entre ces spermatozoïdes et l'enveloppe vitelline en utilisant les méthodes d'immuno-répliques et montrer que les enzymes des spermatozoïdes (Raisman et Barbieri 1969 ; Elinson 1971 ; Iwao & Katagiri 1982) sont capables de lyser cette barrière afin de faciliter leur pénétration.

3.2.2.4 Enveloppe de fertilisation

Elle apparaît suite à la fécondation et résulte de la transformation de l'enveloppe vitelline par différents processus que nous tenterons de résumer ici.

La fécondation a toujours lieu dans le pôle animal de l'ovocyte (Elinson 1986, Charbonneau & Picheral 1983), il s'ensuit une dépolarisation de la membrane plasmique avec un changement du potentiel membranaire qui provoque la fusion des granules corticaux avec la membrane et l'exocytose de leur contenu. Cette expulsion s'accompagne de nombreux changements physiologiques de l'œuf (Elinson 1986).

Grey *et al* (1974) et parallèlement Wolf (1974) ont mis en évidence le contenu de ces granules corticaux, dont une glycoprotéine de masse moléculaire 50 kDa qui est capable d'induire artificiellement la fertilisation d'ovocytes dégangués, ils l'ont appelé composé F. Celui ci se polymérise en présence d'ions divalents (Ca²⁺) pour former une enveloppe résistante, dense aux électrons (Wyrick *et al* 1974). Ultérieurement Greve et Hedrick (1978) ont mis en évidence une glycoprotéine ayant une activité lectinique spécifique du galactose qui, pour ces auteurs, est responsable de la formation de la couche F (dite de fertilisation), en effet elle se complexe avec les résidus galactosyls présents dans la première couche de gangues. Cependant les travaux de Yoshizaki et Katagiri (1984) qui confirment que ce composé F est bien une lectine, ont proposé qu'elle a pour ligands des structures galactosylées synthétisées

par les cellules "oviducales" de la *pars recta* (Yoshizaki 1984). Cette couche F, couche dense aux électrons, qui se trouve donc à l'interface entre l'enveloppe vitelline et la première couche de gangues (Grey *et al* 1974, Wolf 1974, Yoshizaki & Katagiri 1984), permet de piéger le contenu des granules entre l'enveloppe de fertilisation et la membrane de l'œuf, formant ainsi une barrière osmotique (Schmell *et al* 1983).

Certaines glycoprotéines de l'enveloppe vitelline subissent une hydrolyse partielle sous l'action d'enzymes protéolytiques relarguées de ces mêmes granules corticaux, cette hydrolyse ménagée va conférer à cette enveloppe une plus haute résistance aux protéases des spermatozoïdes (Miceli et al 1977; Schmell et al 1983; Wyrick et al 1974). Prody et al (1985) ont purifié une glycosidase (N-acétyl-β-D-glucosaminidase) des granules corticaux des œufs de Xenopus laevis. Cette glycosidase est relarguée dans l'espace périvitellin et hydrolyse les sites de fixations des lectines membranaires du spermatozoïde. L'enveloppe vitelline est ainsi transformée en enveloppe de fertilisation, imperméable aux spermatozoïdes, résistante à la solubilisation thermique, chimique et enzymatique (Katagiri 1973, Wolf 1974) et particulièrement résistante à la lysine du spermatozoïde (Miceli et al 1977, Grey et al 1976). La mise en place de cette couche F ("F-Layer"), la transformation de la membrane vitelline en enveloppe de fertilisation et le relargage d'enzymes hydrolytiques assurent aux œufs d'anoures la monospermie (Schmell et al 1983). Il semble que la mise en place de cette enveloppe imperméable aux spermatozoïdes soit commune à de nombreuses espèces d'animaux. Ainsi Vacquier (1973) a décrit des phénomènes semblables chez l'oursin Ginsburg (1961) chez les poissons.

3.2.2.5 Les gangues ovulaires



Figure 6: Représentation de la matrice extracellulaire des ovocytes d'Anoures (A) et d'Urodèles (B). J : jelly, GE : gangue externe, GM : gangue moyenne, GI : gangue interne, z.d. : zone dense, e.v. : enveloppe vitelline, e.p. : espace périplasmique. (D'après Salthe 1963)

3.2.2.5.1 Description des gangues

Nous avons vu précédemment que tous les ovocytes d'Amphibiens sont entourés par une matrice extracellulaire extrêmement abondante. Cette matrice est composée, en plus de la membrane vitelline, d'une série de gangues plus ou moins visqueuses qui sont déposées de manière concentrique lors du passage de l'ovocyte vitellin dans la *pars convoluta* de l'oviducte (Good & Daniel 1943 ; Shivers & James 1969 ; Jørgensen & Vijayakumar 1970 ; Barbieri & Budeger de Atenor 1973 ; Low *et al* 1976 ; Maack *et al* 1985) et dont la synthèse est étroitement contrôlée par les hormones œstrogènes (Thornton & Evenett 1969 ; Boisseau 1975 ; Jego 1976b ; Jego & Abalin 1978 ; Maack *et al* 1985). Nous distinguons la (les) gangue(s) interne(s), les gangues moyennes et les gangues externes synthétisées et déposées respectivement dans la partie antérieure, médiane et postérieure de la *pars convoluta* de l'oviducte. Il existe donc autant de régions oviducales que de gangues (Shivers & James 1969).

Bien que l'architecture globale des ovocytes soit équivalente chez tous les Amphibiens (Anoures, Urodèles et Apodes) il existe des différences fondamentales entre les ordres.

Les ovocytes d'Urodèles sont distingués en deux groupes suivant leur morphologie :

- Dans le premier groupe (Hynobidés, Ambystomatidés, Salamandridés) les cellules possèdent une chambre capsulaire interne, extrêmement résistante, qui permet une rétention de la gangue interne très fluide et très hydratée assurant la libre rotation de l'embryon (Salthe 1963), cette capsule est elle-même, recouverte par les gangues moyenne(s) et externes particulièrement abondantes.
- Le second groupe (Plethidontidés) est caractérisé par l'absence de chambre capsulaire mais possède une enveloppe vitelline très abondante, renfermant des granules de glycogène (Picheral 1977b) et des gangues externes très résistantes.

Chez les Anoures, l'organisation générale de la matrice est semblable mais l'absence de chambre capsulaire est générale hormis quelques rares exceptions (*Discoglossus*, *Pipa*, *Alyte*, *Leptodactyl*) où celle-ci subsiste tout en possédant une morphologie différente de celle des Urodèles. Salthe (1963) a montré qu'il est impossible de classer les espèces suivant la morphologie de leurs œufs tant le nombre et la complexité structurale des gangues sont grands d'une espèce à l'autre. De plus il observe qu'il n'existe pas de corrélation entre la morphologie de l'œuf et son site de développement, mais qu'il en existe une avec le lieu de ponte (terrestre ou aquatique). Il est toutefois reconnu que la présence d'une chambre capsulaire et la complexité dans l'organisation des gangues sont les caractères primitifs des espèces.

3.2.2.5.2 Composition des gangues

Les gangues sont donc présentes en nombre variable suivant les ordres et les espèces (Shivers & James 1969; Del Pino 1973; Barbieri & Budeger de Atenor 1973; Campanella 1975; McLaughlin & Humphries 1978; Yoshizaki 1985). Les études chimiques, histochimiques et immunologiques montrent qu'elles sont constituées de protéines et de sucres (Lee 1967; Freeman 1968; Shivers & James 1969; Steinke & Benson 1970; Katagiri 1973; Jego 1974 ; Yurewicz et al 1975 ; Jego 1976b), formant des glycoprotéines (GP) de poids moléculaire élevé (Nishihara et al 1983), spécifiques de chaque gangue et exhibant une grande variabilité de déterminants antigéniques (Shivers 1965 ; Shaver 1966 ; Katagiri 1967,1968 ; Yurewicz et al 1975; Jego 1976a; Yoshizaki 1985; Hedrick & Nishihara 1991). De nombreux travaux, notamment électrophorétiques, sur la localisation des GP ont été réalisés mettant en évidence que les gangues internes renferment généralement des GP à caractère acide tandis que les GP des gangues moyennes et externes sont généralement neutres (Freeman 1968; Steinke & Benson 1970; Boisseau et al 1974; Yurewicz et al 1975; Caroll et al 1991b). L'intégrité de toutes ces couches est assurée par de nombreux ponts disulfures interprotéiniques (Gussek & Hedrick 1971), mais chacune d'entre elles peut être séparée de manière manuelle, chimique ou physique (Freeman 1968 ; Jego 1976b ; Yurewicz et al 1975). Ces propriétés confèrent à ces GP une structure quaternaire, visible en microscopie électronique, organisée en réseau globulaire pour les plus petites et en réseau fibrillaire pour les plus grosses (Bonnel et al 1996) ce qui est comparable à la matrice extracellulaire des ovocytes d'oursin (Bonnel et al 1994). Des travaux d'hémagglutination sur la matrice extracellulaire d'ovocytes d'Urodèles montrent que certaines de ces GP sont de type lectine et qu'elles sont synthétisées, suivant les espèces, exclusivement soit par les segments antérieurs soit par les segments postérieurs de l'oviducte (Jego et al 1976a,b, 1983; Lerivray et al 1985; Chesnel et al 1985).

L'analyse chimique des GP totales indique que la partie peptidique est riche en résidus de sérine et thréonine (jusqu'à 55%), pauvre en acides aminés acides et une abondance variable d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe (Yurewicz *et al* 1975 ; Jego 1976b ; Shimo-

da et al 1994) suivant leur localisation au sein des gangues (Oliphant & Hedrick 1971; Lee 1967; Maack et al 1985). Les glycannes ont, jusqu'à présent, été peu étudiés. Néanmoins les travaux réalisés montrent qu'ils représentent jusqu'à 70% du poids sec des gangues, et qu'ils sont constitués d'hexoses (Galactose, Fucose) et d'hexosamines (N-acétyl-galactosamine et N-acétyl-glucosamine) mais également d'acide sialique (pour références antérieures à 1950 voir Folkes et al 1950 ; Bolognani et al 1966 ; Lee 1967 ; Freeman 1968 ; Shivers & James 1969; Steinke & Benson 1970). Seshadri et Reddy (1980) ont montré que seule la Nacetylgalactosamine est liée aux résidus de sérine et de thréonine, impliqués dans la séquence consensus de la O-Glycosylation (voir chapitre sur les mucines), qu'elle pouvait être substituée de différentes manières par les autres monosaccharides, mais que le fucose et l'acide sialique se trouvent toujours en position terminale non réductrice. Ces glycannes sont aisément libérés en milieu alcalin. Toutes ces caractéristiques physico-chimiques montrent qu'il existe des GP de type mucine (Folkes et al 1950; Shimoda et al 1994). Le caractère acide est, selon les auteurs, attribué à la présence des résidus d'acide sialique mais surtout à des groupements sulfates (Humphries 1970) uniquement localisés dans les gangues internes (Gerton 1986b) sous forme d'oligosaccharides sulfatés (Hedrick 1974). Ces nombreux groupements acides confèrent aux mucines leur haute capacité à fixer les cations (Shimoda et al 1994).

L'objet de nos travaux consistant en l'étude des glycannes contenus dans les gangues ovulaires de diverses espèces d'Amphibiens, nous développerons cette partie dans le chapitre « résultats ». Toutefois il nous semble nécessaire de décrire brièvement les travaux effectués quant à l'importance des gangues dans les mécanismes de fertilisation chez les Amphibiens.

3.2.2.5.3 Rôles des gangues dans la fertilisation

Les études sur la fertilisation sont la clé de la compréhension du développement des espèces animales, et la fertilisation des Amphibiens propose un modèle de choix pour cette étude. En effet l'extrême variabilité de leur mode de reproduction présente un large éventail de types de fertilisation rencontré aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés supérieurs. Ainsi les fécondations peuvent être monospermiques, ce qui signifie qu'un seul spermatozoide pénètre l'ovule, comme chez la plupart des Anoures ou, *a contrario*, présenter une polyspermie physiologique comme dans la majorité des espèces d'Urodèles. La polyspermie est caractérisée par l'entrée de plusieurs spermatozoides (8 à 10) dans l'ovule ; cependant un seul d'entre eux réalisera l'amphimixie (Picheral 1977a,b).

Pour qu'un spermatozoïde puisse féconder un ovule, quelle que soit l'espèce animale, il faut que ce dernier subisse quelques transformations physiologiques fondamentales, encore appelées événements primaires de la fertilisation, que nous allons résumer ci-dessous.

La capacitation

Le spermatozoïde doit tout d'abord subir la capacitation (Austin 1952), qui se traduit par une modification de la double couche lipidique de sa membrane acrosomienne. Cette étape permet de préparer le spermatozoïde à la réaction acrosomienne ; elle a été observée pour la première fois chez l'étoile de mer par Dan (1950) et plus amplement étudiée par la suite sur d'autres espèces animales (Dan 1952, 1954, 1956, Hoshi *et al* 1994).

La réaction acrosomienne

La réaction acrosomienne est induite par la reconnaissance des résidus de *N*-acétylglucosamine, exhibés à la surface des glycoprotéines de l'enveloppe vitelline, avec les lectines membranaires du spermatozoïde. Cette modification physiologique consiste au relargage du contenu de l'acrosome sur l'enveloppe vitelline. Ces enzymes, encore appelés protéinases acrosomales, ont été identifiés comme étant des protéases à activité de protéase à sérine ou de type chymotrypsique (Greenslade *et al* 1973 ; Raisman & Cabada 1977 ; Katagiri *et al* 1982) capables de perforer l'enveloppe vitelline (Iwao & Katagiri 1982) et donc permettre le passage à travers cette barrière physiologique

La fertilisation

Dans beaucoup d'espèces animales la reconnaissance des gamètes s'effectue par des interactions de type protéine-ligands (Macek & Shur 1988; Ruiz-Bravo et Lennarz 1989; Miller & Ax 1990). La protéine peut être soit une lectine comme chez l'oursin (Vacquier & Moy 1977; Barnum 1983), soit une glycosidase comme chez le spermatozoïde de l'ascidie (Hoshi *et al* 1983) ou encore une galactosyltransférase comme chez la souris (Lopez *et al* 1985). Ces interactions permettent une fixation des spermatozoïdes au niveau de l'enveloppe vitelline et un largage du contenu de l'acrosome. Il a été démontré que chez les oursins ce sont des glycoconjugués fortement acides contenant des esters sulfatés de type fucan (SeGall et Lennarz 1979,1981; Shimidzu *et al* 1990), qui sont reconnus par les lectines du spermatozoïde. Lindsay et Hedrick (1988) ont montré que chez *Xenopus laevis* (Anoure), les interac-

tions font intervenir des lectines et des glycoconjugués sulfatés, et que seule la partie glycannique des glycoprotéines induit la réaction acrosomienne. Ces interactions, qui requièrent des structures sulfatées, une concentration ionique adéquate et un pH optimum, sont spécifiques de l'espèce comme le montrent fort bien les travaux récents d'Alves (1997) sur l'oursin. La présence de nombreux oligosaccharides sulfatés dans les mucines des gangues ovulaires de certaines espèces d'Amphibiens (Maes *et al* 1997, Morelle & Strecker 1997) suggére le même type d'interactions chez ces animaux.

Rôles des gangues

De par leur morphologie et la facilité de leur obtention, les ovocytes d'amphibiens ont été utilisés très tôt comme modèles d'étude de la fertilisation (Newport 1854). Il est maintenant bien établi que, *in vivo*, les ovocytes "dégangués" ne peuvent être fécondés, ce qui montre l'importance des gangues (Bataillon 1919 ; Hykes 1927 ; Good & Daniel 1943 ; Kambara 1953 ; Mc Laughlin & Humphries 1978). Néanmoins certaines expériences montrent que, sous certaines conditions, les ovocytes cœlomiques et vitellins peuvent être fécondés avec une fréquence variable suivant les espèces, à condition que ceux-ci soient fertilisés par des spermatozoïdes préalablement incubés avec des extraits de gangues. (Kambara 1953 ; Katagiri 1965, 1966, 1967, 1974 ; Barbieri & Raisman 1969 ; Elinson 1971, 1973a,b ; Cabada *et al* 1978 ; Stewart-Savage & Grey 1984)

L'importance de chacune des gangues a pu être mis en évidence en utilisant des ovocytes possédant des degrés de maturation différents. Les travaux effectués par différentes équipes montrent que les ovocytes pourvus uniquement de leurs gangues internes sont potentiellement fertilisables et que des ovocytes ne possédant que les gangues externes le sont beaucoup moins (Kambara 1953 ; Katagiri 1965 ; Elinson 1971 ; Barbieri & Budeger de Atenor 1973 ; Ishihara *et al* 1984 ; Omata *et al* 1993).

Par ailleurs, certains auteurs ont décrit l'existence dans les gangues ovulaires de facteurs diffusibles et dialysables, capables, dans certaines conditions et avec un faible taux, d'activer artificiellement les spermatozoïdes (Elinson 1971 ; Barbieri & Del Pino 1975 ; Katagiri 1966a, 1973 ; Ishihara *et al* 1984). Ces facteurs sont stables lors de l'exposition à de très hautes températures, ce qui montre qu'ils sont d'origine inorganique. Il s'agit en fait d'ions divalents de type Ca²⁺, Mg²⁺. En parallèle, d'autres auteurs (Grigera & Cabada 1975) soulignent l'importance du taux d'hydratation des gangues et de la concentration ionique contenue dans celles-ci qui permettent de maintenir constante la force osmotique requise pour une bonne migration des gamètes.

Ces observations ont conduit à la mise au point d'une technique de fertilisation artificielle en utilisant une "egg-jelly water". Cette solution correspond à un milieu d'incubation mimant les conditions naturelles trouvées dans les gangues. Elle est composée d'extraits bruts de gangues et d'une concentration ionique identique à celle présente dans la matrice extracellulaire. Ce milieu d'incubation est utilisé couramment et permet d'activer artificiellement les gamètes mâles, qui sont alors capables de féconder des ovocytes vitellins (Shivers et James 1970 ; Cabada *et al* 1978 ; Katagiri 1982,1986,1987 ; Heasman *et al* 1991).

C'est ainsi que de nombreux travaux sur les fertilisations croisées ont été réalisés. Katagiri (1967) a montré que des ovocytes vitellins (*Hyla*) sont potentiellement fertilisables lorsque les gamètes mâles (*Hyla*) sont mis en contact avec des extraits de gangues d'une deuxième espèce (*Rana chemsinensis*) et les facteurs diffusibles d'une troisième (*Bufo japonicus*). D'autres auteurs (Katagiri 1973 ; Elinson 1971,1974,1975 ; Brun & Kobel 1977) ont réalisé avec succès sur certaines espèces de nombreuses fertilisations croisées, montrant de ce fait que les gangues ovulaires ne constituent pas une barrière aux spermatozoïdes et qu'elles ne suffisent pas à elles seules pour permettre une fertilisation réussie. Néanmoins Shivers et James (1971) ont montré que ces mêmes gangues sont responsables de la capacitation des spermatozoïdes.

Les travaux en microscopie électronique et en contraste de phase ont permis de suivre la progression rectiligne des spermatozoïdes dans la matrice extracellulaire et montrent que ces derniers mettent de 3 à 8 minutes, suivant les espèces, à traverser les différentes gangues (Stewart-Savage & Grey 1984) sans subir de modification importante. Les spermatozoïdes sont capacités au niveau des gangues moyennes et la réaction acrosomienne n'a lieu qu'à l'interface de l'enveloppe vitelline et la gangue interne (Elinson 1971 ; Katagiri 1973 ; Raisman & Cabada 1977 ; Yoshizaki & Katagiri 1982).

Cependant Grey *et al* (1977) ont décrit que la reconnaissance n'est possible qu'après l'altération de cette enveloppe par les sécrétions des cellules de la *pars recta* de l'oviducte. D'autres travaux ont confirmé l'importance de ces sécrétions, émises sous forme de granules, dans les mécanismes de fertilisation (Miceli *et al* 1978a,b; Yoshizaki & Katagiri 1981,1984; Katagiri *et al* 1982; Katagiri 1986,87; Mariano *et al* 1984; Takamune *et al*
1986). Le contenu de ces granules a été identifié comme étant des enzymes de type trypsique (Katagiri *et al* 1982 ; Miceli & Fernandez 1982 ; Takamune *et al* 1987 ; Hardy et Hedrick 1992) qui dégradent l'enveloppe vitelline de façon ménagé permettant de convertir l'enveloppe cœlomique en enveloppe vitelline, cette dernière devenant alors sensible aux enzymes acrosomiennes (Miceli *et al* 1987 ; Yamashi *et al* 1988). De plus d'autres travaux montrent que ces extraits sont capables d'induire, *in vitro*, la réaction acrosomienne (Miceli *et al* 1978a,b ; Miceli et Fernadez 1982 ; Yoshizaki & Katagiri 1982, Katagiri *et al* 1982). Au vu de toutes ces expériences de fertilisations combinatoires, les auteurs montrent que quelles que soient les espèces utilisées, la reconnaissance des gamètes se fait au niveau de l'enveloppe vitelline (Elinson 1973a,b ; Katagiri 1974,1987 ; Stewart-Savage 1984).

La fécondation

Les spermatozoïdes ayant perdu leur coiffe acrosomienne vont, chez les Anoures, pouvoir féconder l'ovule au niveau du pôle animal provoquant ainsi une dépolarisation de la membrane (Grey et al 1982, Charbonneau et al 1983) qui induit chez les monospermiques une fusion instantanée des granules corticaux avec la membrane de l'ovocyte. Cette fusion provoque le relarguage du cocktail protéique constitué de glycosidases, et notamment une N-acétylglucosaminidase, et de lectine à galactose ; cette étape est encore appelée réaction corticale. Les glycosidases vont hydrolyser les sites de fixation des lectines membranaires des spermatozoïdes. De plus les lectines relarguées interagissent avec les GP de l'enveloppe vitelline (Yoshizaki 1986) et avec des composants de la gangue interne (Schmell et al 1983). Cette réaction n'est, semble t-il, pas spécifique de l'espèce puisque Hedrick et Katagiri (1988) ont pu décrire des structures communes à deux espèces d'Amphibiens (Bufo japonicus japonicus et Xenopus laevis laevis), reconnues par les lectines des granules corticaux d'une seule espèce (Xenopus laevis). Ce relargage s'effectue dans l'espace périvitellin et participe activement aux blocages de la polyspermie chez les Anoures, formant ainsi une barrière impénétrable aux spermatozoïdes, encore appelée enveloppe de fertilisation (Kemp & Istock 1967; Grey et al 1974 ; Wolf 1974 ; Schmell et al 1983 ; Yoshizaki & Katagiri 1984). Roberson et Barondes (1982) ont suggèré que ces lectines auraient, en plus, un rôle dans le développement de l'embryon en agissant comme un messager extracellulaire de la croissance embryonnaire.

Les événements décrits précédemment peuvent être extrapôlés aux Urodèles. Ces espèces ayant toutefois une fertilisation à polyspermie physiologique, il existe certaines différences notables. Comme les ovocytes matures d'Anoures, les ovocytes des Urodèles possèdent également une série de gangues plus ou moins visqueuses et résistantes composées de mucines. Néanmoins les femelles Urodèles pondent moins d'œufs que les Anoures mais ceux-ci sont plus riches en vitellus. La progression des spermatozoïdes au travers des gangues est rapide, et la réaction acrosomienne a lieu au niveau des gangues moyennes (Picheral 1977a,b). L'existence d'une chambre capsulaire, comparable à l'espace périvitellin des Anoures, permet la formation d'une barrière osmotique et la libre rotation de l'œuf. Plusieurs spermatozoïdes (de 3 à 8 suivant les espèces, Picheral 1977b ; MacLaughlin & Humphries 1978 ; Charbonneau *et al* 1983) pénètrent l'ovule de manière aléatoire. Les travaux sur des espèces aussi variées comme *Triturus alpestris* ou *Pleurodèles waltl* n'ont pas mis en évidence la présence d'exocytose de granules corticaux (Hope *et al* 1963 ; Picheral 1977). L'entrée surnuméraire de spermatozoïdes est attribuée à la réponse tardive de l'œuf dans la repolarisation de sa membrane, ce qui a été remarquablement démontré chez les Anoures par Gomez & Cabada (1994).

Conclusion

L'importance des gangues dans le succès d'une fertilisation chez les Amphibiens n'est plus à démontrer. La présence de nombreux groupements acides et notamment d'esters sulfatés permet de constituer un réservoir d'ions divalents (Ca^{2+}/Mg^{2+}) nécessaires et indispensables à la réaction acrosomienne et aux événements secondaires de la fertilisation (dépolarisation et repolarisation de la membrane plasmique de l'ovocyte). De plus la présence d'ions est incontournable dans le maintien d'une force osmotique constante et indispensable à la progression des spermatozoïdes au travers des gangues. La nature même des mucines permet aux gangues de maintenir une hydratation stable et indispensable de la ponte au développement de l'embryon. En plus de ces rôles fondamentaux, il semblerait qu'elles assurent, *via* les lectines qu'elles contiennent, une protection, notamment bactériologique, de l'embryon durant son développement (Chesnel *et al* 1986) plus un effet thermique et serviraient de réserve énergétique à l'embryon (Guyétant 1975, Nace & Lavin 1963) ; ces derniers rôles restent cependant très controversés.

D'un point de vue téléologique, la présence et le nombre variable des gangues n'ont jamais été élucidés. Cependant certains auteurs n'hésitent pas à comparer la zona pellucida des ovocytes de mammifères à l'enveloppe vitelline des Batraciens et les fluides génitaux aux gangues ovulaires.

4. CONCLUSION GENERALE

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à la taxinomie et aux phénomènes de fertilisation des Amphibiens, par la description des éléments qui y interviennent. Les travaux rapportés ont été effectués sur différentes espèces, et bien que certaines différences existent entre elles, un modèle général est parfaitement adaptable à tous les exemples. C'est pourquoi nous avons évité de citer le modèle de travail des auteurs. Toutefois l'espèce la plus étudiée reste *Xenopus laevis*.

Les modes de fertilisation des Amphibiens sont extrêmement variés et reposent sur le particularisme de leurs gamètes. Les ovocytes de tous les Batraciens sont entourés d'une matrice extracellulaire abondante qui a la particularité d'être composée essentiellement de mucines ; ces dernières sont sécrétées par certaines cellules du tractus oviducal et leur synthèse est hormono-dépendante et facilement contrôlable. Celles-ci sont connues pour être riches en glycannes. Ces oligosaccharides sont neutres ou acides suivant leur localisation au sein des différentes gangues qui constituent l'enveloppe externe des ovocytes. Peu d'études exhaustives ont été réalisées sur leur composition bien que les nombreux travaux effectués mettent en évidence leur importance ; en effet les mécanismes de fertilisation de beaucoup d'animaux reposent essentiellement sur des intéractions de types lectine-sucre mais encore de glycosidase et glycosyltransférase avec leur substrats glycanniques. D'autre part il a été décrit que ce sont les sucres qui sont responsables de la reconnaissance, au niveau de l'enveloppe vitelline, et de l'activation des gamètes (capacitation et réaction acrosomienne). Bien qu'en apparence les gangues n'interviennent pas dans cette reconnaissance, la quantité et l'origine des mucines qu'elles renferment nous a amenés à travailler sur leur composition. Dans une deuxième partie nous nous intéresserons à l'organisation générale des mucines, de leur composition à leur origine.



LES MUCINES

TABLE DES MATIERES

1. DEFINITION	
1.1 Les mucines secretees	
1.2 LES MUCINES MEMBRANAIRES.	
1.3 LES MUCINES SOLUBLES	
2. ORGANISATION GENERALE DES MUCINES	
2.1 PURIFICATION	
2.1.1 Purification non dénaturante	
2.1.2 Purification dénaturante	
2.2 COMPOSITION DES MUCINES	
2.2.1 L'apomucine	
2.2.1.1 Les mucines sécrétées :	
2.2.1.2 Les mucines membranaires :	
2.2.2 Les chaînes glycanniques	
2.3 ULTRASTRUCTURE ET BIOSYNTHESE DES MUCINES	
2.3.1 Structure tertiaire	
2.3.1.1 Mucines membranaires	40
2.3.1.2 Mucines sécrétées et solubles	41
2.3.2 Structure quaternaire	
2.3.3 Biosynthèse et polymérisation	
3. ROLES ET FONCTIONS DES MUCINES	
3.1 LES MUCINES SECRETEES	
3.1.1 Protection mécanique	
3.1.2 Protection chimique et bactériologique	
3.1.3 Protection bactérienne	
3.1.4 Autres rôles des mucines	
3.2 LES MUCINES MEMBRANAIRES	
4. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES MUCINES	50
5. CONCLUSION	50

1. DEFINITION

Les mucines sont des glycoprotéines particulières qui forment à elles seules une sous classe de glycoprotéines, comme le sont par exemple les protéoglycannes. Leurs principales caractéristiques sont les suivantes :

- Les sucres peuvent représenter jusqu'à 80% de leur masse et sont organisés en glycannes O-liés, via une N-acétyl-galactosamine, à un résidu de sérine ou de thréonine de la chaîne peptidique. Ces glycannes ont une taille allant de 1 à 20 résidus monosaccharidiques.
- La chaîne peptidique, encore appelée apomucine lorsqu'elle n'est pas glycosylée, contient dans sa partie centrale un nombre variable de séquences répétées d'acides aminés, encore appelées « tandem repeat ».
- Les mucines peuvent être classées en deux groupes, suivant qu'elles sont sécrétées ou membranaires.

1.1 LES MUCINES SECRETEES

Elles sont retrouvées au niveau des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et génitales de tous les mammifères mais également sur la peau de nombreux invertébrés et vertébrés inférieurs (Insectes, Amphibiens, Poissons) ou encore entourant abondamment l'ovocyte des Batraciens, ce dernier point faisant l'objet de notre travail.

Ces sécrétions sont encore appelées mucus lorsque les mucines sont associées avec divers éléments comme certains électrolytes (ions calcium notamment), des lipides ou encore des acides nucléiques. Ce mucus est extrêmement hydrophile puisque l'eau représente jusqu'à 95% de son poids. Les propriétés viscoélastiques et lubrifiantes de ce mucus sont essentiellement dues aux caractéristiques intrinsèques de la mucine dont nous verrons l'originalité dans les paragraphes suivants. Nous pouvons noter toutefois que ces mucines sont formées de monomères qui ont la capacité de se polymériser formant ainsi un oligomère de taille très importante.

1.2 LES MUCINES MEMBRANAIRES

Ces mucines ont une organisation semblable aux mucines sécrétées, mais ont la particularité de posséder une séquence en acides aminés hydrophobes leur permettant un

ancrage dans la membrane plasmique des cellules. D'autre part l'apomucine est pauvre en résidus de cystéine qui exclue la possibilité d'une oligomérisation par formation de ponts disulfures. Le rôle de ces mucines est encore assez mal connu, mais il est clair qu'elles sont sur-exprimées dans des lignées cellulaires cancéreuses par rapport aux lignées cellulaires saines (Hilkens *et al* 1995). Enfin ces mucines sont ubiquitairement synthétisées par des cellules non spécialisées.

1.3 LES MUCINES SOLUBLES

Elles possèdent les mêmes caractéristiques que les mucines sécrétées mais elles sont de plus petite taille et se retrouvent dans certains fluides biologiques comme dans la salive ou dans la bile.

2. Organisation générale des mucines

2.1 PURIFICATION

Les mucines sont des macromolécules de très grosse taille et de densité importante (jusqu'à 1.48 g/mL, dans la vésicule biliaire) (Klomp *et al* 1994). Les stratégies de purifications sont de plusieurs ordres suivant l'état de pureté souhaité.

2.1.1 PURIFICATION NON DENATURANTE

Les mucines peuvent être, d'une part, isolées par tamisage moléculaire sur résine à large potentiel d'exclusion telle que la Sepharose[®] CL-2B ou d'autre part par ultracentrifugation isopycnique en gradient de chlorure de césium (CsCl), un protocole qui a été introduit pour la première fois par Creeth et Denborough (1970). Cette méthode a été utilisée par de nombreux auteurs pour isoler les mucines de différents mucus d'origine tissulaire différente comme celles du colon (Marschall & Allen 1978), de l'intestin (Mantle & Allen 1981), de l'estomac (Starkey *et al* 1974, Spee-Brand 1980), du tractus trachéobronchique (Ringler *et al* 1987, Thornton *et al* 1990) ou encore des glandes salivaires humaines (Nieuw Amerongen *et al* 1987). Cette technique a également permis de purifier certaines mucines membranaires de cellules cancéreuses (Lan *et al* 1987, North *et al* 1988). Ces méthodes non dénaturantes permettent de conserver toutes les liaisons covalentes entre les différents monomères des mucines oligomériques. Enfin les auteurs recommandent la technique de centrifugation en gradient de CsCl/Chlorure de guanidine en présence

d'iodoacétamide. Cette technique (semi-dénaturante) permet d'obtenir des oligomères purs en conservant l'intégrité des ponts disulfures. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases à large spectre d'action est dans de nombreux cas souhaitable. (Dekker *et al* 1989a, b, 1991).

2.1.2 PURIFICATION DENATURANTE

Les mucines peuvent être solubilisées sous l'action d'agents réducteurs de ponts disulfure (Sheffner 1963) ou par l'utilisation d'enzymes protéolytiques qui permettent d'hydrolyser les parties non glycosylées très sensibles de la glycoprotéine. Toutefois ce dernier traitement altère de manière irréversible l'intégrité des monomères (Pearson *et al* 1980, Carlstedt *et al* 1985, Dekker *et al* 1989b).

Strous et Dekker (1992) reportent que la meilleure technique de purification des mucines reste la centrifugation isopycnique en gradient de densité de CsCl et de chlorure de guanidine, qui permet d'obtenir des mucines avec un haut degré de pureté. Cependant cette méthode dénature irréversiblement la structure quaternaire de la molécule (Snary *et al* 1974). Enfin l'electrophorèse en SDS-PAGE¹ avec un faible taux de réticulation du gel de polyacrylamide peut être utilisée pour séparer les monomères préalablement isolés. Cette technique a été utilisée pour isoler les mucines gastriques de divers animaux (Mantle *et al* 1981, Pearson *et al* 1981).

2.2 COMPOSITION DES MUCINES

Comme nous en avons eu l'occasion de le signaler, les mucines sont composées d'un squelette polypeptidique et de nombreuses chaînes glycanniques. Dans ce paragraphe nous aborderons succinctement la composition de la chaîne peptidique en insistant sur l'importance de la biologie moléculaire qui a permis d'élucider bon nombre de séquences en acides aminés. Nous discuterons ensuite brièvement de la composition en sucres. Cette partie sera développée dans le chapitre III consacré à la structure des O-glycannes.

2.2.1 L'APOMUCINE

L'apomucine constitue le squelette peptidique de toutes les mucines. Degand et collaborateurs (1973) ont été les premiers à mettre en évidence, sur les mucines des kystes bronchogéniques, l'hétérogénéité des peptides constituant les mucines alors que Gold *et al* (1981) et plus tard Wesley *et al* (1985), sur les mucines intestinales, ont permis de montrer qu'il en existe une au niveau des chaînes glycanniques.

¹ S.D.S P.A.G.E. : Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

Les propriétés intrinsèques des mucines et, en particulier, leur glycosylation importante rendent difficile l'étude de la structure primaire des apomucines par les méthodes classiques de séquençage des protéines. Les techniques de biologie moléculaire et en particulier celle du clonage des gènes ont permis aux différents auteurs d'identifier, à partir de tissus et d'animaux différents, un certain nombre de gènes codant pour des apomucines de mucines sécrétées et membranaire (Tableau 1). Ces résultats ont permis d'appréhender la composition en acides aminés d'une manière beaucoup plus aisée. Pour ce faire, les auteurs ont fabriqué des anticorps contre des mucines déglycosylées et réalisé des sondes nucléotidiques de synthèse permettant la réalisation d'une banque d'ADN complémentaires de gènes d'apomucines.

Tableau 1: Récapitulatif des gènes décrits et de leur produit

Nom du gene (Nomenclature)	ORIGINE ET TISSUS	CARACTERISTIQUE DE LA PROTEINE CORRESPONDANTE	Sequence nucleotidique connue	References	Sequences repetees d'acides amines (pb/aa)*	COMMENTAIRES
MUC1	Glande mammaire humaine Cellules tumorale pancréatique,ubiquitaire des cellules epitheliales	apomucine membranaire episialine	Totale	Siddiqui et al 1988, Tondini et al 1988, Gendler et al 1990, Lan et al 1990, Wreschner et al 1990, Ligtenberg et al 1990	60/20	Synthèse non tissus spécifique. Surexpression par les cellules tumorisantes. Encore appelée PEM (Polymorphic epithelial mucin), polyanionique.
M-MUC1	Glande mammaire murine	episialine, soluble	Totale	Vos et al 1991	***************************************	
MUC2	Muqueuse intestinale humaine	apomucine sécrétée (HSIM = Human Small Intestin Mucin)	Totale	Gum et al 1989, Toubara et al 1991, Gum et al 1991, Xu et al 1992b, Gum et al, 1994 Gum et al 1997	69/23	Synthétisée par les «Globlet-cells» pHi basique, similarité de structure avec le facteur pvWF
MUC3	id	apomucine sécrétée	Partielle	Gum <i>et al</i> 1990, van Klieken <i>et al</i> 1995	51/17	Synthétisée par les entérocytes, pHi neutre
MUC4	Muqueuse tracheo- bronchique humaine	apomucine sécrétée	Partielle	Porchet et al 1991	48/16	
MUC5AC	Muqueuse bronchique et stomacale	id	id	Aubert et al 1991, Meczaman et al 1994, Guyonnet-Duperat et al 1995, Lesuffleur et al 1995, Ho et al 1995	24/8	
MUC5B	Glande sous-maxillaire et tractus respiratoire	id	id	Dufossé et al 1993, Keates et al 1997	24/8	
MUC6	Muqueuse stomacale humaine	apomucine sécrétée	Partielle	Toribara et al 1993	507/169	
MGI	Glandes salivaires humaine	mucine soluble, oligomérique	Totale	Loomis et al 1987, New Amerongen <i>et al</i> 1995		Haute masse moléculaire, > 1000kDa

MG2 (=M	UC7)	Glandes salivaires humaine	mucine soluble, monomérique	Totale	Loomis et al 1987, Ramasubbu et al 1991,New Amerongen et al 1995	69/23	Petite masse moléculaire. Deux isoformes MG2a, MG2b distinguées sur la base de leur hétérogénéité glycannique)
MUC	,	Glande sous- maxillaire Humaine	Soluble, monomérique	Totale	Bobeck et al 1993, Niew Amerongen et al 1995 Biesbrock et al 1997	69/23	La plus petite des mucines (365aa)
MUC8	?	Muqueuse tracheo- bronchique humaine	soluble	très partielle	Shankar et al 1994		
RIM [*]	nu - 21	Muqueuse intestinale du rat	Mucine sécrétée				
CTM	3	Muqueuse tracheo- bronchique canine	id	Totale	Verma et Davidson 1993	Absence de tandem repeat	
BSM°		Glande sous-maxillaire bovine	mucine soluble		Barghava et al 1990	Absence de tandem repeat	
PSM ^d		Glande sous-maxillaire porcine	id		Timpte et al 1988, Eckardt et al 1991, Perez-Vilar et al 1996	243/81	
	A1		apomucine majeure, monomérique	Totale	Hoffmann 1988, Probst et al 1992, Hauser et al 1990	nombre de tandem repeat variable suivant les espèces	Domaines riches en cysteines, 10 N- glycosylation
FIM	B1	Peau d'Amphibien	sécrétée, polymérique	Partielle	Probst <i>et al</i> 1990, 1992, Joba et al 1997	id.	Similarité avec MUC2 et le facteur prepro-von Willebrand
	CI		monomérique		Hauser et Hauffmann 1992	iđ.	

* : pb/aa = paires de bases/acides aminés

a : Rat Intestinal Mucin, b : Canine Tracheo-bronchial Mucin, c : Bovine Submaxillary Mucin, d : Porcine Submaxillary Mucin. PvWF : Prepro von Willebrand Factor, e : Frog Integumentary Mucin

Note : Glycoprotéine polymérique sérique, le facteur vonWillebrand est impliqué dans les mécanismes d'agglutination des plaquettes. (Sadler J. E. 1989)

Gènes des mucines	Nombre d'acides aminés	Séquences répétées en acides aminés	nombre de résidus d'intérêt dans la séquence répétée (Ser/Pro/Ala/Gly/Thr)
MUC1	20	PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA	2/6/4/2/3
MUC2	23	P TTT P ITTTTTVT PTP T P TGTQT	0/5/0/1/14
MUC3	17	HSTPSFTSSITTTETTS	5/1/0/0/7
MUC4	16	TSSVSTGHATSLPVTP	4/2/1/1/4
MUC5	8	TTSTTSAP	2/1/1/0/4
MUC6	169	SPFSSTGPMTATSFQTTTTYPTPSHPQTT LLPTHVPPFSTLVTPSTGTVIPTHAOMA TSASIHSTPTGTIPPPTTLKATGSTHTAPP MTPTTSGTSQAHSSFSTAKTSTSLHSHTS STHHPEVTPTSTTTITPNPTSTGTSTPVA HTTSATSSELPTPFTHHSPPTGS	29 / 26 / 10 / 7 / 50
MUC7	23	CRPKLPPSPNKPPKFPNPHQPPK	1/10/0/0/0
MUC8	-	non déterminée	
BSM	-	aucune	
СТМ	-	aucune	
FIM A-1	9	VPTTPETTT	0/2/0/0/5
FIM B-1	11	GESTPAPSETT	2/2/1/1/3
FIM C-1	10	KATTTTPTTT	0/1/1/0/7
PSM	81	GAGPGTTASSVGVTETARPSSVAGSGTT GTVSGASGSTGSSSGSPGATGASIGQPET SRISVAGSSGAPAVSSGASQAAGTS	21 / 5 / 13 / 18 / 11
RIM	6	TTTPDV	0/1/0/0/3

 Tableau 2 : Récapitulatif des séquences répétées d'acides aminés rencontrées dans les mucines connues. Les apomucines sont codées par les gènes MUC. Les résidus de prolines sont indiqués en caractères gras.

Les résultats de ces études montrent ou confirment un pourcentage élevé de 5 acides aminés particuliers (sérine, thréonine, glycine, alanine et proline) localisés essentiellement dans la partie centrale de l'apomucine (Tableau 2). Ces 5 acides aminés représentent 50% des acides aminés totaux et la sérine et la thréonine représentent à elles seules 25 à 40% des acides aminés totaux (Killeen *et al* 1987, Neutra et Forstner 1987, Sorimachi *et al* 1988, Gum *et al* 1989). Il est à noter que ces deux acides aminés sont impliqués directement dans la liaison O-glycosidique et qu'ils sont souvent adjacents, alors que les résidus de proline, d'alanine et de glycine sont très fréquemment retrouvés entre deux sites de glycosylation. La présence d'un résidu de proline procure un motif « β -turn » à la structure secondaire de la protéine. Gum (1995) a d'ailleurs rapporté qu'il existe toujours, quelle que soit la mucine, au moins un résidu de proline par séquence répétée d'acides aminés (Tableau 2). Celui ci confère à la protéine une conformation nécessaire et indispensable à la reconnaissance par des enzymes de glycosylation (Hanover *et al* 1980, Briand *et al* 1981).

Ces cinq acides aminés sont organisés en séquences, ou « tandem repeat » (Tableau 2), qui sont répétées un certain nombre de fois suivant le type de mucine confirmant l'hypothèse de Pigman et collaborateurs (1973) qui ont été les premiers à décrire cette caractéristique particulière aux mucines. Ces séquences répétées d'acides aminés existent dans toutes les apomucines sauf dans la BSM et la CTM (Tableau 1 et 2) (pour revue Verma et Davidson 1994). Ces séquences sont en nombre variables suivant les tissus et les espèces définissant ainsi le polymorphisme génétique des mucines (Swallow *et al* 1987, Griffiths *et al* 1990). La plus longue séquence de répétition, 169 acides aminés, a été décrite pour la mucine codée par le gène *MUC6* (Toribara *et al* 1993).

En plus de ces séquences localisées dans la partie centrale de la molécule, il existe une région N-terminale et une dite C-terminale. Celles ci ont la particularité de contenir de nombreux résidus de cystéine et des sites potentiels de N-glycosylation, définis par la séquence consensus suivante Asn-X-Ser/Thr (Fig. 1), où X est un acide aminé différent de la proline. A titre d'exemple, il existe 2 sites potentiels de N-glycosylation sur MUC2 (Gum *et al* 1989), 1 sur MUC1 (Gendler *et al* 1988) et jusqu'à 13 sur la mucine intestinale du rat (RIM) (Gum *et al* 1991). Ces régions sont typiquement différentes si les apomucines sont sécrétées ou membranaires.

2.2.1.1 Les mucines sécrétées :

Les études sur la structure primaire complète sont encore restreintes à quelques apomucines humaines (MUC2, MG1, MG2 et MUC7) et animales (CTM, FIM) les autres apomucines ne sont encore que partiellement déterminées (Tableau 1 et 2). Les différents auteurs ont pu ainsi décrire les caractéristiques de l'organisation structurale inhérentes aux apomucines sécrétées.

Dans certaines apomucines (trachéo-bronchique ou intestinale) les régions centrales formées de « tandem repeat » qui sont hautement O-glycosylées, peuvent être entrecoupées de régions dites « nues » parce que non glycosylées (Thornthon *et al* 1990, Carlstedt *et al* 1985). Celles ci sont alors sensibles aux enzymes protéolytiques et peuvent renfermer quelques résidus de cystéine (Hoffmann et Hauser 1993). Certains auteurs ont décrit que ces régions nues ont un caractère plutôt hydrophobe en mettant en évidence une association de ces mucines sécrétées ou solubles avec certains lipides de type cholestérol (Woodward *et al* 1982, Witas *et al* 1983, Slomiany *et al* 1983, Roussel *et al* 1984, Slayter *et al* 1984). De plus Smith et LaMont (1983, 1984) ont démonté que les mucines sécrétées par les cellules de la vésicule biliaire perdent leur hydrophobicité lorsqu'elles sont exposées à une protéolyse ménagée.

Contrairement aux apomucines d'origine membranaire, il est clairement établi que les régions N- et C-terminales de ces apomucines sécrétées sont riches en résidus de cystéine qui permettent leur oligomérisation (Dekker et Strous 1990). D'autre part ces régions qui peuvent posséder certains sites de N-glycosylation, sont peu O-glycosylées. Ceci les rend alors plus sensibles aux protéases.

2.2.1.2 Les mucines membranaires :

La plus connue et la mieux décrite est l'apomucine issue du gène MUC1. Cette mucine encore appelée épisialine (Ligtenberg *et al* 1990), antigène DF-3 ou encore PEM (Polymorphic epithelial mucin, Lessufleur *et al* 1994) se trouve au niveau des membranes apicales des cellules qui la synthétisent. Il semble que cette mucine membranaire soit synthétisée par des cellules non spécifiques et dans une grande majorité de tissus. Outre la structure générale qui est similaire aux mucines sécrétées, à savoir des séquences répétées d'acides aminés ou encore la présence de O-glycannes en grand nombre, les mucines membranaires possèdent leurs spécificités structurales. En effet, la O-glycosylation est moins abondante et l'organisation des régions N- et C-terminales sont fondamentalement différentes.

Le séquençage de l'apomucine MUC1 montre qu'il existe très peu de résidus cystéines interdisant toute polymérisation covalente des monomères. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence une zone de la région C-terminale riche en acides aminés à caractère hydrophobe qui permet un ancrage dans la membrane plasmique. Enfin ces mucines appartiennent aux glycoprotéines membranaires caractérisées par une queue cytoplasmique relativement petite, côté C-terminal et un domaine N-terminal extracellulaire important dépassant du glycocalyx.

2.2.2 LES CHAINES GLYCANNIQUES

Les glycannes peuvent représenter jusqu'à 80% du poids sec des mucines (Scharfman et al 1995). Ils sont majoritairement O-liés par leur résidus de N-acétyl-galactosamine à un résidu de serine ou de thréonine. Néanmoins il existe quelques rares N-glycannes liés sur un résidu d'asparagine engagé dans la séquence consensus précédemment décrite.

Les O-glycannes peuvent être aisément libérés par un traitement alcalin en milieu réducteur. Cette méthode permet d'obtenir les chaînes glycanniques réduites (Carlson *et al* 1968). Ces glycannes peuvent posséder de 1, comme dans la mucine sous-maxillaire d'ovins (Graham et Gottchalk 1960) à 20 résidus monosaccharidiques, comme dans la mucine salivaire MG1 (Levine *et al* 1987). Les monosaccharides des chaînes glycanniques sont essentiellement représentés par la *N*-acétyl-galactosamine², le galactose, le fucose, la *N*-acétyl-glucosamine et enfin par de l'acide sialique. De plus dans certaines mucines isolées de vertébrés inférieurs, les auteurs ont décrit la présence de Kdn et d'acide glucuronique (Iwazaki *et al* 1987, Maes *et al* 1997). Ces derniers monosaccharides n'ont pas encore été décrit dans les mucines de mammifères.

Les mucines peuvent être, sur la base de leurs chaînes glycanniques, séparées en deux groupes :

Les mucines acides (ou polyanioniques) possèdent des monosaccharides acides comme l'acide sialique, le Kdn ou l'acide glucuronique (Iwasaki *et al* 1987, Maes *et al* 1997), ce caractère acide peut encore être renforcé par la présence de monosaccharides sulfatés, fréquemment trouvés dans les mucines bronchiques pathologiques humaines (Lo-Guidice *et al* 1994, 1997) ou dans certaines mucines d'Amphibiens (Maes *et al* 1997, Florea *et al* 1997).

Les mucines neutres où les chaînes glycanniques ne sont constituées que de monosaccharides neutres.

² La structure des monosaccharides est donnée dans le chapitre III relatif à la structure des O-glycannes.

L'apomucine peut être substituée par plusieurs centaines de chaînes O-glycaniques qui se trouvent principalement au niveau des séquences répétées d'acides aminés extrêmement riches en sites de O-glycosylation. Les très nombreuses études structurales des chaînes glycanniques de mucines de diverses origines ont permis de déceler une très grande hétérogénéité des structures primaires des glycannes montrant ainsi l'existence d'autant d'épitopes antigéniques et en particulier ceux des groupes sanguins de types A, B, H, Lewis (Tableau 3) (Feizi et Childs 1987, Lloyd 1987). De plus Podolsky et al (1986) ont décrit que chaque mucine possède un nombre limité d'épitopes potentiellement reconnaissables par un grand nombre de micro-organismes et/ou par certaines cellules de l'organisme (Devaraj et al 1994, et pour références et revues antérieures à 1988 Roussel 1988, Klein 1988). Feizi (1985) reporte dans une excellente revue générale que les structures primaires des chaînes ont un certain intérêt dans l'étude du développement cellulaire puisqu'ils sont décrits comme marqueurs de la différentiation cellulaire, de l'embryogenèse à l'oncogenèse (Feizi 1985, Hakomori 1989). Enfin, Jany et al (1991a,b) et parallèlement Bhavanandan (1991) montrent que certaines maladies de type fibrose, bronchite chronique, cancers ou autres pathologies impliquent des mucines porteuses d'une glycosylation aberrante.

 Tableau 3 : Représentation de certains antigènes fréquemment associés aux glycannes de types mucines (selon Feizi)

STRUCTURES	DETERMINANTS ANTIGENIQUES
Gal(β 1-4)GicNAc(β 1-3) (Gal(β 1-4) GicNAc(β 1-3))n	i
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) Gal(β 1-4)GlcNAc β 1- Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)	I
$Gal(\beta 1-4)GlcNAc$ Fuc(\alpha 1-3)	SSEA-1, Le ^x
$Gal(\beta 1-4)GlcNAc$ Fuc(\alpha 1-2)	Antigène H, groupe sanguin O
$Gal(\beta 1-4)GlcNAc$ $ $ Fuc(\alpha 1-2) Fuc(\alpha 1-3)	Le ^Y

Gal(β 1-3)GlcNAc Fuc(α 1-2)	Groupe sanguin H
GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-3/4)GlcNAc Fuc(α 1-2)	Groupe sanguin A
$Gal(\alpha 1-3) Gal(\beta 1-3/4) GlcNAc$ Fuc(\alpha 1-2)	Groupe sanguin B
Gal(β1-3)GlcNAc Fuc(α1-4)	Groupe sanguin Le ^a
$Gal(\beta 1-3)GlcNAc$ $\begin{vmatrix} & \\ & \\ \\ & \\ \\ Fuc(\alpha 1-2) & Fuc(\alpha 1-4) \end{vmatrix}$	Groupe sanguin Le ^b
GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-3/4)GlcNAc Fuc(α 1-2) Fuc(α 1-3/4)	Groupe sanguin Ale ^b /Le ^y
$Gal(\beta 1-3)GlcNAc \\NeuAc(\alpha 2-3) Fuc(\alpha 1-4)$	Sialyl Le ^a

2.3 ULTRASTRUCTURE ET BIOSYNTHESE DES MUCINES

Les données de la génétique sur la structure primaire des mucines et les nombreux travaux de biochimie ont permis aux auteurs de démontrer l'existence de trois types de monomères à la structure tertiaire différente.

2.3.1 STRUCTURE TERTIAIRE

2.3.1.1 Mucines membranaires



Figure 2 : Représentation schématique d'une mucine membranaire de type MUC1.

Ce premier type de structure (Figure 2) est typique des mucines membranaires. Elles sont caractérisées par un plus faible taux de O-glycosylation et une pauvreté en résidus de cystéine qui lui interdit toute polymérisation. De plus elles possèdent une séquence signal riche en acides aminés hydrophobes, du coté C-terminal, qui leur permet un ancrage dans la membrane plasmique des cellules où elles sont synthétisées. Ces glycoprotéines membranaires sont rigides et peuvent avoir une longueur totale de plusieurs centaines de nanomètres (Hilkens *et al* 1992) qui leur permet d'émerger du glycocalyx. Par exemple, la mucine MUC1, bien étudiée par Ligtenberg *et al* (1990) et d'autres (pour références se reporter au Tableau 1), possède cette structure. Elle possède :

- une queue cytoplasmique de 69 acides aminés,
- une région transmembranaire de 24 résidus d'acides aminés,

ø et un domaine extracellulaire contenant un nombre variable (de 30 à 90) suivant les individus, de séquences répétées, hautement glycosylées, de 20 acides aminés.

Enfin, Hilkens et al (1995) définissent ce type de mucine comme « non authentique », contrairement aux mucines sécrétées, par le fait qu'elles ne peuvent former de gel et qu'elles sont ubiquitairement synthétisées par des cellules non spécialisées. Ces mucines membranaires sont exprimées en très faible quantité dans les tissus sains et sur-exprimées dans les lignées cellulaires cancéreuses. Elles sont toujours situées sur la membrane apicale des cellules.

2.3.1.2 Mucines sécrétées et solubles



Monomère de mucine sécrétée

Figure 3 : Représentation schématique d'un monomère de mucine sécrétée

Cette seconde structure (figure 3) a été décrite pour la première fois par Carlstedt et Sheehan (1984) sur la base des données physico-chimiques et d'observation en microscopie électronique sur les mucines cervicales humaines (Carlstedt et Sheehan 1984, Sheehan et al 1986, Sheehan et Carlstedt 1990). Elle est rencontrée dans de nombreux types de mucines d'origines différentes comme notamment les mucines trachéo-bronchiques humaines (Thornthon et al 1990) ou encore au niveau des mucines salivaires (MG1) (pour revue Nieuw Amerongen et al 1995).

L'action d'enzymes protéolytiques montre que la région centrale est formée de domaines hautement glycosylés (appelés domaines T) insensibles aux protéases et de domaines B, plus petits et non O-glycosylés, entièrement dégradés par ces enzymes. L'action de telles enzymes sur certaines mucines cervicales humaines donne alors 3 à 4 glycopeptides

d'environ 100 nm de longueur pour un monomère de 500 nm (Sheehan et Carlstedt 1990) qui sont nettement observables en microscopie électronique.

Les auteurs ont pu ainsi isoler les domaines T et montrent que ceux-ci sont en nombre variable suivant la nature des mucines et leur origine animale. Cette originalité structurale, ajoutée au nombre variable de « tandem repeat », est définie par Hoffman et Hauser (1993) comme la traduction du polymorphisme génétique des mucines.

Ces mucines ont, en plus, la particularité de posséder de nombreux résidus de cystéine, potentiellement oxydables, permettant la formation de liaisons covalentes entreelles. Enfin Dekker *et al* (1989b, 1991) ont décrit que la mucine gastrique de rat ne possède pas de domaines B et que seules les régions N- et C-terminales sont sensibles aux protéases (figure 4). De plus la taille de l'unique domaine glycosylé représente, chez cette mucine, 72% de la longueur de la mucine monomérique néanmoins ce modèle possède les même propriétés physicochimiques que le précédent.



Figure 4 : Représentation schématique du second type de structure de mucine sécrétée trouvée notamment dans les mucines gastriques de rat.

2.3.2 STRUCTURE QUATERNAIRE

L'existence de monomères dans les mucines sécrétées a été démontrée par Snary *et al* (1974) suivant l'observation que les mucines gastriques de porc perdaient leurs propriétés viscoélastiques en présence d'agents réducteurs de ponts disulfures. Les auteurs ont alors suggérés une organisation ulstrastructurale impliquant des liaisons disulfures entre différents monomères. Les travaux de Dekker *et al* (1989b, 1991) en microscopie électronique et en électrophorèse avant et après dénaturation, sur la mucine gastrique humaine et celle du porc, illustrent fort bien une telle organisation oligomérique.



Figure 5 : Structure dite en moulin à vent proposé par Allen (1983).

En travaillant sur les mucines gastriques de porc, Allen (1983) a proposé un modèle particulier d'association des monomères appelé modèle en moulin à vent (« windmill ») (Figure 5). Il a suggéré que cette mucine (de poids moléculaire (PM) 2.10^6 Da) est formée de 4 monomères (PM = 5.10^5 Da) associés entre eux par une protéine de liaison non glycosylée qui n'est pas une mucine, de PM 70 kDa, formant ainsi un hétéro-oligomère comme le sont certaines immunoglobulines.

Bien que certains auteurs du même groupe (Fahim *et al* 1987, Kawagishi *et al* 1990) ont suggéré également ce type d'oligomérisation pour les mucines salivaires humaines et intestinales de rat, d'autres auteurs ont montré que d'une part ce type d'architecture ne correspond pas à la stoechiométrie de la molécule et que, d'autre part, elle n'a encore jamais été observée en microscopie électronique (pour références Strous et Dekker 1992). Néanmoins, Roberton *et al* (1989) ont démontré l'existence d'une protéine de liaison (PM 118 kDa) présente dans toutes les mucines gastro-intestinales et ce quelle que soit leur origine animale. Ils ont pour cela utilisé plusieurs techniques d'isolement, de purification et d'identification (électrophorèse en gel SDS-PAGE³, anticorps monospécifiques ...).

Toutefois toutes les observations en microscopie électronique faites avant et après dénaturation des mucines sont en tout point conformes avec un modèle de polymérisation linéaire (figure 6), appelé modèle en « bottle brush » (Lamblin *et al* 1979, Slayter *et al* 1984, Roussel *et al* 1984, Carlstedt et Sheehan 1989). Cette organisation a d'ailleurs été confirmée,

³ SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

par microscopie électronique, pour les mucines cervicales et trachéo-bronchiques (Harding *et al* 1983, Thornthon *et al* 1990) humaines et de mucines gastriques de rat (Dekker J. *et al* 1991). Enfin il reste à souligner que les deux types de structures de monomères formant les mucines sécrétées sont synthétisés uniquement par certaines cellules spécialisées des muqueuses et certaines glandes exocrines (Roussel 1988).

Comme nous pouvons le constater, la représentation de la structure quaternaire (IV) des mucines reste indécise selon les auteurs. Il semble donc que ces deux modèles (linéaire avec ou sans protéine de liaison) existe suivant l'origine tissulaire et/ou animale.



Figure 6 : Représentation schématique du modèle en « buttle brush » des mucines sécrétées, ces mucines peuvent atteindre des longueurs de plusieurs µm (Roussel 1988). La nature visqueuse du gel est essentiellement du aux nombreux ponts disulfures reliant les différents monomères.

2.3.3 BIOSYNTHESE ET POLYMERISATION

Les étapes de polymérisation ont été bien étudiées sur la mucine de rat (Dekker et Strous 1990).

La biosynthèse s'effectue par les cellules mucoïdes hautement spécialisées (de type cellules en gobelet, « goblett cells », dans la muqueuse intestinale) des muqueuses. L'apomucine est synthétisée au niveau de la surface externe du reticulum endoplasmique rugueux. Les protéines sont alors entièrement internalisées ou restent partiellement associées, grâce à une séquence signal riche en acides aminés hydrophobes, à la membrane si celles-ci sont destinées aux mucines membranaires de type MUC1 (Killeen *et al* 1987, Ligtenberg *et al* 1990). Les apomucines sont ensuite N-glycosylées avec des glycannes de type oligomannosidiques (Glc₃Man₉GlcNAc₂) ce qui confère à celles ci une configuration nécessaire à leur polymérisation (Rose et Doms 1988, Dekker et Strous 1990).

Celle-ci consiste à exposer les résidus de cystéines des extremités N-terminales de deux monomères à la disulfide isomérase qui catalyse alors la réaction d'oxydation conduisant à la formation des ponts disulfures (Munro et Pelham 1987). Les oligomères formés sont O-glycosylés dans le compartiment *trans* reticulum où seul un résidu de GalNAc est attaché aux différents sites potentiels de O-glycosylation. Cette réaction est catalysée par

la polypeptide-GalNAc-transférase (E.C. 2.4.1.41, Schachter et Brockausen 1989). Cette étape donne alors une configuration linéaire à la glycoprotéine qui permet ainsi une maturation des chaînes glycanniques dans les compartiments *cis* et *trans* Golgi.

De la même manière, Gum (1995) propose un schéma équivalent de polymérisation de la mucine humaine MUC2, à partir de l'observation faite sur la biosynthèse du facteur vonWillebrand (Xu *et al* 1992a). Dans ce cas, les monomères se polymérisent par leur côté Cterminal dans la citerne du reticulum, les dimères formés sont associés par leur partie Nterminale. Néanmoins certaines étapes restent à démontrer expérimentalement.

Les multimères formés donnent en microscopie électronique une macromolécule linéaire entrecoupée de zones granulaires correspondants aux liaisons disulfure intermonomères. Les mucines matures sont ensuite stockées dans des vésicules de sécrétions (Neutra et Forstner 1987). Dès l'exocytose la mucine s'hydrate instantanément et atteint jusqu'à 600 fois son volume (Verdugo *et al* 1987, Verdugo 1990). Les auteurs ont décrit que cette extraordinaire augmentation de volume s'explique d'une part par la nature très hydrophile des sucres et d'autre part par la présence de charges ioniques portées par les nombreux résidus d'acides sialiques et/ou de groupements sulfates situés à la périphérie des glycannes. Toutes ces fonctions acides participent, par leurs charges, aux répulsions des chaînes glycanniques adjacentes qui permettent à la mucine d'occuper un maximum d'espace. Enfin les travaux de Mian et Kent (1986) sur les mucines de la trachée de poulet, montrent effectivement que la viscosité augmente avec l'acidité des mucines.

3. Rôles et fonctions des mucines

Les rôles des mucines sont différents suivant qu'elles sont membranaires ou sécrétées. En effet, si leurs structures primaire et secondaire sont voisines, leurs propriétés physicochimiques sont très différentes. Ainsi les mucines sécrétées ont essentiellement un rôle de protection des épithéliums où elles sont synthétisées, tandis que les mucines membranaires assurent en plus un rôle dans certaines interactions entre cellules.

3.1 LES MUCINES SECRETEES

Synthétisées en continu à l'interface entre la lumière des organes et l'épithélium (tissus qui assure et sélectionne les différents échanges entre l'organisme et le milieu extérieur), les mucines sécrétées sont plus ou moins abondantes et ont des propriétés viscoélastiques différentes. Cependant, dans tous les cas, elles assurent une protection

physique des tissus. En effet leur ultrastructure qui forme un gel moléculaire complexe permet une lubrification des tissus. Comme c'est le cas dans la cavité buccale où les mucines MG1 et MG2 assurent une protection pendant l'élocution ou la mastication.

3.1.1 PROTECTION MECANIQUE

Nieuw Amerongen *et al* 1989 ont mis en évidence une affinité des mucines salivaires pour l'hydroxyapatite (composant majeur de l'émail dentaire). Ces mucines agissent comme un film protecteur sur la dentition en limitant les agressions d'origines chimiques ou bactériennes. Ces mucines assurent également une lubrification des tractus génital et gastrointestinal et procurent dans ce dernier une protection des tissus lors du transit du bol alimentaire, par mouvement péristaltique. Dans tout les cas, ces glycoprotéines sécrétées ont la particularité d'être extrêmement hydrophiles puisque l'eau peut représenter jusqu'à 95% du poids des mucus ce qui assure à tous les tissus concernés une hydratation constante.

3.1.2 PROTECTION CHIMIQUE ET BACTERIOLOGIQUE

Les mucines assurent également une protection chimique et enzymologique des muqueuses. En effet, synthétisées de manière abondante dans le tractus gastro-intestinal (jusqu'à 192µm d'épaisseur chez l'homme (Kerss *et al* 1982)), elles protègent d'une part les tissus contre les nombreuses enzymes hydrolytiques (comme la pepsine) particulièrement actives dans la cavité stomacale, et, d'autre part, elles assurent une protection contre les sucs gastriques acides par formation d'un gradient de pH entre la lumière de l'estomac et les cellules stomacales (figure 7, Heatley 1959). Cette protection est assurée par des mucines de très hautes masses moléculaires. Younan *et al* (1982) ont d'ailleurs démontré que les patients atteints d'ulcères gastriques synthétisent des mucines de plus petites tailles et donc moins efficaces. Les mucines sécrétées assurent un rôle équivalent dans le tractus intestinal.





3.1.3 PROTECTION BACTERIENNE

Les O-glycannes des mucines exhibent à leur périphérie des structures oligosaccharidiques très variées et notamment des épitopes de groupes sanguins (Tableau 3). Ceux-ci sont tous potentiellement des ligands des adhésines bactériennes (équivalent des lectines végétales). Cette propriété permet aux mucines sécrétées d'assurer un rôle de protection efficace contre les agressions bactériennes et virales. Ce rôle est particulièrement important dans le tractus trachéo-bronchique où les mucines associées au système ciliaire participent activement à la mobilité muco-ciliaire, fixant notamment micro-organismes et particules en suspension dans l'air inspiré. Les éléments piégés sont alors expulsés en même temps que le mucus. Les mucines constituent dans ce cas la première défense non immunitaire de l'organisme (Klein *et al* 1992).

L'expression de certains épitopes de groupes sanguins (A, B, H, Lewis B, Lewis Y) chez certains individus dits sécréteurs (possédant le gène codant pour une α 1-2 fucosyltransférase) permet chez ceux-ci une protection des candidoses buccales provoquées par le micro-organisme *Candida albicans*. En effet ce dernier exprime des adhésines spécifiques des épitopes de type Le^a (Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc (pas de liaison α 1-2 Fucose). Ces épitopes sont absents chez les individus sécréteurs mais présents chez les autres. Aussi les bactéries ne peuvent se fixer sur les mucines buccales ce qui leur interdit toute prolifération et pathogénicité sur les individus sécréteurs, tandis que chez les autres les foyers d'infections pourront se développer (Lamey *et al* 1991). Par contre, le statut sécréteur favorise les ulcères d'origines bactériennes. En effet, *Helicobacter pilori*, agent pathogène principal responsable de cette affection, possèdent les adhésines qui reconnaissent les épitopes α 1-2 fucosylés (Le^b: Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc, Le^y: Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc). Ces épitopes sont exprimés sur les mucines gastriques des individus sécréteurs, ce qui favorise chez ces derniers le développement de foyers d'infections dans la muqueuse stomacale (Borèn *et al* 1993, 1994).

Par ailleurs Bergey et al (1994), Amano et al (1994) et Veerman (1995) ont montré que de nombreuses bactéries et virus, dont le virus du sida, sont capables de se fixer sur les glycannes des mucines MG1. Lamblin et al (1992) et Klein et al (1992) ont antérieurement démontré ce type d'affinité dans les mucines bronchiques humaines démontrant ainsi l'intérêt de la diversité des épitopes glycanniques des mucines (Scharfman et al 1995). De la même manière, dans le tractus intestinal, les mucines permettent aux bactéries de la flore intestinale et notamment le *Bifidobacterium bifidum* (Fontaine et al 1994) de se fixer assurant ainsi la symbiose avec les entérocytes.

3.1.4 AUTRES ROLES DES MUCINES

Outre ces rôles de protection contre les attaques physiques, chimiques, enzymatiques ou bactériologiques, les mucines du tractus génital assurent un rôle tout à fait particulier dans le contrôle de la fécondation. En effet Chantler *et al* (1989) ont montré, d'une part, que les mucines sécrétées sont abondantes et hautement hydratées lors de l'ovulation (taux d'œstrogènes maximal) ce qui permet alors aux spermatozoïdes une progression libre et rapide le long de ce tractus, et d'autre part que leur sécrétion est plus faible pendant le reste du cycle et que leur viscosité plus importante bloque toute progression des gamètes mâles.

Enfin ces mucines ont la particularité de former un gel moléculaire assurant une barrière sélective entre la lumière des organes et les épithéliums. Ce gel possède une architecture permettant notamment dans la muqueuse intestinale un échange sélectif des nutriments, en retardant la diffusion d'ions, de peptides ou encore de sucrose. (Proust *et al* 1984, Forstner 1978). Elles assurent en plus un autonettoyage des muqueuses en piégeant et expulsant les débris cellulaires.

Chez les organismes inférieurs, comme par exemple les Amphibiens, les mucines de la peau (FIM) assurent une hydratation constante indispensable et une protection efficace contre les agents pathogènes. Par leur nature visqueuse, elles permettent de piéger les exotoxines ou autres molécules sécrétées par la peau comme des peptides anti-bactériens (Zasloff 1992). Les mucines oviducales qui entourent les œufs de ces animaux ont, quant à elles, des rôles aussi variés que la protection de l'embryon contre d'éventuels prédateurs (Chesnel et al 1986), une protection thermique (Guyétant 1975) ou encore une rétention des ions nécessaire à une fertilisation réussie.

Toutes ces propriétés sont dues à l'architecture particulière de ces glycoprotéines. Alors que l'axe peptidique est principalement responsable de la viscosité des mucines, les glycannes, qui peuvent être neutres (comme dans le mucus stomacal) ou polyanioniques comme dans le mucus intestinal, assurent les fonctions de la mucine. Les glycannes, *via* des cations du type Ca²⁺, assurent les interactions électrostatiques entre les différentes chaînes glycanniques adjacentes ce qui renforce la structure quaternaire des mucines (Snary *et al* 1974, Crowther *et al* 1984, Sellers *et al* 1988). Dans tout les cas, elles maintiennent une hydratation constante des mucus.

3.2 LES MUCINES MEMBRANAIRES

Ces mucines (de type MUC1) ont également une fonction de protection des cellules. Elles sont monomériques et ont une rigidité comparable aux précédentes. Celles ci ne sont par contre que très faiblement exprimées dans les cellules saines et ne se trouvent qu'au niveau des membranes apicales des cellules (Zotter *et al* 1988, Parry *et al* 1990). Elles représentent l'ultime barrière protectrice des cellules contre les enzymes protéolytiques ou les agents pathogènes. Par leur taille, elles agissent comme un écran protecteur de la membrane apicale des cellules où sont situées de nombreuses glycoprotéines et notamment les antigènes de surface et récepteurs de toutes sortes. Elles protègent la membrane des molécules de tailles moléculaires indésirables en agissant comme un tamis moléculaire avec son seuil d'exclusion. Hayes *et al* (1990) ont montré que la mucine MUC1 inhibe l'action cytotoxique des lymphocytes T en masquant les récepteurs membranaires de ces derniers.

Sur-exprimée dans les lignées cancéreuses sur toute la surface cellulaire, MUC1 rend ces cellules inaccessibles aux cellules tueuses de l'organisme, ce qui explique en partie les phénomènes d'invasions tissulaires (ou métastase) des cellules malignes (Carraway *et al* 1992). Strous et Dekker (1992) soulignent également que le taux d'expression de ces mucines membranaires régule l'interaction des cellules epithéliales avec leur environnement.

Par ailleurs ces mucines participent activement aux interactions entre cellules. Les épitopes glucidiques exprimés sur ces glycoprotéines, notamment les groupements Sialyl-LewisX et Sialyl LewisA, sont des ligands pour les sélectines E et P trouvées, entre autres, sur les cellules endothéliales (Walz *et al* 1990). De plus, ils sont des ligands pour les L-selectines exclusivement trouvées sur la membrane des leucocytes (Lasky *et al* 1992). Cette propriété

est extrêmement importante puisqu'elle permet d'expliquer en partie les phénomènes de « rolling » dans les processus d'inflammation (Ley et al 1995).

4. Régulation de la biosynthèse des mucines

Si la synthèse des mucines membranaires est constitutive, la synthèse des mucines sécrétées est par contre étroitement contrôlée. Les cellules mucoïdes possèdent une haute capacité de stockage des mucines néo-synthétisées, leur sécrétion étant régulée par différents effecteurs suivant le tissus.

La régulation peut être neuronale, de type cholinergique, comme dans le cas des cellules muco-sécrétrices du tractus gastro-intestinal (Florey 1962). Cependant les effets seront différents suivant la localisation des cellules cibles. Ainsi l'acétyl-choline induit la sécrétion des mucines des « goblet-cells » des cryptes intestinales et a un effet inhibiteur sur les cellules de même type situées sur les villosités du colon (Specian et Neutra 1980). La sécrétion des mucines des cellules de la trachée peut être induite par l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) ou par certaines prostaglandines (Rearick *et al* 1987). De plus une augmentation du taux de calcium intracellulaire induit une fusion des granules de sécrétions avec la membrane apicale des cellules mucoïdes. Enfin il est bien établi que la synthèse des mucines du tractus génital est étroitement contrôlée par les hormones sexuelles de type œstrogène (Chantler *et al* 1989, Maack *et al* 1985).

5. Conclusion

Qu'elles soient sécrétées, membranaires ou solubles, les mucines sont des glycoprotéines hautement glycosylées ce qui leur confèrent des propriétés et des rôles particuliers. Les propriétés physico-chimiques de ces molécules ont rendu leur étude particulièrement difficile, et c'est pourquoi peu de travaux ont été effectués avant les années 1980. La biologie moléculaire et en particulier le clonage des gènes ont permis d'identifier et d'élucider la structure d'un certain nombre d'apomucines d'origine humaine ou animale. Ces études ont confirmé d'une part la présence de domaines répétés d'acides aminés qui caractérisent ce type de molécules et, d'autre part, l'existence d'un polymorphisme génétique des apomucines.

Les études sur les chaînes glycanniques sont de plus en plus nombreuses et montrent que les mucines possèdent une extraordinaire hétérogénéité de structures primaire glycanniques. Ces chaînes glycanniques sont essentielles dans la fonction de ces molécules, assurant aux mucines leur rôle de protection des épithéliums contre les agressions d'origines chimiques, physiques, enzymologiques ou bactériologiques. De nombreux auteurs ont également démontré qu'un bon nombre de pathologies associées aux mucus sont dues à une glycosylation particulière ou aberrante de ses mucines. L'importance des chaînes O-glycanniques nous amène à développer dans une troisième partie leur structure et leur biosynthèse.

.



LES O-GLYCANNES



TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	52
2. STRUCTURE GENERALE	52
2.1.1 Le noyau ou « core »	54
2.1.2 Le squelette des O-glycannes de type mucine	55
2.1.3 La périphérie des O-glycannes	56
2.1.3.1 La substitution des chaînes de type 1 :	
2.1.3.2 La substitution des chaînes de type 2 :	
2.1.3.3 Autres types de substitutions périphériques :	59
3. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES	60
3.1.1 Les glycosyltransférases	60
3.1.1.1 Localisation	60
3.1.1.2 Schéma de la biosynthèse	60
3.1.1.3 Régulation de la biosynthèse	61
4. LES GLYCOSYLTRANSFERASES	64
4.1.1 Initiation de la biosynthèse des O-glycannes	64
4.1.2 Synthèse des noyaux	64
4.1.2.1 UDP-Gal : GalNAc-R β1,3-Gal-Transferase (core1 β3GalT, EC 2.4.1.122)	65
4.1.2.2 UDP-GlcNAc : GalNAc-R β1,3-GlcNAc-transferase (core3 β3GlcNAcT, EC 2.4.1.147)	66
4.1.2.3 UDP-GlcNAc : Galβ1-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc) β1,6-GlcNAc-transferase (core2 β6GnT,	EC
2.4.1.102) et UDP-GlcNAc : GlcNAc B1-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc) B1,6-GlcNAc-transferase (core4	
β6GnT, EC 2.4.1.148)	66
5. GLYCOSYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS L'ELONGATION DES NOYAUX	67
5.1.1 Glycosyltransférases communes à la biosynthèse des N- et O-Glycannes	6 7
5.1.2 Glycosyltransférase spécifique des O-glycannes	6 7
5.1.2.1 UDP-GlcNAc : Gal(β1-3)(R1-6)GalNAc-R (GlcNAc sur Gal) β1,3-GlcNAc-transferase (elongation	
β3GnT, EC 2.4.1.146)	67
6. ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DE LA PERIPHERIE DES O-GLYCAN	NES 68
6.1.1 Les sialyltransférases	68
6.1.1.1 CMP-sialic acid : R1-GalNAc-R α6-sialyltransferase I (ST6O I, ST6GalNAc I, EC 2.4.99.3) et CMP	-sialic
acid : R1-GalNAc-R α6-sialyltransferase II (ST6O II, ST6GalNAc II)	68
6.1.1.2 CMP-sialic acid : Galβ1-3 GalNAc-R α3-sialyltransferase (STOI, ST3Gal I, E.C. 2.4.99.4)	69
6.1.2 Glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des déterminants de groupes sanguins A é	et B. 69
6.1.3 Sulfotransférase	70
7. ROLE DE LA O-GLYCOSYLATION	71

1. INTRODUCTION

Les chaînes O-glycanniques sont aisément séparées des protéines auxquelles elles sont attachées par un traitement alcalin en milieu réducteur. Cette technique, introduite par Carlson (1968), permet de libérer les O-glycannes sous forme d'oligosaccharide-alditols très stables. Dans ce chapitre nous utiliserons les abréviations couramment usitées pour nommer les monosaccharides. Les noms et les formules de ces monosaccharides sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 1: Représentation des monosaccharides rencontrés dans les O-glycannes de type mucine.

Fuc : α -L-fucose



Gal : $(\alpha)\beta$ -D-galactose



GalNAc : $(\alpha)\beta$ -D-N-acétyl-galactosamine



GlcNAc : $(\alpha)\beta$ -D-N-acétyl-glucosamine



NeuAc :acide N-acétyl- α -neuraminique



R= groupement N-acétyl (NeuAc), N-glycolyl (NeuGc), OH (Kdn)

2. STRUCTURE GENERALE

Bien que l'hétérogénéité structurale des chaînes glycanniques soit très importante, l'architecture générale des O-glycannes de type mucine repose sur un modèle unique formé de trois régions distinctes (figure 1), ce modèle a été proposé par Schachter et Williams (1982) : ☞Le noyau (ou "core") représente la partie qui est attachée sur l'apomucine il est toujours constitué du résidu de GalNAc substitué par un ou deux monosaccharides.

El squelette (ou "backbone") représente la région centrale de la chaine glycannique, il peut être branché ou linéaire.



Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation générale des chaînes O-glycanniques de type mucine

☞La périphérie correspond à l'extrémité terminale non réductrice¹ des chaînes glycanniques.

¹: Cette appellation tient du fait qu'un oligosaccharide peut être réduit si ce dernier possède des fonctions réductrices (cétone ou aldéhyde) libres non engagées dans une liaison. Cette propriété est très importante lors de l'isolement ou l'utilisation des chaînes oligosaccharidiques libres.

2.1.1 LE NOYAU OU « CORE »

A ce jour 8 novaux ont été décrits (Tableau 2) et caractérisés à partir de nombreuses glycoprotéines d'origines diverses. Leur numérotation est établie suivant leur ordre de découverte. Certains sont très rares d'autres sont ubiquitaires aux tissus et aux espèces.

Le noyau 1 : Gal (β 1-3) GalNAc α Ser/Thr est le premier a avoir été isolé à partir des glandes sousmaxilaires de (Carlson 1968). C'est porc incontestablement le novau le plus fréquemment retrouvé et il a été isolé dans de très nombreuses glycoprotéines d'origines aussi différentes que les mucines bronchiques humaines (Lamblin et al 1980) ou les mucines d'Amphibiens (Maes et al 1997). Ce disaccharide constitue par ailleurs le déterminant antigénique T (Thomsen-Friedenreich)

Le noyau 3 : GlcNAc (β 1-3) GalNAc α Ser/Thr, moins fréquent que le précédent, est néanmoins rencontré dans les mucines bronchiques humaines (Breg et al 1988) et dans d'autres mucines d'origines aussi diverses que les $GlcNAc(\beta 1-6)$ mucines intestinales de rat (Slomiany et al 1980) ou les mucines oviducales d'Ambystoma mexicanum (Strecker et al 1992). De plus Podolsky (1985) a montré que les Oglycannes des mucines coliques humaines ont la particularité de posséder exclusivement ce type de noyau. Cependant il est à noter qu'il est rare de le trouver au niveau des glycoproteines de cellules malignes (Schachter et Brockhausen 1992).

Les noyaux 2 et 4 : GlcNAc $(\beta 1-6)$ [Gal $(\beta 1-$ 3)]GalNAc α Ser/Thr et GlcNAc(β 1-6) [GlcNAc (β 1-3)]GalNAc α Ser/ Thr. Le noyau de classe 2 est fréquemment isolé à partir de nombreuses mucines, qu'elles soient sécrétées comme dans les mucines gastriques humaines solubles (Oates et al 1974) ou comme dans les mucines salivaires



Novau 8

Tableau 2 : Nomenclature des différents noyaux trouvés dans les O-glycannes de type mucine (selon Schachter et Williams 1982)

d'hirondelles (Wieruszeski et al 1987) alors que le noyau 4 est beaucoup moins fréquent (Schachter et Brockausen 1992).

Le noyau 5: GalNAc(α 1-3)GalNAc α Ser/Thr. Cette structure est rare et a été isolée pour la première fois par Kurosaka *et al* (1983) à partir des glycoproteines de l'adéno-carcinome rectal humain. Il a également été isolé des glycoprotéines du méconium (Hounsell *et al* 1985) ainsi que dans les mucines salivaires du martinet d'Asie (espèce *Collocalia*) (Wieruszeski *et al* 1987).

Le noyau 6 : GlcNAc (β 1-6) GalNAc α Ser/Thr, exclusivement isolé des glycoprotéines humaines (Schachter et Brockhausen 1992). Ce noyau a entre autre été décrit dans le méconium humain (Hounsell *et al* 1985) ou encore dans les glycoprotéines des kystes ovariens (Mutsaers *et al* 1986). Cette structure n'est pas un produit de dégradation des noyaux 2 ou 4 comme cela avait pu être suggeré avant que Yazawa *et al* (1986) aient mis en évidence une activité β 6-N-acétylglucosaminyltransférase qui utilise, *in vitro*, l'antigène Tn (GalNAc α Ser/Thr) comme substrat.

Le noyau 7 : Gal (β 1-6) [Gal (β 1-3)] GalNAc α Ser/Thr, extrêmement rare puisqu'il n'a, jusqu'à présent, été décrit que dans les mucines gastriques humaines (Slomiany *et al* 1984) et dans quelques glycoprotéines humaines (Pour référence se reporter à Schachter et Brockhausen 1992).

Le noyau 8 : GalNAc(α 1-6)GalNAc α Ser/Thr est le dernier noyau décrit. Il a été isolé pour la première fois par Chai *et al* (1992) à partir des mucines des glandes sous-maxilaires de bovins.

Enfin il est à noter que d'autres structures correspondant à des noyaux de classe non encore déterminée ont été isolés à partir des mucines oviducales d'Amphibiens comme notamment le Gal (α 1-3) GalNAc-ol chez *Rana temporaria* (Maes *et al* 1997) ou encore *Rana utricularia* (Morelle et Strecker 1997). Ce noyau a été préalablement isolé des mucines pathologiques d'individus non sécréteurs (van Halbeek *et al* 1994) et pourrait constituer le noyau de classe 9. Ces différents noyaux sont très souvent substitués par des résidus monosaccharidiques et ces substitutions forment alors, par élongation, le squelette (ou "backbone") des chaînes O-glycanniques.

2.1.2 LE SQUELETTE DES O-GLYCANNES DE TYPE MUCINE

Ces squelettes sont représentés par l'addition de résidus galactosyle, *N*-acétylglucosamine ou encore de N-acétyl-galactosamine. Les principales structures d'élongations communément retrouvées sont les suivantes :

Gal (β 1-3) GlcNAc β appelée type 1 ou lacto
Gal (β 1-4) GlcNAc β appelée type 2 ou néolacto

Le type 1 n'est jamais polymérisé alors que le type 2 peut l'être, formant alors le déterminant antigénique i lorsqu'ils sont répétés de manière linéaire et I lorsqu'ils sont branchés. D'autre chaînes, plus rares, ont été décrites. Le type 3 : Gal (β 1-3) GalNAc α et le type 4 : Gal (β 1-3) GalNAc β , ces structures ne sont retrouvées que sur quelques glycoprotéines (Takasaki *et al* 1978) et sur les glycolipides de la série globoside (Clausen *et al* 1986). Ces chaînes sont importantes parce qu'elles peuvent être également des précurseurs pour la formation des épitopes de groupes sanguins. Par ailleurs, les chaînes de types 3 sont typiquement retrouvées dans les chaînes O-glycanniques des mucines oviducales de *Rana palustris* (Chapitre VIII).

Enfin la présence du squelette n'est pas une règle, car dans de nombreux O-glycannes le noyau n'est substitué que par un ou deux résidus monosaccharidiques, ces résidus constituent à la fois le squelette et la périphérie du glycanne.

2.1.3 LA PERIPHERIE DES O-GLYCANNES

Cette région périphérique des O-glycannes est extrêmement importante puisqu'elle constitue, entre autres, le support des déterminants antigéniques de groupes sanguins de type ABH et Lewis. Fort bien étudiés par de nombreuses équipes, la biosynthèse et le contrôle génétique de la formation de ces épitopes sont maintenant bien connus (Oriol *et al* 1981,1986). Ces antigènes ont un rôle très important dans la modulation des activités des glycoproteines qui les portent, et notamment dans les phénomènes d'interactions cellulaires (Grenwell 1997). La périphérie représente donc la substitution des chaînes du squelette. Les différentes substitutions possibles sont résumées dans la figure 2.

2.1.3.1 La substitution des chaînes de type 1 :

L'action d'une $\alpha 1,2$ fucosyltransférase, produit du gène H ou Se, greffe un résidu de fucose en $\alpha 1-2$ sur le galactose terminal formant alors le groupe sanguin de type H :

Fuc (α 1-2)Gal (β 1-3)GlcNAc β 1-R

Ce déterminant peut être trouvé sur les glycoprotéines membranaires, il est alors dû à l'action de la fucosyltransférase issue du gène H. Isolé de glycoprotéines sécrétées ou solubles, il est alors issu du produit du gène Se. Les individus possédant de tels déterminants sur leurs glycoprotéines sécrétées sont alors appelés individus sécréteurs. L'origine et la discrimination des

deux gènes (H et Se) proposées par Oriol (1981) sont forts bien expliquées dans la revue de Greenwell (1997).



Figure 2 : Représentation schématique des différentes substitutions trouvées sur les chaînes de type 1 et 2. Les références citées le sont à titre indicatif, il est bien entendu que ces structures ont été souvent décrites par d'autres auteurs.

L'action d'une α -*N*-acétyl-galactosaminyltransférase ou d'une α -galactosyltransférase sur cette structure conduit à la formation des antigènes A et B respectivement (Figure 2). L'addition de ces résidus masque alors le déterminant H qui n'est alors plus reconnu par les récepteurs ou anticorps correspondants. L'action d'une fucosyltransférase codée par le gène *Le* sur les chaînes de type 1 conduit à la formation de l'épitope de groupe sanguin Le^a. Il est à noter que l'épitope Le^b n'est pas le fruit de l'action d'une nouvelle fucosyltransférase mais est le résultat de l'action simultanée des fucosyltransférases H ou Se avec la fucosyltransférase (Le) responsable de la formation de l'épitope Le^a. Comme il est indiqué sur la figure 2, les substitutions sont restreintes à des liaisons avec des sucres d'anoméries α , conférant alors à la chaîne les déterminants de groupe sanguins A1, B1 et H1. Dans de nombreuses mucines ces chaînes de type 1 peuvent être substituées en 3 ou en 6 sur le galactose terminal par un résidu d'acide *N*-acétyl-neuraminique (Rana *et al* 1984) ou par un groupement sulfate (Mawhinney *et al* 1984).

2.1.3.2 La substitution des chaînes de type 2 :

Comme les précédentes, ces chaînes sont également d'excellents substrats pour les glycosyltransférases responsables de la formation des antigènes de groupes sanguins. Cependant la substitution en 3 de la GlcNAc sub-terminale par un résidu fucosyle défini de nouveaux antigènes (Hakomori et Kobata 1974), le Le^X (encore appelé X ou SSEA-1²) et le Le^Y pour la structure di-fucosylée.

Les substitutions existantes sur les chaînes de type 2 sont plus nombreuses que sur celles de type 1. Contrairement à ces dernières, les chaînes de type 2 peuvent être substituées par des monosaccharides d'anomérie β . Notamment les substitutions en 3 et 4 sur le β -Gal terminal par respectivement un résidu d'acide *N*-acétyl-neuraminique et une β -D-*N*-acétyl-galactosamine définissent le déterminant antigénique rare de groupe sanguin Cad (Sda). Ce dernier a été initiallement décrit par Blanchard *et al* (1983) dans les mucines cervicales de singe et, plus récemment, dans les mucines oviducales de l'Amphibiens *Rana palustris* (Chapitre VIII). Cette structure Cad (Sda) est également la structure majeure des O-glycannes de la glycophorine humaine (Herkt *et al* 1985).

La présence de résidus sulfate en position terminale ou sub-terminale est fréquemment trouvée dans les mucines bronchiques normales (Lo-Guidice *et al* 1997) ou pathologiques, ainsi que dans l'ovomucine des œufs de poules (Strecker *et al* 1987). Par ailleurs, les mucines oviducales de *Rana temporaria* sont particulièrement riches en O-glycannes sulfatés. Il est à souligner que le taux de sulfatation est affecté dans les mucines impliquées dans certaines

² SSEA-1 : Stage-Specific Embryonic Antigen, correspond à l'antigène Lewis X

affections pathologiques comme les adénocarcinomes ou dans les processus d'inflammation, cette variabilité n'est pas encore bien expliquée (Hakomori 1989, Schachter et Brockhausen 1992).

2.1.3.3 Autres types de substitutions périphériques :

La présence de squelettes formés par les chaînes de type 1 ou 2 n'est pas une règle absolue comme l'est la présence ubiquitaire de la N-acétyl-galactosamine.

D'une part, la substitution peut avoir lieu directement sur la GalNAc du point de branchement elle est alors restreinte à un monosaccharide différent des oses formant le noyau. Si la GalNAc est le seul monosaccharide du glycanne, il constitue alors le déterminant antigénique Tn, cette structure est fréquemment trouvée dans de nombreuses mucines. Ce dernier peut être sialylé en 6, bloquant alors toute élongation du glycanne et forme le déterminant Sialyl-Tn. Springer *et al* (1985) ont été les premiers à démontrer que les déterminants Tn et Sialyl-Tn étaient des marqueurs de tumorisation des tissus. Plus récemment Jass *et al* (1995) ont montré l'importance de ces déterminants qui sont des marqueurs à la fois des tissus sains et des tissus cancéreux. L'antagonisme de cette situation tient de la structure de l'acide sialique qui est O-acétylé dans les tissus sains et non O-acétylé dans les tissus tumoraux.

D'autre part, de nombreux O-glycannes sont restreints à une substitution directe sur les noyaux, la plus fréquente reste la substitution par les résidus fucosyles. Cette substitution sur un résidu galactose d'un noyau est suffisante pour définir l'antigène de groupe sanguin H, qui peut être lui-même substitué pour former les groupes sanguins A et B. Enfin les substitutions directes sur les noyaux par les différents acides sialiques (NeuAc, NeuGc, Kdn) ou par des groupements sulfates, sont fréquentes.

Bien que les O-glycannes de types mucines soient constitués de quelques monosaccharides différents, les chaînes glycanniques possèdent une très grande hétérogénéité structurale. Celle-ci est due :

- à l'anomérie des sucres qui peut être α ou β pour le Gal et la GalNAc, α pour les acides sialiques et les fucoses et enfin β pour la N-acétyl-glucosamine;
- 2) à la position de la substitution sur les monosaccharides;
- au nombre de résidus de monosaccharides dans les chaînes, celui-ci peut aller de 1 à 20 (Levine et al 1987).

La combinaison de toutes ces possibilités donne à ces O-glycannes de type mucine leur extraordinaire diversité. Enfin la biosynthèse de ces chaînes est effectuée par un certain nombre de glycosyltransférases qui possèdent chacune leur spécificité que nous allons développer dans le paragraphe suivant.

3. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES

3.1.1 Les Glycosyltransferases

3.1.1.1 Localisation

La biosynthèse des O-glycannes commence dans le compartiment cis-Golgi et ne requiert pas de dérivés secondaires connus comme cela est le cas pour les N-glycannes (pour revue Verbert 1995). La biosynthèse s'effectue par l'addition successive, jusqu'à maturation, de monosaccharides apportés sous forme de précurseur nucléotide-sucre. Toutes les glycosyltransférases (GT) sont des glycoprotéines membranaires de type II avec une queue cytoplasmique N-terminale de petite taille, une séquence en acides aminés hydrophobe transmembranaire, une partie rigide potentiellement clivable par des protéases et enfin un domaine Cterminal catalytique relativement important (Figure 3). Il est à noter que l'action d'une protéase sur la glycoprotéine permet d'obtenir, in vitro, une enzyme soluble active. Toutes les GTs sont localisées dans les citernes cis- et trans- Golgi (Paulson et Colley 1989).



Figure 3 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase membranaire. (Type II)

3.1.1.2 Schéma de la biosynthèse

Hagopian et Eylar (1968) ont établit le concept qu'il existe autant de GT que de liaisons osidiques, ce concept est toujours d'actualité (Brockhausen et Schachter 1997) tant la liste des gènes clonés de ces glycoprotéines ne cesse de croître (Field et Wainwright 1995). Néanmoins certaines GTs, comme par exemple la fucosyltransférase issue du gène *Le* responsable des déterminants antigéniques de groupes sanguins Lewis, sont capables de catalyser une même réaction mais avec des substrats différents (Prieels *et al* 1981). Il est maintenant bien admis que la

majorité des GTs sont spécifiques des substrats donneur et accepteur et qu'elles sont généralement dépendantes, *in vitro*, d'ions métalliques divalents de type Mn^{2+} . Ainsi la réaction catalysée par les GTs responsable de la biosynthèse des chaînes O-glycanniques de type mucines repose sur le schéma suivant :

GlycosyltransféraseR-OH + Nucléotide-sucre $(Mn^{2^{*}})$ R-O-sucre + Nucléotide

<u>R</u> : représente initialement l'apomucine puis ensuite la chaîne O-glycannique en croissance

<u>Nucléotide</u> : les monosaccharides sont disponibles sous forme de nucléotide phosphate. Le galactose, la N-acétyl-glucosamine et la N-acétyl-galactosamine sont sous forme UDP-Gal, UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc (Uridine-Di-Phospho-Sucre). Le fucose est sous la forme de GDP-Fuc (Guanosine-Di-Phospho-Fucose) et les acides sialiques sous forme CMP-NeuAc, CMP-NeuGc et CMP-Kdn (Cytidine-Mono-Phospho-Sucre).

3.1.1.3 Régulation de la biosynthèse

De nombreuses GTs (Tableau 3) sont communes à la biosynthèse des glycoconjugués cependant certaines sont spécifiques à la formation des O-glycannes de type mucine. Ces GTs permettent la synthèse de glycannes avec une très grande variabilité dans leur structure primaire.

- Il existe un contrôle génétique des GTs qui sont, pour certaines, non seulement spécifiques du tissus (gènes des fucosyltransférases (*H* et Se)) mais également des espèces (Brockhausen et al 1985). Les gènes de ces GTs ont des organisations génomiques qui peuvent être mono- ou poly-exoniques et coder pour des isoenzymes³ (Joziasse 1992).
- Le deuxième type de régulation tient au fait qu'il peut y avoir une compétition entre plusieurs enzymes pour un même substrat
- Le troisième type de régulation est donné par la spécificité intrinsèque de l'enzyme pour son substrat. En effet il existe une loi de biosynthèse introduite par Schachter et al en 1986 appelée règle des (liaisons) 3 avant 6, ou Go-No/Go.

Le mécanisme Go-No/Go ou règle du 3 avant 6 :

C'est un mécanisme bien connu qui signifie que la fixation d'un sucre sur un oligosaccharide par une GT A transforme cet oligosaccharide, qui n'est alors plus un substrat pour une GT B. L'exemple type correspond à la synthèse de l'antigène sialyl Tn. La sialyltransférase qui fixe un acide sialique sur la *N*-acétyl-galactosamine en α 2-6, bloque cette structure dans la

³ Les isoenzymes sont différentes par leur activité enzymatique et leur localisation cellulaire.

biosynthèse. Pour parvenir à l'antigène sialylT (Gal $(\beta 1-3)$ [NeuAc($\alpha 2-6$)]GalNAc-ol), le résidu de galactose doit être fixé avant le résidu d'acide sialique.

Le mécanisme No-Go/Go

Ce mécanisme signifie que l'action d'une GT A sur un substrat A permet à ce dernier de devenir un substrat B pour une GT B. L'exemple type du mécanisme No-Go/Go correspond à la formation des noyaux de type 1 et 2 où la β 3 galactosyltransférase doit agir avant la β 6 glucosaminyltransférase. Néanmoins cette dernière règle semble obsolète depuis la découverte d'une β 6 glucosaminyltransférase capable de catalyser la formation du noyau de type 6 (Yazawa *et al* 1986).

Enfin la chaîne peptidique ne semble pas, en général, avoir d'effet sur les GT hormis l'indispensable présence d'au moins un résidu de proline à proximité du site de O-glycosylation. En effet Young *et al* (1979) ont montré que tout peptide de synthèse contenant au moins trois résidus de proline adjacent à un résidu de thréonine est susceptible, *in vitro*, d'être O-glycosylé. Tableau 3 : Récapitulatif des glycosyltransférases communes aux voies de biosynthèse des O- et N-glycannes.

ACTIVITE ENZYMATIQUE	E.C.	SUBSTRAT ACCEPTEUR	Commentaires	REFERENCES
GALACTOSAMINYLTRANSFERASES				
UDP-Gal : GlcNAc-Rβ1-4 galactosyltransferase (β4 GalT)	2.4.1.38/90	N-glycanne O- glycanne Glycolipide	Ubiquitaire des tissus, elle est responsable de la biosynthèse des chaînes poly N-acétyl-lactosaminique. Associée à l' α -lactalbumine elle permet de synthétiser le lactose et, <i>in vitro</i> , elle est capable d'utiliser de l'UDP-GalNAc. C'est l'enzyme d'élongation des chaînes O-glycanniques, cette activité a été isolée à la surface des membranes des spermatozoïdes murins et intervient dans la reconnaissance des gamètes.	Shaper et Shaper 1992, Shaper <i>et al</i> 1990, Palcic et Hindsgaul 1991, Do <i>et al</i> 1995
UDP-Gal : GlcNAc-Rβ1-3 galactosyltransferase (β3 GalT)	-	N-glycanne O- glycanne		Sheares et Carlson 1983
GLUCOSAMINYLTRANSFERASES				
UDP-GlcNAc : Gal-R β 1,3 N-acetylglucosaminyltransferase (i β 3 GnT)	2.4.1.149	N-glycanne O- glycanne Glycolipide	Enzyme responsable de la liaison GlcNAc(β 1-3)Gal, substrat de la β 4GalT, permettant de la fabrication du déterminant antigénique i : [Gal(β 1-4)GlcNAc β 1-] _n , enzyme non clonée	Schachter et Brockhausen 1992
UDP-GlcNAc [+/- Galβ1-4] GlcNAc β1-3 Gal-R (GlcNAc sur Gal) β1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (Iβ6GnT I, Iβ6GnT II)			Enzyme de branchement, deux activités différentes suivant la spécificité du substrat, formation de l'antigène I	Brockhausen 1995
I β6 GnT I : GlcNAc(β1-3)Gal	2.4.1.150			Piller et al 1984
I β6 GnT II : Gal(β1-4)GlcNAc(β1- 3)Gal	-			Leppänen <i>et al</i> 1991
FUCOSYLTRANSFERASES				
GDP-Fuc : Gal β -R α 1,2-Fucosyltransferase (α 2FucT)	2.4.1.69		Deux fucosyltransférases qui ont la même spécificité mais sont tissus spécifiques. Issue du gène H ou Se	Le pendu <i>et al</i> 1985, Kelly <i>et al</i> 1994, Oriol 1981
GDP-Fuc : Gal (β 1-4/3)GlcNAc (Fuc sur GlcNAc) α 1,3/4-fucosyltransferase (FucT III)	2.4.1.65		Rare glycosyltransférase qui n'est pas spécifique d'un seul substrat et capable de catalyser plusieurs réactions. Elle est responsable de la formation des épitopes de groupes sanguins Lewis	Preels <i>et al</i> 1981, Tettero <i>et al</i> 1987

4. LES GLYCOSYLTRANSFERASES

4.1.1 INITIATION DE LA BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES

UDP-GalNAc : Polypeptide α 1-3-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase (**Polypeptide GalNAcT**; EC 2.4.1.41)

Cette activité enzymatique a été isolée pour la première fois par McGuire et Roseman (1967) dans le tissus de la glande sous-maxillaire de mouton, puis a été décrite dans le même tissus chez le porc par Wang *et al* (1992). Elle permet, *in vitro*, de catalyser la fixation de GalNAc sur un résidu de thréonine mais est inefficace sur un résidu de sérine.

Polypeptide GalNAcT

UDP-GalNAc + HO-Thr(Ser)-peptide $\frac{Mn^{2+}}{2}$ GalNAc α -O-Thr(Ser)-peptide + UDP

Cette enzyme est la clé de la biosynthèse des chaînes O-glycannique de type mucine. Elle requiert en plus d'ions Mn^{2+} , la présence d'un résidu de proline à proximité du site de glycosylation. Cet élément structural permet une conformation en « β -turn » indispensable dans la reconnaissance par l'enzyme. La structure ainsi formée correspond à l'antigène Tn très fréquemment retrouvé dans de nombreuses mucines. Enfin Sugiura *et al* (1982) ont montré que l'état de glycosylation, la conformation et la taille moléculaire de la protéine modulent l'activité de transfert de cette enzyme.

4.1.2 SYNTHESE DES NOYAUX

La figure 4 représente les voies de biosynthèse des différents noyaux couramment rencontrés dans les O-glycannes



Figure 4 : Schema de biosynthèse des principaux noyaux (selon Brockhausen et Schachter 1997). A) polypeptide GalNAcT, a) core1 β3GalT, b) core2 β6GnT, c) core3 β3GnT, d) core4 β6GnT, e) core6 β6GnT (non clonée), f) ST6O I ou II, g) ST6O I

4.1.2.1 UDP-Gal : GalNAc-R β1,3-Gal-Transferase (corel β3GalT, EC 2.4.1.122)

Cette activité enzymatique, isolée pour la première fois par Schachter *et al* (1971) dans les glandes sous-maxillaire de porc, catalyse la réaction suivante :

Plusieurs études ont montré, d'une part que l'activité enzymatique est inhibée par les ions Zn^{2+} (Cheng et Bona 1982) et, d'autre part, qu'elle est influencée par la nature du substrat et notamment par la structure primaire du peptide ainsi que par les glycosylations présentes

(Granovsky *et al* 1994). Enfin cette activité obéit à la règle des 3 avant 6 et qu'elle est, outre le noyau 1, indispensable à la biosynthèse des noyaux de type 2 et 7. La structure résultante correspond à l'antigène T.

4.1.2.2 UDP-GlcNAc : GalNAc-R β1,3-GlcNAc-transferase (core3 β3GlcNAcT, EC 2.4.1.147)

Cette activité enzymatique a été isolée de nombreuses fois (Brockhausen et al 1985) et catalyse la réaction suivante :

 $\frac{\text{core3 }\beta 3 \text{GlcNAcT}}{\text{UDP-GlcNAc} + \text{GalNAca-O-R}} \frac{\text{Mn}^{2+}}{(c)} \text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{GalNAca-O-R} + \text{UDP}$

Cette enzyme obéit également à la loi Go-No/Go et elle n'a aucune spécificité, *in vitro*, pour la chaîne peptidique puisqu'elle est capable d'utiliser comme substrat le disaccharide Gal $(\beta 1-3)$ GalNAc mais est incapable d'utiliser l'antigène Tn comme substrat. Ce n'est donc pas cette activité qui catalyse la formation du noyau 6. Enfin elle semble être absente des cellules cancéreuses en culture (Vavasseur *et al* 1995).

4.1.2.3 UDP-GlcNAc : GalβI-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc) β1,6-GlcNAc-transferase (core2 β6GnT, EC 2.4.1.102) et UDP-GlcNAc : GlcNAcβI-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc)β1,6-GlcNAc-transferase (core4 β6GnT, EC 2.4.1.148)

Ces enzymes sont responsables de la biosynthèse des noyaux de type 2 et 4 et sont spécifiques des O-glycannes de types mucines, elles catalysent les réactions suivantes :

$$\frac{core2 \,\beta 6 Glc NAc T}{UDP-Glc NAc + Gal(\beta 1-3)Gal NAc \alpha - O-R} \xrightarrow{(b)} Glc NAc(\beta 1-6)[Gal(\beta 1-3)]Gal NAc \alpha - O-R + UDP}$$

 $core4 \ \beta 6 GlcNAcT$ $UDP-GlcNAc + GlcNAc(\beta 1-3)GalNAc\alpha - O-R \qquad \underbrace{(d)} \qquad GlcNAc(\beta 1-6)[GlcNAc(\beta 1-3)]GalNAc\alpha - O-R + UDP$

Ces enzymes sont différentes de celle détaillée dans le paragraphe précédent. La première enzyme utilise, d'une part le noyau 1 comme substrat et, d'autre part, elle est inactive si ce dernier est substitué et enfin son activité est spécifique du tissu et du développement cellulaire (Brockhausen et Schachter 1997). Cette activité est en compétition avec l'activité enzymatique core 4 ß6GnT dans les tissus sécrétant les mucines, cette dernière étant responsable de la formation des noyaux de type 4 à partir du noyau 3 cependant elle est inactive si ce dernier est substitué en 4, sur la GlcNAc terminale, par un résidu galactosyl. Enfin Brockhausen et Schachter (1997) reportent que cette dernière activité est réduite dans un grand nombre de cellules en culture.

5. GLYCOSYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS L'ELONGATION DES NOYAUX

5.1.1 GLYCOSYLTRANSFERASES COMMUNES A LA BIOSYNTHESE DES N- ET O-GLYCANNES

Un certain nombre de GTs sont communes à la biosynthèse des chaînes N- et Oglycanniques. C'est pourquoi, dans une première partie, nous résumerons dans un tableau (Tableau 3) le nom et la spécificité des GT communes aux deux voies de biosynthèse et recommandons aux lecteurs de se référer à l'excellent ouvrage "Glyco-sciences" pour de plus amples renseignements (Gabius et Gabius 1997)

5.1.2 GLYCOSYLTRANSFERASE SPECIFIQUE DES O-GLYCANNES.

```
5.1.2.1 UDP-GlcNAc : Gal(β1-3)(R1-6)GalNAc-R (GlcNAc sur Gal) β1,3-GlcNAc-
transferase (elongation β3GnT, EC 2.4.1.146)
```

Cette enzyme catalyse, *in vitro*, l'élongation sur le résidu de galactose des noyaux 1 et 2 selon la réaction suivante :

elongation $\beta 3GnT$ UDP-GlcNAc + Gal(β 1-3)GalNAc α -O-R $\xrightarrow{Mn^{2+}}$ GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc α -O-R + UDP

La nécessité d'ions Mn^{2+} et la spécificité de substrat font que cette activité enzymatique diffère de l'activité core3GnT. Par ailleurs les résidus GlcNAc des noyaux 2, 3 et 4 sont des substrats de choix pour les enzymes d'élongation β 4GalT et β 3GnT décrites dans le tableau 3.

6. ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DE LA PERIPHERIE DES O-GLYCANNES

Les résidus périphériques sont comme nous l'avons vu précédemment responsables de l'antigénéicité des chaînes glycanniques. La Figure 2 représente toutes les substitutions trouvées dans les chaînes O-glycanniques des mucines. Les substitutions de types sulfatation et/ou sialylation sont notamment importantes puisqu'elles sont étroitement liées au degré de différenciation cellulaire (Brockhausen et Schachter 1992).

6.1.1 LES SIALYLTRANSFERASES

Nous décrirons ici les principales sialyltransférases (STs) responsables des structures les plus couramment trouvées dans les O-glycannes de type mucine. Toutes les STs connues ont de très faibles homologies structurales. Néanmoins elles possèdent toutes une séquence appelée sialyl-motif. Ces STs sont des glycoprotéines membranaires comme toutes les autres glycosyltransférases. La localisation cellulaire de ces activités enzymatiques est exclusivement restreinte aux compartiments *cis-* et *trans-* Golgi. Nous recommandons aux lecteurs la consultation de la revue générale, très complète, sur les sialyltransférases de Harduin-Leppers *et al* (1995).

6.1.1.1 CMP-sialic acid : R1-GalNAc-R α6-sialyltransferase I (**ST60 I**, ST6GalNAc I, EC 2.4.99.3) et CMP-sialic acid : R1-GalNAc-R α6-sialyltransferase II (**ST60 II**, ST6GalNAc II)

Les ST6GalNAc I et II catalysent la réaction suivante :

ST60 I (II)CMP-AS + (R-)GalNAca-O-R - (R-)[AS($\alpha 2-6$)]GalNAca-O-R + CMP

Cette activité ST6 GalNAc I est responsable entre-autres de la formation de l'antigène STn fréquemment retrouvé associé aux mucines d'origine cancéreuse (Yonezawa *et al* 1992). L'action de cette enzyme bloque la chaîne de l'élongation. En effet, la sialylation en α 2-6 inhibe

l'action de nombreuses GTs. Néanmoins le déterminant A.S⁴.(α 2-6)Gal(β 1-3)GalNAc-R peut être le substrat pour l' α 2FT et les GTs responsables des déterminants antigéniques de groupes sanguins A et B. Kurosawa *et al* (1994a,b) ont d'ailleurs montré l'existence de deux isoenzymes ST6GalNAc I et II qui catalysent la même réaction mais qui diffèrent dans leur spécificité de substrat. Il est enfin à souligner que le peptide est nécessaire, pour les deux enzymes, à la reconnaissance du substrat accepteur, et que,de plus, les substrats donneurs peuvent être du CMP-NeuAc ou du CMP-NeuGc.

6.1.1.2 CMP-sialic acid : Galβ1-3 GalNAc-R α3-sialyltransferase (STOI, ST3Gal I, E.C. 2.4.99.4)

Cette activité enzymatique a été purifiée par Sadler *et al* (1979) dans les glandes sous maxilaires de porc, elle catalyse le transfert d'un résidu d'acide sialique en α 2-3 sur le résidu galactosyl des noyaux 1 et 2, comme le montre la réaction suivante :

CMP-AS + Gal(
$$\beta$$
1-3)GalNAc α -O-R
ST30 I
AS(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc α -O-R + CMP

Il existe deux isoenzymes, ST3O I et II cependant la ST3O I est spécifique des Oglycannes alors que la seconde agit préférentiellement sur les glycolipides (Lee *et al* 1994). Enfin il semble que la ST3Gal I soit sur-exprimée dans certains tissus cancéreux (Yang *et al* 1994, Brockhausen *et al* 1995)

6.1.2 GLYCOSYLTRANSFERASES RESPONSABLES DE LA BIOSYNTHESE DES DETERMINANTS DE GROUPES SANGUINS A ET B

Les déterminants de groupe sanguins A et B sont présents sur les chaînes N- et Oglycanniques ainsi que sur les glycosphingolipides.

La structure A correspond au déterminant H substitué en 3 par un résidu d' α -N-acétylgalactosamine sur le résidu galactosyle terminal. La réaction est catalysée par l'UDP-GalNAc : Fuc(α 1-2)Gal-R α 3-N-acétyl-galactosaminyltransférase (E.C. 2.4.1.40).

La structure B est équivalente à la précédente mais la GalNAc est remplacée par un résidu d' α -galactose. La réaction est alors catalysée par l'UDP-Gal : Fuc(α 1-2)Gal-R α 3-galactosyltransférase (E.C. 2.4.1.37).

⁴ A.S. : Acide Sialique, ils représentent une famille de monosaccharides à 9 carbones et possèdent une fonction carboxylique, ils sont essentiellement trouvés en position terminale non réductrice.

Les deux enzymes sont très similaires puisqu'elles reconnaissent le même substrat accepteur et peuvent, *in vitro*, catalyser la réaction sur le disaccharide Fuc(α 1-2)Gal. De plus ces enzymes sont capables, *in vitro*, d'utiliser le substrat donneur de l'autre pour catalyser la réaction de glycosylation (Yates et Watkins 1982, Greenwell 1986). La figure 5 représente la biosynthèse des déterminants antigéniques de groupes sanguins ABH.



Figure 5 : Schéma de biosynthèse des antigènes de groupes sanguins ABH, d'après Kobata (1992)

Ces enzymes (α GalT, α GalNAcT) font parties des rares GTs n'obéissant pas à la loi de Hagopian et Heylar. La particularité de ces deux enzymes tient dans leur structure primaire puisqu'elles ne diffèrent que par 4 acides aminés.

Ces structures A et B sont abondamment retrouvées dans de nombreuses mucines comme les mucines gastriques et sous-maxillaires de porc (van Halbeek *et al* 1981) ou encore dans le mucus oviducal de certaines espèces d'amphibiens et constituent évidemment les structures antigéniques des groupes tissulaires et sanguins ABH (O) humains.

6.1.3 SULFOTRANSFERASE

La sulfatation est courante dans les chaînes O-glycanniques, l'enzyme responsable de cette modification est la sulfotransférase qui utilise le PAPS⁵ comme substrat donneur. D'autre

⁵ PAPS : 3' Phospho-5'-Adenylyl Sulfate (McNaught 1996)

part le taux de sulfatation semble être altéré dans certaines maladies comme le cancer ou dans les affections pulmonaires. Les études de radiomarquage de Hull et Carraway (1989) ont montré que cette activité est localisée dans le même compartiment Golgien que la β 4GalT et qu'elle a toujours lieu avant les sialylations.

7. ROLE DE LA O-GLYCOSYLATION

La O-glycosylation des protéines est un mécanisme post-traductionnel qui termine le processus de maturation des protéines néo-synthétisées. Les O-glycannes sont trouvés dans les organismes de tout le règne animal (des insectes aux mammifères supérieurs) et présentent une extraordinaire hétérogénéité structurale. Les O-glycannes de type mucine ne représentent qu'une partie de cette O-glycosylation et sont associés à l'expression des gènes MUC pour les mucines mais elles sont également retrouvés sur de nombreuses glycoprotéines.

Le rôle des O-glycannes dans les mucines a été partiellement abordé dans le chapitre précédent où nous avons en particulier évoqué celui de barrière protectrice pour les cellules ou des tissus où ils sont localisés.

Le nombre et la nature des monosaccharides varient suivant l'origine et la fonction des Oglycannes. Ainsi, dans les mucines sécrétées, la structure des glycannes est extrêmement variable et propose un grand nombre de déterminants antigéniques reconnaissables par les adhésines bactériennes, les sélectines animales (Crocker et Feizi 1996) ou encore les lectines végétales. Ces O-glycannes permettent alors les interactions cellule-cellule dans les processus de reconnaissance cellulaire intervenant notamment dans les processus d'inflammation.

Il est maintenant bien établi que certaines structures O-glycanniques sont directement reliées aux développements cellulaires (pour revue Dabelsteen 1996) et sont donc des marqueurs du développement. Cette propriété à fort bien été étudiée par Feizi (1985) en utilisant des anticorps monoclonaux. A titre d'exemple, Springer *et al* (1985) ont été les premiers à montrer l'importance des structures antigèniques Tn et T comme marqueurs de la tumorisation des tissus. Présents dans de nombreux adenocarcinomes, ils sont également exprimés lors de l'embryogenèse (Itzkowitz *et al* 1991). Dans les tissus adultes sains, ces épitopes sont masqués soit par les déterminants antigéniques de groupes sanguins par sialylation ou encore par l'élongation des chaînes (Clausen et Hakomori 1989). L'altération de la glycosylation classique permet alors l'expression de ces structures Tn et T. L'implication des déterminants antigéniques de groupes sanguins dans le dépistage des tumeurs est fort bien documentée dans la revue de Dabelsteen (1996).

Enfin, les O-glycannes agissent directement sur la conformation des glycoprotéines sur lesquelles ils sont attachés, et les mucines membranaires, grâce à leur masse moléculaire élevée, protègent et permettent une sélection, par encombrement stérique, des éléments reconnus par les récepteurs membranaires. Les chaînes O-glycanniques des mucines sécrétées confèrent à celles-ci leurs propriétés physico-chimiques.

La connaissance des structures primaire des chaînes O-glycanniques est essentielle dans la compréhension du rôle et des fonctions de celles-ci. Les premières analyses structurales utilisaient des méthodes chimiques qui demandaient une quantité non négligeable de matériel. Depuis quelques dizaines d'années les méthodes physico-chimiques se sont considérablement développées permettant d'appréhender la détermination structurale de manière plus aisée. Les techniques de chromatographie, de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire permettent à l'heure actuelle d'élucider de très nombreuses structures. Dans une dernière partie nous développerons la technique de R.M.N. appliquée aux O-glycannes libres.



R.M.N.



TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	
2. SCHEMA GENERAL D'UNE EXPERIENCE R.M.N.	
3. PRINCIPE DE BASE	
3.1 QU'EST CE QUE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ?	
3.2 QUELS SONT LES NOYAUX CAPABLES DE FOURNIR UNE RESONANCE ?	
3.3 LES ETATS ENERGETIQUES	
3.4 FREQUENCE DE PRECESSION	
3.5 LA RESONANCE	
4. PRINCIPE GENERAL	
4.1 COMMENT MESURER LA FREQUENCE DE PRECESSION ?	
4.2 COMMENT SUPPRIMER LES SIGNAUX INDESIRABLES ?	82
4.3 LES MONOSACCHARIDES	82
4.4 Les conditions de mesure	85
4.5 LES PARAMETRES IMPORTANTS	85
4.5.1 Le déplacement chimique	87
4.5.2 La densité électronique	88
4.5.3 Intensité des signaux	88
4.5.4 La constante de couplage (J)	88
4.5.4.1 Le nombre de protons (figure 7)	
4.5.4.2 Angle entre deux protons	90
4.6 COMMENT APPREHENDER L'INTERPRETATION DES SPECTRES R.M.N. DES O-GLYCANNES ?	
4.6.1 Méthodologie suivie	93
4.7 LES EXPERIENCES R.M.N.	93
4.7.1 Le spectre proton $({}^{4}H)$ à une dimension	
4.7.2 Le spectre ^{13}C à une dimension	95
4.7.3 L'expérience COSY homonucléaire ${}^{I}H{}^{A}H$	96
4.7.4 Expérience hétéromucléaire	96
4.7.4.1 HMQC : Heteronuclear MultiQuantum Coherence	96
4.7.4.2 HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation	97
4.7.5 Les expériences ROESY (Rotating frame Over Hauser Effect SpectroscopY)	
5. ETUDE D'UN EXEMPLE	
5.1 SPECTRE ¹ H DU <i>N</i> -ACETYL-GALACTOSAMINITOL	
5.2 SPECTRE D'UN OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL.	100
5.2.1 Spectre proton 1D de l'oligosaccharide (Figure 14A)	101
5.2.1.1 Identification de l'osaminitol (Figure 14 C, D)	

,

5.2.1.2 Observation de signaux particuliers	
5.2.2 Les expériences COSY ¹ H/ ¹ H	
5.2.3 COSY 1 relais de l'oligosaccharide-alditol	
5.2.4 COSY 2 relais	
5.2.5 Spectre HMQC de l'oligosaccharide-alditol	
5.2.6 Expérience ROESY	
6. CONCLUSION	

1. INTRODUCTION

Ce chapitre a pour but d'expliquer les principes et la méthodologie de la R.M.N. au plus grand nombre. C'est pourquoi de nombreuses simplifications et omissions ont été sciemment faites. Ceci réjouira les néophytes, ne dérangera pas les amateurs, mais scandalisera probablement les spécialistes auxquels nous demandons quelques indulgences

La Résonance Magnétique Nucléaire en milieu liquide est une technique puissante non destructive permettant de déterminer la structure des molécules biologiques et en particulier celle des oligosaccharides.

Elle est basée sur la propriété magnétique de certains atomes (ou noyaux) dont le proton (¹H), le carbone (¹³C) ou encore le phosphore (³¹P). Par conséquent, les oligosaccharides sont particulièrement adaptés à ce type d'expérience. Dans ce chapitre nous aborderons brièvement la théorie de la résonance en prenant le modèle vectoriel comme représentation du noyau. Ce modèle, très accessible pour un grand nombre d'utilisateurs, ne correspond pas tout à fait à la réalité, mais il permet de simplifier considérablement la représentation du principe de R.M.N.. Après une brève description théorique nous tenterons d'expliquer le cheminement d'une analyse structurale par RMN d'un oligosaccharide-alditol.

2. SCHEMA GENERAL D'UNE EXPERIENCE R.M.N.



Figure 1 : Représentation schématique d'une expérience R.M.N.

L'échantillon est placé dans un champ magnétique statique intense (B_0) . Les molécules de cet échantillon sont soumises à un champ magnétique appliqué B_1 qui provoque une perturbation des atomes considérés. L'application de ce champ de radiofréquence (RF) choisie (impulsion ou "pulse") est de courte durée, quelques microsecondes. Les noyaux génèrent à leur tour un micro-champ magnétique qui sera capté par une bobine réceptrice, c'est le signal R.M.N. (Données). Ces données sont envoyées à un ordinateur où elles sont analysées et transformées en signal. Le traitement mathématique, ou transformée de Fourier, permet de transformer le signal en spectre R.M.N..

3. PRINCIPE DE BASE

3.1 QU'EST CE QUE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ?

Certains noyaux sont comparables à de petits aimants, qui soumis à un champ magnétique intense peuvent sous l'action d'un champ de radio fréquence (RF) convenable, absorber une certaine quantité d'énergie : c'est le phénomène de résonance. Il se traduit par le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable.

3.2 QUELS SONT LES NOYAUX CAPABLES DE FOURNIR UNE RESONANCE ?

Tout les noyaux ne présentent pas de résonance, il en existe deux types :

Les noyaux sensibles au champ magnétique externe qui possèdent un spin nucléaire I égal à ½ comme le proton ¹H, le carbone ¹³C, l'azote ¹⁵N ou le fluor ¹⁹F. Ils ont une circulation de charge sphérique, et possèdent deux moments magnétiques.

Les noyaux à spin I supérieur à ½ : le deutérium ²H l'azote ¹⁴N, l'oxygène ¹⁷O ou encore le soufre ³³S ont une circulation de charge non sphérique et possèdent un moment quadrupolaire nucléaire. Tous ces noyaux sont capables de résonner mais dans des conditions différentes.

Les noyaux non sensibles possèdent tous un nombre de masse et un nombre atomique pairs. La parité de ces deux valeurs entraînent un moment magnétique nucléaire unique. Les noyaux de carbone ¹²C ou d'oxygène ¹⁶O possèdent un spin I égal à 0.

3.3 LES ETATS ENERGETIQUES

Soumis à un champ magnétique B_0 , un noyau de spin I non nul peut prendre 2I+1 orientations par rapport à la direction de ce champ.

Pour exemple, le proton (¹H) qui possède un spin nucléaire I = $\frac{1}{2}$ prend 2 orientations, cellesci correspondent au nombre quantique **m** :

m = $\pm \frac{1}{2}$ lorsque le spin nucléaire est dans la même direction que le champ appliqué, il est alors dans un état énergétique favorable α .

m = $-\frac{1}{2}$ lorsque le spin nucléaire à une orientation antiparallèle au champ appliqué. Il est alors dans une position énergétique défavorable β .

L'équation de Boltzman N β /N α = exp (- Δ E/kT) définie le rapport des noyaux dans les deux états d'énergies.



La transition entre deux états demande un apport d'énergie qui est fourni par une radio-fréquence. Le passage d'un état α à un état β est appelé "transition énergétique". L'énergie nécessaire est selon l'équation de Bohr : $\Delta E = (h\gamma B_0)/2\pi = hv_0$ ou h est la constante de Planke, γ le rapport gyromagnétique du noyau excité et B₀ l'intensité du champ magnétique.

3.4 FREQUENCE DE PRECESSION

Le noyau peut être représenté par un vecteur de moment magnétique μ (avec une direction et une intensité). Ce moment magnétique tourne, autour d'un axe dirigé suivant la direction du champ appliqué **B**₀, à la vitesse $\omega_0 = 2\pi v_0$, ou v_0 est la fréquence de Larmor du noyau, elle est également appelée fréquence de précession, celle-ci est fonction du champ **B**₀. ($v_0 = \gamma B_0 / 2\pi$)

Etat énergétique favorable α



3.5 LA RESONANCE

La résonance consiste donc au passage du noyau d'un état énergétique favorable α (suivant la direction B₀) à un état énergétique défavorable β (antiparallèle à B₀). Cette transition est induite par l'application ponctuelle d'un champ magnétique B₁ perpendiculaire à B₀ et de radiofréquence (RF) choisie v_{B1}. Pour avoir résonance du noyau, il faut que la RF appliquée soit égale à la fréquence de précession du noyau :

$$\mathbf{v}_{\mathrm{B1}} = \mathbf{v}_0 = \gamma \mathbf{B}_0 / 2\pi$$

L'arrêt de l'application de la RF va permettre le retour à l'équilibre des noyaux, c'est le phénomène de relaxation (Figure 2).

Condition de résonance :



Figure 2 : Représentation vectorielle de l'application d'une radiofréquence B_1 sur un vecteur moment magnétique μ représentant un spin nucléaire de proton. La résonance est obtenue quand la RF appliquée v_1 est égale à la fréquence de précession du noyau v_0 .

Dans une molécule, comme un oligosaccharide, tous les protons ne sont pas équivalents et par conséquent les fréquences de précession sont différentes. C'est pourquoi la RF B₁ est appliquée avec des fréquences croissantes ce qui permet d'atteindre la résonance pour chaque noyau.

4. PRINCIPE GENERAL

Dans cette partie nous nous intéresserons aux moments magnétiques totaux qui sont définis comme la magnétisation macroscopique, M. Celle-ci représente la somme des moments magnétiques des noyaux parallèles et antiparallèles. La population des noyaux dans un état α étant plus grande que la population β , la magnétisation M est donc orientée suivant la direction du champ B₀.



La <u>magnétisation macroscopique</u> M est, dans un champs intense B0, parallèle à ce dernier, elle est appelée dans ce cas <u>magnétisation longitudinale</u> (Figure 3A). L'application d'une RF dont la composante magnétique (externe) B1 est perpendiculaire au champ B₀ provoque le basculement de cette magnétisation sur un plan *xoy* pour donner la <u>magnétisation transversale</u>, c'est le principe de l'impulsion R.M.N. ou "pulse" (Figure 3B).

L'application de cette radiofréquence choisie sera de courte durée (quelques microsecondes). Les noyaux, dans une énergétique position défavorable, tendent à revenir dans leur position initiale à l'équilibre. La magnétisation transversale va revenir à l'équilibre en oscillant autour de l'axe à la fréquence de précession des noyaux (Figure 3C). Cette fréquence est spécifique de chaque espèce de noyaux et dépend de l'environnement électronique (densité électronique) de ces derniers. A titre d'exemple le galactose possède 8 protons différents par leur environnement et leur position. Ces derniers qui ont chacun leur propre fréquence de précession donnent alors 8 signaux différents

Figure 3 : Représentation schématique de l'application d'une radiofréquence B₁ sur la magnétisation macroscopique.

4.1 COMMENT MESURER LA FREQUENCE DE PRECESSION ?

L'arrêt de l'application de B_1 va permettre à la magnétisation transversale de revenir à sa position initiale le long de l'axe z avec une fréquence de précession spécifique et pendant un certain temps T.

La projection du vecteur de magnétisation sur le plan *xoy* qui correspond à la magnétisation transversale décroît en fonction du temps (Figure 3C). Cette décroissance peut être mesurée et correspond au temps de relaxation transversale T_2 .

De la même manière, la composante Mz représente la magnétisation transversale qui peut être nesurée et elle correspond au temps T₁.



L'oscillation des noyaux provoquent un champ électromagnétique qui est capté par un récepteur situé suivant l'axe y. Le signal obtenu s'appelle une FID¹ ou décroissance d'induction libre (Figure 3D). Ce signal est tout à fait comparable à celui produit par un guitariste qui pince une corde de sa guitare, le son résultant, de fréquence constante, a une intensité qui diminue en fonction du temps.

Ce signal (S = f(t)) n'est pas exploitable en tant que tel, c'est pourquoi il est transformé en une fonction de fréquence. C'est la transformée de Fourier qui permet d'obtenir le spectre connu I = f (Hz).

¹ FID : Free Induction Decay



Figure 4 : La transformée de Fourier permet de transformer la FID totale qui est une fonction du temps S = f(t)en un spectrogramme qui est une fonction de fréquence (Hz). Chaque signal correspond à une fréquence de précession d'un noyau donné.

La FID finale est, en fait, constituée d'une superposition de sinusoïdes amorties, chacune d'elles correspondant à un type de noyau. Il y a donc autant de sinusoïdes que de signaux R.M.N..

4.2 COMMENT SUPPRIMER LES SIGNAUX INDESIRABLES ?

Un monosaccharide comme le galactose possède 12 atomes d'hydrogène chimiquement différents. En effet certains atomes sont chimiquement mobiles, c'est notamment le cas des protons hydroxyls (-OH) et des protons des fonctions aminées (-NH-). Ceux ci sont substitués par des atomes de deutérium (²H) qui, dans les conditions de mesure, ne résonnent pas. Ils sont donc invisibles sur un spectre R.M.N.. Cette opération s'appelle l'échange chimique.

Cette modification consiste à solubiliser l'échantillon anhydre dans un volume de ${}^{2}\text{H}_{2}\text{O}$ (D₂O), de lyophiliser et de solubiliser à nouveau dans le même solvant. Cette opération peut être répétée plusieurs fois si nécessaire. Néanmoins le D₂O n'est pas enrichi à 100% de deutérium si bien qu'il subsiste alors un signal résiduel d'eau visible sur le spectre et noté HOD (HO²H).

4.3 Les monosaccharides

Les monosaccharides peuvent exister sous deux configurations différentes (appelé D ou L) et un grand nombre de conformations (pyranique, furanique etc. ...) (pour revue McNaught 1996). Néanmoins les sucres pyraniques adoptent presque toujours les conformations chaises ${}^{4}C_{1}$ ou ${}^{1}C_{4}$ (Figure 5). C'est cette dernière qui est considérée dans ce travail. La connaissance de la conformation des sucres est essentielle pour pouvoir interpréter un spectre R.M.N.. La majorité des monosaccharides de série D ont une conformation en ${}^{4}C_{1}$ (Tableau 1) qui signifie que le carbone n° 4 du cycle est au dessus du plan formé par l'oxygène du pont hémiacétalique et les carbones C2, C3, C5, et tandis que le carbone 1 est en dessous.

β-D-galactose



Figure 5 Conformation en chaise ${}^{4}C_{1}$ du β -D-galactose. Les protons axiaux (en rouge) sont parallèles entre-eux. Seul le proton H4 est en position équatoriale, il est alors parallèle au plan du cycle (en grisé).

Dans ce type de conformères, il existe 3 types de protons :

- Les protons axiaux parallèles entre-eux (H 1, 2, 3, 5)
- Les protons équatoriaux (H 4)
- Is a set of the se

Les molécules O-glycanniques sont généralement isolées sous forme réduite. La *N*acétyl-galactosamine en position terminale réductrice sera donc sous forme d'osaminitol non cyclique. Certains de ses protons ont des fréquences de résonances particulières, caractéristiques et parfaitement identifiables.

Tableau 1 : Représentation des principaux monosaccharides rencontrés dans les O-glycannes de type mucines.Les structures sont présentées après échange au deutérium, les protons indiqués en rouge sont observables sur unspectre. R : groupements N-acétyl (NeuAc), N-glycolyl (NeuGc), OH (Kdn)



4.4 LES CONDITIONS DE MESURE

Les programmes d'impulsions qui permettent d'obtenir un signal sont courts, de l'ordre de la seconde. De ce fait les expériences sont répétées un certains nombre de fois et les FID accumulées avant de procéder à la transformée de Fourier. Le rapport signal sur bruit (S/B) est alors amélioré. En effet S/B est proportionel à \sqrt{N} (où N est le nombre d'accumulations).

Les expériences R.M.N. doivent être, en règle générale, réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques. En effet les différents paramètres sont variables suivant la température et le pH des solutions. Etant donné que la R.M.N. peut nécessiter une étude comparative il convient de réaliser les expériences à température et pH constants, ce principe permettant alors de se référer aux banques de données des déplacements chimiques qui seront définis par la suite.

4.5 LES PARAMETRES IMPORTANTS

Chaque signal R.M.N. est caractérisé par plusieurs grandeurs qui sont caractéristiques de chaque noyau considéré. Ces paramètres donnent des informations sur le proton et son environnement. La détermination de la structure primaire des oligosaccharides repose sur les différents critères que sont :

- Le déplacement chimique exprimé en ppm (partie par millions) ou parfois en Hz
- La constante de couplage dont la grandeur est exprimée en Hertz
- L'intensité du signal



Constante de couplage

Figure 6 : Représentation schématique des paramètres R.M.N. contribuant à l'analyse de la structure primaire des oligosaccharides (D'après van Halbeek 1995).

Ces paramètres peuvent être complétés par d'autres :

- Les effets nOe² qui sont dues aux interactions dipolaires entre deux noyaux différents et voisins dans l'espace et dont l'intensité de corrélation est inversement proportionnelle à R⁶ (ou R représente la distance interatomique entre les deux noyaux donnant l'effet nOe). Ce paramètre est essentiel dans les analyses conformationnelles des oligosaccharides. Ce paramètre n'a pas de valeur numérique mais une valeur informationnelle.
- Le temps de relaxation longitudinal T1 (exprimé en secondes) qui décrit la cinétique de retour des noyaux à l'équilibre après une impulsion.
- Le temps de relaxation transversale T2 (en seconde) décrit le taux de décroissance de la magnétisation transversale.

Pour les molécules de petite taille, comme les oligosaccharide-alditols, T1 et T2 sont similaires. Les macromolécules de type polysaccharide ont des temps T1 entre 0.1 et 1 seconde alors que T2 est inférieur à 0.1s.

Ces deux paramètres ont leur importance dans l'établissement des séquences d'impulsions R.M.N. mais ne sont pas nécessaires dans l'interprétation des spectres.

² nOe : nuclear Overhauser enhancement

4.5.1 LE DEPLACEMENT CHIMIQUE

Cette valeur définie (δ) la position du signal sur l'axe des fréquences (axe x du spectre), la valeur sera mesurée par rapport au signal référence par la relation suivante :

$$\delta = \frac{v - v_{ref}}{v_0} \times 10^6$$

 v_{ref} correspond au déplacement chimique des protons du T.M.S.³ (Tétra Méthyl Silane) Ces protons ont la particularité d'être dans un environnement dont la densité électronique est la plus forte. La fréquence de résonance est calculée pour un rapport gyromagnétique $\gamma_{H} =$ 26.752 x 10⁷ rad T⁻¹ s⁻¹ et avec l'intensité (en Tesla) du champ magnétique B₀ de l'appareil utilisé. Par exemple dans un champ B₀ de 9.4 T la fréquence de résonance des protons du T.M.S. se trouve à $v_{ref} = \gamma_{H} x B_0 / 2\pi = (26.752 \ 10^7 x \ 9.4) / 2\pi = 400.22$ MHz. Par définition le déplacement chimique $\delta_{T.M.S.} = 0$ ppm.

 v_0 : Radiofréquence de l'appareil R.M.N..

v : correspond à la fréquence de résonance du signal observé.

Les fréquences v, v_0 et v_{ref} sont très grandes (MHz) c'est pourquoi δ est exprimé en ppm.

L'échelle des spectres pour l'étude des O-glycannes se situent entre 0 et 7 ppm soit pour un appareil de 400MHz, de 0 à 3200Hz. Cette valeur de déplacement chimique exprime l'environnement direct du noyau considéré. Si un noyau se trouve dans un environnement où la densité électronique est très forte (il est dit "blindé") comme c'est le cas pour les protons méthyliques (R-CH₃), le déplacement chimique est alors faible. Par contre, si la densité électronique est moins intense comme pour les protons anomères, le déplacement chimique sera plus grand (le proton est "déblindé"). Ce paramètre est à la base des "structural reporter groups" qui fournissent une carte d'identité pour chaque oligosaccharides. (Vliegenthart *et al* 1983, Kamerling *et al* 1992)

³ T.M.S. : (CH₃)₄Si

4.5.2 LA DENSITE ELECTRONIQUE

La densité électronique est responsable du « blindage » ou du « déblindage » des atomes observés. Pour évaluer la densité électronique il faut prendre en compte les propriétés électro-attractives ou électro-répulsives des atomes et des groupements chimiques (sulfate, phosphate etc. ...). Le caractère électro-attractif des groupements chimiques provoque un "déblindage" des atomes observés, *a contrario* un groupement électro-répulseur induit un blindage par augmentation de la densité électronique autour des noyaux observés.

Cette notion est également importante puisqu'au plus un proton est « blindé » plus la radiofréquence B_1 nécessaire à faire basculer la magnétisation transversale sera élevée et inversement. Sur un spectre R.M.N. cela se traduit par deux zones, une zone dite des hauts champs magnétiques et l'autre des bas champs magnétiques.



De ce principe, chaque proton d'un monosaccharide aura son propre déplacement chimique, avec comme exception les protons chimiquement identiques qui possèdent dans ce cas strictement le même déplacement chimique. Néanmoins l'intensité du signal observé sera proportionnelle au nombre de protons qui résonnent à la même fréquence.

4.5.3 INTENSITE DES SIGNAUX

Les protons chimiquement identiques ont la même fréquence de précession (ou fréquence de résonance) et ont de ce fait le même déplacement chimique. L'intensité du signal considéré sera directement proportionnelle au nombre de protons impliqués dans ce signal. L'intégration du signal par rapport à un signal de référence permet alors de déterminer le nombre de protons. Cette propriété quantitative de l'expérience R.M.N. permet d'analyser le cas échéant un mélange d'oligosaccharides.

4.5.4 LA CONSTANTE DE COUPLAGE (J)

Cette entité est fondamentale dans la détermination structurale et conformationelle des molécules. Cette valeur prend en considération deux éléments :

- E Le nombre de noyaux voisins, c'est à dire les noyaux couplés au noyau observé.
- L'angle qui existe entre les deux noyaux considérés, la valeur de cet angle est importante puisqu'elle détermine la largeur du signal observé.

Il existe plusieurs types de constantes de couplage dont la nomenclature est la suivante :

 ${}^{X}J_{Y,Z}$: X représente le nombre de liaisons covalentes entre le noyau observé et le noyau voisin, Y et Z représentent les deux noyaux pris en compte. Ils peuvent être identiques (H,H) ou différents (C,H).

La constante de couplage homonucléaire :

 $\label{eq:generalized_state} {}^{1}\textbf{H}: {}^{2}J_{H,H}: \text{ constante de couplage géminale} \\ {}^{3}J_{H,H}: \text{ constante de couplage vicinale (ex: COSY)} \\ {}^{13}\textbf{C}: {}^{1}J_{C,C} \\ {}^{2}J_{C,C}: \text{ constante de couplage longue distance} \\ {}^{3}J_{C,C}: \text{ constante de couplage longue distance} \\ \end{array}$

La constante de couplage hétéronucléaire :

 $\label{eq:constant} {}^{13}\text{C}: {}^{13}\text{C}_{,H}: \text{HMQC}$ ${}^{2}\text{J}_{C,H}: \text{constante de couplage faible}$ ${}^{3}\text{J}_{C,H}: \text{constante de couplage longue distance type HMBC}$

 $rac{n}{J}$ ou $n \ge 4$, couplage longue distance.

4.5.4.1 Le nombre de protons (figure 7)

Il est important de considérer le nombre de protons voisins, en effet le nombre de raies spectrales d'un proton est égale à 2^n où n est le nombre de protons couplés au proton observé. L'intensité relative de ces raies, lorsque les constantes de couplage sont identiques, est donnée par le triangle de Pascal.

1	aucun couplage, singulet
1 1	1 noyau couplé, 2 raies d'intensité 1 : 1, doublet
1 2 1	2 noyaux couplés, 3 raies d'intensité 1 : 2 : 1, triplet
1 3 3 1	3 noyaux couplés, 4 raies d'intensité $1:3:3:1$, quadruplet
1 4 6 4 1	etc
1 5 10 10 5 1	



Figure 7. Représentation des différentes constantes de couplages vicinaux $({}^{3}J_{H,H})$ du galactose telles qu'elles peuvent être représentées sur un spectre 2D type COSY.

4.5.4.2 Angle entre deux protons

La relation entre la valeur en Hertz de la constante de couplage et l'angle dihédral (Φ) que font deux protons portés par des carbones voisins peut être schématisée par la relation de Karplus :


Cette propriété permet de déterminer l'anomérie des sucres et leur nature. En effet, chaque monosaccharide est caractérisé par son schéma de constante de couplage vicinal comme cela est indiqué dans le tableau 2.



Figure 8 : Représentation de l'angle dihédral (Φ) entre les protons H1 et H2 des deux anomères du galactose

Ainsi pour les conformations et configurations classiques, les anomères α présentent en règle générale une petite constante de couplage (J < 5Hz) et les anomères β une grande constante de couplage 5 Hz <J > 12Hz.

			·	Stéréochimie des résidus aldopyranosiques								
J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	Configuration	Conformation	Exemples de résidus						
G	G	G	G	β-gluco	⁴ C ₁	β-D-Glc, β-D-GlcNAc, β-D-Qui						
G	G	G	Ρ	α-ido	¹ C ₄	(α-D-Idose)						
G	G	P	Ğ	stéréochimie impossible								
Ğ	G	P	Ρ	β-galacto	${}^{4}C_{1}({}^{1}C_{4})$	β-D-Gal, β-D-GalNAc, (β-L-Fuc), β-D-Fuc						
				α-altro	¹ C ₄	(α-D-Altrose)						
-G-	P	Ğ	Ē	stéréochimie impossible								
Ğ	P	Ğ	P	stéréochimie impossible								
Ğ	- P	P	Ğ	β-allo	⁴ C ₁	(β-D-Allose)						
Ğ	P	P	P	β-gulo		(β-D-Gulose)						
- P -	G	G	G	α-gluco	*C1	α-D-Glc, α-D-GlcNAc, α-D-Qui						
- P-	G	G	P	β-ido	TC₄	(β-D-ldose)						
- P-	G	P	Ğ	stéréochimie impossible								
P	G	P	P	α-galacto	${}^{4}C_{1}({}^{1}C_{4})$	α -D-Gal, α -D-GalNAc, (α -L-Fuc), α -D-Fuc						
- <u></u> P	P	Ğ	G	α-manno	${}^{4}C_{1}({}^{T}C_{4})$	α-D-Man, α-D-ManNAc, (α-L-Rha)						
				β- <i>m</i> anno	⁴ C ₁	β-D-Man, β-D-ManNAc						
- <u></u> -	P	G	P	α-gulo	^T C ₄	(α-D-Gulose)						
P	P	P	G	α et β -altro, α -allo	⁴ C ₁	(α or β -D-Altrose, α -D-Allose)						
- <u>-</u> -	P	P	P	α et β - <i>ido</i> , α - <i>gulo</i>	4C1	(α et β-D-Idose)						
				α-gulo		(α-D-Gulose)						
				α et β - <i>talo</i>	*C1	(α et β-D-Talose)						

Tableau 2: Récapitulatif de toutes les constantes de couplage ${}^{3}J_{H,H}$ possibles des résidus aldopyranosyles. Les symboles G et P représentent respectivement des constantes de couplage vicinals ${}^{3}J_{H,H}$ grandes (>5 Hz) et petites (< 5Hz). (Koerner *et al* 1987). Les résidus les plus fréquemment rencontrés dans les oligosaccharide-alditols isolés à partir de mucines sont en caractères gras.

4.6 COMMENT APPREHENDER L'INTERPRETATION DES SPECTRES R.M.N. DES O-GLYCANNES ?

La lecture des spectres R.M.N. est facilitée par la connaissance de l'origine et de la méthode de séparation du produit analysé. Les O-glycannes de type mucine sont généralement isolés à l'état d'oligosaccharide-alditols ; c'est pourquoi nous considérerons par la suite que tous les oligosaccharides le sont.

Les indications apportées par les méthodes d'isolements (résines échangeurs d'ions, HPLC etc. ...) permettent d'orienter la recherche d'éléments structuraux caractéristiques des molécules acides ou neutres. La réduction des O-glycannes après β -élimination indique que ces oligosaccharides possèdent tous un résidu de *N*-acétyl-galactosaminitol. Toutefois il arrive que certaines molécules aient subit une dégradation récurrente avec ou sans réduction. Les produits obtenus possèdent alors un résidu de galactitol ou sont caractérisés par la présence d'un héxène-tétrol (dégradation par oxydation du *N*-acétyl-galactosaminitol), ce dernier composé est très facilement identifiable à la vue de la résonance très particulière de ses protons éthyléniques aux environs de 6 ppm.

4.6.1 METHODOLOGIE SUIVIE

La réalisation d'un spectre proton à une dimension est systématique. Elle permet de connaître plusieurs paramètres. Deux cas peuvent se présenter :

La molécule a déjà été isolée et, dans ce cas, les déplacements chimiques de ses protons sont strictement identiques à ceux déjà publiés. L'analyse est alors terminée.

La molécule est nouvelle, la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides et les liaisons. Dans ce cas les analyses R.M.N. doivent être approfondies par la réalisation d'expériences à deux dimensions. Les expériences COSY homo- et hétéronucléaire et ROESY permettent, dans la majorité des cas, d'identifier la nature des monosaccharides de l'oligosaccharide et d'élucider la structure primaire de ce dernier.

4.7 LES EXPERIENCES R.M.N.

4.7.1 LE SPECTRE PROTON $({}^{4}H)$ A UNE DIMENSION

Ce type d'expérience apporte de nombreux renseignements à l'interprétation :

- La valeur des déplacements chimiques de chaque proton identifiable
- E Le nombre de résidus monosaccharidiques (nombre de protons anomères)
- La présence ou non d'acide sialique (présence des protons H3 axial et équatorial)
- Le nombre d'osamines (nombre de raies correspondants aux groupements acétamides)
- Le nombre de résidus de fucose (nombre de doublets caractéristiques dans les hauts champs (1.1 < δppm -CH₃ <1.3)</p>
- Accessoirement, l'état de pureté de la molécule (intensité relative des signaux)

Le spectre à une dimension peut être scindé en trois régions distinctes, comme l'indique la figure suivante :



Figure 9 : Ce schéma, très général, est valable pour tout O-glycanne de type mucine.

La région des protons anomères est importante (comprise entre 6 à ~ 4.5 ppm), elle permet de déterminer le nombre de résidus monosaccharidiques qui constituent l'oligosaccharide. Les constantes de couplage peuvent être mesurées discriminant l'anomérie α ou β des sucres.

La "bulk region" (~ 3.6 à 3.2 ppm) renferment de nombreux protons qui possèdent une fréquence de résonance proche ce qui rend leur distinction très difficile. Mais les protons portés par des carbones impliqués dans une liaison O-glycosidique sont très souvent déblindés, ils peuvent alors glissés vers les bas champs. Par conséquent ils peuvent être distingués.

Enfin la région comprise entre 1 et 3 ppm correspond à différents protons qui apportent de nombreuses indications (présence des protons équatorial et axial des acides sialiques, protons acétamides des osamines, etc. ...).

A titre d'exemple, la figure 10 représente un spectre 1D d'un oligosaccharide-alditol, l'emplacement des protons y est caractéristique.



Figure 10 : Spectre proton d'un oligosaccharide-alditol réalisé à 400 MHz et à 300°K. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à une référence interne : les protons de l'acétone résonnent à 2.225 ppm.

4.7.2 LE SPECTRE ¹³C A UNE DIMENSION

Comme nous avons pu l'indiquer précédemment, le ¹³C possède un moment magnétique nucléaire et il est donc possible de réaliser les expériences R.M.N.. L'abondance naturel de cet isotope est de 1/100 par rapport au ¹²C, et de ce fait les expériences seront plus longues. De la même manière, les déplacements chimiques seront caractéristiques de la position du carbone dans la molécule. En effet, ceux ci dépendent également de la densité électronique autour du carbone observé.

La fenêtre spectrale de l'observation des carbones se situent entre 0 et 120 ppm. Ainsi les carbones anomères se situent entre 90 et 110 ppm, les autres carbones résonnant entre 50 et 90 ppm. Les signaux des carbones des groupes methylènes (R-CH₂-R) sont observés aux environs des 60-70 ppm et les carbones méthyliques (R-CH₃) aux environs de 30 ppm. Une différence de $\Delta \delta = \pm 10$ ppm est significative d'une substitution sur le carbone observé.

A titre indicatif, la référence utilisée pour obtenir les conditions de résonance du carbone ¹³C est également le T.M.S.. Le rapport gyromagnétique des carbones de cette référence est $\gamma_{13C} = 6.7283$ 107 rad T⁻¹ s⁻¹. Ce rapport est le quart de celui du proton, la radio-

fréquence, dans un champ magnétique identique au proton, utilisée pour faire basculer la magnétisation est égale au ¹/₄ de celle utilisée pour le proton.

Par exemple, dans un champ de 9.4 T la résonance du ¹³C est obtenue pour : $v = 6.72 \ 10^7 \ X$ 9.4 / $2\pi \sim 100 MHz$.

4.7.3 L'EXPERIENCE $COSY^4$ HOMONUCLEAIRE ${}^{1}H/{}^{1}H$

Le COSY 90 permet d'obtenir des informations importantes. Cette expérience permet de corréler les protons qui sont couplés scalairement, en d'autres termes celle-ci permet de transférer la magnétisation d'un proton sur un proton voisin et permet donc de visualiser les constante de couplage ³J entre 2 protons. Il existe plusieurs expériences COSY :

COSY 90 : Il y a transfert de magnétisation entre le proton H1 et H2

- COSY R1 : COSY un relais, la magnétisation est transférée du H1 à H3 via H2
- COSY R2 : La magnétisation va jusqu'au proton H4

Il existe également le COSY R3 et le TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY où COSY multirelayé). Cette dernière expérience permet de transférer la magnétisation sur la totalité des protons d'un monosaccharide. Néanmoins la visualisation des constantes de couplage y est beaucoup moins aisée.

Les expériences COSY sont fondamentales puisqu'elles permettent de mesurer toutes les constantes de couplage (J) entre les différents protons et donc de déterminer la nature du monosaccharide (Tableau 2). Cette expérience permet, en plus, de déterminer les déplacements chimiques des protons qui résonnent dans la "bulk region".

4.7.4 EXPERIENCE HETERONUCLEAIRE

4.7.4.1 HMQC : Heteronuclear MultiQuantum Coherence

Cette expérience R.M.N. permet de corréler chaque proton au carbone sur lequel il est attaché. La finalité de cette expérience est indissociable de l'expérience COSY multi-relayée. Celle-ci a permis d'identifier et de déterminer le déplacement de la majorité des protons de la molécule, le report de ces valeurs sur le spectre HMQC permet d'identifier les carbones correspondants et d'en déterminer leur déplacement chimique. La connaissance des déplacements chimiques des carbones permettent de déterminer la substitution par

⁴ COSY : acronyme de COrrelation SpectroscopY

l'observation d'un « déblindage» des carbones, $\pm 5 < \Delta \delta < \pm 10$ ppm. Il est à noter que certaines variations sont plus ou moins importantes et apportent des informations quant à la nature des liaisons et substitutions diverses.

4.7.4.2 HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

Cette expérience permet d'obtenir les corrélations et les couplages ³J entre un proton et le carbone voisin. Ces informations sont d'autant plus importantes qu'elles permettent de déterminer la séquence de l'oligosacccharide. En effet les couplages ³J permettent de corréler les noyaux distants de trois liaisons covalentes, il est donc observé, pour un monosaccharide, les corrélations suivantes :

 ${}^{3}J_{H1,C3}$, ${}^{3}J_{H1,C5}$, ${}^{3}J_{H2,C4}$, ${}^{3}J_{H3,C5}$, ${}^{3}J_{H3,C1}$, ${}^{3}J_{H4,C2}$, ${}^{3}J_{H4,C6}$, ${}^{3}J_{H5,C3}$, ${}^{3}J_{H5C1}$ mais surtout ${}^{3}J_{H1,CX}$ où X est la position du carbone du monosaccharide inclus dans la liaison O-glycosidique.



Figure 11 : Schéma représentant les corrélations ³J_{H,C} (en rouge) carbone/proton observées à partir du proton H1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison O-glycosidique.

Ce type d'expérience permet ainsi d'établir les sites de liaisons entre les monosaccharides ou des groupements exocycliques, effectivement la magnétisation peut être également transférée au travers d'un hétéroatome.

4.7.5 Les experiences ROESY (ROTATING FRAME OVER HAUSER EFFECT SPECTROSCOPY)

Ce type d'expérience permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus 5 Å. Les corrélations peuvent être d'origine intra- ou inter-résidus. Il est évident que les intéractions inter-résidus sont plus intéressantes puisqu'elles permettent de conforter la séquence primaire de l'oligosaccharide-alditol.



Figure 12 : Représentation d'une corrélation dipolaire visible entre deux protons dans une expérience ROESY Cette expérience associée à l'HMQC peut se substituer à l'expérience HMBC.

5. ETUDE D'UN EXEMPLE

5.1 Spectre ¹H du *N*-acetyl-galactosaminitol

Cet osaminitol est le point commun de tout O-glycanne de type mucine isolé par β élimination en milieu réducteur. Il semble donc intéressant d'identifier les signaux caractéristiques de cet alcool. Certains de ses protons sont effectivement parfaitement identifiables dans de très nombreux spectres. Ils reflètent alors la nature du noyau (core) de l'oligosaccharide-alditol. (Tableau 3)





Figure 13 : Spectre RMN ¹H du N-acétyl-galactosaminitol. Le signal des protons du groupement N-acétyl n'est pas indiqué dans le spectre, il résonne à 2.055 ppm.

Tous les protons des monosaccharides ont des déplacements chimiques variables suivant la nature du noyau ("core") de l'oligosaccharide. Les monosaccharides du noyaux (core) sont d'ailleurs ceux qui sont le plus affectés. Les protons H2 et H5 sont plus déblindés que les autres protons et "sortent" du massif (où "bulk region"). Ils sont, par conséquent, plus facilement identifiables. La comparaison des déplacements chimiques avec les banques de données permet souvent de déterminer la nature de la substitution

Les protons H-3 et H-4 représentés par 2 quadruplets identiques peuvent ainsi être aisément distinguables, en effet le proton H-3 est déblindé et résonne aux environs de 3.8, 4 ppm alors que le proton H-4 résonne aux environs de 3.3, 3.7 ppm. L'identification de ces protons et la valeur de leur déplacements chimiques respectifs, ajoutés aux protons H-2 et H-5, sont très souvent suffisants pour élucider le type de noyau de l'oligosaccharide-alditol.

		\$ol	∎ ^{¢—oi}	>	≻ol	• Cho-ol	*	≻ol	¢ ^{¢-ol}	•
			noyau 1	noya	au 2	noyau 3	noy	au 4	noyau 5	noyau 6
GalNAc-ol	H-2	4.252	4.395	4.3	95	4.287	4.2	280	4.395	4.242
	H-3	3.850	4.065	4.0)61	3.996	3.9	984	3.888	3.841
	H-4	3.390	3.507	3.4	68	3.546	3.5	519	3.680	3.379
	H-5	3.928	4.196	4.281		4.141	4.230		3.749	4.021
	H-6	3.668	3.69	3.9	31	3.65	3.905		3.647	3.933
	H-6'	3.647	3.628	n.	d.	n.d.	n.d.		3.647	n.d.
	NAc	2.055	2.050	2.0)66	2.037	2.044		2.049	2.046
Autres			βGal	βGal	βGlcNAc	βGlcNAc	βGlcNAc	βGlcNAc	βGalNA	βGlcNAc
residus	H-1	_	4 478	4 468	4,538	4.604	4.600	4.543	c 5.103	4.553
	H-2	-	3.564	3.542	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.235	n.d.
	H-3	-	3.671	n.d.	n.d.	3.584	n.d.	n.d.	3.921	n.d.
	H-4	-	3.901	3.901 n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	4.043	n.d.
	H-5	-	n.d.	n.d. n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	4.073	n.d.
	H-6	-	n.d.	n.d.	3.932	3.950	3.949	3.931	n.d.	3.928
	H-6'	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NAc	-	-	-	2.066	2.085	2.081	2.063	2.060	2.059

Tableau 3 : Table des déplacements chimiques des protons des noyaux 1 à 6 (D'après Kamerling et Vliegenthart 1992)

ŧ

5.2 SPECTRE D'UN OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL

L'oligosaccharide a été isolé par β -élimination réductive d'une mucine. La méthodologie d'isolement et de purification est la suivante :

Mélange total des oligosaccharide-alditols \Leftrightarrow Chromatographie d'échange anionique \Leftrightarrow Discrimination des isomères par CLHP ⁵.

Les renseignements apportés par les méthodes d'isolement indiquent que cet oligosaccharide-alditol est acide et de petite taille (Chromatographie de retard sur gel de silice).

⁵ CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance





Figure 14 : Spectre proton de l'oligosaccharide réalisé à 400 MHz et à 27°C. Les parties expliquées dans le texte sont agrandies

5.2.1.1 Identification de l'osaminitol (Figure 14 C, D)

La présence de pseudo-hexuplés (octuplets) aux déplacements chimiques 4.388 et 4.145 ppm correspondant respectivement aux protons H-2 et H-5 et la présence d'un signal acétamide à 2.044 ppm indique la présence de *N*-acétyl-galactosaminitol (Figure 14 C, D).

Combien y-a t'il de résidus monosaccharidiques ?

L'observation de 3 protons anomères (A,B,C) aux déplacements respectifs $\delta A = 5.286$, $\delta B = 4.710$ et $\delta C = 4.598$ ppm, indique la présence de 3 résidus monosaccharidiques (Figure 14B), les constantes de couplage ³J_{H1,H-2} peuvent être mesurées :

	${}^{3}J_{H1,H2}(Hz)$	
résidu A	P⁶ (3.4)	anomère α
résidu B	G (7.8)	anomère β
résidu C	G (7.8)	anomère β

L'oligosaccharide est donc constitué de 3 résidus monosaccharidiques et d'un résidus de Nacétyl-galactosaminitol.

5.2.1.2 Observation de signaux particuliers

- La présence d'un doublet (Figure 14D) à 1.242 ppm indique qu'il existe un monosaccharide possédant un groupement méthyle (R-CH₃). Cette observation avec la présence d'un résidu d'anomérie α semble indiquer qu'il existe un résidu de fucose.
- L'observation d'un seul signal acétamide indique qu'il n'existe pas de N-acétylhexosamine autre que la N-acétyl-galactosamine réduite (Figure 14D).
- L'absence de signaux (entre 2 et 3 ppm) correspondants à des protons axial et équatorial indique que l'oligosaccharide-alditol acide isolé ne possède pas d'acide sialique. La charge est donc portée par un autre groupement acide.
- L'observation totale du spectre permet d'indiquer que cet oligosaccharide n'est pas contaminé par un autre (Figure 14A).
- L'intégration des raies de protons anomères (Figure 14B) permet de donner l'équimolarité des monosaccharides en proportion 1 : 1 : 1. L'intégration des groupements methyle et acetamide donne 3 : 3 (3 protons équivalents). Il n'existe donc qu'un seul désoxy-sucre et une seule osamine (Figure 14D).

 $^{^{6}}$ P ou G signifient des constantes de couplage $^{3}J_{H,H}$ Petites ou Grandes.

Pour des raisons didactiques nous admettons que la comparaison des déplacements chimiques avec la littérature et les banques de données ne donne pas d'indications sur la structure de l'oligosaccharide-alditols. Il faut donc poursuivre les investigations par des expériences à deux dimensions.

5.2.2 Les experiences $COSY^{1}H^{/1}H$

Comment s'effectue la lecture d'un COSY?





La diagonale du spectre (Figure 15) représente le spectre 1D proton classique. L'expérience COSY va permettre de corréler les protons H1-H2 ; H2-H3 et H3-H4 (Certaines corrélations seront déterminées par les expériences TOCSY).

En partant du proton H1 le proton H2 est déterminé. La projection de ce signal (ou tache de corrélation) sur la diagonale permet de déterminer la corrélation H2-H3. L'identification et la projection sur la diagonale du proton H3 permet d'identifier le proton H4 et ainsi de suite. A noter que le spectre est parfaitement symétrique.



Figure 16 : Spectre COSY 90 de l'oligosaccharide-alditol, le résidu A est codifié en rouge, le B en bleu, le C en noir et l'osaminitol en vert

Cette expérience permet d'une part d'identifier les protons H2 des résidus A, B et C et d'en déterminer les constantes de couplages respectives. D'autre part cette expérience permet de corréler les signaux H2 et H-5 de l'osaminitol avec leurs protons voisins.

Il est important de souligner qu'au plus la résolution⁷ est importante plus la valeur des constantes de couplage est précise.

Mesure des constantes de couplage ³J_{H2,H3} :

	$^{3}J_{\mathrm{H1,H2}}(\mathrm{Hz})$	³ J _{H2,H3} (Hz)
résidu A	P (3.4)	G (> 5Hz)
résidu B	G (7.8)	G (> 5Hz)
résidu C	G (7.8)	G (> 5Hz)

La consultation du tableau 2 permet déjà de discriminer un certains nombre d'aldopyranoses mais n'est pas suffisante pour désigner les monosaccharides B et C. En outre le monosaccharide A qui possède les constantes de couplage ${}^{3}J_{H1,H-2}(\mathbf{P})$ et ${}^{3}J_{H2,H3}(\mathbf{G})$ est un résidu de fucose. En effet le tableau 2 indique que ces 2 constantes (P et G) sont attribuables à 8 résidus aldopyranoses différents, cependant la présence d'un désoxy-sucre représenté par la présence d'un doublet à $\delta = 1.242$ ppm et l'absence de groupement acétamide montre formellement que le résidu A est un α -Fucose.

A ce stade de l'expérimentation nous pouvons affirmer que le composé possède un osaminitol et un résidu de fucose. Bien que le COSY 90 puisse nous donner, dans ce cas, les autres constantes de couplage nous allons poursuivre l'investigation R.M.N. par une expérience COSY 1 relais.

⁷ Qu'est ce que la résolution : La taille informatique d'un spectre est donnée en nombre de points. Le point représente l'échantillonnage du signal. Ainsi une FID peut être formée de 512 points, 1024, 2048 etc. ... Ainsi une FID de 2048 points permet d'obtenir un résolution spectrale 4 fois plus grande qu'une FID de 512 points cependant le temps d'accumulation sera 4 fois plus important. La résolution standard d'un spectre COSY est de 2048 points en F2 et 512 points en F1.





Figure 17 : Spectre COSY 1 relais, même codification que pour le COSY 90. Expérience réalisée à 27°C et à 400 MHz, résolution 2048 (F2) X 512 (F1) pts.

Les protons H-2 identifiés, les protons H-3 peuvent donc l'être très facilement. Les corrélations H2-H3 et constantes de couplages sont parfaitement lisibles sur le spectre.

Mesure des constantes de couplage :

	${}^{3}J_{\mathrm{H1,H2}}$	³ J _{H2,H3}	³ J _{H3,H4}
Fucose	Р	G	P (<5z)
résidu B	G	G	P (<5z)
résidu C	G	G	P (<5z)

La consultation du tableau 2 permet dès maintenant de déterminer la nature des monosaccharides B et C. En effet, la combinaison des éléments apportés par le spectre 1D et les constantes de couplages mesurées (B : GGP, C : GGP) montrent sans ambiguïté que les résidus aldopyranosiques B et C correspondent à 2 résidus galactosyls. L'absence de groupement acétamide surnuméraire permet d'éliminer la présence de N-acétyl-galactosamine.

De plus l'observation fine des signaux H3 des galactosyles B et C indique qu'ils ont des déplacements chimiques franchement différents. Le proton H3-B est anormalement déblindé ($\delta = 4.326$ ppm) comparé au H3-C ($\delta = 3.988$ ppm). Cette indication permet de penser qu'il existe une substitution à ce niveau par un groupement particulièrement électroattracteur. 5.2.4 COSY 2 RELAIS



Figure 18 : Spectre COSY 2 relais effectué à 400MHz et à 27°C.

De la même manière, le spectre COSY 2 relais (figure 18) permet, connaissant la position des protons H2 et H3, d'identifier les protons H-4 de tout les résidus. La mesure des constantes de couplages donne les résultats suivants :

	³ J _{H1,H2}	³ J _{H2,H3}	³ J _{H3,H4}	³ J _{H4,H5}
Fucose	Р	G	Р	P (<5Hz)
Galactose	G	G	Р	P (<5Hz)
Galactose	G	G	Р	P (<5Hz)

Les expériences précédentes ont permis de déterminer le nombre et la nature des monosaccharides, les déplacements chimiques de leurs protons. Ces indications permettent maintenant la lecture d'un spectre hétéronucléaire de type HMQC.



5.2.5 Spectre HMQC de l'Oligosaccharide-alditol

Figure 19 : Spectre hétéronucléaire ¹³C / ¹H de l'oligosaccharide-alditol permettant de déterminer les corrélations entre les protons des résidus et leurs carbones correspondants.

Le spectre de la figure 19 représente la partie du spectre la plus intéressante où sont représentées toutes les corrélations carbone-proton qui ont un intérêt dans la détermination de la structure primaire de l'oligosaccharide.

Le report des déplacements chimiques des protons (donnés par le spectre COSY 2 relais, figure 18) permettent d'identifier chaque carbone correspondant. L'observation de singulet, de doublets et de triplets permettent de discriminer les protons H2, H3 et H4 des résidus galactosyles.

Quelles sont les informations apportées ?

Le déplacement chimique des carbones

La position des substitutions

L'observation des carbones C3 du Gal B, C2 et C4 du Gal C montre que les déplacements chimiques, comparés à ceux de la littérature, ont des valeurs qui correspondent à des carbones fortement déblindés. Ils traduisent ainsi une substitution sur ces carbones.

De la même manière les déplacements chimiques du carbone C3 et C5 du GalNAc-ol indique que ce dernier possèdent un noyau de type 1 : Gal(β1-3)GalNAc-ol.

Les carbones du résidu fucosyle indiquent que ce monosaccharide est en position terminale non réductrice et qu'il n'est donc pas substitué. Le spectre HMQC apporte donc les informations suivantes :

Le ßGal B est donc substitué en 3

Le ßGal C est substitué en 2 et 4

Le GalNAc-ol est substitué en 3

Le fucose est en position terminale non réductrice et il n'est pas substitué

L'oligosaccharide possède un noyau de type 1

Il reste à ce niveau à positionner les résidus galactosyles et fucosyle sachant que le β Gal lié sur le GalNAc-ol peut être le résidu B ou C et qu'il peut être substitué en 2, 3 et/ou 4. La solution est apportée dans ce cas par une expérience ROESY.

5.2.6 EXPERIENCE ROESY



Figure 20 : Spectre ROESY de l'oligosaccharide-alditol réalisé à 400 MHz et à 27°C.

Connaissant tout les déplacements chimiques des protons il est maintenant très aisé de déterminer les corrélations spatiales entre certains protons. Le spectre de la figure 20 indique donc :

- Qu'il existe une corrélation entre le proton H1 du βGalC avec le H3 du GalNAc-ol, le Gal C est donc lié en C-3 sur le N-acétyl-galactosaminitol confirmant par ailleurs la présence d'un noyau de type 1.
- Que le proton H1 du fucose avec les protons H2 et H3 du Gal C, le fucose peut donc être lié en 2 ou 3 sur le Gal C. Comme l'HMQC nous a indiqué que le Gal C est substitué en 2 et 4 ; le résidu de fucose est donc lié en C-2 sur le βGal C.
- Et enfin, que le H1 du Gal B est corrélé avec le H4 du Gal C. Le galactose B est donc lié en 4 sur le Gal C.

A ce niveau la séquence est maintenant parfaitement connue :

$$3 \begin{array}{c} 0 \\ B \\ Gal(\beta 1-4) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ A \end{array} \right|_{A} \begin{array}{c} 0 \\ GalNAc-ol \\ GalNAc-ol \\ A \end{array}$$

Seule la substitution du galactose B reste inconnue. La méthodologie d'isolement et le spectre 1D ¹H nous indiquent que ce composé est acide et qu'il n'existe pas d'acide sialique. La charge est donc assurée par un groupement sulfate. En effet la charge ne peut pas être un groupement phosphate étant donné qu'il n'est pas observé de couplage fort Phosphore-Proton ${}^{2}J_{H,P}$. Cette substitution peut d'ailleurs être confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF⁸). La séquence primaire complète de l'oligosaccharide-alditol est donc la suivante.

$$\begin{array}{c} & \text{ol} \\ & \text{Gal}(\beta 1-4) \text{ Gal}(\beta 1-3) \\ \text{HSO}_3^{-}(3) \xrightarrow{7} \text{Fuc}(\alpha 1-2) \\ & \text{A} \end{array}$$

⁸ MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

6. CONCLUSION

Comme nous avons pu le voir, la R.M.N. est un outil particulièrement intéressant dans l'analyse structurale des oligosaccharide-alditols puisque ceux ci sont constitués majoritairement d'atomes possédant une résonance . Cette technique est puissante par le fait qu'elle est suffisante pour une détermination complète de la composition et de la structure de ces molécules biologiques. Bien que non destructive cette technique a ses limites. En effet les expériences, et notamment les expériences d'observation du carbone ¹³C, demandent une quantité non négligeable de matériel qui n'est pas toujours disponible. Néanmoins la mise au point de bobines inductrices de champs magnétiques de plus en plus puissants (jusqu'à 1 GHz) et de séquences d'impulsions de plus en plus complexes permettent d'augmenter la sensibilité de cette technique.

La R.M.N. est une technique complémentaire de la spectrométrie de masse (et vice et versa). Leur combinaison permet très souvent d'obtenir les résultats souhaités.

Enfin ce chapitre a été élaboré à partir de revues générales. Nous conseillons vivement aux lecteurs la consultation de ces ouvrages pour de plus amples informations.

Références

Benn R. and Günther H. (1983) Modern pulse Methods in High-Resolution NMR Spectroscopy, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 22, 350-380

Bria M. and Watkin P. (1997) La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions ou l'aide à la détermination structurale des molécules organiques, Act. Chim., 2, 24-35

Derome A. E., Modern NMR techniques in hight resolution NMR, Pergamon Press, 1987

Kamerling J. F. and Vliegenthart J. F. G. (1992) In : *Biological Magnetic Resonance* (Berliner, L. J. and Reben J. Eds), Plenum Press, New-York and London, vol 10, pp 1-287

Koerner T.A.W., Prestegard J.H. and Yu R. K. (1987) Oligosaccharide structure by two-dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Methods in Enzymology*, **138**, 38-59 Sanders J.K.M. and Hunter B.K., Modern NMR spectroscopy. A guide for chemists, Oxford University Press, 1994

Strecker G. (1993) Analyse structurale des chaînes glycanniques, Biofutur, Juillet-Aout, 46-52

van Halbeek H., N.M.R. spectroscopy of Carbohydrates, Analytical Glycobiology 3rd International Symposium, San Diego, CA, 1995.

van Halbeek H., 500-MHz 1H-NMR spectroscopy as a tool in the structural analysis of the carbohydrate chains of glycoproteins, *Thesis of Utrecht University*, 1982.

van de Ven FJ.M. The basics of multi-dimensional NMR in liquids, VCH Publisher, 1992

Vliegenthart J. F. G., Dorland L. and van Halbeek H. (1983) High-resolution, ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins, *Adv. Carbohydr. Biochem.*,vol. 41

MATERIELS ET METHODES



primaires

Figure 1 : Protocole expérimental utilisé pour les travaux d'isolements et de caractérisation des oligosaccharide-alditols à partir de la mucine totale des gangues ovulaires. Pour une explication plus exhaustive de la méthodologie de séparation et d'isolement des glycoconjugués nous conseillons aux lecteurs la consultation de l'ouvrage : "Methods on glycoconjugates" (Verbert *et al* 1995)

RESULTATS ET DISCUSSIONS



Ambystoma tigrinum

1. INTRODUCTION

La première espèce étudiée est *Ambystoma tigrinum*, qui appartient à l'ordre des Urodeles et à la famille des Amphiumidae. Cette espèce est apparentée à l'espèce *Pleurodeles waltl* précédemment étudiée par Strecker *et al* (1992).

Ce travail a consisté à isoler les oligosaccharides acides, sous forme réduite, des sécrétions oviducales de cet animal. Ces sécrétions très abondantes sont constituées en grande partie de mucines et sont aisément accessibles puisqu'elles constituent les gangues ovulaires des œufs. Ce matériel est lyophilisé puis directement soumis à une β -élimination en milieu réducteur. Les produits obtenus sont ensuite fractionnés selon la méthodologie décrite dans la figure 1.

Cette procédure expérimentale a permis d'isoler 11 structures oligosaccharidiques acides qui sont décrites dans ce premier chapitre. Les structures primaires ont été élucidées essentiellement sur la base des données de la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) à une dimension et par la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gaz (GC-MS).

Primary structure of acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of *Ambystoma tigrinum*

Occurrence of oligosaccharides

with fucosyl(α 1-5)[fucosyl(α 1-4)]-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid and fucosyl (α 1-2) galactosyl (α 1-3)-N-acetylgalactosamine sequences

Emmanuel MAES, Yves PLANCKE, Florence DELPLACE and Gérard STRECKER

Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, France

(Received 4 January/24 February 1995) - EJB 95 0010/5

Eleven O-glycosidic carbohydrate units derived from the jelly coat of Ambystoma tigrinum were analyzed by ¹H-NMR spectroscopy. As previously shown for four other amphibian species, the glycans display a remarkable species specificity. As a characteristic feature, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn) was found difucosylated at C4 and C5, and α -Gal attached to C3 of GalNAc-ol. The most representative carbohydrate units are:



Keywords. Oligosaccharide structure; Ambystoma tigrinum; egg jelly coat; 'H-NMR.

Amphibian eggs are surrounded by a transparent extracellular matrix which is mainly composed of mucin-type glycoproteins. Its functions include recognition of homologous species, capacitation of the sperm, induction of the acrosome reaction and prevention of polyspermy [1-4]. It also retains Ca^{2+} ions and maintains the concentration necessary for successful fertilization [5, 6].

In previous communications [6-10], the structures of the Oglycosidic carbohydrate units of four different amphibian species were studied. A series of oligosaccharide-alditols containing N-acetylneuraminic acid (NeuAc) or 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn) was characterized which displays remarkable species specificity. Moreover, the abundance of the material and the similarities of their carbohydrate chains with those of some rare human carbohydrate determinant (such as Lewis Y) led us to investigate new amphibian species.

Correspondence to G. Strecker, Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille. F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. COSY, correlation spectroscopy: GalNAc-ol, N-acetylgalactosaminitol; Kdn, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid.

3.9

1.9

taken as 1. The	molar reponse of Kdn w	as taken as that	of NeuA	.c.					ше	calcul	aleu w	iin Gai	NAC (or Gair	NAC-0
Sugar	Amount in		Amount in HPLC fraction												
	crude jelly coat		3	6	7a	7b	8	9	10	15	16	18	19	20	21
	%	mol/mol													
GalNAc-ol	-		-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gal	8.9	1.4	1.0	1.1	0.9	1.0	0.9	0.9	1.4	1.6	1.9	1.9	2.5	1.9	1.1

1.6

1.1

1.7

19

1. Carbohydrate composition of crude jelly coat and oligosaccharide-alditols. Molar ratio are calculated Ac-ol)

0.9

1.1

2.0

1.1

1.9

1.0

1.9

1.1

Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)



Fig. 1. HPLC separation of oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coat of Ambystoma tigrinum.

In the present study, we compare the structure of oligosaccharide-alditols released from Ambystoma tigrinum egg jellies, with those isolated from Ambystoma maculatum and Axolotl mexicanum.

MATERIALS AND METHODS

GlcNAc

GalNAc

Total

Fuc

Man

Glc

Kdn

3.8

8.9

10.2

0.5

0.4 3.4

35.9

0.4

2.3

1.0

< 0.1

< 0.1

1.0

Isolation of oligosaccharide-alditols. Eggs from Ambystoma tigrinum were obtained from Charles D. Sullivan Co. (Nashville, TE). The jelly coat was lyophilized and the dry material (1 g) was submitted to alkaline reductive β -elimination in 50 mM NaOH containing 1 M NaBH₄ (300 ml) at 45 °C for 24 h. The reaction was stopped by Dowex 50×8 (mesh 25-50; H⁺ form). The filtrate was concentrated under vacuum and boric acid removed by co-distillation with methanol.

Acidic oligosaccharides were adsorbed on Dowex 1×2 (mesh 200-400; HCOO⁻ form) and then eluted with 100 mM pyridine acetate pH 6.0. The oligosaccharides were further fractionated by HPLC on a primary amine bonded silica (Supelcosyl® LC-NH₂, 4.6 mm×25 cm; Supelco Inc., Bellefonte USA), using a solution of acetonitrile/30 mM KH₂PO₄ pH 5.2, at a flow rate of 1 ml/min. After an isocratic elution (70:30; 1 h) the concentration of buffer was increased up to 40% during 1 h. Oligosaccharide-alditols were detected by absorbance at 206 nm.

Table 2. Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated oligosaccharide-alditols. A plus (+) indicates the compound was present but not quantified.

0.7

1.3

1.2

_

0.9

2.0

1.1

0.9

2.9

1.0

1.2

3.4

1.2

0.9

3.5

0.4

1.0

0.3

1.7

1.0

Methyl ether	Amount in oligosaccharide- alditol							
	7a	7Ъ	9	16	18			
1,4,5,6-Me₄-GalN(Me)Ac-ol	+	+	+		~			
2,3,4,6-Me₄-Gal	1.0	-	1.0	1.0°	1.0*			
2,3,4-Me ₃ -Fuc	0.7	1.6	1.7	1.6	2.4			
3,4,6-Me3-Gal		1.0	_	1.0	1.1			
3,6-Me ₂ -GlcNAc	-	-	-	0.8	0.7			
6-Me-Glc-NAc					-			
3,6-anh-1,4,5-Me3-GalN(Me)Ac-ol	-	-	-	+	+			
3,5,6,7,8,9-Me ₆ -Kdn-ol	+	-		+	_			
3,6,7,8,9-Me₅-Kdn-ol		+	+		+			

* The presence of permethyl galactose results from the hydrolysis of the Kdn unit (see Materials and Methods). The O3 substitution of Gal was confirmed by NMR analysis.

Analytical procedures. Carbohydrate composition was determined according to Zanetta et al. [11] and methylation analysis was achieved according to Fournet et al. [12]. Before methylation, oligosaccharide-alditols were partially hydrolyzed with acetic acid (pH 2; 30 min; 80°C), and then treated with NaBD₄ in order to reduce the Kdn unit. After permethylation, the material was submitted to a methanolysis (CH₃OH/0.5 M HCl; 20 h; 80°C) and N- and O-acetylated before analysis by mass spectrometry. 'H-NMR experiments were performed on a Bruker ASX 400 WB spectrometer. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4'-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ in D₂O at 25 °C). The two-dimensional homonuclear COSY with simple and double relay transfer was performed using Bruker standard pulse sequences.

RESULTS

The oligosaccharide-alditols released after treatment with 1 M NaBH, 0.05 M NaOH were fractionated into neutral and acidic fractions by anion-exchange chromatography. The acidic compounds were eluted from the resin with 100 mM pyridine acetate and fractionated into 21 peaks on primary amine bonded silica (Fig. 1). Fractions 3, 4, 10 and 15 were mixtures too complex to be investigated by NMR. Fraction 7 was submitted to a

Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)



Fig. 2. ¹H-NMR spectra of oligosaccharide-alditols (16) and (18).

second chromatography, using acetonitrile/30 mM KH_2PO_4 pH 5.2 (75:25), which provided subfractions 7a and 7b. The carbohydrate composition of crude jelly coat and fractions analysed below is reported in Table 1; the results of the methylation analysis are given in Table 2.

¹H-NMR analysis of oligosaccharide-alditols

Structures of the GlcNAc(β 1-6)[Gal(β 1-3)]GalNAc-ol core type (core type 2). Structure (16) consists of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc, Fuc and Kdn in a ratio 1/2/1/2/1 (Table 1). The 'H-NMR spectrum (Fig. 2) indicates the presence of core type 2 as shown by the H2 and H5 signals of GalNAc-ol at δ = 4.390 and δ = 4.271, respectively [13]. The sequence Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) is deduced from the chemical shifts of the structural reporter groups relative to Fuc, Gal and GlcNAc (Table 3), which match those of oligosaccharide-alditols described previously [13]. The Gal(β 1-3) unit is O3-substituted with sialic acid (actually Kdn) as shown by its H1 and H3 resonating at δ = 4.528 and δ = 4.091, respectively [14]. The H1 resonance of the second fucose (δ = 5.150) is similar to that observed in the sequence Fuc(α 1-4)Kdn [8]. Moreover, the methylation of compound (16) gives 4-mono-O-acetyl-2,5,6,7,8,9-hexa-O- methyl Kdn-ol, proving this element of sequence (Fig. 7). The structure of (16) is therefore:

Fuc(
$$\alpha$$
1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)
GalNAc-ol.
Fuc(α 1-4)Kdn(α 2-3)Gal(β 1-3)

Structure (18) consists of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc, Fuc and Kdn in a ratio 1/2/1/3/1 (Table 1). Its 1H-NMR spectrum (Fig. 2 and Table 3) shows the presence of an additional Fuc residue (δ H1 = 5.512), whereas the other resonances are quite similar to those observed for compound (16). Particulary, the structural reporter groups of the sequences $Fuc(\alpha 1-2)Gal(\beta 1-$ 4)GlcNAc(β 1-6) and Kdn(α 2-3)Gal(β 1-3), as well as the H2, H3 and H5 resonances of GalNAc-ol [13], match those of the preceding structure. The methylation analysis of the compound gives 4,5-di-O-acetyl-2,6,7,8,9-penta-O-methyl Kdn-ol, demonstrating its O4 and O5 substitution (Fig. 7). The comparison of NMR parameters relative to Kdn H3_{ax} and H3_{eq} in compounds (16) and (18) shows that the disubstitution of Kdn results in a downfield shift of these resonances: +0.076 ppm for H3_{ax}, +0.064 ppm for H3_{eq}. Consequently, the new Fuc H1 resonance observed at $\delta = 5.512$ can be assigned to a Fuc(a1-5) unit. The H5 resonance of the Fuc(α 1-5) unit was observed at $\delta = 4.08$

Table 3. 'H-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (16), (18), (19B), (20A) and (20B) containing core type 2. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \diamond -ol = GalNAc-ol; $\blacktriangle = Kdn$; $\blacksquare = \beta Gal$; $\boxtimes = \alpha Gal$; $\square = Fuc$; $\diamond = GalNAc$ and $\bullet = GlcNAc$. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows: 6_{\backslash} and n.d. = not determined.

547

Residue	Reporter	Chemical shifts of				
		16	18, 19A	19B	20A	20B
		ppm				
GaINAc-ol	H2 H3 H4 H5 H6' NAc	4.390 4.068 3.438 4.271 n.d. 2.061	4.392 4.07 3.444 4.272 n.d. 2.063	4.390 4.064 3.423 4.273 n.d. 2.064	4.390 4.064 n.d. 4.256 n.d. 2.062	4.390 4.064 n.d. 4.256 n.d. 2.062
Galβ1-3	H1 H2 H3 H4	4.528 3.601 4.091 3.929	4.529 3.605 4.08 3.932	4.527 3.601 4.082 n.d.	4.526 n.d. 4.081 n.d.	4.526 n.d. 4.081 n.d.
Gal\$1-4	H1	4.535	4.535	4.446	4.498	4.595
GlcNAcβ1-6	H1 H5 • H6 NAc	4.535 3.468 3.986 2.066	4.535 3.465 3.989 2.067	4.556 n.d. n.d. 2.055	4,54 n.d. n.d. 2.055	4.526 n.d. n.d. 2.062
Fuca1-2	H1 H5 H6	5.308 4.225 1.230	5.308 4.225 1.228	- - -	5.279 4.25 1.268	5.348 4.315 1.244
Fuca1-3	H1 H5 H6	- - -		5.105 4.834 1.171	5.093 4.873 1.232	
Fuca1-4	H1 H5 H6	5.150 4.180 1.247	5.140 4.210 1.246	5.139 4.210 1.244	5.139 4.210 1.244	5.139 4.210 1.244
Fuca1-5	H1 H5 H6		5.512 4.08 1.206	5.511 4.080 1.206	5.510 4.08 1.204	5.510 4.08 1.204
Kdna2-3	H3 _{ax} H3 _{eq}	1.885 2.821	1.961 2.885	1.961 2.885	1.959 2.884	1.959 2.884
GalNAca1-3	H1 H2 H5 NAc		-		-	5.175 4.239 4.217 2.037

which, on a COSY spectrum, clearly indicated the correlation peak between the H5 and H6 signals (not shown). These results provide the structure:

Fuc(
$$\alpha$$
1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)
Fuc(α 1-5)
Kdn(α 2-3)Gal(β 1-3)
Fuc(α 1-4)

Fraction 19 consists of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc, Fuc and Kdn in a ratio 1/2/1/3/1. As shown in Fig. 3 and Table 3, the fraction contains two compounds, one of them (19A) being the oligosaccharide-alditol (18). The second (19B) is characterized

by atom resonances relative to Fuc(α 1-3) (δ H1 = 5.105; δ H5 = 4.834; δ H6 = 1.171), GlcNAc(β 1-6) (δ H1 = 4.556) and Gal(β 1-4) (δ H1 = 4.446) which can be ascribed to the sequence Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6) [13]. The second branch of the molecule is common to that described for compound (18) (Table 3). Thus, the structure proposed for (19B) is:

Fuc(
$$\alpha$$
1-3)
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)
Fuc(α 1-5)
Fuc(α 1-5)
Fuc(α 1-4)

Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)



Fig. 3. ¹H-NMR spectra of oligosaccharide-alditols (19A), (19B), (20A) and (20B).

Structures (20A) and (20B). Fraction 20 is heterogeneous, as shown by the 'H-NMR spectrum (Fig. 3 and Table 3) which contains six α -anomeric signals in the ratio 1/0.4/0.6/0.3/1.1/0.6. Two different oligosaccharide-alditols were characterized on the basis of the following observations. The two H1 resonances at $\delta = 5.510$ and $\delta = 5.139$, as well the H3_{ax} and H3_{eq} resonances at $\delta = 1.959$ and $\delta = 2.884$ are characteristic of the sequence Fuc(α 1-5)[Fuc(α 1-4)]Kdn(α 2-3)Gal, previously described for the oligosaccharide-alditols (18) and (19B). Their intensity clearly indicates that they are common to the two structures. The signals observed at $\delta = 5.279$ and $\delta = 5.093$ are significant of Fuc(α 1-2) and Fuc(α 1-3) involved in the Lewis Y determinant [15]. Their H6 atom resonances at $\delta = 1.268$ and $\delta = 1.232$ are quite similar to those ascribed for reference models. The characteristic value of Gal(β 1-4) H1 resonance, at $\delta = 4.498$, confirms the presence of Lewis Y determinant. Therefore, the structure of (20A) is:

Fuc(
$$\alpha$$
1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)
Fuc(α 1-3)
Fuc(α 1-5)
Fuc(α 1-4)
GalNAc-ol.

The second oligosaccharide-alditol is characterized by the presence of resonances at $\delta = 5.348$ and $\delta = 5.175$ which have been found to correspond to the anomeric protons of Fuc(α 1-2) and GalNAc(α 1-3) of blood-group A determinant [16]. The resonance of Gal(β 1-4), observed at $\delta = 4.595$, confirms the establishment of this structure. Thus, the structure proposed for (20 B) is:

Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)



Fig. 4. ¹H-NMR spectra of oligosaccharide-alditols (8) and (7b).



Fig. 5. 'H-NMR spectrum of oligosaccharide-alditol (21).



Structures of the Gal(β 1-3) GalNAc-ol core type (core type 1). Structure(8) consists of GalNAc-ol, Gal, Fuc and Kdn in a ratio 1/1/2/1 (Table 1). The nature of the core is clearly indicated by the GalNAc-ol H2, H5 and H6' resonances (Fig. 4 and Table 4). The sequence of the neutral branch, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3), can be established on the basis of the H1 resonances of Fuc(α 1-2)

and Gal(β 1-3) [16]. The H1 resonance at $\delta = 5.142$ has been already ascribed for the sequence Fuc(α 1-4)Kdn(α 2-6) present in the carbohydrate chains released from *Axolotl mexicanum* mucin [8]. Therefore, the structure of compound (8) was established to be:

Fuc(
$$\alpha$$
1-4)Kdn(α 2-6)
Gal(β 1-3)
Fuc(α 1-2)

Structure (21) consists of GalNAc-ol, Gal, Fuc and Kdn in a ratio 1/1/4/2. The nature of the core can be easily deduced from the typical set of the H2, H3, H5 and H6' atom resonances of the GalNAc-ol residue (Fig. 5 and Table 4). The presence of
Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)

Residue	Reporter group	Chemical shifts of				
			hifts of d d d d d d d d d d			
		8	6B	21		
		ppm				
GalNAc-ol	H2 H3 H4 H5 H6' NAc	4.380 4.080 3.547 4.208 3.462 2.037	4.392 4.066 3.494 4.188 n.d. 2.045	4.381 4.056 3.522 4.236 3.436 2.037		
Galβ1-3	H1 H2 H3	4.587 n.d. n.d	4.542 n.d. 4.080	4.539 3.603 4.082		
	H5 H4	n.d.	n.d.	3.93		
Fuca1-2	H1 H5 H6	5.265 4.271 1.236		- - -		
Fuca1-4	H1 H5 H6	5.142 4.161 1.236	5.140 4.214 1.244	5.137*/5.127* 4.211*/4.175* 1.242*/1.230*		
Fuca1-5	H1 H5 H6	- -	5.509 4.080 1.208	5.508 4.080 1.205		
Kdna2-3	H3 H3	-	1.967 2.881	1.964 2.878		
Kdna2-6	H3 H3	1.769 2.774	-	1.826 2.833		

Table 4. 'H-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (8), (6B) and (21) containing core type 1. The symbolic notation is as in Table 3.

* Fuc attached to Kdn (α2-3).

^b Fuc attached to Kdn (α 2-6).

Kdn α -2,3 and α -2,6-linked to Gal and GalNAc-ol, respectively, is indicated by the presence of two H3_{ax} and H3_{eq} resonances. The anomeric protons of the Fuc residues possess similar chemical shifts to those assigned for Fuc(α 1-4) and Fuc(α 1-5) of compounds (18), (19) and (20). On the basis of these observations, the structure of oligosaccharide-alditol (21) was established to be:



Fraction 6 (Fig. 6 and Table 4) exhibits four signals relative to Kdn H3_{ax} and H3_{eq} resonances. Nevertheless, the structure of the major component was established on the basis of the following observations. The H1 resonances observed at $\delta =$ 5.140 and $\delta = 5.509$ are known to correspond to the sequence Fuc(α 1-5)[Fuc(α 1-4)]Kdn sequence. The Kdn residue is α -2,3linked to Gal, as shown by its characteristic H3_{ax} and H3_{eq} resonances. The H3 and H5 resonances of GalNAc-ol are significant of the Gal(β 1-3)GalNAc-ol core and the value observed for the Gal H1 resonance, at $\delta = 4.542$, confirms this sequence. Therefore, the major component of the fraction 6 is:



The structure of the second major component is identical to that of oligosaccharide-alditol (7a) (see below).

Structures of the Gal(α 1-3)GalNAc-ol core type. Structure (7a) (Fig. 6 and Table 5) consists of GalNAc-ol, Gal, Fuc and Kdn in a ratio 1/1/1/1. The chemical shifts of Kdn H3_{ax}, H3_{eq} as well as the GalNAc-ol H6' are significant of the presence of Kdn α -2,6-linked to GalNAc-ol. The attachment of Fuc to Kdn is also confirmed by comparison of their NMR parameters with those of compound (8). The Gal residue is α -1,3-linked to GalNAc-ol, AS shown by its small ${}^{3}J_{1,2}$ coupling constant and the typical set of GalNAc-ol H2, H3 and H5 resonances which has been previously precisely defined [17]. The structure of compound (7a) is therefore:

Fuc(
$$\alpha$$
1-4)Kdn(α 2-6)
GalNAc-ol.
Gal(α 1-3)

Structure (7b) contains one additional Fuc residue ($\delta = 5.287$) attached to the α -Gal residue (Fig. 4 and Table 5). A two-

Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)



Fig. 6. 'H-NMR spectra of oligosaccharide-alditols (7a), (9) and (6).

step relayed COSY spectrum (not shown) allows the determination of the chemical shift of α Gal H2, H3 and H4 resonances and, in particular, shows that the H2 signal is downfield shifted at $\delta = 3.975$. Such an observation is compatible with the Osubstitution of the α Gal residue, that was confirmed by methylation analysis, which furnishes 3,4,6-tri-O-methyl-galactose. Structure (7b) is therefore:



Structure (9) is an extension of (7a) with α -1,5-linked Fuc to Kdn (Fig. 6 and Table 5). It is evident from the chemical



Maes et al. (Eur. J. Biochem. 230)

Fig. 7. Mass spectra of 2,5,6,7,8,9-hexa-O-methyl Kdn-ol (a) and 2,6,7,8,9-penta-O-methyl Kdn-ol (b), resulting from the methylation analysis of compounds (16) and (18) respectively.

Residue	Reporter group	Chemical shifts in				
		7a	7b	9		
		ppm				
GalNAc-ol	H2 H3 H4 H5 H6' NAc	4.367 4.037 n.d. 4.106 3.506 2.037	4.419 n.d. n.d. 3.993 3.486 2.029	4.367 4.080 n.d. 4.105 3.495 2.037		
Galα1-3	H1 H2 H3 H4 H5	5.147 n.d. n.d. 4.022 4.053	5.154 3.975 4.110 4.023 4.102	5.153 n.d. n.d. 4.023 4.053		
Fuca1-2	H1 H5 H6	- - -	5.287 4.068 1.242			
Fuca1-4	H1 H5 H6	5.141 4.158 1.236	5.144 4.159 1.242	5.131 4.177 1.233		
Fuca1-5	H1 H5 H6		- - -	5.507 4.080 1.205		
Kdna2-6	H3 _{ax} H3 _{aq}	1.781 2.785	1.786 2.779	1.873 2.839		

Table 5. 'H-NMR chemical shifts of the oligosaccharides (7a), (7b) and (9). The symbolic notation is explained in Table 3.



Ambystoma tigrinum

Fig. 8. Recapitulative scheme of oligosaccharide-alditols found in 100 mM fraction released from the Ambystoma tigrinum egg jelly coat.

shifts of Fuc⁵ H1, H6 signals, and the downfield shift of Kdn $H3_{ax}$ and $H3_{eq}$ induced by its disubstitution (see [8, 21]). Structure (9) is therefore:



DISCUSSION

The present work confirms that the carbohydrate chains released from the mucins which constitute the amphibian egg jelly coats are highly species-specific [6-10]. The most significant structures which have been characterized in *A. tigrinum* mucin are reported in Fig. 7. Kdn, which has previously been isolated from fish glycoproteins [18], is the specific sialic acid of several amphibian mucins, but toads such as Bufo japonicus japonicus [6] and Bufo bufo (personal result) are characterized by the exclusive presence of NeuAc. The carbohydrate chains of A. tigrinum jelly coat possess H, Lex, Ley and A determinants, which have already been found in other amphibian species [6, 7], but the typical features of this species are the occurrence of the core Gal(α 1-3)GalNAc-ol, and the presence of disubstituted Kdn. The sequence $Fuc(\alpha 1-3)Fuc(\alpha 1-4)Kdn$ has been found in Ambystoma mexicanum mucin [8], and the species A. maculatum is characterized by the sequence $Fuc(\alpha 1-2)[Fuc(\alpha 1-3)]Fuc(\alpha 1-4)Kdn(\alpha 2-1)]$ 3/6) (unpublished results). These data point to the diversity of novel fucosyltransferase activities which remain to be studied with regard to animal evolution. The core type $Gal(\alpha 1-3)Gal$ -NAc-ol was first characterized in rat-brain glycoproteins [19] and isolated from human bronchial mucins [17].

The implication of jelly coat glycoproteins in the fertilization process has recently been reviewed [1, 6]. We can now indicate another aspect of our investigations, which concerns the availability of the amphibian jelly coat material for providing new sources of carbohydrates of biological interest. The mucin of *Pleurodeles waltl* contains essentially the Lewis^y determinant [7] whereas that of *A. maculatum* is characterized by the presence of the sequence GalNAc(β 1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc [9], which has been characterized in *Schistosoma mansoni* [20] and human glycoproteins [21]. In conclusion, our results reveal the diversity of carbohydrate chains which can be easily fractionated from amphibian mucin and may aid future biochemical studies concerning carbohydrate-mediated egg-sperm interactions.

REFERENCES

- Jego, P., Joly, J. & Boisseau, C. (1980) Amphibian jelly envelope proteins secreted by the oviduct and surrounding the eggs: their role in fertilization, *Reprod. Nutr. Dev.* 20, 557-567.
- Freeman, S. B. (1968) A study of the jelly envelopes surrounding the egg of the amphibian Xenopus laevis, Biol. Bull. 135, 501-513.
- Wyrick, R. E., Nishihara, T. & Hedrick, J. L. (1974) Agglutination of jelly coat and cortical granule components and the block to polyspermy in the amphibian Xenopus laevis, Proc. Natl Acad. Sci. USA 71, 2067-2071.
- Hedrick, J. L. & Katagari, C. (1980) Bufo japonicus japonicus and Xenopus laevis laevis egg jellies contain structurally related antigens and cortical granule lectin ligands, J. Exp. Zool. 245, 78-85.
- Ishihara, K., Hosono, J., Kanatari, H. & Katagari, C. (1984) Toad egg-jelly as a source of divalent cations essential for fertilization, *Dev. Biol.* 105, 435-442.
- Shimoda, Y., Kitajima, K., Inoue, S. & Inoue, Y. (1994) Isolation, structural determination, and calcium binding properties of the major glycoprotein present in *Bufo japonicus japonicus* egg jelly, *Eur. J. Biochem.* 223, 223-231.
- Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Alonso, C., Michalski, J. C., Boilly, B. & Montreuil, J. (1992) Characterization of Le^x, Le^y and ALe^y antigen determinants in Kdn-containing O-linked glycan chains from *Pleurodeles waltl* jelly coat eggs, *FEBS Lett.* 298, 39-43.
- Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Michalski, J. C., Alonso, C., Leroy, Y., Boilly, B. & Montreuil, J. (1992) Primary structure of neutral and acidic oligosacharide-alditols derived from the jelly coat of Axolotl mexicanum, Eur. J. Biochem. 207, 995-1002.
- Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Fontaine, M. D. & Plancke, Y. (1994) Structure of the major oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of *Ambystoma maculatum*. Characterization of the carbohydrate sequence GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3/6), Glycobiology 4, 605-609.
- Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Plancke, Y. & Boilly, B. (1995) Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released

from the jelly coats of the anuran Xenopus laevis by reductive β -elimination, Glycobiology 5, 137-146.

- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids, J. Chromatogr. 69, 291-304.
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) Gasliquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans, Anal. Biochem. 116, 489-502.
- Klein, A., Lamblin, G., Lhermitte, M., Roussel, P., Breg, J., Van Halbeek, H. & Vliegenthart, J. F. G. (1988) Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combination of 500-Mhz 'H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis. 1. Structure of 16 oligosaccharides having the Gal(β1-3)GalNAc-ol core (type 1) or the Gal(β1-3)[GlcNAc(β1-6)]GalNAc-ol core (type 2), Eur. J. Biochem. 171, 631-642.
 Breg, J., Van Halbeek, H., Vliegenthart, J. F. G., Lamblin, G.,
- Breg, J., Van Halbeek, H., Vliegenthart, J. F. G., Lamblin, G., Houvenhaghel, M. C. & Roussel, P. (1987) Structure of sialyloligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis, Eur. J. Biochem. 168, 57-68.
- Van Halbeek, H., Breg, J., Vliegenthart, J. F. G., Klein, A., Lamblin, G. & Roussel, P. (1988) Isolation and structural characterization of low-molecular-mass monosialyl oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, *Eur. J. Biochem.* 177, 443-460.
- Dua, V. K., Rao, B. N. N., Wu, S. S., Dube, V. E. & Bush, C. A. (1986) Characterization of the oligosaccharide alditols from ovarian cyst mucin glycoproteins of blood group A using high pressure liquid chromatography (HPLC) and high field 'H NMR spectroscopy, J. Biol. Chem. 261, 1599-1608.
- Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G., Roussel, P., Strang, A. M. & Van Halbeek, H. (1991) Structures of neutral oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non secretor (O, Le^{*+b-}) patient suffering from chronic bronchitis. *Glycobiology* 1, 277-293.
- Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S. & Inoue, Y. (1986) A naturally occuring deaminated neuraminic acid, 3deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN), J. Biol. Chem. 261, 11550-11557.
- Finne, J. & Krusius, T. (1976) O-glycosidic carbohydrate units from glycoproteins of different tissues: demonstration of a brain-specific disaccharide, a-galactosyl-(1-3)-N-acetylgalactosamine, FEBS Lett. 66, 94-97.
- Srivatsan, J., Smith, D. F. & Cummings, R. D. (1992) Shistosoma mansoni synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal β-linked N-acetylgalactosamine, Glycobiology 2, 445-452.
- Bergweff, A. A., Thomas-Oates, J. E., Van Oostrum, J., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. G. (1992) Human urokinase contains GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-2) as a novel terminal element in N-linked carbohydrate chains, FEBS Lett. 314, 389-394.

2. CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence les caractéristiques structurales de l'espèce Ambystoma tigrinum et de confirmer l'hypothèse d'une spécificité structurale des chaînes glycanniques propres aux espèces. Quatre observations peuvent être faites :

- ✓ La première montre que la charge acide est portée par du Kdn[#]. Ce monosaccharide acide semble être l'acide sialique majeur des chaînes glycanniques acides des Amphibiens à l'exception toutefois des espèces du genre Bufo (*Bufo japonicus* Shimoda *et al* 1994 et *Bufo bufo* Morelle et Strecker 1997) où seul l'acide *N*-acétyl-neuraminique et l'acide *N*glycolyl-neuraminique sont présents.
- ✓ La deuxième observation montre que ce Kdn est mono ou disubstitué en 4 ou en 4 et 5 dans les séquences Fuc(α 1-4)Kdn, Fuc(α 1-4)[Fuc(α 1-5)]Kdn-R. Cette substitution suggère, d'après l'hypothèse d'Hagopian et Heylar (1968), l'existence d'une nouvelle activité fucosyltransférasique non encore décrite, et semble être exclusivement exprimée chez cette espèce. Cette originalité structurale représente la spécificité structurale de cette espèce.
- ✓ La troisième observation concerne la présence de déterminants antigéniques comme les épitopes H (Fuc(α 1-2)Gal β 1-R, Lewis X (ou SSEA-1) Gal $(\beta$ 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β , Lewis Y (Fuc α 1-2)Gal $(\beta$ 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc β et le trisaccharide responsable de l'activité de groupe sanguin A (GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal β). Ces structures ne caractérisent toutefois pas l'espèce puisqu'elles ont été déjà décrites et isolées à partir d'autres mucines d'Amphibiens (*Pleurodeles waltl* Strecker *et al* 1992, *Bufo japonicus japonicus* Shimoda *et al* 1994). Compte tenu de l'éloignement phylogénétique de ces espèces, la présence de ces activités enzymatiques est indépendante de leur phylogénie.
- ✓ Enfin cette étude a permis également de mettre en évidence la structure Gal(α1-3)GalNAc qui a été décrite pour la première fois au niveau des glycoprotéines de cerveau de rat (Finne et Krusius 1976) et dans les mucines bronchiques humaines (van Halbeek *et al* 1997). Cette observation montre que ce noyau, rare chez les mammifères, est probablement plus fréquent chez les animaux inférieurs.

[#] Kdn : 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid

Ces travaux sont venus compléter ceux effectués sur quatre autres espèces d'Amphibiens : *Pleurodeles waltl* (Strecker *et al* 1992), *Ambystoma maculatum* (Strecker *et al* 1994, Fontaine *et al* 1995), *Ambystoma mexicanum* (Strecker *et al* 1992) et *Xenopus laevis* (Strecker *et al* 1995, Plancke *et al* 1995). Ils permettent également de conforter l'hypothèse de la spécificité structurale des chaînes glycanniques propres à chaque espèce, ce qui implique l'existence de nouvelles activités glycosyltransférasiques. Les résultats de ces travaux ont encouragé l'étude sur d'autres espèces et notamment *Rana temporaria* qui fait l'objet du chapitre suivant.



Rana temporaria

1. INTRODUCTION

Rana temporaria est un Anoure de la famille des Ranidae. Cette espèce est communement appelée grenouille rousse. Elle représente avec *Bufo bufo* l'espèce la plus représentée dans nos régions.

L'étude des oligosaccharides des mucines oviducales a été effectuée suivant la même procédure expérimentale que les précédents travaux. Cette étude a pour objet de confirmer l'hypothèse d'une spécificité structurale propre à cette espèce. Comme précédemment les déterminations structurales ont été réalisées sur la base de données de R.M.N. ainsi que par spectrométrie de masse.

Ces travaux ont permis d'élucider la structure primaire de 25 oligosaccharide-alditols.

Glycoconjugate Journal (1997) 14: 127-146

Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*

Emmanuel Maes, Doina Florea, Florence Delplace, Jerome Lemoine, Yves Plancke and Gerard Strecker*

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherches du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille (Flandres-Artois), F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex France

The carbohydrate chains of the mucins which constitute the jelly coat surrounding the eggs of *Rana temporaria* were released by alkaline borohydride treatment. Neutral and acidic oligosaccharide-alditols were purified by ion-exchange chromatography and HPLC. From the structural analysis, based upon ¹H and ¹³C-NMR spectroscopy in combination with MALDI-TOF, the following glycan units are proposed.



Keywords: ¹H-NMR, carbohydrate, mucin, amphibian, Rana temporaria

Abbreviations: MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization – time of flight; HPLC, high performance liquid chromatography; COSY, correlation spectroscopy; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy; HMQC, heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy; ROESY, rotating-frame overhauser enhancement spectroscopy; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GalNAc-ol, *N*-acetylgal

Introduction

The jelly coat surrounding amphibian eggs is composed of mucin-type glycoproteins. These highly glycosylated molecules are synthesized by oviduct cells and play an

^{*}To whom correspondence should be addressed.

important role in the fertilization process, involving capacitation of the sperm, induction of the acrosome reaction, block of polyspermy (anouran species), and recognition of homologous species [1-4]. The jelly coat is very important for the embryonic protection and retains Ca²⁺ ions necessary for successful fertilization [3, 5]. Our previous studies have shown that the jelly coat glycoproteins present highly species-specific glycosylation patterns and that they contain, for most of the species, 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid (Kdn) as the only acidic sugar [6-15]. Moreover, some species exhibit, as a major structure, rare human carbohydrate determinants (i.e. Lewis Y in Pleurodeles waltl [6]). In the present study, we have isolated neutral and acidic carbohydrate chains from the egg jelly of Rana temporaria, and determined the structure of seventeen of them.

Material and methods

The jelly coat was lyophilized and the dry material (2 g) was subjected to alkaline reductive degradation in 0.1 M NaOH containing 1 M NaBH₄ (200 ml) at 37 °C for 48 h. The reaction was stopped by DOWEX 50X8 (mesh 25-50, H⁺ form) and boric acid was eliminated as its methyl ester in the presence of methanol. Neutral and acidic oligosaccharides were further fractionated on DOWEX 1X2 (mesh 200-400, HCOO⁻ form). After water elution of neutral compounds, acidic oligosaccharides were desorbed with 50, 100, 200 and 300 mm of pyridine-acetate buffer (pH 6.5) respectively, and fractions were isolated by high-performance liquid chromatography on primary-bond silica (Supelcosyl LC-NH₂; $4.6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$, Supelco Inc. Bellefonte USA) using acetonitrile/30 mm potassium phosphate, pH 5.2, with a flow rate of 1ml min⁻¹. Several fractions were obtained at various concentrations of the elution gradient (see HPLC profiles in Fig. 2). The neutral oligosaccharide-alditols were eventually recycled on a 5 µm ODS Zorbax column (25 cm × 0.94 cm I.D.; Du Pont Instruments, Paris, France), with water as eluent. Oligosaccharide-alditols were detected by spectroscopy at 206 nm.

Analytical procedure

Carbohydrate composition was determined according to Zanetta et al. [16] and to Clamp et al. [17].

¹H-NMR spectroscopy was performed on a Bruker ASX 400 WB spectrometer. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4'-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm in D₂O at 25 °C). The two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy (COSY), with simple and double relay transfer, the heteronuclear single-quantum coherence (HSQC), the heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) and rotating-frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

Maes et al.

(ROESY) experiments were performed using Bruker standard pulse-sequences. For ROESY experiments, the mixing time was set at 400 ms.

Mass spectroscopy

Mass measurements of matrix O-glycan-alditols were performed by matrix assisted laser desorption and time of flight mass spectrometry on a Vision 2000 (Finnigan Mat, Hemel) instrument in reflection mode (nitrogen laser: 337 nm).

Samples were dissolved in water at a concentration of $50-100 \text{ pmol } \mu l^{-1}$ and $1 \, \mu l$ of these solutions were mixed with $1 \, \mu l$ of matrix onto the target then allowed to crystallize at room temperature.

Monoacidic structures were mass analysed in the positive mode using 2,5-dihydroxybenzoic acid $(10 \text{ mg ml}^{-1} \text{ in} \text{ methanol:water 70:30})$. The diacidic compound was analysed in the negative mode using 3 aminochinolin matrix $(10 \text{ mg ml}^{-1} \text{ in water:ethanol 90:10})$. Ten to 15 shots were accumulated for each spectrum.

Results

A fractionation of neutral oligosaccharide-alditols on Bio-Gel P-4 resulted in three sub-fractions and only the third one was studied here (N-III). Two oligosaccharide-alditols N-III-1 and N-III-2 were further purified by preparative reversed phase HPLC on a 5 μ m ODS column (Fig. 1). The acidic oligosaccharide-alditols were eluted from the Dowex 1X2 column in seven fractions, with 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 mM buffer solutions. Figure 2 shows the HPLC profile on a LC-NH₂ column of the four fractions 50 to



Figure 1. HPLC profile of neutral oligosaccharide-alditols (fraction N-III) on a 5 μ m ODS column, eluted with water. (1) GalNAc-ol and Gal(β 1-3)GalNAc-ol; (2) Gal(a1-3)GalNAc-ol.



Analysis of oligosaccharide-alditols from Rana temporaria mucins

Figure 2. HPLC profiles of oligosaccharide-additols eluted from the anionic ion exchanger with pyridine acetate buffer. The primary-bonded silica $LC-NH_2$ (25 × 0.46 cm) was eluted with gradients of acetonitrile-30 mM KH₂PO₄, as depicted on the profiles.

300 mM, which were further analysed. The numbering of the various acidic fractions takes into account the concentration of the elution buffer (50, 100, 200 and 300), together with the appearance in HPLC elution profile. Some of the fractions were in too low concentration or too complex to allow an extensive study. The order of the description of the oligosaccharide-alditols in the text was set afterward in such a way as to write them in a logical sequence.

The structures of oligosaccharide-alditols were established on the basis of NMR. Mass spectroscopy (MALDI-TOF) was used for confirming the presence of an anionic group (phosphate or sulfate, $\Delta MW = 80$). The discrimination between these two groups was achieved by NMR, by analysing a putative ³¹P-¹H coupling constant, the absence of which allowing to identify the anionic unit as sulfate. Monosaccharide units were identified on the basis of their vicinal coupling constants, and the linkage by HMQC spectroscopy. In some cases, the sequence was determined using the ROESY pulse sequence NMR.

The fraction N-III-1 contains a mixture of the two well known compounds GalNAc-ol and Gal(β 1-3)GalNAc-ol (Table 1) in a ratio 3:2.

The acidic fraction 100-4a also contains a compound of low molecular weight, namely Kdn(α 2-6)GalNAc-ol, which was identified on the basis of its NMR spectrum (Table 1). Indeed, the chemical shifts relative to the GalNAc-ol unit are identical to those observed for reference compound NeuAc(α 2-6)GalNAc-ol [18]. The α -2,6-linked Kdn shows specific H-3ax and H-3eq signals at $\delta = 1.660$ and 2.671 ppm [6].

Maes et al.

Table 1. ¹H-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (N-III-1a), (N-III-1b), (N-III-2), (100-4a), (50-4), (50-5a) and (50-5b) Table 1. 'H-NMH chemical shifts of the origonal containing core type 1 and 8. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \checkmark -oi, Gairoo-oi, -, -, -, Kdn; \Box , Fuc. ND, not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows: $\frac{4}{3/2}$ containing core type 1 and 8. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: Ο-ol, GalNAc-ol; , βGal; Ø, aGal; Δ,

Residue	Reporter	Chemical shifts (ppm) in							
	group	⊘-ol	∎ €	⊠ ^{\$\$-ol}	▲ ⊘-ol	▲ ⊠X>-ol	-ol		
		N-III-1a	N-III-1b	N-III-2	100-4a	504	50-5a		
GalNAc-ol I	H-1,1′	ND	3.801/3.735	3.795/3.709	ND	3.794/3.703	3.76/3.72	3.826/3.760	
	H-2	4.251	4.390	4.373	4.243	4.365	4.377	4.421	
	H-3	3.849	4.064	3.935	3.841	3.925	4.052	3.884	
	H-4	3.390	3.510	3.714	3.403	3.713	3.522	3.669	
	H-5	3.928	4.192	4.054	4.013	4.104	4.232	3.992	
	H-6.6'	ND	3.680/3.629	3,756/3.652	ND	3.827/3.503	3.845/3.468	3.85/3.474	
	NAc	2.055	2.050	2.045	2.052	2.038	2.045		
Gal <i>β</i> 1-3 II	H-1,1′		4.477	-	-	-	4.471	-	
	H-2		3.564	-	-		3.567	-	
	H-3	-	3.677	_	_	-	3.668	-	
	H-4	-	3.903	-	-	-	3.899	-	
	H-5	-	3.729			-	3.72	-	
	H-6,6′	-	3.78	-	-	-	3.77	-	
Gal a1-3 II	H-1,1′	-		5.170	_	5.150	-	5.142	
	H-2	-		3.868	-	3.86	-	3.976	
	H-3	-		3.866	-	3.86	-	~ 4.11	
	H-4	-		4.028	-	4.025	-	4.039	
	H-5			4.054	-	4.051	-	4.100	
	H-6,6′	-		3.756		3.75	-	~ 3.76	
Fuc a1-2 F	H-1,1'	-		-	_	-	-	5.293	
	H-2	-		-	_	-	_	3.790	
	Н-З	-		-	-		-	3.888	
	H-4	_		_		_		3.850	
	H-5	-		-	-	-	_	4.061	
	CH₃	-		-	-	-	-	1.241	
Kdn a2-6 K	H-3ax	_		-	1.660	1.661	1.653	1.670	
	H-3eq	-		-	2.671	2.670	2.686	2.690	
	H-4	-		-	-	-	3.58	3.58	
	H-5	-		-		-	3.52	3.52	
	H-6	-		-	-	-	3.66	3.66	
	H-7			-		_	3.87	3.87	
	H-8	-		-	_	_	3.82	3.82	
	H-9,9'	<u>.</u>		-	-	-	3.90/3.70	3.90/3.70	

The compound N-III-2 (Fig. 3, Tables 1 and 4) is composed of GalNAc-ol and Gal in the ratio 1:1. The anomeric configuration of the α -Gal unit is evident, from the shape of its H-1 resonance (J_{1,2} \cong 3 Hz), despite its distortion due to a virtual long-range coupling. The ¹³C-NMR data reported in Table 4 clearly show the C-3 substitution of the GalNAc-ol unit, and, therefore, lead to propose the following structure:

GalNAc-ol Gal(α1-3)

N-III-2

The compound 50-4 (= 100-7), (Fig. 4 and Table 1), possesses Kdn and Gal respectively α -2,6- and α -1,3-linked to GalNAc-ol. This conclusion results from the observation of typical Kdn H-3ax, H-3eq, GalNAc H-3, H-6 and H-6'



Analysis of oligosaccharide-alditols from Rana temporaria mucins

Figure 3. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound N-III-2.

and Gal H-1 ($J_{1,2} \sim 3$ Hz), H-5 atom resonances which are characteristic for each structural element of the following compound:



The NMR spectrum of fraction 50-5 confirms that it contains two different oligosaccharide-alditols, according to the presence of two GalNAc-ol H-2 and H-5 signals (Fig. 5; Tables 1 and 4). Both structures contain Kdn O-6 linked to GalNAc-ol, according to the H-6 and H-6' atom resonances of the hexitol. The α -Gal residue II-B was identified on the basis of the J_{1,2} coupling constant (= 3 Hz), and the set of the vicinal coupling constants observed for J_{2,3}, J_{3,4} and J_{4,5} coupling constants (respectively 8, 3 and 1 Hz). The β -Gal residue II-A (J_{1,2} = 8 Hz; J_{4,5} = 1 Hz) occurs in the terminal non-reducing position, whereas the α -Gal residue

II-B is O-2 substituted, as shown by its C-2 resonance deshielded at 79.15 ppm. Since this deshielding is correlated with the occurrence of an additional Fuc unit, the sequences of the two compounds in the fraction can be established as follows:

Kdn(
$$\alpha$$
2-6)
GalNAc-ol
Gal(β 1-3) 50-5A



Maes et al.

MALDI analysis of compound 200-7 shows a [M-H + 2K]⁺ ion at m/z 704 (Fig. 6) which may correspond to a sulfated trisaccharide-alditol with GalNAc-ol, Gal and SO₃H in the molar proportions of 1:2:1. The downfield-shift resonances of Gal III H-3 and H-4 (Fig. 7; Tables 2 and 5) are attributable to the C-3 substitution by a sulfate residue [19]. The Gal II unit is itself substituted on the 4 position, as indicated by the downfield-shift resonance of H-4 ($\delta = 4.200$ ppm) and C4 ($\delta = 79.35$ ppm). The ROESY spectrum indicated nOe contacts between Gal III H-1/Gal II H-4 and Gal II H-1/GalNAc-ol I H-3, an observation that led us to propose the following sequence:

GalNAc-ol
3 Gal(
$$\beta$$
1-4) Gal(β 1-3)
HSO₃ 200-7

MALDI analysis of fraction 200-8 shows a [M-H + 2K]⁺ ion at m/z 850 (Fig. 6), which indicates the compound to be an extension of 200-7 with a Fuc unit (Δ MW = 146). The set of Gal III H-3 and H-4 resonances is identical to that of compound 200-7 and is characteristic of an O-3 sulfatation (Fig. 8 and Table 2). On the HMQC spectrum, the di-substitution of Gal II at position 2 and 4 can be deduced from the C-2 and C-4 atom resonance observed at δ = 80.25 and 78.39 ppm, respectively (Table 5). In addition, nOe effects between Fuc H-1 and Gal II H-1, H-2, H-3 signals, Gal III H-1 and Gal II H-3, H-4 signals (Fig. 9) confirm the α -1,2-linkage of Fucose to the Gal II unit:

Structure 100-4b: From the MALDI analysis which shows a $[M-H + 2K]^+$ ion at m/z 1012 (Fig. 6), the compound 100-4b can be considered as an extension of 200-8 with in addition a hexose unit, identified as galactose on the basis of the 2D COSY spectrum (Fig. 10 and Table 2). The C-2, C-3 and C-4 atom resonances of Gal II are shifted downfield (Table 5), which shows C-3 at the point of substitution by the Gal III' unit. The nOe contacts (Fuc H-1 \rightarrow Gal II H-1, H-2, H-3; Gal III' H-1 \rightarrow Gal IIH-3, H-4; Gal III H-1 \rightarrow Gal II H-3, H-4; Gal II H-1 \rightarrow GalNAc-ol H-2, H-3) depicted in Fig. 9 are in good agreement with the following sequence:





Chemical shifts (in ppm)

Figure 4. ¹H-NMR spectra of compounds 50-4 (a), 200-3 (b) and 300-5 (c).

The ¹H NMR spectrum of compound 200-3 shows the presence of resonances relative to Gal H-1, H-3 and H-4, which are characteristic of an O-3 sulfated Gal unit [19], and to GalNAc-ol H-2 and H-5, themselves significant of an O-3 substituted GalNAc unit (Fig. 4 and Table 2). These observations point us to propose the following structure:





Figure 5. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of fraction 50-5.

The MALDI spectrum of compound 100-6 (Fig. 6) shows a $[M-H + 2K]^+$ pseudo-molecular ion at m/z 1158 corresponding to an extension of 100-4b with in addition a Fuc unit (ΔMW : 146). A comparison of the HMQC spectra of both compounds 100-4b and 100-6 (Figs 10 and 11; Tables 2 and 5) indicates that Gal III' C-2 is deshielded from 72.44 to 75.19 ppm, leading to the linkage of the additional Fuc unit at position 2 of Gal III':



The NMR spectrum of fraction 300-5 (Fig. 5) is superimposable with that of compound II [20] previously described as:



The presence of a sulfate group at O-6 of GlcNAc is responsible for a significant downfield shift for GlcNAc H-6 and H-6' atom resonances (Table 3) [21].

Compound 200-9, with $[M-H + 2K]^+$ at m/z 890 (Fig. 6), is an extension of 300-5 with α -1,2-linked fucose, as was clearly demonstrated by the set of structural reporter-group signals for Gal(β 1-3) (δ H-1 = 4.577) and Fuc(α 1-2) (δ H-1 = 5.245, δ H-5 = 4.305, δ CH₃ = 1.242) [22]. As shown above for compound 300-5, the presence of a sulfate group at O-6 of GlcNAc is attested by the typical downfield shift of H-6 and H-6' atom resonances (Fig. 12 and Table 3).

Maes et al.

Table 2. ¹H-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (200-3), (200-7), (200-8), (100-4b), (100-6), (50-7A) and (50-7B) containing core type 1. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: (\diamond -ol, GalNAc-ol; \otimes , GlcA; \blacksquare , β Gal; S- \blacksquare , β Gal-3-S; \Box , Fuc. ND, not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows:

Residue	Reporter group	Chemical shifts (ppm) in						
		s a col	s ol	s d	s -ol	s -ol		
		200-3	200-7	200-8	100-4b	100-6	50-7A	50-7B
GalNAcol I	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 H-6 NAc	ND 4.396 4.091 3.516 4.201 ND 2.049	~ 3.74 4.389 4.063 3.525 4.176 3.63 2.052	~ 3.8 4.387 4.079 3.528 4.143 3.64 2.049	3.799 4.359 4.106 3.570 4.118 ~ 3.65 2.051	3.811 4.320 4.052 3.557 4.101 3.634 2.053	~ 3.79 4.344 4.113 3.571 4.136 3.64–3.67 2.051	~ 3.80 4.397 4.086 3.534 4.136 3.64-3.67 2.045
Gai β1-3 II	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6′		4.503 3.639 3.795 4.200 3.761 ~ 3.7	4.598 3.817 3.988 4.208 3.774 ~ 3.8	4.673 3.952 4.114 4.455 3.790 ~ 3.8	4.653 3.650 4.086 4.468 ~ 3.7 ~ 3.8	4.663 3.789 4.017 4.222 3.77 ND	4.593 3.837 3.995 4.198 3.77 ND
Gai <i>β</i> 1-3/4 III	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6′				4.864 3.563 3.689 3.895 3.662 ~ 3.83	4.967 3.677 3.901 3.848 3.637 ~ 3.8	4.636 3.695 3.817 4.173 3.68 ND	4.600 3.687 3.778 4.142 3.68 ND
Gal-3-S <i>β</i> 1-4 III	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6'	4.592 ND 4.348 4.274 ND ND	4.700 3.739 4.342 4.276 3.715 ~ 3.65	4.710 3.725 4.236 4.276 3.719 ~ 3.8	4.730 3.816 4.334 4.297 3.741 ~ 3.8	4.730 3.800 4.339 4.303 ~ 3.7 ~ 3.8	- - - -	
GlcA <i>β</i> 1-3 IV	H-1,1′ H-2 H-3 H-4	- - -		- - -		- - -	4.790 3.560 3.730 3.530	4.755 3.552 3.726 3.528
Fuc a1-2 F^{2.3}	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 CH₃		- - - -	5.286 3.807 3.926 3.832 4.282 1.242	5.406 3.792 3.925 3.803 4.289 1.237	5.350 3.768 3.889 3.782 ~ 4.30 1.270	5.345 3.788 3.91 3.78 4.277 1.235	5.273 3.816 3.925 3.831 4.285 1.244
Fuc a1-2 F^{2.3.3}	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 CH ₃				- - - -	5.456 3.769 3.917 3.975 4.514 1.225	5.336 3.788 3.907 3.831 4.545 1.221	5.336 3.788 3.907 3.831 4.561 1.226



Figure 6. MALDI analyses of acidic oligosaccharide-alditols. Analyses were performed in the positive mode (pseudo-molecular ion [M-H + 2K]⁺, except for compound 300-11.

The MALDI analysis of compound 100-8 shows a $[M-H + 2K]^+$ at m/z 1199 (Fig. 6), which is in agreement with the following molar proportions: GlcNAc, Gal, Fuc, GalNAc and sulfate (1:2:2:1:1). The homo and heteronuclear NMR spectra (Fig. 13; Tables 3 and 6) confirm the presence of

a sulfate group at O-6 of GlcNAc, owing to its characteristic H-6 and C-6 atom resonances. The downfield shift of the GlcNAc C-3 resonance is attributable to the presence of the α -1,3-linked fucose unit. The second branch of the glycan contains two galactose units. The former (Gal II) is





Figure 7. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 200-7.



Figure 8. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 200-8.



Figure 9. ROESY spectra of compounds 200-8 and 100-4b.



Figure 10. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 100-4b.





Figure 11. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 100-6.

substituted at both C-2 (δ C-2 = 77.44) and C-3 (δ C-3 = 83.37), whereas the latter occurs in a terminal non-reducing position, since none of its ¹³C resonance is deshielded. On the basis of these observations, the structure of 100-8 was deduced to be the following:



With the pseudomolecular ion $[M-H + 2K]^+$ at m/z 1092 (Fig. 6), compound 50-7 can be considered as a hexasaccharide-alditol composed of Gal, Fuc, GalNAc-ol and hexuronic acid in the molar ratio of 2:2:1:1. The examina-

tion of the NMR spectra (Figs 14, 15 and Tables 2 and 5) provides new information, and, particularly, shows that two isomers occur in the fraction. Indeed, two C-2 atom resonances, relative to GalNAc-ol, are observed at $\delta = 53.57$ and 52.88 ppm, respectively. The hexuronic acid was identified as glucuronic acid on the basis of the set of its vicinal coupling constant $(J_{1,2} = J_{2,3} = J_{3,4} = J_{4,5} = 8 \text{ Hz}).$ Actually, two glucuronic acid units can be characterized with δ H-1 = 4.790, δ C-1 = 103.67 for the first one, and δ H-1 = 4.755, δ C-1 = 103.76, for the second one. The HMQC spectrum (Fig. 15) allows us to distinguish two Gal II units, substituted at C-2 and C-3, for Gal II-A, and C-2 and C-4, for Gal II-B, respectively. In both isomers, the Gal III and GlcA IV possess the same substitution, at C-3 for the former, and C-2 for the latter. These conclusions were drawn from the observation of the chemical shifts of the corresponding ¹³C resonances depicted in Table 5. Consequently, the two isomers can be considered as the extension of the sequences: $Gal(\beta 1-3)[Fuc(\alpha 1-2)]Gal(\beta 1-3)GalNAc-ol (A)$

Table 3. ¹H-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (300-5), (200-9), (100-8) and (300-11) containing core type 2. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \diamond -ol, GalNAc-ol; \blacksquare , β Gal; \otimes , GlcA; S- \bullet , GlcNAc-6-S, \Box , Fuc. ND, not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows:

Residue	Reporter	Chemical shifts (p	Chemical shifts (ppm) in					
	group	s ol	s -ol	s D ol	s o			
		300-5	200-9	■ 白 100-8	₩ 1 300-11			
GalNAc-ol I	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6' NAc	ND 4.389 4.060 3.473 4.271 3.939 2.067	ND 4.393 4.079 3.512 ND 3.73 2.053	3.79 4.335 4.085 3.57 4.198 3.93/3.70 2.050	3.78 4.342 4.095 3.560 4.204 3.933/3.689 2.053			
Gal <i>β</i> 1-3 II	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6′	4.463 ND ND 3.898 ND ND	4.577 3.684 3.876 3.916 ND ND	4.660 3.786 4.008 4.219 ~ 3.76 ~ 3.75	4.658 3.781 4.012 4.211 3.75 3.74			
Gai <i>β</i> 1-3 III	H-1 H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6 [′]	- - - -	-	4.615 3.613 3.65 3.920 ~ 3.68 ~ 3.75	4.630 3.694 3.820 4.169 3.69 3.74			
GlcNAc-6-S β1-6ΙΙ′	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 H-6,6' NAc	4.559 ND ND ND ND 4.360/4.233 2.065	4.575 3.728 3.56 3.587 ND 4.360/4.233 2.059	4.592 3.876 3.650 3.621 3.685 4.261/4.246 2.037	4.594 3.856 3.665 3.611 3.685 4.368/4.256 2.041			
GlcA β1-3 ΙV	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5	- - - -	- - - -	- - - -	4.784 3.554 3.732 3.71 3.70			
Fuc a1-2 F ^{2.3}	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 CH ₃	- - - - -	5.245 3.804 3.893 3.824 4.305 1.242	5.380 3.80 3.89 3.800 ND 1.229	5.335 3.787 3.886 3.802 4.268 1.234			
Fuc a1-2 F ^{2.3.3}	H-1,1′ H-2 H-3 H-4 H-5 CH₃	- · - - - -	- - - -		5.335 3.787 3.913 3.836 4.545 1.222			
Fuc a1-3 F ^{3.6}	H-1,1' H-2 H-3 H-4 H-5 CH ₃	- - - -	- - - -	4.986 3.687 3.837 3.800 ND 1.158	4.990 3.687 3.837 3.800 4.327 1.161			

Table 4. ¹³C-NMR chemical shifts of the oligosaccharidealditols (N-III-1a), (50-5a), and (50-5b) containing core type 1 and 8. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \diamond -ol, GalNAc-ol; \blacksquare , β Gal; \boxtimes , α Gal; \blacktriangle , Kdn; \Box , Fuc. ND, not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows:

3/2

Residue	Reporter	Chemical shifts (ppm) in				
	group	⊠ ^{¢}-oi}	ol			
		N-III-2	50-5a	50-5b		
GalNAc-ol I	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 CH ₃	62.34 53.31 78.19 71.11 71.19 64.31 23.35	61.66 52.68 77.26 70.47 69.23 66.96 23.27	61.60 53.60 78.50 71.40 69.86 66.96 23.42		
Gal β1-3 ΙΙ	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	-	105.25 72.43 73.74 69.88 76.44 62.18	- - - -		
Gal a1-3 II	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	100.78 69.53 70.50 70.39 72.99 62.23	- - - - -	100.61 79.15 70.55 70.97 73.24 62.18		
Fuc <i>a</i> 1-2 F	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6		 	101.40 69.37 70.57 73.18 68.42 16.80		
Kdn <i>a</i> 2-6 K	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 C-7 C-8 C-9	 	ND ND 41.12 71.52 71.29 74.94 69.27 73.43 64.06	ND ND 41.12 71.42 71.29 74.94 69.27 73.48 64.06		

and Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-3)GalNAc-ol (B) with the same terminal disaccharide Fuc(α 1-2)GlcA(β 1-3). The exact assignment of NMR parameters relative to GlcA IV (A) and IV (B) is based on the presence of the sequence A in compound **300-11** (see below). On the basis of these observa-



Figure 12. COSY spectrum of compound 200-9.

tions, the structures of the oligosaccharide-alditols present in the fraction 50-7 were deduced to be the following:



$$\begin{array}{c|c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ GlcA(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c|c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array}$$
 \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Ga

The pseudo molecular ion $[M-H]^-$ observed at m/z 1443 (Fig. 6) indicated that compound **300-11** is an octasaccharide-alditol composed of Gal, Fuc, hexuronic acid, HexNAc,



Figure 13. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 100-8.



Figure 14. 1H-NMR spectrum of fraction 50-7.

Maes et al.

Table 5. ¹³C-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (200-7), (200-8), (100-4b), (100-6), (50-7A) and (50-7B) containing core type 1. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \diamond -ol, GalNAc-ol; \otimes , GlcA; \blacksquare , β Gal; S- \blacksquare , β Gal-3-S; \square , Fuc. ND = not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows:

Residue	Reporter	Chemical shifts (ppm) in					
	group	s	s d	s d	s d	8 4 4	
		200-7	200-8	100-4b	100-6	50-7A	50-7B
GalNAc-ol I	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	~ 62 53.35 78.64 70.83 71.21 64.8	61.56 52.84 76.24 70.12 70.60 64.03	61.85 53.28 75.39 70.51 70.81 63.98	61.71 53.70 75.60 70.51 70.75 63.64	61.9 53.57 75.22 70.44 70.80 64.0	61.9 52.88 76.41 70.20 70.80 64.0
Gal β1-3 ΙΙ	CH₃ C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	23.57 105.84 73.26 74.5 79.35 76.27 ~ 62	23.57 103.48 80.25 73.91 78.39 75.57 62.08	23.63 102.64 77.71 83.07 77.15 75.51 62.30	23.57 102.36 77.44 82.97 75.63 75.84 ~ 62	23.56 102.50 77.89 83.67 70.08 76.2 62.2	23.56 103.78 80.30 73.86 78.01 76.2 62.2
Gal β1-3/4 III	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6		-	104.33 72.44 73.92 69.93 76.24 61.94	102.26 75.19 75.76 70.5 76.21 ~ 62	105.64 71.85 82.76 69.96 75.8 62.2	105.95 72.03 82.63 70.08 75.8 62.2
Gal-3-S β1-4 III	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	105.84 71.30 82.13 68.76 76.66 ~ 62	105.34 70.60 81.49 68.11 75.93 62.08	105.41 73.17 81.67 68.18 76.10 62.30	105.14 70.56 81.81 68.14 75.84 ~ 62	- - - -	
GicA β1-3 ΙV	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	- - - -		- - - -		103.67 79.61 77.5 73.26 77.5 ND	103.76 78.93 75.5 73.26 77.5 ND
Fuc a1-2 F^{2.3}	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	- - - - -	- - - -	101.27 70.24 70.39 73.17 69.00 16.77	100.97 69.58 70.64 73.18 68.14 17.09	101.42 69.68 70.79 73.40 68.92 16.8	102.47 69.68 70.79 73.28 69.87 16.8
Fuc a1-2 F ^{2.3.3} or F ^{2.3.4}	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	99.09 69.58 70.81 73.04 67.72 16.96	100.29 69.68 70.79 73.28 68.26 16.8	100.29 70.79 70.79 73.28 68.26 16.8



Figure 15. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of fraction 50-7.



Figure 16. Homonuclear and heteronuclear COSY spectra of compound 300-11.

Maes et al.

Table 6. ¹³C-NMR chemical shifts of the oligosaccharide-alditols (100-8), and (300-11) containing core type 2. The monosaccharides are represented by this symbolic notation: \diamond -ol, GalNAc-ol; **I**, β Gal; \otimes , GlcA: S-**O**, GlcNAc-6-S; \Box , Fuc. ND = not determined. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows:

\$

GalNAc-ol and SO₃H in the molar ratio : 2:3:1:1:1:1. The NMR spectra (Fig. 16; Tables 3 and 6) clearly confirm the presence of GlcNAc and GlcA according to the set of their vicinal coupling constants. Moreover, the chemical shifts of GalNAc-ol H-6 and H-6' are characteristic of a type 2 core structure GlcNAc(β 1-6)[Gal(β 1-3)]GalNAc-ol. A comparison of the spectrum of **300-11** with those of **100-8** and **50-7** indicates the presence of the sequences Fuc(α 1-3)GlcNAc-6-S(β 1-6) and Fuc(α 1-2)GlcA(β 1-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-2)] Gal(β 1-3). This conclusion results from the observation of some significant resonances such as GlcNAc C-3 and C-6, GlcA C-2, Gal III C-3 and Gal II C-2 and C-3, which match those of the two reference compounds. On the basis of these observations, the structure of compound **300-11** was established as follows:



Discussion

The aim of this study was to extend the hypothesis that glycanic chains of amphibian oviducal mucins are highly species-specific. The results obtained for Rana temporaria confirm this point, since almost all oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination are novel (Scheme 1). By comparison with the six amphibian species previously examined [5-15], the main characteristics of Rana temporaria mucin are the following: 1) The anionic charge of the mucin is carried by Kdn, but also by sulfate and glucuronic acid; 2) the core structure $Gal(\alpha 1-3)GalNAc$, previously found in human bronchial mucus [23] and Ambystoma tigrinum mucin [14], is described here for the third time; 3) as generally occurs in carbohydrate chains released from a single species, the different structures derive one from the other according to a specific sequence of biosynthesis. For instance, compounds 200-8, 100-4b and 100-6 are related to 200-7 by successive addition of Fuc, Gal and Fuc again, respectively; 4) new fucosyltransferase (FucT) activities can be defined on the basis of new sequences: an α -1,2 FucT acting on terminal GlcA unit (compound 50-7A,B and 300-11), or an α -1,3 FucT able to act directly on terminal GlcNAc (or sulfated GlcNAc), as testified by the presence of compounds 100-8, 200-9 and 300-11.

By comparison with other amphibian species, at least six different fucosyltransferase activities, such as Kdn: $(\alpha 1-4)$

Residue	Reporter	Chemical shif	ts (ppm) in
	group	s D-ol	s D >-0
GaiNAc-ol I	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 CH	62.0 53.42 75.42 70.63 69.35 72.26 23.6	62.1 53.28 74.99 70.46 69.21 72.27 23.5
Gal <i>β</i> 1-3 II	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	102.37 77.44 83.37 70.09 75.93 62.2	102.33 77.72 83.57 69.95 75.76 62.2
Gai β1-3 III	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	105.59 72.31 74.14 69.90 76.44 62.2	105.44 71.57 82.59 69.95 75.97 62.2
GicNAc-6-S β1-6 ΙΙ'	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 CH ₃	102.68 56.49 81.54 69.53 74.96 68.23 23.6	102.49 56.42 81.38 69.40 74.83 68.18 23.5
GICA β1-3 ΙV	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	- - - - -	103.45 79.36 77.14 73.12 77.14 ND
Fuc a1-2 F ^{2.3}	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	101.08 70.00 70.61 73.14 68.8 16.80	101.13 69.74 70.45 73.2 68.73 16.8
Fuc a1-2 F ^{2.3.3}	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6		100.08 69.74 70.70 73.2 68.16 16.8
Fuc a1-3 F ^{3.6}	C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6	101.31 69.34 70.76 73.14 68.20 16.50	101.15 69.23 70.70 73.2 68.14 16.50



Scheme 1

FucT [7], Fuc(α 1-4) Kdn: (α 1-2) Fuc T [13], Fuc(α 1-4)Kdn: (α 1-3) Fuc T [7,13], Kdn: (α 1-5) Fuc T [14], Gal(α 1-3)Gal: (α 1-2) Fuc T [10] and Gal (α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal: (α 1-2) Fuc T [10], can be identified. According to these observations, amphibian tissues could become an excellent model for studying the relation between the structure and the specificity of this class of enzyme.

Acknowledgements

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte n°111, Relations structure-fonction des constituants membranaires, Director Professor André Verbert) and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Doina Florea is a fellow

Maes et al.

of the European Community (Tempus Programme PEC JEP-4398/92-95; Coordination : Dr Rita Barot).

References

- 1 Jego P, Joly J, Boisseau C (1980) Reprod Nutr Develop 20: 557-67.
- 2 Freeman SB (1968) Biol Bull 135: 501-13.
- 3 Katagari C (1987) Zool Sci 4: 1-14.
- 4 Wyrick RE, Nishihara T, Hedrick JL (1974) Proc Natl Acad Sci USA 71: 2067-71.
- 5 Shimoda YK, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y (1994) Eur J Biochem 223: 223-31.
- 6 Strecker G, Wieruszeski JM, Alonso C, Michalski JC, Boilly B, Montreuil J (1992) FEBS-Lett 298: 39-43.
- 7 Strecker G, Wieruszeski JM, Michalski JC, Alonso C, Leroy Y, Boilly B, Montreuil J (1992) Eur J Biochem 207: 995-1002.
- 8 Strecker G, Wieruszeski JM, Michalski JC, Montreuil J (1992) Biochem J 287: 905–9.
- 9 Strecker G, Wieruszeski JM, Fontaine MD, Plancke Y (1994) Glycobiology 4: 605–9.
- 10 Strecker G, Wieruszeski JM, Plancke Y, Boilly B (1995) Glycobiology 5: 137-46.
- 11 Maes E, Wieruszeski JM, Plancke Y, Strecker G (1995) FEBS Letters 358: 205-10.
- 12 Plancke Y, Wieruszeski JM, Boilly B, Strecker G (1994) Cienca et cultura (Brazil) 46: 273-9.

- 13 Fontaine MD, Wieruszeski JM, Plancke Y, Delplace F, Strecker G (1995) Eur J Biochem 231: 424-33.
- 14 Maes E, Plancke Y, Delplace F, Strecker G (1995) Eur J Biochem 230: 146–56.
- 15 Plancke Y, Wieruszeski JM, Alonso C, Boilly B, Strecker, G (1995) Eur J Biochem 231: 434–39.
- 16 Zanetta JP, Breckenridge WC, Vincendon G (1972) J Chromatogr 69: 291-304.
- 17 Clamp JR, Bhatti T, Chambers RE (1971) Methods Biochem Anal 19: 229-344.
- 18 van Halbeek H, Dorland L, Vliegenthart JFG, Fiat AM, Jollés P (1980) Biochim Biophys Acta 623: 295-300.
- 19 Capon C, Leroy Y, Wieruszeski JM, Ricart G, Strecker G, Montreuil J, Fournet B (1989) Eur J Biochem 182: 139-52.
- 20 Dickenson JM, Huckerby TN, Nieduszynski IA (1990) Biochem J 269: 55-59.
- 21 Strecker G, Wieruszeski JM, Martel C, Montreuil J (1989) Carbohydr Res 185: 1-13.
- 22 van Halbeek H, Dorland L, Vliegenthart JFG, Hull WE, Lamblin G, Lhermite M, Boersma A, Roussel P (1982) Eur J Biochem 127: 7-20.
- 23 van Halbeek H, Strang AM, Lhermite M, Rahmoune H, Lamblin G, Roussel P (1994) Glycobiology 4: 203-19.

Received 6 December 1995, revised 24 January 1996, accepted 11 March 1996

Rana temporaria 152



Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189

CARBOHYDRATE RESEARCH

Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria* Characterization of the sequence $HSO_3(3) GlcA(\beta 1-3) Gal$

Doina Florea^a, Emmanuel Maes^b, Gérard Strecker^{b,*}

^a Departement de Biochimie, Université de Bucarest, Spl. Independentei No. 91–95, 75201 Bucarest, Romania

^b Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche No. 111, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Received 17 March 1997; accepted 22 April 1997

Abstract

The mucins isolated from *Rana temporaria* egg jelly coats were found to be composed of Gal, Fuc, GlcNAc, GalNAc and GlcA acid. The primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols was obtained by 1D/2D NMR analyses (¹H-¹³C). The results show the presence of the sulfated monosaccharides HSO₃(3)Gal, HSO₃(6)GlcNAc and HSO₃(3)GlcA. The sequence HSO₃(3)GlcA(β 1-3)Gal, which constitutes the major determinant of the HNK-1 oncofectal epitope, was characterized. © 1997 Elsevier Science Ltd.

Keywords: Sulfated-oligosaccharides; NMR; Amphibian; Egg jelly coat

1. Introduction

The jelly envelopes deposited around amphibian eggs are composed of mucin-type glycoproteins which constitute the first barrier for fertilizating sperm. They play a role in species specificity of sperm-egg interaction, sperm capacitation, acrosomal reaction and prevention of polyspermy. The jelly coat retains Ca^{2+} ions necessary for successful fertilization and also ensures an embryonic protection [1-8].

Recent works have demonstrated that the carbohydrate chains of these mucins are highly speciesspecific [8–19]. We previously reported the primary structure of seventeen oligosaccharide-alditols from the oviducal mucin of *Rana temporaria*, which contained sulfate and glucuronic acid. Here we describe new compounds characterized by the presence of O-3 sulfated glucuronic acid.

Corresponding author.



2. Experimental

The jelly coat was lyophilized and the crude material was subjected to alkaline borohydride degradation in 1 M NaBH₄, 0.1 M NaOH, pH 12.6 at 37°C for 48 h. The reaction was stopped by DOWEX 50W-X8 (Mesh 25–50, H⁺ form) until neutral pH at 4°C. After filtration, the filtrate was adjusted at pH 6.5 and concentrated under vacuum. Boric acid formed was removed by co-distillation (3 times) with anhydrous MeOH.

The material was further fractionated on DOWEX 1-X2 (mesh 200-400, HCOO⁻ form). After water elution of neutral compounds, acidic oligosaccharides were desorbed with pyridine acetate buffer (pH 7.6), from 50 mM to 1000 mM. Each fraction was applied tò a Bio-Gel P2 column $(1 \times 100 \text{ cm})$ and eluted with water at a flow rate 15 mL h^{-1} . The acidic oligosaccharides were isolated by high performance liquid chromatography (HPLC) on primary-bond silica (Supelco LC-NH2; 4.6 mm × 25 cm, Supelco Inc., Belefonte, USA) using acetonitrile/30 mM potassium phosphate buffer pH 5.2 with a flow rate of 1 mL/min. The oligosaccharide-alditols were detected by spectroscopy UV at 206 nm. Several fractions were obtained at various concentration according to anionic charge of oligosaccharides (Fig. 1). Peaks were collected, desalted on Bio-Gel P2 (1 cm \times 80 cm) and lyophilized.

Sugar analysis was carried out by GLC of trifluoroacetylated derivatives of methylglycosides formed by methanolysis in 0.5 M hydrochloric acid in MeOH at 80°C for 24 h according to Zanetta et al. [20].

The 400 MHz 'H NMR experiments were performed on a Bruker AM-400WB spectrometer with 5 mm ${}^{1}H^{-13}C$ mixed probe head operating in the pulse Fourier-transform mode and controlled by an Aspect 3000 computer. After two exchanges with D₂O (99.95% atoms ²H, Aldrich) and intermediate lyophilization, the samples were analysed with a spectral width of 3000 Hz for 16 k frequency domain points and time domain data point 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 relative the methyl signal of internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm for ¹H and $\delta = 31.55$ ppm for ¹³C) in D₂O at 300°K. The two dimensional homonuclear correlation spectroscopy (COSY) with simple and double relay transfer, the heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and rotating-frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (ROESY) experiments were



Fig. 1. HPLC profiles of oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coat of *Rana temporaria*.

performed using Bruker standard pulse sequences. For ROESY experiments, the mixing time was set at 300 ms.

Mass measurements of matrix O-glycan-alditols were performed by matrix assisted laser desorption and time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) on a Vision 2000 (Finnigan Mat, Hemel) instrument in reflection mode (nitrogen laser: 337 nm). Samples were dissolved in water at a concentration of 50–100 pmol μL^{-1} and 1 μL of these solutions were mixed with 1 μL of matrix on to the target then allowed to crystallize at room temperature. The structures were mass analysed in the negative mode using 3aminochinolin matrix (10 mg mL⁻¹ in H₂O:EtOH 90:10). Ten to 15 shots were accumulated for each analysis.

3. Results and discussion

Fig. 1 depicts the HPLC profiles of fractions 500, 600 and 1000 mM desorbed from the anion exchange column. Sixteen major peaks were characterized, but several compounds were actually isolated in two different sub-fractions.

Compound 1 (600 mM-3).—From the methanolysis of compound 1 the molar ratio composition was found to be Kdn, Gal and GalNAc-ol in the molar ratio 1:1:1. The presence of sulfate was deduced from the MALDI-TOF analysis, which exhibited a pseudo molecular ion $[M - H]^-$ at m/z 724. The sulfate was discriminated from phosphate on the basis of the absence of coupling between proton and phosphorus. The O-6 substitution of the GalNAc unit with Kdn is clearly defined by the characteristic H-3 ax and H-3 eq signals of the Kdn residue as well as the significant upfield shifted value of the GalNAc-ol H-6b resonance (Fig. 2 and Table 1) [18]. The O-3 sulfation of the Gal unit is deduced from the set of its H-3 and H-4 signals [21]. So, the sequence of compound 1 was determined as follows:



Compound 2 (600 mM-1).—The chemical shifts (Fig. 2 and Table 1) of the H-2 and H-5 atom resonances of the GalNAc-ol unit are characteristic of an O-3 and O-6 substituted unit (type 2 core). The structural reporter groups of the Gal residues are superimposable on those observed in the sequence $HSO_3(3)Gal(\beta 1-4)[Fuc(\alpha 1-2)]Gal\beta 1-3$ previously described [18]. The second branch of the compound was characterized by NMR signals already observed in two compounds which possess the common sequence: $HSO_3(6)[Fuc(\alpha 1-3)]GlcNAc(\beta 1-6)$ [19]. Therefore, the sequence of compound 600 mM-1 was established as follows:



Compound 3 (compound 1000 mM-5).—From the MALDI-TOF analysis, compound 3 contains 2 Gal, 1 GlcA, 1 GalNAc-ol and 1 sulfate residue. The structural reporter groups of GalNAc-ol (H-2, H-4 and H-5) are consistent with an O-3 substituted hexosaminitol unit (Fig. 2 and Table 1). Comparison of the NMR spectrum of 3 with that of compound 200-7 previously identified as HSO₃(3)Gal(β 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc-ol [18] shows similar chemical shifts for the Gal linked to GalNAc-ol, particularly the H-1 and H-4 signals which are respectively observed at $\delta = 4.497$ (H-1, 3), $\delta = 4.503$ (H-1, 200-7), $\delta = 4.185$ (H-4; 3) and 4.200 (H-4, 200-7). The attachment of GlcA at O-3 of Gal III is deduced from the chemical shifts of Gal III H-4 signal at $\delta = 4.165$. Indeed, the H-3 and H-4 signals of Gal O-3 substituted with GlcA have been observed at $\delta = 3.82$, 3.78 or 3.82 (H-3) and $\delta = 4.173$, 4.142 or 4.169 (H-4) for compounds having the common sequence Fuc($\alpha 1-2$)GlcA($\beta 1-3$)Gal [18]. Such an observation was also found for compound 4 (see below), for which a complete NMR assignment has been performed by ¹H-¹H correlation spectroscopy. The signal observed at $\delta = 4.327$ ppm was ascribed to GlcA H-3, according to the comparison of the spectra of 4 and 5 and this downfield shifted value can be easily interpreted as resulting from the O-3 sulfation of the Glucuronic acid unit. Consequently, the sequence of 3 was deduced to be following:



Compound 4 (600 mM - 6).—From the two-step relayed COSY spectrum depicted in Fig. 3 and Table 1, compound 4 can be defined as an extension of 3 with an additional α Fuc, attached at O-2 of Gal II unit. Indeed, the Chemical shifts of the H-2, H-3 and H-4 of this Gal unit perfectly match those of the



D. Florea et al. / Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189

Fig. 2. 1 H NMR spectra of compounds 1, 2, 3.

D. Florea et al. / Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189

Table 1 ¹H NMR chemical shifts of the sulfated oligosaccharide-alditols^a

				HSQ.77	NEGLER AND CONTRACT		NEOR B CO	
		1	2	3	4	5	6	7
GalNAc-ol I	H-la,lb	n.d.	n.d.	n.d.	3.788	3.806	3.792	3.792
	H-2	4.383	4.348	4.387	4.389	4.388	4.332	4.332
	H-3	4.084	4.098	4.063	4.079	4.080	4.104	4.057
	H-4	n.d.	3.556	3.531	3.528	3.527	3.570	3.534
	H-5	4.244	4.210	4.19	4.150	4.088	4.120	4.120
	H-6a,6b	n.d./3.462	3.940	n.d.	3.676/3.630	3.665/3.636	3.672/3.644	3.672/3.644
	NAc	2.043	2.056	2.049	2.044	2.044	2.047	2.051
Gal II	H-1	4.588	4.698	4.497	4.587	4.591	4.680	4.576
	H-2	n.d.	n.d.	n.d.	3.824	3.816	3.953	3.756
	H-3	4.340	4.030	n.d.	3.972	3.970	4.108	3.967
	H-4	4.269	4.233	4.185	4.193	4.180	4.451	4.138
	H-5	n.d.	n.d.	n.d.	3.760	3.761	n.d.	n.d.
Gal III	H-1	-	4.725	4.639	4.653	4.690	4,700	4.627
	H-2		n.d.	n.d.	3.743	3.851	3.781	3.635
	H-3	_	4.336	n.d.	3.810	3.903	3.810	3.857
	H-4	_	4.290	4.165	4.157	3.882	4.187	4.393
Gal V	H-1	-	_		_	4.811	4.869	4,954
	H-2	-	_			3,544	3.558	3.678
	H-3	-	_	-	_	3.693	3.696	3.914
	H-4	_		-	_	3.894	3.895	3.862
GlcNAc II'	H-1	_	4.651	-		_	-	-
GIUNACII	H-2	-	3.841	_	_	_		-
	H-6a	_	4.368		-		_	_
	H-6b	_	4.280	_		-		
	NAc	_	2.041			_		-
GlcA IV	H-1	_	_	4,761	4,761	4,752	4,775	4719
	H-2		-	n.d.	3.589	3.612	3.612	3.636
	H-3	_		4 327	4.330	4 329	4.335	4 333
	H-4	_	_	n.d.	3.695	3.765	3.701	3.771
	H-5	_	-	n.d.	3,791	3.772	3.798	3,798
Fuc II'	H-1	_	4,990		_	_	-	_
	H-5	_	4.348	_		_	_	
	CH.	_	1.163	_	-	_	_	-
Fuc II	H-1	_	5 371	-	5.285	5.286	5.397	5.273
	H-2	_	n.d.	-	3.808	3.807	3,780	3.803
	H-3	_	3 912		3 923	3.919	3.928	3.913
	H-4		n.d.	_	3.831	3.825	3.799	3.831
	H-5		4 281		4.281	4.277	4.285	4.513
	CH.	_	1 2 3 8	-	1 241	1 241	1 238	1 277
Fuc V	H-1		-	_	_	-	_	5 443
	H-2	_	_	-	_	_	_	3.78
	H-3	_	_	~		_	_	3 995
	H-4	_		_		_	_	3 826
	H-5	_	_	_		_	_	4 285
	CH.	_	_	_	_	-	_	1 238
Kdn	H-32	1 654	-	- -			_	-
	H-3e	2.673		_	_	-		

^a The monosaccharides are represented by this symbolic notation: $\Diamond - ol = GalNAc - ol$, $\triangle = \alpha Kdn$, $\blacksquare = \beta Gal$, $\Box = \alpha Fuc$, $\bigotimes = \beta GlcA$, and $\bigodot = \beta GlcNAc$. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows: and n.d. = not determined.

⁶ 54 2

Gai(β1-4) Gai(β1-3) GicA(β1-3) Fuc(α1-2) HSO,(3)

GalNAc-ol

4 (600 mM-6)

D. Florea et al. / Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189

signals observed for compound 200-8 (HSO₃(3)-Gal($\beta 1-4$)[Fuc($\alpha 1-2$)]Gal($\beta 1-3$)GalNAc-ol) previously described [18]. As discussed above for 3, the structural reporter groups of Gal III are typical of an O-3 substitution with GlcA, itself sulfated at O-3 ($\delta_{H-3} = 4.330$). From these data, the sequence of 4 was established as follows:



Fig. 3. COSY spectrum of compound 4.

Compound 5 (500 mM-1).—The 2D NMR spectrum (Fig. 4 and Table 1) of 5 shows the presence of 3 Gal (II, III, V), 1 GlcA (IV), 1 GalNAc-ol (I) and 1 Fuc (F) units. The O-3 sulfation of GlcA was verified because of the downfield shifted value of its H-3 signal ($\delta = 4.329$). By comparison of the spectrum with that of 4, a deshielding effect can be observed which affects the Gal III H-4 signal ($\Delta \delta = +0.275$ ppm), and shows the possible O-4 substitution with the additional Gal V unit. As indicated by the set of the H-2, H-3 and H-4 atom resonances the Gal V unit occurs in a terminal position. The NOE contacts

which are observed on the ROESY spectrum are: Fuc $H-1 \rightarrow Gal$ II H-2; Fuc $H-1 \rightarrow Gal$ II H-3; Gal II $H-1 \rightarrow GalNAc$ -ol H-2; Gal II $H-1 \rightarrow GalNAc$ -ol H-3; Gal III $H-1 \rightarrow Gal$ III $H-1 \rightarrow Gal$ III H-4 (strong); GlcA IV $H-1 \rightarrow Gal$ III H-3 and Gal V $H-1 \rightarrow Gal$ III H-4. On the basis of these data, the following sequence was deduced:





Fig. 4. COSY and ROESY spectra of compound 5.


D. Florea et al. / Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189



D. Florea et al. / Carbohydrate Research 302 (1997) 179-189



The MALDI-TOF analysis confirms the presence of two compounds, having pseudomolecular ions [M -H]⁻ at m/z 1148 (3 Gal, 1 Fuc, 1 HexA, 1 GalNAc-ol, 1 sulfate) and 1294 (3 Gal, 2 Fuc, 1 HexA, 1 GalNAc-ol, 1 sulfate). The monosaccharides were identified on the basis of the set of their vicinal coupling constants, as depicted on the relayed COSY spectrum (Fig. 5). The H-2, H-3 and H-4 atom resonances of the 11 monosaccharides and the 2 GalNAc-ol residues characterized on the 2D spec-



Fig. 6. HMQC spectrum of compounds 6 and 7.

Table 2		
¹³ C NMR chemical shifts of oligosaccharide-alditol	s 6	and
7 (symbols as in Table 1)	•••	

Residue			
		بیمیمب ⁹⁶	**so,ar ⁷ ² 7
GalNAc-ol I	C-1	~ 61.5	~ 61.5
	C-2	53.07	53.25
Gal II	C-3	75.36	76.02
	C-4	70.49	70.05
	C-5	70.73	70.73
	C-6	~ 63.7	~ 63.7
	NAc	23.65	23.65
	C-1	102.65	103.38
	C-2	~ 71	80.43
	C-3	82.77	74.12
	C-4	77.23	79.23
Gal III	C-6 C-1 C-2	~ 61.5 105.49 ~ 71	n.d. ~ 61.5 105.72 75.40
Gal V	C-3 C-4 C-1 C-2 C-3 C-4	69.50 104.31 72.60 73.91 ~ 70	84.07 74.85 102.19 76.11 75.74 ~ 70.6
GlcA IV	C-5	~ 73	~ 73
	C-6	~ 62	~ 62
	C-1	104.64	105.31
	C-2	~ 73	~ 73
	C-3	85.05	85.05
	C-4	71.75	71.75
Fuc II	C-5	77.50	77.50
	C-1	101.45	102.36
	C-2	69.64	69.64
	C-3	~70	70.65
Fuc V	C-4	n.d.	~ 69
	C-5	69.04	69.74
	C-6	16.79	16.98
	C-1		99.56
	C-2	-	69.64
	C-3	-	70.65
	C-4	-	73.19
	C-5 C-6	-	67.85 16.79

trum were fully assigned (Table 1), and the values for most of the ¹³C resonances were recorded from the HMQC spectrum (Fig. 6 and Table 2). The relative low-field position of some ¹³C resonances, compared with their position in the spectra of the corresponding non-substituted monosaccharides, were caused by glycosylation and revealed the substitution pattern in the polymer [22]. These data show the following substitutions: 3-GalNAc-ol; 2, 3, 4-Gal II_A; 3-Gal III_A; 3-Gal III_A; 3-GlcA IV_A; 2, 4-Gal II_B; 3, 4-Gal III_B; 3-GlcA IV_B, 2-Gal V_B and Gal V_A, Fuc II_A, Fuc II_B and Fuc

 V_B as terminal sugar units. From the ROESY spectrum depicted in Fig. 7 the following connectivities were easily observed: H-1 $V_A \rightarrow$ H-4 II_A; H-1 II_A \rightarrow H-3 I_A; H-1 Fuc II_A \rightarrow H-1, H-2, H-3 II_A and H-1





Fuc $V_B \rightarrow H-2 V_B$; H-1 $V_B \rightarrow H-4 III_B$; H-1 $III_B \rightarrow H-4 II_B$; H-1 $III_B \rightarrow H-3 I_B$; H-1 $IV_B \rightarrow H-3 III_B$; H-1 Fuc $II_B \rightarrow H-2 II_B$, H-3 II_B .

From the data obtained on the basis of these three different NMR experiments, the sequences proposed above were fully established.

In conclusion, this study has confirmed the structural species-specificity of carbohydrate chains which represent more than 75% of the oviducal mucins of Amphibians. [8–18]. In some cases, these mucins are available sources of 'human' antigens, such as Le^X and Le^Y (*Pleurodeles waltl*) or blood group substances [10]. This polymorphism should be of great interest for recognizing phenotypic variants of some species [14,19]. The mucin of *Rana temporaria* is characterized by the presence of sulfate and glucuronic acid which are responsible of the negative charge of the macromolecule. The sulfated oligosaccharide HSO₃(3)GlcA(β 1–3)Gal is a part of the HNK-1 epitope, first described as an antigen of human natural killer cells [23–26].

Acknowledgements

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte No. 111, Relations structure-fonction des constituants membranaires, Director Professor André Verbert) and by the Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche. Doina Florea is a fellow of the European Community (Tempus programma PEC JEP-4398/92-95; Coordination: Dr. Rita Barot). We thank Dr. Jérôme Lemoine (UMR111), for recording the MALDI-TOF spectra.

References

- P. Jego, J. Joly, and C. Boisseau, *Reprod. Nutr. Develop.*, 20 (1980) 557-567.
- [2] J.L. Hedrick and T. Nishihara, J. Electro. Micros. Tech., 17 (1991) 319-335.
- [3] R.E. Wyrick, T. Nishihara, and J.L. Hedrick, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 (1974) 2067–2071.
- [4] S.B. Freeman, Biol. Bull., 135 (1968) 501-513.

- [5] C. Katagari, Zool. Scien., 4 (1987) 1-14.
- [6] J.L. Hedrick and C. Katagari, J. Exp. Zool., 245 (1980) 78-85.
- [7] K. Ishihara, J. Hosono, H. Kamatari, and C. Katagari, Dev. Biol., 105 (1984) 435-442.
- [8] Y. Shimoda, K. Kitajima, S. Inoue, and Y. Inoue, Eur. J. Biochem, 223 (1994) 223-231.
- [9] G. Strecker, J.M. Wieruszeski, J.C. Michalski, C. Alonso, Y. Leroy, B. Boilly, and J. Montreuil, *Eur. J. Biochem.*, 207 (1992) 995-1002.
- [10] G. Strecker, J.M. Wieruszeski, J.M. Michalsi, C. Alonso, B. Boilly, and J. Montreuil, *FEBS Lett.*, 298 (1992) 39-43.
- [11] Y. Plancke, J.M. Wieruszeski, B. Boilly, and G. Strecker Ciência Cult., 46(4) (1994) 273-279.
- [12] G. Strecker, J.M. Wieruszeski, M.D. Fontaine, and Y. Plancke, *Glycobiology*, 4 (1994) 605-609.
- [13] E. Maes, Y. Plancke, F. Delplace, and G. Strecker, Eur. J. Biochem., 230 (1995) 146-156.
- [14] Y. Plancke, J.M. Wieruszeski, C. Alonso, B. Boilly, and G. Strecker, *Eur. J. Biochem.*, 231 (1995) 434– 439.
- [15] M.D. Fontaine, J.M. Wieruszeski, Y. Plancke, F. Delplace, and G. Strecker, *Eur. J. Biochem*, 231 (1995) 424-433.
- [16] W. Morelle and G. Strecker, *Biochem. J.*, 321 (1997) 879–887.
- [17] W. Morelle and G. Strecker, *Glycobiology* (1997), in press.
- [18] E. Maes, D. Florea, F. Delplace, J. Lemoine, Y. Plancke, and G. Strecker, *Glycoconj. J.*, 14 (1997) 127-146.
- [19] G. Strecker, J.M. Wieruszeski, Y. Plancke, F. Delplace, and G. Strecker, *Glycobiology*, 5 (1995) 137-146.
- [20] J.P. Zanetta, W.C. Breckendridge, and G. Vicendon, J. Chromatogr., 69 (1972) 291-304.
- [21] C. Capon, Y. Leroy, J.M. Wieruszeski, G. Ricart, G. Strecker, J. Montreuil, and B. Fournet, *Eur. J. Biochem*, 182 (1989) 139-152.
- [22] K. Bock and C. Pedersen, Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 41 (1983) 27-66.
- [23] A. A. Ilyas, R. H. Quarles, T. D. MacIntosh, M. J. Dobersen, B. D. Trapp, M. C. Dalakas, and R. O. Brady, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (1984) 1225-1229.
- [24] T. Abo and C.M. Balch, J. Immunol., 127 (1981) 1024-1029.
- [25] M.E. Shy, C.A. Gabel, E.C. Vietorisz, and N. Latov, J. Neuroimmunol., 12 (1986) 291-298.
- [26] H. Voshol, C.W.E.M. van Zuylen, G. Orberger, J.F.G. Vliegenthart, and M. Schachner, J. Biol. Chem., 271 (1996) 22957-22960.

2. CONCLUSION

Ces travaux ont permis d'élucider 25 structures primaires d'oligosaccharide-alditols. Ces structures possèdent certaines originalités structurales qui caractérisent cette espèce.

L'acidité des chaînes glycanniques est assurée par trois types de groupements acides : le Kdn, le sulfate et l'acide glucuronique. Si le Kdn semble être l'acide sialique majeur des chaînes glycanniques de ces animaux et les groupements sulfates fréquemment trouvées associés à l'acidité des mucines, la présence d'acide glucuronique est en outre beaucoup plus surprenante. En effet, à notre connaissance la présence de ce monosaccharide au sein de mucines n'avait jamais été décrite à ce jour.

D'une part cet acide uronique peut être substitué en 2 par un résidu de fucose ou en 3 par un groupement sulfate. Cette dernière substitution est présente dans plusieurs oligosaccharide-alditols et représente la partie terminale du déterminant antigénique oncofœtal HNK-1[#] De plus cette structure : Fuc(α 1-2)GlcA β -R traduit la présence d'une nouvelle activité glycosyltransférasique qui peut s'écrire : GDP-Fuc : α 2 GlcA fucosyltransferase.

D'autre part la présence de nombreuses structures sulfatées est en faveur d'une activité sulfotransférasique particulièrement importante dans le tissu de l'oviducte de Rana temporaria.

Cette espèce se caractérise également par la présence de structures présentant des substitutions originales comme notamment des résidus galactosyls trisubstitués en 2, 3 et 4. Ce type de substitution se traduit en R.M.N. par des déplacements chimiques tout à fait particuliers. Le séquençage de telles structures n'a pu être effectué que grâce à l'utilisation de la spectroscopie de corrélation ROESY.

Enfin la détermination structurale des chaînes oligosaccharidiques pour une espèce donnée reflète le schéma de biosynthèse de ces chaînes qui consiste en une addition séquentielle des monosaccharides. L'observation d'un tel schéma peut être faite à partir du composé 200-3 (SO₃(3)Gal(β 1-3)GalNAc-ol) qui conduit aux composés 200-7, 200-8, 100-4b et 100-6 par l'addition successive de galactose sulfate, de fucose, de galactose et enfin d'un résidu de fucose en position terminale non réductrice.

[#] HNK-1 : Human Natural Killer 1

L'espèce Rana temporaria se caractérise au travers de ses chaînes glycanniques de mucines par les éléments structuraux suivants:

- ✓ Présence d'acide glucuronique fucosylé ou sulfaté et présentant le déterminant antigénique HNK-1.
- ✓ Présence de galactose trisubstitué en 2, 3 et 4
- ✓ La charge acide est portée essentiellement par les groupements sulfates mais aussi par l'acide glucuronique et du Kdn.

En marge de cette thématique de caractérisation des espèces par leurs chaînes glycanniques, il a été mis en évidence un nouveau monosaccharide qui se caractérise en R.M.N. par la présence de proton axial et équatorial possédant des constantes de couplages et des déplacements chimiques tout à fait nouveaux. Cette observation nous a conduit à approfondir les investigations sur ce composé et a fait l'objet de l'article suivant.



<u>Rana temporaria</u>

(suite)

1. INTRODUCTION

Bien que ce travail n'entre pas directement dans le concept de la spécificité structurale des espèces. L'étude par résonance magnétique nucléaire des différents oligosaccharidealditols isolés des mucines de *Rana temporaria* a mis en évidence un nouveau composé, l'acide 4-*désoxy*-β-alluronique, alors non encore décrit dans ce type de glycannes. Les analyses R.M.N. à deux dimensions ont permis d'établir l'origine de ce composé comme étant un produit de dégradation de l'acide glucuronique.

Degradation of glucuronic acid 3-sulfate into 4-deoxy-\beta-alluronic acid

during reductive β -elimination of mucins

Emmanuel Maes^a, Doina Florea^b and Gérard Strecker^a*

^aLaboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche n°111, Centre National de la Recherche Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, FRANCE.

^b Departement de Biochimie, Université de Bucarest, Spl. Independentei n° 91-95, 75201 Bucarest, ROMANIA

* To whom correspondence should be addressed.

INTRODUCTION

We previously described a series of sulfate and glucuronic acid-containing O-linked oligosaccharides released by reductive β -elimination from the oviducal mucin of *Rana temporaria* [1, 2]. One of these oligosaccharide-alditols exhibited NMR paramaters characteristic of a new deoxysugar. The present paper describes the results of NMR investigations which led to the identity of this monosaccharide unit and chemical experiments succeptible to explain the origin of the compound.

ABSTRACT

Reductive β -elimination of the oviducal mucin from *Rana temporaria* led to the following oligosaccharide-alditol : 4-dAllA(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-3)GalNAc-ol. This compound was also obtained in a yield of 70% by treating the compound (HO)S(O)₂(3)GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-3)GalNAc-ol under the same alkaline reductive conditions. Undoubtedly, this product results from the formation of a 3, 4-epoxide and trans-diaxial opening by hydride ions.

RESULTS AND DISCUSSION

The oligosaccharide-alditol 1 was eluted with 50mM pyridine-acetate buffer from the anion-exchanger and isolated by HPLC on a primary amine-bonded column (Fig. 1). MALDI-TOF analysis in the negative mode showed a pseudo-molecular ion [M-H]⁻ at m/z 852.3, indicating a MW of 853. The COSY spectrum of 1 pointed to the presence of one α anomeric proton and three β anomeric protons. The sugars were identified as α Fuc (1 unit), β Gal (2 units) and GalNAc-ol respectively, on the basis of the set of vicinal coupling constants depicted on a two step relayed COSY spectrum (not shown). The fifth sugar unit (numbered IV) exhibited two octuplets at δ =1.817 and 2.095 (Fig. 2 and Fig. 3A), which were assigned to the H-4 ax and H-4 eq resonances of the 4-deoxysugar, owing to the connectivities depicted on the COSY spectrum. Moreover, the absence of coupling with H-6 atoms indicated the presence of a carboxyl group, in agreement with the molar composition given by the MALDI-TOF analysis (MW 853 = dHex, Hex, N-acetylhexosaminitol, dHexA : 1:2:1:1). The set of vicinal coupling constants (Table 1) was significant for the configuration ${}^{4}C_{1}$ 4-dAllo (or 4dGulo). Therefore, the sugar unit IV was identified as 4-deoxy-\beta-alluronic acid.

Origin of the 4-deoxyalluronic acid

The acid hydrolysis or methanolysis of the crude mucin did not yield trace of 4-dAllA

or dimer 4-dAllA(β 1-3)Gal. Consequently, the compound should originate from another oligosaccharide-alditol of the series. The compound **2** (Fig. 5) previously isolated from the same mucin [2] was submitted to a reductive β -elimination (at 45°C instead 37°C) and analyzed by ¹H-NMR spectroscopy. The relative intensity of NMR signals relative to compound **2** shows 70% of degradation when the same experiment is performed in NaB[²H]₄. In addition one H-4 atom is exclusively observed in equatorial position (Fig. 3B), proving than the ²H ax atom and the hydroxyl at position 3 are trans-diaxial. These observation pointed to a mechanism involving the formation of an epoxide, followed by ring-opening under the action of sodium borodeuteride :



EXPERIMENTAL

First experiment

A crude extract of mucin surrounding Rana temporaria eggs was subjected to alkaline reductive degradation in 0.1M NaOH containing 1M NaBH₄ (200ml) at 37°C during 48h. The reaction was stopped by DOWEX 50X8 (mesh 25-50; H+ form) and boric acid was eliminated as its methyl ester in the presence of methanol. Neutral and acidic fractions were further fractionated on DOWEX 1X2 (mesh 200-400; HCOO⁻ form).

Neutral oligosaccharide-alditols were eluted by water. Acidic compounds were eluted with a gradient of pyridine acetate buffer from 25 to 1000mM [1]. After gel permeation, the 50mM fraction was fractionated by High Perfomance Liquid Chromatography (HPLC) on primary bound silica (LC-NH₂; 4.6 mm X 25 cm, Supelco Inc. Bellefonte U.S.A.) using acetonitrile/30mM phosphate potassium buffer, pH 5.2, with a flow rate of 1ml min⁻¹. Oligosaccharide-alditols were detected by UV absorbance at 206 nm.

Second experiment

Compound 2 (1mg) was subjected at a alkaline reductive borohydride treatment in 0.1N NaOH containing 1M NaB[2 H]₄ (total volume 2ml) at 45°C during 48h. The reaction was stopped with acetic acid until pH 7. After gel permeation this compound was analyzed by ¹H-NMR spectroscopy.

NMR experiments

¹H-NMR experiments were performed on a Bruker AM 400-WB spectrometer with 5mm ¹H/¹³C mixed probe head operating in the pulse fourier transform mode and controlled

by an aspect 3000 computer. The chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4'-dimethyl-4-silapentane-*l*-sulfonate but were actually mesured by reference to internal acetone ($\delta^{1}H = 2.225$ ppm; $\delta^{13}C = 31.55$ ppm in D₂O at 27°C). The 2D homonuclear COSY with simple and double relay transfer, the HMQC and ROESY experiments were performed using Bruker standard pulse sequences. For ROESY experiment the mixing time was at 200ms.

Mass Spectrometry

Mass mesurements of matrix O-glycan alditols were performed by Matrix Assisted Laser Desorption and Time Of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF) on a Vision 2000 (Finnigan Mat., Hemel) instrument in reflection mode (nitrogen laser : 337 nm). Samples were dissolved in water at a concentration 50-100 pmol μ l⁻¹ and 1 μ l of these solution were mixed with 1 μ l of matrix on to the target then allowed to crystallize at room temperature. The structures were mass analyzed in the negative mode using 3-aminochinolin matrix (10 mg ml⁻¹ in water:ethanol 90:10). Ten to fifteen shots were acumulated for each spectrum.

REFERENCES

[1] Maes E., Florea D., Delplace F., Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G., Glycoconjugate

J., 14, (1997), 127-146

[2] Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Carbohydr. Res., 302, 179-189.

	H-1/1'	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6/6'	NAc
GalNAc-ol	3.821	4.392	4.085	3.534	4.154	3.672	2.045
	3.784					3.624	
$Gal(\beta 1-3)$	4.595	3.829	3.980	4.202	3.76	3.82	-
$Gal(\beta 1-4)$	4.656	3.745	3.791	4.209	3.68	3.76	-
$Fuc(\alpha 1-2)$	5.287	3.806	3.925	3.832	4.285	1.242	_
4 -dAllA(β 1-3)	4.926	3.523	4.260	1.817(ax)	4.290	-	-
				2.095(eq)			

Table 1 : 1 H and 13 C NMR data of the 4-deoxy- β -alluronic-containing oligosaccharide-alditol

Coupling constants of 4-dAllA (Hz)

 $J_{1,2} = 8 J_{2,3} = 3.4 J_{3,4eq} = 2.4 J_{4ax,4eq} = -12.5 J_{4eq,5} = 3.4$

	$J_{3,4ax} = 2.4$				$J_{4ax,5} = 9.0$		
•	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH3
GalNAc-ol	61.73	52.93	76.41	70.29	70.72	64.12	23.65
$Gal(\beta 1-3)$	103.7	80.35	74.04	78.37	75.75	62.11	_
$Gal(\beta 1-4)$	105.7	71.93	83.91	69.46	73.33	62.34	
$Fuc(\alpha 1-2)$	102.4	70.75	70.82	73.26	69.84	16.78	-
4-dAllA(β 1-3)	103	72.16	68.96	36.79	72.73	n.d.	-

•



Figure 1 : H.P.L.C. profile of the fraction « 50mM » obtained after anion exchange chromatography on Dowex 1 X 2. Compound 1 corresponds to peak 50mM-6



Figure 2 : Expended region of ¹H-NMR, from 1.7 to 2.2 ppm, of oligosaccharide-alditols 1



Figure 3 : Homonuclear COSY spectra of 4-deoxyalluronic acid-containing oligosaccharidealditols. (A) : COSY90 of compound 1 released from the mucin. (B) : One step relayed COSY of compound 1 obtained by treatment of 2 with NaOH 0.1N / NaB[²H]₄ 1M at 45°C during 48h.



Figure 4 : HMQC (A) and ROESY (B) spectra of compound 1



Figure 5 : Structure of compounds 1 and 2

2. CONCLUSION

Le composé est caractérisé en R.M.N. par la présence d'octuplés aux déplacements chimiques $\delta = 1.817$ et 2.095 ppm. Ils ont été attribués à des protons H4 axial et équatorial d'un acide alluronique sur la base des données de la spectrométrie de masse ainsi que par l'étude des corrélations et des constantes de couplages proton-proton, données par la R.M.N..

La similitude de composition avec le composé 600-6 (SO₃(3)GlcA(β 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-3)GalNAc-ol) a permis de suggérer que ce composé est issu d'une dégradation interne de l'acide sulfo-glucuronique. Cette proposition a été dans un premier temps confirmée par la recherche infructueuse de ce composé dans le matériel de départ. L'origine de ce composé a été vérifiée en soumettant le composé 600-6 à des réactions de β -élimination réductive en présence de borohydrure (NaBH₄) et de borodeutérure (NaB²H₄) sur le composé 600-6. Les composés obtenus ont été isolés et analysés en R.M.N.. Dans le premier cas, les deux protons H4 axial et équatorial ont été retrouvés identiques à ceux de la molécule de référence (50-6), alors qu'en présence de NaB²H₄, seul le proton H4 équatorial était recouvré. Cette dernière situation montre formellement que le deutérium ²H est en position axiale et qu'il entre dans une conformation trans-diaxiale avec le groupement hydroxyle en C3. La position de cet atome de deutérium résulte donc du déplacement d'un époxide par le borohydrure deutéré.

Ce résultat nous amène à sensibiliser les utilisateurs de cette méthode chimique d'isolement des chaînes O-glycanniques sur l'effet de dégradation non souhaité des chaînes contenant de l'acide sulfoglucuronique. L'isolement par cette méthode des glycannes porteurs du déterminant antigénique HNK-1 risque en effet de réduire considérablement leur rendement.



Rana palustris

1. INTRODUCTION

Troisième et dernière espèce étudiée, *Rana palustris* (Anoures) appartient au même genre que *Rana temporaria*. L'isolement et la caractérisation des structures glycanniques de cette espèce a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Dans ce dernier article, 20 isomères oligosaccharidiques neutres et acides ont été caractérisés et représentent la spécificité structurale de cette espèce. Cette fois encore, le concept de la spécificité structurale propre à l'espèce sera vérifié.

PRIMARY STRUCTURE OF 20 OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS ISOLATED FROM RANA

Palustris EGG jelly coat by reductive β -elimination.

Characterization of the type 3 backbone sequence : $Gal(\beta1,3)GalNAc\alpha$

Emmanuel MAES, Doina Florea, Alexandra Coppin and Gérard Strecker*

Laboratoire de Chimie biologique, Unité Mixte de Recherches du Centre National de Recherche Scientifique n°111, Université des sciences et technologies de Lille (Flandres-Artois), F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex France

*To whom correspondence should be addressed

INTRODUCTION

The jelly envelopes deposited around amphibians eggs are secreted products of the tubular gland cells lining the oviduct. This secretion is mainly composed of mucins type glycoproteins. This one contains more 50% of carbohydrate which are susceptible to be involved in the first steps of gamete recognition. Moreover, this material seems play a role in fertilization process such as block polyspermy in Anouran order [1-3]. Previous studies have show that the carbohydrate chains of the mucins which constitute the jellies display highly species-specific structure [4-12]. These findings are in agreement with the hypothesis of the involvement of carbohydrate chains in egg sperm interaction. Also, the abundance of these material and the similarities of their carbohydrate chains with those some rare human carbohydrate determinants (e.g. Le^Y in *Pleurodeles waltl* [4], part of HNK-1 epitope in *Rana temporaria* [13] and other blood group in several species) prompted us to investigate new amphibian species. The present paper describes the O-linked carbohydrate chains from *Rana palustris* mucin egg jelly coat.

Keys words : Amphibians, Mucins, Oligosaccharide-alditols, ¹H-NMR

Abbreviation : MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight, HPLC, high performance liquid chromatography; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GalNAc-ol, *N*-acetylgalactosaminitol; NeuAc, *N*-acetyl neuraminique acid. The monosaccharides are represented by this symbolic notation : \diamond^{-ol} : GalNAc-ol, \blacksquare : β -Gal, \diamond : α -GalNAc, \diamond : β -GalNAc, \triangle : α -NeuAc, ① : α -GlcNAc, and o: β -GlcNAc. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows : \checkmark_6



MATERIALS AND METHODS

FRACTIONATION OF OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS

Eggs from *Rana palustris* were obtained from natural spawning. The jelly coat mucins were solubilized with phosphate buffer saline (30mM) containing 0.5% (p/v) of β -mercaptoethanol during 12 hours. The solution was centrifuged and supernatant has been lyophilized. The dry material was submitted to alkaline reductive degradation in 100mM NaOH containing 1 M NaBH₄ (500mL) at 37°C during 48h.

The reaction was stopped by addition of DOWEX 50X8 (25-50 mesh, H^+ form) at 4°C, until pH 7. The solution was filtered and then concentrated. Boric acid was distilled as methyl ester in the presence of methanol, 3 times 100mL. Total material was submitted to a cationic exchange chromatography on DOWEX 50X2 (200-400 mesh, H^+ form) to remove residual peptide ;

Neutral oligosaccharide-alditols were separated from acidic alditols by fractionation on a column (40cm X 2cm) of DOWEX 1X2 (HCCO⁻ form). Acidic compounds were desorbed with pyridine-acetate buffer (pH 6.7) gradient, 50mM to 1M.

The neutral compounds were isolated by HPLC on primary amine-bonded silica (SupelcosylTM, LC-NH2; 4.6mm X 25 cm, Supelco Inc., Bellefonte USA) using a solution consisting of acetonitril-H₂O gradient (see Fig. 1) with a flow rate of 1mL/min. Acidic oligosaccharide-alditols were isolated by the same way, using a gradient of acetonitril-30mM potassium phosphate buffer, pH 5.2.

ANALYTICAL PROCEDURE

Methylation analysis was achieved as described by Ciucanu and Kerek [16].

<u>Mass spectroscopy</u>: Mass measurements of matrix O-Glycan alditols were performed by matrix assisted laser desorption and time of flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy on a Vision 2000 (Finnigan Mat., Hemel) instrument equipped with a 337 nm U.V. laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under a 6 kV accelerating voltage and positive and negative detection.

The sample was dissolved in water at a concentration of $100 \text{pmol}/1\mu\text{L}$. A $2\mu\text{L}$ sample of the analyze solution was mixed with an equal volume of the matrix solution on to target and the allowed to crystallize at room temperature. We used 2, 5 dihydrobenzoic acid (10 mg/mL, dissolved in water/ethanol, 4 :1, v/v) for neutral and acidic fractions. External calibration was performed using angiotensin I standard purchased from Sigma (mass 1296.7 Da). Between 10 and 20 shots were accumulated for each spectrum.

<u>*NMR analysis*</u>: ¹H-NMR spectroscopy was performed on a BrukerTM ASK 400 WB spectrometer. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4²-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm for ¹H and $\delta = 31.55$ ppm for ¹³C, in D2O at 300°K). The two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy (COSY), with simple and double relay transfer, the heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) and Rotating-frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (ROESY) experiments were performed using standard Bruker pulse library. For ROESY experiments, the mixing time was set at 300ms, and 90° pulse was optimized for each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

A fractionation of neutral oligosaccharide-alditols on Bio-Gel P-4 resulted in three sub-fractions N-I to N-III. The analysis of N-III indicated the presence of GalNAc-ol and Gal(β 1-3)GalNAc-ol, whereas the fraction N-I contained oligosaccharide-alditols of too hight molecular weight for easily analyzed by HPLC. This fraction will be furtherly fractionated.

The HPLC profile of fraction N-II which is depicted in Figure 1A shows more than 12 peaks. Fractions 1 to 10 were prepared in pure form and structuraly identified as will be described below.

By the same way, the acidic oligosaccharide-alditols, respectively desorbed from anion-exchanger with 80 mM (fraction 80) and 200 mM (fraction 200) of pyridine acetate buffer, were furtherly fractionated in 9 major fractions, as show in Figure 1B.

NEUTRAL FRACTION

The NMR spectrum of compound N-1 (Fig. 2 and Table 2) shows the presence of resonances relative to α -GlcNAc and β -Gal, identified on the basis of the set of the ring proton vicinal coupling constants. The *C*-6 substitution for the GalNAc-ol unit is attested by the chemical shift of H 6,6' atom resonances, both observed at δ = 3.663 ppm. The downfield shift resonance of Gal II H-4 is attributable to the *C*-4 substitution with the α -GlcNAc unit, as confirmed by methylation analysis (Table 1). Therefore, the sequence of compound N-1 was established as follows :

$\begin{array}{c} \text{GalNAc-ol} \\ \text{GlcNAc}(\alpha 1\text{-}4)\text{Gal}(\beta 1\text{-}3) \end{array} \hspace{1.5cm} \textbf{N-1} \end{array}$

Compound N-2 (Fig. 2, Table 2) consist of α -GalNAc, β -Gal and GalNAc-ol in the ratio 1:1:1. The H-2, H-3 and H-4 resonances of the β -Gal unit are identical to those

$$\begin{array}{c} \text{GalNAc-ol} \\ \text{GalNAc}(\alpha 1\text{-4})\text{Gal}(\beta 1\text{-3}) \checkmark \qquad \textbf{N-2} \end{array}$$

The compounds N-3 and N-4 (Fig. 3 and Table 2), analyzed by MALDI-TOF, consist of a trisaccharide-alditol (MW = 588) and a tetrasaccharide-alditol (MW = 734) respectively. The chemical shifts values of their protons are exactly the same as those described by van Halbeek *et al* [16] and Klein *et al* [18] for the two compounds described below. Moreover, the analyses of methyl-ether derived confirm the molar ratio of these two componds (Table 1).

The first one (N-3) possess the core class 2 and the second one (N-4) is its extension with an α -fucosyl residue ($\delta = 5.223 \text{ ppm}$; ${}^{3}J_{1,2} = 3 \text{ Hz}$) attached on the C-2 of Gal II. This substitution causes a number of shift increments which are observed for several GalNAc-ol protons (H-3 $\Delta \delta = +0.025 \text{ ppm}$, H-5 $\Delta \delta = -0.020 \text{ ppm}$ and NAc $\Delta \delta = -0.012 \text{ ppm}$). The effect of the presence of Fuc on the chemical shifts of Gal II H-1 ($\Delta \delta = +0.108 \text{ ppm}$) and GlcNAc II' ($\Delta \delta = +0.013 \text{ ppm}$) are characteristic of this substitution. The two compounds possess the following sequences :

$$\begin{array}{c} GlcNAc(\beta 1-6) \\ Gal(\beta 1-3) \\ Gal(\beta 1-3) \\ N-3 \\ \end{array} \begin{array}{c} GlcNAc(\beta 1-6) \\ Gal(\beta 1-3) \\ N-4 \end{array} \begin{array}{c} GlcNAc(\beta 1-6) \\ Gal(\beta 1-3) \\ N-4 \\ N-4 \end{array}$$

The one step relayed COSY spectrum of compound N-5 (Fig.4 and Table 2) indicates the presence of three anomeric protons, two of them having an identical chemical shift. From the set of the vicinal coupling constants of their ring protons, the monosaccharide units are respectively α -GalNAc (unit III) and β -Gal (unit II and IV). The atom resonances of GalNAcol, and particularly those of H-6,6', clearly prove the absence of C-6 substitution. A comparison with compound N-1 and N-2 clearly indicates that Gal II is C-4 substituted with α -GalNAc. The substitution of α -GalNAc is characterized by the downfield shifted resonance of its H-3 ($\Delta\delta$ = +0.111 ppm) and H-4 ($\Delta\delta$ = +0.278 ppm) atom resonances. The methylation analysis (Table 1) indicated the α -GalNAc unit to be C-3 substituted. The characteristic H-3 and H-4 resonances of this C-3 substituted α -GalNAc will help for the elucidation of the structure of following compounds of the series (Compounds N-1, N-2 and N-3). From these results, the structure of compound N-5 was established as follows :

As shown by the numbering of the monosaccharide units, reported in Table 1, compound N-8 (Fig. 5 and Table 2) is composed of two α -GalNAc (III, V), three β -Gal (II, IV, VI) and one GalNAc-ol. The H-2, H-3 and H-4 atom resonances of Gal VI are characteristics of a non-reducing terminal unit, whereas the H-4 signals of Gal II and Gal IV possess identical chemical shifts to that of the C-4 substituted Gal II unit present in compounds N-1, N-2, N-3, and N-8. The set of H-2, H-3 and H-4 resonances of two α -GalNAc III and V units matches those of C-4 substituted α -GalNAc residue present in compound N-3. Moreover, the nOe contacts respectively observed between Gal IV,H-1/GalNAc V, H-3 ; GalNAc V, H-1/Gal IV, H-4 ; Gal IV, H-1/GalNAc III, H-4 ; GalNAc III, H-1/Gal II, H-2 and Gal II,H-1/GalNAc-ol, H-3 clearly demonstrate the sequence of compound N-8 ; which was established as follows :

$$\label{eq:GalNAc-ol} GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \checkmark GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \checkmark Gal(\beta 1-3) \checkmark N-8$$

The low amount of compound N-10 (0.2mg) did not allow to record a NMR spectrum of good quality (Fig. 4). Nevertheless, the observation of three Gal H-4 resonances (II, IV, VI)

at $\delta = 4.006$ ppm and one (VIII) at 3.915 ppm indicates the presence of three C-4 substituted β -Gal and one non-reducing terminal Gal. Although the broad resonances of the anomeric protons of the three α -GalNAc units does not allow to accurately assign each of them, the presence of three H-2 signals is clearly observed, owing to their connectivities with their respective H-3 resonances. From these assignments, compound N-10 can be considered as the elongation of compound N-8 with an additional Gal(β 1-3)GalNAc unit, and therefore, its sequence was established as :

$$\label{eq:GalNAc-ol} GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \medskip GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \medskip GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \medskip Gal(\beta 1-3) \medskip Gal($$

Compound N-7 (Fig. 6 and Tables 1,2) consists of α -Fuc, β -Gal, α -GalNAc and GalNAc-ol in the molar proportion 1 :2 :1 :1. The inter-glycosidic linkages were confirmed by methylation analysis and heteronuclear ¹H/¹³C NMR spectroscopy. From these data, compound N-7 possesses a linear sequence in which the Gal IV unit is C-2 substituted with α -Fuc residue (δ C-2 Gal IV = 77.62 ppm). The presence of α -Fuc results in an upfield shift of the α -GalNAc H-2, which resonates as GalNAc H-3, and causes a strong coupling which disturbs the shape of the signals (Fig. 6). Compound N-7 can be considered as resulting from the elongation of compound N-5 with an α -Fuc unit, and, therefore, possesses the following sequence :

$$\begin{array}{c} \text{GalNAc-ol} \\ \text{GalNAc}(\alpha 1\text{-4})\text{Gal}(\beta 1\text{-3}) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1\text{-3}) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1\text{-2}) \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{N-7} \\ \end{array} \end{array}$$

ACIDIC FRACTIONS

From the MALDI-TOF analysis, compound 80-1 (Fig. 7 and Table 3) contains only 1 NeuAc and 1 HexNAc-ol ($[M-H]^{-}$ at m/z = 513). The ¹H-NMR spectrum confirms clearly the following sequence, largely described in literature [16,19] :

> NeuAc (α2-6) GalNAc-oi **80-1**

The ¹H-NMR (Fig. 7 and Table 3) of compound **80-2**, support the monosubstitution at C-3 of GalNAc-ol by Gal β residue (GalNAc-ol δ H-2= 4.378, δ H-5 = 4.148), and the presence of a β GalNAc unit is reflected by its H-1 and NAc reporters at δ = 4.732 ppm (³J_{1,2} = 8Hz) and δ = 2.027 ppm respectively. The NeuAc is characterized by unusual H-3a and H-3e resonances respectively at δ = 1.929 and 2.684 ppm which are characteristic of Cad blood group determinant, as shown by Herck *et al* [15]. Consequently the primary structure of compound **80-2** was established as follows :

 $\begin{array}{c} & \text{GalNAc-ol}\\ \text{GalNAc}(\beta1\text{-}4)\text{Gal}(\beta1\text{-}3) \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{NeuAc} (\alpha2\text{-}3) \end{array} \end{array} \\ \begin{array}{c} 80\text{-}2 \end{array} \end{array}$

The ¹H-NMR spectrum of compound **80-3** (Table3) indicates the presence of two anomeric protons, 1 GalNAc-ol (characterized by its H-2, H-3, H-4, H-5 and NAc protons) and 1 NeuAc (H-3a, H-3e and NAc protons) residues. The values of NeuAc H-3a and H-3e signals at $\delta = 1.694$ and 2.728 respectively, are typical of α 2-6 linkage on core class 1. The presence of the β -Gal residue is evident from the doublet of its H-1 at $\delta = 4.584$ (³J_{1,2} = 8Hz). The presence of an α -anomeric proton at $\delta = 5.268$, a pseudo-quadruplet at $\delta = 4.262$ (H-5 Fuc) and a doublet at $\delta = 1.237$ ppm (H-6) are characteristic of an α -fucosyl residue. From the downfield shift observations (by comparison with some references [19,20]) of Gal H-1 (strong $\Delta \delta = +0.110$ ppm) and Gal H-4 (low $\Delta \delta = +0.019$ ppm) protons confirms that this residue is C-2 substituted by α -fucosyl. The following sequence proposed for 80-3 is :

The MALDI-TOF analysis of compound **80-4** suggests an apparent state of purity (pseudo-molecular ion [M-H]⁻ at m/z 878.3, Hex, HexNAc, NeuAc, HexNAc-ol, 1 :1 :1 :1). Nevertheless, the NMR spectrum (Fig. 9) clearly indicates the presence of two compounds in approximate ratio 2 :1, as confirmed by the relative intensity of anomeric protons III_A/III_B and II_A/II_B . The identification of α -GlcNAc III_A is based upon the set of its ring atom vicinal coupling constants. The H-4 signal of Gal II_A is representative of an *C*-4 substitution and the intensity of the GalNAc-ol I_A H-6 and H-6' (The chemical shifts of which being characteristic of an *C*-6 substitution with NeuAc) allows to associate these three units in the same molecule. Therefore, the sequence of compound **80-4A** is established as follows :

NeuAc(α 2-6) GalNAc-ol GicNAc(α 1-4)Gal(β 1-3) **80-4A**

The second oligosaccharide (80-4B) is characterized by the presence of an α -GalNAc unit (II_B), as indicated by the coupling constants of the ring protons. The characteristic H-3a and H-3e resonances of the second NeuAc residue are representative of an α 2-3 linkage. The absence of *C*-6 substitution of the GalNAc-ol I_B unit is verified by its H-6,6' resonances, both observed at δ =3.743 ppm. From the characteristic strong downfield shift of Gal II_B H-3 the NeuAc unit is attached at *C*-3 of Gal II_B. Therefore, the sequence of compound **80-4B** was established as follows :

GalNAc-ol
GalNAc(
$$\alpha$$
1-4)Gal(β 1-3) \checkmark
NeuAc(α 2-3) \checkmark 80-4B

Fraction 80-5 (Table 3 and Fig. 10) contains one major compound (70%) composed of β -Gal, α GalNAc, α -NeuAc and GalNAc-ol. The NMR parameters relative to β -Gal and α -GalNAc are superimposable with those of the compound N-2 (Gal(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAcol) and the H-3a and H-3e signals of the NeuAc unit are specific of the α -2,6 linkage to GalNAc-ol, that is also confirmed by the chemical shifts of the H-2, H-5 and H-6' signals of GalNAc-ol. Therefore, the sequence of compound 80-5 is as follow:



From the MALDI-TOF analysis, ([M-H]- at m/z 1032), compound **200-5** is composed of Hex, HexNAc, HexNAc-ol and sulfate, or phosphate, in the ratio 2 :2 :1 :1. From the relayed COSY spectrum (Fig. 9), the sugar unit can be easily identified as β-Gal (unit II and IV), β-GlcNAc (unit II'), α-GalNAc (unit III) and GalNAc-ol (unit I). The characteristic downfield shifts of GlcNAc H-6, H-6', as well as the absence of ³JH_{H,P} coupling constant, confirm the C-6 sulfation of GlcNAc. The H-6 and H-6' atom resonances of GalNAc-ol are representive of a C-6 substitution with β-GlcNAc. From these observations the compound **200-5** possess the following primary structure :

HSO₃(6)
GlcNAc(
$$\beta$$
1-6)
GalNAc-ol
GalNAc(α 1-4)Gal(β 1-3)
Gal(β 1-3)

The MALDI-TOF analysis of fraction 80-7 shows the presence of two compounds which contain respectively 2 Hex, 1 HexNAc, 1 NeuAc and 1 GalNAc-ol (compound 80-7A, [M-H]- at m/z 1040) and 2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc and 1 GalNAc-ol (compound 80-7B, [M-H]⁻ at m/z 1243). The hexose and N-acetylhexosamine units were respectively identified as β -Gal (II_{A,B}, IV_A, IV_B), α -GalNAc (III_A, III_B) and β -GalNAc (V_B), on the basis of the set of their ring proton coupling constants (Fig. 12). Although the anomeric protons of GalNAc III_A and III_B possess identical chemical shifts, they can be distinguished owing to their respective H-3 and H-4 atom resonances. From the intensity of the H-1 signals of Gal IV_A and Gal IV_B, the ratio of the two compound 80-7A and 80-7B can be established as approximately 2 :1. The relative intensity of the cross peaks III_A and III_B allows to assign the resonances belonging from each compound. Although the H-2, H-3 and H-4 signals relative to Gal II_{A,B} possess identical chemical shift, the high intensity of the Gal II_{A,B} anomeric proton clearly shows that it belongs from the two oligosaccharides.

Moreover, the GalNAc-ol H-6 and H-6' signals, observed at $\delta = 3.849$ and 3.510 ppm for A, and both at $\delta = 3.664$ ppm, for B allows to precise the C-6 substitution with NeuAc for the former, whereas the later is C-3 monosubstituted. The H-2, H-3 and H-4 resonances of Gal IVA are superimposable with those of the terminal Gal found in compounds N-5 and N-8, and the resonances belonging from Gal IIA, B are representative a C-4 substitution. In both compounds α GalNAc is clearly C-3 substituted. Frm these observations, the sequences of 80-7A and 80-7B were deduced to be following :

NeuAc (
$$\alpha$$
2-6)
GalNAc-ol
GalNAc(α 1-4)Gal(β 1-3)
Gal(β 1-3)
80-7A
$$GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \ GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \ Solution \ Solution\ \ Solution \ Solution \ Solution \ Solution \$$

Compound 80-6, with [M-H]⁻ at m/z 1040 (MW = 1041), can be considered as a pentasaccharide-alditol composed of sialic acid, 2 Hex, 1 HexNAc and 1 N-acetylhexosaminitol. From the 1D NMR spectrum, (Fig. 8, 11 and Table 3) and the relayed COSY spectrum (not shown), these sugar unit were identified as α -NeuAc, β -Gal and α -GalNAc, on the basis of the set of the ring coupling constants. The set of GalNAc H-2, H-5 and H-6 atom resonances is characteristic of substitution at C-3 by β -Galactosyl residue. A comparison of the NMR spectra of compounds N-5 and 80-6 clearly shows that 80-6 is an extension of N-5 with NeuAc unit. Indeed, the chemical shifts of the ring atoms of Gal II and GalNAc III match those of the same sugar units which compose the neutral oligosaccharide-alditol N-4. The set of NeuAc H-3 signals is present at $\delta = 1.789$ (H-3a) and $\delta = 2.763$ (H-3e), which is specific for NeuAc in α 2-3 linkage to Gal IV, the H-3 signal of it being itself downfield shifted at 4.087 ppm. The nOe contacts $(1^{IV} \rightarrow 2^{III}, 1^{IV} \rightarrow 3^{III}, 1^{III} \rightarrow 4^{II}$ and $1^{II} \rightarrow 3^{I}$) depicted in figure 11 are in good agreement with the following sequence :

$$GalNAc-ol GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3) \label{eq:GalNAc-ol} Gal(\beta 1-3) \label{eq:GalNAc-ol} Sal(\beta 1-3) \label{eq:GalNAc-ol} NeuAc(\alpha 2-3) \label{eq:GalNAc-ol} 80-6$$

The fraction 80-8 is a mixture of two oligosaccharide-alditols which possess the same molecular weight ([M-H]⁻ at m/z 1186) and the same composition. Indeed, the presence of two α -NeuAc units, respectively attached to *C*-6 of GalNAc-ol and at *C*-3 of Gal IIB can be easily deduced from the chemical shift of the respective structural-reporter groups : NeuAc H-3a, H-3e, GalNAc-ol H-5, H-6, H-6' and Gal IIB H-3 (Fig. 13 and Table 3).

For both 80-8A and 80-8B, the attachment of Fuc at C-2 of Gal IV is evident from the characteristic set of Gal IV H-2, H-3 and H-4 signals. Moreover, the strong coupling which affects the H-2 and H-3 resonances of α -GalNAc unit (δ H-2 = 4.190, δ H-3 = 4.190) and which was already observed for compound N-7 can be considered as characteristic for the sequence Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-4). Consequently, the two compounds 80-8A and 80-8B can be considered as an extension of N-7 with a NeuAc unit attached at C-6 of GalNAc-ol (80-8A) or C-3 of Gal II (80-8B). Therefore, the sequences were established as follows :





A survey of the primary structures listed in Fig. 14 clearly shows that most of them are novel and are consequently species-specific of *Rana palustris*. Indeed, previous works have proved that the carbohydrate chains released from the oviducal mucins of amphibians are highly species-specific, and be considered as phenotypic marker. One of the main characteristics of the new series of glycans is the presence of $\alpha(1-4)$ GlcNAc and $\alpha(1-4)$ GlaNAc. The terminal $\alpha(1-4)$ GlcNAc is a common feature of mucins extracted from pig stomach cell linings [22-23] and the glycan released from *R. palustris* exhibit the same terminal sequence. In opposite, the $\alpha(1-4)$ GalNAc unit which characterizes the neutral compound **N-2** can be itself substituted with β -Gal, as observed in 10 different compounds of the list. The polymerized sequence Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-4) can be substituted with terminal $\alpha(1-2)$ Fuc or $\alpha(2-3)$ NeuAc (**80-6**, **80-8**). Beside this new type of backbone sequence, the $\alpha(1-2)$ Fuc or $\alpha(2-3)$ NeuAc (80-6, 80-8). Beside this new type of backbone sequence, the presence of the blood group Cad determinant was observed in compounds 80-2 and 80-7B. Moreover, the attachment of Cad determinant to an α -1,4-linked GalNAc (compound 80-7B) has never been reported. A new type of sialylation chain, involving the α -2,3-sialylation of the peripheral or internal disaccharide GalNAc(α 1-4)Gal is also depicted in compound 80-4B and 80-8B.

Finally, these observations clearly show that the oviducal tissue of *Rana palustris* exhibit new biosynthetic pathways which are responsible of its diversity. The role of this is important in gamete recognition in fertilization process.

REFERENCES

- 1- Freeman S. B. (1968) Biol. Bull., 135, 501-513
- 2- Wyrick R. E., Nishihara T. and Hedrick J. L. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 2067-2071
- 3- Jego P., Joly J. and Boisseau C. (1980) Reprod. Nutr. Develop., 20, 557-567
- 4- Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Alonso C., Boilly B. and Montreuil J. (1992a) FEBS-Letters, 298, 39-48
- 5- Strecker G., Wieruszeski, Michalski J. C., and Montreuil J. (1992b) Biochem. J., 287, 905-909
- 6- Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Alonso C., Leroy Y., Boilly B. and Montreuil J. (1992c) Eur. J. Biochem., 207, 995-1002
- 7- Plancke Y., Wieruszeski J. M., Alonso C., Boilly B. and Strecker G. (1995) Eur. J. Biochem., 231, 434-439
- 8- Strecker G., Wieruszeski J. M., Fontaine M. D. and Plancke Y. (1994) Glycobiology, 4, 605-609
- 9- Strecker G., Wieruszeski J. M., Plancke Y. and Boilly B. (1995) Glycobiology, 5, 137-146
- 10-Maes E., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Eur. J. Biochem., 230, 146-156
- 11-Morelle W. and Strecker G. (1997) Biochem. J., 321, 879-887
- 12-Maes E., Florea D., Delplace F., Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G. (1997) Glycoconj. J., 14, 127-146
- 13-Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Carbohydr. Res., 302, 179-189
- 14-Ciucanu I. and Kerek F. (1984) Carbohydr. Res., 131, 209-217
- 15-Herkt F., Paz Parente J., Leroy Y., Fournet B., Blanchard D., Cartron J.P., van Halbeek H. and Vliegenthart J.F.G. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **146**, 125-129

- 16- van Halbeek H., Breg J., Vliegenthart J.F.G., Klein A., Lamblin G. and Roussel P. (1988)
 Eur. J. Biochem., 177, 443-460
- 17-van Halbeek H., Dorland L., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Hull W. E., Lamblin G., Lhermitte M., Boersma A. and Roussel P. (1982) Eur. J. Biochem. 127 :7-20
- 18- Klein A., Lamblin G., Lhermitte, M., Roussel P., Breg J., van Halbeek, H. and Vliegenthart J. F. G. (1988) Eur. J. Biochem., 171, 631-642
- 19- Nasir-Ud-Din, Jeanloz R.W., Lamblin G., Roussel P., van Halbeek H., Mutsaers J.H.G.M., and Vliegenthart J.F.G. (1986) J. Biol. Chem., 261 :1992-1997
- 20-Capon C., Leroy Y., Wieruszeski J.M., Ricart G., Strecker G., Montreuil J. and Fournet B. (1989) Eur. J. Biochem., 182: 239
- 21-Vliegenthart J.F.G., Dorland L. and van Halbeek H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41:209
- 22-van Halbeek H., Dorland L., Vliegenthart J. F. G., Kochetkov N. K., Arbatsky N. P. and Derivitskaya V. A. (1982) Eur. J. Biochem., 127, 21-29
- 23-Vliegenthart J. F. G., van Halbeek H. and Dorland L. (1981) Pure Appl. Chem., 53, 45



Figure 1: HPLC profiles of oligosaccharide-alditols eluted from an ion-exchanger with water for neutral compounds (A) and with 80 mM pyridine acetate buffer for acidic oligosaccharide-alditols (B). The primary-bonded silica LC-NH₂ (25 X 0.5 cm) was eluted with gradients of acetonitrile/water (A) and acetonitrile/30mM KH₂PO₄, as depicted on profiles.



Figure 2: Double relayed COSY spectra of neutral oligosaccharide-alditols N-1 (upper) and N-2 (lower).



Figure 3 : Resolution-enhancement ¹H-NMR spectrum of compound N-3.



Figure 4: Double relayed COSY spectra of neutral oligosaccharide-alditols N-5 (upper) and N-10 (lower).



Figure 5: Double relayed COSY spectrum (upper) and ROESY spectra (lower) of neutral oligosaccharide-alditols N-8.



Figure 6: COSY spectrum (upper) and HMQC spectrum (lower) of neutral oligosaccharidealditols N-7.

Figure 7 : Resolution-enhancement ¹H-NMR spectra of compond 80-1 (upper) and 80-2 (lower)

Figure 8 : Resolution enhancement 1H-NMR spectra of compound 80-6

Figure 9: Double relayed COSY spectra of compound 80-4 (upper) and 200-5 (lower).

Figure 10 : Resolution enhancement 1H-NMR spectrum of compound 80-5

Figure 11: ROESY spectrum of compound 80-6 (¹H-NMR spectrum is shown in figure 8).

Figure 12: Double relayed COSY spectrum (upper) and ROESY spectrum (lower) of oligosaccharide-alditols 80-7A and 80-7B.

NeuAc (α2-6) GalNAc-ol 80-1 GalNAc-ol GlcNAc(α1-4)Gal(β1-3) N-1 GalNAc-ol 80-2 GalNAc(β1-4)Gal(β1-3) / $GalNAc\text{-ol} \\ GalNAc(\alpha 1\text{-}4)Gal(\beta 1\text{-}3) \checkmark$ N-2 NeuAc (α 2-3) GicNAc(β1-6) Gal(β1-3) GalNAc-ol NeuAc (α 2-6) Gal(β 1-3) [Fuc(α 1-2)]_{c1} Gal(α 1-2) N-3 $\begin{array}{c} \text{GicNAc}(\beta1\text{-}6)\\ \text{Gal}(\beta1\text{-}3) \end{array} \\ \text{Fuc}(\alpha1\text{-}2) \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta1\text{-}3) \end{array} \\ \end{array}$ N-4 NeuAc (α2-6) στ GalNAc-oi 80-4A $\begin{array}{cc} & \mbox{GalNAc-oi} & \mbox{N-5} \\ & \mbox{GalNAc}(\alpha 1 \mbox{-4})\mbox{Gal}(\beta 1 \mbox{-3}) \mbox{ } \end{array}$ GlcNAc(α 1-4) Gal(β 1-3) 80-4B GalNAc-oi GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) ✓ Gal(β1-3) ✓ N-7 GalNAc-ol GalNAc-ol GalNAc-ol $Fuc(\alpha 1-2)^{I}$ NeuAc (α2-3) GaiNAc-olGai(β 1-3) $\int GaiNAc(\alpha$ 1-4 $Gai(\beta$ 1-3)]₂ N-8 80-5 NeuAc (α2-6) GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) GaiNAc-ol [GaiNAc(α1-4βai(β1-3)] Gai(β1-3) N-10 80-6 GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) ∕ Gal(β1-3) ∕ GalNAc-ol NeuAc (α2-3) 80-7A NeuAc (α2-6) 80-7B $GalNAc(\alpha 1-4)Gal(\beta 1-3)$ GalNAc(\beta 1-4)Gal(\beta 1-3) GalNAc-ol GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Gal(β1-3) NeuAc (a2-3) NeuAc (α2-6) GaiN^Δα -80-8B GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Gal(β1-3) 2)[|] NeuAc (α2-3) GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Fuc(a1-2) Fuc(a1-2) HSO₃(6) 200-5 GlcNAc(β1-6) 21 GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3)

Figure 14 : Recapitulative scheme of primary structures found in O-glycan mucin from *Rana* palustris egg jelly coat.

Table 1: Molar ratios of oligosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated oligosaccharide-alditols. A plus (+) indicates the compound was present but not quantified.

Methyl ether	Aı	Amount in oligosaccharide-alditol					
	1	2	5	7	8	10	
1,4,5,6-Me ₄ -GalN(Me)Ac-ol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
3,4,6-Me ₃ -GlcN(Me)Ac	0.9	_	-	-		-	
2,3,6-Me ₃ -Gal	0.9	1.0	1.0	0.9	2.0	2.9	
3,4,6-Me₃-GalN(Me)Ac	-	1.0	-	-		-	
2,3,4-Me ₃ -Fuc				0.9	-		
2,4,6-Me ₃ -GalN(Me)Ac	_	_	0.9	1.0	1.9	3.0	
2,3,4,6-Me ₄ -Gal		_	1.0	_	0.9	1.0	
3,4,6-Me ₃ -Gal	-	_	-	1.0	-		

		[
				•			
		€-∎∕~ <	◇■ ^				
					<u>Б</u> '		
Residue	Reporter						
<u></u>	group	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-7
GalNAc-ol I	H-1,1'	3,823/3,776	3.80	n.d.	n.d.	3.82/3.78	3.82/3.78
	H-2	4.407	4.408	4.393	4.398	4.409	4.409
	H-3	4.085	4.082	4.060	4.085	4.078	4.078
	H-4	3.537	3.536	3.465	n.d.	3.536	3.536
	H-5	4.197	4.195	4.273	4.253	4.208	4.208
	H-6,6'	3.663	3.660	n.d.	n.d.	3.66	3.66
	NAc	2.057	2.057	2.066	2.054	2.059	2.059
Gal II	H-1	4.525	4.523	4.464	4.572	4.531	4.512
	H-2	3.617	3.621	n.d.	n.d.	3.638	3.637
	H-3	3.751	3.750	n.d.	n.d.	3.762	3.749
	H-4	3.972	3.979	3.904	3.920	4.001	3.981
GicNAc III/II'	H-1	4.867	-	4.538	4,551	-	-
	H-2	3.891	-	n.d.	n.d.	-	_
	Н-3	3.805	-	n.d.	n.d.	-	-
	H-4	3.542		n.d.	n.d.	-	-
	H-5	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	-
	H-6,6'	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	
	NAc	2.089	-	2.066	2.058	-	
GaiNAc III	H-1	-	4.890	-	-	4.891	4.874
	H-2	- 1	4.166	-	-	4.345	4.18
	H-3	-	3.988	-	-	4.099	4.18
	H-4	-	4.037	-	-	4.315	4.248
	H-5	-	4.407	-	-	4.444	4.471
	H-6,6'	- 1	3.740	-		3.72	3.71
	NAc	- 1	2.089	-	-	2.076	2.101
Gal IV	H-1	- (-			4.531	4.708
	H-2	-	-	-	_	3.540	3.658
	H-3	-	-	-	-	3.638	3.848
	H-4	-		-	-	3.916	3.904
Fuc F	H-1	-	-	-	5.223	-	5.248
	H-2	- 1	-	-	n.d.	-	3.76
	H-3	- 1		-	n.d.		3.660
	H-4	-	-	-	n.d.	-	3.680
	H-5	- 1	-	-	4.275	-	4.220
	CH₃	-	-	-	1.245	-	1.196

 Table 2 : ¹H-NMR chemical shifts of the neutral oligosaccharide-alditols N-1 to N-10

		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Residue	Reporter	-	
	aroup	N-8	N-10
GalNAc-ol I	H-1.1'	3.81/3.76	3 82/3 78
	H-2	4 409	4 41
	H-3	4.088	4 09
	H-4	3.549	3 551
	H-5	4.198	4 19
	H-6,6'	3.66	3.66
	NAc	2.058	2.058
Gal II	H-1	4.538	4.537
	H-2	3.640	3.650
	H-3	3.770	3.768
	H-4	4.010	4.006
GalNAc III	H-1	4.888	4.91
	H-2	4.391	3.99
	H-3	4.137	4.13
	H-4	4.300	4.29
	H-5	4.463	4.47
	H-6,6'	3.71	3.72
	NAc	n.d.	n.d.
Gal IV	H-1	4.406	4.608
	H-2	3.597	3.602
	H-3	3.72	3.72
	H-4	4.005	4.009
GalNAc V	H-1	4.907	4.91
	H-2	4.376	3.98
	H-3	4.078	4.08
	H-4	4.300	4.29
	H-5	4.463	4.47
	H-6,6'	3.71	3.72
	NAc	2.083	n.d.
Gal VI	H-1	4.49	4.556
	H-2	3.523	3.586
	H-3	3.636	3.72
	H-4	3.916	4.006
GalNAc VII	H-1	-	4.91
	H-2	-	4.23
	H-3	-	4.13
	H-4	-	4.29
	H-5	-	4.47
	H-6,6	-	3.72
0	NAC ⊔ ∢	-	2.082
	П-1 Ц 2	-	4.40D
	⊡-∠ ⊔ າ	-	3.323 2.525
	-т-з ш <i>и</i>	-	3.030 2.015
	1 1-4	-	3,513

Table 3: ¹H-NMR chemical shifts of the acidic oligosaccharide-alditols 80-1 to 80-8 and200-5

				Δ.	Δ	∽- •I	\triangle .
		Δ .	_ _ ∽		_ ≫−ol		~oi
					0-8	\bowtie	~-
			Δ				
Residue	Reporter	I.					
	group	80-1	80-2	80-3	80-4A	80-4B	80-5
GalNAc-ol I	H-1,1'	n.d.	n.d.	n.d.	3.77	3.77	n.d.
	H-2	4.246	4.378	4.380	4.392	4.392	4.395
	H-3	n.d.	4.060	4.083	4.070	4.096	4.076
	H-4	3.407	n.d.	3.544	3.562	3.685	n.d.
	H-5	4.024	4.148	4.227	4.244	4.115	4.240
	H-6,6'	3.533(H-6')	n.d.	3.487(H-6')	3.506(H-6')	3.743	3.502(H-6')
	NAc	2.054	2.046	2.040	2.054	2.054	2.055
Gal II	H-1	-	4.564	4.584	4.521	4.559	4.520
	H-2	_	n.d.	n.d.	3.613	3.542	n.d.
	H-3	-	4.168	n.đ.	3.744	4.070	n.d.
	H-4	-	4.091	3.913	3.96	3.925	3.975
GICNAC III	H-1	-		-	4.868	-	_
	H-2	_	-	-	3.89	-	_
	H-3	_	-	-	3.824	_	_
	H-4	-	_	_	3.533	-	_
	H-5	_	_	_	4.183		_
	H-6,6'	_	_	_	3.802	_	_
	NAc	_	_		2.126	-	_
GalNAc III	H-1	_	4.732	_	_	5.070	4.900
	H-2	_	n.d.	_	_	4.362	4.168
	H-3	_	n.d.	-	_	4.083	4.032
	H-4	_	n.d.	_	_	4.278	4.051
	H-5	_	n.d.	_		n.d.	4.395
	H-6.6'	_	n.d.	-	-	n.d.	n.d.
	NAc	_	2.027	_	-	2.054	2.123
Gal IV	H-1	-	_	_		-	_
	H-2	_	_	-	_	_	_
	H-3	_	_	_	_	-	_
	H-4	-	_	-	-	_	_
GalNAc V	H-1	-	_	-	-	-	_
	H-2	_	-	-	_	_	_
	H-3	-		-	_	_	-
	H-4	_	-	-	_	_	-
	H-5	-	_	_	-	-	-
	H-6,6'	~		-	_	-	-
	NAc	-		-	-	-	
Fuc F	H-1	_		5.268	_	-	_
	H-2	-		n.d.	-	-	_
	H-3	-		n.d.	_	-	
	H-4	-		n.d.	-	-	-
	H-5	-	-	4.262	_	-	-
	CH₃	_	-	1.237	_	-	
NeuAc ³ N	H-3ax	_	1.929	-	-	1.784	-
	H-3eq	_	2.684	-	-	2.760	_
	NAc	-	2.033	-	-	2.029	-
NeuAc ⁶ N	H-3ax	1.705	-	1.694	1.684	-	1.684
	H-3eq	2.725	_	2.728	2.734	-	2.728
	NAc	2.032	_	2.033	2.034	_	2.034

			≻-oi △	
D	. .			
Residue	Reporter	20.6	00.74	00 70
	group	80-6	80-7A	80-7B
GaINAc-ol I	H-1,1'	3.78	3.78	3.78
	H-2	4.411	4.389	4.389
	H-3	4.085	4.078	4.078
	H-4	3.581	3.564	3.564
	H-5	4.203	4.246	4.203
	H-6,6'	3.671(H-6')	3.849/3.510	3.664
	NAc	2.067	n.d.	n.d.
Gal II	H-1	4.522	4.525	4.525
	H-2	3.656	3.64	3.638
	H-3	3.758	3.754	3.754
	H-4	3.994	3.996	3.996
GalNAc III	H-1	4.905	4.890	4.890
	H-2	4.328	4.349	4.349
	H-3	4.123	4.115	4.083
	H-4	4.325	4.323	4.273
	H-5	4.4	4.453	4.453
	H-6,6'	3.72	3.72	3.72
	NAc	2.076	n.d.	n.d.
Gal IV	H-1	4.603	4.573	4.611
	H-2	3.564	3.53	3.336
	H-3	4.087	3.675	4.122
	H-4	3.935	3.928	4.103
GalNAc V	H-1	-		4.731
	H-2	-	-	3.923
	H-3	_	-	n.d.
	H-4		-	3.922
	H-5		-	n.d.
	H-6,6'		-	n.d.
	NAc		_	n.d.
NeuAc ³ N	H-3ax	1.789	-	1.917
	H-3eq	2.763	-	2.669
	NAc	2.032	-	n.d.
NeuAc ⁶ N	H-3ax		1.679	-
	H-3eq	-	2.729	-
	NAc	-	n.d.	-

Table 3 continued

				s
				o -ol
		I ·	I 🗹	
Residue	Reporter			-
	aroup	80-8A	80-8B	200-5
GalNAc-ol I	H-1,1'	3.78	3.78	3.779
	H-2	4,399	4,399	4.379
	H-3	4.068	4.068	4.063
	H-4	3.55	3.55	3.474
	H-5	4.279	4.227	4.325
	H-6,6'	3.865/3.513	3.674	3.945/3.682
	NAc	n.d.	n.d.	2.066
Gal II	H-1	4.504	4.545	4.598
	H-2	3.636	3.567	3.587
	H-3	3.742	4.114	3.745
	H-4	3.971	3.957	4.000
GICNAC II'	H-1	_		4.591
	H-2	-	_	3.777
	H-3	-	-	3.702
	H-4	_	-	n.d.
	H-5	—	-	n.d.
	H-6,6'	-	-	n.d.
	NAc	-		2.066
GalNAc III	H-1	4.862	4.862	4.894
	H-2	4.190	4.190	4.196
	H-3	4.190	4.190	3.974
	H-4	4.236	4.236	4.049
	H-5	4.484	4.184	n.d.
	H-6,6'	3.683	3.683	4.441/4.353
	NAc	n.d.	2.131	2.066
Gal IV	H-1	4.771	4.771	4.465
	H-2	3.640	3.64	3.567
	H-3	3.881	3.881	3.662
	H-4	3.912	3.912	3.900
GalNAc V	H-1		4	
	H-2	-	-	-
	H-3	-	-	-
	H-4	-	-	-
	H-5	-	-	
	H-6,6'	-		
	NAc	-	-	-
Fuc F	H-1	5.234	5.234	_
	H-2	3.770	3.770	-
	H-3	3.700	3.700	-
	H-4	3.718	3.718	-
	H-5	4.218	4.218	-
	CH₃	1.193	1.193	-
NeuAc ³ N	H-3ax	-	1.796	-
	H-3eq	-	3.767	-
-	NAc	-	n.d.	_
NeuAc ⁶ N	H-3ax	1.686	-	-
	H-3eq	2.739		-
	NAc	2.036	-	-

2. CONCLUSION

L'étude de la structure primaire de 20 oligosaccharide-alditols islées des mucines oviducales de *Rana palustris*, a permis d'identifier les caractéristiques inhérentes à cette espèce. Une composition en monosaccharide a montré qu'il n'existe pas de Kdn chez cette espèce contrairement aux précédentes.

Les charges acides sont portées essentiellement par de l'acide *N*-acétyl-neuraminique et de rares groupements sulfates. Une des caractéristiques essentielles de ces chaînes est la présence de nombreuses osamines et en particulier de la *N*-acétyl-galactosamine ; celles-ci peuvent représenter jusqu'à 50% des monosaccharides totaux d'un glycanne.

Bien qu'aucune liaison O-glycosidique nouvelle n'ait été trouvée contrairement aux deux autres espèces, *Rana palustris* est caractérisée par la répétition de la séquence [Gal(β 1-3)GalNAc α]_n. Ce disaccharide représente les chaînes de type 3 essentiellement présentes sur certains glycannes de quelques glycoprotéines (Takasaki *et al* 1978). Cette particularité structurale peut être soulignée du fait de sa rareté. De plus, ces structures représentent le déterminant glucidique reconnu par la lectine PNA[#]. Enfin cette espèce possède, en plus, des chaînes glycanniques qui exhibent le déterminant antigénique rare de groupe sanguin Cad : GalNAc(β 1-4)[NeuAc(α 2-3)GlcNAc β préalablement décrit par Blanchard *et al* (1983). Son isomère GalNAc(α 1-4)[NeuAc(α 2-3)GlcNAc β constitue, par contre, une nouvelle séquence périphérique

Enfin, bien que *Rana palustris* soit phénotypiquement proche de *Rana temporaria*, selon la classification en cours, ces deux espèces possèdent des chaînes glycanniques fondamentalement différentes qui permettent d'affirmer que ces deux espèces expriment des systèmes glycosyltransférasiques complètement différentes.

En comparant les structures primaires de ces chaînes glycanniques avec celles préalablement décrites dans notre groupe, nous nous apercevons que cette espèce est l'une des rares avec *Bufo bufo* et *Xenopus laevis* à posséder de l'acide sialique comme monosaccharide acide. Cette phénotypie rapproche-t'elle ces trois espèces qui sont pourtant morphologiquement différentes ? Seule une étude génétique pourra y répondre.

Quoi qu'il en soit *Rana palustris* est caractérisée par les éléments structuraux suivants :

[#] Pea Nuts Agglutinin

- ✓ La présence de nombreuses osamines principalement de la *N*-acétyl-galactosamine, essentiellement engagées dans un déterminant structural généralement reconnu par la lectine PNA[#].
- ✓ L'expression du déterminant antigénique de groupe sanguin Cad.
- ✓ Par l'absence de Kdn.
- ✓ Et enfin par une polymérisation de la séquence Gal(β1-3)GalNAcα, encore connue comme étant le déterminant antigénique T.

CONCLUSION GENERALE

Les structures oligosaccharidiques libérées à partir des différentes mucines oviducales que nous avons étudiées durant notre thèse sont résumées en annexe.

Plusieurs conclusions peuvent être déduites de l'examen attentif de ces glycannes :

✓ D'un point de vue phylogénétique tout d'abord :

Une constatation évidente peut être dégagée de notre étude. Les glycannes de ces mucines oviducales sont spécifiques de l'espèce considérée et constituent d'excellents marqueurs phénotypiques. A partir de cette observation, l'étude des glycannes peut constituer un procédé de classification taxinomique des espèces. A cet égard un procédé simple tel que l'analyse comparative des profils chromatographiques du mélange total d'oligosaccharide-alditols libérés des mucines, peut constituer un moyen simple pour apprécier le degré de polymorphisme d'une espèce considérée.

Cette constatation trouve un éclairage particulier pour l'espèce Xenopus où nos études permettraient d'identifier et de mettre en évidence ses nombreuses sous-espèces non répertoriées dans l'arbre phylogénique.

Cette spécificité d'espèce, au travers des chaînes glycanniques, a par ailleurs été décrite chez d'autres espèces animales et notamment chez les échinodermes par l'équipe du Professeur Munrão.

✓ D'un point de vue évolution :

Les structures glycanniques constituent des marqueurs phénotypiques qui témoignent de l'évolution du génome responsable, entre autres, de l'expression des glycosyltransférases particulières et nécessaires à la biosynthèse de ces molécules. Deux monosaccharides retiendront plus particulièrement notre attention :

Le Kdn tout d'abord : Cet acide sialique particulier a été initialement découvert dans les œufs de poissons. Ce monosaccharide acide semble largement répandu chez les Amphibiens. Il est toutefois à noter une exclusion mutuelle de l'acide N-Acétylneuraminique (Neu5Ac) et du Kdn au sein d'une même espèce Ces monosaccharides constituent généralement des signaux de fin de synthèse et se situent pour cette raison aux extrémités terminales non-réductrices des chaînes glycanniques. Cette loi ne semble pas vérifiée chez les Amphibiens puisque chez *Ambystoma tigrinum*, ce monosaccharide apparaît à l'intérieur de la chaîne, substitué en l'occurrence par du fucose. Le fucose ensuite : La présence de fucose sur les glycannes revêt un intérêt particulier en ce sens que ce monosaccharide fait partie intégrante d'épitopes antigéniques tels que ceux de groupes sanguins (A, B, H et Lewis). Un grand nombre de fucosyltransférases, connues pour leur étroite spécificité, codées par des gènes différents ont été décrites chez les mammifères et chez l'homme en particulier (Costache *et al* 1997).

L'examen des structures glycanniques décrites dans ce mémoire laisse présager l'existence de nouvelles activités glycosyltransférasiques telles que la GDP-Fuc : $\alpha 1,5$ Kdn FucT chez l'*Ambystoma tigrinum* ou la GDP-Fuc : $\alpha 1,2$ GlcA FucT chez *Rana temporaria*. En raison de l'extrême diversité des liaisons et de l'agencement particulier des résidus de fucose dans les oligosaccharides décrits, nous mettons en hypothèse que la biodiversité serait le résultat de mutations successives de gènes ancestraux comme ceux des fucosyltransférases, aboutissant à l'expression de glycosyltransférases de spécificités étroites et propre à une espèce.

✓ D'un point de vue rôle biologique :

La spécificité structurale liée à l'espèce est en faveur des différents rôles biologiques généralement avancés pour les glycannes des gangues ovulaires à savoir : rôles dans les phénomènes de capacitation et reconnaissance spécifique des gamètes. Les séquences glycanniques spécifiques à l'espèce représenteraient en particulier une barrière à l'interfécondation.

Les travaux réalisés sur les mucines d'Amphibiens avaient à l'origine étaient initiés au vu de l'observation que certains glycannes porteurs d'épitopes onco-foetaux, spécifiques de certains cancers humains pouvaient être retrouvés dans des mucines d'animaux inférieurs. Cette observation avait notamment été vérifiée pour les mucines d'oiseaux qui possédaient l'épitope GalNAc(α 1,3)GalNAc spécifique du cancer du côlon chez l'homme, et le Pleurodeles qui exprime, au travers de ces mucines oviducales, l'antigène LeY : Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)[Fuc α 1-3)]GlcNAc rencontré dans de nombreux cancers de l'épithélium humain. L'hypothèse qui animait nos recherches était fondée sur le concept présentant l'ontogenèse comme étant la récapitulation de la phylogenèse impliquant certains marqueurs de développement chez l'homme sont également des marqueurs naturellement retrouvés chez les espèces animales inférieures. Cette hypothèse se vérifie pour les mucines étudiées. En particulier l'antigène HNK-1 connu comme étant un marqueur des tissus cérébraux chez

l'homme et également retrouvé associé à certains cancers, fait partie intégrante des glycannes de *Rana temporaria*.

✓ Enfin d'un point de vue structural :

Tous les oligosaccharides décrits sont potentiellement utilisables et notamment pour l'obtention d'anticorps mais encore pour leur utilisation comme compétiteurs ou substrats de réactions enzymatiques.

L'abondance du matériel glycannique obtenu à partir d'un seul animal montre une intense activité glycosyltransférasique dans les tissus de l'oviducte. Ces tissus constituent par conséquent une source non négligeable d'activités enzymatiques, souvent nouvelles, mais parfois identiques à celles des tissus humains

Enfin, la grande diversité structurale des oligosaccharides décrits, nous permet d'enrichir considérablement les banques de données de déplacements chimiques des oligosaccharide-alditols et notammant ceux des oligosaccharides fucosylés et sulfatés.

BIBLIOGRAPHIE

Abalain J. (1977) Etude de l'action de l'œstradiol sur la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines dans le canal de Müller d'un Urodeles (*Pleurodeles waltlii Michah*) Thèse de 3^{ième} cycle Université de Rennes.

Adams A. E. (1940) Sexual conditions in *Triturus viridescens*. III. The reproductive cycle of the adult aquatic form of both sexes. *Amer. J. Anat.*, 66, 235-271

Ahuya K. K. (1985) Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization Amer. J. Anat., 174, 207-223

Allen A. (1983) Mucus - a protective secretion of complexity. Trends Biochem. Sci., 8, 169-173

Alves A.P., Mulloy B., Diniz J.A. and Mourão P.A.S. (1997) Sulfated polysaccharides from the Egg Jelly Layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of *sea urchins. J. Biol. Chem.*, 272, 6965-6971

Amano A., Sojar H. T., Lee J. Y., Sharma M. J., Levine M. J. and Genco R. J. (1994) Salivary receptors for recombinant fimbrillin of *Porphyromanas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 62, 3372-3380

Aplington H. W. Jr. (1957) The insemination of body cavity and oviducal eggs of amphibia. Ohio J. Sci., 57, 91-99

Arnold J. F. & Shavers J. R. (1962) Interfemale transfer of eggs and ovaries in the frog. Exp. Cell Res. 27, 150-153

Aubert J. P., Porchet N., Crepin M., Duterque-Coquillaud M., Verges G., Mazzuca M., Debuire B., Petitprez D. and Degand P. (1991) Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 5, 178-185

Austin C. R. (1952) The « capacitation » of the mammalian sperm. *Nature*, **170**, 236-237

Bakos M. A., Kurosky A. and Hedrick J. L. (1990a) Physicochemical characterization of progressive changes in the *Xenopus laevis* egg envelope following oviducal transport and fertilization. *Biochemistry*, **29**, 609-615

Bakos M., Kurosky A. and Hedrick J. L. (1990b) Enzymatic and envelope converting activities of *pars recta* oviducal fluid from *Xenopus laevis*, *Dev. Biol.*, 138, 169-176

Barbieri F. D. and Raisman J. S. (1969) Non-gametic factors involved in the fertilization of Bufo arenarum oocytes, *Embryologia*, **10**, 363-372

Barbieri F. D. and Budeguer de Atenor M. S. (1973) Role of oviducal secretions in the fertilization of *Bufo arenarum* oocytes. *Arch. Biol.*, **84**, 501-511

Barbieri F. D. and del Pino E. J. (1975) Jelly coats and diffusible factor in anouran fertilization. *Arch. Biol.*, **86**, 311-321

Barmun S.R. and Brou G.G. (1983) Effect of lectins and sugars on primary sperm attachment in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus L., Dev. Biol.*, **95**, 352-359

Bataillon E. (1919) Analyse de l'activation par la technique des œufs nus et la polyspermie expérimentale chez les Batraciens. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol., 10, 1-38

Bergey E. J., Cho M. L., Blumberg B. M., Hammarskjöld M. L., Rekosh D., Epstein L. G. and Levine M. J. (1994) Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. J. Acq. Immun. Def. Synd., 7, 995-1002

Bhargava A. K., Woitach J. T., Davidson E. A. and Bhavanandan V. P. (1990) Cloning and cDNA sequence of a bovine submaxillary gland mucin-like protein containing two distinct domains. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, **87**, 6798-6802

Bhavanandan V. P. (1991) Cancer-associated mucins and mucin-type glycoproteins, Glycobiology, 1, 493-503

Biesbrock A. R., Bobek L. A. and Levine M. J. (1997) MUC7 gene expression and genetic polymorphism, *Glycoconjugate J.*, 14, 415-422

Blanchard D., Carton J., Fournet B., Montreuil J., van Halbeek H. and Vliegenthart J.
F. G. (1983) Primary structure of the oligosaccharide determinant of blood group Cad specificity, J. Biol. Chem., 258, 7691-7695.

Bleau G. and S^T Jacques S. (1989) Transfer of oviducal proteins to in the *zona pellucida*. In J. Dielt (ed) : Structure and function of the mammalian egg coat. « New York : Springer-Verlag », 99-110.

Bleil J. D. and Wasserman P.M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse egg: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a *zona pellucida* glycoprotein. *Dev. Biol.*, **95**, 317-324.

Bleil J. D. and Wasserman P.M. (1988) Galactose at non reducing terminus of Olinked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6778-6782.

Bobeck L. A., Tsai H., Biesbrock A. R., Levine M. J. (1993) Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (*MUC7*) J. Biol. Chem., **268**, 20563-20569

Boisseau C. (1975) Etude ultrastructurale de l'oviducte du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. III. Action de l'œstradiol 17 β sur la différentiation des cellules sécrétrices de l'oviducte moyen de la femelle immature. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **27**, 430-449

Boisseau C. et Joly J. (1972) Données sur l'histologie de l'oviducte de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien, Urodèle, Salamandridé) C. R. Soc. Biol., 166, 1770-1773

Boisseau C., Jego P., Joly J. et Picheral B. (1974) Organisation et caractérisation histochimiques des gangues ovulaires sécrétées par l'oviducte de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien, Urodèle, Salamandridé) C. R. Soc. Biol., 168, 1102-1107

Bolognani L., Bolognani A. M., Lusignani F. R. and Zonta L., (1966) Presence of sialopolysaccharidic components in egg gelatinous mantle of *Rana latastei* and *Bufo vulgaris Experientia*, **22**, 601-603

Bonnell B. S., Keller S. H., Vacquier V. D. and Chandler D. E. (1994) The sea urchin egg jelly coat consists of globular glycoproteins bound to a fibrous fucan superstructure. *Dev. Biol.*, **162**, 313-324

Bonnell B. S., Reinhart D. and Chandler D. E. (1996) *Xenopus laevis* Egg jelly coats consist of small diffusible proteins bound to a complex system of structurally stable networks composed of High-molecular-weight glycoconjugates. *Dev. Biol.*, **174**, 32-42

Borèn T. and Falk P (1994) Helicobacter pylori binds to blood groups antigens, Sci. Med., 1, 28-37

Borèn T., Falk P., Roth K. A., Larson G. and Normark S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262, 1892-1895

Breg J., van Halbeek H., Vliegenthart J. F. G., Lamblin G., Houvenaghel M. C. and Roussel P. (1987) Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis, *Eur J Biochem*, **168**, 57-68

Breg J., van Halbeek H., Vliegenthart J. F. G., Klein A., Lamblin G. and Roussel P. (1988) Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory mucus

glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combinaison of 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis. 2. Structure of 19 oligosaccharides having the GlcNAc (β 1-3) GalNAc-ol core (type 3) or the GlcNAc (β 1-3)[GlcNAc (β 1-6]GalNAc-ol core (type 4). *Eur. J. Biochem.*, **171**, 643-654

Briand J. P., Andrews S. P., Cahill E., Conway N. A. and Young J. D. (1981) Investigation of the requierements for O-glycosylation by bovine submaxillary gland UDP-Nacetylgalactosamine : Polypeptide N-acetylgalactosamine transferase using synthetic peptide substrate, J. Biol. Chem., 256, 12205-12207

Brockhausen I. (1995) Biosynthesis of O-glycans of the *N*-acetylgalactosamine- α -Ser/Thr linkage type. In *Glycoproteins* 29a (Montreuil J., Vliegenthart J. F. G., Schachter H. Eds) pp 201-259, Amsterdam, The Netherlands : Elsevier

Brockhausen I., Orr J. and Schachter H. (1983) Mucin synthesis. V. The action of pig gastric mucosal UDP-GlcNAc: Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6) GalNAc-R (GlcNAc to Gal) β 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase on high molecular weight substrates, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 1081-1090

Brockhausen L, Matta K. L., Orr J. and Schachter H. (1985) Mucin synthesis. UDP-GlcNAc : GalNAc-R(β 3)-*N*-acetylglucosaminyltransferase and UDP-GlcNAc : GlcNAc β 1-3 GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) β 6-N-acetylglucosaminyltransferase from pig and rat colon mucosa, *Biochemistry*, **24**, 1866-1874

Brockhausen I., Yang J., Burchell J., Whitehouse C. and Taylor-Papadimitriou J. (1995) Mechanism underlying aberrant glycosylation of the MUC1 mucin in breast cancer cells, *Eur. J. Biochem.*, 233, 607-617

Brockhausen I. and Schachter H. (1997) Glycosyltransferases involved in N- and O-Glycan Biosynthesis, In *Glyco-science*, status and perspectives, pp 79-113, H. J. and S. Gabius (Eds), Chapman & Hall, Weinheim

Brun R.B. and Kobel H.R. (1977) Observations on the fertilization block between Xenopus borealis and Xenopus laevis. J. Exp. Zool., 201, 135-138
Cabada M. D., Mariano M. I. and Raisman J. S. (1978) Effect of trypsin innhibitors and Con A on the fertilization of *Bufo arenarum* cœlomic oocytes. J. Exp. Zool., 204, 409-416

Campanella C. (1975) The site of spermatozoon entrance in the unfertilized egg of Discoglossus pictus (Anoura): An electron microscopic study. Biol. Reprod., 12, 439-447

Carlson D. M. (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins, J. Biol. Chem., 243, 616-626

Carlstedt I. and Sheehan J. K. (1984) Is the macromolecular architecture of cervical, respiratory and gastric mucins the same? *Biochem Soc Trans*, **12**, 615-617

Carlstedt I., Sheehan J. K., Corfield, A. P. and Gallagher J. T. (1985) Mucous Glycoproteins : a gel of a problem, *Essays Biochem.*, **20**, 40-76

Carlstedt I. and Sheehan J. K. (1989) Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins, in Mucus and related topics, Chantler, E. and Ratcliffe, N. A., Eds., University of Cambridge, Cambridge; *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **43**, 289-316

Carraway K. L., Fregien N., Carraway K. L. and Carothers-Carraway. A. (1992) Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation. J. Cell Sci., 103, 299-307

Carroll E. J., Wei S. H. and Nagel G. M. (1991a) Purification, Physicochemical characterization, and immunohistochemical localization of a major 11.7 S glycoprotein from the jelly coats of the anouran *Leptidobatrachus laevis*. Arch. Biochem. Biophy., **284**, 346-351

Carroll E. J., Wei S. H., Nagel G. M. and Ruibal R. (1991b) Structure and macromolecular composition of the egg and embryo jelly coats of the anouran *Lepidobatrachus laevis*. *Develop*. Growth & Differ., **33**, 37-43

Chai W., Hounsell E. F., Cashmore G. C., Rosankiewicz J. R., Bauer C. J., Feeney J., Feizi T. and Lawson A. M. (1992) Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. A combined mass spectroscopy and ¹H-NMR study, *Eur. J. Biochem.*, **203**, 257-268

Chang M. C. (1957) A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, **179**, 258-259

Chantler E., Sharma R. and Scharman D. (1989) Changes in cervical mucus that prevent penetration by spermatozoa, in Mucus and related topics, Chantler, E. and Ratcliffe, N. A., Eds., University of Cambridge, Cambridge; Symp. Soc. Exp. Biol., 43, 325-336

Charbonneau M., Moreau M., Picheral B., Vilain J.P. and Guerrier P. (1983) Fertilization of Amphibian eggs : a comparison of electrical responses between anurans and urodeles. *Dev. Biol.*, **98**, 304-318 Chesnel A., Lerivray H. and Jego P. (1985) Lectines sécrétées par l'oviducte des Amphibiens Urodeles. C. R. Acad. Sc., 300, 405-408

Chesnel A., Lerivray H. and Jego P. (1986) Lectin-induced agglutination of microorganisms in Urodeles Amphibia egg jelly. In : Marker proteins in inflammation 3, Bienvenu, Grumaud, Laurent, ed :Walter de Guyter and Co, Berlin, New-York.

Christen R., Schackmann R. W. and Shapiro B. M. (1983) Interaction between sperm and sea urching jelly. *Devl. Biol.*, 98, 1-14

Clausen H., Levery S. B., Kannagi R. and Hakomori S. I. (1986) Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in blood group A and AB erythrocytes (type 3 chain H) I. Isolation and chemical characterization, *J. Biol. Chem.*, **261**, 1380-1387

Corfield T. (1992) Mucus glycoproteins, super glycoforms; how to solve a stiky problem ?, *Glycoconj. J.*, 9, 217-221

Costache M., Cailleau A., Fernandez-Mateos P., Oriol R. and Mollicone R. (1997) Advances in molecular genetics of $\alpha 2$, and $\alpha 3 / 4$ fucosyltransferases, *Transfusion Clin. Biol.*, 4, 367-382

Creeth J. M. and Denborough M. (1970) The use of equilibrium-density-gradient methods for the preparation and characterization of blood-group-specific glycoproteins, *Biochem. J.*, 117, 879-891

Creeth J. M. and Cooper B. (1984) Studies on the molecular weight distributions of two mucins, *Biochem Soc Trans*, 12, 618-621

Crocker P. R. and Feizi T. (1996) Carbohydrate recognition systems : functional triads in cell-cell interactions, Curr. Opi. Struc. Biol., 6, 679-691

Crowther R. S., Marriott C. and James S. L. (1984) Cation induced changes in the rheological properties of purified mucus glycoprotein gels, *Biorheology*, 21, 253-263

Dabelsteen E. (1996) Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas, J. Pathol., 179, 358-369

Dan J. C. (1950) Sperm entrance in echinoderms, observed with the phase contrast microscope. *Biol. Bull.*, 99, 399-411

Dan J. C. (1952) Studies of the acrosome I : Reaction to egg-water and other stimuli. Biol. Bull., **103**, 54-66

Dan J. C. (1954) Studies of the acrosome. III : Effects of Calcium deficiency *Biol. Bull.*, 107, 335-349.

Dan J. C. (1956) The acrosome reaction, Int. Rev. Cyt., 5, 365-393

Degand P., Roussel P., Lamblin G. and Havez R. (1973) Purification et étude des mucines de kystes bronchogéniques, *Biochem. Biophys. Acta*, 320, 318-330

Dekker J., van Beurden-Lamers, W. M. O. and Strous G. J. (1989a) Biosynthesis of gastric mucus glycoprotein of the rat. J. Biol. Chem., 264, 10431-10437

Dekker J., Van Beurden-Larmers, W. M. O., Oprins, A. and Strous G. J. (1989b) Isolation and structural analysis of rat gastric mucus glycoproteins suggests a homogeneous protein backbone, *Biochem. J.*, **260**, 717-723

Dekker J. and Strous G. J. (1990) Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation. J. Biol. Chem., 265, 18116-18122

Dekker J., Aelmans P. H. and Strous G. J. (1991) The oligomeric structure of rat and human gastric mucins, *Biochem. J.*, 277, 423-427

Del Pino E. M. (1973) Interactions between gametes and environment in the toad Xenopus laevis (Daudin) and their relationship to fertilization. J. Exp. Zool., 185, 121-132

Devaraj N., Sheykhnazari M., Warren W. S. and Bhavanandan V. P. (1994) Glycobiology, 4, 307-316

Dhume S. T. and Lennartz W. J. (1995) The involvement of *O*-linked oligosaccharide chains of the sea urchin egg receptor of sperm in fertilization. *Glycobiology*, **5**, 11-17.

Do K. Y., Do S. I. and Cummings R. D. (1995) α -lactalbumin induces bovine milk β 1,4-galactosyltransferase to utilise UDP-GalNAc, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18447-18451

Donald A. S. R. (1981) A active trisaccharides isolated from A_1 and A_2 blood group specific glycoproteins, *Eur. J. Biochem.*, **120**, 243-249

Duellmann W. (1992) La stratégie reproductrice des Amphibiens, pour la Science, 179, 76-83

Dufosse J., Porchet N., Audie J. P., Guyonnet-Duperat V., Laine A, van Seuningen I., Marrakchi S., Degand P. and Aubert J. P. (1993) Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15, *Biochem. J.*, **293**, 329-337 **Dumont J. M.** and Brummett A.R. (1977) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J. Morphol.*, 155, 73-98

Eckhardt A. E., Timpte C.S., Abernethy J. L., Toumadje A., Johnson W. C. and Hill R. L. (1987) Structural properties of porcine submaxillary gland apomucin, *J. Biol. Chem.*, 262, 11339-11344

Eckhardt A. E., Timpte C.S., Abernethy J. L., Zhao Hill (1991) Porcine submaxillary mucin contains a cysteine-rich, carboxyl-terminal domain in addition to a highly repetitive, glycosylated domain. J. Biol. Chem., 256, 9678-9686

Elinson R. P. (1971) Fertilization of partially jellied and jellyless oocytes of the frog Rana pipiens. J. Exp. Zool., 176, 415-428

Elinson R. P. (1973a) Fertilization of frog body cavity eggs enhanced by treatments affecting the vitelline coat. J. Exp. Zool., 176, 415-428

Elinson R. P. (1973b) Fertilization of body-cavity eggs : Rana pipiens eggs and Rana clamitans sperm. Biol. Reprod., 8, 362-368

Elinson R. P. (1974) A block to cross fertilization located in the egg jelly of the frog Rana clamitans. J. Embryol. Exp. Morphol., 32, 325-335

Elinson R. P. (1975) Viable amphibian hybrids produced by circumventing a block to cross fertilization (*Rana clamitans* female X *Rana castabeiana* male). J. Exp. Zool., **192**, 323-330

Elinson R. P. (1986) A Comparative approach to the block to polyspermy in amphibian eggs. Int. Rev. Cytol., 101, 59-100

Fahim R. E. F., Forstner G. G. and Forstner J. F. (1987) Structural and compositional differences between intracellular and secreted mucin of rat small intestine, *Biochem. J.*, 248, 389-396

Feizi T. (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens, *Nature (London)* **314**, 53-57

Feizi T. and Childs R. A. (1987) Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins, *Biochem. J.*, 245, 1-11

Field M. C. ang Wainwright L. J. (1995) Molecular cloning of eucaryotic glycoprotein and glycolipid glycosyltransferases : A survey, *Glycobiology*, 5, 463-472

Finne J. and Krusius T. (1976) O-glycosidic carbohydrate units from glycoproteins of different tisues : demonstration of brain-specific disaccharide, α -galactosyl(β 1-3)-*N*-acetylgalactosamine, *FEBS-Lett.*, **66**, 94-97

Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria* : Characterization of the sequence HSO₃(3)GlcA(β 1-3)Gal, *Carbohydr. Res.*, **302**, 179-189

Florey H. (1962) The secretion and function of intestinal mucus, *Gastroenterology*, 43, 326-329

Folkes B.F., Grant R.A. and Jones J.K.N. (1950) Frog-spawn mucins J. Chem. Soc., 440, 2136-2140

Fontaine I. F., Aissi E. A. and Bouquelet S. J-L. (1994) In vitro binding of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to Mucosal Glycoproteins and Hemagglutinating Activity, *Curr. Microbiol.*, 28, 325-330

Fontaine M.D., Wieruszeski J.M., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Structure of six 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn)-containing oligosaccharide-alditols released from oviduct secretions of Ambystoma maculatum, *Eur. J. Biochem.*, 231, 424-433

Forstner J. F., Ofosu F and Forstner G. G. (1978) Intestinal mucins in health and disease, *Digestion*, 17, 234-263

Fox H. (1986) The skin of Amphibia : dermal glands. In *Biology of the Integument*. 2 : *Vertebrates* (edited by Bereiter-Hahn J., Matoltsy A. G. and Richards K. S.), Springer Berlin, 116-135

Freeman S. B. (1968) A study of the jelly envelopes surrounding the egg of the amphibian, *Xenopus laevis*, *Biol. Bull.*, 135, 501-513

Gabius H. J. and Gabius S.(1997) Glyco-sciences Status and perspectives, Chapman & Hall, Weinheim

Garfinkel M. D., Pruitt R. E. and Meyerowitz E. M. (1983) DNA sequences, gene regulation and modular protein evolution in the *Drosophila* 68C glue gene cluster. *J. Molec. Biol.*, 168, 765-789

Gendler S. J., Taylor-Papamiditriou J. Duhing T., Rothbard J. and Burchell J. (1988) A highly immunogenic region of human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats, *J. Biol. Chem.*, **263**, 12820-12823

Gendler S. J., Lancaster C. A., Taylor J., Duhing T., Peat N., Burchell J., Pemberton L., Lalani E. and Wilson D. (1990) Molecular cloning and expression of human tumor associated polymorphic epithelial mucin. J. Biol. Chem., 265, 15286-15293

Gerton G. A. and Hedrick J. L. (1986a) The cœlomic envelope to vitelline envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. J. Cell. Biochem., **30**, 341-350

Gerton G. A. (1986b) Biochemical studies of envelope transformation in Xenopus laevis eggs, Adv. Exp. Med. Biol., 207, 133-149

Ginsburg S. (1961) The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli), J. Embryol. Exp. Morphol., 9, 173-190

Gold D. V., Schochat D. and Miller F. (1981) Protease digestion of colonic mucin, J. Biol. Chem., 256, 6354-6358

Gomez M.I. & Cabada M.O. (1994) Amphibian cross-fertilization and Polyspermy. J. Exp. Zool., 269, 560-565

Good G. M. and Daniel J. F. (1943) Fertilization of coelomic eggs of triturus. Univ. Cal. Publ. Zool., 51, 149-163

Granovsky M., Bielfeldt T., Peters S., Paulsen H., Meldal M., Brockhausen J. and Brockhausen I. (1994) UDP-Galactose : glycoprotein-*N*-acetyl-D-galactosamine 3- β -Dgalactosyltransferase activity synthesiting O-glycan core1 is controlled by the amino acid sequence and glycosylation of glycopeptide substrates, *Eur. J. Biochem.*, **221**, 1039-1046

Grassé P. P. (1986) Traité de Zoologie, anatomie, systématique, Biologie. Amphibiens, Tome XIV, Fascicule I-B. Edition Masson. Greenslade F. C., McCormack J. J., Hirsh A. F. and Davanzo J. P. (1973) Blockage of fertilization in *Rana pipiens* by tripsin inhibitors. *Biol. Reprod.*, **8**, 306-310

Greenwell P. Yates A. D. and Watkins W.M (1986) UDP-N-acetyl-D-galactosamine as a donor substrate for the glycosyltransferase encoded by the B gene at the human blood group ABO locus, *Carbohydr Res*, 149, 149-170

Greenwell P. (1997) Blood group antigens: molecules seeking a function?, Glycoconj. J., 14, 159-173

Greve L. C. and Hedrick J. L. (1978) An Immunocytochemical localization of the cortical granule lectin in fertilized and unfertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Gamete Res.*, 1, 13-18.

Grey R. D., Wolf D. P. and Hedrick J. L. (1974) Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis* eggs. *Dev. Biol.*, **36**, 44-61

Grey R. D., Working P.K. and Hedrick J.L. (1976) Evidence that the fertilization envelope blocks sperm entry in eggs of *Xenopus laevis*: Interaction of sperm with isolated envelopes. *Dev. Biol.*, 54, 52-60

Grey R. D., Working P. K. and Hedrick J. L. (1977) Alteration of structure and penetrability of the vitelline envelope after passage of eggs from cœlom to oviduct in *Xenopus laevis. J. Exp. Zool.*, 201, 73-84

Grey R. D., Bastiani M. J., Welb D. J. ans Shertel E.R. (1982) An electrical block is required to prevent polyspermy in eggs fertilized by natural mating of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, **89**, 475-484.

Griffiths S., Matthews D. J., West L., Attwood, L., Povey S., Swallow D. M., Gum J. R. and Kim Y. S. (1990) Assignment of the polymorphic intestinal mucin gene (*MUC2*) to chromosome 11p15, *Ann. Hum. Genet.*, **51**, 277-285

Grigera G. J. and Cabada M. O. (1975) Some biophysicochemical properties of *Bufo* arenarum oocytes jelly coats. Acta Physiol., latinoam., 25, 446-450

Gum J. R., Byrd J. C., Hicks J. W., Toribara N. W., Lamport D. T. A. and Kim Y. S. (1989) Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6480-6487

Gum J. R., Hicks J. W., Swallow D. M., Lagace R. E., Byrd J. C., Lamport D. T. A., Siddiki B. and Kim Y. S. (1990) Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 407-415 Gum J. R., Hicks J. W., Lagace R. E., Byrd J. C., Toribara N. W., Siddiki B., Fearney F. J., Lamport D. T. A. and Kim Y. S. (1991) Molecular cloning of rat intestinal mucin. Lack of conservation between mammalian species. *J Biol Chem*, **266**, 22733-22738

Gum J. R., Hicks J. W., Toribara N. W., Rothe E. M., Lagace R. E. and Kim Y. S. (1992a) The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region *J. Biol. Chem.*, **267**, 21375-21383

Gum J. R., Hicks J. W., Toribara N. W., Siddiki B. and Kim Y. S. (1994) Molecular cloning of human intestinal mucin (*MUC2*) cDNA J. Biol. Chem., 269, 2440-2446

Gum J. R. (1995) Human mucin glycoproteins : varied structures predict diverse properties and specific function in : Mucins : Their structure and Biology. 655th Meeting held at the University of Manchester, 18-21 July 1995, 795-799

Gum J. R., Hicks J. J. and Kim Y. S. (1997) Identification and characterization of the *MUC2* (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region : promoter activity in cultured cells, *Biochem. J.*, **325**, 259-267

Gusseck D. J. and Hedrick J. L. (1971) A molecular approach to fertilization. Idisulfide bounds in *Xenopus laevis* jelly coat and a molecular hypothesis for fertilization. *Dev. Biol.*, 25, 337-347

Guyétant R. (1975) (Cité par Joly et Boisseau) Etude des intéractions intraspécifiques chez le tétard de quelques Amphibiens Anoures-Conséquences physiologiques. Thèse de doctorat *es* Sciences Naturelles Besançon.

Guyonnet-Duperat V., Audie J. P., Debailleul V., Laine A., Buisine M. P., Galiegue-Zouitina S., Pigny P., Degand P., Aubert J. P. and Porchet N. (1995) Characterization of the human mucin gene *MUC5AC*: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin gene ?, *Biochem. J.*, **305**, 211-219

Hagopian A. and Eylar E. H. (1968) Glycoprotein biosynthesis : Studies on the receptor specificity of the polypeptidyl : *N*-acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 422-433

Hakomori S. I. and Kobada A. (1974) Blood group antigens. In *The antigens* (Sela M. ed). Academic Press, New York, vol II, 79-140

Hakomori S. I. (1989) Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. Adv. Cancer Res., 52, 257-331

Hanover J. A., Lennarz W. J. and Young J. D. (1980) Synthesis of N- and O- linked glycopeptides in oviduct membrane preparations, J. Biol. Chem., 255, 6713-6716

Harding S. E., Rowe A. J. and Creeth J. M. (1983) Further evidence for a flexible and highly expended spheroidal model for mucus glycoproteins in solution, *Biochem. J.*, 209, 893-896

Harduin-Lepers A., Recchi M. A. and Delannoy P. (1995) 1994, the year of sialyltransferase, *Glycobiology*, 8, 741-758

Hardy & Hedrick J. L. (1992) Oviductin. Purification and proprieties of the oviducal protease that processes the molecular weight 43000 glycoprotein of the *Xenopus laevis* egg enveloppe, *Biochemistry*, **31**, 4466-4472

Hayes D. F., Silberstein D. S., Rodrique S. W. and Kufe D. W. (1990) DF3 antigen, a human epithelial cell mucin, inhibits adhesion of eosinophils to antibody-coated targets, *J. Immunol.*, 145, 962-970

Heasman J., Holwill S. and Wylie C. C. (1991) Fertilization of cultured *Xenopus* oocytes and use in studies of maternally inherited molecules. In : *Methods in cells biology* (B. K. Kay and H. B. Peng, Eds Academic press, San Diego, vol. 36, 214-240

Heatley N. G. (1959) Mucosubstance as a barrier to diffusion, *Gastroenterology*, 37, 313-318

Hedrick J. L., Smith A.J., Yurewicz E. C., Oliphant G. and Wolf D. P. (1974) The incorporation and fate of [³⁵S]-sulfate in the jelly coat of *Xenopus laevis* eggs. *Biol. Reprod.*, 11, 534-542

Hedrick J. L. and Katagiri C. (1988) *Bufo japonicus* and *Xenopus laevis laevis* egg jellies contain structurally related antigens and cortical granule lectin ligands. *J. Exp. Zool.*, 245, 78-85

Hedrick J. L. and Nishihara T. (1991) Structure and function of the extracellular matrix of Anouran eggs. J. Electron. Microsc. Tech., 17, 319-335

Heller H., Ferreri E. et Leathers D. H. G. (1970) The effect of neurohypophysial on the amphibian oviduct *in vitro*, with some remarks on the histology of this organ. J. Endocrinol., 47, 495-509

Herkt F., Parente J. P., Leroy Y., Fournet B., Blanchard D., Carton J. P., van Halbeek H. and Vliegenthart J. F. G. (1985) Structure determination of oligosaccharides isolated from

Cad erythrocyte membranes by permethylation analysis and 500-MHz proton spectroscopy, *Eur. J. Biochem.*, 146, 125-129.

Hilkens J. and Bruijs F. (1988) Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 263, 4215-4222

Hilkens J., Litenberg M. J., Vos H. L. and Litvinov S. V. (1992) Trends Biochem. Sci., 17, 359-363

Hilkens J., Wesseling J., Vos H. L., Storm J., Boer B., van der Valk S. W. and Maas M. C. E. (1995) Involvment of cell surface-bound mucin, episialin/*MUC1*, in progression of human carcinomas in Mucins: Their structure and Biology. 655th Meeting held at the University of Manchester, 18-21 July 1995, 842-846

Hill H. D., Schwyzer M., Steinman H. M. and Hill R. L. (1977) Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-*N*-acetyl-galactosamine : mucin transferase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3799-3804

Ho S. B., Roberton A. M., Shekels L. L., Lyflogt C. T., Niehans G. A. and Toribara N. W. (1995) Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression, *Gastroenterology*, **109**, 735-747

Hoffmann W. and Hauser F. (1993) Biosynthesis of frog skin mucins : cysteine-rich shuffled modules, polydispersities and genetic polymorphism, *Comp. Biochem. Physio.*, 105, 465-472

Hoshi M., De Santis R., Pinto M. R., Cotelli F. and Rosati F. (1983) Is sperm α -L-fucosidase responsible for sperm-egg binding in *Ciona intestinalis*? In « The sperm cell » (J. Andre Ed) Marinus Nijhoff, The Hague

Hoshi M., Nishigaki T., Ushiyama A., Okinaga T., Chiba K. and Matsumoto M. (1994) Egg-jelly signal molecules for triggering the acrosome reaction in starfish spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, **38**, 167-174

Houillon C. (1972) Tolérance des greffes ovariennes entre espèces différentes chez les Amphibiens Urodeles; conséquences sur l'émission de pontes hétérologues. C. R. Acad. Sc. Paris, 274, 2790-2793.

Hounsell E. F., Lawson A. M., Feeney J., Gooi H. C., Pickering N. J., Stoll M. S., Lui S. C. and Feizi T. (1985) Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofœtal antigens, *Eur. J. Biochem.*, 148, 367-377

Hounsell E. F.(1985) Novel core, backbone and peripheral region sequences of the oligosaccharides of foetal gastrointestinal mucins present in human meconium, *Symp Soc Exp Biol.*, **43**, 149-154

Hull S. R. and Carraway K. L. (1989) Sulfatation of the tumor cell surface sialomucin of the 13762 rat mammary adenocarcinoma, J. Cell Biochem., 40, 67-81

Humphries A. A. Jr (1961) Experiments on the normal meiotic block in the ovum of *Triturus viridescens. Biol. Bull.*, **120**, 29-37

Humphries A. A. Jr (1966) Observations on the deposition, structure and cytochemistry of the Jelly envelopes of the egg of the newt. *Triturus viridescens, Dev. Biol.*, 13, 214-230.

Humphries A. A. Jr (1970) Incorporation of [³⁵S]-Sulfate into the oviducts and egg jelly of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Exp. Cell. Res.*, **59**, 157-161

Hykes O. V. (1927) Rôles de l'enveloppe gélatineuse de l'œuf dans la première période de développement de la grenouille. C. R. Acad. Biol. Paris, 98, 1029-1039.

Ishihara K., Hosono J., Kanatani H. and Katagiri C. (1984) Toad egg-jelly as a source of divalent cations essential for fertilization. *Dev. Biol.*, 105, 435-442

Iwao Y. and Katagiri C. (1982) Proprieties of the vitelline coat lysin from toad sperm, J. Exp. Zool., 219, 87-95

J

James T. C., Maak C. A., Bond U. M., Champion J. and Tata J. R. (1985) *Xenopus* egg jelly coat proteins. Characterization of messenger RNAs of the oviduct and cloning of complementary DNAs to poly(A)-containing RNA, *Comp. Biochem. Physiol.*, **80**, 89-97

Jany B., Gallup M., Tsuda T. and Basbaum C. (1991a) Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 181, 1-8

Jany B., Gallup M., Yan P. S., Gum J., Kim Y. and Basbaum C. (1991b) Human bronchus and intestine express the same mucin gene, J. Clin. Invest., 87, 77-82

Jass J., Allison L.J. and Edgar S. G. (1995) Distribution of sialosyl Tn and Tn antigens within normal and malignant colorectal epithelium, J. Pathol., 176, 143-149

Jego P. (1974) Composition en glucides des différents segments de l'oviducte et des gangues ovulaires de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle). *Comp. Biochem. Physiol.* **48B**, 435-446.

Jego P., Abalain J. H. and Wroblenwski H. (1976a) Réactions de précipitation de type « anigène-anticorps » entre produits de sécrétions de différentes régions de l'oviducte de *Pleurodeles waltlii* Michah., C. R. Acad. Sc., Paris, t. 282, 767-770.

Jego P. (1976b) Analyse des protides des gangues ovulaires de Pleurodeles waltlii Michah (Amphibien, Urodele). Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 16, 13-24

Jego P. (1977) Action différentielle de l'œstradiol sur les activités de la fucosyltransférase et de la galactosyltransférase de l'oviducte du triton Pleurodeles. Gen. Comp. Endocrinol., 31, 475-481

Jego P. and Abalain J. H. (1978) Isolement, par chromatographie d'affinité, d'une proteine spécifique apparaissant dans l'oviducte du pleurodele immature sous l'effet de l'œstradiol., *Biol. Cell.*, **31**, 311-314

Jego P., Chesnel A. and Joly J. (1983) Reactions de précipitation entre les produits de sécrétion des oviductes chez les Amphibiens. *Reprod. Nutr. Develop.*, 23(4), 679-692.

Joba W. and Hoffmann W. (1996) Alternative splicing of repetitive units is responsible for the polydispersities of integumentary mucin B.1 (FIM-B.1) from Xenopus laevis, *Glycoconj. J.*, 13, 735-740

Joba W. and Hoffmann W. (1997) Similarities of Integumentary mucin B.1 from Xenopus laevis and prepro-von Willebrand factor at their amino-terminal regions, J. Biol. Chem., 272, 1805-1810

Joly J. et Picheral B. (1972) Ultrastructure, histochimie et physiologie du follicule pré-ovulatoire et du corp jaune de l'Urodèle ovo-vivipare Salamandra salamandra, Gen. Comp. Endocrinol., 18, 235-259.

Jørgensen C. B. and Vijayakumar S. (1970) Annual oviduct cycle and its control in the toad Bufo bufo, Gen. Comp. Endocrinol., 14, 404-411

Joziasse D. H. (1992) Mammalian glycosyltransferases : genomic organization and protein structure, *Glycobiology*, 2, 271-277

Kambara S., (1953) Role of jelly envelopes of toad eggs in fertilization. Annot. Zool Japon., 26, 78-84

Katagiri C. (1965) The fertilizability of cœlomic and oviducal eggs of toad, Bufo bufo formosus. J. Fac. Sci. Hokkaïdo (Zool.), 15, 633-643

Katagiri C. (1966) Fertilization of dejellied uterine toad eggs in various experimental conditions. *Embryologia (Nagoya)*, 9, 159-169

Katagiri C. (1967) Occurrence of the fertilizing capacity of toad sperm in heterologous egg-jellies. Annot. Zool. Jap., 40, 67-73

Katagiri C. (1968) Immunological relationship among anouran egg-jellies and their contribution to the analysis of fertilization. SABCO J., 4, 33-43

Katagiri C. (1973) Chemical analysis of toad egg-jelly in relation to its « sperm capacitating » activity. Dev. Growth Differ., 15, 81-92

Katagiri C. (1974) A high frequency of fertilization in premature and mature cœlomique toad eggs after enzymatic removal of vitelline membrane. J. Embryol. Exp. Morphol., 31, 573-587

Katagiri C. (1986) The role of oviducal secretions in mediating gamete fusion in the toad, *Bufo bufo japonicus*. Adv. Exp. Med. Biol., 207, 151-166

Katagiri C. (1987) Role of oviducal secretions in mediating gamete fusion in anouran amphibians. *Zool. Sci.*, **4**, 1-14

Katagiri C., Iwao Y. and Yoshizaki N. (1982) Participation of oviducal pars recta secretions in inducing the acrosome reaction and release of vitelline coat lysin in fertilizing toad sperm. Dev. Biol., 94, 1-10

Kawagishi S., Fahim R. E. F., Wong K. H. and Bennick A. (1990) Purification and characterization of subunits of a high molecular weight human salivary mucin. *Arch. Oral Biol.*, **35**, 265-272

Keates A. C., Nunes D. P., Afdhal N. H., Troxler R. F. and Offner G. D. (1997) Molecular cloning of a major human gall bladder mucin : complete C-terminal sequence and genomic organization of *MUC5B*, *Biochem. J.*, **324**, 295-303

I

Kelly R. J., Ernst L. K., Larsen R. D., Bryant J. G., Robinson J. S. and Lowe J. B. (1994) Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 91, 5843-5847

Kemp N. E. and Istock N.L. (1967) Cortical changes in growing oocytes and in fertilized or pricked eggs of *Rana pipiens*. J. Cell. Biol., 34, 111-122

Kerss S., Allen A. and Garner A. (1982) A simple method for measuring thickness of the mucus gel layer adherent to rat, frog and human gastric mucosa : influence of feeding, prostaglanding, N-acetylcysteine and other agents, *Clin. Sci.*, **63**, 187-195

Killeen N., Barclay A. N., Willis A. C. and Williams A. F. (1987) The sequence of rat leukosialin (W3/13 antigen) reveals a molecule with O-linked glycosylation of one third of its extracellular amino acids, *EMBO J.*, **6**, 4029-4034

Klein A. (1988) Chaines glycanniques neutres et sialylées de mucines bronchiques humaines sécrétées aux cours de bronchopathies chroniques, Thèse de doctorat de l'université de Lille II.

Klein A., Carnoy C., Wieruszeski J. M., Strecker G., Strang A. M., van Halbeek H., Roussel P. and Lamblin G. (1992) The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. *Biochemistry*, **31**, 6152-6165

Klomp L. W. J., De Lely A. J. and Strous G. J. (1994) Biosynthesis of a human gallbladder mucin, *Biochem. J.*, 304, 737-744

Kobata A (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins, Eur J Biochem., 209, 483-501

Kurosaka A., Nakjima H., Funakoshi I., Matsuyama M., Nagayo T. and Yamashina I. (1983) Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocracinum glycoprotein, J. Biol. Chem., 258, 11594-11598

Kurosawa N., Hamamoto T., Lee Y. C., Nakaoka T., Kojima N. and Tsuji S. (1994a) Molecular cloning and expression of GalNAcα2,6-sialyltransferase, J. Biol. Chem., 269, 1402-1409

Kurosawa N., Kojima N., Inoue M. Hamamoto T. and Tsuji S. (1994b) Cloning and expression of chick Galb1-3GalNAca2-3-sialyltransferase, J. Biol. Chem., 269, 19048-19053

Lamblin G., Lhermitte M., Degand P., Roussel P. and Slayter H. S. (1979) Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins, *Biochimie*, **61**, 23-43

Lamblin G. Lhermitte M, Boersma A, Roussel P and Reinhold V (1980) Oligosaccharides of human bronchial glycoproteins. Neutral di- and trisaccharides isolated from a patient suffering from chronic bronchitis, *J Biol Chem*, 255, 4595-4598

Lamblin G., Aubert J. P., Perini J. M., Klein A., Porchet N., Degand P. and Roussel P. (1992) Human respiratory mucins, *Eur. Respir. J.*, 5, 247-256

Lamblin G. and Roussel P. (1993) Airways mucins and their role in defense against micro-organisms, *Resp. Med.*, 87, 421-426

Lamey PJ, Nolan A, Thomson E, Lewis MA and Rademaker M (1991) Oral presentation of the Laugier-Hunziker syndrome, *Br Dent J*, 171, 59-60

Lan M. S., Khorrami A., Kaufman B. and Metzgar R. S. (1987) Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. The DU-PAN-2 antigen, *J. Biol. Chem.*, 262, 12863-12870

Lan M. S., Batra S. K., Qi W. N., Metzgar R. S. and Hollingsworth M. A. (1990) Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA, J. Biol. Chem., 265, 15294-15299

Larabell C. A. and Chandler D. E. (1988) In vitro formation of the «S» layer, a unique component of the fertilization envelope in *Xenopus laevis* eggs, *Dev. Bio.*, **130**, 356-364

Larabell C. A. and Chandler D. E. (1989) The cœlomique envelope of Xenopus laevis eggs : A quick-freeze, deep-etch analysis. Dev. Biol., 131, 126-135

Lasky L. A., Singer M. S., Dowbenko D, Imai Y, Henzel W, Fennie C, Watson S, Rosen S. D. (1992) Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1: a novel mucin-like adhesion ligand for L-selectin, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**, 259-269

Lavin L. H. (1964) The transfer of cœlomique eggs between frogs. J. Embryol. Exp. Morph., 12, 457-463

Lee P. A. (1967) Studies of frog oviducal jelly secretion. I) Chemical analysis of secretory product, II) Cytology of secretory cycle. J. Exp. Zool., 166, 99-120

Lee Y. C., Kojima N., Wada E. Kurosawa N., Nakaoka T., Hamamoto T. and Tsuji S. (1994) Cloning and expression of cDNA for a new type of Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase, J. Biol. Chem., 269, 377-385

Leppänen A., Penttilä L., Niemelä R., Helin J., Seppo A., Lusa S. and Renkonen O. (1991) Human serum contains a novel β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activity that is

involved in midchain branching of oligo (N-acetyllactosaminoglycans), Biochemistry, 30, 9287-9296

Lerivray H., Chesnel A. and Jego P. (1985) Identification and localization of lectin in the oviduct of various Urodeles Amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81**, 385-391

Lessuffleur T., Zweibaum A. and Real F. X. (1994) Mucin in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 17, 153-180

Lessufleur T., Roche F., Hill A. S., Lacasa M., Fox M., Swallow D. M., Zweibaum A and Real F. X. (1995) Charaterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 Mucussecreting cells (the 3' end of MUC5AC), *J. Biol. Chem.*, **270**, 13665-13673

Levine M.J., Reddy M. S., Tabak L. A., Loomis R. E., Bergey E. J., Jones P. C., Cohen R. E., Stinson M. W. and Al-Hashimi I. (1987) Structural aspects of salivary glycoproteins, J. Dent. Res., 66, 436-441

Ley K., Zarkrezewicz A., Hanski C., Stoolman L. and Kansas G. S. (1995) Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling *in vivo*, *Blood*, **85**, 3727-3735

Ligtenberg M. J. L., Vos H. L., Gennissen A. M. C. and Hilkens J. (1990) Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5573-5578

Lillie F. R. (1919) Problems of fertilization. The University of Chicago Press. p31. cité par Hedrick 1990

Lindsay L. L. and Hedrick J. L. (1988) Identification of *Xenopus laevis* sperm and egg envelope binding components on nitrocellulose membranes. J. Exp. Zool., 245, 286-293

Lindsay L. L. and Hedrick J. L. (1989) Proteases released from *Xenopus laevis* eggs at activation and their role in enveloppe conversion, *Dev. Biol.*, 135, 202-211

Lloyd K. O. (1987) Blood group antigens as markers for normal differentiation and malignant change in human tissues. Am. J. Clin. Pathol., 87, 129-139

Lodge P. D. S. et Smith C. L. (1960) Hormonal control of secretion in the oviduct of the Amphibian. *Nature* (London), 185, 774-775

Lo-Guidice J. M., Wieruszeski J. M., Lemoine J., Verbert A., Roussel P. and Lamblin G. (1994) Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis, *J. Biol. Chem.*, **269**, 18794-18813

Lo-Guidice J. M., Herz H., Lamblin G., Plancke Y, Roussel P. and Lhermitte M. (1997) Structure of sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le^{a+b-}) patient suffering from chronic bronchitis, *Glycoconj. J.*, 14, 113-125

Loomis R. E., Prakobphol A., Levine M. J., Reddy M. S. and Jones P. C. (1987) Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibularsublingual saliva. *Arch. Biochem. Biophys.*, 258, 452-464

Lopez L. C., Bayna E. M., Litoff D., Shaper N. L., Shaper J. H. and Shur B. D. (1985) Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. J. Cell. Biol., 101, 1501-1510

Low K. L., Chen T. W. et Tan C.K. (1976) The acquisition of egg jelly and its effect on fertilizability and hatchability in *Bufo melanostictus*. *Copeia*, 4, 684-689.

Maes E., Wieruszeski J.M., Plancke Y. and Strecker G. (1995) Structure of three Kdncontaining oligosaccharide-alditols released from oviducal secretions of *Ambystoma tigrinum* : Fuc(α 1-5)[Fuc(α 1-4)]Kdn(α 2-3/6), *FEBS-Lett.*, **358**, 205-210

Maes E., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Primary structure of acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of *Ambystoma tigrinum*, *Eur. J. Biochem.*, 230, 146-156

Maes E, E., Florea D., Delplace F., Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G. (1997) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*, *Glycoconj. J.*, 14, 127-146

Maack C. A., James T. C., Champion J., Hunter J. R. and Tata J. R. (1985) *Xenopus* egg jelly coat proteins-1. Identification and characterization of proteins in individual coats in eggs and oviduct., *Comp. Biochem. Physiol.*, **80**, 77-87

Macek M.B. and Shur B. D. (1988) Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gamete Res.*, 20, 93-109

Mawhinney T. P., Adelstein E., Morris D. A., Mawhinney A. M. and Barbero G. J. (1987) Structure determination of five sulfated oligosaccharides derived from tracheobronchial mucus glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2994-3001

Mantle M. and Allen A. (1981) Isolation and characterization of the native glycoprotein from pig small-intestine mucus, *Biochem. J.*, 195, 267-275

Mantle M., Mantle D. and Allen A. (1981) Polymeric structure of pig small-intestinal mucus glycoprotein, *Biochem. J.*, 195, 277-285

Mariano, M. I., Martin M. G. and Pisano A. (1984) Morphological modifications of oocyte vitelline envelope from *Bufo arenarum* during different functional states. *Dev. Growth. Differ.*, 26, 33-42

Marshall T. and Allen A. (1978) Isolation and characterization of the high molecular weight glycoproteins from pig colonic mucus, *Biochem. J.*, 173, 569-578

Mawhinney T. P., Adelstein E., Morris D. A., Mawhinney A. M. and Barbero G. J. (1984) Structure determination of five sulfated oligosaccharides derived from tracheobronchial mucus glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2994-3001

McGuire E. J. and Roseman S. (1967) Enzymatic synthesis of the proteinhexosamine linkage in sheep submaxillary mucin, *J Biol Chem*, 242, 3745-3747

McLaughlin E. W. and Humphries A. A. Jr (1978) The jelly envelopes and fertilization of eggs of the newt Notophthalmus viridescens. J. Morphol., 158, 73-90.

Mc Naught A. D. (1997) Nomenclature of carbohydrates, Carbohydr. Res., 297, 1-92

Meerzaman D., Charles P., Daskal E., Polymeropoulos M. H., Martin B. M. and Rose M. C. (1994) Cloning and analysis of cDNA encoding of a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5) *J. Biol. Chem.*, **269**, 12932-12939

Metz C. B. (1967) Gamete surface components and their role in fertilization, In « Fertilization » ed C. B. Metz and A. Monroy Academic Press Vol 1, 163-236

Mian N. and Kent P. W. (1986) Directional Ca²⁺ effect on stimulation of secretion of common mucins and sulfate-rich components from chicken trachea in vitro, *Biochimi*. *Biophys. Acta.*, 883, 476-485

Miceli D. C., del Pino E. J., Barbieri F. D., Mariano M. I. and Raismann J. S. (1977) Tha envelope-to-fertilization enveloppe transformation in the toad *Bufo arenarum Dev. Biol.*, 59, 101-110

Miceli D. C., Fernandez S. N. and del Pino E. (1978a) An oviducal enzyme isolated by affinity chromatography which acts upon the vitelline envelope of *Bufo arenarum* cœlomic oocyte. *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 289-292

Miceli D. C., Fernandez S. N., Raisman J. S. and Barbieri D. F. (1978b) A trypsin-like oviducal proteinase involved in *Bufo arenarum* fertilization. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 48, 79-91

Miceli D. C. and Fernandez S. N. (1982) Proprieties of an oviducal protein involved in amphibian oocyte fertilization, J. Exp. Zool., 221, 357-364

Miceli D. C., Fernandez S. N., Mansilla Z. C. and Cabada M. O. (1987) New evidence of anouran oviducal pars recta involvement on gamete interaction. J. Exp. Zool., 244, 125-132

N

Miller D. J. and Ax R. L. (1990) Carbohydrates and fertilization in animals. Mol. Reprod. Dev., 26, 184-198.

Milstead W. W. (1951) A new locality record for the Texas neotonic Salamander, Eurycea latitans, Herpetologica, 7, 57-58.

Morelle W. and Strecker G. (1997a) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from viducal mucins of *Bufo bufo* : characterization of the carbohydrate sequence Gal(α 1-3)GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal.,*Glycobiology.*, 7, 777-790

Morelle W. and Strecker G. (1997b) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from the jelly coat of *Rana utricularia* eggs, *Biochem. J.*, **321**, 879-887

Munro S. and Pelham H. R. M. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins, Cell, 48, 899-907

Mutsaers J. H. G. M., van Halbeek H., Vliegenthart J. F. G., Wu A. M. and Kabat E. A. (1986) Typing of core and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from ovarian-cyst glycoproteins by 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy, *Eur. J. Biochem.*, **157**, 139-146

Nace G. W. and Lavin L. H. (1963) Heterosynthesis and autosynthesis in the early stages of anouran development, Am. Zoologist., 3, 193-207

Neutra M. R. and Forstner J. F., (1987) Gastrointestinal mucus : synthesis, secretion and function, in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson L. R., Ed. Raven Press, New York, 975-1009

Nieuw Amerongen A. V., Oderkerk C. H. and Driessen A. A. (1987a) Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization *in vitro*, *Caries Res.*, **21**, 297-309

Nieuw Amerongen A. V., Odekerk C. H., Roukema P. A., Wolf J. H., Lisman J. J. W. and Vliegenthart J. F. G. (1987b) Primary Structure of O- and N-glycosidic carbohydrate chains derived from murine submandibular mucin, *Carbohydr. Res.*, 164, 43-48

O

Nieuw Amerongen A. V., Oderkerk C. H. and Veerman E. C. I. (1989) Interaction of human salivary mucin with hydroxyapatite. J. Biol. Buc., 17, 85-92

Nieuw Amerongen A. V., Bolscher J. G. M. and Veerman E. C. I. (1995) Salivary mucins : protective functions in relation to their diversity, *Glycobiology*, **5**, 733-740

Nishihara T., Gerton G. L. and Hedrick J. L. (1983) Radioinization studies of the envelopes from *Xenopus laevis* eggs, J. Cell. Biochem., 22, 235-244

Nishihara T, Wyrick R. E., Working P. K., Chen Y. and Hedrick J. L. (1986) Isolation and characterization of a lectin from *Xenopus laevis* eggs. *Biochemistry*, 25, 6013-6020

North S. M., Steck P. A., Spohn W. H. and Nicolson G. L. (1988) Development and characterization of a syngeneic monoclonal antibody to a rat mammary tumor metastasisassociated mucin-like cell-surface antigen (gp 580), *Int. J. Cancer*, **42**, 607-617

Oates M. D. G., Robsbottom A. C. and Schrager J. (1974) Further investigation into the structure of human gastric mucin: The structural configuration of the oligosaccharide chains, *Carbohydr. Res.*, 34, 115-137

Oliphant G. and Hedrick J. L. (1971) Isolation and physicochemical characterization of a sperm capacitation factor from the jelly coat of *Xenopus laevis* eggs. *Fed. Proc.*, **30**, 1280

Oliphant G. and Brackett B. G. (1973) Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.*, 9, 404-414

Omata S. (1993) Relative roles of jelly layers in successful fertilization of *Bufo bufo* japonicus. J. Exp. Zool., 265, 329-335

Omata S. and Katagiri C. (1996) Involvement of carbohydrate moieties of the toad egg vitelline coat in binding with fertilizing sperm, *Develop. Growth Differ.*, **38**, 663-672

Oriol R., Danilovs J., Hawkins B. R. (1981) A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene. Am. J. Hum. Genet., 33, 421-431

Oriol R., Le Pendu J. and Mollicone R. (1986) Genetics of ABO, H, Lewis, X and Related antigens, *Vox Sang.*, 51, 161-171

Palcic M. M. and Hindsgaul O. (1991) Flexibility in the donor substrate specificity of β 1,4-galactosyltransferase : application in the synthesis of complex carbohydrates, *Glycobiology*, 1, 205-209

Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Handrow R. R., Ax R. L. and First N. L. (1989) Effect of sulfated glycoconjugates on capacitation and acrosome reaction of bovine and hamster spermatozoa. *Gamete Research*, **24**, 403-413

Parry G., Beck J. C., Moss L., Bartley J. and Ojakian G. K. (1990) Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures : the role of cell-cell, cell-substratum and membrane-cytoskeleton interactions. *Exp. Cell. Res.*, **188**, 302-311

Paulson J. C. and Colley K. J. (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization and control of cell type-specific glycosylation. J. Biol. Chem., 264, 17615-17618

Pearson J., Allan A. and Venables C. (1980) Gastric mucus : isolation and polymeric structure of undegraded glycoprotein : its breakdown by pepsin, *Gastroenterology*, **78**, 709-715

Pearson J., Allan A. and Parry S. A. (1981) A 70000-molecular-weight protein isolated from purified pig gastric mucus glycoprotein by reductive disulfide bridges and its implication in the polymeric structure, *Biochem. J.*, **197**, 155-162

Perez-Vilar J., Eckhardt A. E. and Hill R. L. (1996) Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains J. Biol. Chem., 271, 9845-9850

Picheral B. (1977a). La pénétration des spermatozoïdes et la réaction locale de l'œuf J. Ultrastructure Res., 60, 181-202

Picheral B. (1977b) La fécondation chez le triton Pleurodele. I. La traversée des enveloppes de l'œuf par les spermatozoïdes. J. Ultrastructure Res., 60, 106-120

Pigman W., Moschera J., Weis M. and Tettamanti G. (1973) The occurrence of repetitive glycopeptide sequences in bovine submaxillary glycoprotein, *Eur. J. Biochem.*, **32**, 148-154

Pigman W. (1977) Submandibular and sublingual glycoprotein, *The Glycoconjugates*, Vol I, Horowitz M.I. and Pigman W., Ed : Academic Press, New York, 129-

Piller F., Cartron J. P., Maranduba A., Veyrières A., Leroy Y. and Fournet B. (1984)
Biosynthesis of blood group I antigens. Identification of a UDP-GlcNAc : GlcNAcβ1-3Gal (R) β1-6 (GlcNAc to Gal) N-acetylglucosaminyltransferase in hog gastric mucosa, J. Biol. Chem., 259, 13385-13390

Plancke Y., Wieruszeski J.M., Alonso C., Boilly B. and Strecker G. (1995) Structure of four acidic oligosaccharides from the jelly coat surrounding the eggs of *Xenopus laevis*, *Eur. J. Biochem.*, 231, 434-439

Podolsky D. K. (1985) Oligosaccharide structures of human colonic mucin, J. Biol. Chem., 260, 8262-8271

Podolsky D. K., Fournier D. A. and Lynch K. E. (1986) Human colonic goblet cells. Demonstration of distinct subpopulations defined by mucin-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1263-1271

Porchet N., van Cong N., Dufosse J., Audie J. P., Gutonnet Duperat V., Gross M. S., Denis C., Degand P., Berheim A. and Aubert J. P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 414-422

Prieels J., Monnom D., Dolmans M., Beyer T. A. and Hill R. L. (1981) Copurification of the Lewis blood group *N*-acetylglucosaminide α 1-4-fucosyltransferase and an *N*acetylglucosaminide α 1-3-fucosyltransferase from human milk, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10456-40463

Probst J. C., Gertzen E. M. and Hoffman W. (1990) An integumentary mucin (FIB-B.1) from *Xenopus laevis* homologous with von Willebrand factor, *Biochemistry*, 29, 6240-6244

Probst J. C., Hauser F., Joba W. and Hoffmann W. (1992) The polymorphic integumentary mucin B.1 from *Xenopus laevis* contains the short consensus repeat. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6310-6316

Prody G. A., Greve C. and Hedrick J. L. (1985) Purification and characterization of an N-Acetyl-β-D-glucosaminidase from cortical granules of *Xenopus laevis*. *The Journal of Exp. Zool.*, **235**, 335-340 Raisman, J.S. and Cabada M. O. (1977) Acrosomic reaction and proteolitic activity in the spermatozoa of an Anouran amphibian, *Leptodactylus chaquensis* (CEI) *Dev. Growth Differ.*, 19, 227-232

Rana S. S., Chandrasekaran E. V., Kennedy J. and Mendicino (1984) Purification and structures of oligosaccharide chains in swine trachea and cowper's gland mucin glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12899-12907

Rearick J. L., Deas M. and Jetten A. M. (1987) Synthesis of mucous glycoproteins by rabbit tracheal cells *in vitro*. Modulation by substratum, retinoïds and cyclic AMP, *Biochem*. J., 242, 19-

Richter H. P. (1980) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of isolated cortices of Xenopus laevis eggs. 4, 985-995

Ringler N. J., Selvakumar R., Woodward H. D., Simet I. M., Bhavanandan V. and Davidson E. A. (1987) Structure of canine tracheobronchial mucin glycoprotein, *Biochemistry*, **26**, 5322-5328

Roberson M. M. and Barondes S. H. (1982) Lectin from embryos and oocytes of Xenopus laevis : purification and properties. J. Biol. Chem., 257, 7520-7524

Roberton A. M., Mantle M., Fahim R. E. F., Specian R. D., Bennick A., Kawagishi S., Sherman P. and Forstner J. F. (1989) The putative « link » glycopeptide associated with mucus glycoproteins - composition and properties of preparations from the gastrointestinal tracts of several mammals, *Biochem. J.*, **261**, 637-647

Roberts G. P. (1976) The role of disulfide bonds in maintening gel structure of bronchial mucus. Arch. Biochem. Biophys., 173, 528-537

Rose J. K. and Doms R. W. (1988) Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 257-288

Roussel P. (1988) The complexity of mucins, Biochimie, 70, 1471-1482

Roussel P., Lamblin G., Houdret N., Lhermitte M. and Slayter H. S. (1984) Conformation of human mucus glycoproteins observed by electron microscopy, *Biochem.* Soc. Trans., 12, 617-618

Rught R. (1935) Ovulation in the frog. I. Pituitary relations in induced ovulation, II. Follicular rupture in fertilization. J. Exp. Zool., 71, 163-193

Ruiz-Bravo N. and Lennarz W. J. (1989) Receptors and membrane interactions during fertilization. In : The molecular Biology of fertilization (Ed by Heide Schatten and G. Shatten) Cell Biology ed Academic Press Inc. San Diego, 21-36

Sadler J. E. (1989) in The Molecular Basis of Inherited Disease (Scriver, D. R., Beaidet A. L., Sly W. S. and Valle D. Ed), McGraw-Hill, New York, 2171-2188

Sadler J. E. (1991) von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 266, 22777-22780

Sadler J. E., Rearick J. I., Paulson J. C. and Hill R. (1979) Purification to homogeneity of a β -galactoside α 2-3-sialyltransferase and partial purification of an α -Nacetylgalactosaminide α 2-6-sialyltransferase from porcine submaxillary glands, *J. Biol. Chem.*, 254, 4434-4443

Salthe S. N. (1963) The egg capsules in the Amphibia., J. Morphol., 113, 161-171

Schachter H. (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides, *Biochem. Cell Biol.*, 64, 163-181

Schachter H., McGuire E.J. and Roseman S (1971) Sialic acids. 13. A uridine diphosphate D-galactose: mucin galactosyltransferase from porcine submaxillary gland. *J Biol Chem*, 246, 5321-5328

Schachter H. and Williams D. (1982) Biosynthesis of mucus glycoproteins. In mucus health and disease (Chantler E. N., Elder J. B. and Elstein M. Eds). Plenum press, New York, vol. 2, 3-28

Schachter H. and Brochausen I. (1989) The biosynthesis of branched O-glycans, in Mucus and related topics, Chantler, E. and Ratcliffe, N. A., Eds., University of Cambridge, Cambridge; Symp. Soc. Exp. Biol., 43, 1-26

Schachter H. and Brockhausen I. (1992) The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moities. In Glycoconjugate : composition, structure and functioon (Allen H. J. and Kisialus E. C. Eds). Marcel Dekker Inc., New York, 263-332

Scharfman, A., Lamblin G. and Roussel P. (1995) Interaction between human respiratory mucins and pathogens in : Mucins : Their structure and Biology. 655th Meeting held at the University of Manchester, 18-21 July 1995, 836-839

Schmell E. D., Gulyas B.J. and Hedrick J.L. (1983) Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. In : Mechanism and control of Animal Fertilization. *J.F. Hartmann, ed. Academic Press*, New York, 1983, 365-413

SeGall G. K. and Lennarz W. J. (1979) Chemical characterization of the component of the egg jelly coat from sea urchin egs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev. Biol.*, 71, 33-48

SeGall G. K. and Lennarz W. J. (1981) Jelly coat and induction of the acrosome reaction in echinoid sperm. *Devl. Biol.*, 86, 87-93

Sellers L. A., Allen A., Morris E. R. and Ross-Murphy S. B. (1988) Submaxillary mucins. Intermolecular interactions and gel forming potential of concentrated solutions, *Biochem. J.*, 256, 599-607

Seshadri H. S. and Reddy M. S. (1980) Studies on toad egg jelly glycoproteins : Part II, isolation of glycopeptide and investigation on structure of carbohydrate moity. India J. Biochem. Biophys., 17, 24-31

Shankar, V., Gilmore M. S., Elkins R. C. and Schdev G. P. (1994) A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization *Biochem J.*, 300, 295-298

Shaper N. L., Wright W.W. and Shaper J. H. (1990) Murine β 1,4-galactosyltransferase: both the amounts and structure of the mRNA are regulated during spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 87, 791-795

Shaper J. H. and Shaper N. L. (1992) Enzymes associated with glycosylation, Curr. Opinion Struct. Biol., 2, 701-709

Shapiro B. M., Cook S., Quest A. F. G., Oberdorf J. and Wothe D. (1990) Molecular mechanisms of sea-urchin sperm activation before fertilization, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 42, 3-8

Shaver J. R. (1966) Immunobiological studies of the jelly coats of anouran eggs. Amer. Zool., 6, 75-87

Shaver J. R., Burch S. H. and Umpierre C. C. (1970) Interspecific relationships of oviducal materials as related to fertilization in amphibia. J. Embryol. Exp. Morph., 24, 209-225.

Sheares B. T. and Carlson D. M. (1983) Characterization of UDP-galactose : 2acetamido-2-deoxy-D-glucose 3β-galactosyltransferase from pig trachea, J. Biol. Chem., 258, 9893-9898

Sheehan J. K., Oates K. and Carlstedt I. (1986) Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins, *Biochem. J.*, 239, 147-153

Sheehan J. K. and Carlstedt I. (1990) Electron microscopy of cervical-mucus glycoproteins and fragments thereform - the use of colloidal gold to make visible naked proteinregions, *Biochem. J.*, 265, 169-178

Sheffner A. L. (1963) The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, Ann. N. Y. Acad. Sci., 106, 298-310

Shimidzu T., Kinoh H. Yamaguchi M. and Suzuki N. (1990) Purification and characterization of the egg jelly macromolecules, sialoglycoprotein and fucose sulfate glycoconjugate, of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. Dev. Growth Differ., **32**, 473-487.

Shimoda Y., Kitajima K., Inoue S. and Inoue Y. (1994) Isolation, structural determination, and calcium-binding properties of the major glycoprotein present in *Bufo japonicus japonicus egg jelly. Eur. J. Biochem.*, **223**, 223-231

Shivers C. A. (1965) The relationships of antigenic components in egg jellies of various amphibian species. *Biol. Bull.*, **128**, 328-336

Shivers C. A. and James J. M. (1969) Morphology and Histochemistry of the oviduct and egg-jelly layers in the frog, *Rana pipiens*. Anat. Rec., 166, 541-556

Shivers C. A. and James J. M. (1970) Capacitation of frog sperm. *Nature*, 227, 183-184

Shivers C. A. and James J. M. (1971) Fertilization of antiserum-inhibited frog eggs with « capacitated » sperm. *Biol. Reprod.*, 5, 229-235

Shogren R., Gerken T. A. and Jenthoft N. (1989) Role of glycosylation of the conformation and chain dimensions of O-linked glycoproteins; light-scattering studies of ovine submaxillary mucin, *Biochemistry*, 28, 5525-

Siddiqui J., Abe M., Hayes D., Shani E., Yunis E. and Kufe D. (1988) Isolation and sequencing of a cDNA coding for yhe human DF3 breast carcinoma-associated antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 2320-2323

Sidhu K. S. and Guruya S. S. (1989) Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int. Rev. Cytol.*, **118**, 231-280

Silberberg A. (1987) A model for mucus glycoprotein structure. *Biorheology*, 24, 605-614

Slayter H. S., Cooper A. G. and Brown M. C. (1974) Electron microscopy and physical parameters of human blood group i, A, B, and H antigens, *Biochemistry*, 13, 3365-3371

Slayter H. S., Lamblin G., La treut A., Galabert C., Houdret N., Degand P. and Roussel P. (1984) Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein, *Eur. J. Biochem.*, 142, 209-218

Slomiany B. L., Murty V. L. N. and Slomiany A. (1980) Isolation and characterization of oligosaccharides from rat colonic mucus glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, 255, 9719-9723

Slomiany B. L., Witas H., Murty V. L. N., Slomiany A. and Mandel I. D. (1983) Association of lipids with proteins and glycoproteins in human saliva, *J. Dent. Res.*, 62, 24-27

Slomiany B. L., Zdebska E. and Slomiany A. (1984) Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H⁺Le^{b+} gastric mucin, J. Biol. Chem., **259**, 2863-2869

Smith B. F. and LaMont J. T. (1983) Bovine gallbladder mucin binds bilirubin in vitro, Gastroenterology., 85, 707-712

Smith B. F. and LaMont J. T. (1984) Hydrophobic binding properties of bovine gallbladder mucin, J. Biol. Chem., 259, 12170-12177

Snary D., Allen A. and Pain R. H. (1974) Conformational changes in gastric mucoproteins induced by caesium chloride and guanidium chloride, *Biochem. J.*, 141, 641-646

Sorimachi H., Emori Y., Kawasaki H., Kitajima K., Inoue S., Suzuki K. and Inoue Y. (1988) Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for apopolysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. Multiple mRNA species transcribed from multiple genes contain diverged numbers of exact 39-base (13 amino acid) repeats. J. Biol. Chem., 263, 17678-17684

Soupart P. and Clewe T. H. (1965) Sperm penetration of rabbit zona pellucida inhibited by treatment of ova with neuraminidase. *Fertility Sterility*, 16, 677-689

Specian R. D., and Neutra M.R. (1980) Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine, *J Cell Biol*, **85**, 626-640

Spee-Brand R., Strous G. J. and Kramer M. F.(1980) Isolation and partial characterization of rat gastric mucus glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, 621, 104-116

Springer G. F., Taylor C. R., Howard D. R. et al (1985) Tn, a carcinoma-associated antigen reacts with anti-Tn of normal human sera, *cancer*, 55, 561-569

Starkey B. J., Snary D. and Allen A. (1974) Characterization of gastric mucoproteins isolated by equilibrium density-gradient centrifugation in calcium chloride, *Biochem. J.*, 141, 633-639

Steinke J. H. et Benson D. G. (1970) The structure and polysaccharide cytochemistry of the jelly envelopes of the egg of the frog, *Rana pipiens*. J.Morph., **130**, 57-66

Stewart-Savage J. and Grey R. D. (1984) Fertilization of investment-free Xenopus eggs. Exp. Cell. Res., 154, 639-642

Stewart-Savage J. and Grey R. D. (1987) Loss of functional sperm entry into Xenopus laevis eggs after activation correlate with a reduction in surface adhesivity. Dev. Biol., 120, 434-446

Strecker G., Wieruszeski J. M., Martel C. and Montreuil J. (1987) Determination of the structure of sulfated tetra- and pentasaccharides obtained by alkaline borohydride degradation of hen ovomucin. A fast atom bombardment-mass spectrometric and ¹H-NMR spectroscopic study, *Glycoconj. J.*, **4**, 329-337

Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Alonso C., Leroy Y., Boilly B. and Montreuil J. (1992) Primary structure of neutral and acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of the Mexican axolotl, *Eur. J. Biochem.*, **207**, 995-1002

Strecker G., Wieruszeski J. M., Fontaine M.D.and Plancke Y (1994) Structure of the major neutral oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of Axolotl maculatum. Characterization of the carbohydrate sequence GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3/6), *Glycobiology*, 4, 605-609

Strecker G., Wieruszeski J. M., Plancke Y. and Boilly B. (1995) Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coat of the anuran *Xenopus laevis* by reductive β-elimination, *Glycobiology*, **5**, 137-146

Strous G. J. and Dekker J. (1992) Mucin-Type Glycoproteins, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 27, 57-92

Sugiura M., Kawasaki T. and Yamashina I. (1982) Purification and characterization of UDP-GalNAc : Polypeptide N-acetylgalactosamine transferase from an Ascites Hepatoma, AH 66, J. Biol. Chem., 257, 9501-9507

Suzuki N. (1990) Sperm-activating peptides from sea urchin jelly. Bioorg. Mar. Chem., 3, 47-70

Swallow D. M., Gendler S., Griffiths B., Corney G., Taylor-Papadimitriou J. and Bramwell M. E. (1987) The human tumor-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus *PUM*, *Nature (London)*, **328**, 82-84 Takamune K., Yoshizaki N. and Katagiri C. (1986) Oviducal pars recta-induced degradation of vitelline coat proteins in relation to acquisition of fertizability of toad eggs. *Gamete Res.*, 14, 215-224

Takasaki S., Yamashita K. and Kobata A. (1978) The sugar chain structure of ABO blood group active glycoproteins, J. Biol. Chem., 253, 6086-6091

Thornthon V. F. and Evenett P. J. (1969) Endocrine control of oocyte maturation and oviducal jelly release in the toad, *Bufo bufo. Gen. Comp. Endocrinol.*, 13, 268-274

Thornton D. J., Davies J. R., Kraayenbrink M., Richardson P. S., Sheehan J. K. and Carlstedt I. (1990) Mucus glycoproteins from « normal » human tracheobronchial secretion, *Biochem. J.*, 265, 179-186

Thornthon D. J., Howard M., Devine P. and Sheenhan J. K. (1995) Methods for separation and deglycosylation of mucin subunits, *Ana. Biochem.*, **227**, 162-167

Timpte C. S., Eckhardt A. E., Aberthy J. L. and Hill R. L. (1988) Porcine submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated, identical sequences of 81 residues, *J. Biol. Chem.*, 263, 1081-1088

Tondini C., Hayes D. F., Gelman R., Henderson I. C. and Kufe D. W. (1988)Comparison of CA15-3 and carcinoembryonic antigen in monitoring the clinical course of patients with metastatic breast cancer, *Cancer Res.*, **48**, 4107-4112

Toribara N. W., Gum J. R., Culhane P. J., Lagace R. E. and Kim Y. S. (1991) MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism *J. Clin. Invest.*, **88**, 1005-1013

Toribara N. W., Roberton A. M., Ho S. B., Kuo W. L., Gum E., Hicks J. W., Gum J. R., Byrd J. C., Siddiki B. and Kim Y. S. (1993) Human gastric mucin (identification of a unique species by expression cloning) *J. Biol. Chem.*, **268**, 5879-5885

Vacquier V. D., Tegner M. J. and Epel D. (1973) Protease released from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy, *Exptl. Cell.Res.*, **80**, 111-119

Vacquier V. D. and Moy G. W. (1977) Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2456-2460

Van Halbeek H., Dorland L, Haverkamp J, Veldink GA, Vliegenthart J. F. G., Fournet B., Ricart G., Montreuil J., Gathmann W. D. and Aminoff D. (1981) Structure determination of oligosaccharides isolated from A+, H+ and A-H- hog-submaxillary-gland mucin glycoproteins, by 360-MHz 1H-NMR spectroscopy, permethylation analysis and mass spectrometry, *Eur J Biochem.*, **118**, 487-495

van Halbeek H., Breg J., Vliegenthart J. F. G., Klein A., Lamblin G. and Roussel P. (1988) Isolation and structural characterization of low-molecular-mass monosialyl oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of patient suffering from bronchiectasis, *Eur. J. Biochem.*, 177, 443-460

Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides : all of the theories are correct, *Glycobiology*, **3**, 97-130

Vavasseur F., Dole K., Yang J., Dole K., Paulsen H. and Brockhausen I.(1995) Characterization of O-glycan core 3 of UDP-GlcNAc: GalNAc-R β 3-Nacetylglucosaminyltransferase activity from colonic tissues. Loss of the activity in human cancer cell lines, *Glycobiology*, **5**, 351-357

Veerman E. C. L, Ligtenberg A. J. M., Schenkels L. C.P. M., Walgreen-Weterings E. and Nieuw-Amerongen A. V. (1995) Binding of human high molecular weight salivary mucins (MG1) to *Haemophilus parainfluenzae*, J. Dent. Res., 74, 351-357

Verbert A. Montreuil J., Bouquelet S., Cacan R., Debray H., Fournet B., Michalski J. C., Spik G. and Strecker G. (1995) *Methods on glycoconjugates*, a laboratory manual, Harwood academic publishers GmbH, Switzerland

Verbert A. (1995) From Glc₃Man₉GlcNAc₂-protein to Man₅GlcNAc₂-protein : transfert « en bloc » and processing. In *Glycoproteins* 28a (Montreuil J., Vliegenthart J. F. G., Schachter H. Eds) 145-152, Amsterdam : Elsevier.

Verdugo P. (1990) Goblet cells secretion and mucogenesis, Annu. Rev. Physiol., 52, 157-176

Verdugo P., Deyrup-Olsen I., Aitken M., Villalon M. and Johnson D. (1987) Molecular mechanism of mucin secretion. I. The role of intragranular charge shielding. J. Dent. Res., 66, 506-508

Verma M. and Davidson E. A. (1993) Molecular cloning and sequencing of a canine tracheobronchial mucin cDNA containing a cysteine-rich domain, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 90, 7144-7148

Verma M. and Davidson E. A. (1994) Mucin genes : Structure, expression and regulation, *Glycoconjugate J.*, 11, 172-179

Vilter A., (1967) Histochemistry of ovular sheaths in the Alpine salamander, C. R. Soc. Biol., 161, 63-67

Vos H. L., de Vries Y. and Hilkens J. (1991) The mouse episialin (Muc1) gene and its promoter : rapid evolution of the repetitive domain in the protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 121-130

Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M and Seed B (1990) Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells, *Science*, **250**, 1132-1135

Wang Y., Abernethy J. L., Eckhardt A. E. and Hill R. (1992) Purification and characterization of a UDP-GalNAc: Polypeptide α 1-3-N-Acetylgalactosaminyltransferase specific for glycosylation of threonine residues, J. Biol. Chem., **267**, 12709-12716

Wesley A., Mantle M., Man D., Qureshi R., Forstner G. and Forstner J. (1985) Neutral and acidic species of human intestinal mucin, J. Biol. Chem., 260, 7955-7959

Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Montreuil J., Strecker G., Peter-Katalinic J., Egge H., van Halbeek H., Mustaers J. H. G. M. and Vliegenthart J. F. G. (1987) Structure of the monosialyl oligosaccharides derived from salivary gland mucins glycoproteins of the chinese swiftlet (*Genus collocalia*), J. Biol. Chem., **262**, 6650-6657

Wikramanayake A. H. and Clark W. J. Jr (1994) Two extracellular matrix from oocytes of marine shrimp *Sicyona ingentis* that independently mediate only primary or secondary sperm binding. *Dev. Growth Diff.*, 36, 89-101

Witas H., Sarosiek J., Aono M., Murty V. L. N., Slomiany A. and Slomiany B. L. (1983) Carbohydr. Res., 120, 67-76

Wolf D. P. (1974) On the contents of cortical granules from *Xenopus laevis* eggs *Dev. Biol.*, 38, 14-29

Wolf D. P. and Hedrick J. L. (1971) A molecular approach to fertilization. III Development of a bioassay for sperm capacitation. Dev. Biol., 25, 360-376

Woodward H., Horsey B., Bhavanandan V. P. and Davidson E. A. (1982) Isolation, purification and properties of respiratory mucus glycoproteins, *Biochemistry*, **21**, 694-701

Wreschner D. H., Hareuveni M., Tsarfaty I., Smorodinsky N., Horev J., Zarestsky J., Kotkes P., Weiss M., Lathe R., Dion A. and Keydar I. (1990) Human epithelial tumor antigen

cDNA sequences (differential splicing may generate multiple protein forms), Eur. J. Biochem., 189, 463-473

Wyrick R. E., Nishihara T. and Hedrick J. L. (1974) Agglutination of the jelly coat and cortical granule components and the block to polyspermy in the amphibian Xenopus laevis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2067-2071

Xu G., Huan L. J., Khatri I. A. (1992a) cDNA for the carboxyl-terminal region of a rat intestinal mucin-like peptide, J. Biol. Chem., 267, 5401-5407

Xu G., Huan L., Khatri I., Sajjan U. S., McCool D., Wang D., Jones C., Forstner J (1992b) Human intestinal mucin-like protein (MLP) is homologous with rat MLP in the Cterminal region, and is encoded by a gene on chromosome 11p15.5, Biochem. Biophys. Res. Commun., 183, 821-828

Yamashi H., Takamune K and Katagiri C. (1988) Classification, innhibition and specificity studies of the vitelline coat lysin from toad sperm. Gamete Res., 20, 287-300

Yang J. M., Byrd J., Siddiki B., Chung Y., Okuno M., Sowa M., Kim Y. S., Matta K. L. and Bockhausen I. (1994) Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues, Glycobiology, 4, 873-884

Yates A. D. and Watkins W. M. (1982) The biosynthesis of blood group B determinants by the blood group A gene-specified α -3-GalNAc-transferase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 958-965

Yazawa S., Abbas S. A., Madiyalakan R., Barlow J. J. and Matta K. L. (1986) Nacetyl-B-D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarian tissue, Carbohydr. Res., 149, 241-252

Yonezawa S., Tachikawa T. and Shin S. (1992) Sialosyl-Tn antigen : its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas, Am. J. Clin. Pathol., 98, 167-174

Х

Ζ

Yoshizaki N. and Katigiri C. (1981) Oviducal contributions to alteration of the vitelline coat in the frog *Rana japonica* : An electron microscopic study. *Dev. Growth Differ.*, 23, 495-506

Yoshizaki N. and Katagiri C. (1982) Acrosome reaction in sperm of toad, *Bufo bufo japonicus*. Gamete Res., 6, 343-352

Yoshizaki N. and Katagiri C. (1984) Necessity of oviducal *pars recta* secretions for the formation of the fertilization layer in *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.*, **1**, 255-264

Yoshizaki N. (1985) Fine structure of oviducal epithellium of *Xenopus laevis* in relation to its role in secreting egg envelopes. J. Morph., **184**, 155-169

Yoshizaki N. (1986) Properties of the cortical granule lectin isolated from Xenopus eggs. Dev. Growth Diff., 28, 275-283

Younan F, Pearson J, Allen A and Venables C (1982) Changes in the structure of the mucous gel on the mucosal surface of the stomach in association with peptic ulcer disease., *Gastroenterology*, 82, 827-831

Young J. D., Tsuchiya D., Sandlin D. E. and Holroyde M. J. (1979) Enzymic Oglycosylation of synthetic peptides from sequences in basic myelin protein. *Biochemistry*, 18, 4444-4448

Yurewicz E. C., Oliphant G. and Hedrick J.L. (1975) The macromolecular composition of *Xenopus laevis* egg jelly coat. *Biochemistry*, 14, 3101-3107

Zasloff M. (1992) Antibiotic peptides as mediators of innate immunity, Curr. Opin. Immunol., 4, 3-7

Zotter S., Hageman P. C., Lossnitzer A., Mooi W. J. and Hilgers J. (1988) Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin, *Cancer Rev.*, 11, 55-101





Pleurodeles waltl

Pleurodeles waltl (Urodèle) a été la première espèce étudiée. Ses spécificités structurales (encadrées) se sont révélées particulièrement intéressantes puisqu'elles représentent des déterminants antigéniques humains rares. (Strecker *et al* 1992)

.



Axolotl mexicanum

La spécificité structurale de l'espèce Axolotl mexicanum (Urodèle) est représentée par les éléments de séquences encadrées (Strecker et al 1992)
Sous-espèces

A

B



La caractérisation des structures primaires des oligosaccharide-alditols de Xenopus laevis (Anoure) a permis de différentier deux sous-espèces qui possèdent leurs propres spécificités structurales. (Strecker et al 1995)



Principales structures isolées des gangues ovulaires d'Ambystoma maculatum (Urodèle). La présence de polymères de fucoses représente la spécificité structurale de cette espèce (Strecker et al 1994, Fontaine et al 1995)



Bufo bufo

Oligosaccharide-alditols isolés des gangues ovulaires de Bufo bufo (Anoure), la séquence qui caractérise cette espèce est encadrée (Morelle et Strecker 1997a)



Bufo bufo (suite)



Rana utricularia

La détermination structurale de l'espèce Rana utricularia (Anoure) montre que cette espèce biosynthétise des structures glycanniques représentant des déterminants antigéniques de groupes sanguins. Ces structures ne reflètent aucune spécificité d'espèce, toutefois une étude exhaustive des glycannes est en cours. (Morelle et Strecker 1997b)



Ambystoma tigrinum

La détermination des structures de l'espèce Ambystoma tigrinum (Urodèle) est explicitée dans la partie résultats (Maes et al 1995). La spécificité glycannique de cette espèce est encadrée.

Gal(\$1-3) HSO₃ GalNAc-ol Gal(a1-3) GlcNAc(β1-6) $Fuc(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol Kdn(α2-6) 🔨 Gal(\$1-4)Gal(\$1-3) GalNAc-ol HSO₃? Gal(\$1-3) Kdn(α 2-6) 3 Gal(β 1-3) HSO₃ $Fuc(\alpha 1-2)^{\dagger}$ Gal(\$1-3) Gal(\$1-3) Gal(\$1-3) GlcA(\$1-3) Kdn(α 2-6) Gal(α 1-3) GalNAc-ol $Fuc(\alpha 1-2)$ $Fuc(\alpha 1-2)$ Gal(β1-4) Gal(β1-3) K.dn(α2-6) Gal(\alpha1-3) GlcA(β1-3) $Fuc(\alpha 1-2)$ $Fuc(\alpha 1-2)$ Fuc(a1-2) 3_Gal(β1-3) HSO3 HSO3 ⁶GlcNAc(β1-6) Fuc(α1-3) GalNAc-ol $_{3}$ Gal(β 1-4) Gal(β 1-3) HSO₃ GalNAc-ol Gal(β1-4) Gal(β1-3) GlcA(β1-3) GalNAc-ol 3 Gal(β 1-4) Gal(β 1-3) HSO₂ Fuc(α 1-2) $Fuc(\alpha 1-2)$ $Fuc(\alpha 1-2)^{I}$ Gal(β1-4)^IGal(β1-3) GalNAc-ol GlcA(β1-3) 3, Gal(β 1-4) Gal(β 1-3) HSO₃ Gal(β 1-3) 3, HSÓ GalNAc-ol $\begin{array}{c|c} & \text{Gal}(\beta 1-4) \text{ Gal}(\beta 1-3) \\ & \text{GlcA}(\beta 1-3) \\ & \text{Fuc}(\alpha 1-2) \\ \end{array}$ $Fuc(\alpha 1-2)$ HSO₃ GalNAc-ol 3 Gal(β 1-4) Gal(β 1-3) HSO₃ Gal(β 1-3) Fuc(α 1-2) Fuc(α 1-2) $\begin{array}{c} Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3) \\ 3 \\ GlcA(\beta 1-3) \\ Fuc(\alpha 1-2) \\ HSO_3 \end{array}$ HSO3 Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Gal(β 1-3)Gal(β 1-3) Fuc(α 1-2) GicA(β 1-3) HSO₃(3) GalNAc-ol GlcNAc(\beta1-6) GalNAc-ol Gal(\$1-3) HSO3 6 GlcNAc(β1-6) GalNAc-ol GalNAc-ol Gal(\$1-3) $Gal(\beta 1-4) Gal(\beta 1-3)^{\prime}$ $\operatorname{Gal}(\beta 1-3) \xrightarrow{} \operatorname{Gal}(\beta 1-3) \xrightarrow{} \operatorname{Gal}(\beta 1-3) \xrightarrow{} \operatorname{Gal}(\beta 1-3) \xrightarrow{} \operatorname{Fuc}(\alpha 1-2)$ HSO₃(3) $Fuc(\alpha 1-2)$ HSO GlcNAc(β1-6) $Fuc(\alpha 1-3)$ GalNAc-ol Gal(β1-3) Rana temporaria Gal(\$1-3) $Fuc(\alpha 1-2)^{l}$

Cette espèce, Rana temporaria (Anoure), se caractérise entre autres par la présence de monosaccharides sulfatés et d'acide glucuronique.



 $\begin{array}{c} \text{GalNAc-ol} \\ \text{GlcNAc}(\alpha 1\text{-4})\text{Gal}(\beta 1\text{-3})^{\checkmark} \end{array}$ GalNAc(α 1-4)Gal(β 1-3) Gal(β 1-3) GalNAc-ol GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) $\begin{array}{c} \text{GalNAc-ol}\\ \text{GalNAc}(\alpha 1\text{-}4)\text{Gal}(\beta 1\text{-}3) \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1\text{-}3) \\ \end{array} \end{array}$ GlcNAc(β1-6)、 GalNAc-ol Gal(β1-3) Fuc(α1-2) $GalNAc \cdot ol GalNAc (\alpha 1 - 4)Gal(\beta 1 - 3) - GalNAc (\alpha 1 - 4)Gal(\beta 1 - 3) - Gal(\beta 1 - 3) - Gal(\beta$ GlcNAc(β1-6)、 GalNAc-ol GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Gal(β1-3) Fuc(α1-2) GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Gal(β1-3) -NeuAc (α2-6) GalNAc-ol NeuAc (α2-6) GalNAc-oi GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) Gal(61-3) 1 $GalNAc-ol GalNAc(\beta 1-4)Gal(\beta 1-3) \checkmark$ GalNAc(β1-4)Gal(β1-3) GaiNAc-oi NeuAc (a2-3) NeuAc (α2-3) NeuAc (α 2-6) Gai(β 1-3) GaiNAc-ol NeuAc (α2-6) [Fuc(a1-2)] GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) ⁴ Gal(β1-3) GalNAc-ol NeuAc (a2-6) $Fuc(\alpha 1-2)^{\dagger}$. GalNAc-ol GlcNAc(a1-4) Gal(B1-3) $\begin{array}{c} \mbox{GalNAc-ol} & \mbox{GalNAc-ol} \\ \mbox{Gal}(\beta 1-3) & \mbox{Gal}(\beta 1-3) \\ \mbox{Gal}(\beta 1-3) & \mbox{NeuAc}(\alpha 2-3) \end{array}$ Fuc($\alpha 1-2$) $GalNAc\text{-ol} \\ GalNAc(\alpha 1\text{-4})Gal(\beta 1\text{-3})^{-1}$ NeuAc (a2-3) HSO₃(6) NeuAc (α2-6) GIcNAc(β1-6) GalNAc-ol GalNAc-ol GalNAc(α1-4)Gal(β1-3) GalNAc(α 1-4)Gal(β 1-3) Gal(β1-3) GalNAc-ol GalNAc(α 1-4)Gal(β 1-3) Gal(β 1-3) NeuAc (α2-3)

Rana palustris

Rana palustris (Anoure) est la troisième espèce étudiée, la détermination structurale est explicitée dans la partie résultats de ce travail. La spécificité d'espèce est représentée par les séquences encadrées.