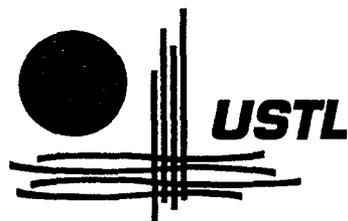


the 2000 0232

N° d'ordre :

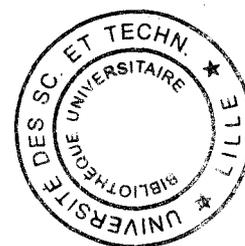


Université des Sciences et  
Technologies de Lille  
Villeneuve d'Ascq



**THESE**

présentée par



**Rabih MOURAD**

pour l'obtention du grade de

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

Analyse structurale des chaînes glycaniques  
des mucines oviducales spécifiques de l'espèce  
*Rana ridibunda*

Soutenue le 2 avril 1999 devant la Commission d'examen

<b>Président :</b>	Pr André VERBERT
<b>Rapporteurs :</b>	Pr Ten FEIZI Dr Geneviève LAMBLIN
<b>Examineurs :</b>	Dr André NEVEU Pr Philippe ROUSSEL
<b>Directeur de Thèse :</b>	Dr Gérard STRECKER

A la mémoire de mon père  
A ma mère  
A mes frères et soeurs

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche n° 111 du CNRS, dirigé par Monsieur le Professeur André VERBERT et sous la direction du Docteur Gérard STRECKER.

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur le Professeur André VERBERT pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je vous remercie également pour l'honneur que vous me faites en présidant le jury de cette Thèse.

Je remercie le Professeur Ten FEIZI et le Docteur Genviève LAMBLIN de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Philippe ROUSSEL et le Docteur André NEVEU d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Gérard STRECKER pour avoir dirigé mes recherches durant ces quatre dernières années. Je te suis très reconnaissant pour tes compétences scientifiques que tu as mises à ma disposition, ainsi que pour ton amitié, ta sympathie et ton enthousiasme.

Grand merci à ce grand Homme, l'ancien premier ministre libanais Monsieur Rafic HARIRI pour m'avoir donné l'occasion de continuer mes études supérieures ; sans vous, je ne serais jamais là et cette thèse n'aurait jamais existé. Merci à l'ensemble du personnel du Centre Culturel HARIRI notamment aux Docteurs HAMMOUD et LAKKIS pour m'avoir suivi tout au long de mon chemin en France.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Willy MORELLE pour son aide si précieuse afin d'élaborer ce travail. Je te remercie pour ta disponibilité et tes conseils.

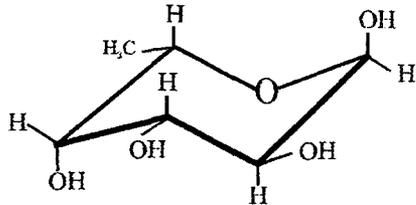
Merci aux membres du laboratoire : Alexandra, Florence, Ossarath, Yann et Yves. Merci également à tout le deuxième étage en particulier Catherine et Emmanuel ; ainsi qu'à l'ensemble du C9 notamment Brigitte et Mme CELEN. J'y associe également viviane DURIER et Bernard MOUCHEL.

Je n'oublie pas mes amis qui ont toujours été là pour m'écouter et me soutenir. Nous avons déjà partagé tant de bons souvenirs en espérant qu'il y en aura d'autres. Merci pour votre sincérité et votre amitié.

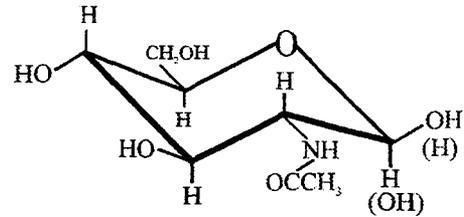


Classe : Amphibiens  
Sous-classe : Lissamphibiens  
Ordre : Anoures  
Sous-ordre : Neobatrachia  
Super-famille : Ranaidea  
Famille : Ranidae  
Sous-famille : Raninae  
Genre : ***Rana***  
espèce : ***ridibunda***

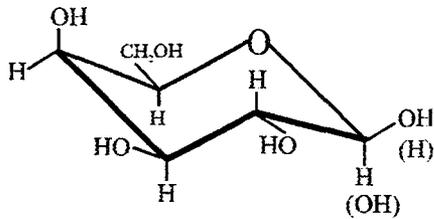
Fuc :  $\alpha$ -L-fucose



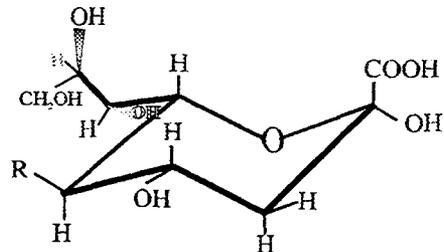
GlcNAc :  $(\alpha)\beta$ -D-N-acetyl-glucosamine



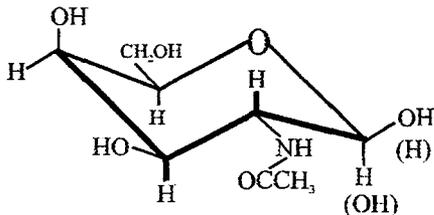
Gal :  $(\alpha)\beta$ -D-galactose



NeuAc : acide N-acetyl- $\alpha$ -neuraminique



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



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

Représentation des monosaccharides rencontrés dans les O-glycannes de type mucine

STRUCTURES	DETERMINANTS ANTIGENIQUES
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) (Gal(β1-4) GlcNAc(β1-3))	i
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAcβ1-	I
Gal(β1-4)GlcNAc Fuc(α1-3)	SSEA-1, Le <sup>x</sup>
Gal(β1-4)GlcNAc Fuc(α1-2)	Antigène H, groupe sanguin O
Gal(β1-4)GlcNAc Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)	Le <sup>y</sup>
GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2)	Goupe sanguin A
Gal(α1-3) Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2)	Goupe sanguin B
Gal(β1-3)GlcNAc Fuc(α1-4)	Goupe sanguin Le <sup>a</sup>
Gal(β1-3)GlcNAc Fuc(α1-2) Fuc(α1-4)	Goupe sanguin Le <sup>b</sup>
GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2) Fuc(α1-3/4)	Goupe sanguin ALe <sup>b</sup> /Le <sup>y</sup>
Gal(β1-3)GlcNAc NeuAc(α2-3) Fuc(α1-4)	Sialyl Le <sup>a</sup>

Représentation de certains antigènes fréquemment associés aux glycanes de types mucines humaines (selon Feizi)

---

# TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION .....	10
II. GÉNÉRALITÉS .....	13
II.A. LA FECONDATION CHEZ LES AMPHIBIENS ANOURES .....	13
II.A.1. SECRETIONS DES GANGUES .....	13
II.A.2. FECONDATION DES OEUFS .....	15
II.A.3. LES GANGUES OVULAIRES .....	17
II.A.3.1. Structure des gangues .....	17
II.A.3.2. Rôle des gangues .....	18
II.A.3.3. Conclusion .....	20
II.B. ETUDE STRUCTURALE DES MUCINES DE DIFFERENTES ESPECES D'AMPHIBIENS .....	21
II.B.1. <i>Xenopus laevis</i> .....	21
II.B.2. <i>Pleurodeles waltl</i> .....	22
II.B.3. <i>Bufo japonicus</i> .....	24
II.B.4. <i>Bufo arenarum</i> .....	24
II.B.5. <i>Bufo bufo</i> .....	25
II.B.6. <i>Rana temporaria</i> .....	31
II.B.7. <i>Rana palustris</i> .....	32
II.B.8. <i>Rana utricularia</i> .....	36
II.B.9. <i>Ambystoma mexicanum</i> .....	36
II.B.10. <i>Ambystoma tigrinum</i> .....	37
II.B.11. <i>Ambystoma maculatum</i> .....	41
II.B.12. <i>Rana clamitans</i> .....	41
II.B.13. CONCLUSION .....	43
II.C. STRUCTURES ET BIOSYNTHESE DES MUCINES: LE MODELE HUMAIN .....	44
II.C.1. STRUCTURES DES O-GLYCANNES CHEZ L'HOMME .....	44
II.C.1.1. Le noyau .....	44
II.C.1.2. Le squelette .....	47
II.C.1.3. La périphérie .....	48
II.C.2. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES .....	51
II.C.2.1. Les glycosyltransférases .....	51
II.C.2.2. L'étape d'initiation .....	52
II.C.2.3. La synthèse des noyaux .....	52
II.C.2.4. La synthèse de la périphérie .....	55
II.C.3. Rôle de la O-glycosylation .....	57
III. MATERIEL ET METHODES .....	60
III.A. $\beta$ -ELIMINATION REDUCTIVE .....	60

III.A.1. Principe .....	60
III.A.2. Protocole .....	60
III.B. METHYLATION .....	63
III.B.1. Principe .....	63
III.B.2. Protocole .....	65
III.B.3. Caractérisation des monosaccharides partiellement méthylés et acétylés .....	65
III.C. SPECTROMETRIE DE MASSE: .....	71
III.D. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE .....	71
III.D.1. LE SPECTRE PROTON ( $^1\text{H}$ ) A UNE DIMENSION .....	71
III.D.2. EXPERIENCES DE CORRELATION HOMONUCLEAIRE (COSY) .....	73
III.D.3. EXPERIENCE ROESY (Rotating Frame Over Hauser Effect Spectroscopy) .....	74
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>76</b>
IV.A. PURIFICATION DES O-GLYCANNES .....	76
IV.B. ANALYSE STRUCTURALE DES CHAÎNES GLYCANNIQUES .....	85
IV.B.1. Structures renfermant le noyau Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (noyau de type 2) .....	85
IV.B.2. Oligosaccharide alditol 200-I-1 .....	86
IV.B.3. Oligosaccharide alditol N-II-8b .....	90
IV.B.4. Oligosaccharides alditols 100-2 et 100-5 .....	95
IV.B.5. Oligosaccharides alditols possédant le noyau Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal $\beta$ 1 .....	99
IV.B.6. Oligosaccharides alditols possédant la séquence GlcA( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol .....	113
IV.B.7. Oligosaccharides alditols possédant le noyau Gal( $\beta$ 1-4)[Gal( $\beta$ 1-3)]Gal $\beta$ 1 .....	119
IV.B.8. Oligosaccharide alditol 100-11 .....	130
IV.B.9. Oligosaccharide alditol 400-II-6 .....	132
IV.B.10. Oligosaccharide alditol 200-I-B2 .....	132
IV.B.11. Oligosaccharide alditol 100-13 .....	135
IV.B.12. Oligosaccharide alditol 400-II-7 .....	139
IV.B.13. Oligosaccharide alditol 200-I-B3 .....	140
IV.B.14. Oligosaccharide alditol 200-I-B4 .....	140
<b>V. CONCLUSION ET DISCUSSION</b> .....	<b>149</b>
<b>VI. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>160</b>

---

# **INTRODUCTION**

## I. INTRODUCTION

Des travaux réalisés depuis 1991 dans le groupe "Diversité des chaînes glycaniques" de l'UMR 111 du CNRS ont démontré que les structures glycaniques des mucines des gelées oviducales d'amphibiens étaient strictement spécifiques de l'espèce étudiée. D'autres travaux, réalisés sur les oeufs de poissons, les oursins, trématodes et quelques mammifères, ont également mis en évidence l'existence de structures propres à chacune des espèces étudiées, sans que les auteurs n'aient encore affirmé que ces chaînes glycaniques pourraient constituer des marqueurs phénotypiques stricts des espèces animales.

Compte tenu du nombre extrêmement grand de polymères glucidiques qui peuvent être construits à partir d'un nombre donné de monomères ( $10^{12}$  avec 6 monomères,  $10^{17}$  avec 8 monomères), l'hypothèse formulée plus haut reste valable malgré les objections qui pourraient être formulées d'un point de vue purement numérique. Cette hypothèse est également liée à l'existence d'un nombre tout aussi important de nouvelles activités glycosyltransférasiques responsables de la biosynthèse de ces chaînes glycaniques, existence aisément confirmée par le simple examen des nouvelles structures élucidées.

La discussion qui termine notre mémoire fera d'ailleurs état d'une hypothèse selon laquelle cette diversité structurale, si elle se confirme, serait le résultat d'une sélection naturelle due à des mutations affectant le génome des glycosyltransférases étroitement associées aux interactions hôte-parasite(s). Les parasites sont déjà reconnus comme acteurs de l'Evolution, et les chaînes glycaniques seraient donc étroitement associées aux mécanismes de sélection naturelle qui résultent du parasitisme.

Les chaînes glycaniques des gelées oviducales jouent également un rôle au cours des mécanismes de fécondation, en particulier dans l'induction de la réaction acrosomienne, tandis que l'enveloppe vitelline serait plus particulièrement responsable de la reconnaissance spécifique des spermatozoïdes.

Bien que le modèle amphibien ait été l'un des premiers à être utilisé pour l'étude des mécanismes de la fécondation, ceux-ci demeurent encore largement méconnus compte tenu de la complexité des différents mécanismes physiologiques de reproduction propres à cette classe animale.

Après avoir rappelé l'essentiel des travaux réalisés sur les mucines d'amphibiens, et précisé les mécanismes généraux de biosynthèse des mucines humaines (qui seules ont été étudiées de façon exhaustive), nous décrivons la méthodologie et les résultats obtenus quant à l'analyse des structures glycaniques propres à l'espèce *Rana ridibunda*. Cette étude n'a pu être réalisée que grâce à l'apport de la résonance magnétique nucléaire qui constitue la principale méthode d'analyse de polymères glucidiques aussi complexes et imprévisibles que ceux qui caractérisent les mucines d'amphibiens.

---

# Généralités

<b>II. GÉNÉRALITÉS.....</b>	<b>13</b>
II.A. LA FECONDATION CHEZ LES AMPHIBIENS ANOURES .....	13
II.A.1. SECRETIONS DES GANGUES: .....	13
II.A.2. FECONDATION DES OEUFS.....	15
II.A.3. LES GANGUES OVULAIRES.....	17
II.B. ETUDE STRUCTURALE DES MUCINES DE DIFFERENTES ESPECES D'AMPHIBIENS .....	21
II.B.1. <i>Xenopus laevis</i> .....	21
II.B.2. <i>Pleurodeles waltl</i> .....	22
II.B.3. <i>Bufo japonicus</i> .....	24
II.B.4. <i>Bufo arenarum</i> .....	24
II.B.5. <i>Bufo bufo</i> .....	25
II.B.6. <i>Rana temporaria</i> .....	31
II.B.7. <i>Rana palustris</i> .....	32
II.B.8. <i>Rana utricularia</i> .....	36
II.B.9. <i>Ambystoma mexicanum</i> .....	36
II.B.10. <i>Ambystoma tigrinum</i> .....	37
II.B.11. <i>Ambystoma maculatum</i> .....	41
II.B.12. <i>Rana clamitans</i> .....	41
II.B.13. CONCLUSION.....	43
II.C. STRUCTURES ET BIOSYNTHESE DES MUCINES: LE MODELE HUMAIN .....	44
II.C.1. STRUCTURES DES O-GLYCANNES CHEZ L'HOMME.....	44
II.C.2. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES.....	51
II.C.3. Rôle de la O-glycosylation.....	57

## II. GÉNÉRALITÉS

### II.A. LA FECONDATION CHEZ LES AMPHIBIENS ANOURES

Les amphibiens possèdent deux modes de reproduction, selon les espèces. Ils peuvent être vivipares mais surtout ovipares; dans ce deuxième cas, les ovocytes sont entourés de plusieurs couches, appelées gangues ovulaires, indispensables à la fécondation.

Dans ce chapitre, nous allons tenter d'étudier le rôle de ces gangues ovulaires dans la fécondation des ovocytes.

#### II.A.1. SECRETIONS DES GANGUES:

L'oviducte se compose de trois parties: *pars recta*, *pars convulata* et *pars uterina* (figure 1).

Chez les ovipares, *la pars convulata* est bien développée et permet la sécrétion des gangues ovulaires (Boisseau 1975, Shivers et James 1969, Steinke et Benson 1970).

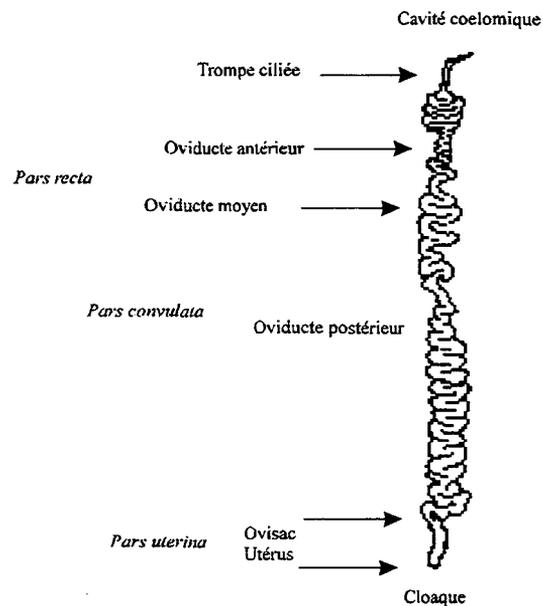


Figure 1: le système reproductif d'une femelle Anoure. Les oeufs se déplacent le long de l'oviducte

Quant aux vivipares, la *pars convulata* devient courte permettant d'avoir une *pars uterina* très importante; il s'agit ainsi d'un utérus ou ovisac qui porte l'embryon.

L'ovocyte est recouvert d'une couche appelée enveloppe ovarienne. Celle-ci est reliée à l'ovocyte grâce à des fibres denses de l'espace perivitellin.

L'enveloppe ovarienne va subir des modifications lors du transport de l'ovocyte dans l'oviducte.

Dans un premier temps, dans l'ovocyte nouvellement pondu, l'enveloppe ovarienne se transforme en enveloppe coelomique; celle-ci est identique à la première mais présente une organisation différente.

Ensuite, arrivée à la *pars recta*, l'enveloppe se transforme en enveloppe vitelline; celle-ci possède une composition en glycoprotéine différente et aura pour rôle de présenter aux récepteurs de spermatozoïdes leurs ligands.

Dans la *pars convulata*, l'ovocyte va être entouré des gangues ovulaires dont le nombre est variable selon l'espèce : de 6 chez *Rana pipiens* (Shivers et James 1969, Steinke et Benson 1970) à 2 chez *Lepidobatrachus laevis* (Carroll et al. 1991) (figure 2).

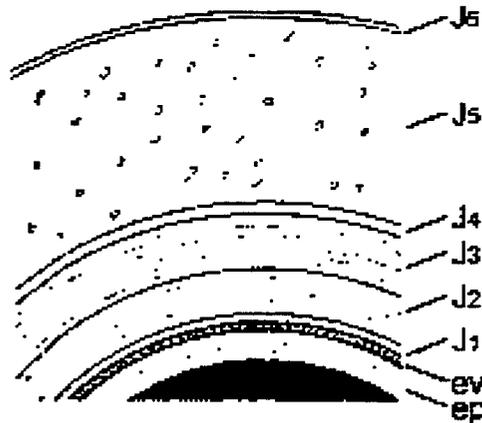


Figure 2: Représentation schématique des gangues ovulaires chez les Anoures (*Rana pipiens*). J<sub>1</sub> à J<sub>6</sub> : "jelly" couches; ev: enveloppe vitelline; ep: espace périvitellin.

L'intérêt de cette variation du nombre de couches est inexpliquée.

Après la ponte, les oeufs doivent être fertilisés avant que les gangues ne gonflent en s'imbibant d'eau et avant que des composés nécessaires à la fécondation ne diffusent à l'extérieur des gangues (Katagiri 1987).

## II.A.2. FECONDATION DES OEUFS

L'oeuf est donc entouré de l'enveloppe vitelline et des gangues ovulaires. Celles-ci sont indispensables pour que l'oeuf soit fécondable; ceci a été bien montré chez plusieurs espèces de *Bufo* (Katagiri 1966, Barbieri et al. 1969, Raisman et al. 1970, Cabada et al. 1978).

En effet, l'enveloppe vitelline subit plusieurs modifications lors du passage de l'ovocyte dans *la pars recta*; ces modifications sont très importantes pour la pénétration du spermatozoïde (Grey et al. 1977, Cabada et al. 1978, Miceli et al. 1978, Yoshizaki et Katagiri 1981, Takamune et al. 1986).

Ainsi, le spermatozoïde subit d'abord la capacitation (Austin 1952) qui consiste en une modification de la bicouche lipidique de sa membrane acrosomienne afin d'induire la réaction acrosomienne. En effet, le spermatozoïde traverse les gangues ovulaires et c'est au niveau de la gangue interne qu'a lieu la réaction acrosomienne (Raisman et Cabada 1977, Yoshizaki et Katagiri 1982).

La réaction acrosomienne est généralement induite par l'interaction de lectines membranaires du spermatozoïde avec des résidus de N-acétylglucosamine des glycoprotéines de la surface de l'enveloppe vitelline. Ces interactions peuvent être dues à une lectine, comme chez l'oursin (Vacquier et Moy 1977, Barnum et Brou 1983), mais également à une glycosidase, comme chez l'ascidie (Hoshi et al. 1983) ou encore à une galactosyltransférase, comme chez la souris (Lopez et al. 1985).

Le contenu de l'acrosome est alors relargué sur l'enveloppe vitelline; il s'agit de la sécrétion des enzymes, appelées protéinases acrosomiennes, qui permettent une hydrolyse ménagée de l'enveloppe vitelline et la pénétration du spermatozoïde à travers cette barrière physiologique (Iwao et Katagiri 1982).

Ces enzymes de type trypsine assurent donc trois fonctions: l'induction de la réaction acrosomienne, l'hydrolyse ménagée de l'enveloppe vitelline et l'activation des lysines des spermatozoïdes. Ces fonctions sont  $Ca^{2+}$  dépendantes.

Après leur pénétration, les spermatozoïdes vont provoquer une dépolarisation de la membrane plasmique (Grey et al. 1982, Charbonneau et al. 1983). Cette dépolarisation est due à une libération d'ions chlore et potassium (Jaffe et Schilchter 1985, Webb et Nuccitelli 1985). Cette réaction de dépolarisation est appelée activation ou potentiel de fécondation.

Après le déclenchement du potentiel de fécondation, on assiste à une libération des granules corticaux (Peres et Bernardini 1985). Ces granules vont interagir avec un ou des produits de la gangue interne.

Le produit de la réaction se dépose à l'extérieur de l'enveloppe vitelline (Grey et al. 1976). Cette réaction provoque la transformation de l'enveloppe vitelline en enveloppe de fécondation; transformation s'accompagnant de la formation d'une couche F (couche de fertilisation) et d'une réorganisation structurale des fibres de l'enveloppe en couches concentriques.

Cette mise en place d'une barrière infranchissable aux spermatozoïdes (Grey et al. 1976) va permettre la monospermie chez les anoures.

Ce phénomène est commun à plusieurs espèces animales; on le trouve chez les oursins (Vacquier et al. 1973) et chez les poissons (Ginsburg 1961).

La réaction corticale a été bien étudiée notamment chez *Xenopus laevis*. Le contenu des granules corticaux renferme essentiellement une lectine de masse moléculaire de 50 KDa qui est capable d'induire artificiellement la fertilisation d'ovocytes dépourvus de leurs gangues. Il s'agit d'un composé F qui se polymérise en présence de  $Ca^{2+}$  pour interagir avec des composés dans la gangue interne (Greve et Hedrick 1978). Ce ligand est un polysaccharide sulfaté (Birrr 1979).

Il est également possible que les ligands soient présents dans une couche de pré-fécondation sécrétée par la *pars recta* (Yoshizaki et Katagiri 1984b, Yoshizaki 1984a).

En tous cas, cette interaction lectine-ligand, qui peut être inhibée par des galactosides, produit une couche de fécondation très dense aux électrons (greve et Hedrick 1978, Wyrick et al. 1974) à l'interface enveloppe vitelline-gangue ovulaire (Yoshizaki et Katagiri 1984b, Grey et al. 1974, Schmell et al. 1983).

### **II.A.3. LES GANGUES OVULAIRES**

La réaction acrosomienne se déroule au voisinage de la gangue interne ou au contact de l'enveloppe vitelline et le spermatozoïde doit donc traverser les gangues ovulaires avant le déclenchement de cette réaction acrosomienne et la fécondation de l'ovocyte.

Il a été montré que les oeufs dépourvus de leurs gangues ne sont pas fécondables (Bataillon 1919, Hykes 1927, Good et Daniel 1943, Kambara 1953, McLaughlis et Humphries 1978, Katagiri 1966, Cabada et al. 1978). D'autres études ont montré que les ovocytes pourvus uniquement de leurs gangues internes sont fertilisables alors que ceux ne possédant que leurs gangues externes le sont beaucoup moins (Katagiri 1967). D'où l'intérêt d'étudier le rôle de ces gangues.

#### **II.A.3.1. Structure des gangues**

Les structures et les propriétés des gangues sont étroitement liées à leur composition chimique. Ces gangues sont constituées de glycoprotéines de type mucine renfermant 60 à 70% de sucre. Ce pourcentage varie selon les espèces (Folkes et al. 1950, Bolognani et al. 1966, Katagiri 1973).

On a pu déterminer par microscopie le nombre de couches entourant l'oeuf (Dumont et Brummett 1985) mais sans pouvoir connaître précisément la composition de chacune d'elle.

Les études immunochimiques et électrophorétiques indiquent que les gangues sont constituées d'une dizaine de macromolécules différentes (Yurewicz et al. 1975, Jégo 1978) dont la taille varie de 50.000 daltons pour atteindre plusieurs centaines de milliers ou même quelques millions de daltons.

Chez *Xenopus laevis*, la composition de chaque gangue a été déterminée (Yurewicz et al. 1975). Il s'agit de trois gangues constituées de 8 à 9 glycoprotéines; celles-ci ne sont pas

uniformement réparties à l'intérieur de chaque couche. La gangue la plus interne possède des groupements sulfate. Cela laisse suggérer un intérêt particulier de ces groupements sulfate compte tenu que la réaction acrosomienne a lieu au niveau de cette gangue interne.

### ***II.A.3.2. Rôle des gangues***

#### ***a) Blocage de la polyspermie:***

Une fois libéré, l'ovule doit être fécondé, sinon il va perdre sa fécondité au bout d'un certain laps de temps qui varie, selon l'espèce, de 15 minutes à une heure, voire plus (Katagiri 1961, Wolf et Hedrick 1971, Elinson 1971, Tchou-su et Wang 1956).

En effet, les gangues ovulaires subissent une hydratation qui est accompagnée par des changements physico-chimiques qui auront pour conséquence d'empêcher la migration des spermatozoïdes à travers les gangues ovulaires, permettant ainsi de diminuer le nombre de spermatozoïdes au niveau de l'enveloppe vitelline. Cela permet le blocage de la polyspermie.

Chez *Xenopus laevis*, ce blocage de la polyspermie pourrait tout aussi bien être du à l'action d'une N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase sécrétée par les granules corticaux (Greve et al. 1985), qu'à l'action d'une lectine corticale sécrétée conjointement (Wyrick et al. 1974).

#### ***b) Fertilisation croisée***

Les gangues ovulaires d'une certaine espèce possèdent une architecture structurale incompatible avec le spermatozoïde d'une autre espèce. Cela empêche le croisement inter-espèces (Katagiri 1965, Katagiri 1968).

Cependant, certains travaux ont permis de réaliser des fertilisations croisées (Katagiri 1967). En effet, des ovocytes d'une certaine espèce, entourés par les gangues ovulaires d'une autre espèce, seront fécondables par les spermatozoïdes de cette deuxième espèce. C'est le cas des oeufs de *Rana pipiens* enrobés de gangues de *Rana clamitans* (Elinson 1974).

c) Fécondité de l'oeuf:

Pour étudier l'importance des gangues dans la fécondité des ovocytes, des ovocytes possédant des degrés de maturation différents ont été utilisés.

Les résultats obtenus montrent que l'ovocyte est d'autant plus fertilisable que la distance parcourue le long de l'oviducte est importante. Il est aussi bien fertilisable quand il est pourvu uniquement de ses gangues J<sub>1</sub> et J<sub>2</sub> alors que pourvu uniquement de ses gangues J<sub>3</sub> et J<sub>4</sub>, il le sera beaucoup moins. Le taux de fertilisation augmente avec l'épaisseur de la gangue J<sub>2</sub> (Omata et Katagiri 1993).

Mais, malgré leur importance, il semble que J<sub>1</sub> et J<sub>2</sub> n'induisent pas directement la réaction acrosomienne (Yoshizaki et Katagiri 1982); en effet, celle-ci se produit plutôt au niveau de l'enveloppe vitelline. Le rôle des gangues serait d'induire la capacitation des spermatozoïdes (Elinson 1971, Wolf et Hedrick 1971, Katagiri 1973, Raisman et al. 1980).

d) Facteurs diffusibles

Certaines études ont montré la possibilité d'activer artificiellement la fécondation grâce à des facteurs diffusibles et dialysables (Elinson 1971, Barbieri et del Pino 1975, Ishihara et al. 1984). Il s'agit des cations divalents Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>.

En effet, la fécondation nécessite une diminution totale en cations et un maintien de la concentration en cations divalents Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> à 1mM (Ishihara et al. 1984). La fonction des gangues seraient donc de fixer les ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> permettant ainsi d'assurer un environnement ionique adéquat à la fertilisation.

Ainsi, il a été possible de fertiliser artificiellement des ovocytes en utilisant un milieu d'incubation appelé "egg-jelly-water". Il s'agit d'un milieu composé d'extraits bruts de gangue pouvant mimer les conditions ioniques trouvées dans les gangues (Shivers et James 1970, Cabada et al. 1978, Katagiri 1986 et 1987, Katagiri et al. 1982, Heasman et al. 1991).

D'autres travaux (Fonovich et al. 1993) ont permis la fécondation des oeufs de *Bufo arenarum* dépourvus de leurs gangues; ceci a été possible grâce à un tampon Ringer-

phosphate. Celui-ci possède un pH de 7,4 et provoque la variation de pH nécessaire pour déclencher la réaction acrosomienne.

Ces travaux montrent que les gangues jouent un rôle dans le maintien d'un pH et donc d'une force ionique nécessaire pour la fécondation.

#### e) Protection

De par leur consistance coriace, élastique ou gluante, les gangues protègent les oeufs contre certains prédateurs ou parasites (Salthe et Mecham 1974).

#### f) Adhésion

Les gangues jouent un rôle dans l'adhésion des oeufs les uns aux autres et au substratum.

#### g) Fixation des spermatozoïdes

Les glycannes des glycoprotéines situés au niveau de l'enveloppe vitelline sont impliqués dans la fixation des spermatozoïdes.

Chez *Bufo arenarum*, ces sont les résidus mannose qui sont impliqués dans la reconnaissance des spermatozoïdes (Valz-Gianinet et al. 1991). Quant à *Bufo japonicus*, ces sont les résidus GalNAc et acide sialique qui participent à cette fixation (Omata et Katagiri 1996).

### **II.A.3.3. Conclusion**

Le rôle des gangues ovulaires dans la fertilisation des oeufs est très important. Elles permettent la protection de l'oeuf, la fixation des spermatozoïdes, l'induction de la réaction acrosomienne, en maintenant un pH adéquat, et le blocage de la polyspermie.

## II.B. ETUDE STRUCTURALE DES MUCINES DE DIFFERENTES ESPECES D'AMPHIBIENS

L'étude des structures des glycanes des mucines de différentes espèces d'amphibiens nous donne un nombre stupéfiant de structures différentes et nouvelles. La spécificité structurale de chaînes glycaniques propre à chaque espèce implique l'existence de nouvelles activités glycosyltransférasiques.

Dans ce chapitre, nous allons tenter de récapituler les différentes structures glycaniques déterminées au sein de notre laboratoire au cours de ces dernières années et également de définir les nouvelles activités glycosyltransférasiques impliquées dans leur biosynthèse.

### II.B.1. *Xenopus laevis*

La figure 3 (Plancke et al. 1995; Strecker et al. 1995) décrit les structures glycaniques caractéristiques de l'espèce *Xenopus laevis*. Les noyaux de type 1 ( $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$ ) et 2 ( $\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{GlcNAc}(\beta 1-6)]\text{GalNAc}$ ) sont ainsi observés, mais il est intéressant de constater l'existence du chaînon  $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$  que nous retrouverons souvent au cours de cette étude. Ce dimère de galactose est lui-même di-substitué par des unités d' $\alpha$ -fucose, voire substitué par de l' $\alpha$ -galactose.

D'autre part, nous observons également la présence de l'épitope de groupe sanguin A ( $\text{GalNAc}(\alpha 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Gal}$ ) substitué par une unité d' $\alpha$ -N-acétylglucosamine.

Ces observations conduisent naturellement à conclure en l'existence d'au moins deux systèmes glycosyltransférasiques nouveaux, responsables de la substitution de l'épitope de groupe sanguin A par un résidu surnuméraire d' $\alpha$ -N-acétylglucosamine et de l'addition d' $\alpha$ -galactose à l'épitope H.

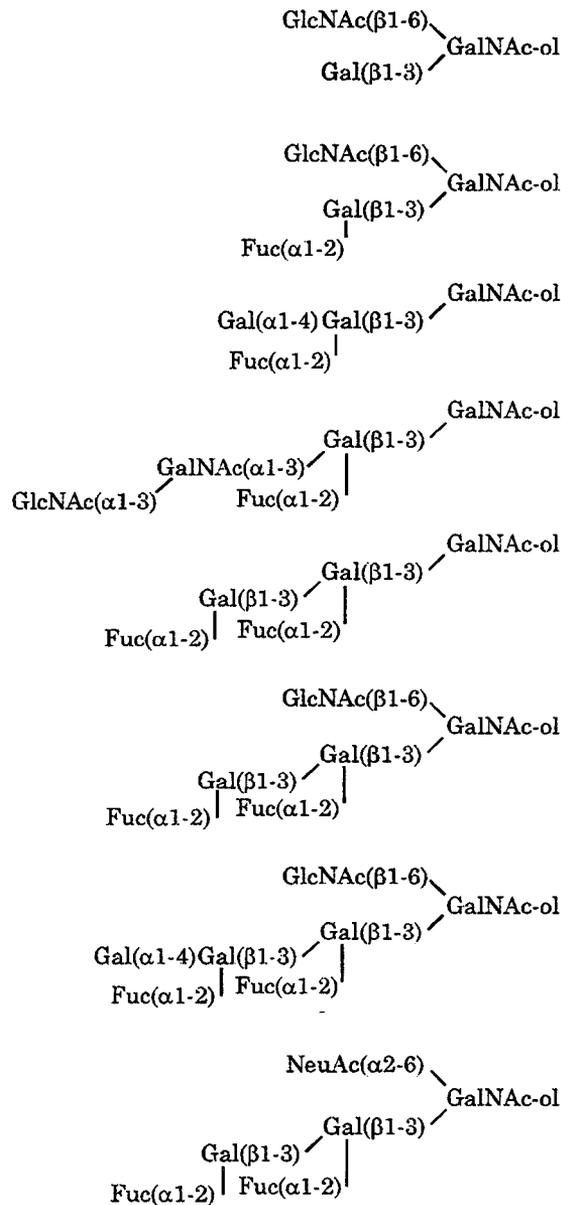


Figure 3: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduales de *Xenopus laevis* (Plancke et al. 1995; Strecker et al. 1995).

### II.B.2. *Pleurodeles waltl*

Les structures glycaniques rencontrées chez *Pleurodeles waltl* sont essentiellement des noyaux 1 et 3 (figure 4). Il est également remarquable de constater que ces structures sont riches en Kdn.

Les noyaux 3 sont substitués par des déterminants antigéniques Lewis X, A Lewis X, Lewis Y et A Lewis Y (Strecker et al. 1992a et b).

La structure majeure GalNAc( $\alpha$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3) suggère que le résidu GalNAc peut être directement fixé sur le déterminant Lewis X, réaction évidemment impossible chez l'Homme, chez qui la fixation de GalNAc ne peut s'effectuer que sur la séquence Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal.

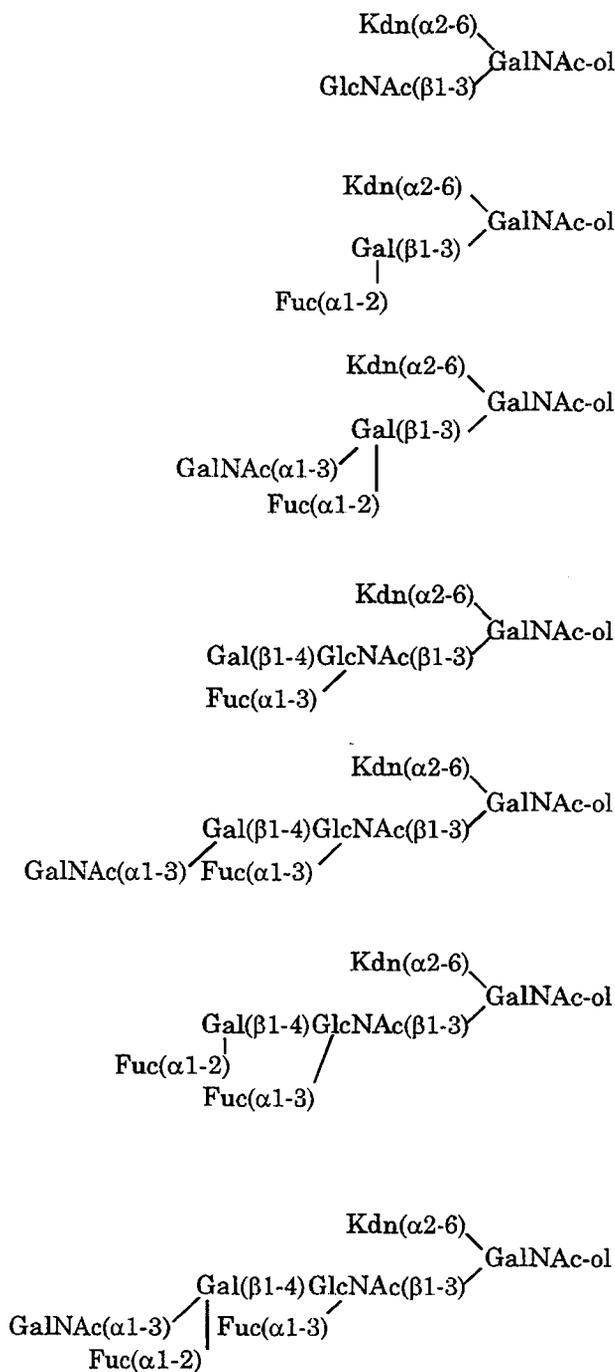


Figure 4: Structures d'oligosaccharides alditoles obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduales de *Pleurodeles waltl* (Strecker et al. 1992a et b).

### II.B.3. *Bufo japonicus*

Chez *Bufo japonicus* (figure 5), des structures simples avec des noyaux 1 et 2 ont été caractérisés (Shimoda et al. 1994). Certaines contiennent l'acide neuraminique et ces structures sont en tous points identiques à celles décrites chez l'Homme. Toutefois, il est possible que cette étude préliminaire n'ait pas pris en compte d'autres structures plus complexes également présentes chez cette mucine.

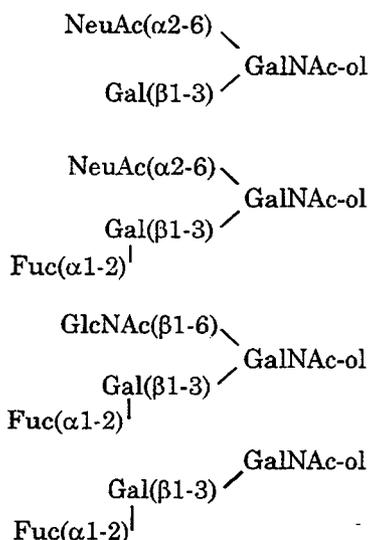


Figure 5: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduciales de *Bufo japonicus* (Shimoda et al. 1994).

### II.B.4. *Bufo arenarum*

Comme *Bufo japonicus*, *Bufo arenarum* présente des structures glycaniques ayant des noyaux de type 1 et 2 (Morelle et al. 1998a). Certaines d'entre elles contiennent de l'acide neuraminique mais d'autres portent des groupements sulfate (figure 6).

*B. arenarum* présente des déterminants antigéniques de groupe sanguin A (100-I-6) et Cad (100-I-4). Chacune de ces structures, considérée individuellement, ne constitue en aucun cas un marqueur phénotypique de l'espèce, puisqu'elles ont été retrouvées chez d'autres amphibiens. Néanmoins, leur association (exemple H, A, Cad) est typique de *B. arenarum*. Nous devons également prendre en compte le fait que l'étude des oligomères de masse plus

élevée n'a pas été conduite à son terme et seules ces molécules plus élaborées seront susceptibles de renfermer des séquences périphériques spécifiques.

*Bufo arenarum*

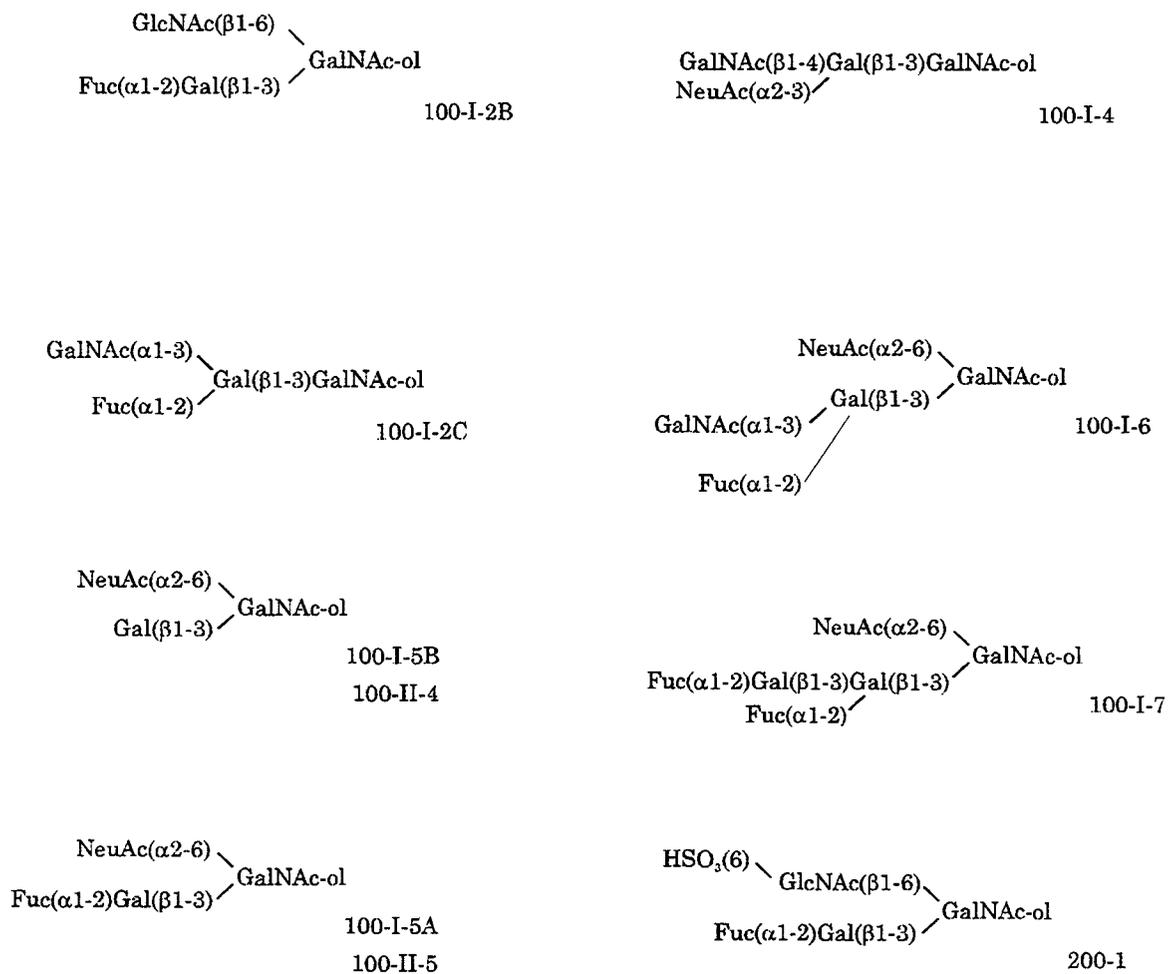


Figure 6: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduciales de *Bufo arenarum* (Morelle et al. 1998a).

### II.B.5. *Bufo bufo*

Les structures glycaniques présentes chez *Bufo bufo* (figure 7), sont essentiellement des noyaux 1, 2 et 3. Nous notons en outre la présence simultanée de NeuAc et NeuGc (Morelle et Strecker 1997a et 1998b).

*Bufo bufo* présente des déterminants antigéniques du groupe sanguin A liés à un noyau de type 1: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAC-ol. Ce déterminant A bloque définitivement l'élongation des

chaînes glycaniques chez l'Homme, mais chez *Bufo bufo*, l' $\alpha$ -GalNAc se présente comme un bon accepteur d'un  $\alpha$ -Gal (Morelle et Strecker 1997,b).

Cela suggère que le groupe sanguin A est une étape intermédiaire pour la biosynthèse de la chaîne glycanique complète, d'où la mise en évidence d'une nouvelle activité enzymatique:  
 $\alpha$ 1,3-Gal T :  $\alpha$ -GalNAc.

Deux autres enzymes sont à envisager d'après les structures décrites dans la figure 7:  
 $\beta$  1,3-Gal T :  $\beta$ -Gal et  $\beta$ 1,6-GlcNAc T :  $\beta$ -Gal.

*Bufo bufo* 100mM

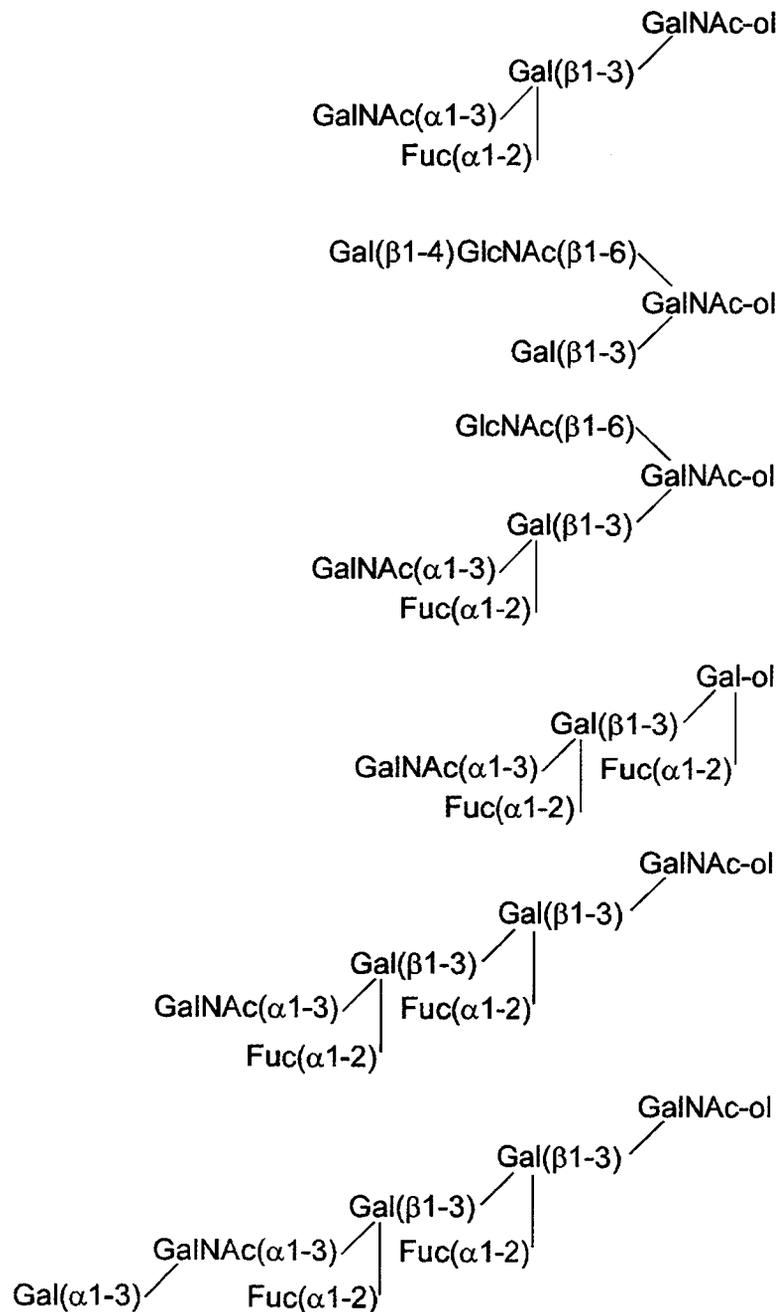


Figure 7: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après β-élimination de mucines oviducaltes de *Bufo bufo* (Morelle et Strecker 1997a, b et 1998b).

*Bufo bufo* 100mM

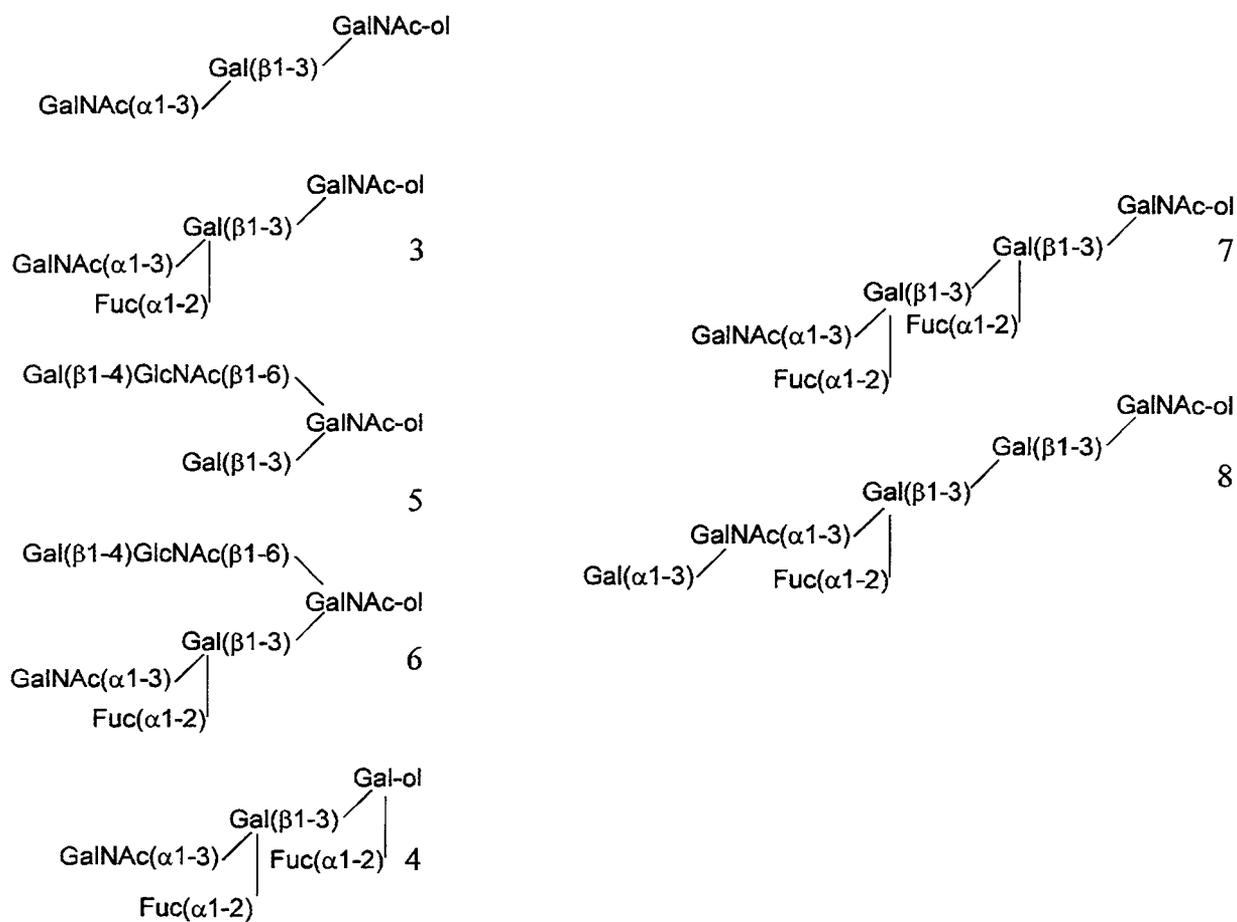


Figure 7 (suite).

*Bufo bufo* 200mM I

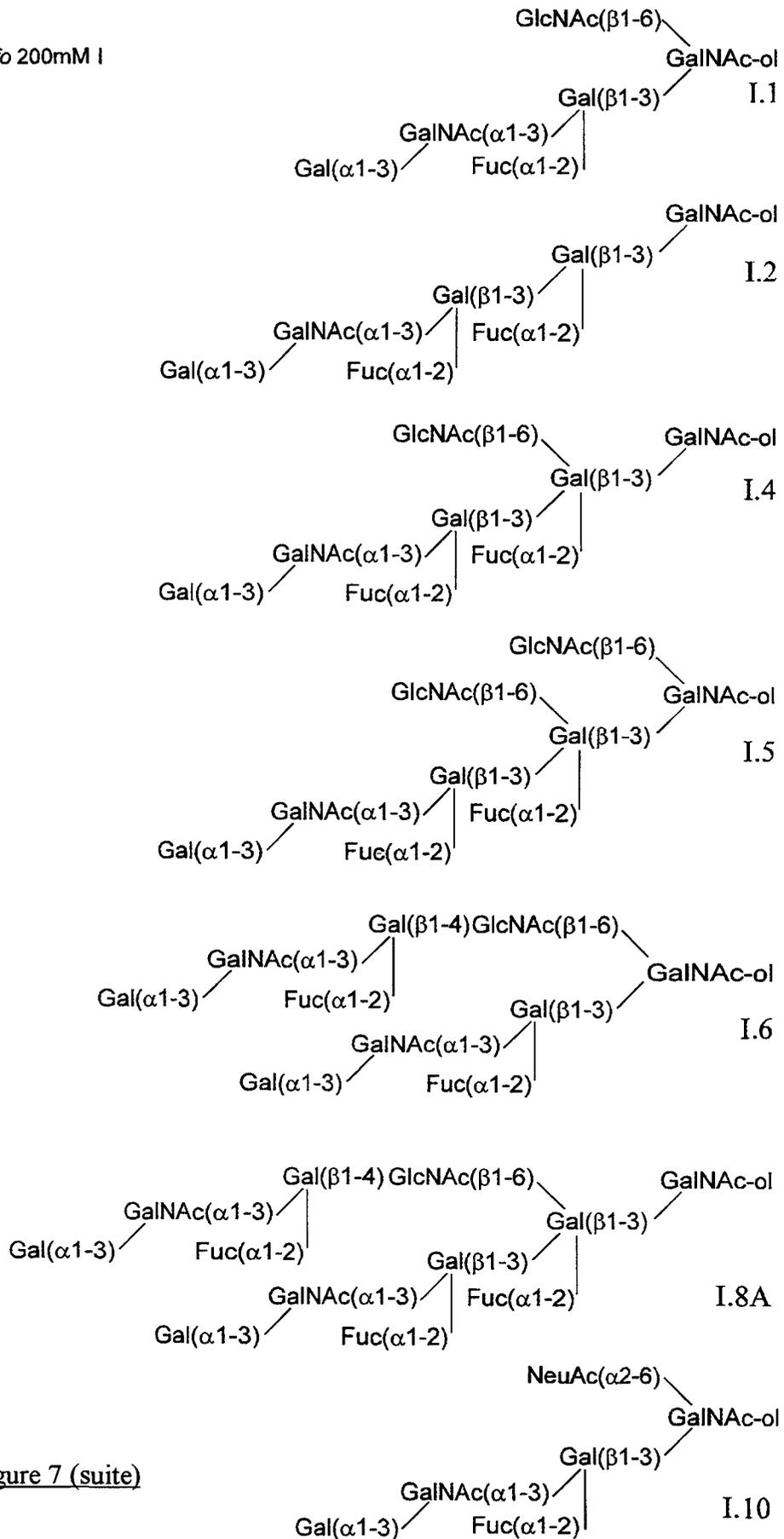


Figure 7 (suite)

*Bufo bufo* 200mM I (suite)

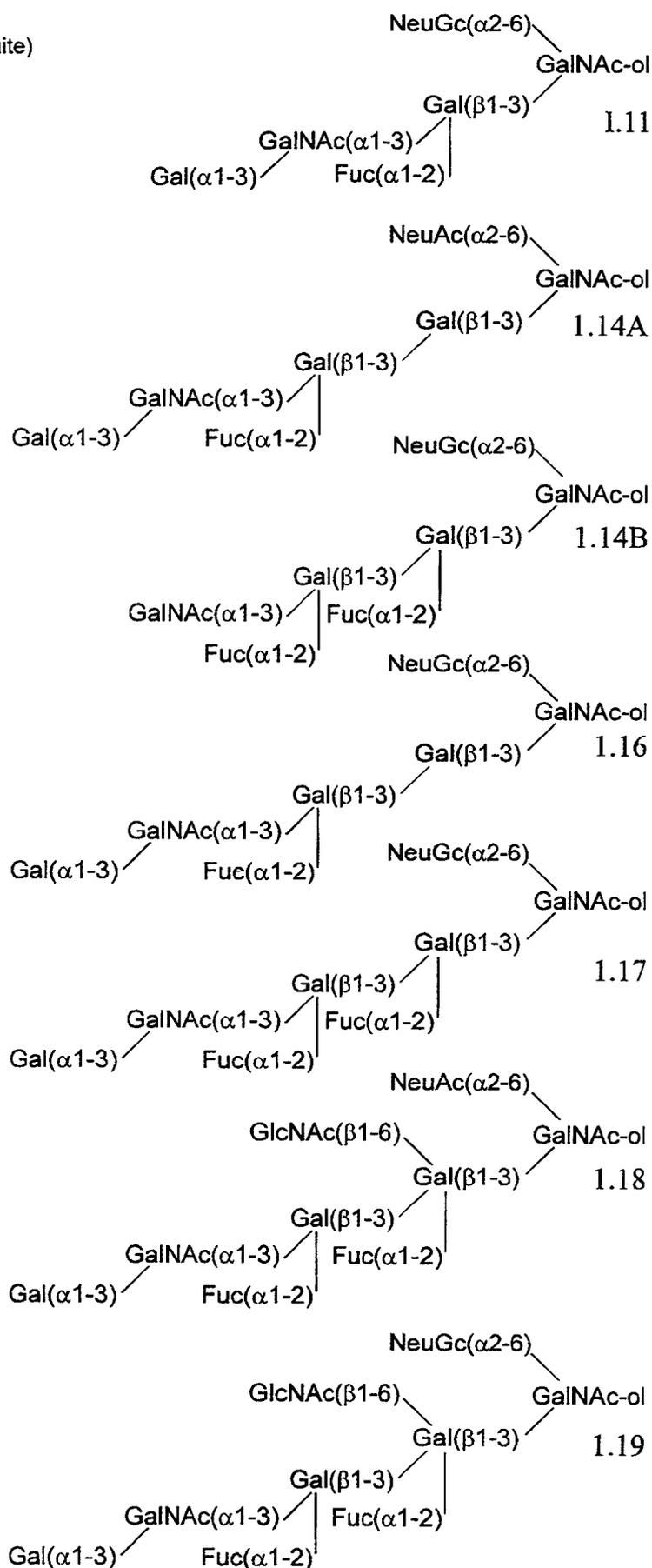


Figure 7 (suite)

*Bufo bufo* 200mM

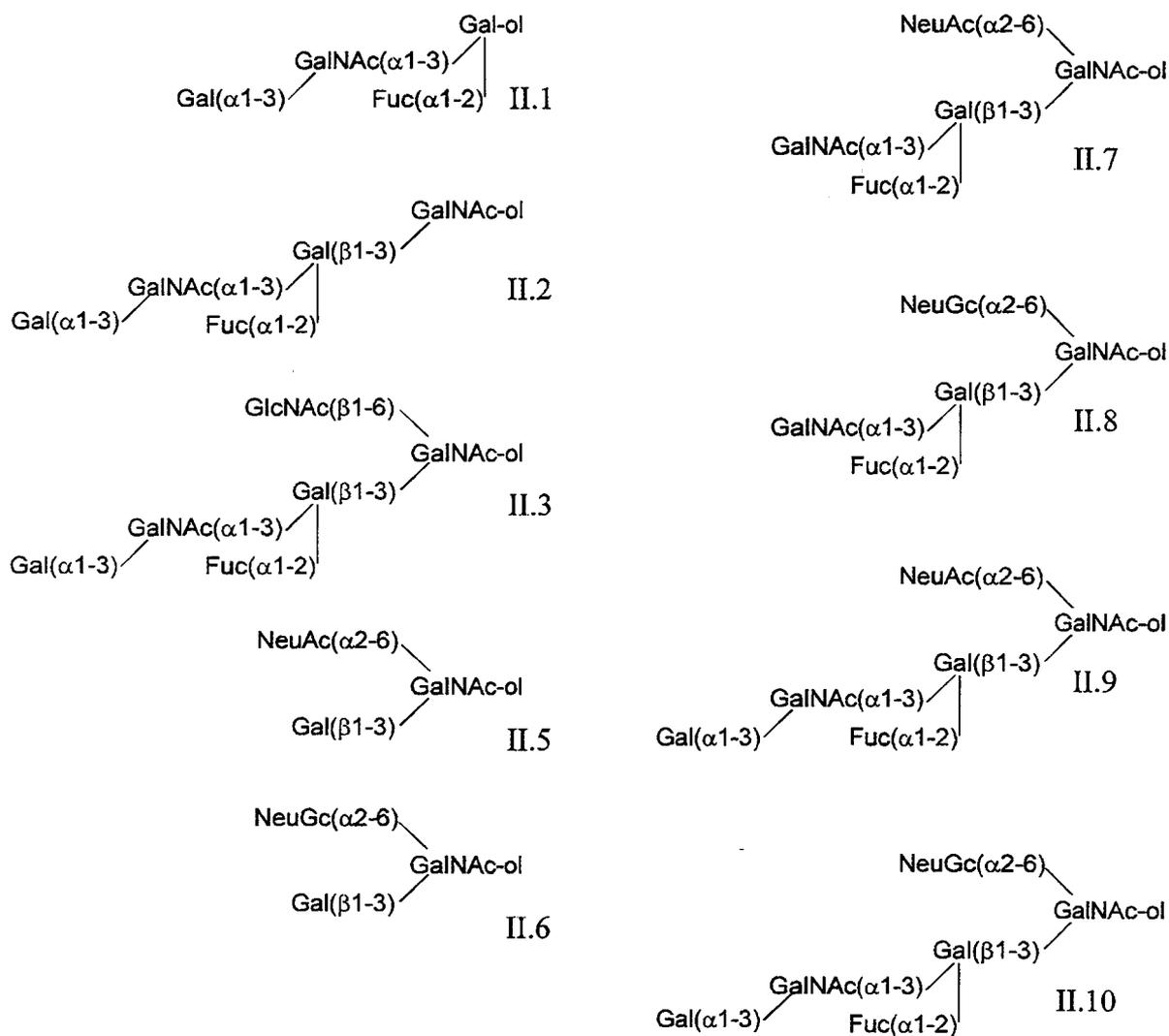


Figure 7 (suite).

### II.B.6. *Rana temporaria*

Chez *Rana temporaria*, 25 oligosaccharides alditols ont été identifiés et qui vérifient une fois de plus, l'hypothèse de la spécificité structurale propre à chaque espèce (figure 8).

Ces sont uniquement des noyaux de type 1 et 2. On y trouve du Kdn, des groupements sulfate et du GlcA.

L'originalité structurale réside d'une part en la présence d'acide glucuronique sulfaté ou fucosylé, conduisant en particulier au déterminant antigénique HNK-1 (Human Natural

Killer-1); et d'autre part, à l'observation d'unités de galactose trisubstitués en 2, 3 et 4 (Florea et al. 1997; Maes et al. 1997a).

Nous pouvons donc résumer l'originalité de ces structures par la présence des activités enzymatiques suivantes :

- $\beta$  1,4 Gal T : Gal  $\beta$
- $\beta$  1,3 Gal T : Gal  $\beta$
- $\beta$  1,3 GlcA T : Gal  $\beta$
- $\alpha$  1,2 Fuc T : GlcA  $\beta$
- $\beta$  1,3 GlcNAc T : GlcNAc  $\beta$

### *II.B.7. Rana palustris*

20 structures oligosaccharidiques neutres et acides ont été caractérisés (Maes 1997b). Les charges anioniques sont portées par l'acide N-acétylneuraminique et de rares groupements sulfate (figure 9).

Cette espèce est caractérisée par la répétition des noyaux de type 3. Sa spécificité consiste à la présence de GalNAc qui constitue près de 50% des monosaccharides totaux.

Les mucines portent également un déterminant antigénique rare du groupe sanguin Cad.

En outre, *Rana palustris* présente des activités transférases différentes de celles de *Rana temporaria*:

- $\beta$ 1,3 Gal T : GalNAc  $\alpha$
- $\alpha$  1,4 GalNAc T : Gal  $\beta$
- $\alpha$  1,4 GlcNAc T : Gal  $\beta$
- $\alpha$  2,3 NeuAc T : GalNAc( $\alpha$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-3).

Une structure isomérique de l'épitope Cad est également présente (structures 80-4B et 80-8B).

*Rana temporaria*

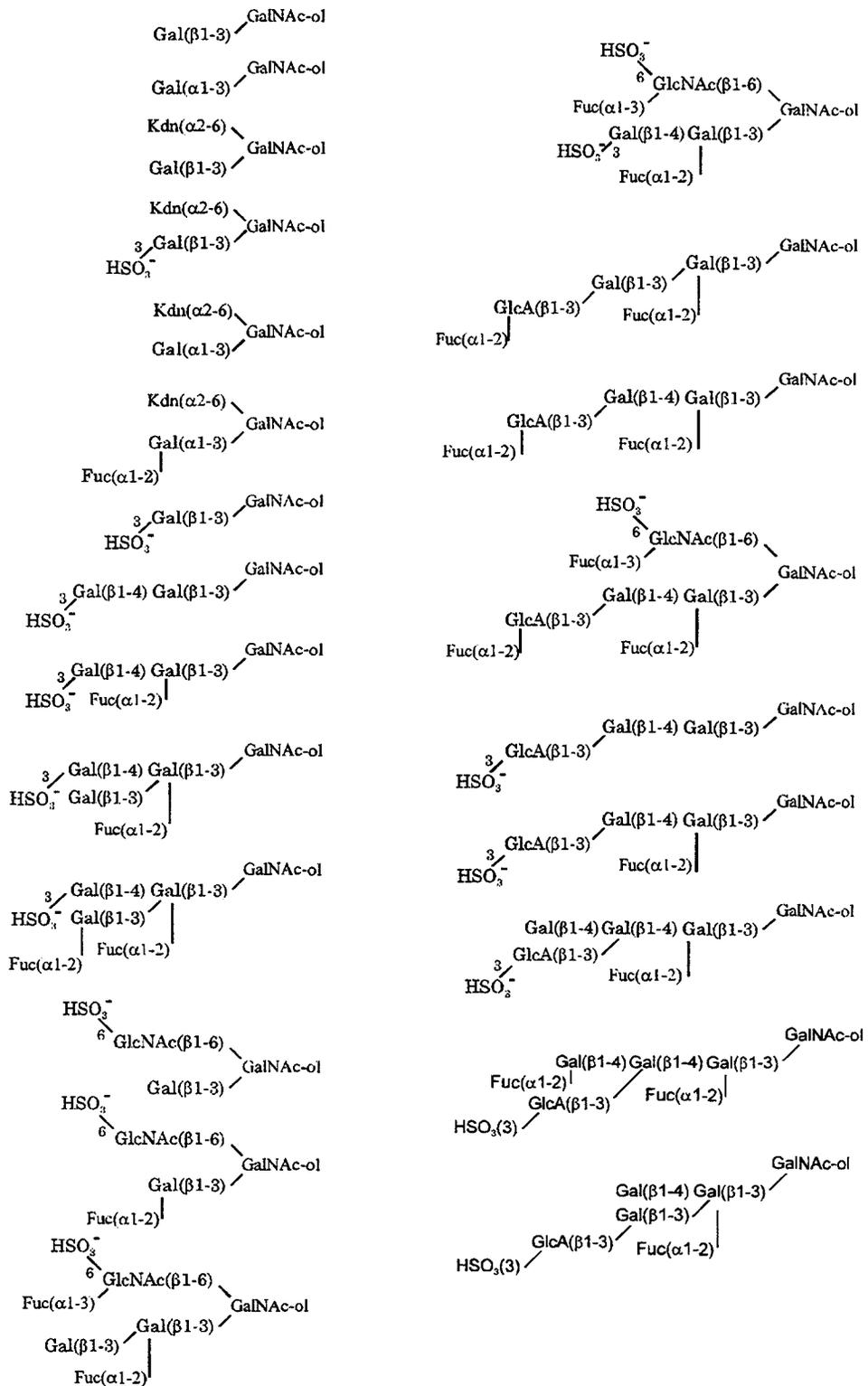


Figure 8: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après β-élimination de mucines oviducales de *Rana temporaria* (Florea et al. 1997; Maes et al. 1997a).

*Rana temporaria* (suite)

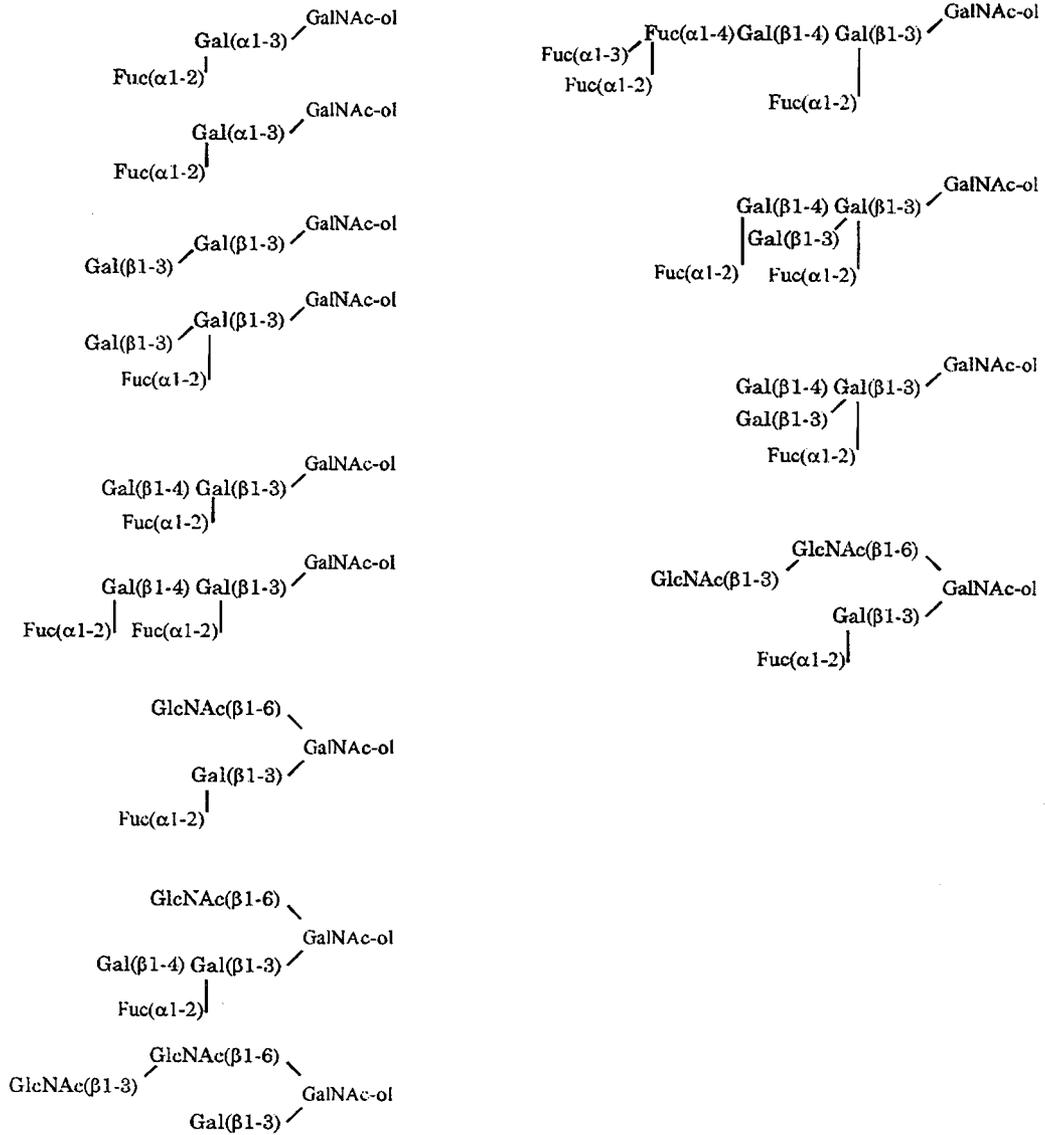


Figure 8 (suite).



### *II.B.8. Rana utricularia*

12 oligosaccharides alditols ont été isolés et qui vérifient encore une fois la spécificité glycanique propre à chaque espèce (figure 10).

Le fait le plus original de cette mucine est la présence du noyau: GlcNAc( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-6).

Elle ne présente ni de résidus Kdn ni de résidus N-aétylneuraminique. Les charges anioniques sont portées par des groupements sulfate et glucuronyl. Les noyaux sont de type 1 et 2. Elles présentent parfois des déterminants antigéniques A (Morelle et Strecker 1997c et 1998c).

### *II.B.9. Ambystoma mexicanum*

Les glycannes d'*Ambystoma mexicanum* (Strecker et al. 1992c) sont uniquement des noyaux de type 3 (figure 11). Ils présentent l'épitope H substitué par un Gal  $\alpha$ 1,4 sur le Gal  $\beta$  (au lieu du Gal  $\alpha$  dans le cas de l'épitope B). Il s'agit en fait d'une structure hybride P<sub>1</sub>/H.

Les charges anioniques sont exclusivement portées par du Kdn, qui est lui-même substitué par un dimère de fucose.

Ces résultats suggèrent naturellement l'existence des systèmes glycosyltransférases suivants:

➤  $\alpha$  1,4 Fuc T : Kdn

➤  $\alpha$  1,3 Fuc T : Fuc

➤  $\alpha$  1,4 Gal T : (Fuc) Gal.

## II.B.10. *Ambystoma tigrinum*

Nous observons la présence de 11 structures oligosaccharidiques acides (figure 12), dont la charge est portée par le Kdn. Celui-ci est mono ou disubstitué en 4 ou en 4 et 5 par du fucose. Cette structure constitue la spécificité d'*Ambystoma tigrinum*.

Cette espèce présente des déterminants antigéniques H, A, Le X et Le Y. Le noyau Gal( $\alpha$ 1-3)GalNAc semble très fréquent chez les vertébrés inférieurs alors que chez les mammifères, il n'a été identifié qu'à deux occasions, chez le rat et chez l'Homme (Maes et al. 1995).

Toutes ces structures mettent en évidence les activités enzymatiques suivantes:

- $\alpha$  1,4 Fuc T : Kdn
- $\alpha$  1,5 Fuc T : Kdn
- $\alpha$  1,3 Gal T : GalNAc
- $\alpha$  1,2 Fuc T : Gal  $\alpha$

*Rana utricularia*

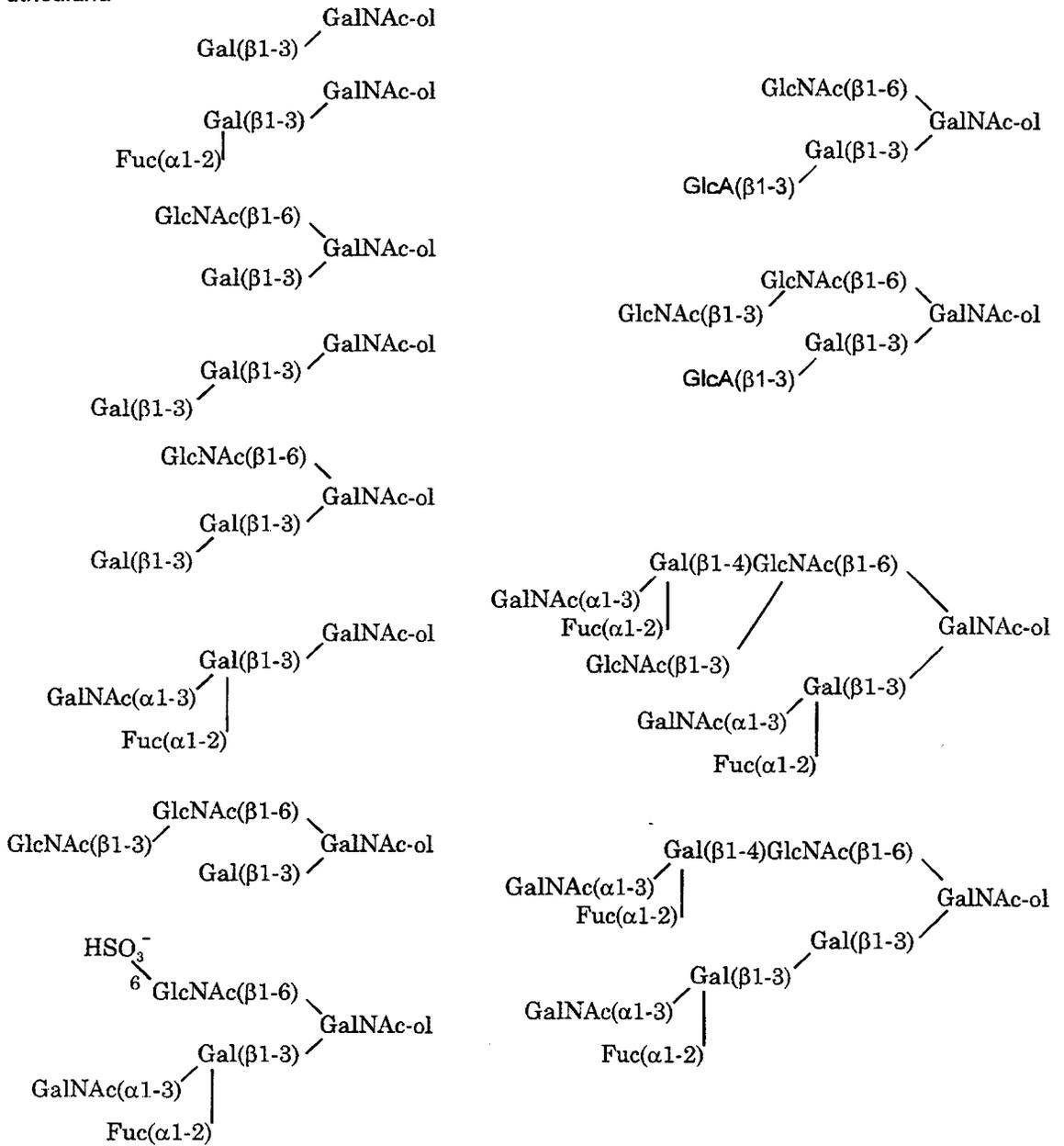


Figure 10: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduales de *Rana utricularia* (Morelle et Strecker 1997c et 1998c).

*Ambystoma mexicanum*

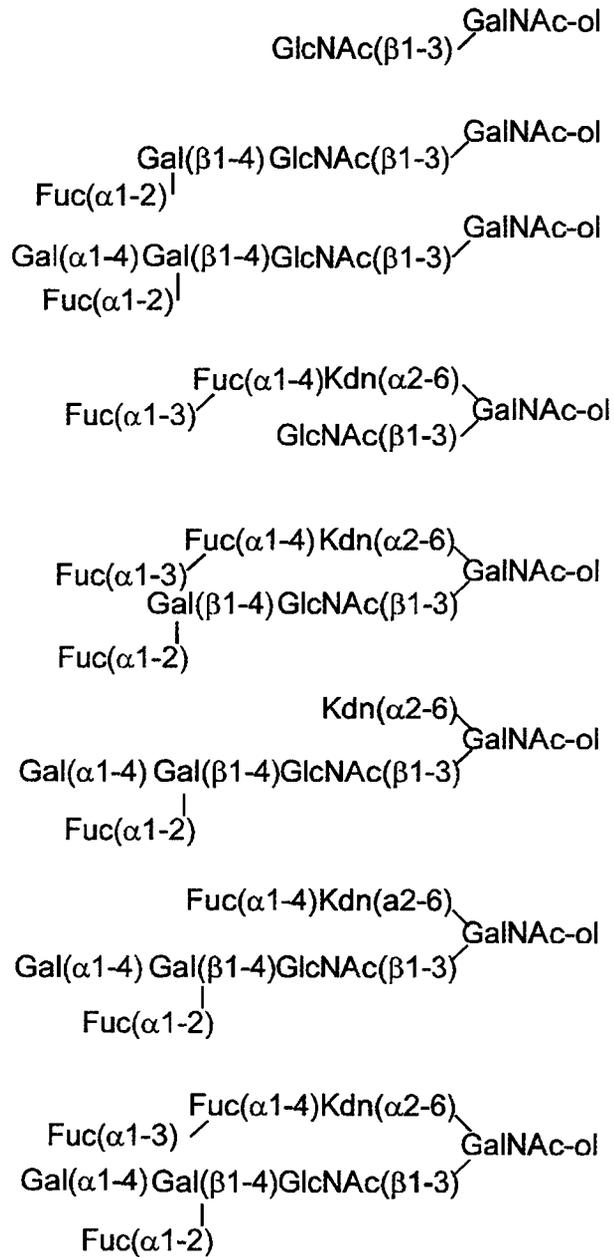


Figure 11: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviducales d'*Ambystoma mexicanum* (Strecker et al. 1992c).

*Ambystoma tigrinum*

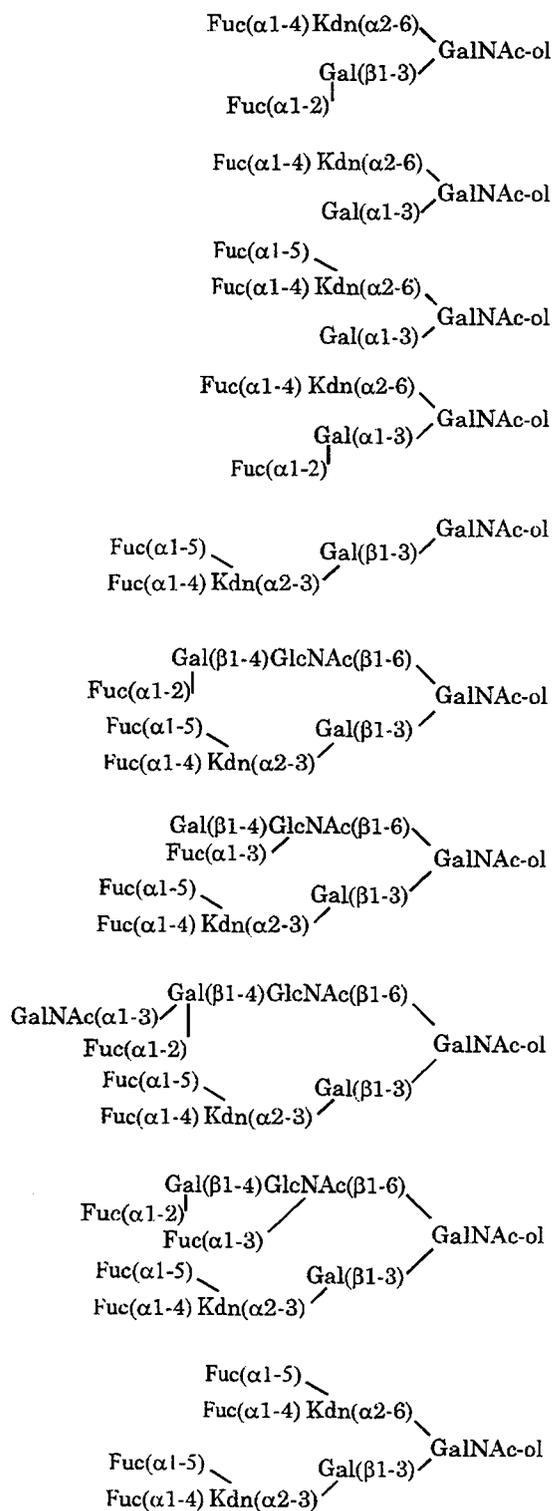


Figure 12: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après β-élimination de mucines oviducales d'*Ambystoma tigrinum*.

### *II.B.11. Ambystoma maculatum*

Les glycanes possèdent des noyaux 2 et 3 (figure 13) et renferment du Kdn lui-même substitué par un trimère ramifié de fucose (Strecker et al. 1994, Fontaine et al. 1995).

Ces structures suggèrent donc l'existence des activités glycosyltransférasiques suivantes:

☛ GalNAc  $\beta$  1,4 T : GlcNAc  $\beta$

☛  $\alpha$  1,4 Fuc T : Kdn

☛  $\alpha$  1,2 Fuc T : Fuc

☛  $\alpha$  1,3 Fuc T : Fuc

☛  $\alpha$  2,3 Kdn T : Gal

☛  $\alpha$  2,3 Kdn T : GalNAc.

### *II.B.12. Rana clamitans*

Des travaux préliminaires du Docteur F. Delplace (communication personnelle), il ressort que la plupart des structures isolées des mucines de *Rana clamitans* possèdent le chaînon: Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\alpha$ 1-3)Gal( $\alpha$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1- , c'est-à-dire la séquence de l'épitope P<sub>1</sub>, substitué par le disaccharide Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\alpha$ 1-3).

L'activité  $\alpha$ 1,3-Gal T : Gal  $\alpha$  est donc ici mise en évidence.

*Ambystoma maculatum*

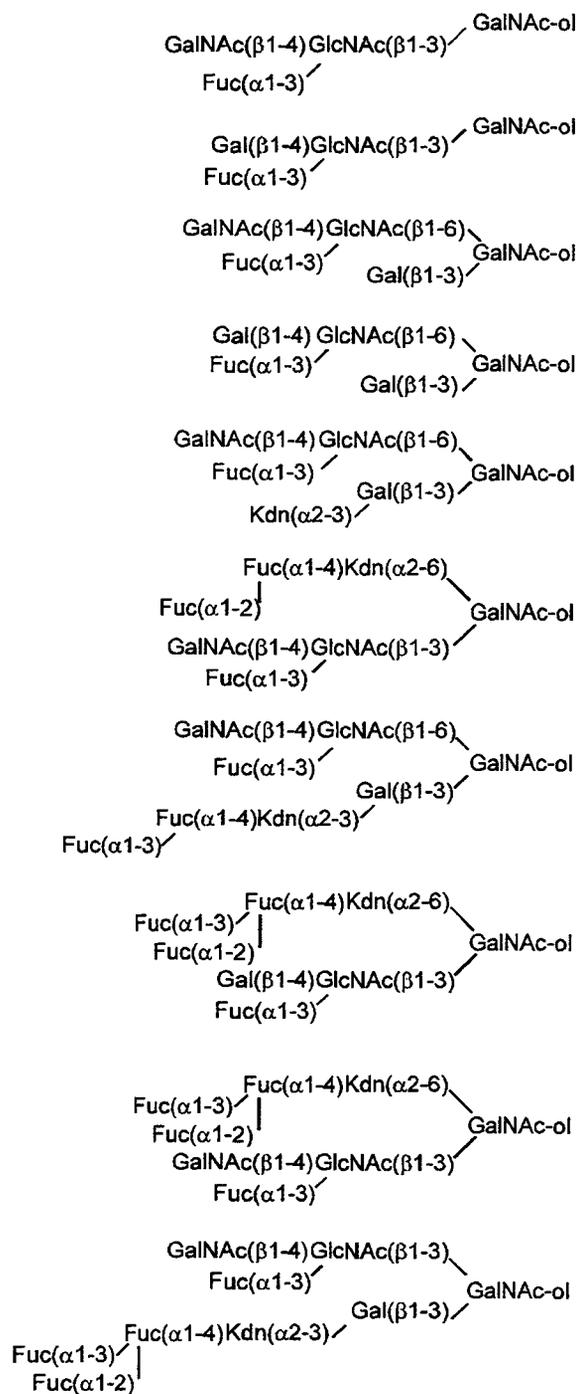


Figure 13: Structures d'oligosaccharides alditols obtenus après  $\beta$ -élimination de mucines oviduales d'*Ambystoma maculatum* (Maes et al. 1995).

### **II.B.13. CONCLUSION**

De ce rapide survol des structures glycaniques caractéristiques des mucines oviducals de 12 espèces d'amphibiens, il ressort donc nettement une spécificité de structure propre à chaque espèce, qui constitue un nouveau marqueur phénotypique susceptible d'apporter une aide précieuse à la recherche taxonomique.

Si ce fait devait se vérifier pour l'ensemble des amphibiens, voire du monde animal, il deviendrait possible d'établir de nouvelles hypothèses concernant le rôle des chaînes glycaniques au cours de l'évolution et dans l'analyse de la biodiversité.

En effet, il est de plus en plus évident que la reconnaissance spécifique de gamètes homologues est le fait de la reconnaissance de structures glycaniques, et, en outre, les interactions hôte-parasite dépendent largement de ligands de nature glucidique.

La biodiversité serait donc le résultat d'une sélection naturelle fondée sur l'extrême diversité des activités glycosyltransférases, diversité elle-même liée à des processus de mutations ponctuelles et variées qui auraient progressivement modulé ces activités enzymatiques.

## II.C. STRUCTURES ET BIOSYNTHESE DES MUCINES: LE MODELE HUMAIN

### II.C.1 STRUCTURES DES O-GLYCANNES CHEZ L'HOMME

Les chaînes O-glycanniques sont fixées à des protéines sur des acides aminés spécifiques: la sérine ou la thréonine. La séparation de ces chaînes glycanniques de la protéine peut être réalisée par une réaction de  $\beta$ -élimination en milieu alcalin (Carlson 1968). Cela permet la libération des O-glycannes sous forme d'oligosaccharide alditols stables.

Il existe des caractéristiques répétitives, malgré la très grande diversité du type de chaînes O-glycanniques, qui sont (Schachter et Williams 1982) (figure 14):

- Un noyau, le résidu fixé à la protéine est toujours le GalNAc pour la mucine, substitué par au moins un sucre.
- Le squelette, la partie centrale de la chaîne.
- La périphérie, la partie terminale non réductrice et l'expression d'activité de groupe génétiquement déterminés.

Le type de liaison résulte de l'interaction entre la fonction hydroxyle de la sérine ou la thréonine et la fonction héli-acétalique de la N-acétylgalactosamine. La séquence de réaction de glycosylation a lieu par le noyau, puis le squelette et la périphérie.

#### II.C.1.1. Le noyau.

On y trouve toujours la N-acétylgalactosamine sous la catalyse d'une enzyme: la N-acétylgalactosaminyltransférase (McGuire 1967) :



Ce type de synthèse se retrouve aussi bien chez l'Homme: dans les glandes sous-maxillaires, l'estomac (Hearn et al. 1970) et le sérum humain (Ko et Raghupathy 1972), que

dans le cerveau de rat (Ko et Raghupathy 1972), dans les glandes sous-maxillaires bovines (Hagopian et Eylar 1968), porcines (Hill et al. 1977), le mucus de la trachée artère (Baker et Sawyer 1975), l'oviducte de poule (Hanover et al. 1980) et la glande mammaire ovine (Soulier et Gaye 1981).

En réalité, il existe plusieurs enzymes différentes qui seraient spécifiques des séquences peptidiques; actuellement, 7 enzymes ont été clonées (Hagen et al. 1998a) et dont l'activité est liée à la reconnaissance des séquences peptidiques de l'apomucine. Des nombreux travaux tentent de déterminer la relation entre l'activité enzymatique et la séquence peptidique (Hagen et al. 1998b et 1999, Hennebicq et al. 1998).

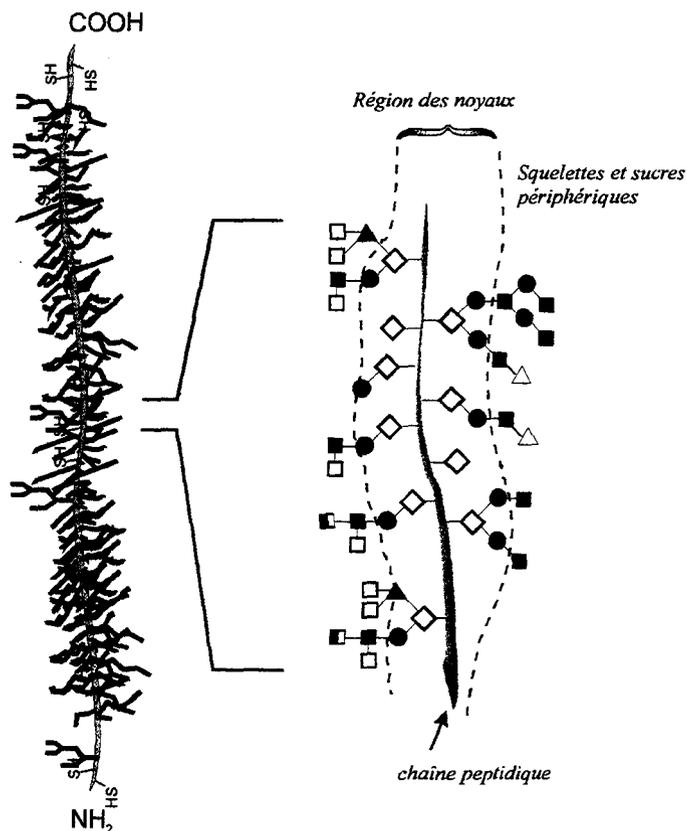


Figure 14: Représentation schématique des chaînes O-glycanniques de type mucine (Schachter et Williams 1982).

Les monosaccharides fixés directement sur la protéine forment alors le noyau. On peut en définir huit types (figure 15).

➤ Le noyau de classe 1: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Il a été découvert chez le porc (Carlson 1968) dans les glandes sous-maxillaires.

Reconnu par la lectine de cacahuète, la PNA (Lotan et al. 1975), il constitue le déterminant antigénique T (de Thomsen-Friedenreich). Il peut être mono ou disialylé.

➤ Le noyau de classe 3: GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Il a été retrouvé dans les mucines intestinales du rat (Carlsson et al. 1978).

L'addition d'une N-acétylglucosamine en  $\beta$ 1-6, sur les noyaux 1 et 3, donnent respectivement les noyaux 2 et 4.

➤ Le noyau de classe 4: Il a été découvert dans les mucines gastriques de mouton (Hounsell et al. 1980) et humaines (Breg et al. 1988, Klein et al. 1992 et 1993).

➤ Le noyau de classe 5: GalNAc( $\alpha$ 1-3)GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Il a été isolé sous forme sialylé dans les mucines d'adénocarcinomes du colon humain (Kurosaka et al. 1983), des glycoprotéines du méconium (Hounsell et al. 1985), des mucines salivaires d'hirondelles (*genre Collocalia*) (Wieruszkeski et al. 1987) et des mucines sous-maxillaires bovines (Savage et al. 1990).

➤ Le noyau de classe 6: GlcNAc( $\beta$ 1-6)GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Il a été retrouvé dans les glycoprotéines humaines, le méconium (Hounsell et al. 1985), les mucines du kyste ovarien (Schachter et Brockhausen 1992) et dans la caséine- $\kappa$  bovine (Fait et al. 1984).

Ces tissus posséderaient une N-acétylglucosaminyltransférase ayant comme substrat le GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Cela permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle ce noyau est formé par une dégradation, par une  $\beta$ -galactosidase, du noyau 2.

➤ Le noyau de classe 7: GalNAc( $\alpha$ 1-6)GalNAc- $\alpha$ -ser/thr-R. Il a été retrouvé dans les mucines sous-maxillaires bovines (Chai et al. 1992).

➤ Le noyau de classe 8: Il est obtenu par une substitution au niveau de l'hydroxyle du carbone 3 de la GalNAc-ol, par un résidu de galactose lié en  $\alpha$ 1-3 (Van Halbeek et al. 1994).

Noyau	Type de noyau
Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc	1
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-6) \backslash \\ \text{Gal}(\beta 1-3) / \end{array} \text{GalNAc}$	2
GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc	3
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-6) \backslash \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-3) / \end{array} \text{GalNAc}$	4
GalNAc( $\alpha$ 1-3)GalNAc	5
GlcNAc( $\beta$ 1-6)GalNAc	6
GalNAc( $\alpha$ 1-6)GalNAc	7
Gal( $\alpha$ 1-3)GalNAc	8

Figure 15: Noyaux O-glycanniques de type mucine (Schachter et Williams 1982)

### II.C.1.2. Le squelette

Les réactions de glycosylation formant le squelette vont donner différents types de séquences (Feizi 1982, Hounsell et al. 1982).

Il existe:

➤ Structure de type 1: Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -

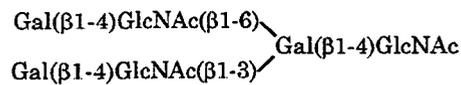
➤ Structure de type 2: Gal( $\beta$ 1-4) GlcNAc $\beta$  -

Elles sont soit linéaires , soit branchées.

⇒ [Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)]<sub>n</sub>; une répétition de la chaîne de type 2 (polylactosaminoglycannes), donne l'antigène i (Moore et al 1994).

⇒ [Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]<sub>n</sub>; Il s'agit d'une séquence linéaire des glycoprotéines du lait humain (Hanisch et al. 1989).

⇒ Une ramification en  $\beta$ 1-6 conduit à l'antigène I:



Dans de nombreux O-glycannes, le noyau est substitué par un ou deux résidus monosaccharidiques qui constituent le squelette et la périphérie du glycanne.

### ***II.C.1.3. La périphérie***

C'est elle qui détermine le support des déterminants antigéniques des groupes sanguins ABH et Lewis.

Il pourrait y avoir plusieurs substitutions possibles (figure 16):

⇒ La substitution des chaînes de type 1:

Sous l'action d'une  $\alpha$ 1-2-fucosyltransférase, on obtient le groupe sanguin de type H par fixation d'un fucose en  $\alpha$ 1-2 sur le galactose terminal:  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}\beta 1-$ .

Synthétisée par le gène H, l'enzyme donne ce type de déterminant sur des glycoprotéines membranaires; quant à l'enzyme produite par le gène Se, elle donne des glycoprotéines sécrétées ou solubles. On a alors les individus sécréteurs qui possèdent de tels déterminants sur leurs glycoprotéines sécrétées.

⇒ La substitution des chaînes de type 2:

Il a été mis en évidence (Hakomori et Kobata 1974), l'existence de noyaux antigéniques X et Y où le fucose substitue le N-acétylglucosamine. Les chaînes de type 1 étant substituées par des monosaccharides en anomérie  $\alpha$ , celles-ci présentent de substitutions en anomérie  $\beta$ .

Les substitutions en 3 et 4 sur le  $\beta$ -Gal terminal par respectivement un résidu N-acétylneuraminique et une  $\beta$ -D-N-acétylgalactosamine, donne un déterminant antigénique rare de groupe sanguin Cad.

La sulfatation en position terminale ou sub-terminale des chaînes, conduit à des structures retrouvées dans l'ovomucine des oeufs de poules (Strecker et al. 1987) et dans les mucines bronchiques (Lo-Guidice et al. 1997).

⇒ Autres types de substitutions:

Quand le GalNAc est le seul monosaccharide du glycanne, il constitue le déterminant antigénique Tn; sialylé en 6 (signal de fin d'élongation du glycanne), il forme le déterminant antigénique Sialyl-Tn.

Il a été démontré (Spinger et al. 1985), que les déterminants Tn et Sialyl-Tn étaient des marqueurs de tumorigénéisation des tissus. Cependant, il a été ensuite prouvé que ces déterminants sont également présents aussi bien dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux (Jass et al. 1995). La différence tient du fait que l'acide acétique est O-acétylé dans le cas des tissus sains uniquement alors qu'il ne l'est pas dans les tissus tumoraux.

Il existe des substitutions directes sur le noyau par des résidus fucosyles de manière fréquente. Celle-ci se faisant sur un résidu galactose d'un noyau, forme l'antigène H qui à son tour, peut donner les épitopes de groupe sanguin A et B. Il existe également d'autres substitutions directes avec d'autres acides sialiques (NeuAc, NeuGc, Kdn) ou par des groupements sulfates.

Les différents types de monosaccharides retrouvés n'expliquent pas à eux seuls la très grande diversité de chaînes glycaniques. Cette diversité est due également à:

⇒ La position de la substitution sur les monosaccharides.

⇒ L'anomérisation des sucres en  $\alpha$  ou  $\beta$  pour le Gal et le GalNAc; en  $\alpha$  pour les acides sialiques et les fucoses et en  $\beta$  pour la N-acétylglucosamine.

⇒ La variabilité (de 1 à 20) du nombre de résidus de monosaccharides dans les chaînes (Levine et al. 1987).

Ces nombreuses diversités structurales nécessitent un grand nombre de glycosyltransférases pour permettre leur biosynthèse.

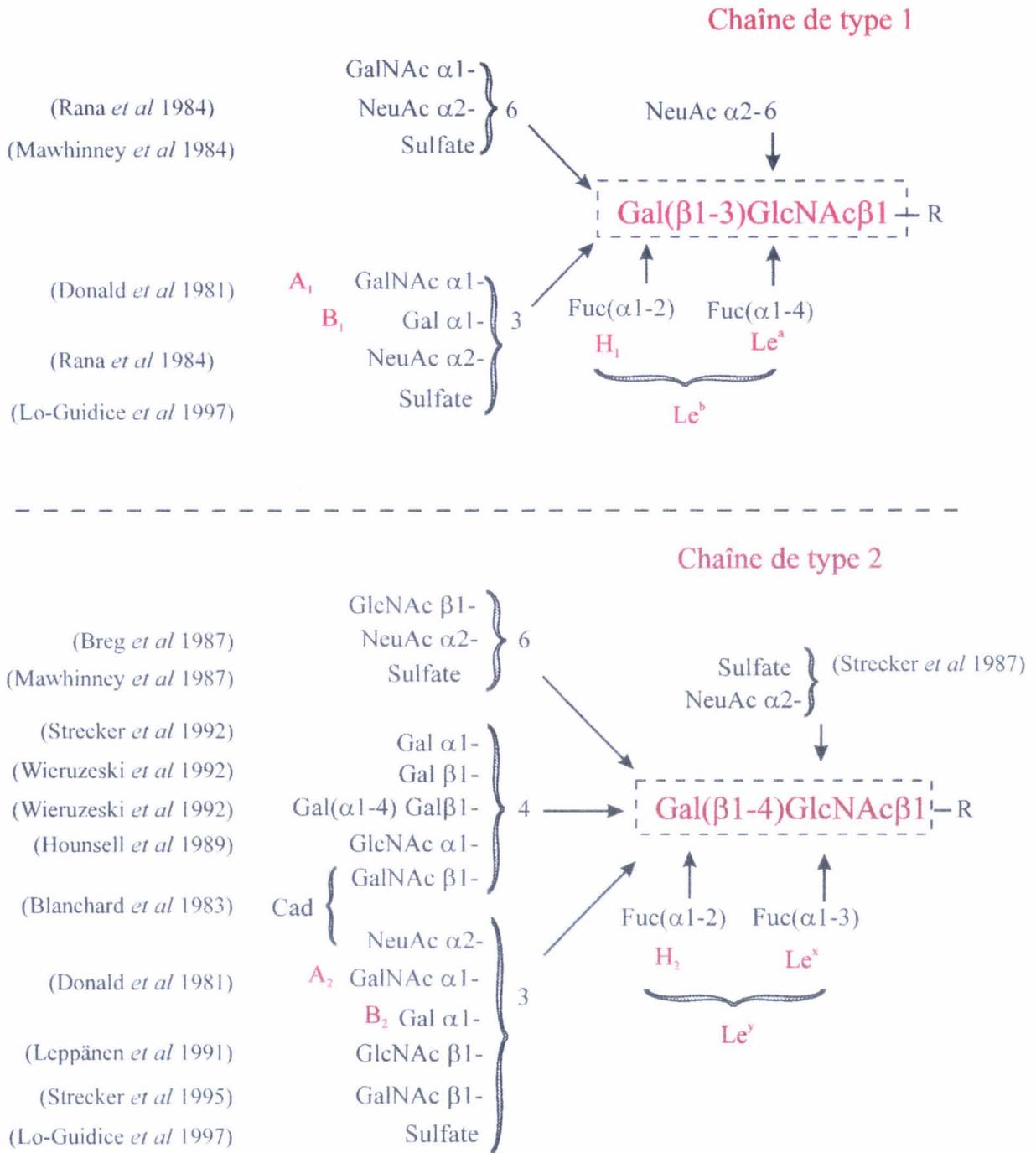


Figure 16: Représentation schématique des différentes substitutions trouvées sur les chaînes de type 1 et 2.

## II.C.2. BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES

### II.C.2.1. Les glycosyltransférases

A la différence des N-glycannes, la biosynthèse des O-glycannes, débutant dans le compartiment cis-Golgi, ne nécessitent pas de précurseur oligosaccharidique associé à un lipide.

Les sucres sont activés par des nucléotides: UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Fuc et le CMP-acide sialique.

Toutes les glucosyltransférases (GT) sont des glycoprotéines membranaires de type II (figure 17) avec une queue cytoplasmique N-terminale de petite taille, une séquence transmembranaire hydrophobe, une zone de clivage rigide et enfin la partie C-terminale catalytique.

Il a été suggéré l'hypothèse qu'il existe autant de GT que de liaisons osidiques (Hagopian et Eylar 1968, Brockhausen et Schachter 1997).

Il reste à noter qu'une même GT peut donner la biosynthèse d'une même liaison osidique avec des substrats différents (Prieels et al. 1981).

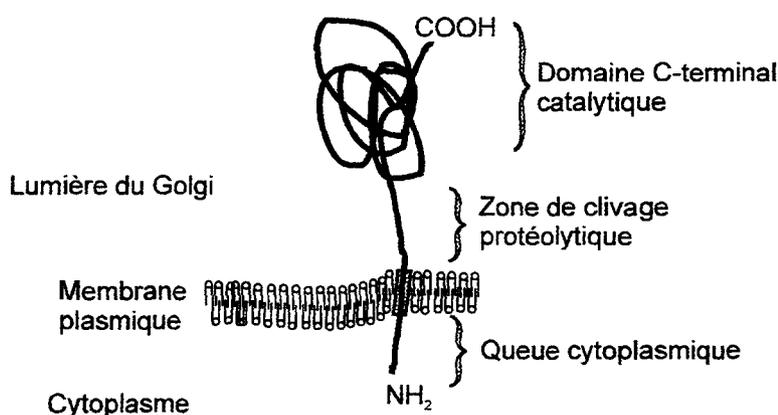
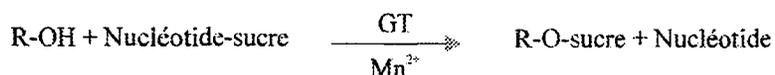


Figure 17: Représentation schématique d'une glycosyl transférase membranaire (type II).

### II.C.2.2. L'étape d'initiation

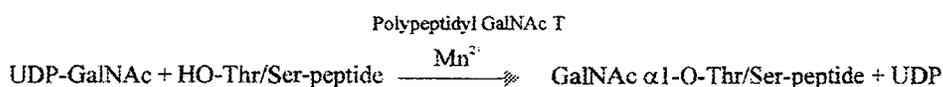
La réaction générale de biosynthèse des chaînes de type mucines est la suivante:



R = L'apomucine ou la chaîne O-glycannique en élongation.

L'enzyme clé de la biosynthèse des chaînes O-glycanniques de type mucine est la polypeptidyl- $\alpha$ 1-3-N-acétylgalactosaminyltransférase (Polypeptidyl GalNAcT) (E.C.2.4.1.41).

La réaction est la suivante:



Il est à noter que pour une bonne reconnaissance par le site catalytique du substrat, la présence d'un résidu de protéine est nécessaire car il permet la formation d'un  $\beta$ -turn (ou coude).

### II.C.2.3. La synthèse des noyaux

La figure 18 représente les différentes voies de biosynthèse fréquemment rencontrés.

Le mécanisme Go/NoGo (ou règle de 3 avant 6) signifie que lorsqu'une GT fixe un oligosaccharide, celui-ci ne pourra plus être le substrat pour une autre GT. Ainsi, la sialyltransférase fixant l'acide sialique sur la N-acétylgalactosamine en  $\alpha$ 2-6 stoppe la biosynthèse pour former l'antigène sialyl-Tn.

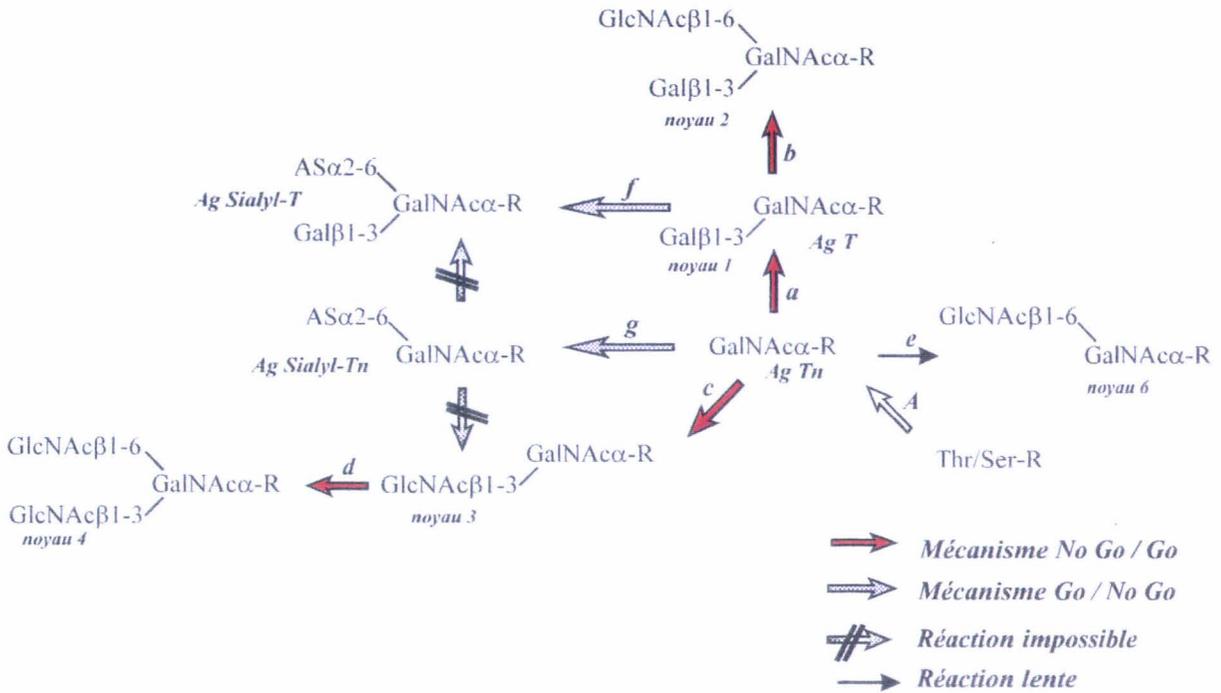
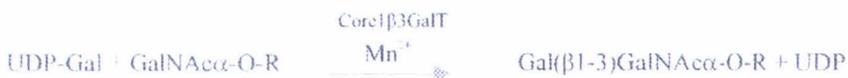


Figure 18 : Schéma de biosynthèse des principaux noyaux (Brockhausen et Schachter 1997). A: polypeptide GalNAcT, a: core1  $\beta$ 3GalT, b: core2  $\beta$ 6GnT, c: core3  $\beta$ 6GnT, d: core4  $\beta$ 6GnT, e: core6  $\beta$ 6GnT (non clonée), f: ST6O I ou II, g) ST6O I

Quant au mécanisme NoGo/Go, il permet de poursuivre l'élongation en permettant à un substrat d'une GT de devenir le substrat d'une seconde GT. Ainsi, la  $\beta$ 3 galactosyltransférase agit avant la  $\beta$ 6 glucosaminyltransférase pour former les noyaux de type 1 et 2. Or, cette règle a été remise en cause par la découverte d'une  $\beta$ 6 glucosaminyltransférase permettant la synthèse des noyaux de type 6 (Yazawa et al. 1986).

a) UDP-Gal : GalNac-R  $\beta$ 1-3-Gal-transférase

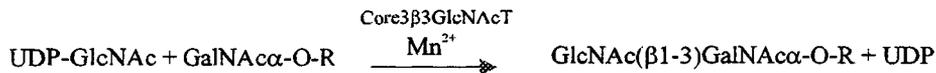
Cette enzyme (E.C.2.4.1.122) catalyse la réaction suivante:



Elle a été mise en évidence dans les glandes sous-maxillaires de porc (Schachter et al. 1971). Elle a besoin de cations divalents  $Mn^{++}$  et  $Cd^{++}$  mais est inhibée par  $Zn^{++}$ . Elle obéit à la règle 3 avant 6 pour donner l'antigène T.

b) *UDP-GlcNAc : GalNAc-R  $\beta$ 1-3-GlcNAc-transférase*

Cette enzyme (E.C.2.4.1.147) permet d'avoir la réaction suivante:

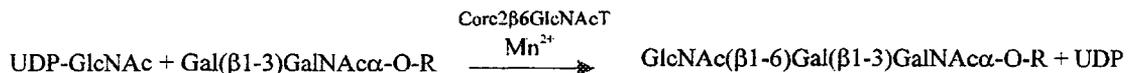


Cette enzyme obéit à la loi Go-No/Go. Elle semble absente des cellules cancéreuses (Vavasseur et al. 1995).

c) *UDP-GlcNAc : Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc)  $\beta$ 1-6-GlcNAc-transférase; UDP-GlcNAc : GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc sur GalNAc)  $\beta$ 1-6-GlcNAc-transférase*

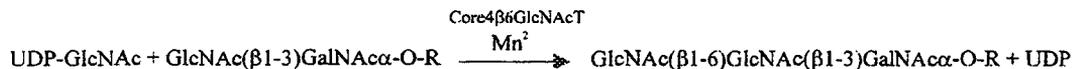
Ces enzymes sont spécifiques des O-glycannes de types mucines.

La première enzyme (E.C.2.4.1.102) est responsable de la biosynthèse des noyaux de type 2 .



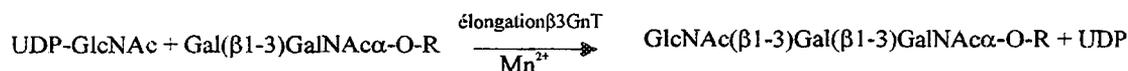
Il a été montré que cette enzyme est spécifique du tissu de développement cellulaire et qu'elle utilise le noyau 1 comme substrat quand il n'est pas substitué (Brockhausen et Schachter 1997).

Quant à la seconde (E.C.2.4.1.148), elle permet la biosynthèse des noyaux de type 4 en utilisant le noyau 3 comme substrat.



#### d) L'élongation des noyaux

Il s'agit d'une enzyme, UDP-GlcNAc : Gal( $\beta$ 1-3)(R1-6)GalNAc-R(GlcNAc sur Gal) $\beta$ 1-3-GlcNAc) transférase, (E.C.2.4.1.46), qui permet l'élongation sur le résidu galactose des noyaux 1 et 2 selon la réaction suivante:



Cette enzyme élongation $\beta$ 3GnT nécessite pour son activité des ions  $\text{Mn}^{2+}$ . Ainsi, elle se distingue de l'activité core3GnT.

L'élongation des noyaux 2, 3 et 4 se fait par des enzymes  $\beta$ 4GalT et  $\beta$ 3GnT qui ont pour substrats les résidus GlcNAc.

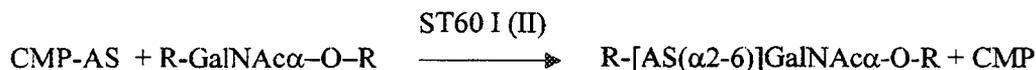
### **II.C.2.4. La synthèse de la périphérie**

#### a) Les sialyltransférases (ST)

Celles-ci possèdent toute une séquence dite "sialyl-motif". Elles se trouvent uniquement dans le cis et le trans Golgi.

CMP-acide sialique : R1-GalNAc-R  $\alpha$ 6-sialyltransférase I (ST60 I, ST6 GalNAc I, E.C.2.4.99.3).  
 CMP-acide sialique : R1-GalNAc-R  $\alpha$ 6-sialyltransférase II (ST60 II, ST6 GalNAc II)

Ces deux enzymes permettent d'obtenir la réaction suivante:

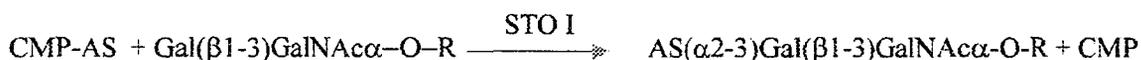


En particulier, La ST60 I donne la formation de l'antigène STn (Yonezawa et al. 1992). Cette enzyme a pour conséquence l'arrêt de l'élongation. Ces deux isoenzymes

catalysent la même réaction mais elles se différencient par leur spécificité pour le substrat (Kurosawa et al. 1994a et b).

b) *CMP-acide sialique : Galβ1-3 GalNAc-R α3-sialyltransférase I (STO I, ST3 Gal I, E.C.2.4.99.4)*

Cette enzyme catalyse la réaction suivante (Sadler et al. 1979):



Cette enzyme serait sur-exprimée dans les tissus cancéreux (Yang et al. 1994, Brockhausen et al. 1995). Cette enzyme, spécifique des O-glycannes, a une isoenzyme: la STO 3 II qui est spécifique des N-glycannes (Lee et al. 1994).

*Cas des déterminants antigéniques A et B*

Les déterminants de groupe sanguins A et B sont synthétisés par une substitution en 3 du déterminant H par respectivement un résidu d' $\alpha$ -N-acétylgalactosamine et un résidu  $\alpha$ -galactose sur le résidu galactosyle terminal. Ainsi, les deux enzymes qui catalysent la biosynthèse des antigènes A et B sont respectivement:

⇒ UDP-GalNAc : Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal-R  $\alpha$ 3-N-acétylgalactosaminyltransférase (E.C.2.4.1.40).

⇒ UDP-GalNAc : Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal-R  $\alpha$ 3-N-acétylgalactosyltransférase (E.C.2.4.1.37).

Ces deux enzymes ne diffèrent que par 4 acides aminés dans la structure primaire.

La figure 19 montre les différentes voies de la biosynthèse des antigènes de groupe sanguin ABH.

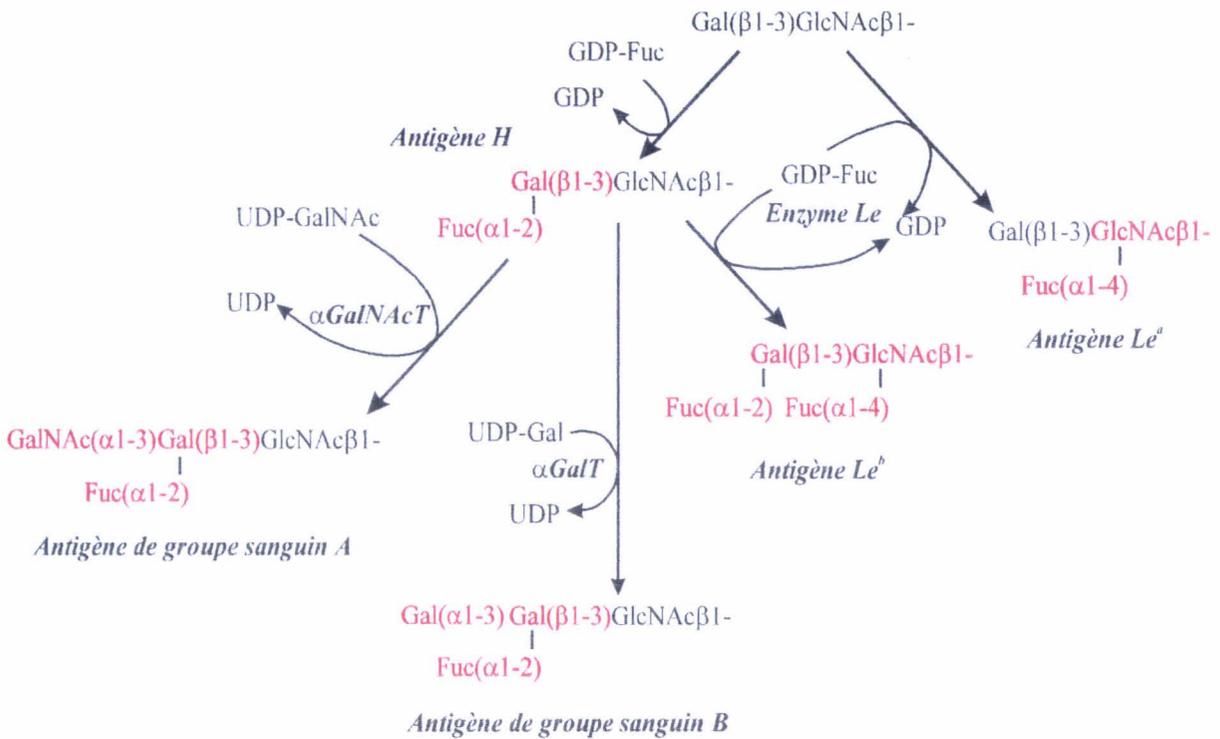


Figure 19: Schéma de biosynthèse des antigènes de groupes sanguins ABH (Kobata 1992).

### c) La sulfotransférase

Cette enzyme utilise le PAPS (3'Phospho-5'AdenylylSulfate) (McNaught 1997) comme donateur de sulfate. La sulfatation a toujours lieu avant les sialylations et se déroule dans le même compartiment Golgien que la  $\beta$ 4GalT (Hull et Carraway 1989).

### II.C.3. Rôle de la O-glycosylation

Il s'agit d'un mécanisme post-traductionnel des protéines qui engendre une très grande variabilité structurale et un grand nombre de déterminants antigéniques. Ces structures O-glycanniques jouent un rôle dans la reconnaissance inter-cellulaire surtout dans le processus d'inflammation.

Certaines structures O-glycanniques ont un lien avec le développement cellulaire (Dablesteen 1996). Il a été également montré que les antigènes T et Tn sont des marqueurs de la tumorigénèse (Springer et al. 1985). Ils sont également exprimés dans l'embryogenèse.

Par leur taille, les O-glycannes masquent certains éléments reconnus par les récepteurs membranaires, et ils confèrent aux mucines leurs propriétés physico-chimiques.

---

# MATERIEL ET METHODES

<b>III. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>60</b>
III.A. $\beta$ -ELIMINATION REDUCTIVE.....	60
<i>III.A.1. Principe</i> .....	60
<i>III.A.2. Protocole</i> .....	60
III.B. METHYLATION.....	63
<i>III.B.1. Principe</i> .....	63
<i>III.B.2. Protocole</i> .....	65
<i>III.B.3. Caractérisation des monosaccharides partiellement méthylés et acétylés</i> .....	65
III.C. SPECTROMETRIE DE MASSE: .....	71
III.D. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE .....	71
<i>III.D.1. LE SPECTRE PROTON (<math>^1\text{H}</math>) A UNE DIMENSION</i> .....	71
<i>III.D.2. EXPERIENCES DE CORRELATION HOMONUCLEAIRE (COSY)</i> .....	73
<i>III.D.3. EXPERIENCE ROESY (Rotating Frame Over Hauser Effect Spectroscopy)</i> .....	74

### III. MATERIEL ET METHODES

#### III.A. $\beta$ -ELIMINATION REDUCTIVE

##### *III.A.1. Principe*

La  $\beta$ -élimination (figure 20) permet de libérer les O-glycannes de la chaîne peptidique. Cette réaction réalisée dans un milieu alcalin, va permettre de rompre les liaisons O-glycosidiques entre le résidu GalNAc et la sérine ou thréonine de la chaîne peptidique.

Cette réaction est effectuée en présence de borohydrure de sodium qui empêche la réaction de peeling en réduisant immédiatement l'oligosaccharide; quant à la chaîne peptidique, elle subira une destruction totale.

##### *III.A.2. Protocole*

La mucine est mise en solution à 1% dans le  $\text{BH}_4\text{Na}$  1M. Le pH est ajusté à 12.5 par addition des gouttes de  $\text{NaOH}$  2N. Cette solution est portée à 37°C pendant 48 heures et sous agitation.

La réaction sera ensuite arrêtée par addition d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 200-400 mesh, forme  $\text{H}^+$ ) jusqu'à neutralisation.

Après filtration sur laine de verre, le filtrat sera neutralisé par l'ammoniaque (jusqu'à pH 6) et évaporé à sec à l'évaporateur rotatif.

Les borates seront ensuite éliminés sous forme de borates de méthyle par addition du méthanol et évaporation à sec à l'évaporateur rotatif; cette étape sera répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un produit sec transparent.

Toutes ces étapes sont résumées dans la figure 21.

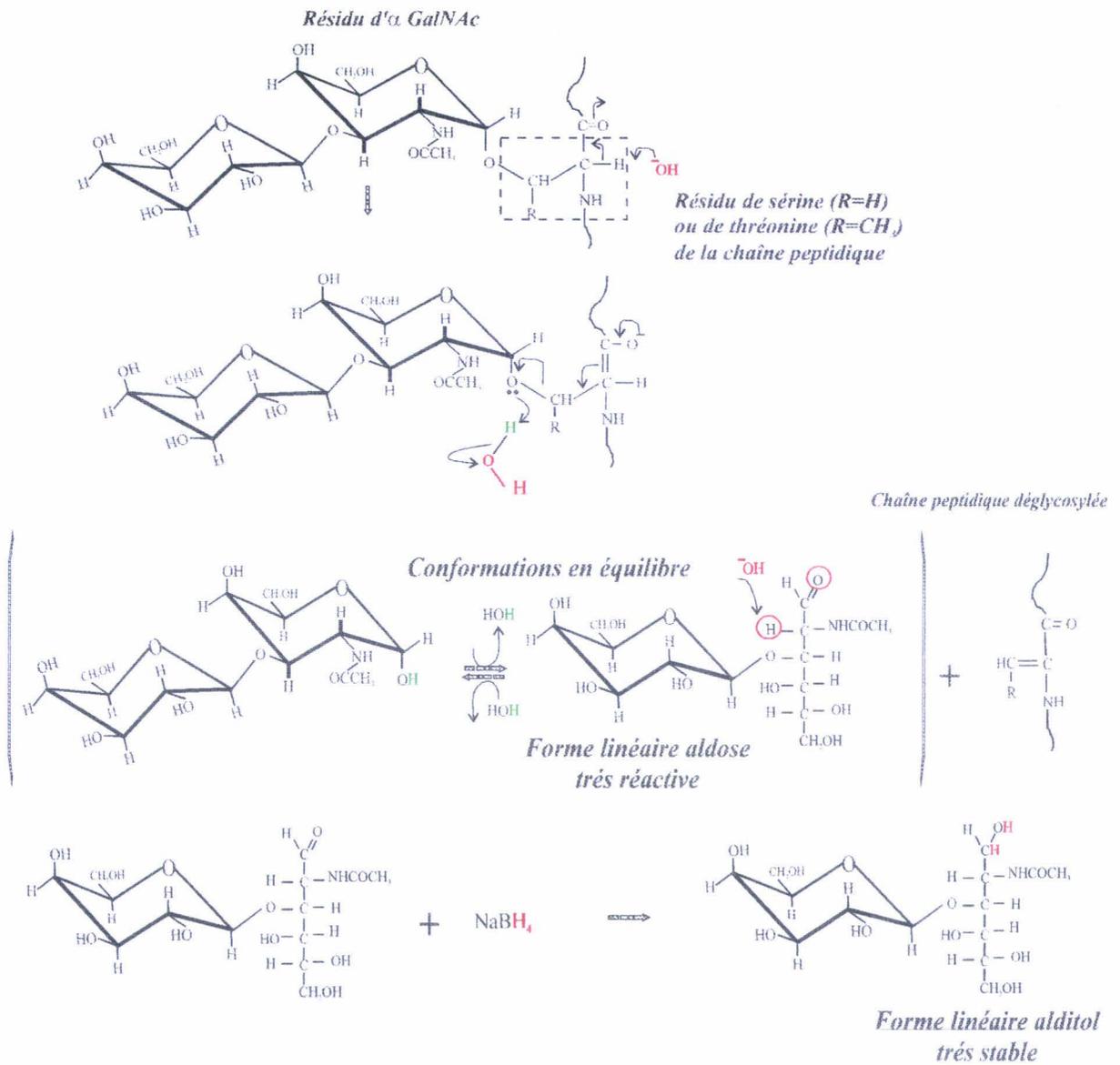


Figure 20 : Mécanisme de  $\beta$ -élimination en milieu réducteur.

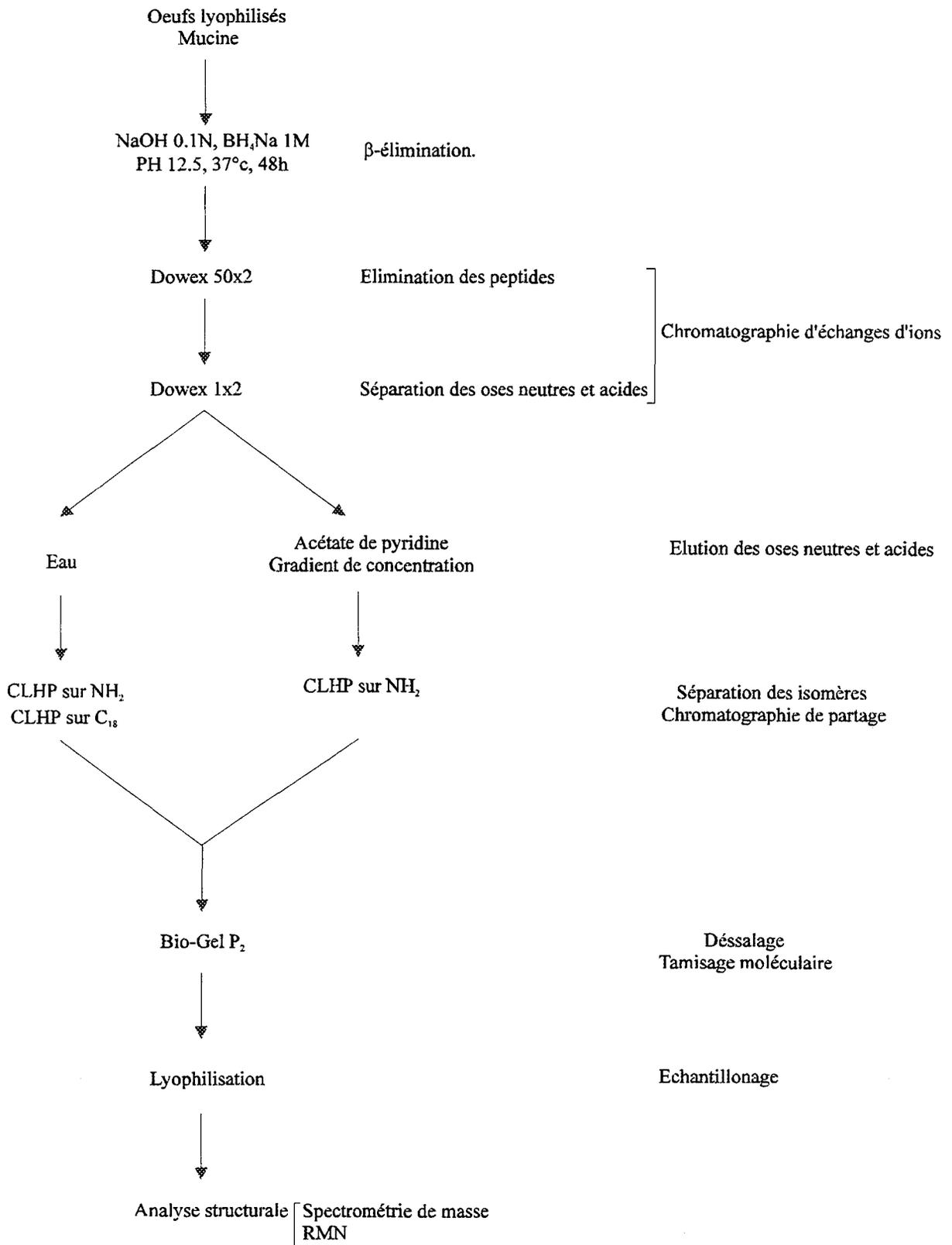


Figure 21: Schéma général du protocole expérimental.

## III.B. METHYLATION

### III.B.1. Principe

La méthylation (figure 22) permet d'avoir des informations sur le degré de substitution et la position des liaisons d'un oligosaccharide. Cependant, elle ne permet pas de déterminer la séquence ou l'anométrie des oses constituant les oligosaccharides (Lindberg 1972, Lindberg et Lönngren 1978).

La première étape consiste à une perméthylation des fonctions hydroxyles libres. Cette réaction peut être réalisée en utilisant le méthyle sulfinyle (Hakomori 1964) ou par l'hydroxyde de sodium dans le méthyle sulfoxyde en présence d'iodure de méthyle (Ciucanu et Kerek 1984).

Après perméthylation, deux méthodes sont possibles:

La première est une hydrolyse acide qui permet la rupture des liaisons glycosidiques libérant ainsi les oses sous forme partiellement méthylés: c'est la méthode de Lindberg. Elle peut être réalisée par l'acide sulfurique 0.025M (100°C, 12h) ou par l'acide acétique à 95%.

Cependant, cette hydrolyse acide nécessite la réduction des monosaccharides libérés par le borodéutérure de sodium afin de pouvoir distinguer le carbone 1 du carbone 6. Les alditols ainsi régénérés sont ensuite acétylés pour obtenir des dérivés dénommés alditols acétates partiellement méthylés.

La deuxième méthode consiste à remplacer l'hydrolyse acide par une méthanolyse. Celle-ci permet de mettre en évidence les acides neuraminiques labiles par la méthode de Lindberg. Après méthanolyse d'oligosaccharides méthylés, une acétylation donne des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés.

L'analyse de ces produits par chromatographie en phase gazeuse donne de nombreux pics pour chacun des monosaccharides libérés. Cela est dû aux anoméries  $\alpha$  et  $\beta$  et aux formes pyranose et furanose.

Il existe également des méthodes d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse afin d'avoir des meilleurs renseignements sur les structures des oligosaccharides.

A noter que la méthylation des acides uroniques s'accompagne d'une réaction de  $\beta$ -élimination permettant une rupture spécifique des acides uroniques. Cela provoque une perte d'information pour la suite de l'étude structurale. Cette  $\beta$ -élimination est bien importante lors de la méthylation par l'hydroxyde de sodium (Gunnarson 1987) mais elle peut être minimisée en méthylant selon la méthode d'Hokomori. En plus, la réduction par le borodeutereure de sodium permet de marquer les acides uroniques par deux deutérium et ainsi les identifier par la suite par spectrométrie de masse.

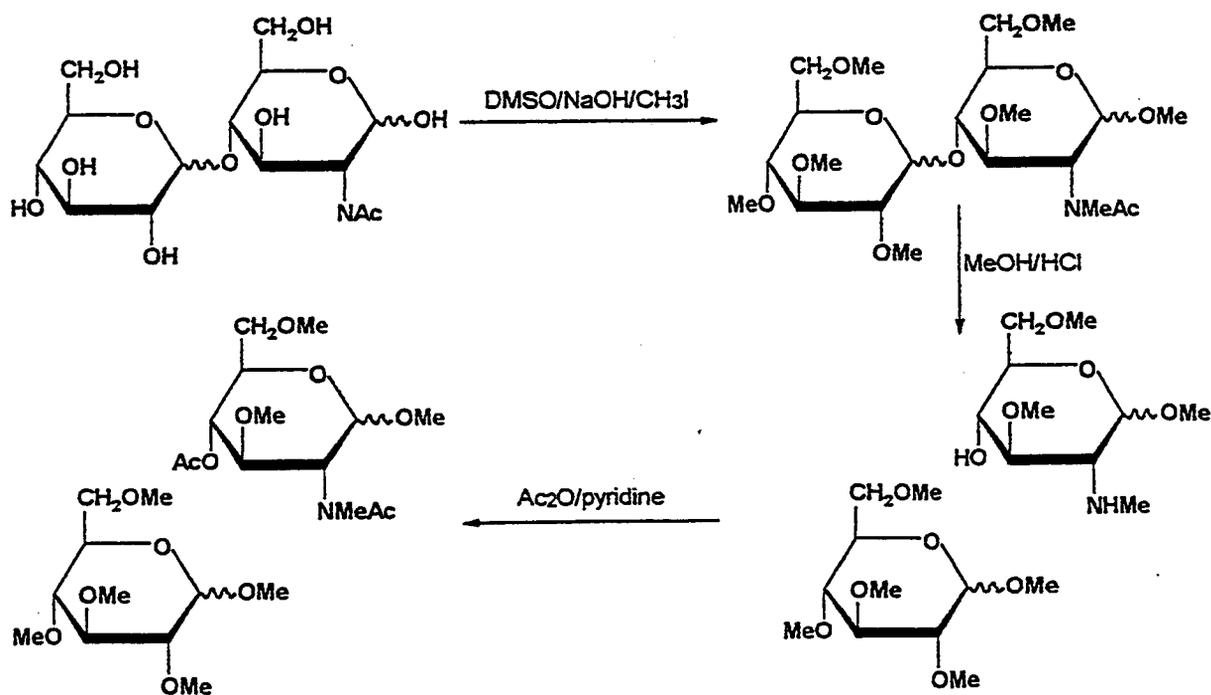


Figure 22: Méthylation d'un oligosaccharide.

### *III.B.2. Protocole*

Dans un tube en verre, dissoudre 50 µg d'oligosaccharide dans 100 µl de diméthyl sulfoxide (DMSO); le tube est ensuite placé dans l'ultrason pendant une demie heure. Après, ajouter d'abord la soude pulvérisée puis 200 µl d'iodure de méthyle; puis porter à l'ultrason pendant deux heures. Ces opérations seront effectuées sous atmosphère d'argon.

Pour arrêter la réaction, ajouter 1,5 µl d'eau. Ensuite, l'excès d'iode sera éliminé par addition de quelques cristaux de thiosulfate de sodium.

L'extraction de l'oligosaccharide ainsi perméthylé s'effectue par 3 fois 500 µl de chloroforme. Il sera ensuite lavé 10 fois par 2 volumes d'eau. Le chloroforme sera éliminé par séchage sous azote. Quant aux traces de DMSO, elles seront éliminées par lyophilisation.

L'oligosaccharide perméthylé va subir ensuite une méthanolyse dans 0,5 ml de méthanol/ HCl 0,5 N pendant 24h à 80°C.

Après refroidissement à température ambiante et évaporation sous azote (N<sub>2</sub>), les méthyles glycosides partiellement méthylés sont acétylés par addition de 50 µl de pyridine et 200 µl d'anhydride acétique. La réaction se déroule pendant une nuit à température ambiante.

L'identification des produits ainsi obtenus s'effectue par couplage GC/MS.

### *III.B.3. Caractérisation des monosaccharides partiellement méthylés et acétylés*

Les méthyles glycosides partiellement méthylés et acétylés ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse réalisée dans le mode impact électronique. Les séparations chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'une colonne capillaire: CHROMPACK (The Netherlands), WCOT Fused Silica 30 mx0,25 mm, Coating CP SIL 5 CB (méthyl silicone, apolaire), DF = 0,1 µm.

La caractérisation de chaque dérivé a été réalisée selon le protocole de Fournet et al (1981), qui a décrit les différents fragments caractéristiques de chacun des méthyles glycosides (figures 23 et 24).

Les acides uroniques ont été identifiés sous forme de 6,6' D<sub>2</sub>-glucose, selon le protocole décrit dans les figures 25 et 26.

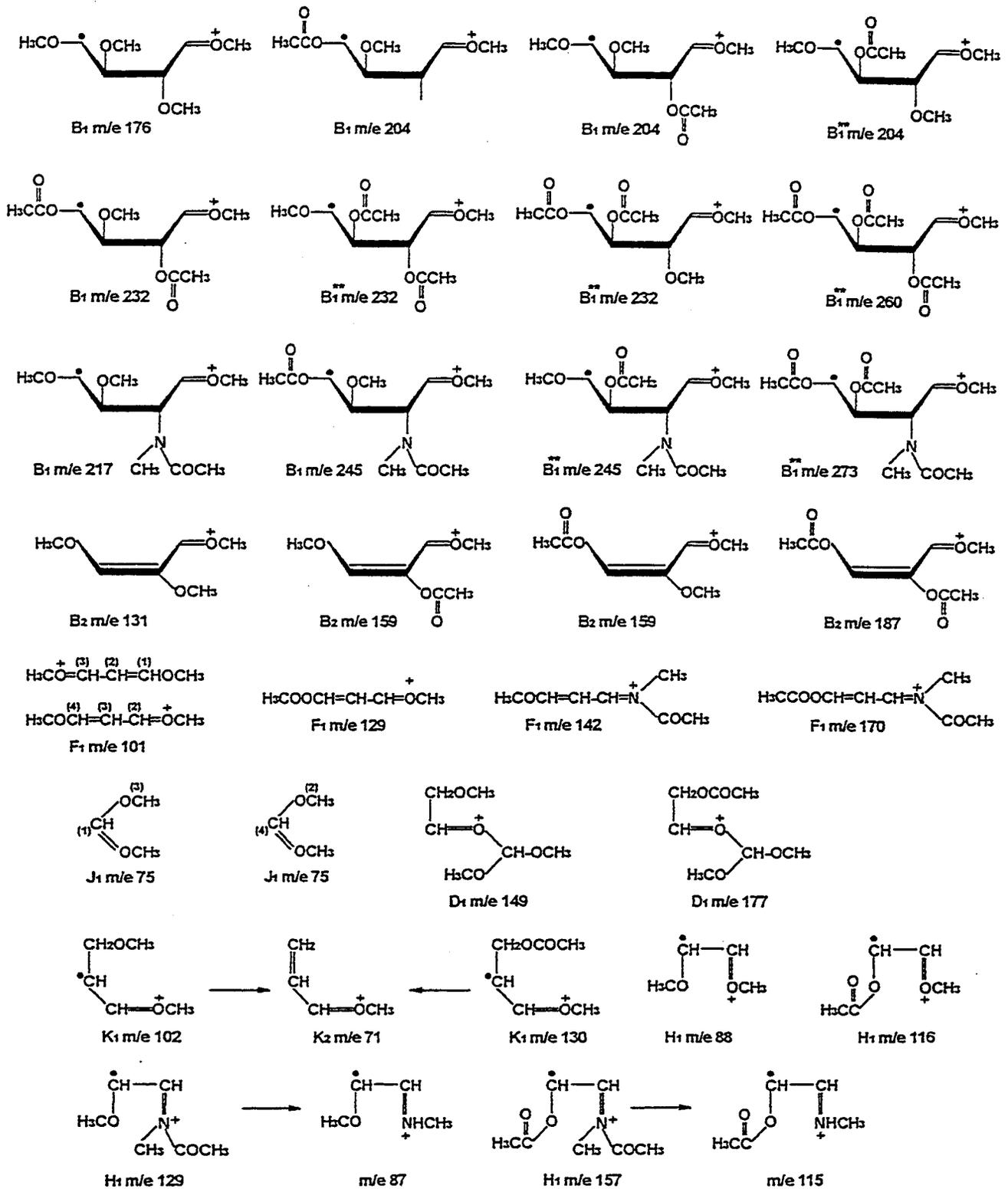


Figure 23: Structures des principaux ions caractéristiques d'hexose et de 2-N-(méthylacétamido) D-glucose partiellement méthylés et acétylés. Les fragments (\*\*) ne sont jamais obtenus avec un acétyl sur le carbone 3 (d'après Fournet et al. 1981).

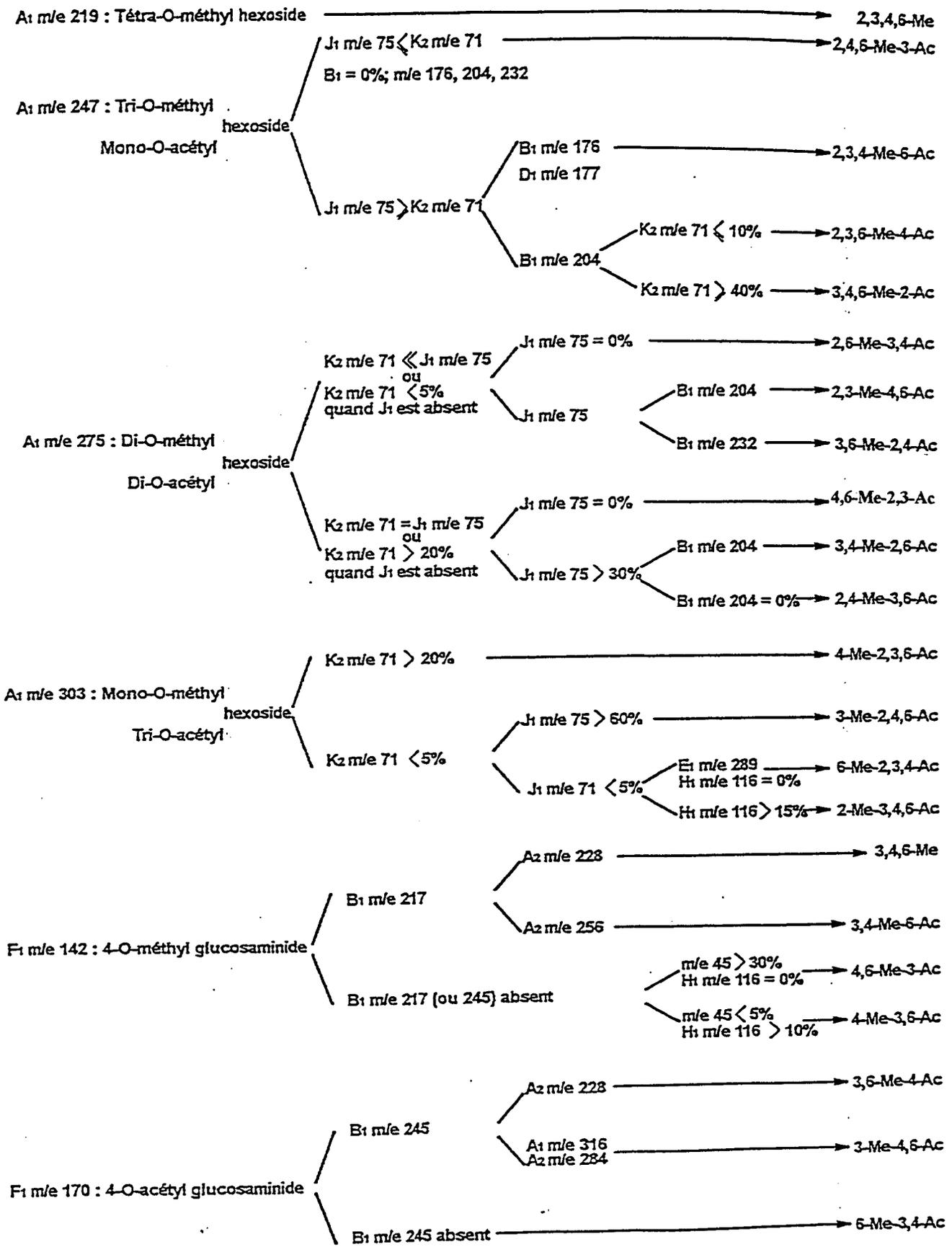


Figure 24: Principaux fragments permettant la caractérisation des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés (d'après Fournet et al. 1981).

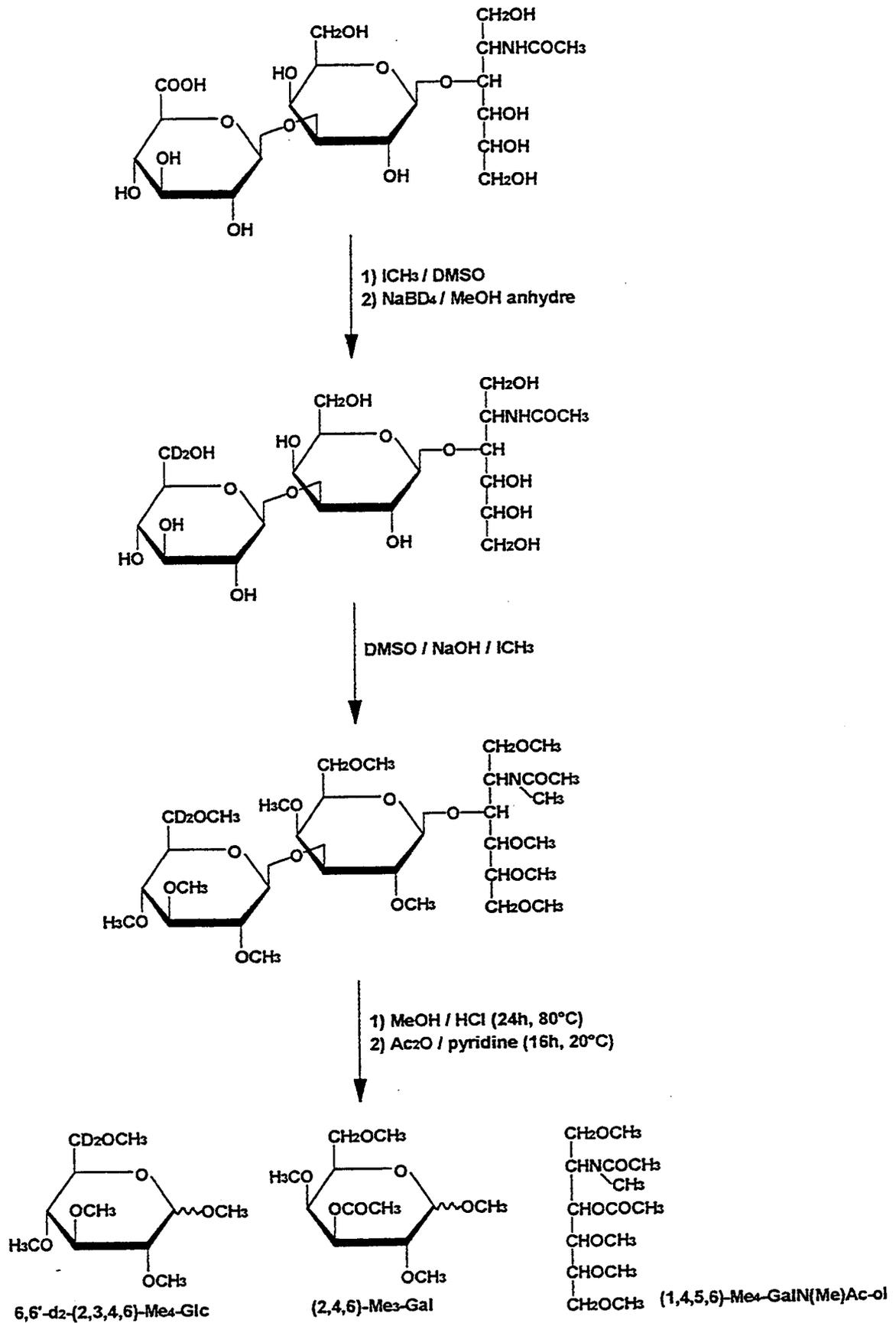


Figure 25: Perméthylation des oligosaccharides après conversion des acides uroniques en hexoses.

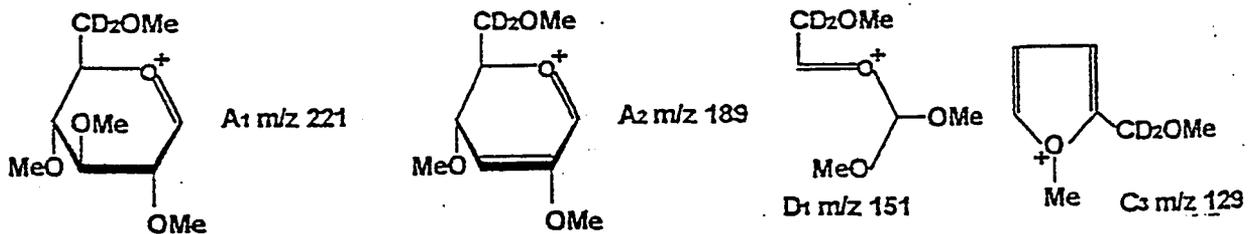
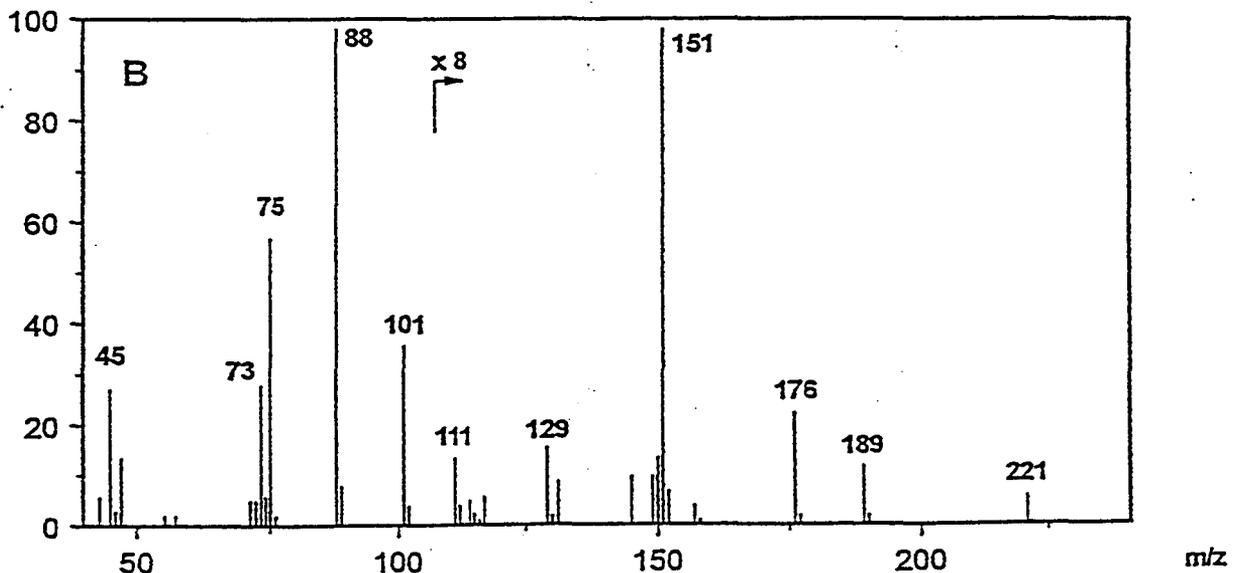
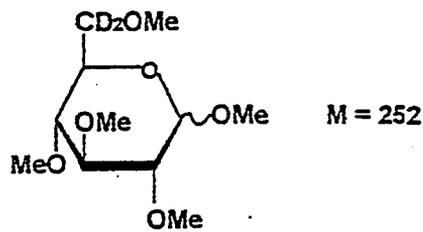
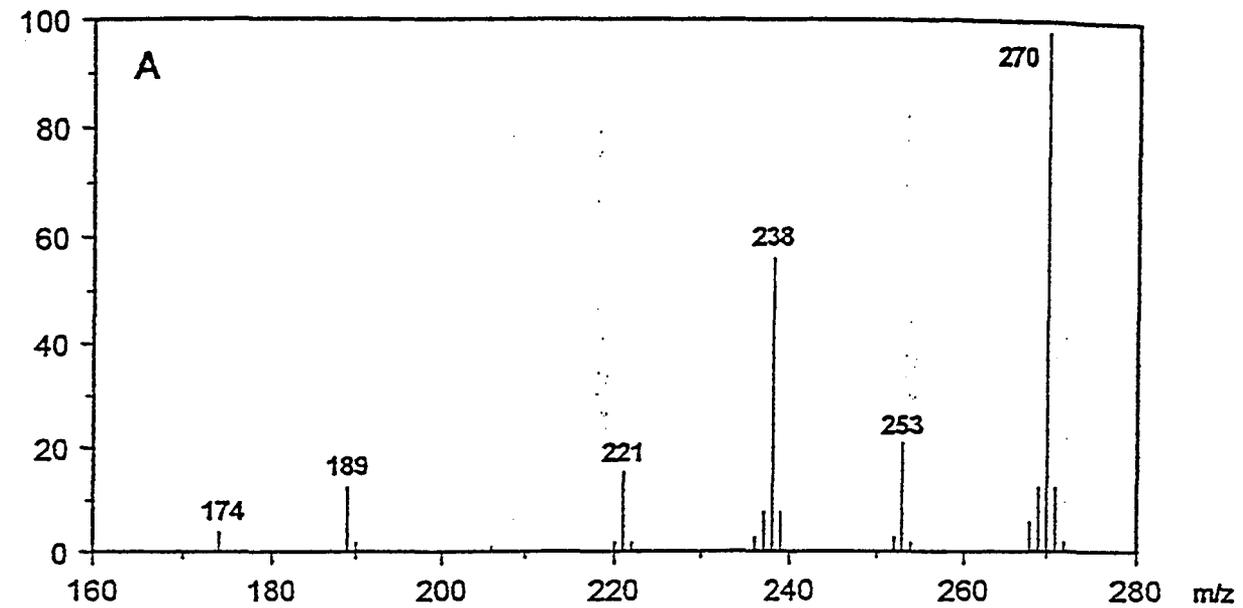


Figure 26: A) Spectre de masse en mode d'ionisation chimique (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) du méthylglucoside perméthylé résultant de la réduction de l'acide glucuronique par BD<sub>4</sub>Na: 6,6'-D<sub>2</sub>-(2,3,4,6)-Me<sub>4</sub>-Glc. B) Spectre de masse en impact électronique du même composé.

### III.C. SPECTROMETRIE DE MASSE:

Les masses moléculaires des oligosaccharides alditols ont été déterminées par spectrométrie de masse sur un appareil MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) Vision 2000, Finnigan Mat, Hemel.

Les échantillons ont été dissous dans l'eau désionisée à une concentration de 50-100 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$  et 1  $\mu\text{l}$  de ces solutions a été mélangé avec 1  $\mu\text{l}$  de matrice sur la cible. Après cristallisation à température ambiante, 10 à 15 mesures ont été accumulées pour l'obtention de chaque spectre.

Les oligosaccharides neutres ont été analysés en mode positif avec une matrice constituée d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (10 mg  $\text{ml}^{-1}$  dans le méthanol/eau 70/30). Les molécules acides ont été analysées en mode négatif avec une matrice 3-aminochinoline (10 mg  $\text{ml}^{-1}$  dans l'éthanol/eau 90/10).

### III.D. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Compte tenu de la diversité structurale des chaînes glycaniques des mucines oviducalées des amphibiens, comme nous l'avons rappelé dans le chapitre II-B, l'analyse des séquences oligosaccharides repose essentiellement sur la résonance magnétique nucléaire.

#### III.D.1. LE SPECTRE PROTON ( $^1\text{H}$ ) A UNE DIMENSION

L'analyse RMN du proton à une dimension apporte déjà un certain nombre de renseignements:

- le nombre de protons anomères, qui fournit la composition molaire de l'oligosaccharide.
- l'anomérisation de chaque unité monosaccharidique, déterminée grâce à la mesure de la constante de couplage  $^3J_{1,2}$ , qui est de 1 à 4 Hertz pour l'anomérisation  $\alpha$  et 7 à 8 Hertz pour l'anomérisation  $\beta$ .

Cette détermination ne s'applique pas aux monosaccharides possédant un H équatorial en C-2 (exemple: rhamnose, mannose...), réserve qui n'intervient pas dans notre cas, puisque la mucine de *Rana ridibunda* renferme du galactose, de la N-acétylglucosamine, de la N-acétylgalactosamine et du fucose.

➤ l'identification de l'acide sialique, sur la base de la caractérisation de ses protons H-3 axial et H-3équatorial. L'acide N-glycolylneuraminique se distingue de l'acide N-acétylneuraminique par l'absence de groupe acétamido ( $\delta = 2,030$  ppm) et la présence du groupe glycolyl ( $\delta = 4.15$  ppm).

➤ le nombre d'unités de fucose, identifié grâce à la présence de doublets correspondants aux groupements méthyles ( $1,1 < \delta_{\text{ppm}} < 1,3$ ).

En outre, un certain nombre de résonances, observés entre 4 et 4,5 ppm, peuvent renseigner sur la nature de certaines liaisons glycosidiques. C'est le cas des protons H-2 et H-5 de l'unité N-acétylgalactosaminitol, qui nous informent de la nature des substitutions en C-3 et C-6 par le galactose, la N-acétylglucosamine ou l'acide sialique. Il en est de même de certaines résonances comme celles des protons H-3 ou H-4 du galactose qui sont fortement déblindées dans le cas de liaisons 1,3 ou 1,4.

Quand l'analyse RMN s'applique à l'étude d'une série homologue d'oligosaccharides, comme ceux isolés de mucines humaines, l'examen de ces résonances, qui ne représentent que 20% de l'ensemble des paramètres spectraux, permet de préciser la séquence de chaque molécule (Kamerling et Vliegenthart 1992).

Cette détermination s'effectue alors par consultation de banques de données, dans le cas des structures déjà répertoriées, mais va jusqu'à l'identification de molécules nouvelles, grâce à la connaissance des incréments de glissement chimique propres à chaque type de liaison.

Néanmoins, cette méthode s'applique difficilement à l'étude des mucines d'amphibiens, dont les chaînes glycaniques possèdent presque toujours des structures imprévisibles. Aussi avons nous fait appel à des expériences de corrélation homonucléaire  $^1\text{H}/^1\text{H}$ .

### III.D.2. EXPERIENCES DE CORRELATION HOMONUCLEAIRE (COSY)

Les expériences de corrélation homonucléaire permettent d'attribuer les résonances des protons des hétérocycles monosaccharidiques.

Une expérience COSY 90 permet de corréler les protons anomères aux protons H-2. Après ce transfert de magnétisation du proton H-1 au proton H-2, une seconde expérience, COSY relayé ou COSY R1, transfère la magnétisation de H-1 à H-3 via H-2. Une troisième expérience, COSY R2, va de même transférer cette magnétisation jusqu'au proton H-4.

Un troisième relai devrait permettre d'attribuer le proton H-5. Cependant, compte tenu de la très faible constante  $^3J_{4,5}$  du galactose, la visualisation du proton H-5 des unités de galactose est rarement réalisée.

L'association de ces trois expériences COSY 90, COSY R1 et COSY R2 permet donc d'identifier les protons H-1 à H-4, mais aussi de mesurer les constantes de couplage  $^3J_{1,2}$  à  $^3J_{4,5}$  et d'identifier les monosaccharides.

Les constantes de couplage sont en effet de 7 à 8 Hz pour des protons trans axiaux, ou de 1 à 4 Hz pour des protons en position axial-équatorial ou équatorial-équatorial. En attribuant à ces constantes de couplage les lettres G (> 6 Hz) et P (< 5 Hz), les sucres de conformation galacto et gluco seront caractérisés par le tableau suivant:

	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$
$\alpha$ -galacto	P	G	P	P
$\beta$ -galacto	G	G	P	P
$\alpha$ -gluco	P	G	G	G
$\beta$ -gluco	G	G	G	G

### *III.D.3. EXPERIENCE ROESY (Rotating Frame Over Hauser Effect Spectroscopy)*

Cette expérience permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux atomes voisins de moins de 5°A. Ces corrélations peuvent être intra-résidus (ex: H-1/H-3, H-5) ou extra-résidus. Dans ce dernier cas, le proton anomère d'un monosaccharide sera corrélé avec le proton le plus proche du sucre sur lequel il est lié. Cette observation permet évidemment de préciser la séquence de l'oligosaccharide.

---

# RESULTATS

<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>76</b>
IV.A. PURIFICATION DES O-GLYCANNES .....	76
IV.B. ANALYSE STRUCTURALE DES CHAÎNES GLYCANNIQUES .....	85
IV.B.1. Structures renfermant le noyau Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (noyau de type 2) .....	85
IV.B.2. Oligosaccharide alditol 200-I-1.....	86
IV.B.3. Oligosaccharide alditol N-II-8b.....	90
IV.B.4. Oligosaccharides alditols 100-2 et 100-5.....	95
IV.B.5. Oligosaccharides alditols possédant le noyau Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal $\beta$ 1 .....	99
IV.B.6. Oligosaccharides alditols possédant la séquence GlcA( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol .....	114
IV.B.7. Oligosaccharides alditols possédant le noyau Gal( $\beta$ 1-4)[Gal( $\beta$ 1-3)]Gal $\beta$ 1 .....	119
IV.B.8. Oligosaccharide alditol 100-11 .....	130
IV.B.9. Oligosaccharide alditol 400-II-6 .....	132
IV.B.10. Oligosaccharide alditol 200-I-B2 .....	132
IV.B.11. Oligosaccharide alditol 100-13 .....	135
IV.B.12. Oligosaccharide alditol 400-II-7 .....	139
IV.B.13. Oligosaccharide alditol 200-I-B3 .....	140
IV.B.14. Oligosaccharide alditol 200-I-B4 .....	140

## IV. RESULTATS

### IV.A. PURIFICATION DES O-GLYCANNES

Une  $\beta$ -élimination réductive a été réalisée sur les mucines oviducales de *Rana ridibunda* afin de libérer les chaînes O-glycanniques sous forme d'oligosaccharides alditols. Plusieurs étapes de purification et séparation ont été ensuite effectuées afin d'isoler des sucres à l'état pur permettant ainsi leur analyse par RMN, spectrométrie de masse et méthylation. Le schéma général du protocole expérimental a été décrit lors du chapitre précédent (revoir figure 21).

En effet, après  $\beta$ -élimination et déssalage par tamisage moléculaire sur une colonne de Bio-Gel P<sub>2</sub>, les oligosaccharides sont purifiés par chromatographie d'échange d'ion sur une colonne de Dowex50x2 (mesh200-400, forme H<sup>+</sup>), afin d'éliminer les peptides. Ensuite, une chromatographie d'échange d'ion sur une colonne de Dowex1x2 (mesh200-400, forme HCOO<sup>-</sup>), est nécessaire pour séparer les sucres neutres et acides; l'élution des sucres neutres se fait à l'eau désionisée alors que celle des sucres acides s'effectue par un gradient d'acétate de pyridine 200, 400 et 600mM. Chacune de ces fractions sera ensuite séparée par tamisage moléculaire en sous-fractions: lourdes, moyennes et légères; cela est possible grâce à l'observation par chromatographie sur couche mince dans les solvants suivants:

- Ethanol/n-butanol/acide acétique/eau/pyridine (100/10/3/30/10).
- Butanol/acide acétique/eau (20/10/15).

Les fractions ainsi obtenues sont ensuite analysées sur Chromatographie en phase Liquide Haute Performance (CLHP) afin d'isoler chacun de ces oligosaccharides alditols.

Dans le cas de *Rana ridibunda*, nous avons obtenu trois fractions neutres: N-I, N-II et N-III. La figure 27 montre le profil CLHP, en phase normale, sur colonne Supelcosyl LC-NH<sub>2</sub>, de la fraction N-II. Certains pics obtenus contiennent en réalité plusieurs sucres et ont été isolés sur CLHP en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub> (figure 28). La figure 29 montre le profil CLHP, en phase normale, de la fraction N-III.

Certaines fractions acides ont été également analysées en CLHP avec un gradient de phosphate de potassium. Les figures 30 et 31 montrent les profils CLHP des fractions 100mM et 200mM-I. Celle-ci présentent un ensemble de pics rassemblés en une fraction 200-I-B qui a été recyclée en CLHP afin d'isoler les différents sucres (figure 31). Les profils CLHP des fractions 200mM-II et 400mM-II sont montrés dans les figures 32 et 33.

Tous les pics ont été collectés, purifiés sur colonne de Bio-Gel P<sub>2</sub>, avant d'être analysés en RMN. L'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF a été également réalisée et les résultats sont résumés dans le tableau 8 à la fin de ce chapitre.

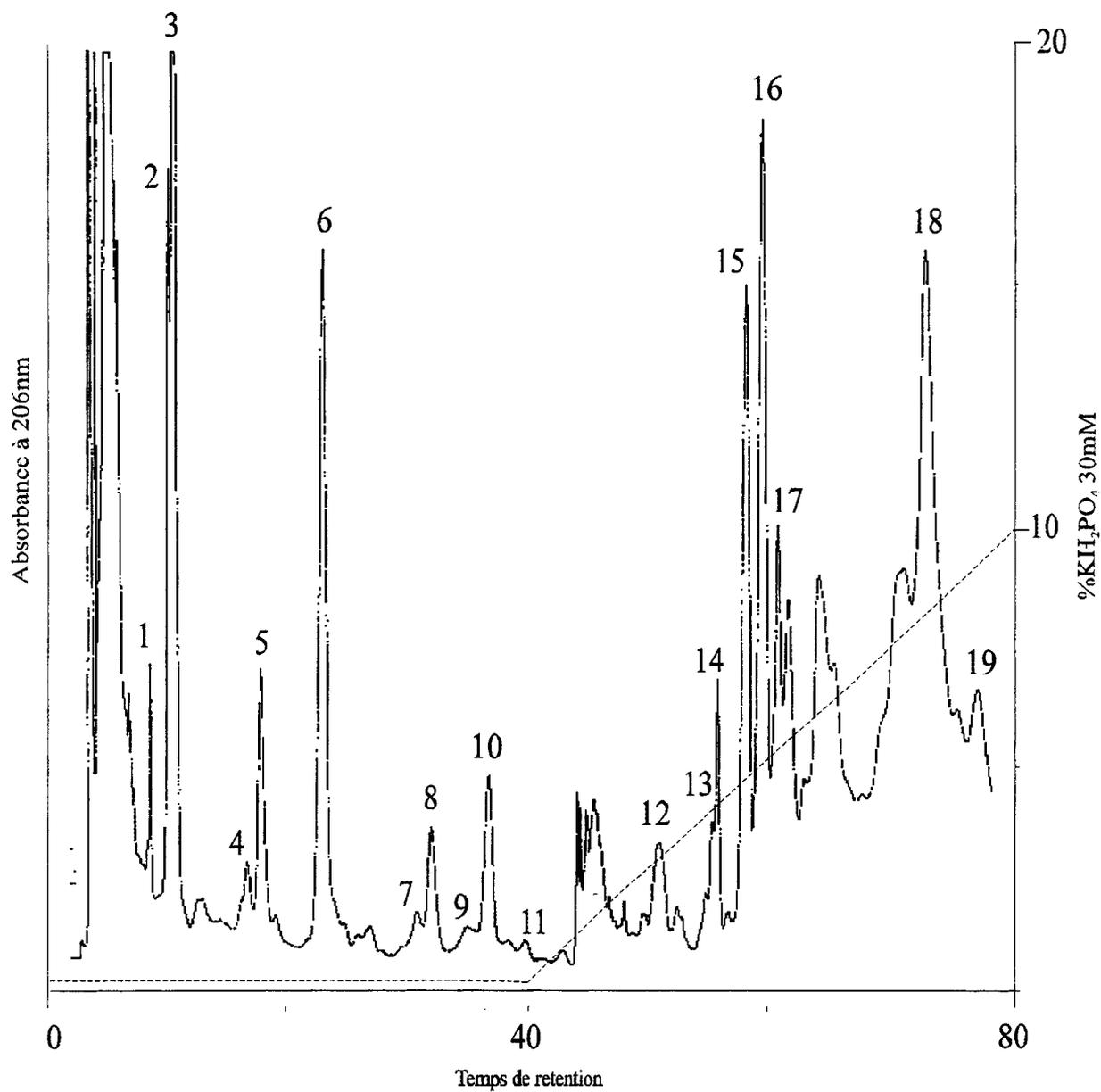


Figure 27: Chromatogramme CLHP en phase normale de la fraction Neutre-II de *Rana ridibunda*.

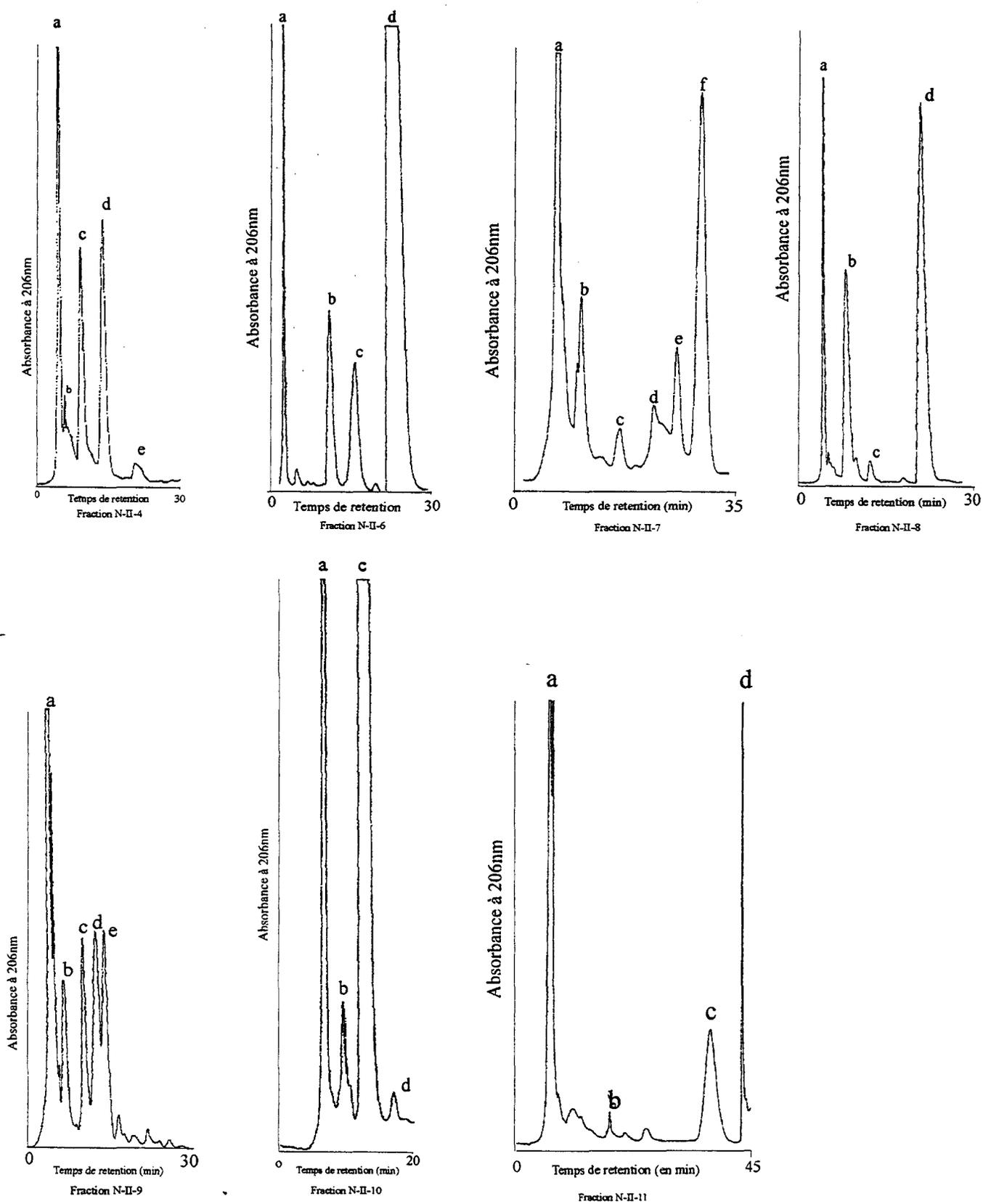


Figure 28: Chromatogramme CLHP en phase inverse des fractions obtenues par CLHP de la fraction Neutre-II de *Rana ridibunda*.

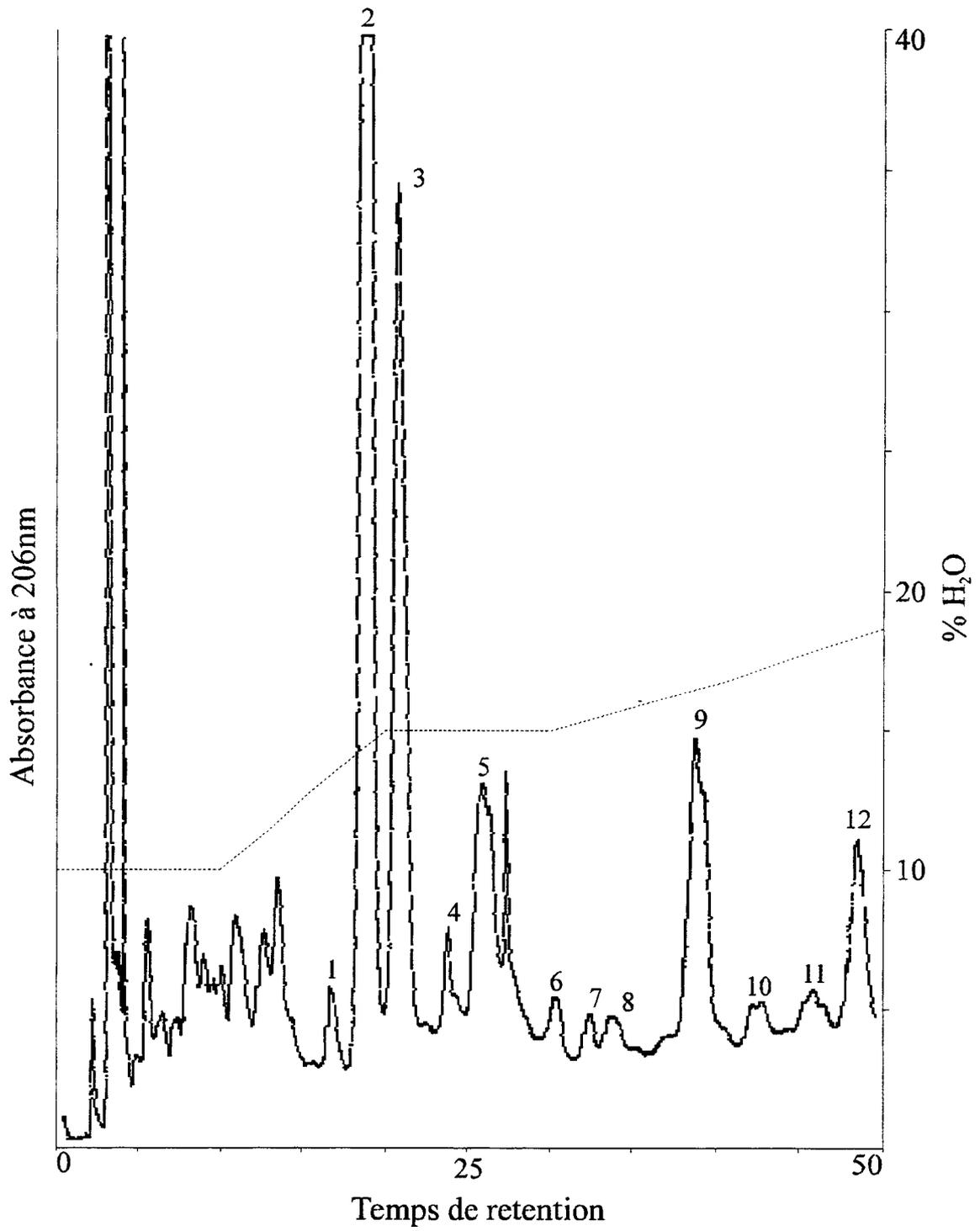


Figure29: Profil CLHP de la fraction Neutre-III de *Rana ridibunda*.

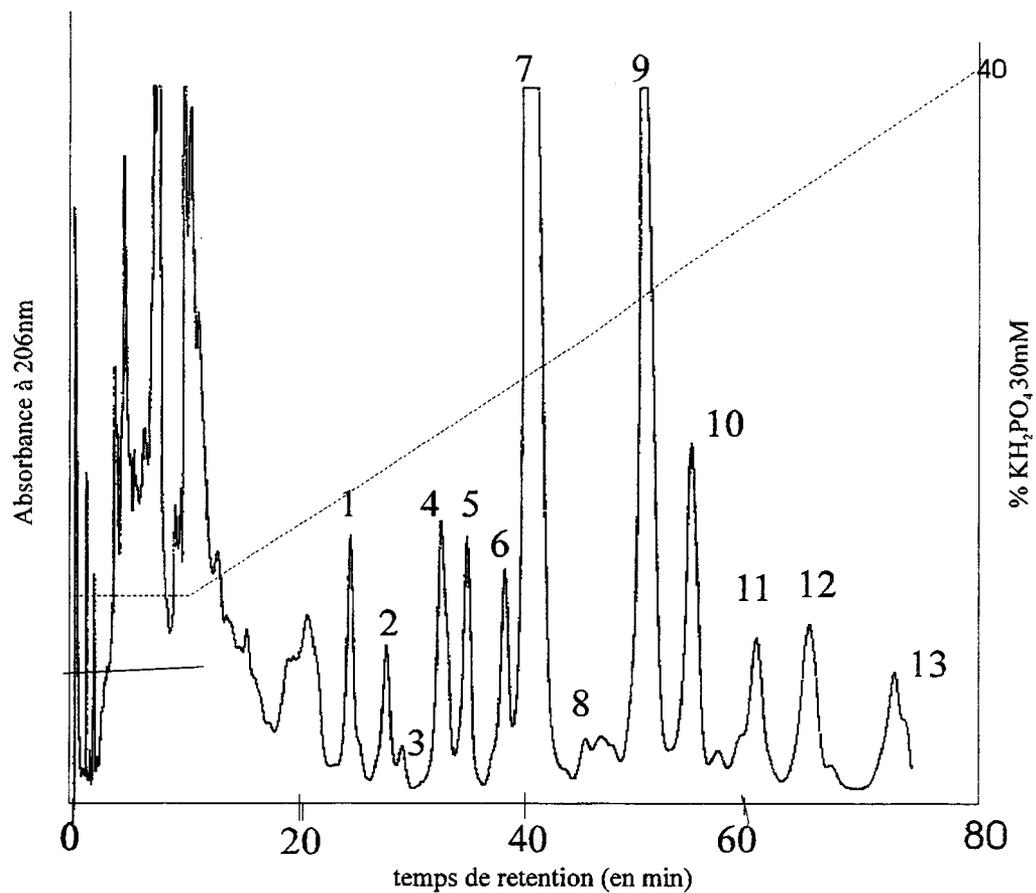


Figure 30: Profil CLHP de la fraction 100mM de *Rana ridibunda*.

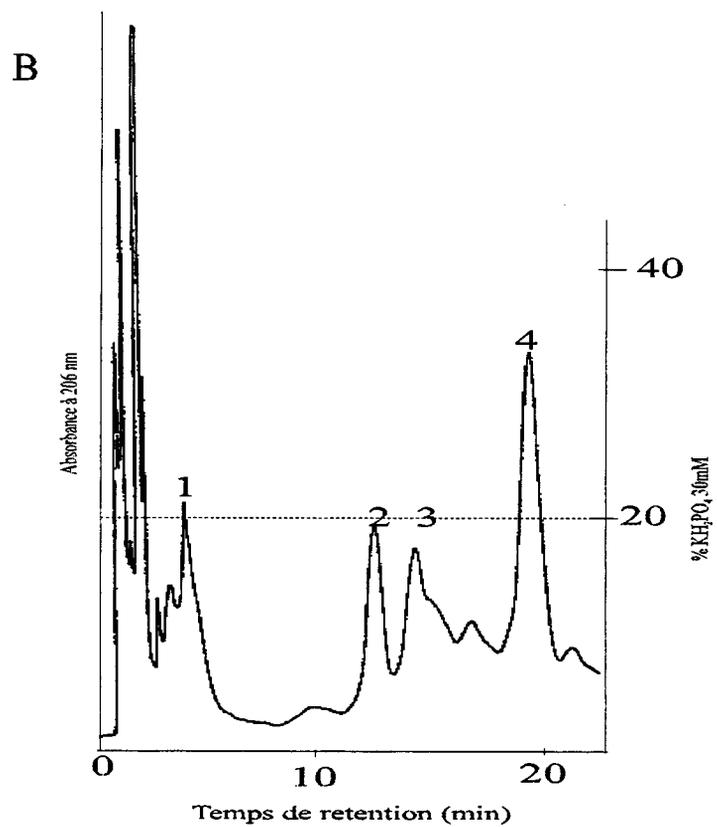
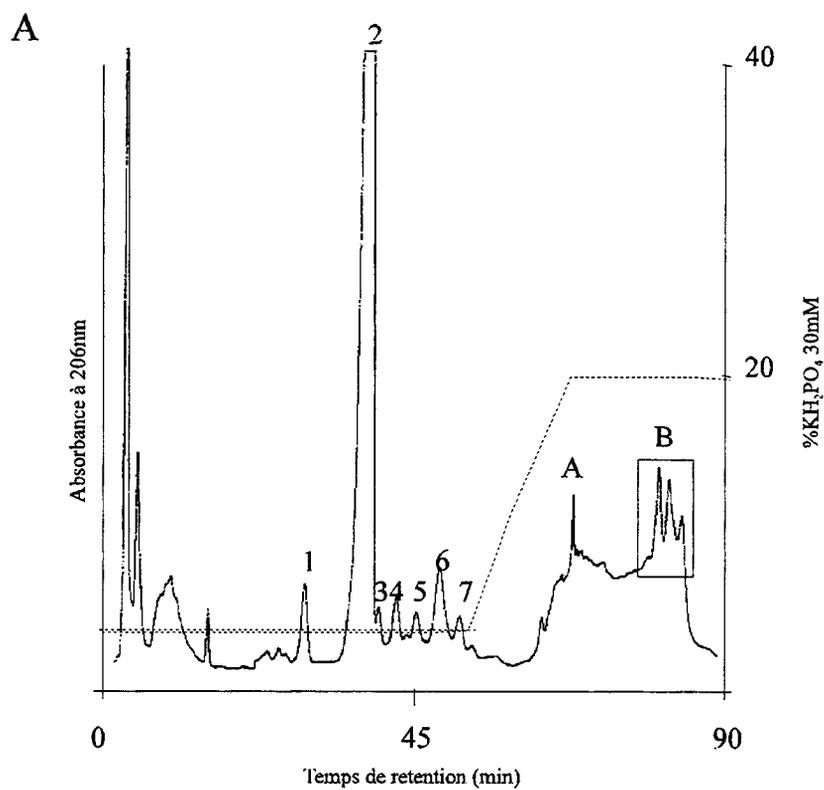


Figure 31: Profil CLHP des fractions: A) 200 mM-I et B) 200mM-I-B de *Rana ridibunda*.

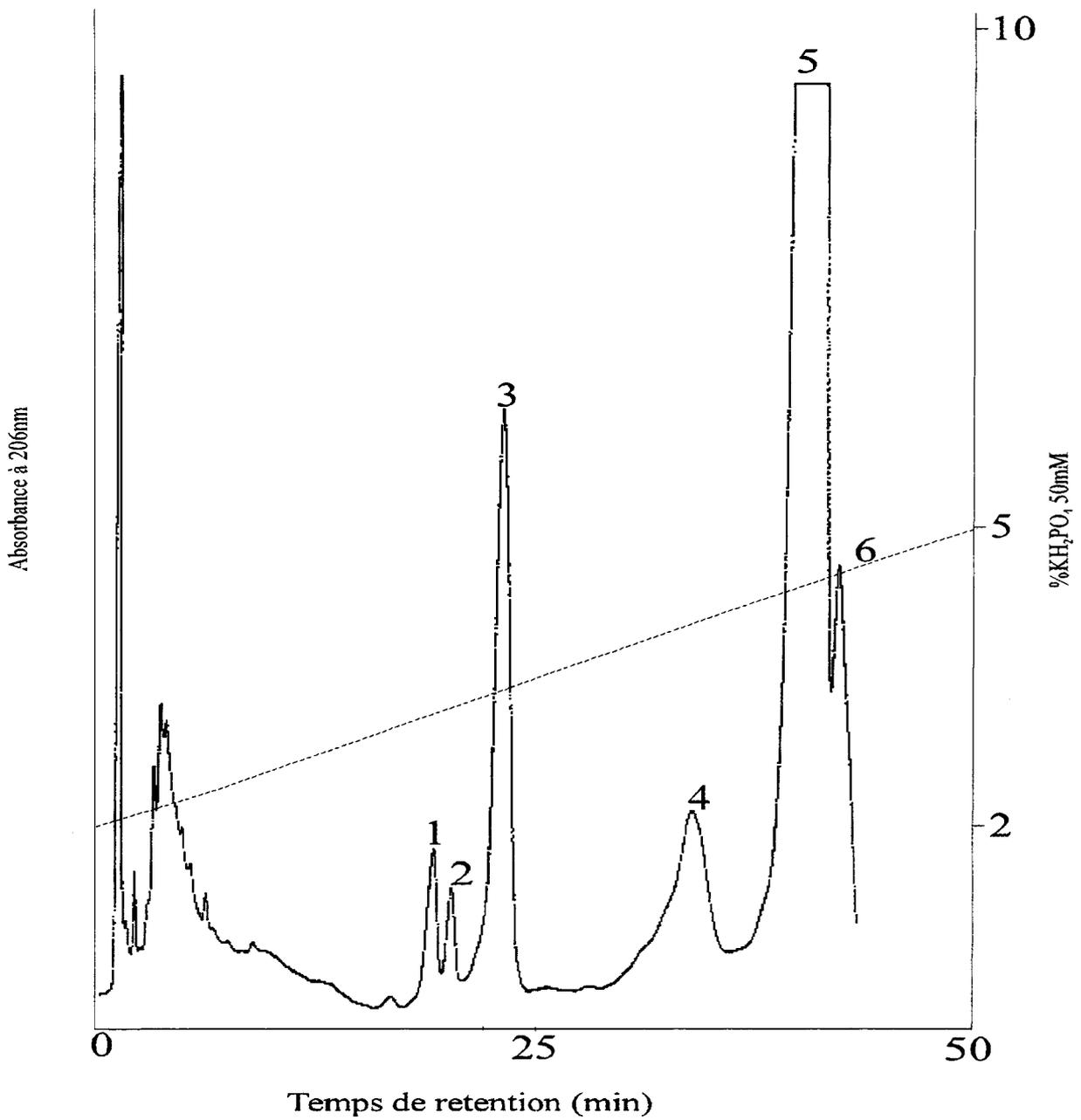


Figure 32: Profil CLHP de la fraction 200 mM-II de *Rana ridibunda*.

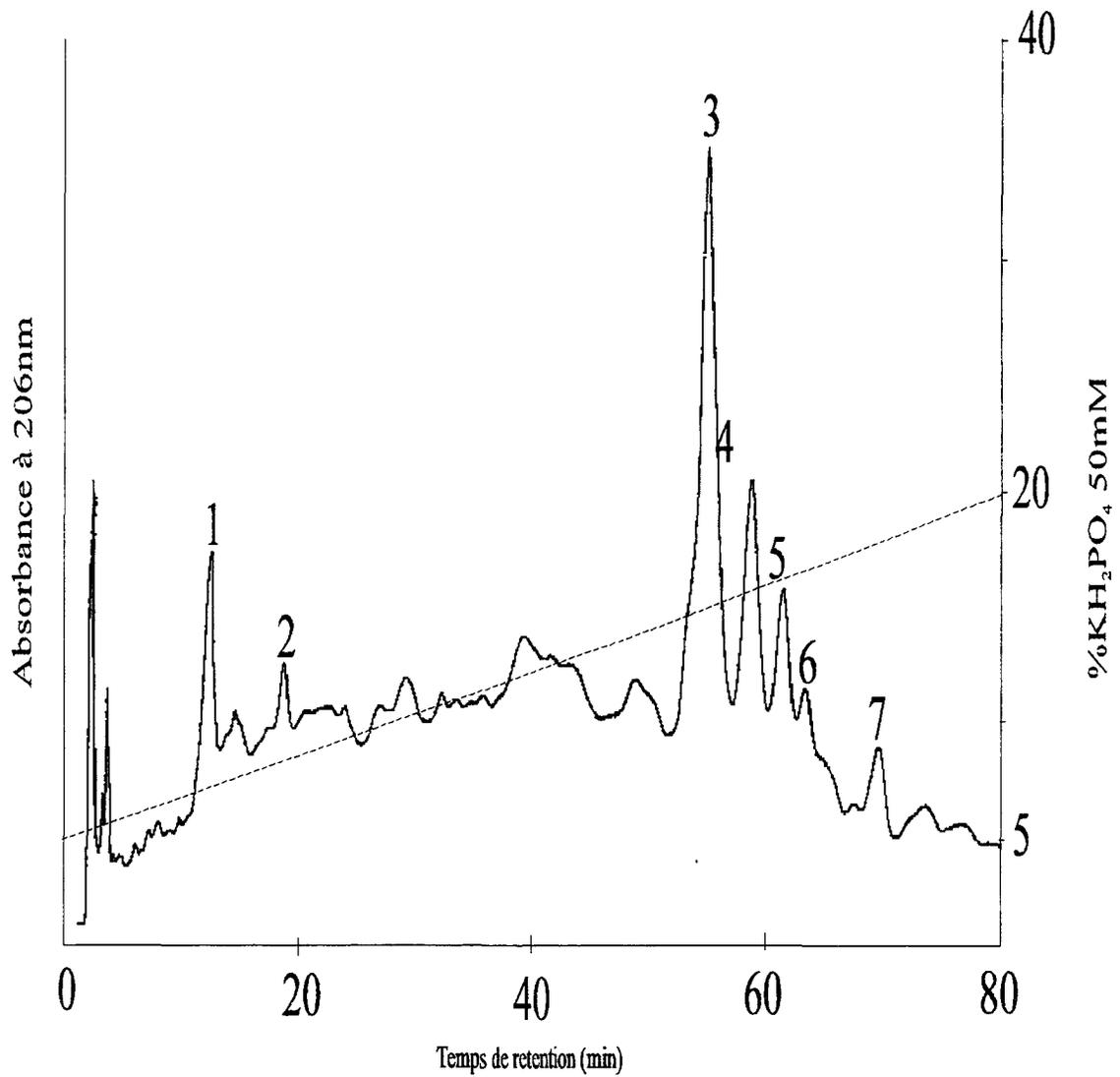


Figure 33: Profil CLHP de la fraction 400 mM-II de *Rana ridibunda*.

## IV.B. ANALYSE STRUCTURALE DES CHAÎNES GLYCANNIQUES

L'analyse structurale des chaînes glycaniques libérées par  $\beta$ -élimination réductive a été essentiellement réalisée par analyse de résonance magnétique nucléaire. Dans certains cas, une analyse 1D a permis d'identifier directement ces séquences, lorsqu'il s'agissait d'une structure déjà rencontrée chez une autre espèce d'amphibien. Dans la plupart des cas, la mesure de la masse moléculaire par spectrométrie de masse de mode MALDI-TOF a permis de confirmer la composition molaire en sucre et de caractériser la présence d'un groupement sulfate ou glucuronyl. L'identification de cet acide glucuronique a été réalisée après réduction de ce dernier, en 6-D<sub>2</sub>-Glucose. L'analyse des monosaccharides méthylés a été effectuée pour chaque tête de série homologue, les suivants pouvant être aisément identifiés sur la base des données RMN. Dans un but de simplification, les différents oligosaccharides alditols ont été décrits selon un ordre logique de complexité croissante, qui ne tient pas compte de leur numérotation sur les enregistrements de chromatographie liquide.

### *IV.B.1. Structures renfermant le noyau Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (noyau de type 2)*

Les oligosaccharides alditols 200-I-2 et 200-II-6 possèdent un noyau de type : Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol. Cette caractéristique découle naturellement des valeurs des glissements chimiques des protons H-6 et H-6' de l'unité de GalNAc-ol, respectivement à 3,938 et 3,684 ppm pour le premier; et 3,937 et 3,671 ppm pour le second.

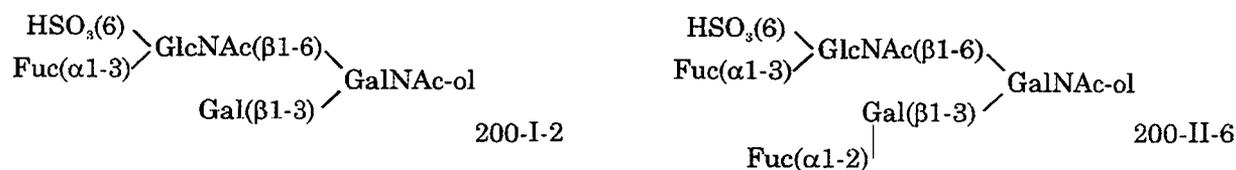
L'analyse du spectre COSY de 200-II-6 (figure 34) met en évidence la présence de deux unités de Fucose (F<sup>2</sup> et F<sup>3</sup>), d'une unité de GlcNAc et d'une unité de galactose. Des valeurs de glissements chimiques de F<sup>2</sup> H-1, H-5 et H-6 et du déblindage du proton H-1 de l'unité  $\beta$ -Gal, la séquence Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$  peut aisément être identifiée.

Les deux quadruplets observés à 4,361 et 4,251 ppm sont caractéristiques des protons H-6 et H-6' d'un N-acétylglucosamine sulfatée sur le carbone 6 (Strecker et al. 1997). Une analyse complémentaire en MALDI-TOF a confirmé la présence de ce groupement sulfate (ou phosphate). L'assurance de la présence de sulfate est confirmée par l'absence de couplage additionnel <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub>, qui aurait découplé les signaux H-6 et H-6' en octuplets. Les signaux relatifs

aux protons H-1, H-5 et H-6 de la seconde unité de Fucose sont caractéristiques de la liaison Fuc( $\alpha$ 1-3)GlcNAc qui est fréquent chez de nombreuses espèces d'amphibiens (Maes et al, 1997,a).

En ce qui concerne l'oligosaccharide alditol 200-I-2 (figure 35), il est aisé de constater que les seules différences portent sur l'absence du signal relatif au fucose F<sup>2</sup>, et au blindage ( $\Delta\delta = -0,112$  ppm) du proton anomère du  $\beta$ -galactose ( $\delta = 4,461$  ppm), prouvant ainsi qu'il s'agit de la forme monofucosylée du 200-II-6.

Sur la base de ces données, les structures des oligosaccharides 200-I-2 et 200-II-6 ont été établies comme suit:



#### IV.B.2. Oligosaccharide alditol 200-I-1

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de l'oligosaccharide alditol 200-I-1 fournit un ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$   $m/z$  772, correspondant à la composition molaire suivante: 1 sulfate, 2 Gal, 1 Fuc et 1 GalNAc-ol.

L'analyse du spectre COSY (figure 36) confirme la présence de deux unités  $\beta$ -Gal, sur la base des constantes de couplage  $J_{1,2}$ ;  $J_{2,3}$ ;  $J_{3,4}$  et  $J_{4,5}$  ( $\sim 8\text{H}_2$ ;  $\sim 8\text{H}_2$ ;  $\sim 3\text{H}_2$ ;  $\sim 1\text{H}_2$ ).

Etant donné que les protons H-6 et H-6' de l'unité GalNAc-ol possèdent des glissements chimiques identiques ( $\sim 3,67$  ppm), il est aisé de conclure en la présence d'un hydroxyde libre en position 6. Les paramètres relatifs à l'unité  $\alpha$ -Fuc sont caractéristiques d'une liaison  $\alpha$ 1,2. L'unité Gal III, dont les protons H-3 et H-4 sont déblindés à  $\delta = 4,332$  et  $4,290$  ppm, respectivement, est sulfatée en position C-3 (Maes et al. 1997,a).

Les glissements chimiques des protons H-3 et H-4 ( $\delta = 4,036$  et  $4,241$  ppm) de l'unité Gal II sont caractéristiques d'une substitution en 3 et en 4 par le galactose Gal III.

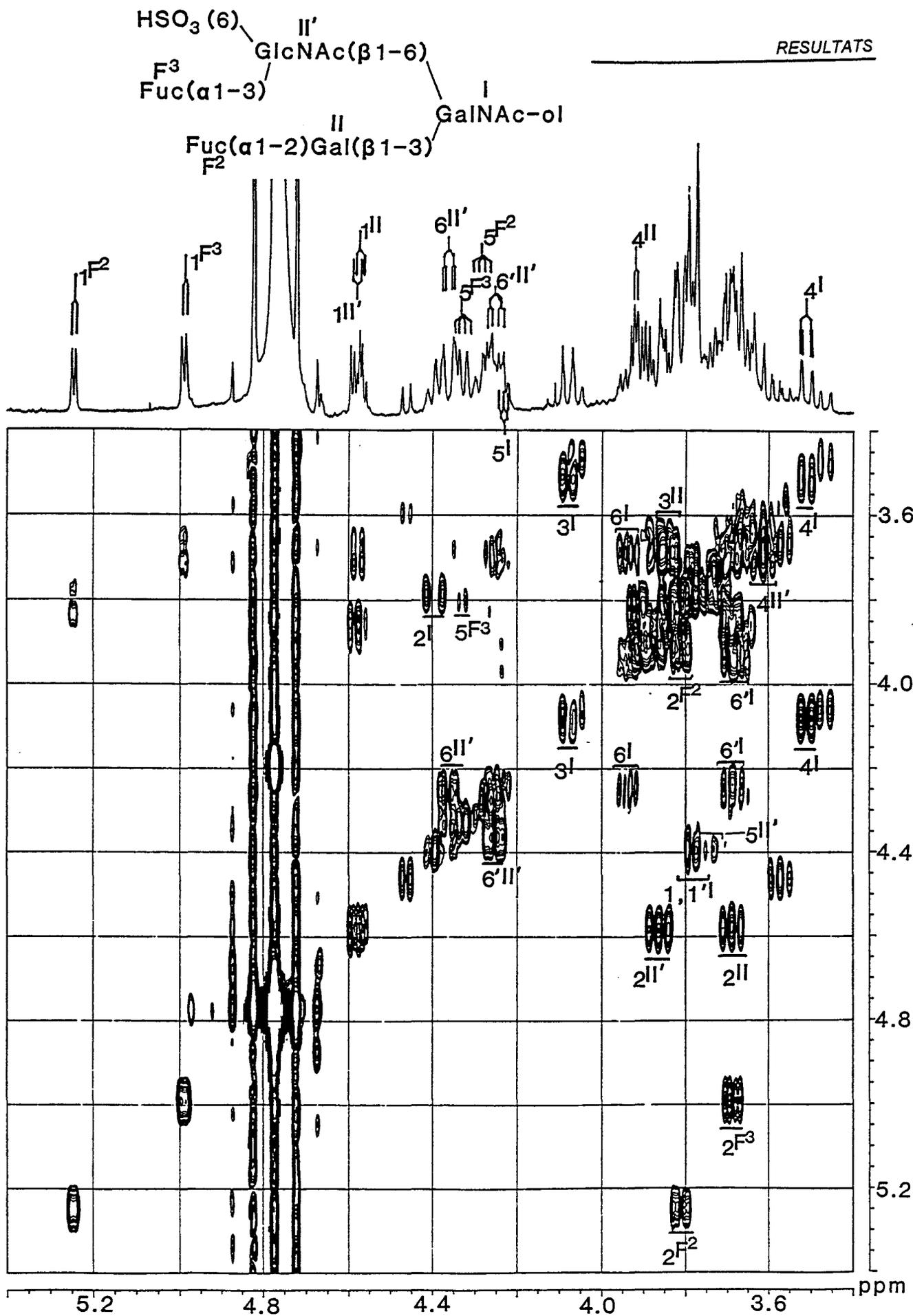


Figure 34: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 200-II-6.

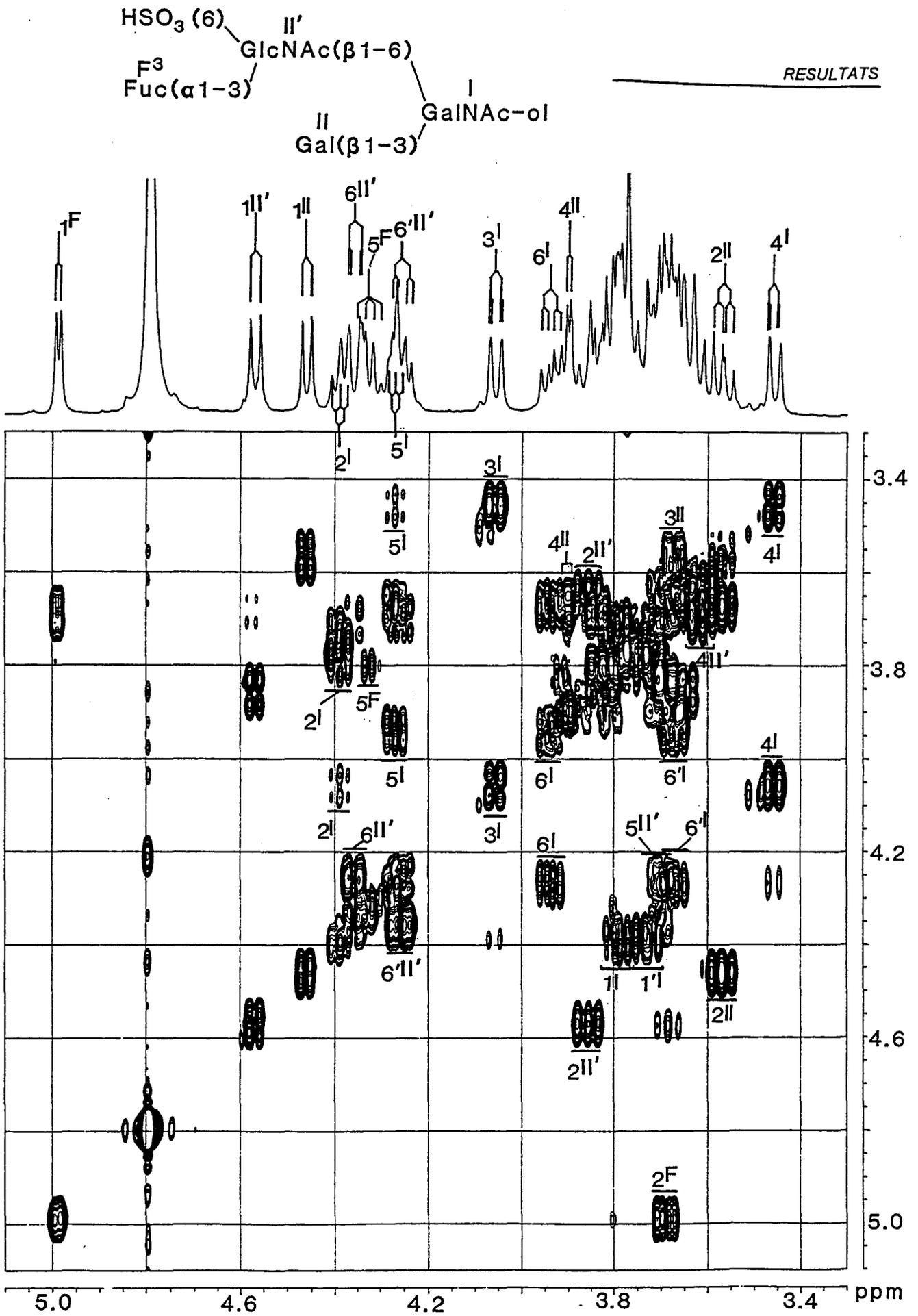


Figure 35: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 200-I-2.

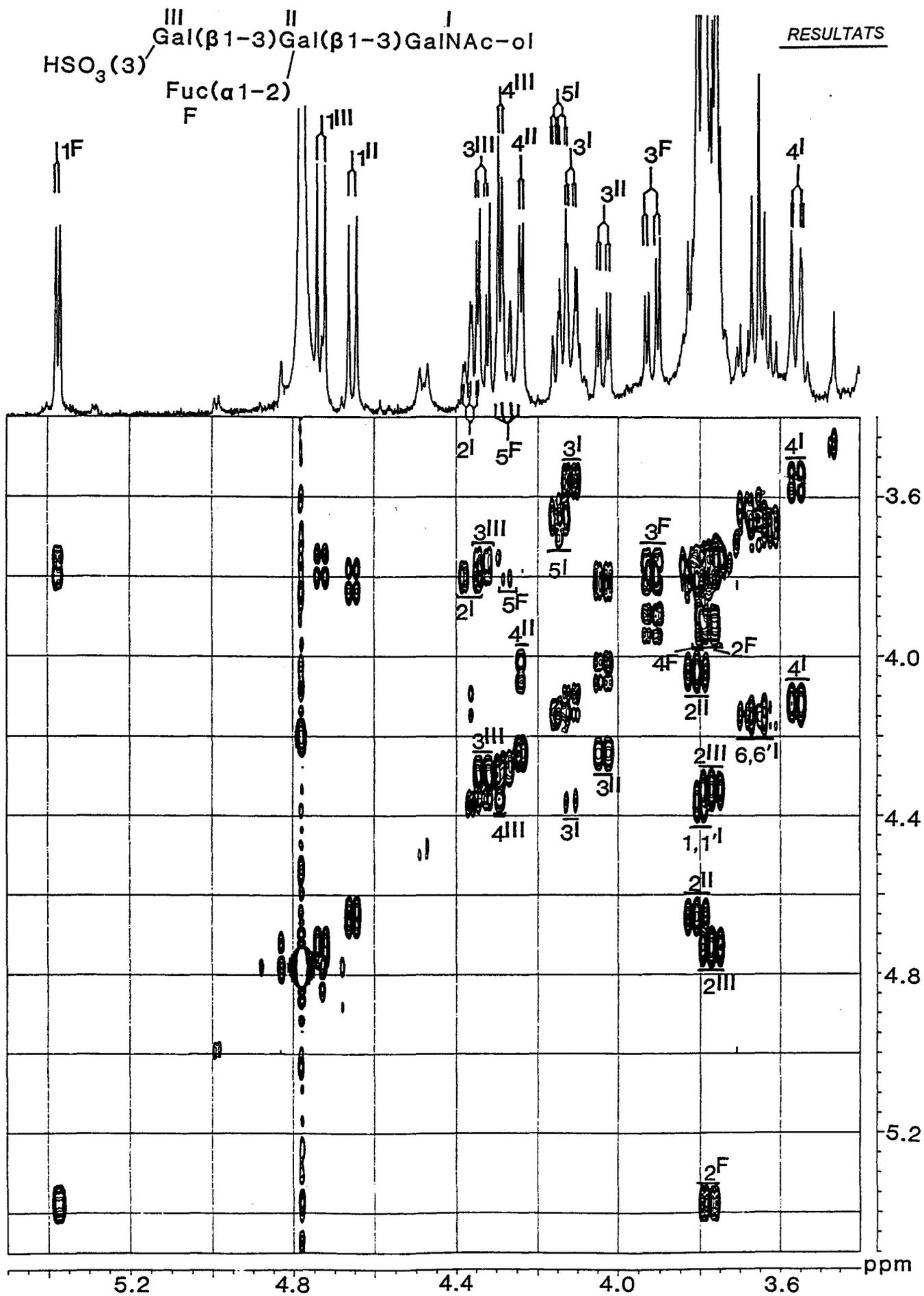


Figure 36: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 200-I-1.



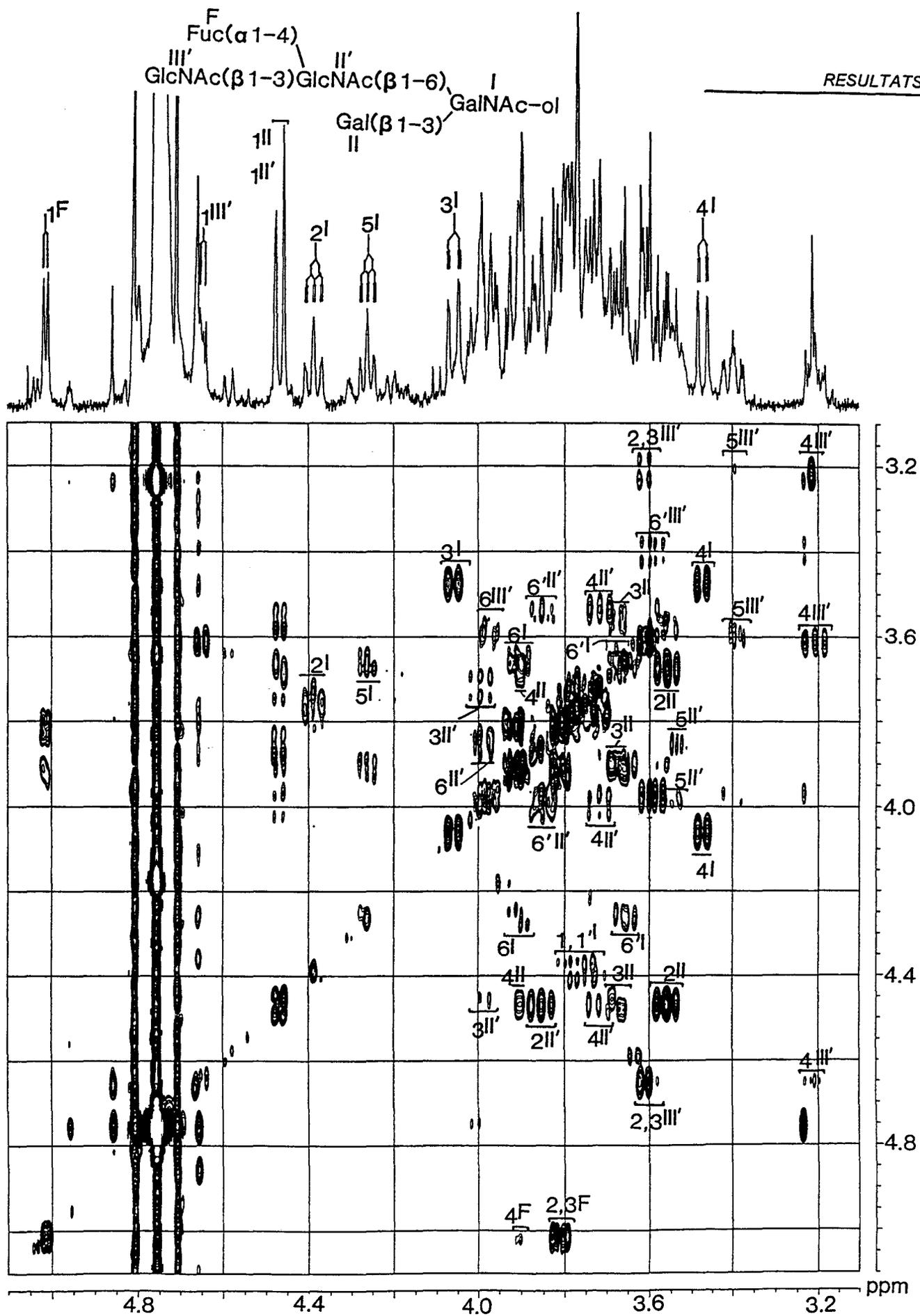


Figure 37: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol N-II-8b.

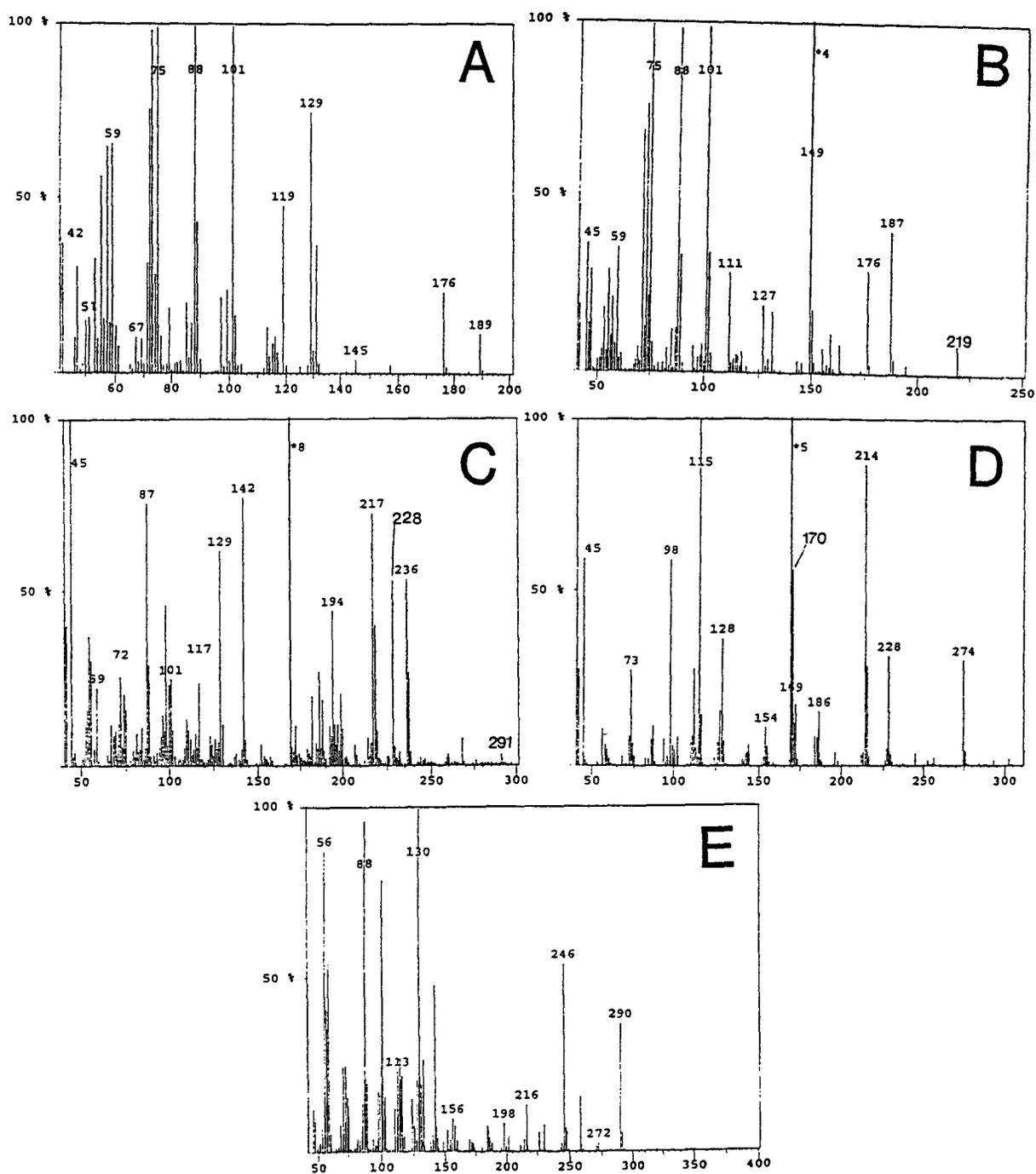
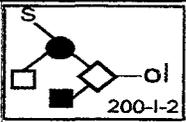
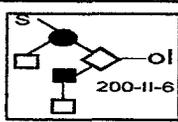
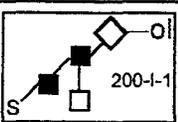
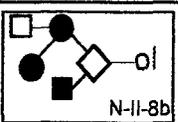


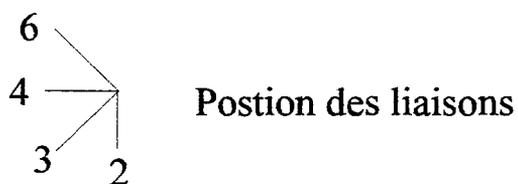
Figure 38: Spectres GC/MS après méthylation de l'oligosaccharide alditol N-II-8b.

Tableau 1: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 200-I-2, 200-II-6, 200-I-1 et N-II-8b.

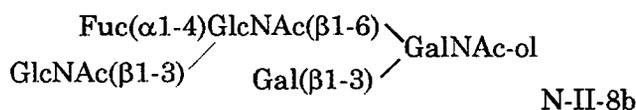
					
GalNAc-ol (I)	H-1	3,777	3,78	3,79	3,787
	H-1'	3,728	3,78	3,79	3,74
	H-2	4,392	4,392	4,361	4,388
	H-3	4,052	4,078	4,116	4,056
	H-4	4,456	3,507	3,558	3,470
	H-5	4,259	4,244	4,146	4,261
	H-6	3,938	3,937	3,68	3,91
	H-6'	3,684	3,671	3,66	3,639
	NAc	2,066	2,065	2,051	2,005
Gal(β1-3) (II)	H-1	4,461	4,573	4,65	4,467
	H-2	3,568	3,685	3,808	3,559
	H-3	3,670	3,87	4,036	3,675
	H-4	3,900	3,918	4,241	3,91
GlcNAc(β1-6) (II')	H-1	4,568	4,584		4,467
	H-2	3,854	3,861		3,854
	H-3	3,639	3,677		3,994
	H-4	3,609	3,597		3,721
	H-5	3,705	3,74		3,524
	H-6	4,357	4,361		3,974
	H-6'	4,255	4,251		3,862
	NAc	2,055	2,051		2,067
Fuc(α1-3) (F <sup>3</sup> )	H-1	4,986	4,991		
	H-2	3,688	3,677		
	H-3	N.D.	N.D.		
	H-4	3,80	3,80		
	H-5	4,324	4,324		
	CH <sub>3</sub>	1,162	1,165		
Fuc(α1-2) (F <sup>2</sup> )	H-1		5,245	5,373	
	H-2		3,807	3,775	
	H-3		3,935	3,916	
	H-4		3,87	3,82	
	H-5		4,251	4,275	
	CH <sub>3</sub>		1,241	1,24	
Gal(β1-3) (III)	H-1			4,73	
	H-2			3,769	
	H-3			4,332	
	H-4			4,290	

GlcNAc( $\beta$ 1-3) (III')	H-1			4.644
	H-2			3.612
	H-3			3.612
	H-4			3.218
	H-5			3.391
	NAc			2.102
Fuc( $\alpha$ 1-4)	H-1			5.012
	H-2			3.806
	H-3			3.80
	H-4			3.90
	H-5			4.81
	CH <sub>3</sub>			1.277

Notations symboliques:



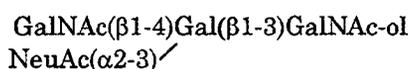
- ◇-ol      GalNAc-ol
- ◇           $\alpha$ GalNAc
- ◆           $\beta$ GalNAc
- $\beta$ GlcNAc
- ▣           $\alpha$ Gal
- $\beta$ Gal
- $\alpha$ Fuc
- ⊠           $\beta$ GlcA
- $\alpha$ NeuAc



Cette structure a été en outre vérifiée par méthylation (figure 38)

#### IV.B.4. Oligosaccharides alditols 100-2 et 100-5

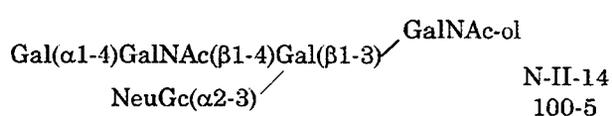
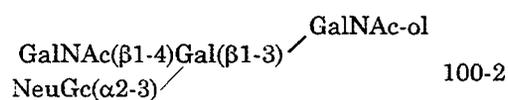
Le spectre RMN de l'oligosaccharide 100-2 (figure 39) est identique à celui d'un constituant isolé de la mucine *Bufo arenarum* (Morelle et al., 1998, a) dont la structure était:



Cependant, l'absence du groupement acétamido et la présence d'un singulet à  $\delta = 4,12$  ppm montrent que l'acide sialique est, dans notre cas, de l'acide N-glycolylneuraminique.

L'oligosaccharide 100-5 (figure 40) possède une unité d' $\alpha$ -galactose supplémentaire ( $\delta_{\text{H-1}} = 4,980$  ppm;  $J_{1,2} = 4\text{Hz}$ ). Nous observons également un déblindage de la résonance H-4 de l'unité  $\beta$ -GalNAc, observée à  $\delta = 4,076$  ppm.

Sur la base de ces observations, les structures des oligosaccharides alditols 100-2 et 100-5 sont les suivantes:



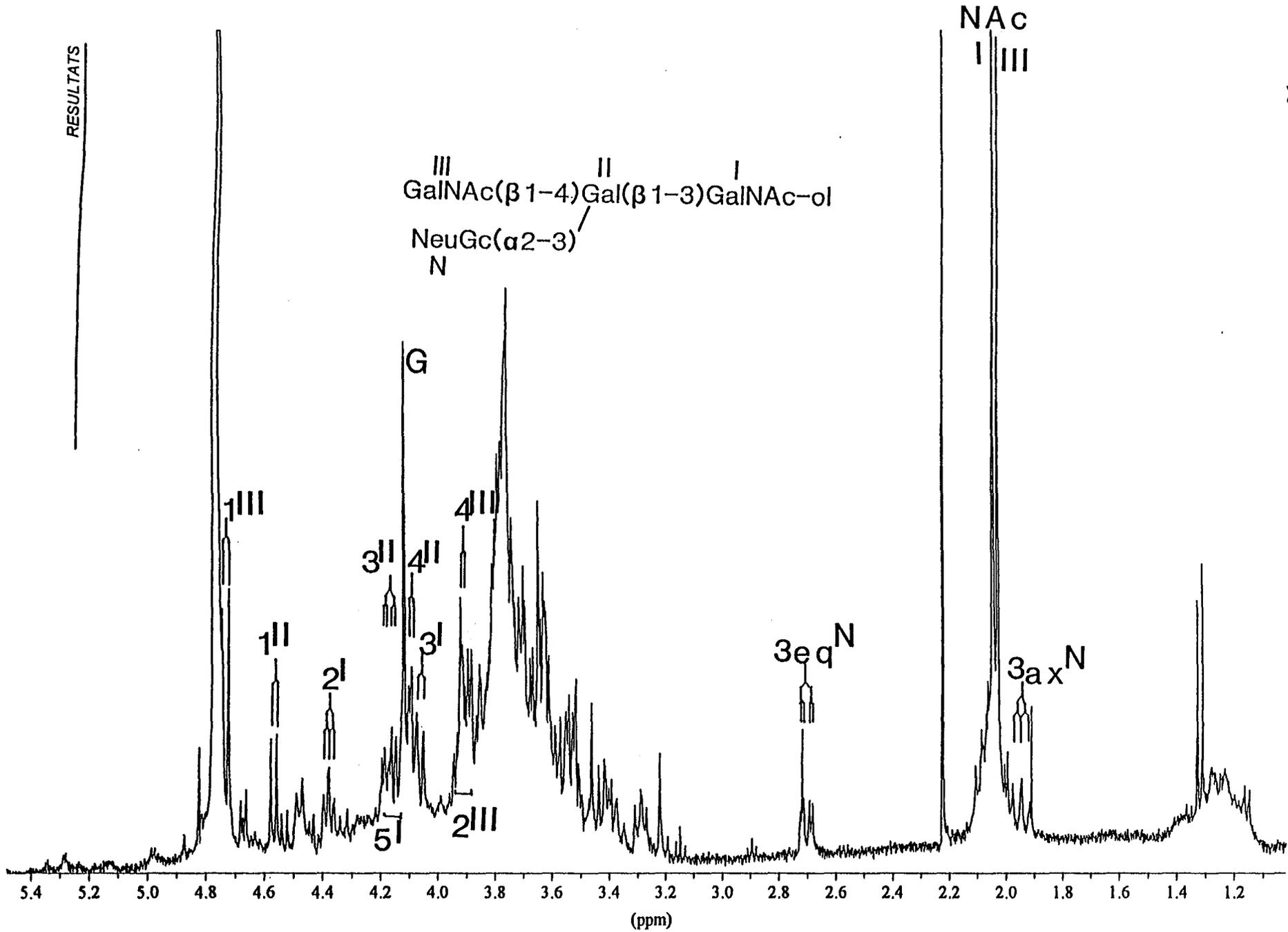


Figure 39: Spectre RMN à une dimension de l'oligosaccharide alditol 100-2.

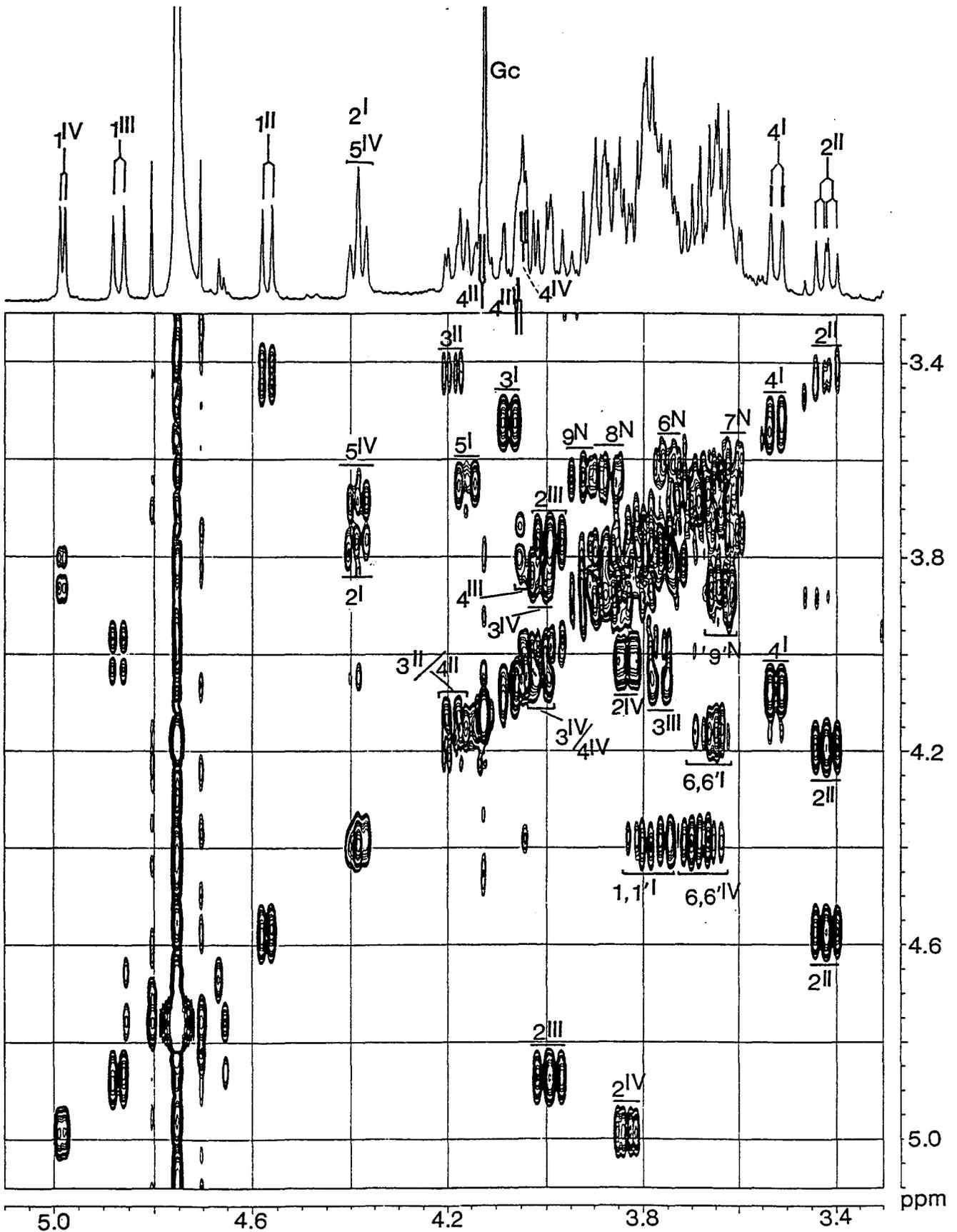
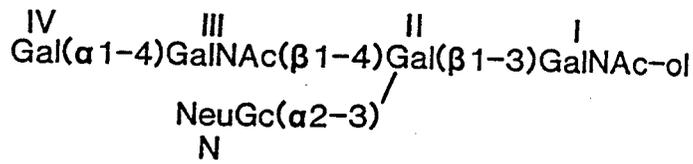
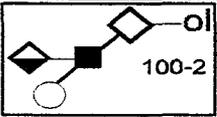
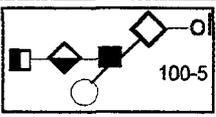


Figure 40: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 100-5.

Tableau 2: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 100-2 et 100-5:

			
GalNAc-ol (I)	H-1	N.D.	3,774
	H-2	4,378	4,382
	H-3	4,063	4,073
	H-4	N.D.	3,523
	H-5	4,162	4,157
	H-6	N.D.	3,678
	H-6'	N.D.	3,645
	NAc	2,048	2,048
Gal( $\beta$ 1-3) (II)	H-1	4,569	4,570
	H-2	N.D.	3,418
	H-3	4,177	4,189
	H-4	4,099	4,189
GalNAc( $\beta$ 1-4) (III)	H-1	4,735	4,871
	H-2	3,903	3,992
	H-3	N.D.	3,767
	H-4	3,919	4,076
	NAc	2,032	2,029
Gal( $\alpha$ 1-4) (IV)	H-1		4,980
	H-2		3,829
	H-3		4,006
	H-4		4,006
	H-5		4,382
	H-6,6'		3,673
NeuGc (N)	H-3eq	2,705	2,700
	H-3ax	1,945	1,960
	H-4	N.D.	N.D.
	H-5	N.D.	N.D.
	H-6	N.D.	3,752
	H-7	N.D.	3,608
	H-8	N.D.	3,865
	H-9	N.D.	3,925
	H-9'	N.D.	3,636
Gc	4,12	4,12	

#### IV.B.5. Oligosaccharides alditols possédant le noyau Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal $\beta$ 1



Les oligosaccharides alditols N-II-6d, N-II-8d, 200-I-7, 100-6 et N-II-10c ont comme point commun de posséder le noyau Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal $\beta$ 1-. Il s'agit de l'épitope du groupe sanguin B dont l'unité d' $\alpha$ -Gal est toutefois substitué par un résidu de  $\beta$ -Gal.

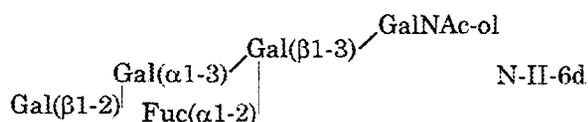
Pour le premier composé de cette série, N-II-6d, la présence de deux unités de  $\beta$ -Gal, une unité de  $\alpha$ -Gal et une unité d' $\alpha$ -Fuc est directement déduite de l'analyse du spectre COSY à deux relais (figure 41), sur lequel ces monosaccharides ont été identifiés sur la base de la mesure des constantes de couplage de protons des cycles pyraniques. Le déplacement chimique du proton H-1 du  $\beta$ -Gal II est caractéristique d'une substitution en C-2 et C-3 par du fuose et de l' $\alpha$ -galactose, comme il a été montré pour les substances de groupe sanguin B.

Cependant, le proton anomère de l'unité  $\alpha$ -Gal est ici déplacé de vers les champs faibles à  $\delta = 5,498$  ppm, témoignant de sa substitution. Les paramètres RMN de l'unité  $\beta$ -Gal supplémentaire (Gal IV) confirment que ce monosaccharide est en position terminale non réductrice.

Ces données sont confirmées par l'analyse des dérivés méthylés (figure 42), qui sont respectivement le 2,3,4-tri-O-méthylfuose, le 2,3,4,6-tétra-méthyl-galactose, le 2-acétyl,3,4,6-tri-méthylgalactose, le 2,3-di-acétyl,4,6-di-méthylgalactose et le 3-acétyl,1,4,5,6-tétra-méthyl-N-acétyl(méthyl)galactosaminitol.

Après une défucosylation réalisée par hydrolyse partielle ( $\text{CF}_3\text{COOH}$  0,5N, 30 min,  $100^\circ\text{C}$ ), nous observons la disparition du 2,3-di-acétyl,4,6-di-méthyl-galactose et l'apparition du 2,4,6-tri-méthyl-galactose (figure 43).

La structure de l'oligosaccharide N-II-6d est donc la suivante:



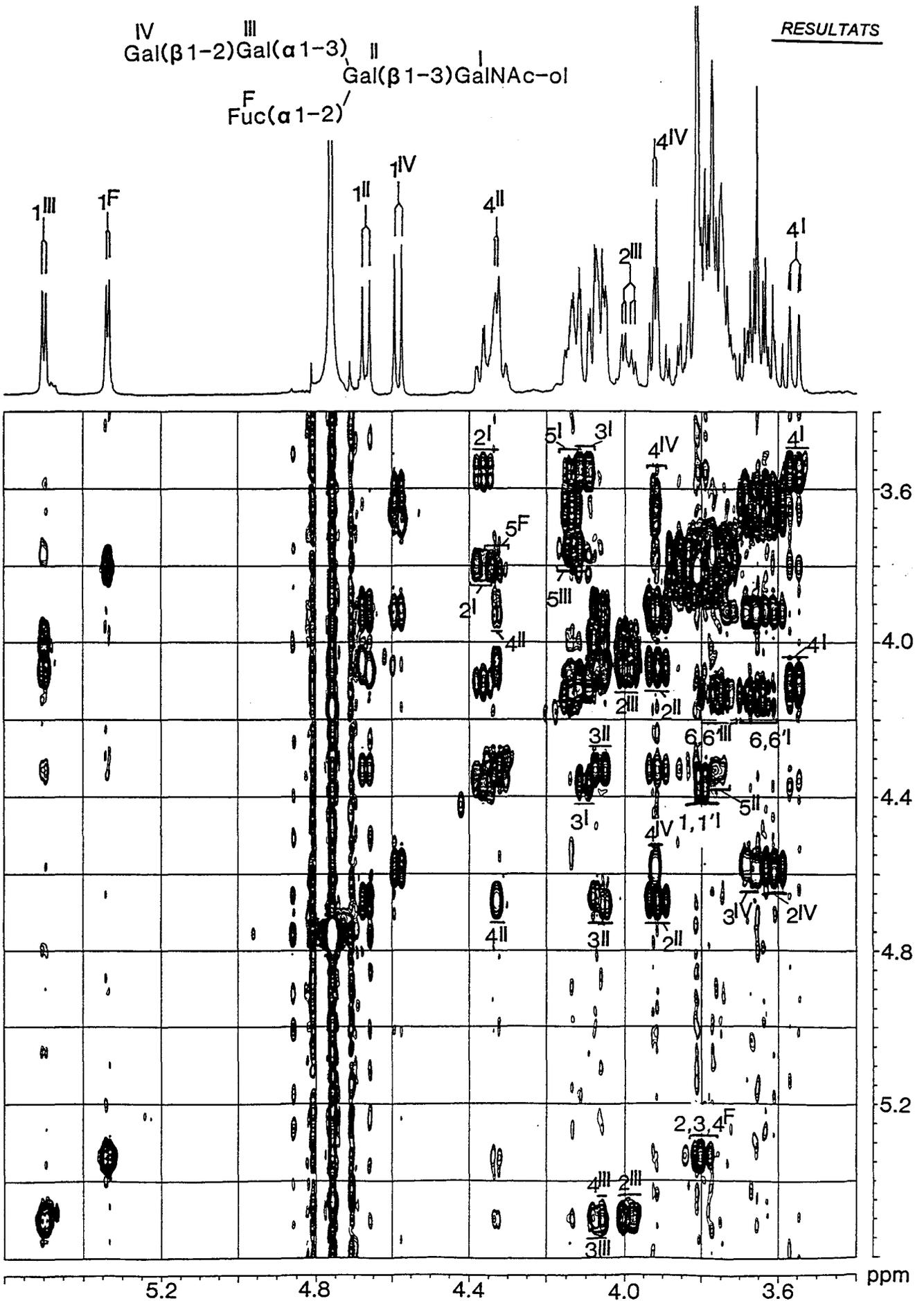


Figure 41: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol N-II-6d.

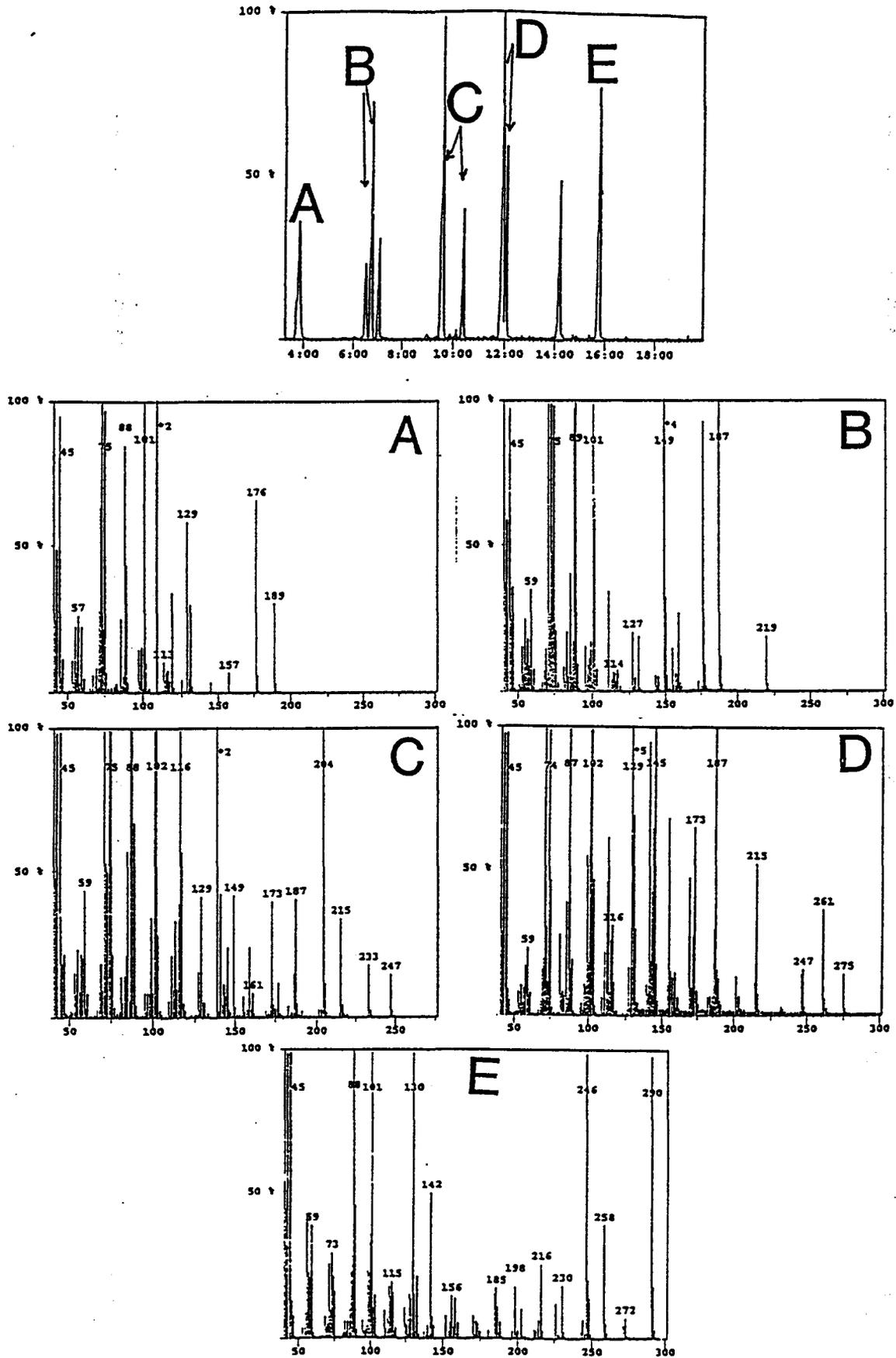


Figure 42: Spectres GC/MS après méthylation de l'oligosaccharide alditol N-II-6d.

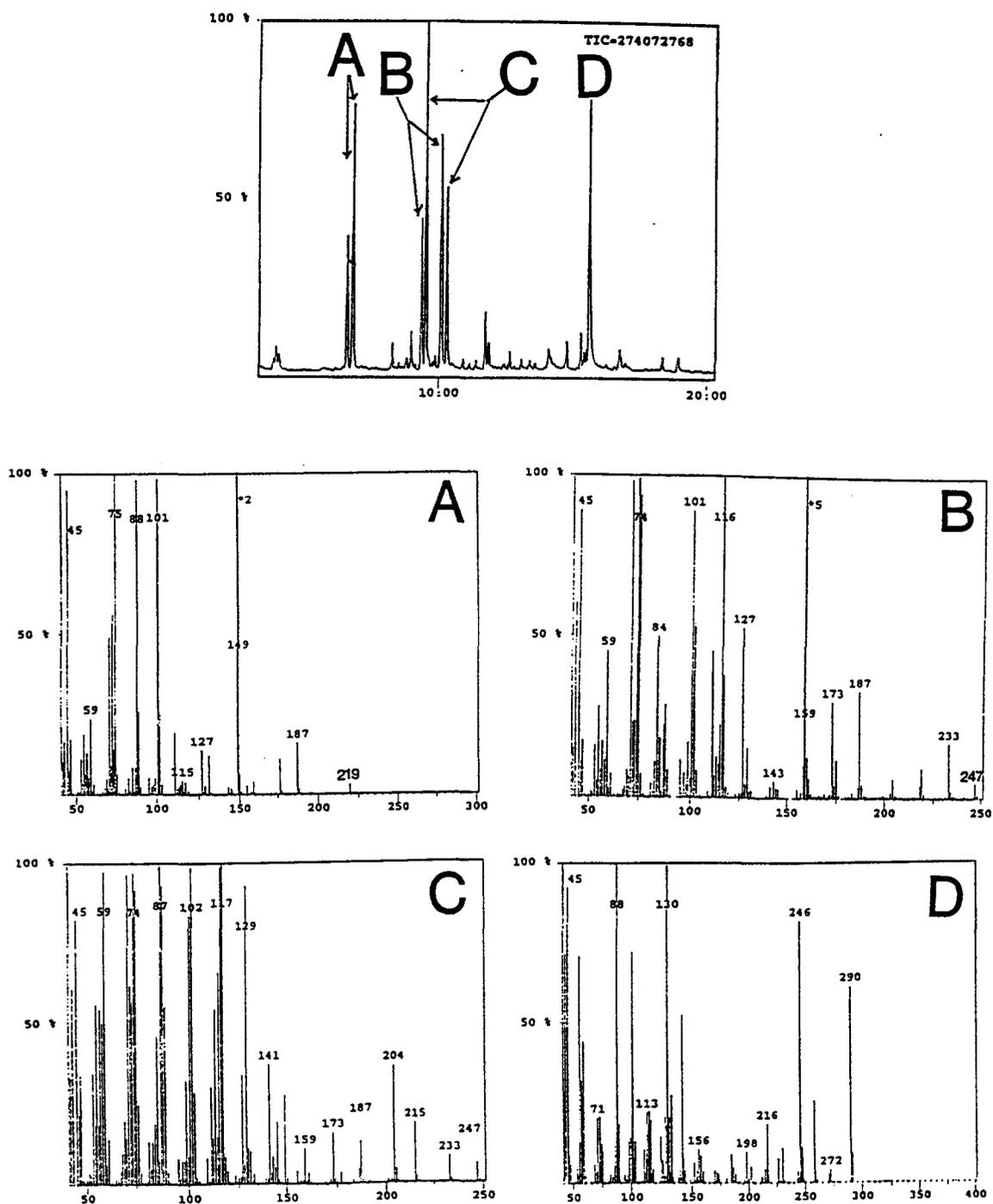
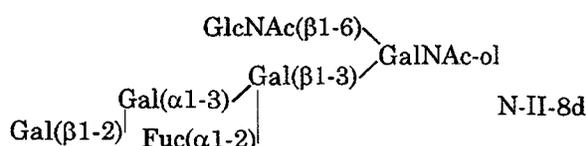


Figure 43: Spectres GC/MS après défucosylation et méthylation de l'oligosaccharide alditol N-II-6d.

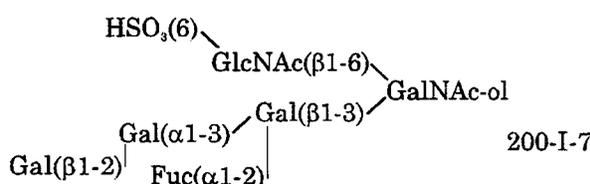
L'oligosaccharide N-II-8d possède une unité de N-acétylglucosamine supplémentaire, comme le prouve la présence des signaux (figure 44) à  $\delta = 4,565$  ppm (H-1, doublet), 3,717 ppm (H-2, triplet), 3,540 ppm (H-3, triplet), 3,44 ppm (H-4, triplet) et 2,062 ppm (acétamido). Les déplacements chimiques des protons H-6 et H-6' de GalNAc-ol, observés à  $\delta = 3,930$  et 3,713 ppm prouvent une substitution par une unité de N-acétylglucosamine. Les autres paramètres RMN relatifs aux unités Gal II, Gal III et Fucose demeurent inchangées, démontrant ainsi que l'oligosaccharide N-II-8d est une extension de N-II-6d par une N-acétylglucosamine liée en C-6 sur le N-acétylgalactosaminitol:



L'analyse MALDI-TOF du composé 200-I-7 fournit un ion pseudomoléculaire à  $[M-H]^- = 1137$ , caractéristique de la composition molaire: 1 HexNAc, 3 Gal, 1 Fuc, 1 GalNAc et 1 sulfate.

La sulfatation de l'unité GlcNAc II' est vérifiée sur le spectre COSY (figure 45) par l'observation des signaux relatifs aux protons H-6 et H-6', à  $\delta = 4,357$  et 4,226 ppm, respectivement.

L'ensemble des autres paramètres RMN sont identiques à ceux décrits pour l'oligosaccharide N-II-8d, conduisant à proposer la séquence suivante:



La comparaison des spectres RMN de 200-I-7 et 100-6 (figure 46) montre la présence d'un nouveau proton anomère ( $\delta_{H-1} = 4,992$  ppm;  $J_{1,2} = 2.5$  H-2) et d'un groupement méthyl ( $\delta = 1,163$  ppm) qui témoignent de la présence d'une unité de Fuc liée en  $\alpha 1,3$  sur l'unité GlcNAc II'.

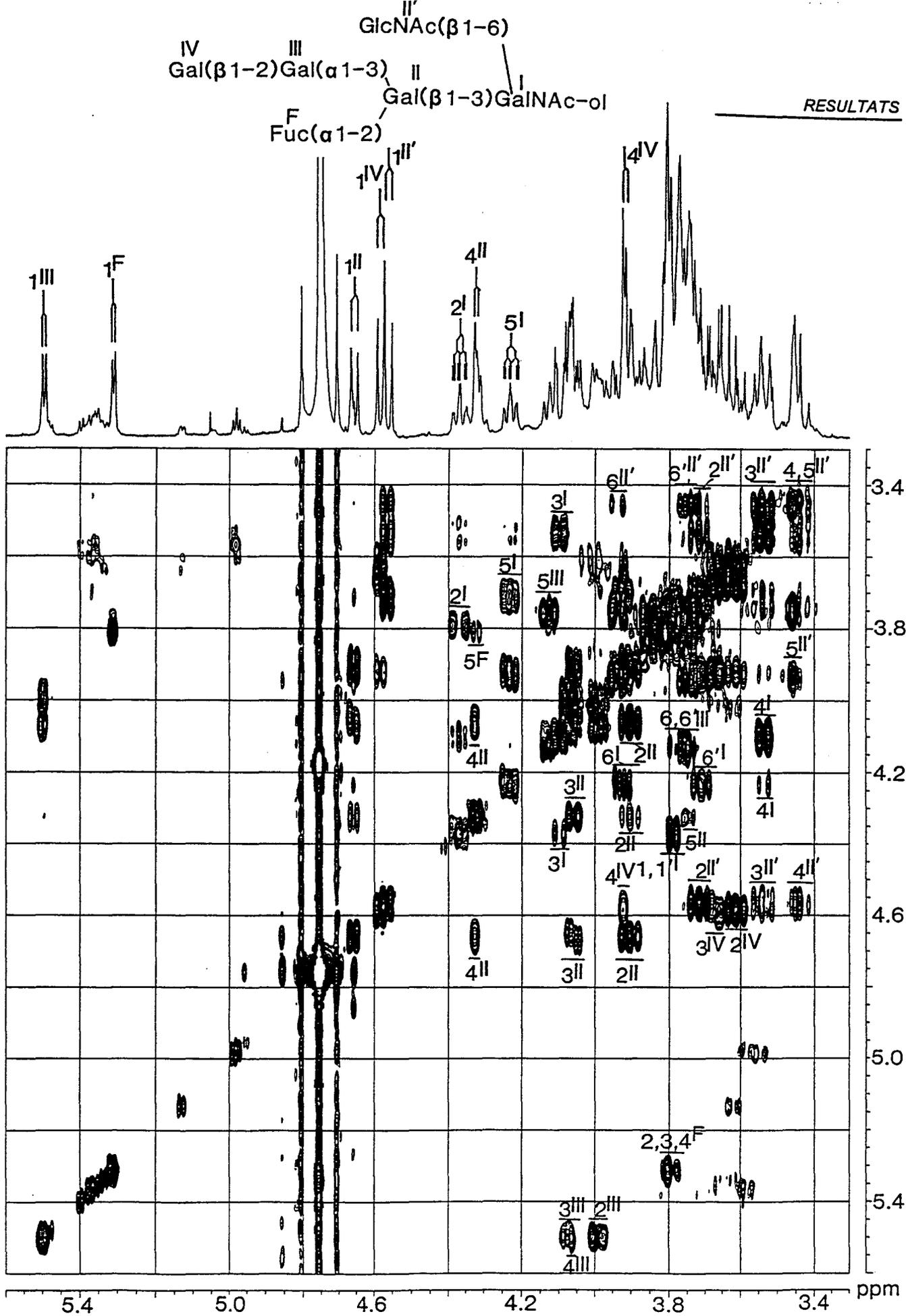


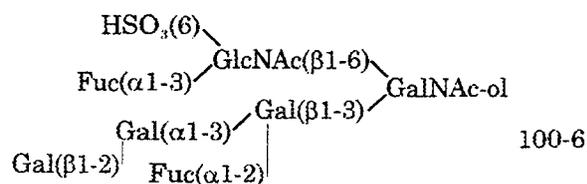
Figure 44: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol N-II-8d.





Les paramètres RMN de ce fucose ont été souvent observés à de nombreuses reprises et sont remarquablement stables d'un oligosaccharide à l'autre (Maes et al. 1997,a).

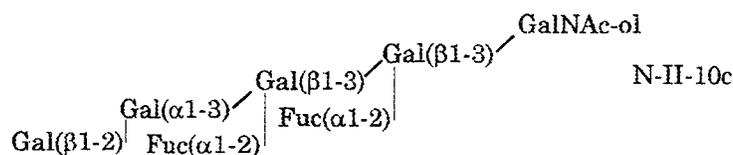
La structure de l'oligosaccharide 100-6 est donc la suivante:



Le spectre COSY double relai de l'oligosaccharide N-II-10c (figure 47) montre la présence de 2 unités de fucose, 3 unités de  $\beta$ -galactose, d'une unité  $\alpha$ -Gal et d'une unité de N-acétylgalactosaminitol. Le déplacement chimique du proton anomère de Gal III, à  $\delta = 4,908$  ppm est caractéristique de la séquence  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Gal}\beta 1$  (Strecker et al. 1995).

Les paramètres de l'unité Gal V sont identiques à ceux du galactose terminal lié en  $\beta 1-2$  sur l' $\alpha$ -galactose de l'épitope B, décrit plus haut.

Sur la base de ces données RMN, la structure de l'oligosaccharide N-II-10c peut être établie comme suit:



Afin de vérifier cette séquence, nous avons en outre analysé les éthers méthyliques résultants du cycle méthylation-méthanolyse-acétylation du composé natif et défucosylé.

Les produits obtenus ont été les suivants:

➤ Oligosaccharide natif (figure 48):



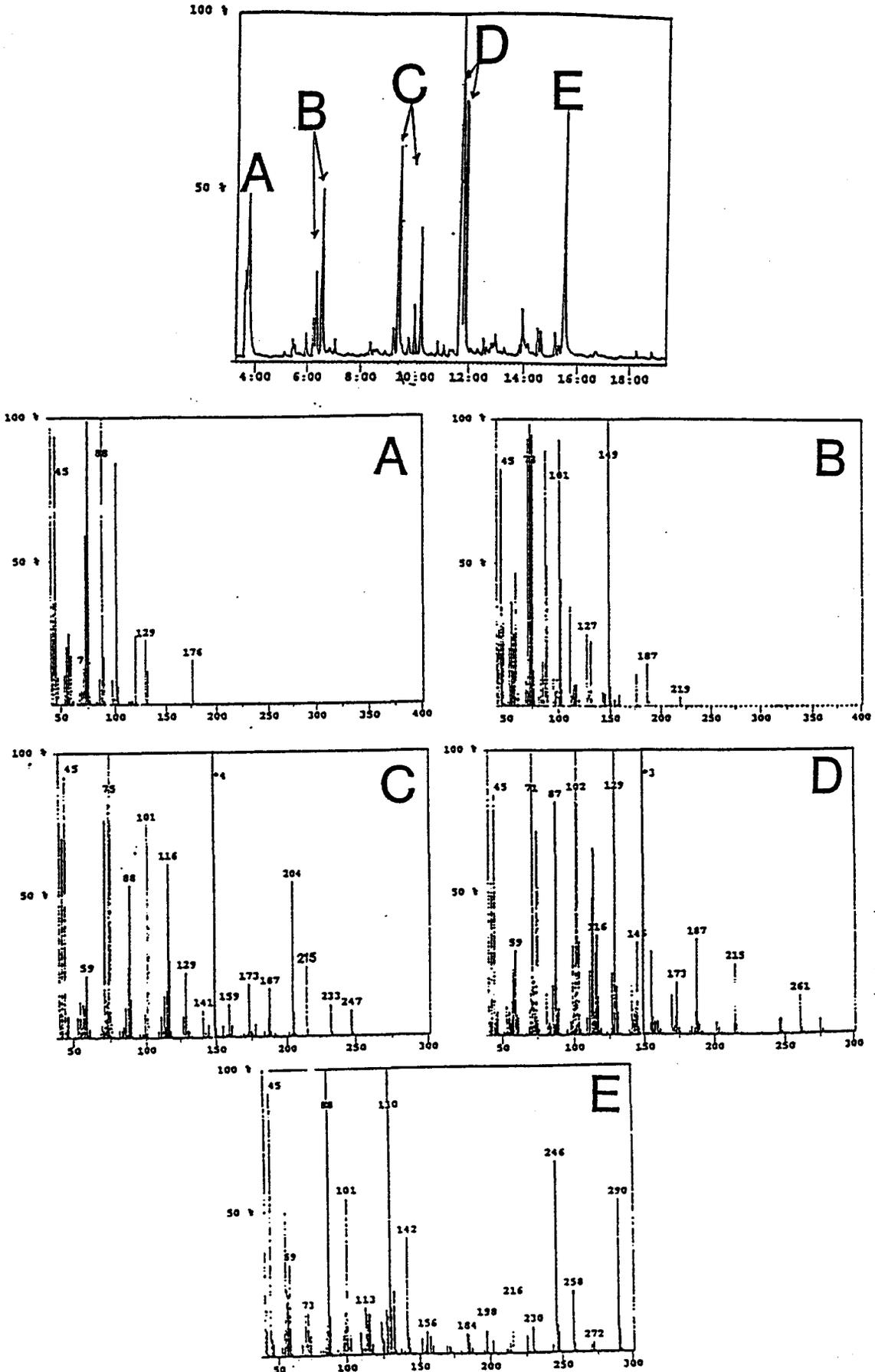


Figure 48: Spectres GC/MS après méthylation de l'oligosaccharide N-II-10c.

- \* méthyl-2,3,4-tri-O-méthylfucoside
- \* méthyl-2,3,4,6-tetra-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-2,3-di-acétyl, 4,6 di-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-2-O-acétyl,3,4,6,-tri-O-méthylgalactoside
- \* 3-O-acétyl,1,4,5,6-tetra-O-méthyl-N-acétyl (méthyl)galactosaminitol.

➤ Oligosaccharide défucosylé:

- \* méthyl-2,3,4,6-tetra-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-3-O-acétyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-2-O-acétyl-3,4,6-tri-O-méthylgalactoside
- \* 3-O-acétyl,1,4,5,6-tetra-O-méthyl-N-acétyl(méthyl)galactosaminitol.

La séquence de cet oligosaccharide a également été confirmée par étude des contacts nOe (figure 47):

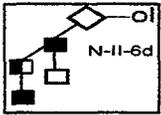
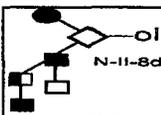
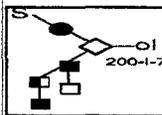
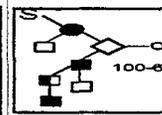
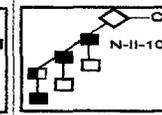
- H-1 Gal V → H-1, H-2, H-3 Gal IV (liaison 1,2)
- H-1 Fuc III → H-2 Gal III (liaison 1,2)
- H-1 Gal III → H-2, H-3, H-4 Gal II
- H-1 Gal II → H-3 GalNAc-ol I.

La structure de l'oligosaccharide N-II-10c a pu donc aussi être confirmée grâce à ces deux expérimentations complémentaires.

Une étude par modélisation moléculaire a été effectuée sur l'oligosaccharide N-II-10c (Viviane DURIER et Gérard VERGOTEN). L'une des conformations d'énergie minimale est représentée dans la figure 49. Les distances interatomiques sont reportées ci-après.

A l'exception de la distance H-1 Fuc(II)/H-5 Fuc(III), qui est alors de 5,6 Å, l'ensemble de ces paramètres confirme l'attribution des effets nOe observés. Toutefois,

Tableau 3: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides N-II-6d, N-II-8d, 200-I-7, 100-6 et N-II-10c:

						
GalNAc-ol (I)	H-1,1'	3,79	3,79	3,778	3,79	3,75
	H-2	4,363	4,367	4,354	4,378	4,302
	H-3	4,104	4,097	4,080	4,101	4,064
	H-4	3,555	3,534	3,559	3,560	3,623
	H-5	4,133	4,217	4,195	4,20	4,236
	H-6	3,68	3,930	3,927	3,933	3,80
	H-6'	3,63	3,713	3,685	3,699	3,78
NAc	2,049	2,055	2,053	2,054	2,047	
Gal( $\beta$ 1-3) (II)	H-1	4,669	4,656	4,673	4,668	4,695
	H-2	3,911	3,900	3,905	3,914	3,795
	H-3	4,060	4,057	4,048	4,056	4,185
	H-4	4,327	4,324	4,312	4,320	4,028
	H-5	3,763	3,743	3,743	N.D.	N.D.
Gal( $\alpha$ 1-3) (III, IV)	H-1	5,498	5,507	5,495	5,495	5,471
	H-2	3,995	3,993	3,974	3,986	3,977
	H-3	4,079	4,085	4,063	4,085	4,052
	H-4	4,055	4,061	4,073	4,065	4,038
	H-5	4,121	4,131	4,135	4,145	4,076
	H-6	3,79	3,78	3,775	3,75	3,65
GlcNAc( $\beta$ 1-6) (II')	H-1		4,565	4,591	4,504	
	H-2		3,717	3,725	3,850	
	H-3		3,540	3,546	N.D.	
	H-4		3,44	3,504	N.D.	
	H-5		3,45	3,682	3,703	
	H-6		3,937	4,357	4,365	
	H-6'		3,754	4,226	4,250	
NAc		2,062	2,062	2,046		
Fuc( $\alpha$ 1-2) (F <sup>2</sup> II)	H-1	5,337	5,311	5,323	5,323	5,383
	H-2	3,79	3,78	3,778	3,79	3,773
	H-3	3,80	3,78	3,778	N.D.	3,851
	H-4	3,82	3,82	3,778	3,80	3,805
	H-5	4,327	4,315	4,199	4,074	4,294
	CH <sub>3</sub>	1,237	1,235	1,233	1,235	1,230
Gal( $\beta$ 1-2) (IV,V)	H-1	4,583	4,582	4,581		4,696
	H-2	3,612	3,610	3,616		3,628
	H-3	3,670	3,667	3,599		3,665
	H-4	3,916	3,920	3,908		3,921

Fuc( $\alpha$ 1-3) (F <sup>3</sup> )	H-1			4.992	
	H-2			3.688	
	H-4			3.82	
	H-5			4.074	
	CH <sub>3</sub>			1.163	
Gal( $\beta$ 1-3) (III)	H-1				4.908
	H-2				3.993
	H-3				4.023
	H-4				4.337
	H-5				3.694
Fuc( $\alpha$ 1-2) (F <sup>2</sup> III)	H-1				5.337
	H-2				3.790
	H-3				3.715
	H-4				3.833
	H-5				4.417
	CH <sub>3</sub>				1.194

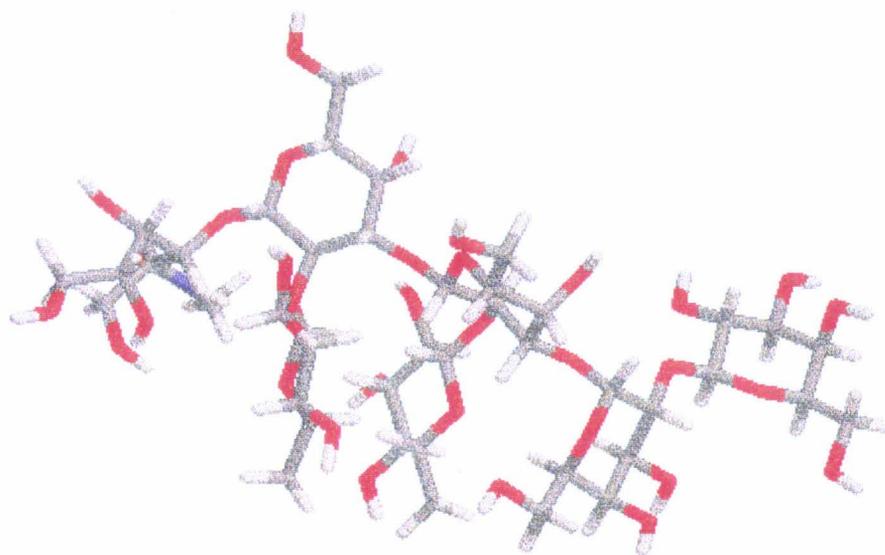


Figure 49: Représentation par modélisation moléculaire d'une conformation dans l'espace de l'oligosaccharide N-II-10c.

L'étude de la conformation de cet oligosaccharide devra être réalisée en tenant compte de sa solvation. Le noyau Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal a été observé à de nombreuses reprises chez différentes espèces (*Bufo bufo*, *Rana arvalis*, *Bufo viridis*, *xenopus laevis*), mais chaque fois dans un environnement différent: présence d'acide sialique, d' $\alpha$ -1,4galactose, de N-acétylglucosamine. Ces différents modèles fournissent donc l'occasion d'analyser la conformation de molécules fucosylés, susceptibles de posséder des activités biologiques.

Effets nOe	Distance déduite de la modélisation en Å
H-1 Gal II/H-3.GalNAc-ol	2.7
H-1 Gal III/H-2 Gal II	4.4
H-1 Gal III/H-3 Gal II	2.5
H-1 Gal III/H-4 Gal II	3.7
H-1 Gal IV/H-3 Gal III	2.4
H-1 Gal V/H-1 Gal IV	4.4
H-1 Fuc II/H-1 Gal III	2.5
H-1 Fuc III/ H-1 Gal III	2.9
H-1 Fuc II/H-5 Fuc III	5.6
H-1 Fuc III/H-5 Fuc II	3.8

#### IV.B.6. Oligosaccharides alditols possédant la séquence $\text{GlcA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc-ol}$

Les oligosaccharides 100-7, 100-10 et 400-II-3 possèdent la séquence,  $\text{GlcA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc-ol}$ , qui a été établie sur la base de l'analyse des dérivés méthylés de la spectrométrie de masse.

Une étude complète de l'oligosaccharide 100-7 a été réalisée. Une analyse en MALDI-TOF a fournit un ion pseudo-moléculaire  $[\text{M-H}]^-$  à  $m/z$  868, indiquant la composition molaire suivante: 1 acide uronique, 2 galactose, 1 fucose et 1 N-acétylgalactosaminitol.

De l'analyse RMN (figure 50), il ressort immédiatement que cet acide uronique ne peut être de la série galactose sur la base de la forme des signaux H-2, H-3 et H-5. Cependant, ces signaux ne sont pas de véritables triplets (série gluco) et l'analyse du spectre COSY double relai de 100-10 (figure 51) ne permet pas d'étendre les corrélations au-delà du proton H-4, à partir du proton H-2 ( $\delta = 3,429$  ppm). Nous supposons donc que les protons H-4 et H-5 de cet acide uronique possèdent le même glissement chimique et qu'un couplage virtuel fort affecte le signal du proton H-3, observé sous la forme d'un octuplet.

Cet acide uronique a donc été identifié après un cycle de réactions impliquant une perméthylation, une réduction de la fonction carboxyméthylester par  $\text{BD}_4\text{Na}$ , une nouvelle méthylation, une méthanolyse et une acétylation (figure 52). Dans ces conditions, l'analyse GC-MS conduit à l'identification de :

- \* méthyl-2,3,4-tri-O-méthylfucoside
- \* méthyl-2,3,4,6-tetra-O-méthyl-6D<sub>2</sub>-glucoside
- \* méthyl-3-O-acétyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-2,3-di-O-acétyl-4,6-di-méthylgalactoside
- \* 3-O-acétyl-1,4,5,6-tetra-O-méthyl-N-acétyl(méthyl)galactosminitol.



IV  
GalA(β 1-3)  
III  
Gal(β 1-3)  
II  
Gal(β 1-3)  
I  
GalNAc-ol  
Fuc(α 1-2)  
F

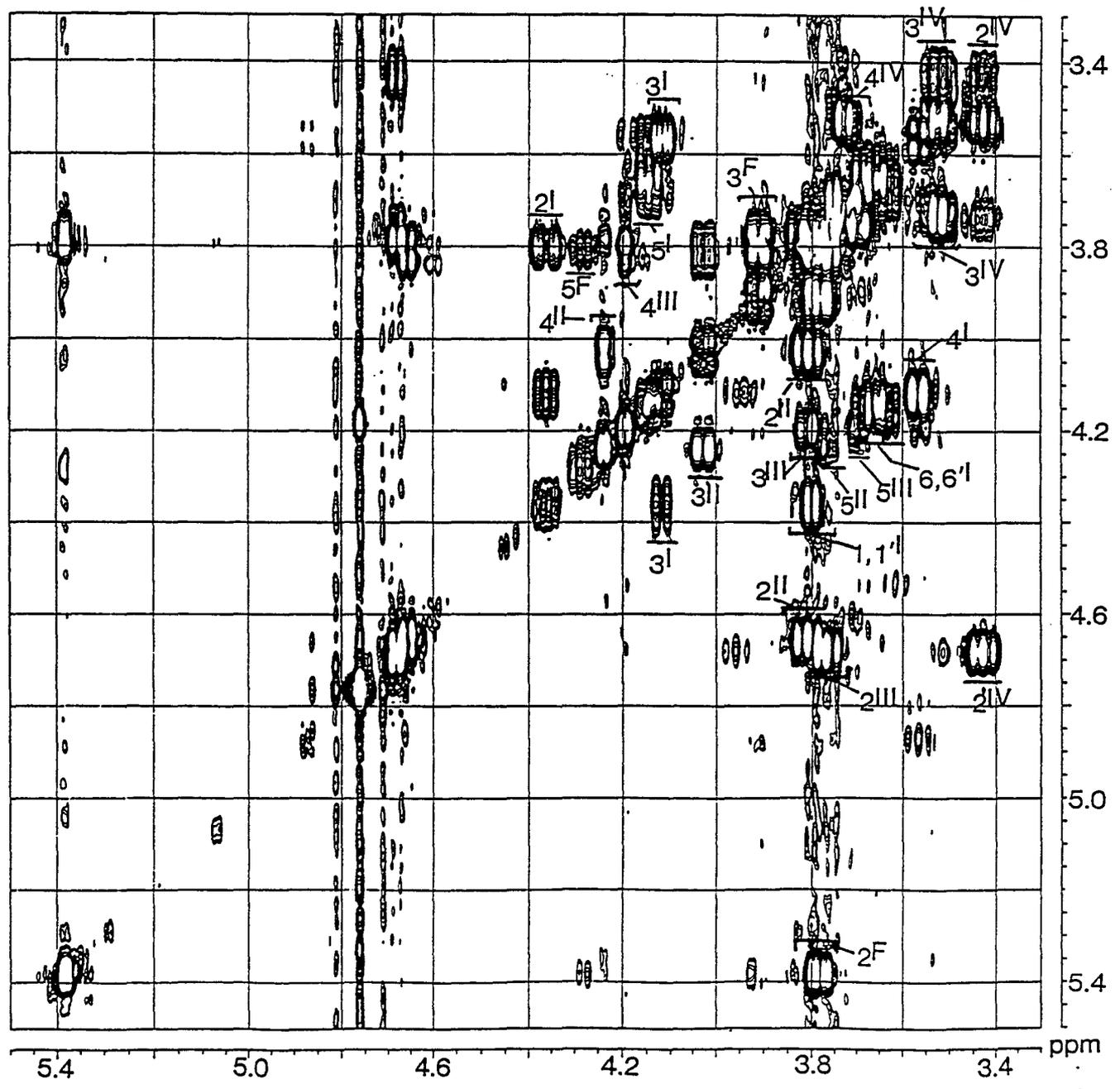
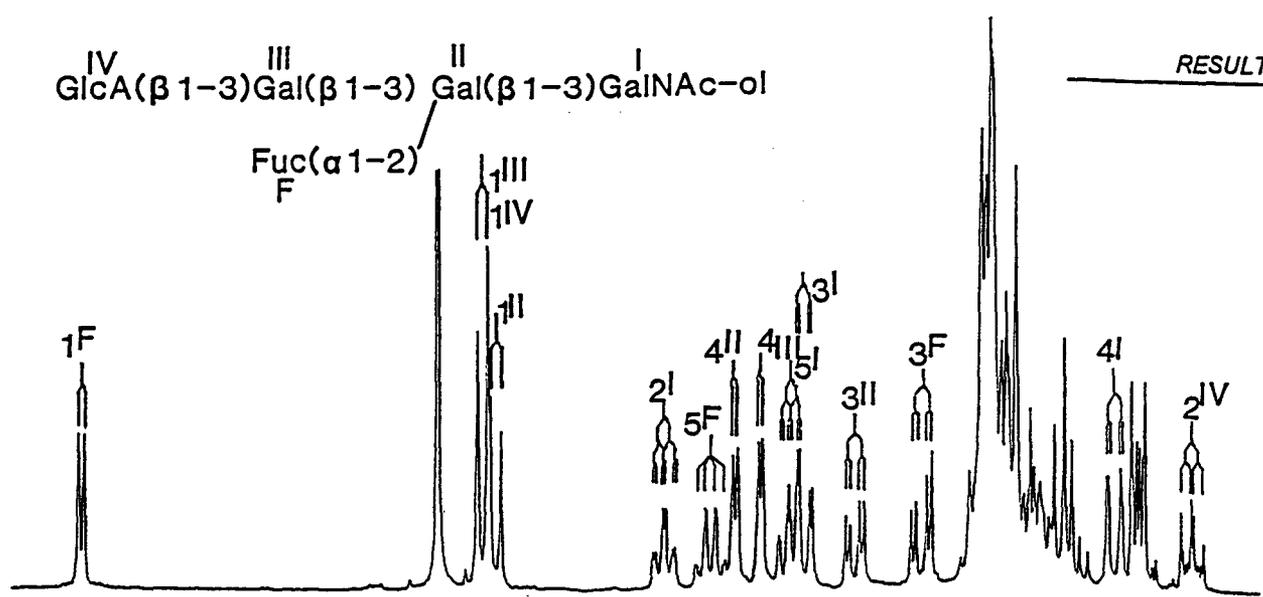


Figure 50: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 100-7.

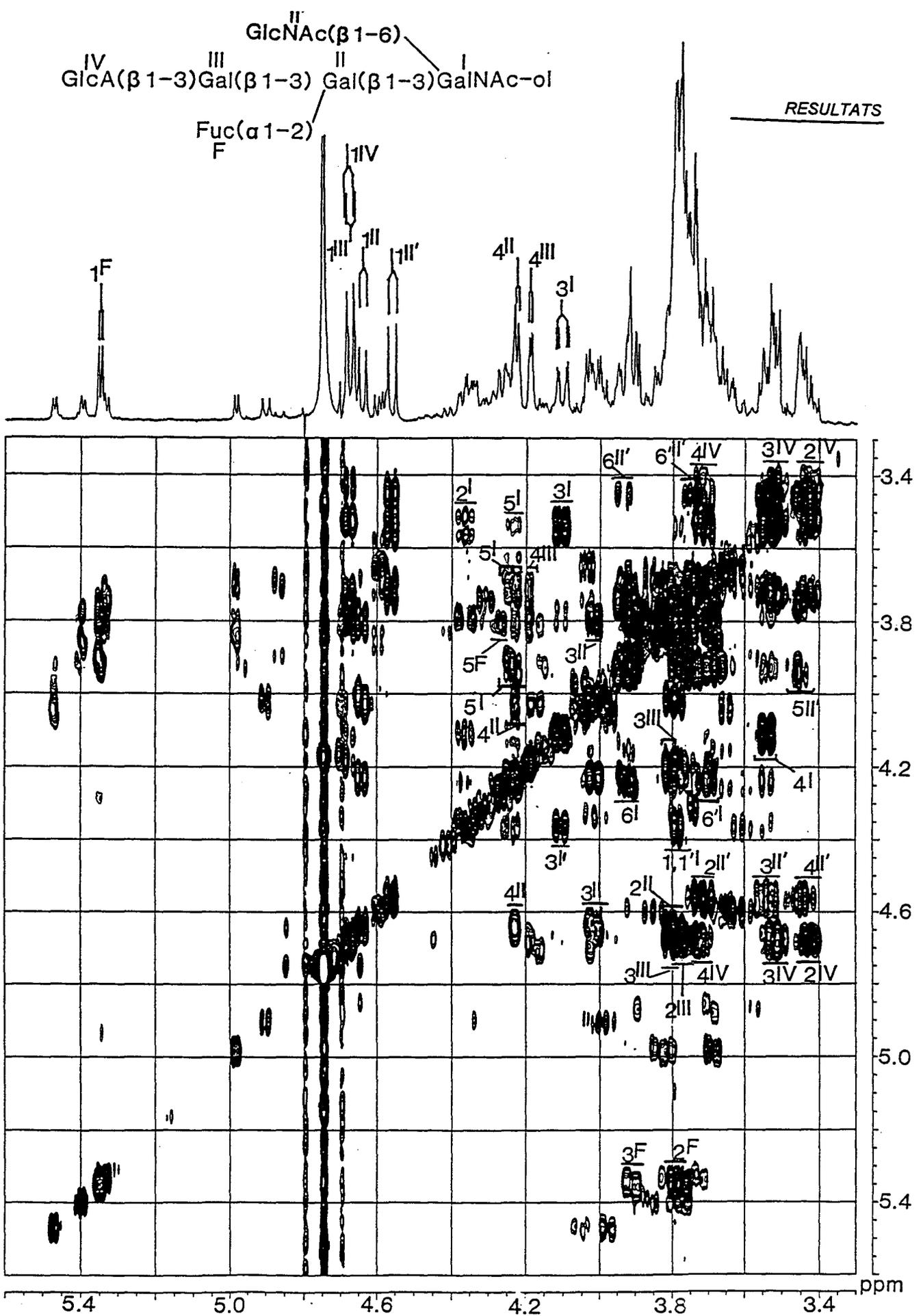


Figure 51: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol 100-10.

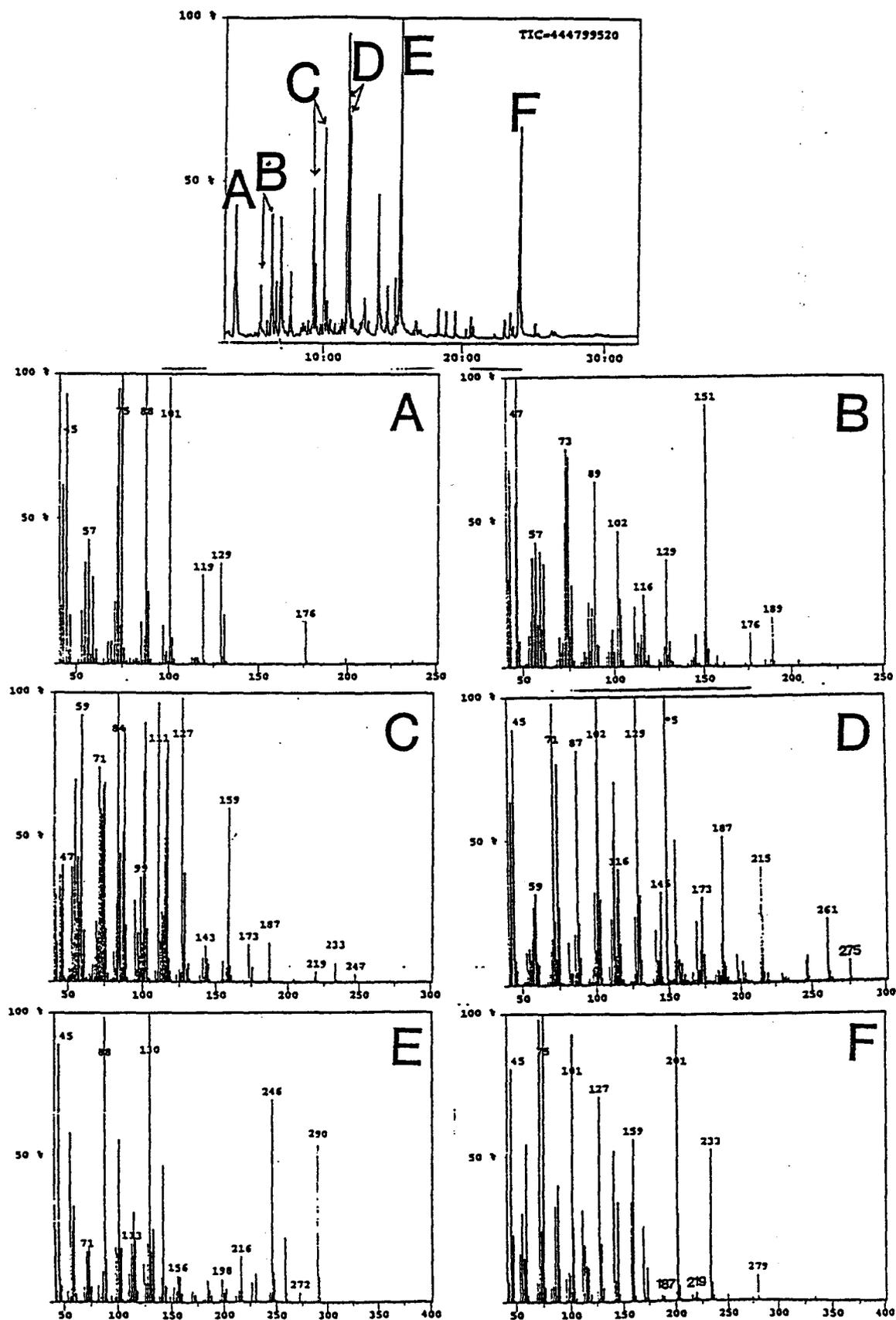


Figure 52: Spectres GC/MS après méthylation de l'oligosaccharide alditol 100-7.



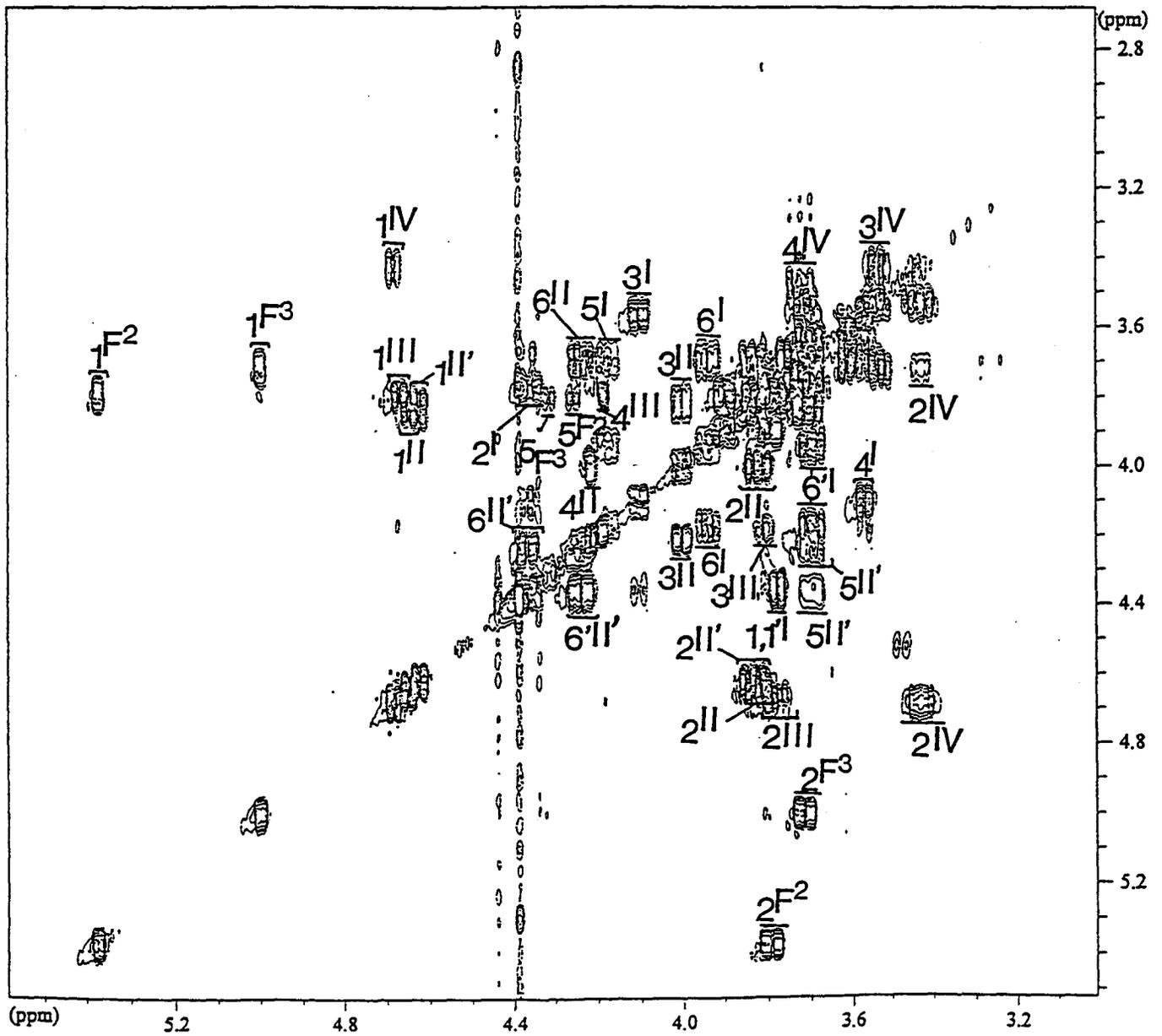
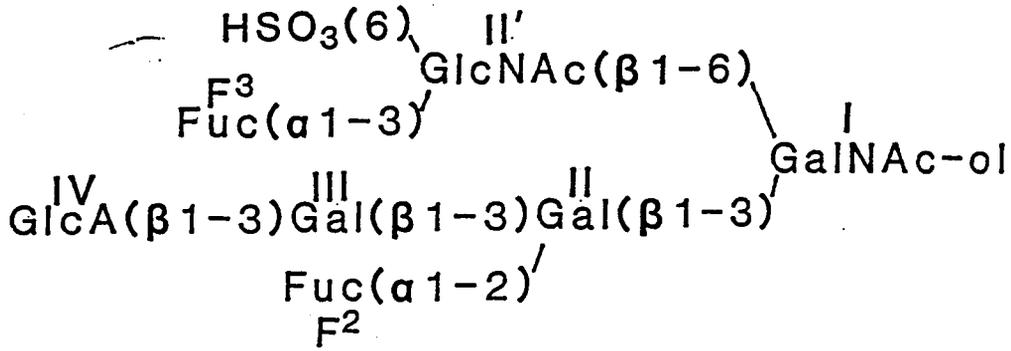
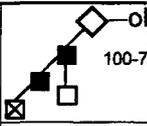
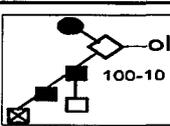
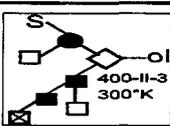


Figure 53: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 400-II-3 (à température 330°k).

Tableau 4: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 100-7et 100-10 (à 300°k); et 400-II-3 (à 330°k):

				
GalNAc-ol (I)	H-1,1'	3.80	3.78	3.78
	H-2	4.360	4.363	4.364
	H-3	4.116	4.107	4.106
	H-4	3.564	3.541	3.567
	H-5	4.146	4.228	4.177
	H-6	3.69	3.928	3.939
	H-6'	3.64	3.715	3.696
	NAc	2.051	2.056	2.054
Gal(β1-3) (II)	H-1	4.652	4.641	4.631
	H-2	3.806	3.798	3.805
	H-3	4.026	4.015	4.003
	H-4	4.238	4.230	4.217
	H-5	3.776	3.76	N.D
Gal(β1-3) (III)	H-1	4.676	4.676	4.667
	H-2	3.767	3.766	3.795
	H-3	3.765	3.807	3.807
	H-4	4.196	4.194	4.196
	H-5	3.701	N.D.	N.D
GlcA(β1-3) (IV)	H-1	4.676	4.674	4.684
	H-2	3.429	3.425	3.428
	H-3	3.526	3.519	3.523
	H-4	3.73	3.724	3.723
	H-5	3.73	3.73	3.73
Fuc(α1-2) (F <sup>2</sup> )	H-1	5.377	5.349	5.373
	H-2	3.782	3.788	3.793
	H-3	3.911	3.911	N.D
	H-4	3.82	3.82	N.D
	H-5	4.279	4.263	4.260
	CH <sub>3</sub>	1.237	1.237	1.243
GlcNAc(β1-6) (II')	H-1		4.561	4.621
	H-2		3.711	3.833
	H-3		3.539	N.D
	H-4		3.443	N.D
	H-5		3.45	3.694
	H-6		3.936	4.364
	H-6'		3.751	4.237
	NAc		2.039	2.039

---

Fuc( $\alpha$ 1-3)	H-1			5.000
	H-2			3.717
	H-5			4.312
	CH <sub>3</sub>			1.162



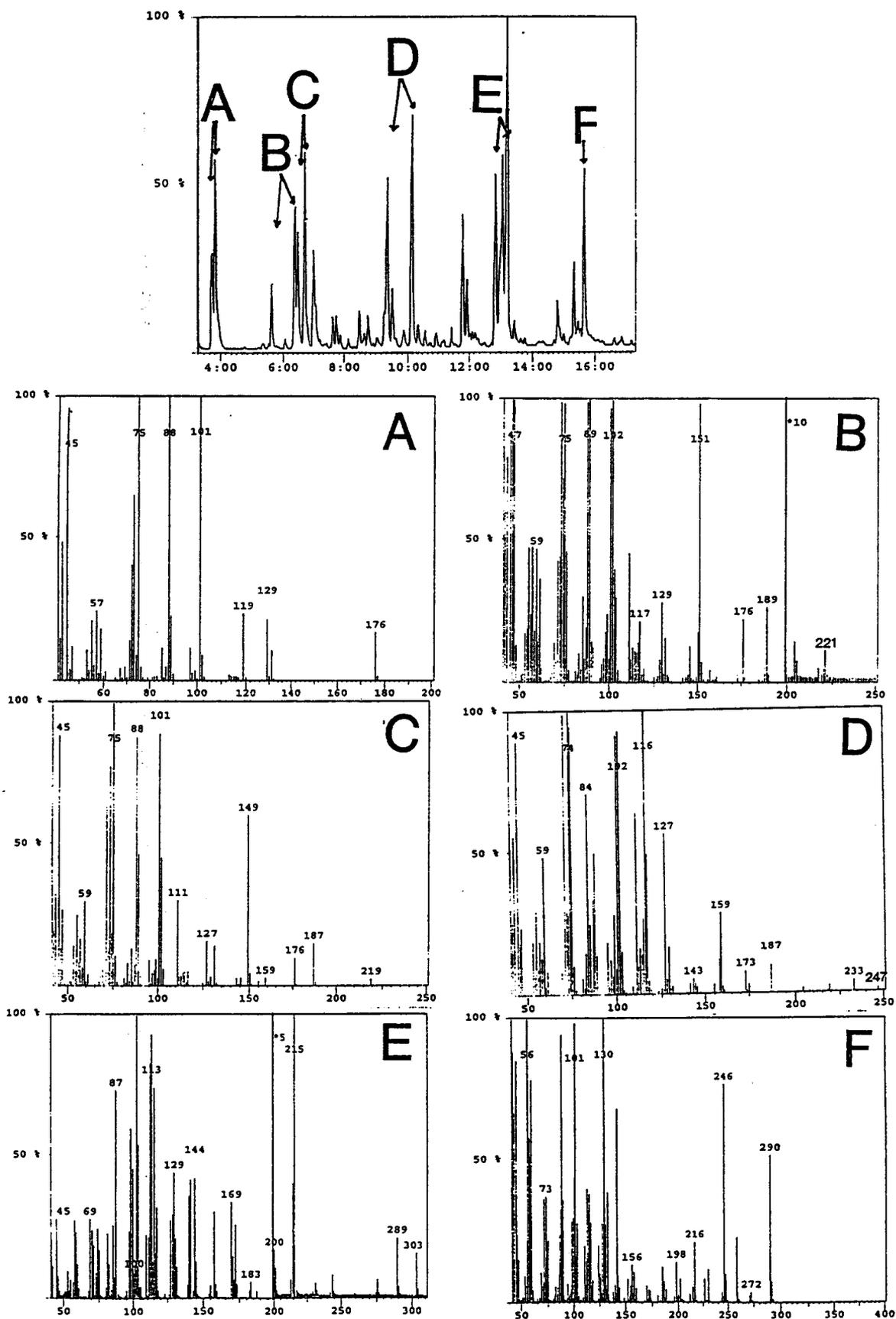
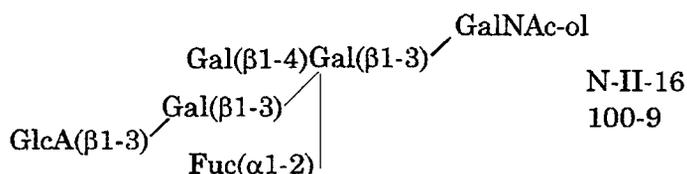


Figure 55: Spectres GC/MS après méthylation de l'oligosaccharides alditol 100-9.

- \* méthyl-2,3,4,6-tetra-O-méthylglucoside 6D<sub>2</sub>
- \* méthyl-2,3,4,6-tetra-O-méthylgalactoside
- \* méthyl-3-O-acétyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactoside
- \* méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-méthylgalactoside
- \* 3-O-acétyl-1,4,5,6-tetra-O-méthyl-N-acétyl(méthyl) galactosaminitol.

De cette analyse, il ressort nettement que l'oligosaccharide 100-9 résulte de l'élongation de 100-7 par une unité de β-galactose liée en C-4 du galactose II:



Les oligosaccharides 100-12, 400-II-4 et 400-II-5 fournissent des spectres RMN voisins (figures 56 et 57), dans lesquels nous notons la présence d'une unité de N-acétylglucosamine supplémentaire, lié en position C-6 du N-acétylgalactosaminitol. Pour 100-12, nous observons (GalNAc-ol: H-6 = 3,72 et H-6' = 3,706 ppm; GlcNAc II': H-1 = 4,547 ppm).

La N-acétylglucosamine du composé 400-II-4 est en outre sulfatée sur son carbone 6 (GlcNAc H-6 = 4,364 et H-6' = 4,234 ppm).

Quant à l'oligosaccharide 400-II-5, une unité de fucose liée en α1,3 sur la N-acétylglucosamine II' est caractérisée par les signaux relatifs aux protons (H-1 = 4,989 et H-6 = 1,164 ppm) de ce résidu fucosyl.

Les oligosaccharides 100-12, 400-II-4 et 400-II-5 possèdent donc les structures suivantes :



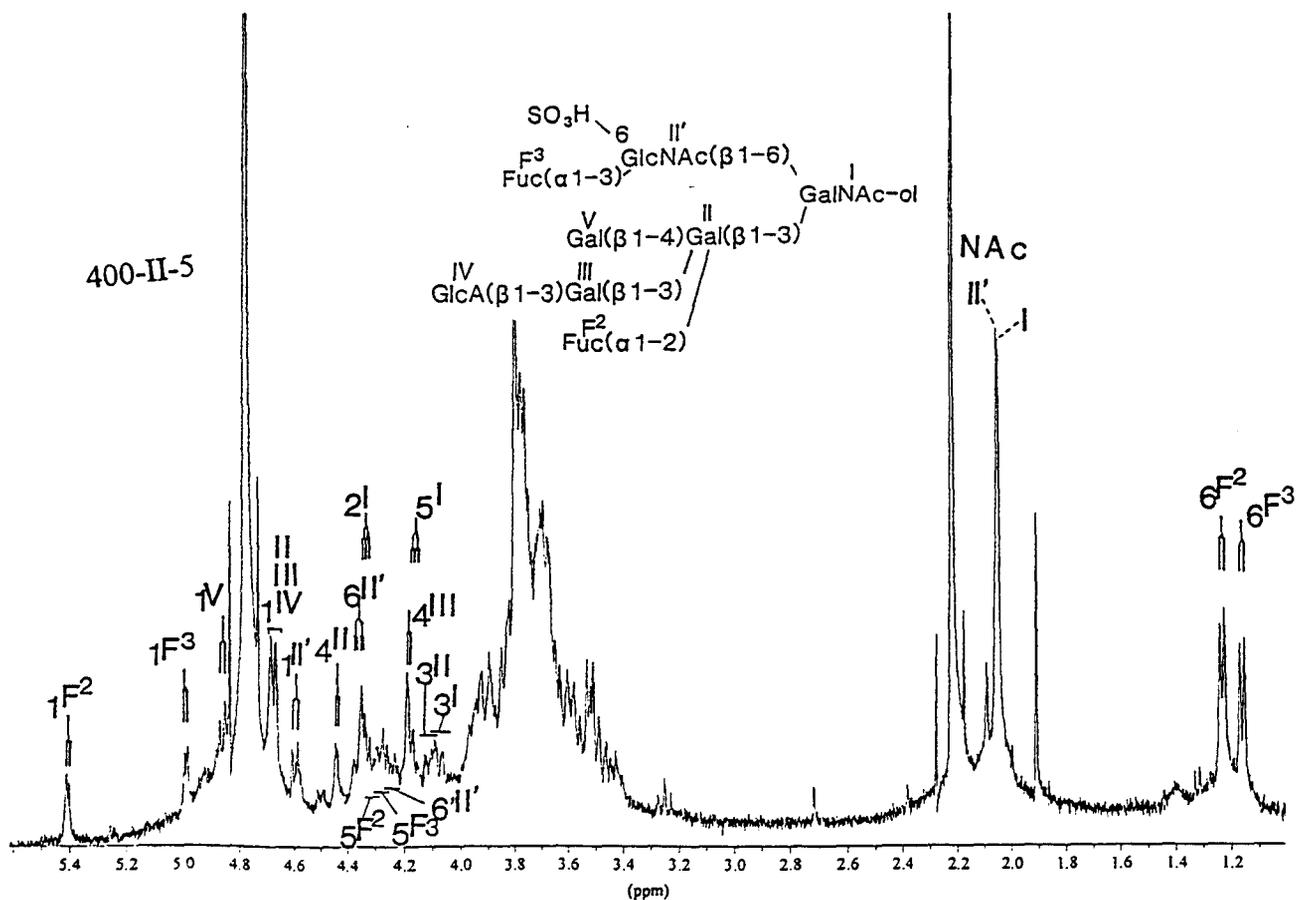
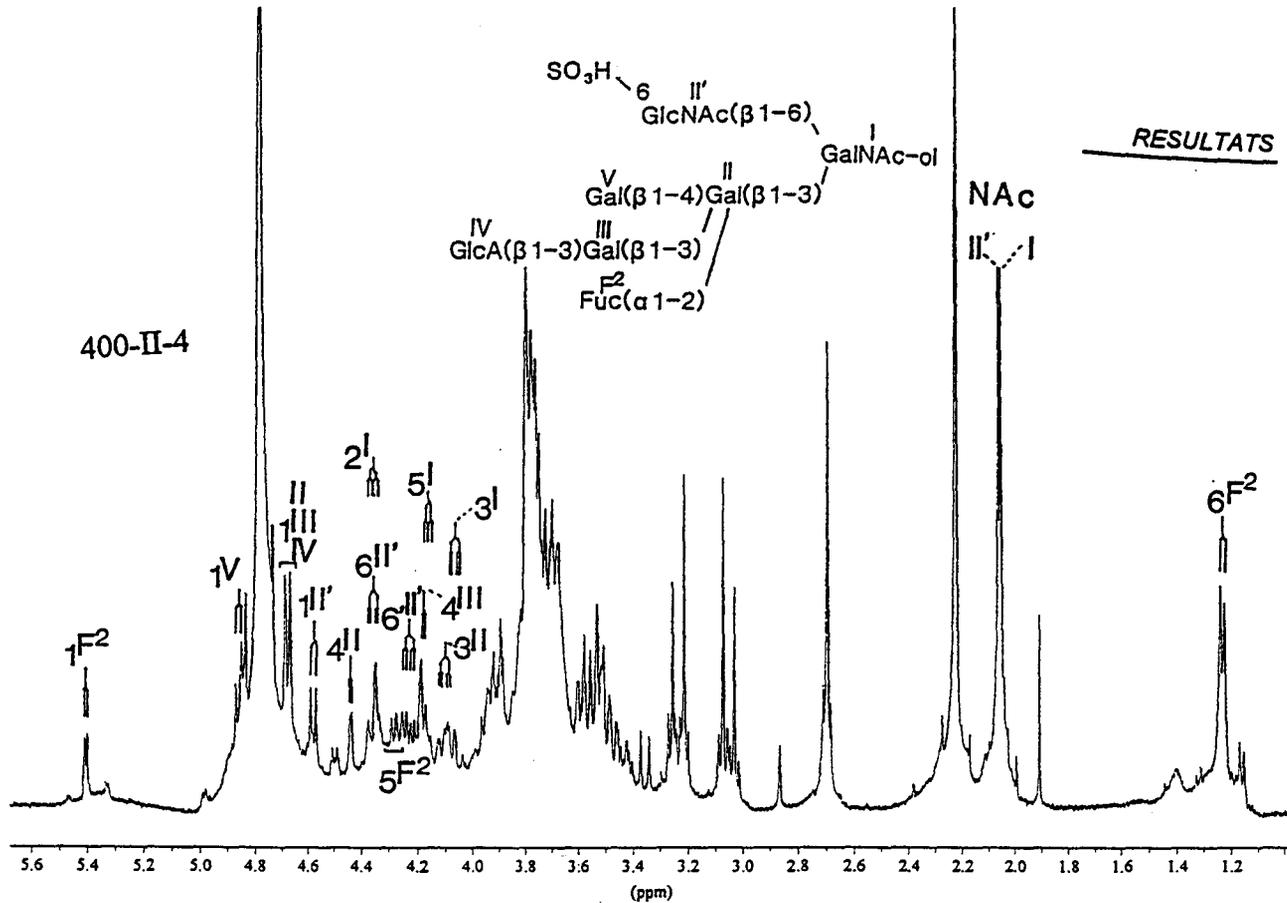
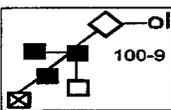
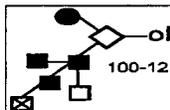
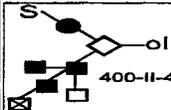
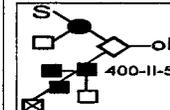
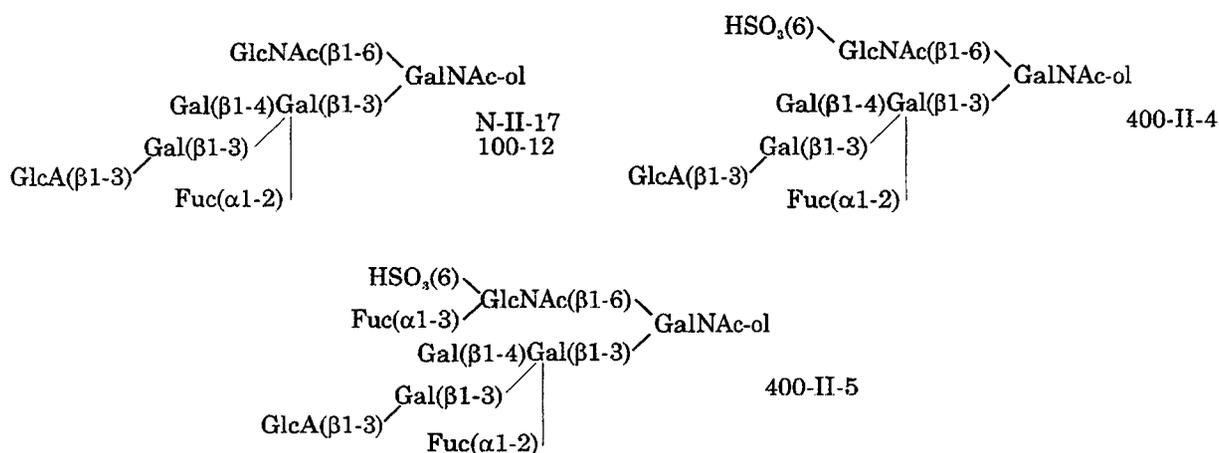


Figure 57: Spectres RMN à une dimension des oligosaccharides alditols 400-II-4 et 400-II-5.

Tableau 5: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 100-9, 100-12, 400-II-4 et 400-II-5:

					
GalNAC-ol (I)	H-1,1'	3.79	3.80	N.D.	N.D.
	H-2	4.363	4.355	4.351	4.344
	H-3	4.092	4.103	4.077	4.077
	H-4	3.560	3.652	N.D.	N.D.
	H-5	4.106	4.241	4.173	4.170
	H-6	3.68	3.72	N.D.	N.D.
	H-6'	3.65	3.706	N.D.	N.D.
	NAC	2.057	2.051	2.054	2.051
Gal( $\beta$ 1-3) (II)	H-1	4.658	4.674	4.681	4.678
	H-2	3.941	3.952	N.D.	N.D.
	H-3	4.111	4.110	4.114	4.115
	H-4	4.442	4.445	4.441	4.443
Gal( $\beta$ 1-3) (III)	H-1	4.680	4.694	4.681	4.678
	H-2	3.77	3.78	N.D.	N.D.
	H-3	3.81	3.81	N.D.	N.D.
	H-4	4.194	4.195	4.190	4.187
	H-5	3.70	N.D.	N.D.	N.D.
GlcA( $\beta$ 1-3) (IV)	H-1	4.682	4.694	4.681	4.678
	H-2	3.434	3.426	N.D.	N.D.
	H-3	3.521	3.519	N.D.	N.D.
	H-4	3.726	3.723	N.D.	N.D.
	H-5	3.72	3.72	N.D.	N.D.
Gal( $\beta$ 1-4) (V)	H-1	4.863	4.866	4.862	4.863
	H-2	3.578	3.565	N.D.	N.D.
	H-3	3.696	3.698	N.D.	N.D.
	H-4	3.895	3.894	N.D.	N.D.
Fuc( $\alpha$ 1-2) (F <sup>2</sup> )	H-1	5.404	5.404	5.407	5.405
	H-2	3.779	3.783	N.D.	N.D.
	H-3	3.926	3.921	N.D.	N.D.
	H-4	3.798	3.790	N.D.	N.D.
	H-5	4.278	4.289	4.286	
	CH <sub>3</sub>	1.235	1.236	1.233	1.234

GlcNAc( $\beta$ 1-6) (II')	H-1		4,547	4,583	4,597
	H-2		3,697	N.D.	N.D.
	H-3		3,535	N.D.	N.D.
	H-4		3,444	N.D.	N.D.
	H-5		3,45	N.D.	N.D.
	H-6		3,948	4,364	4,363
	H-6'		3,756	4,234	4,24
	NAc		2,087	2,063	2,057
Fuc( $\alpha$ 1-3) (F <sup>3</sup> )	H-1				4,989
	CH <sub>3</sub>				1,164



#### IV.B.8. Oligosaccharide alditol 100-11

L'analyse MALDI-TOF de l'oligosaccharide 100-11 fournit un ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z = 1233$ , correspondant à la composition molaire suivante: 1 Fuc, 3 Gal, 1 GlcA, 1 HexNAc et 1 GalNAc-ol.

L'unité de N-acétylhexosamine a été identifiée à l' $\alpha$ -N-acétylgalactosamine, sur la base des constantes de couplage  $J_{1,2}$  à  $J_{4,5}$  qui sont caractéristiques de l'anomère  $\alpha$  d'un sucre de la série galacto.

L'oligosaccharide 100-11 peut donc être considéré comme une extension de 100-9 par une unité  $\alpha$ -GalNAc. Le spectre COSY double relai (figure 58) montre nettement que le carbone 6 de l'unité GalNAc-ol n'est pas substitué, puisque les protons GalNAc-ol H-6 et H-6' possèdent un glissement chimique identique. Une comparaison des spectres COSY des oligosaccharides 100-9 et 100-11 ne montre pas de différence essentielle, à l'exception du déblindage des protons H-2 (+ 0,058 ppm), H-3 (+ 0,067 ppm) et H-4 (+ 0,095 ppm) de l'unité Gal V. Ces déplacements chimiques sont caractéristiques du galactose substitué en C-4 par une unité  $\alpha$ -N-acétylgalactosamine ou  $\alpha$ -N-acétylglucosamine (Maes 1997,b).

Sur la base de ces résultats, la séquence de l'oligosaccharide 100-11 a donc été établie comme suit :

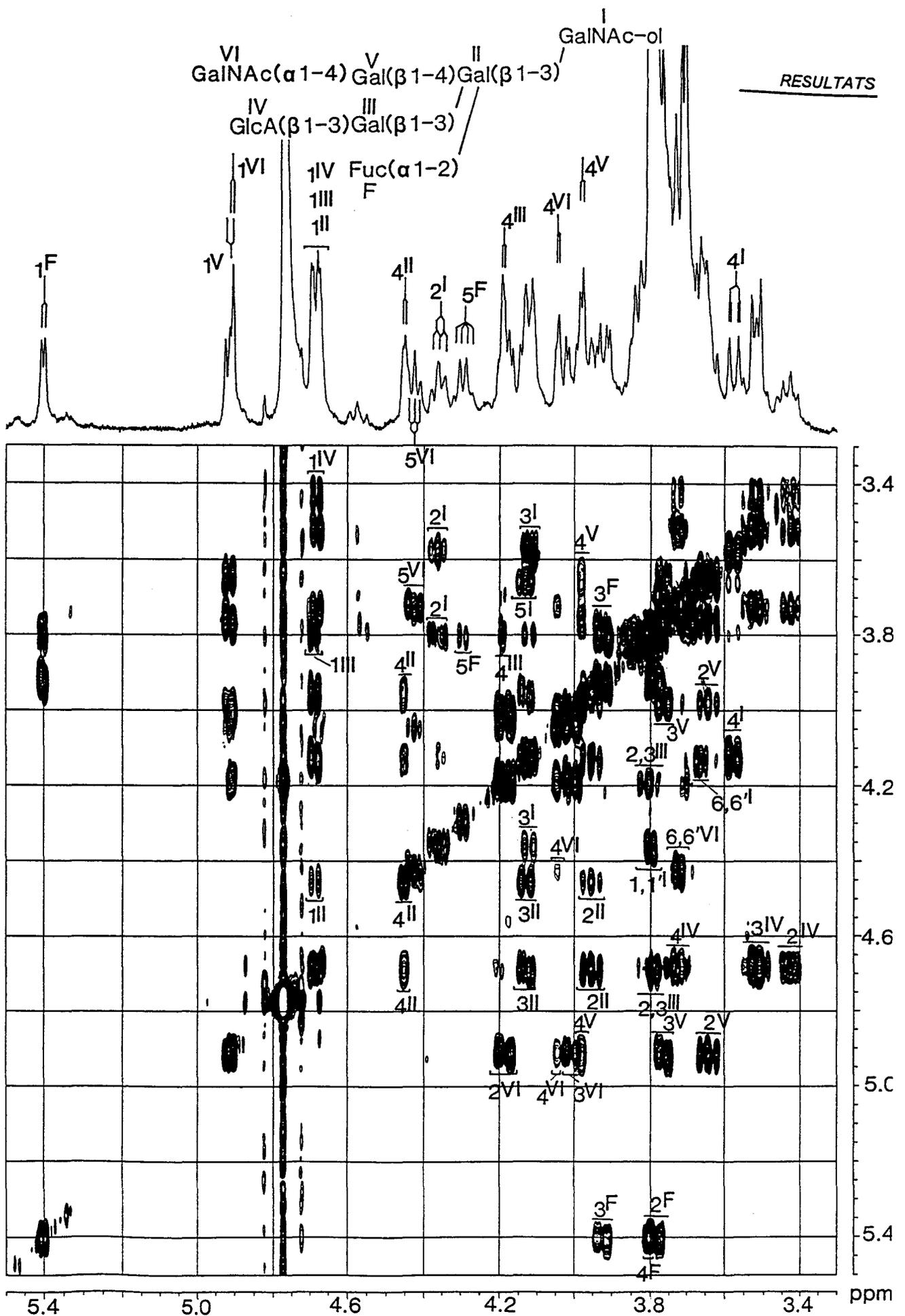
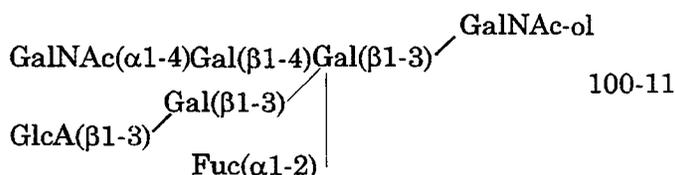


Figure 58: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol 100-11.

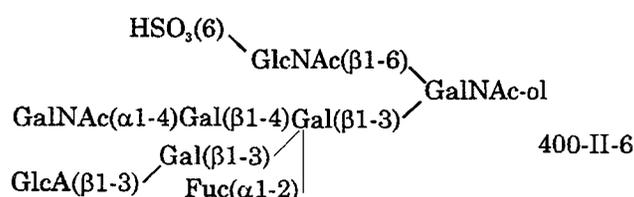


#### IV.B.9. Oligosaccharide alditol 400-II-6

Le spectre RMN de l'oligosaccharide alditol 400-II-6 présente un profil très voisin de celui de 100-11 (figure 59), et les seules différences portent sur la présence d'un proton anomère à  $\delta = 4,583$  ppm (GlcNAc $\beta$ 1-6), de deux quadruplets à 4,366 et 4,227 ppm (H-6 et H-6' de GlcNAc-6-O-sulfate), et sur les paramètres de GalNAc-ol H-3 et H-5 qui sont caractéristiques de GalNAc-ol substitué en C-6 par une unité N-acétylglucosamine.

De ces observations, il est donc possible de considérer l'oligosaccharide 400-II-6 comme le résultat de l'addition de GlcNAc-6-O-sulfate en position C-6 de l'unité GalNAc-ol de 100-11, ou de l'élongation de l'oligosaccharide 400-II-4 par une unité GalNAc liée en  $\alpha$ 1,4 sur le  $\beta$ -galactose V.

Sur la base de ces données, la séquence de l'oligosaccharide 400-II-6 a été établie comme suit:



#### IV.B.10. Oligosaccharide alditol 200-I-B2

Une comparaison des spectres RMN des oligosaccharides 400-II-6 et 200-I-B2 (figures 59 et 60) permet d'observer la présence, pour 200-I-B2, d'une unité Fuc( $\alpha$ 1-3) supplémentaire,

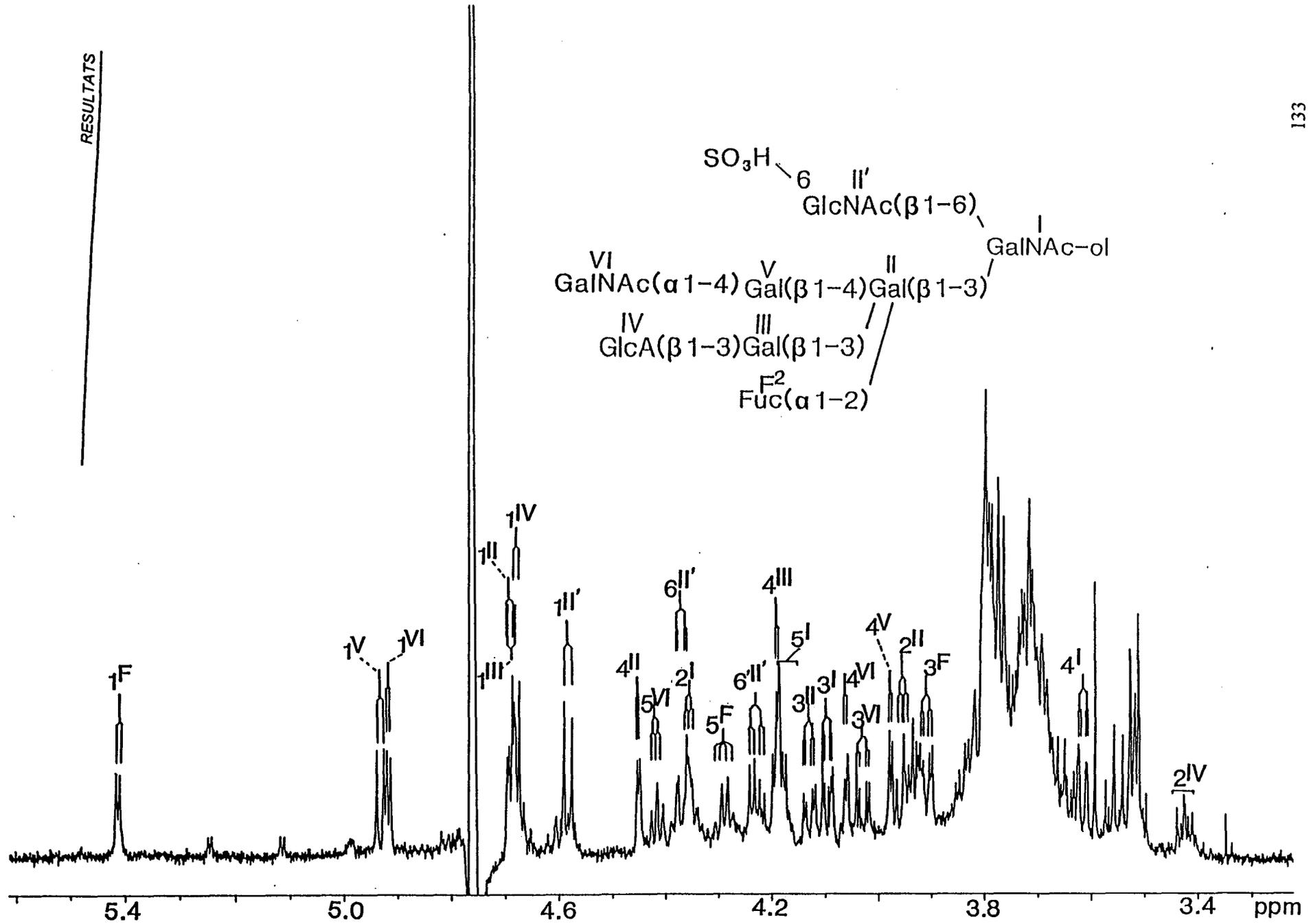


Figure 59: Spectre RMN à une dimension de l'oligosaccharide alditol 400-II-6.

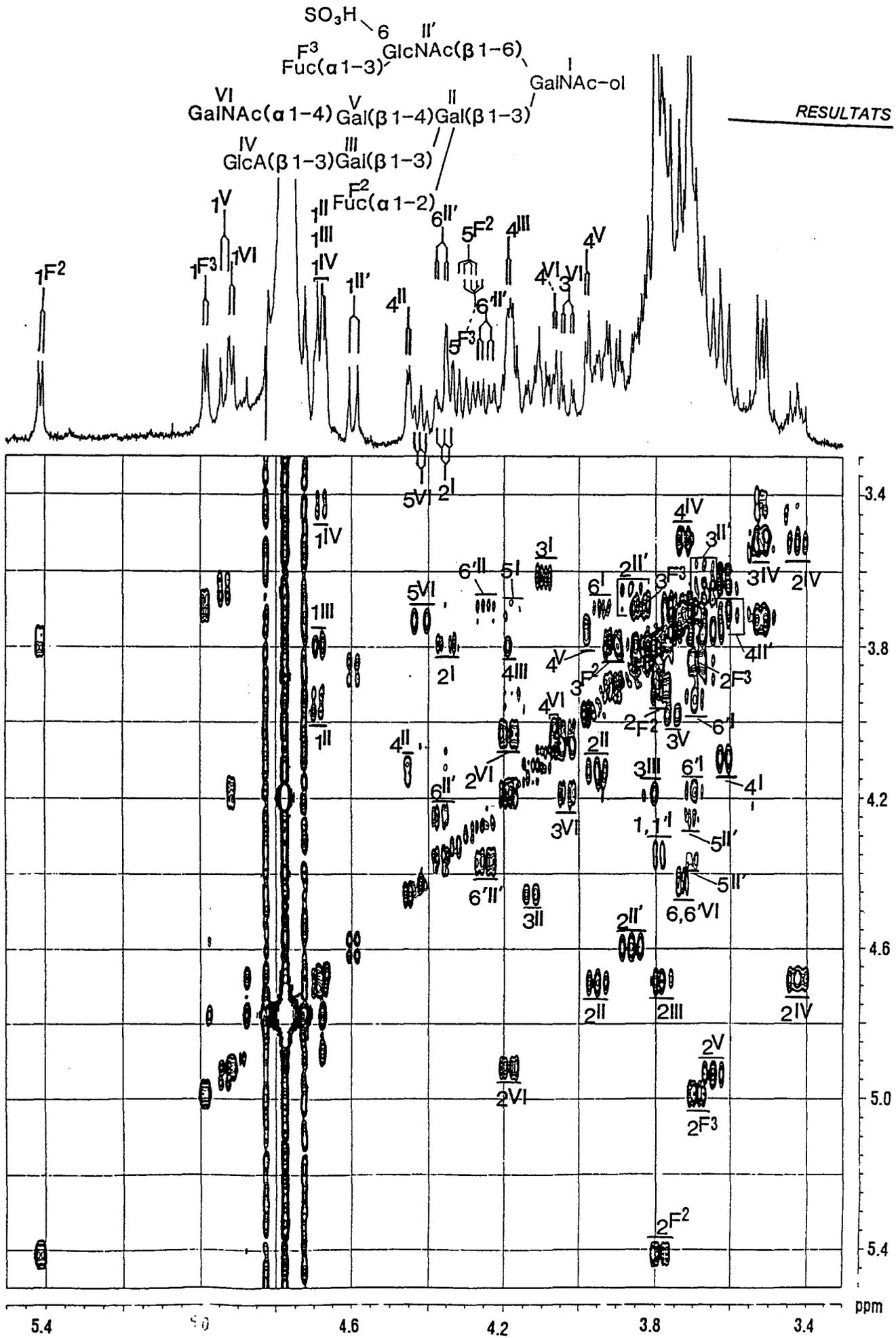
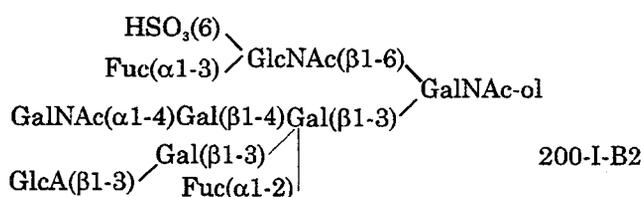


Figure 60: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol 200-I-B2.

dont les principaux paramètres RMN (H-1, H-5 et H-6) sont caractéristiques de la séquence Fuc( $\alpha$ 1-3)GlcNAc.

L'ensemble des autres paramètres RMN demeure inchangé, à l'exception du proton H-1 de l'unité GlcNAc II' dont la résonance est ici observée à  $\delta = 4,594$  ppm au lieu de 4,583 ppm.

Sur la base de ces observations, la structure de l'oligosaccharide 200-I-B2 a été établie comme suit:



#### IV.B.11. Oligosaccharide alditol 100-13

Le spectre RMN de l'oligosaccharide 100-13 (figure 61) doit être comparé avec celui de 100-11 (figure 58).

En effet, nous observons, pour 100-11, un proton anomère supplémentaire ( $\delta$ H-1 = 4,523 ppm) qui correspond à une unité de  $\beta$ -galactose, sur la base de la mesure des constantes de couplage  $J_{1,2}$  à  $J_{4,5}$ . En outre, les glissements chimiques des protons H-2, H-3 et H-4 de ce galactose sont caractéristiques d'un monosaccharide non substitué. L'examen des glissements chimiques des protons H-2, H-3 et H-4 de l'unité  $\alpha$ -GalNAc VI montre un déblindage important du proton H-4 ( $\Delta\delta = + 0,269$  ppm), qui est caractéristique de la séquence Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ -) déjà observée dans les mucines de *Rana palustris* (Maes 1997,b).

Par rapport à l'oligosaccharide 100-11, nous n'observons aucune modification des paramètres RMN . En particulier, les résonances de GalNAc-ol H-6, H-6' à  $\delta = 3,66$  ppm montrent clairement que le carbone C-6 de cette unité monosaccharidique n'est pas substitué.

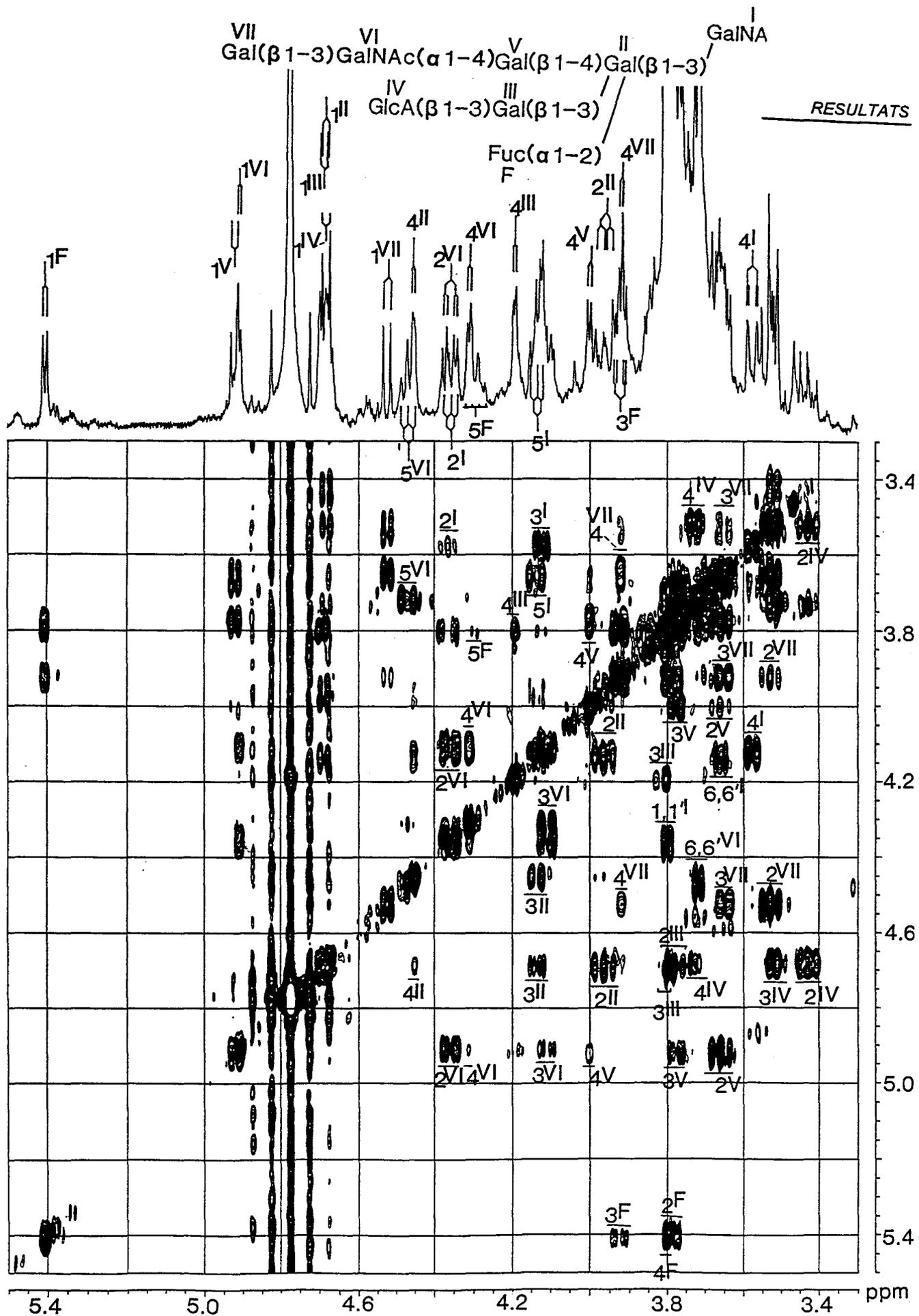
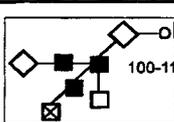
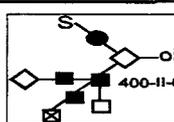
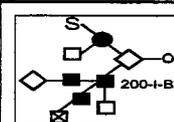


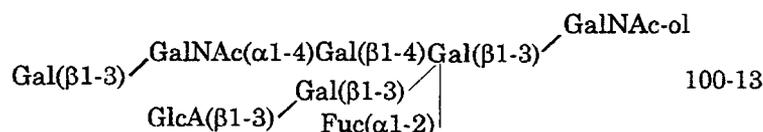
Figure 61: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol 100-13.

Tableau 6: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 100-11, 400-II-6 et 200-I-B2:

				
GalNAc-ol (I)	H-1,1'	3.80	N.D.	3.79
	H-2	4.363	4.361	4.351
	H-3	4.121	4.096	4.094
	H-4	3.574	3.616	3.652
	H-5	4.124	4.189	4.181
	H-6	3.66	N.D.	3.943
	H-6'	3.66	N.D.	3.702
	NAc	2.057	2.058	2.058
Gal(β1-3) (II)	H-1	4.687	4.690	4.692
	H-2	3.955	3.953	3.949
	H-3	4.131	4.130	4.131
	H-4	4.454	4.451	4.452
Gal(β1-3) (III)	H-1	4.685	4.683	4.686
	H-2	3.79	N.D.	3.79
	H-3	3.83	N.D.	3.81
	H-4	4.192	4.187	4.189
GlcA(β1-3) (IV)	H-1	4.68	4.681	4.681
	H-2	3.428	3.426	3.424
	H-3	3.519	N.D.	3.519
	H-4	3.725	N.D.	3.723
	H-5	3.73	N.D.	3.73
Gal(β1-4) (V)	H-1	4.921	4.932	4.936
	H-2	3.636	N.D.	3.646
	H-3	3.763	N.D.	3.756
	H-4	3.980	3.977	3.980
GalNAc(α1-4) (VI)	H-1	4.911	4.916	4.917
	H-2	4.185	N.D.	4.186
	H-3	4.002	4.030	4.030
	H-4	4.046	4.061	4.046
	H-5	4.423	4.416	4.420
	H-6,6'	3.721	N.D.	3.72
	NAc	2.090	2.091	2.092
Fuc(α1-2) (F <sup>2</sup> )	H-1	5.404	5.233	5.411
	H-2	3.784	N.D.	3.783
	H-3	3.924	3.910	3.922
	H-4	3.802	N.D.	3.80
	H-5	4.293	4.288	4.305
	CH <sub>3</sub>	1.241	1.235	1.235

GlcNAc( $\beta$ 1-6) (II')	H-1		4.583	4.594
	H-2		N.D.	3.859
	H-3		N.D.	3.690
	H-4		N.D.	3.590
	H-5		N.D.	3.699
	H-6		4.366	4.367
	H-6'		4.227	4.245
	NAc		2.061	2.043
Fuc( $\alpha$ 1-3)	H-1			4.987
	H-2			3.687
	H-3			3.837
	H-4			3.80
	H-5			4.305
	CH <sub>3</sub>			1.160

Sur la base de ces observations, la structure de l'oligosaccharide alditol 100-13 est donc la suivante:



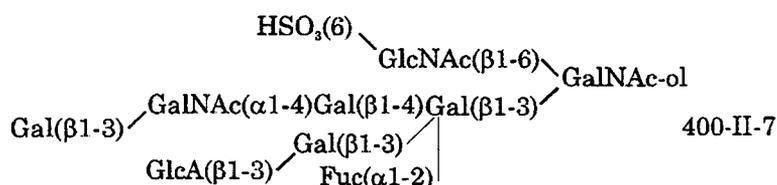
#### IV.B.12. Oligosaccharide alditol 400-II-7

Par rapport au spectre RMN de l'oligosaccharide 100-13, celui de l'oligosaccharide 400-II-7 (figure 62) permet de mettre en évidence un proton anomère supplémentaire à  $\delta = 4,576$  ppm, correspondant à l'unité II' : GlcNAc( $\beta 1-6$ ). D'autre part, les deux quadruplets observés à  $\delta = 4,363$  et  $4,233$  ppm prouvent la présence d'un groupement sulfate en position C-6 de cette osamine.

Par rapport à 100-13, nous observons également une différence importante portant sur le proton H-1 de l'unité Gal V, qui résonne à  $\delta = 4,979$  ppm (400-II-7), au lieu de  $4,920$  ppm (100-13).

Mais une comparaison des spectres des composés 100-11 et 400-II-6 a déjà permis d'observer que la présence d'une unité GlcNAc liée en  $\beta 1-6$  sur le N-acétylgalactosaminitol provoquerait le déblindage du proton anomère du  $\beta$ -galactose V. Cet effet sera également observé pour l'oligosaccharide 200-I-B3 (figure 63)., mais disparaîtra pour le composé 200-I-B4.

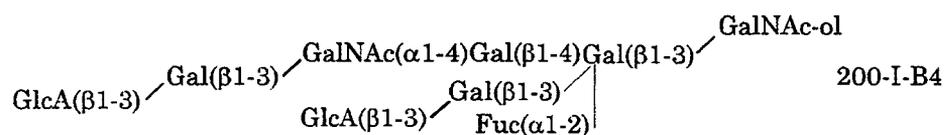
L'ensemble des autres paramètres RMN relatifs aux monosaccharides de la branche inférieure (unités II, III, IV, V et VII) sont en tous points identiques à ceux observés pour l'oligosaccharide 100-13. La structure de ce composé est donc la suivante:





m/z 1571 permet de confirmer la composition molaire suivante: 1 Fuc, 4 Gal, 1 GalNAc, 2 GlcA et 1 GalNAc-ol. L'ensemble de ces résultats permet de conclure en la substitution de l'unité Gal VII par un acide glucuronique. Le déblindage du proton H-4 de l'unité Gal VII est identique à celui du proton H-4 du galactose III, et en outre, les paramètres relatifs aux deux unités GlcA IV et VIII sont absolument superposables.

L'ensemble de ces observations a conduit à l'établissement de la structure suivante:





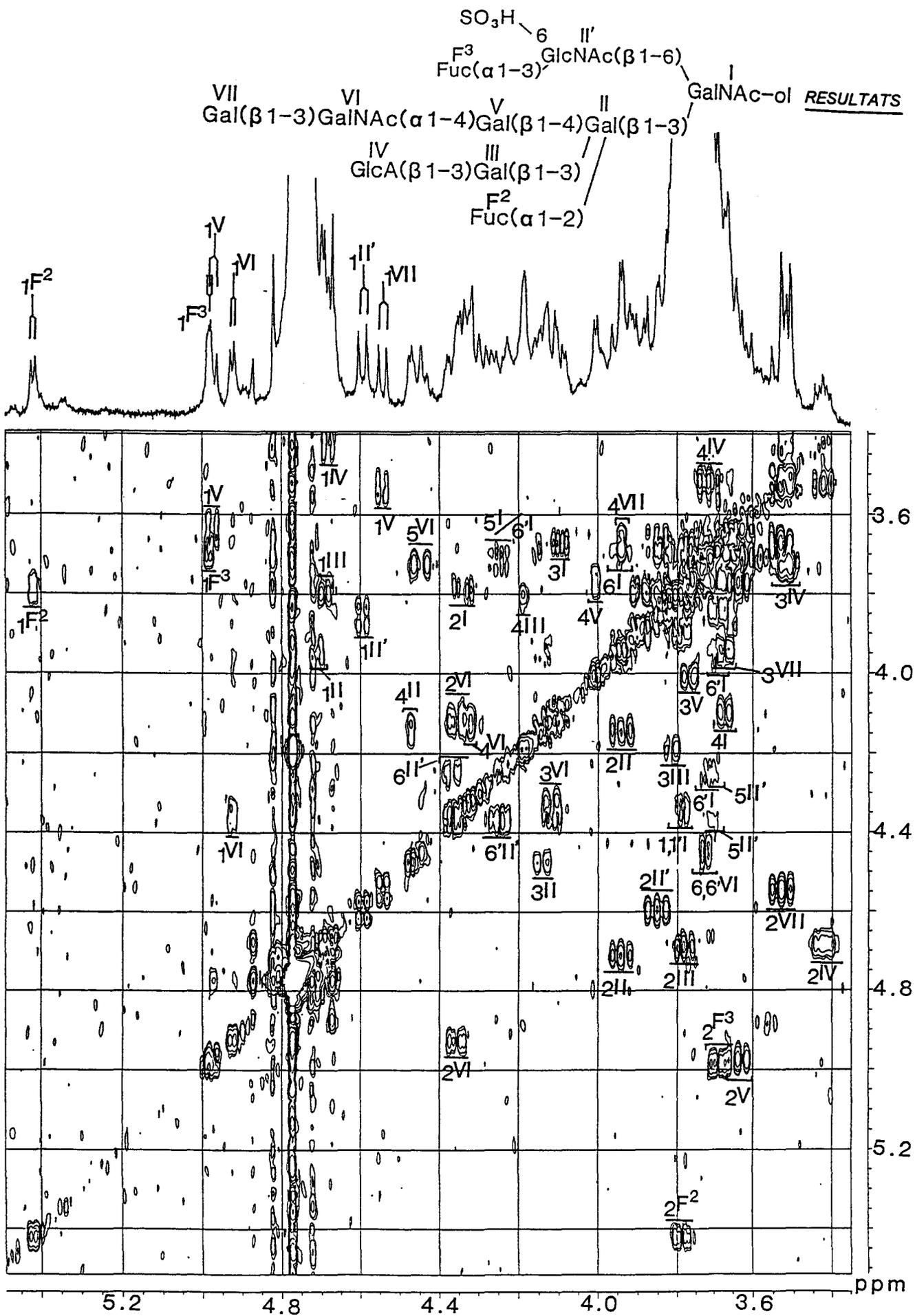


Figure 63: Spectre COSY de l'oligosaccharide alditol 200-I-B3.

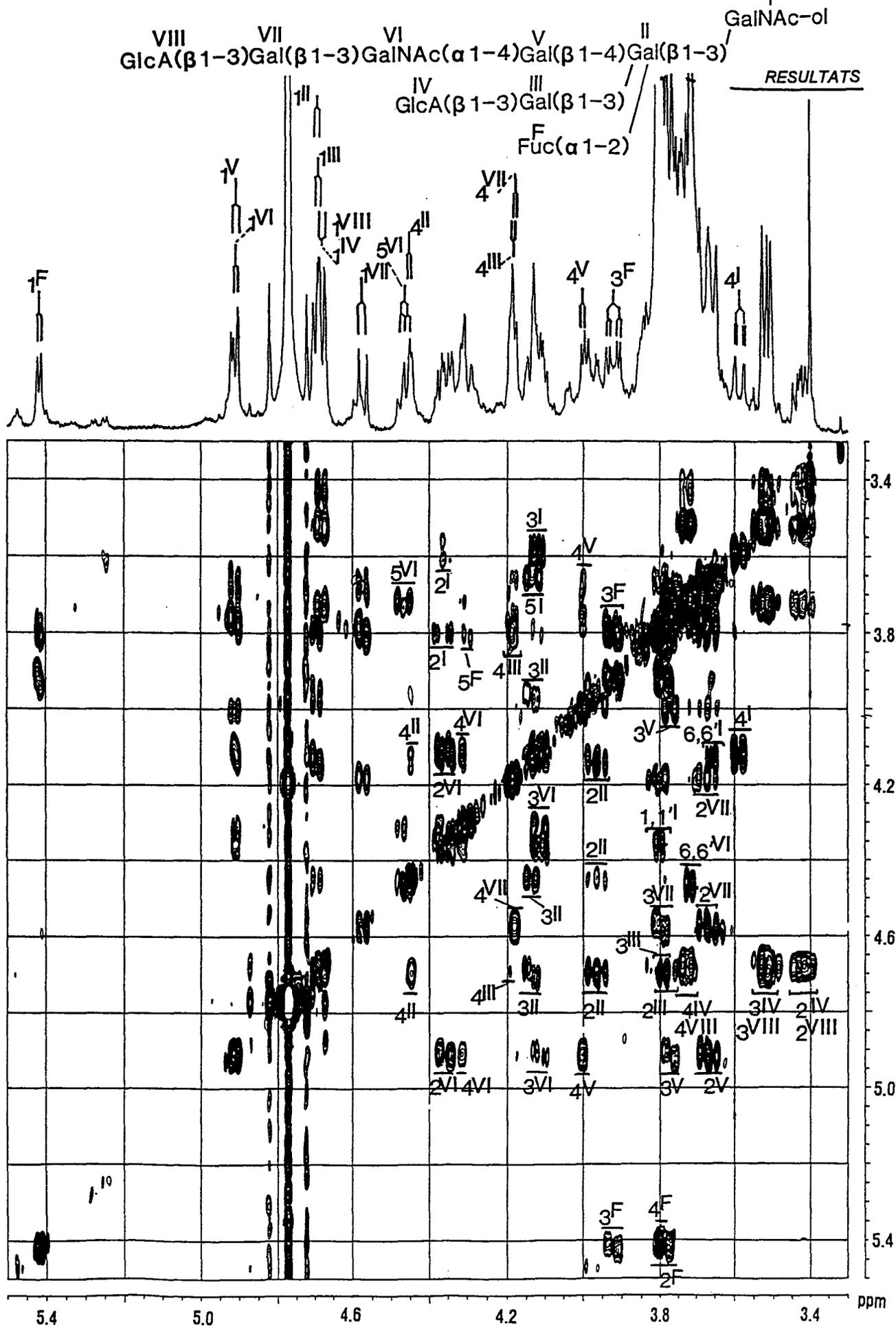
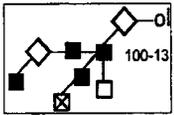
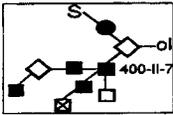
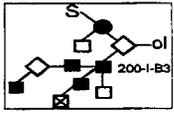
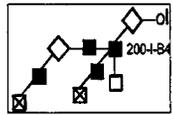


Figure 64: Spectre COSY double relai de l'oligosaccharide alditol 200-I-B4.

Tableau 7: Glissements chimiques des protons des oligosaccharides 100-13, 400-II-7, 200-I-B3 et 200-I-B4:

					
GalNAc-ol (I)	H-1,1'	3.80	N.D.	3.786	3.79
	H-2	4.365	N.D.	4.339	4.365
	H-3	4.124	4.116	4.095	4.124
	H-4	3.574	N.D.	3.669	3.587
	H-5	4.148	4.157	4.148	4.133
	H-6	3.66	N.D.	3.95	3.66
	H-6'	3.66	N.D.	3.72	3.66
	NAc	2.055	2.058	2.061	2.056
Gal(β1-3) (II)	H-1	4.682	4.690	4.541	4.691
	H-2	3.968	3.950	3.943	3.967
	H-3	4.132	4.132	4.141	4.135
	H-4	4.452	4.473	4.474	4.444
Gal(β1-3) (III)	H-1	4.694	4.699	4.593	4.691
	H-2	3.79	N.D.	3.781	3.79
	H-3	3.82	N.D.	3.819	3.82
	H-4	4.198	4.187	4.196	4.196
GlcA(β1-3) (IV,VIII)	H-1	4.680	4.671	4.678	4.679
	H-2	3.424	3.422	3.427	3.43
	H-3	3.515	N.D.	3.518	3.52
	H-4	3.721	N.D.	3.712	3.72
	H-5	3.72	N.D.	3.72	3.72
Gal(β1-4) (V)	H-1	4.920	4.979	4.976	4.912
	H-2	3.663	N.D.	3.636	3.670
	H-3	3.776	N.D.	3.765	3.769
	H-4	4.003	4.004	4.002	3.997
GalNAc(α1-4) (VI)	H-1	4.907	4.925	4.925	4.908
	H-2	4.360	4.352	4.356	4.358
	H-3	4.109	4.103	4.120	4.113
	H-4	4.315	4.320	4.324	4.312
	H-5	4.476	4.446	4.465	4.465
	H-6,6'	3.72	N.D.	3.72	3.72
NAc	2.074	2.074	2.074	2.068	
Gal(β1-3) (VII)	H-1	4.523	4.537	4.543	4.573
	H-2	3.529	N.D.	3.529	3.671
	H-3	3.648	N.D.	3.669	3.799
	H-4	3.922	3.931	N.D.	4.182

GlcNAc( $\beta$ 1-6) II'	H-1		4.576	4.594	
	H-2		N.D.	3.851	
	H-3		N.D.	4.367	
	H-4		N.D.	4.249	
	H-5		N.D.	3.680	
	H-6		4.363	4.367	
	H-6'		4.233	4.248	
	NAc		2.064	2.043	
Fuc( $\alpha$ 1-2) (F <sup>2</sup> )	H-1	5.405		5.420	5.417
	H-2	3.790		3.787	3.782
	H-3	3.922		3.893	3.924
	H-4	3.803		N.D.	3.799
	H-5	4.290		4.324	4.298
	CH <sub>3</sub>	1.234		1.223	1.239
Fuc( $\alpha$ 1-3) (F <sup>3</sup> )	H-1			4.982	
	H-2			3.686	
	H-3			3.837	
	H-5			4.289	
	CH <sub>3</sub>			1.161	

Tableau 8 : Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de différents oligosaccharides alditols.

## Rapport molaire

Oligosaccharide	[M+Na] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	GalNAc-ol	HexNAc	Hex	deHex	NeuGc	GlcA	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
200-I-2		813	1	1	1	1	-	-	1
200-II-6		959	1	1	1	2	-	-	1
200-I-1		772	1	-	2	1	-	-	1
N-II-8b	760		1	2	1	1	-	-	-
100-2		912	1	1	1	-	1	-	-
100-5		1074	1	1	2	-	1	-	-
N-II-6d	878		1	-	3	1	-	-	-
N-II-8d	1081		1	1	3	1	-	-	-
200-I-7		1137	1	1	3	1	-	-	1
100-6		1283	1	1	3	2	-	-	1
N-II-10c	1186		1	-	4	2	-	-	-
100-7		868	1	-	2	1	-	1	-
100-10		1081	1	1	2	1	-	1	-
400-II-3		1307	1	1	2	2	-	1	1
100-9		1030	1	-	3	1	-	1	-
100-12		1233	1	1	3	1	-	1	-
400-II-4		1313	1	1	3	1	-	1	1
400-II-5		1459	1	1	3	2	-	1	1
100-11		1233	1	1	3	1	-	1	-
400-II-6		1516	1	2	3	1	-	1	1
200-I-B2		1662	1	2	3	2	-	1	1
100-13		1395	1	1	4	1	-	1	-
400-II-7		1678	1	2	4	1	-	1	1
200-I-B3		1824	1	2	4	2	-	1	1
200-I-B4		1571	1	1	4	1	-	2	-

---

## **CONCLUSION ET DISCUSSION**

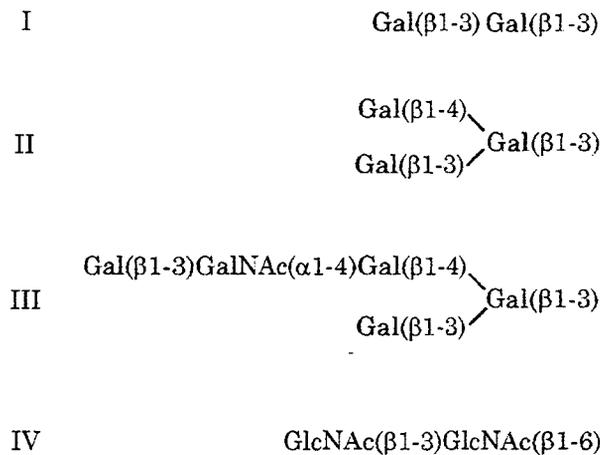
## V. CONCLUSION ET DISCUSSION

L'étude des chaînes glycaniques des mucines oviducalées de *Rana ridibunda* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de 25 structures glycaniques qui sont décrites dans la figure 65.

L'examen de ces structures permet les conclusions suivantes:

1° ⇔ Les noyaux de type 1 et 2 ont été identifiés.

2° ⇔ Quatre différents squelettes ont été caractérisés:



Le squelette I a été caractérisé à de nombreuses reprises (*Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Rana clamitans*). Il n'a jamais été identifié dans les mucines humaines ou d'autres mucines de mammifères supérieurs et paraît donc très spécifique des mucines d'amphibiens.

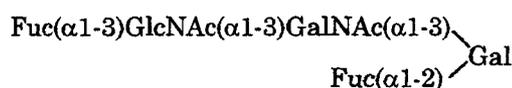
Le squelette II est caractéristique de l'espèce *Rana temporaria*. Le squelette III est spécifique de *Rana ridibunda*. Certes, la séquence  $\text{Gal}(\beta 1-3) \text{GalNAc}(\alpha 1-4)$  existe chez *Rana palustris*, mais lié directement sur le noyau de type I,  $\text{Gal}(\beta 1-3) \text{GalNAc}$ . Enfin, la séquence  $\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \text{GlcNAc}$  a été déjà observée chez *Bufo bufo*, *Rana utricularia*, ainsi que chez *Bufo viridis* (Coppin, communication personnelle).

3° ⇔ La partie périphérique des glycanes de *Rana ridibunda* tient son originalité à la présence d'acide glucuronique, et surtout à celle des épitopes de groupe sanguin B et "Cad".

La séquence Gal( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal, qui définit l'épitope de groupe sanguin B est toutefois substituée par une unité monosaccharidique  $\beta$ -galactose lié en C-2 sur le galactose( $\alpha$ 1-3). Une telle substitution d'un épitope de groupe sanguin a déjà été observée chez *Bufo bufo* et *Xenopus laevis*:



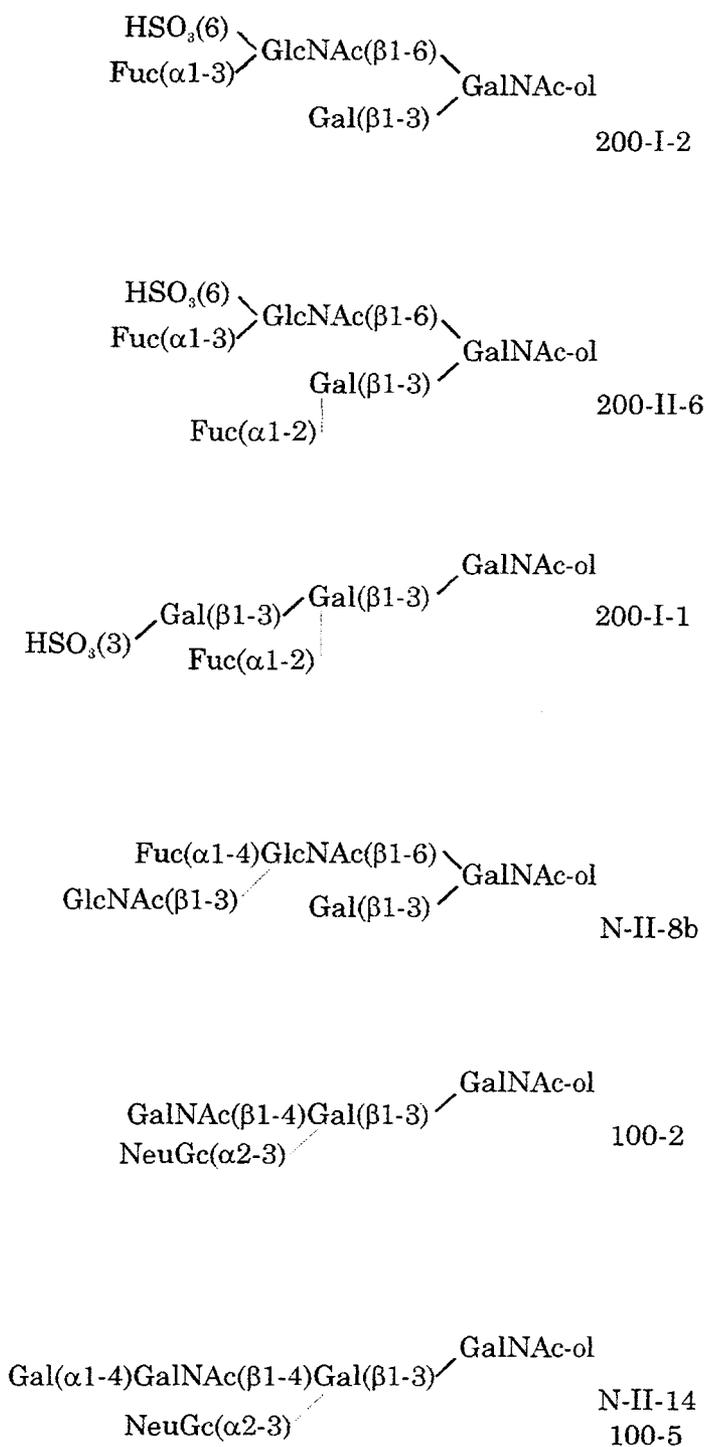
*Bufo bufo*



*Xenopus laevis*

Il a été connu depuis longtemps que les amphibiens sont les premières espèces dont les tissus sécréteurs ectodermiques synthétisent des substances de groupes sanguins A, B et H. Les observations ci-dessus montrent clairement que ces épitopes de groupe sanguin - ou tissulaires- ainsi définis par référence aux systèmes correspondants rencontrés chez l'Homme, étaient initialement beaucoup plus complexe. En réalité, ces épitopes ont comme raison d'être de constituer les parties périphériques des chaînes glycaniques auxquelles elles assurent une certaine spécialisation.

Une observation similaire peut être faite à propos de l'épitope Cad, ou plutôt pseudo-Cad puisque le déterminant Cad d'origine humaine renferme de l'acide N-acétylneuraminique. Chez *Rana ridibunda*, l'unité  $\beta$ -N-acétylgalactosamine est substitué en C-4 par un  $\alpha$ -galactose surnuméraire qui confère, une fois de plus, aux glycanes de cette mucine une spécificité propre à l'espèce.

*Rana ridibunda*Figure 65: Structures des oligosaccharides déterminés chez *Rana ridibunda*.



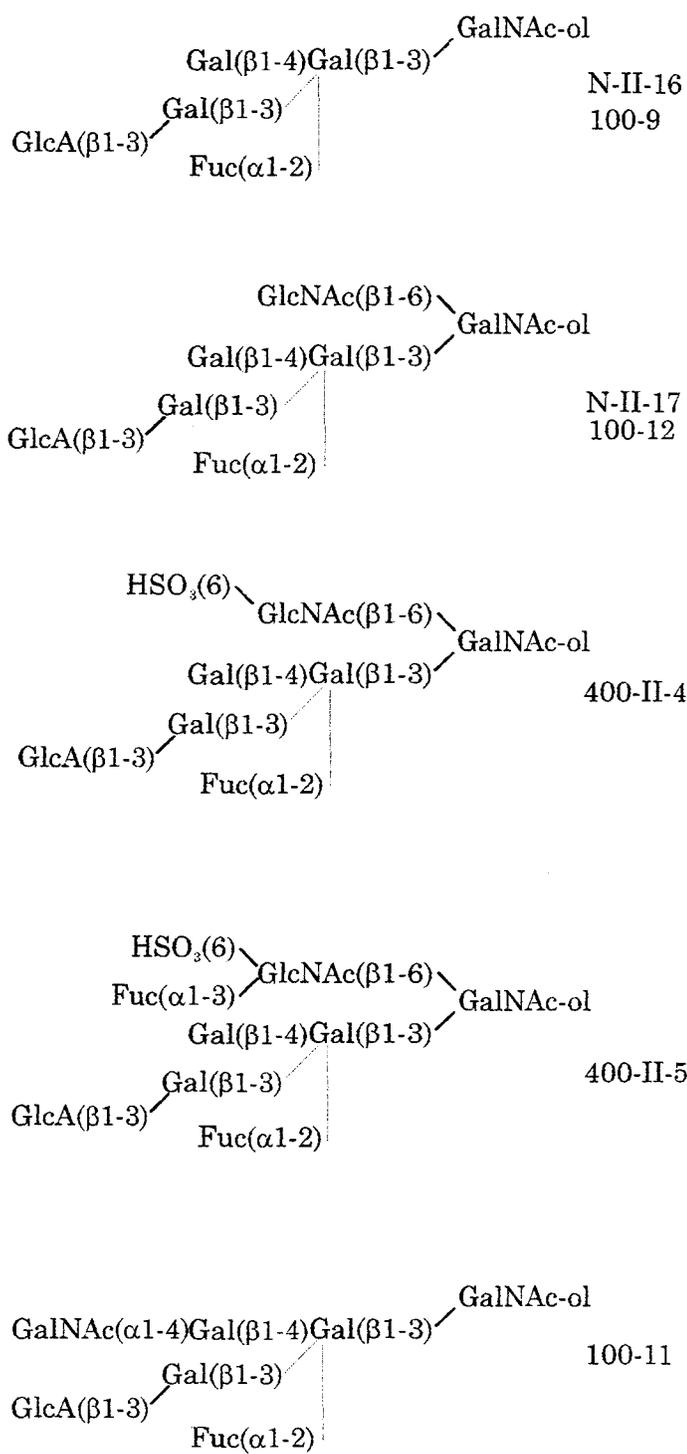
*Rana ridibunda*

Figure 65 (suite).

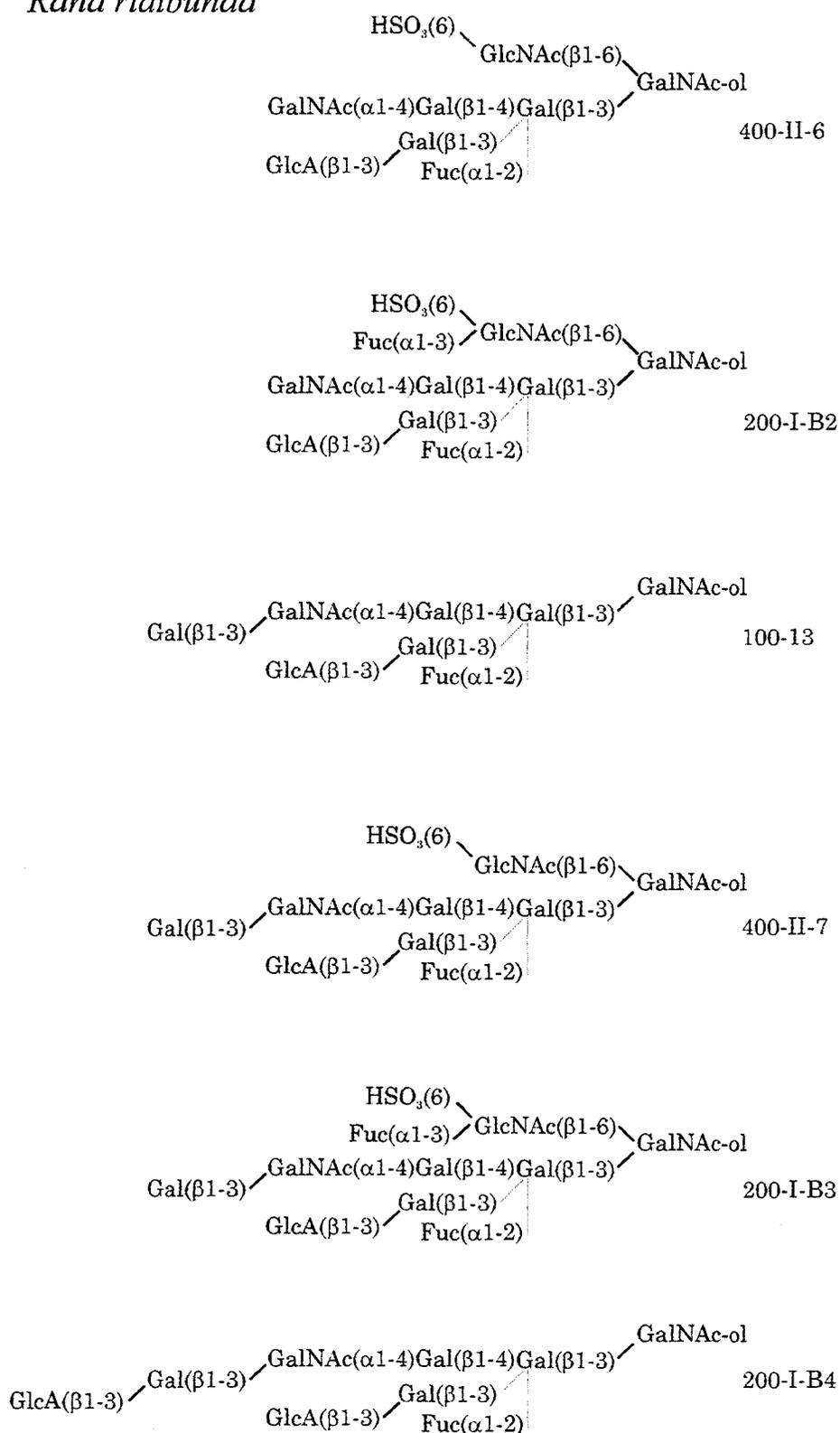
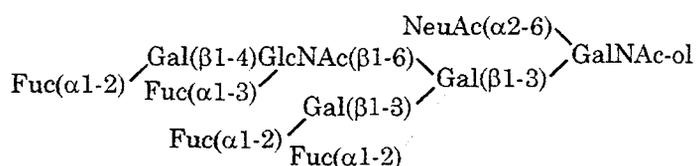
*Rana ridibunda*

Figure 65 (suite).

Les structures que nous décrivons sont absolument spécifiques de *Rana ridibunda*, bien que certains éléments des chaînes glycaniques aient déjà été rencontrés chez d'autres espèces. Ceci est évident pour les noyaux internes, communs à toutes les espèces animales. Les squelettes que nous avons décrits sont propres aux amphibiens, même s'ils n'existent que chez 5 ou 6 autres espèces parmi la vingtaine étudiée jusqu'à présent. Par contre, la partie périphérique est sujet à des variations beaucoup plus importantes. Ces parties périphériques sont susceptibles de jouer des rôles biologiques variés et sont le support de la véritable spécificité de ces chaînes glycaniques.

Les études préliminaires portant sur six ou sept espèces d'amphibiens avaient montré une spécificité structurale stricte, propre à chaque espèce. Une étude d'une dizaine de nouvelles espèces a permis de démontrer l'existence de structures qui réutilisent de nombreux motifs glycaniques communs, mais dont les combinaisons conduisent à des structures nouvelles. L'exemple récent suivant, observé chez *Bufo viridis* (Coppin, communication personnelle):

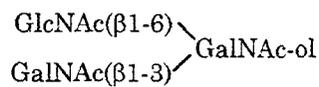
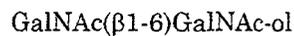
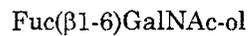


Cette structure montre la coexistence de l'épitope  $\text{Le}^Y$ , rencontré jusqu'à présent chez *Pleurodeles waltl*, et la séquence  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Gal}(\beta 1-3)$ , commune à quatre espèces différentes. Néanmoins, cette structure n'en demeure pas moins spécifique de *Bufo viridis*, et l'ensemble de tous ces exemples confirme une fois de plus la spécificité d'espèce des structures glycaniques des mucines oviducales d'amphibiens.

#### DISCUSSION: ORIGINE ET SIGNIFICATION DE LA DIVERSITE STRUCTURALE DE CHAINES GLYCANNIQUES:

Il est certes trop tôt pour affirmer que les chaînes glycaniques sont strictement spécifiques de chaque espèce animale et constituent un facteur de spéciation absolu. Cela tient du fait qu'un nombre assez restreint de travaux a été conduit dans ce sens. Il est toutefois

remarquable de constater que les études réalisées chez quelques espèces de poissons, de vers (nématodes et trematodes) et de gastéropodes ont conduit à de semblables observations, c'est-à-dire que chaque famille de glycanes présentait des structures nouvelles pour chaque nouvelle espèce étudiée. Les travaux concernant les mucines de mammifères supérieurs vont dans le même sens. En particulier, une étude récente portant sur les mucines sous-maxillaires bovines (Martensson et al. 1998) a permis de décrire trois nouveaux types de noyaux:



Nous nous devons également de rappeler les travaux de Laine (1994), qui a calculé le nombre d'isomères glycaniques théoriquement possibles par combinaisons de six monomères ( $10^{12}$  polymères) ou de huit monomères ( $10^{17}$  polymères). En dépit des restrictions que nous pouvons formuler sur ce calcul qui tient compte de toute combinaison, même celles qui incluent les sucres exclusivement furanniques, ou la présence d'acide sialique interne, il n'en demeure pas moins que le nombre possible de structures glycaniques, observables dans la nature, est immense.

De plus, il faudrait tenir compte également de substituants divers, comme les groupes pyruvate, méthyl, acétyl, succinyl, phosphoethanolamine, phosphocholine etc..., qui participe également à cette diversité.

Notre concept de spécificité glycanique liée à l'espèce ne constitue donc pour le moment qu'une hypothèse. Cette diversité structurale s'explique évidemment par l'existence d'un nombre tout aussi important de nouvelles activités glycosyltransférasiques. Rappelons qu'une activité glycosyltransférasique est liée à la nature du sucre transféré, de son anomérie, du donneur et de la séquence acceptrice, qui, selon les mécanismes GO/NO-GO (Brockhausen et al. 1997), associés aux considérations précédentes, sont responsables de cette diversité.

Ce nombre aussi considérable de nouvelles activités glycosyltransférasiques doit nécessairement correspondre une diversité génétique tout aussi étendue. Les travaux de

Hakamori et al. (1987) ont démontré, chez l'Homme, que trois mutations ponctuelles du gène de l' $\alpha$ -galactosyltransférase, responsable de la synthèse des déterminants de groupe sanguin B, conduisant à l'expression d'une nouvelle activité enzymatique, l' $\alpha$ -N-acétylgalactosaminyltransférase, responsable de la synthèse de l'épitope de groupe A. Cette observation suggère qu'un nombre élevé de nouvelles activités glycosyltransférales peut être créé par de simples mutations qui affectent les mécanismes de reconnaissance enzyme-substrat, et qui sont aussi responsables de la diversité des structures glycaniques.

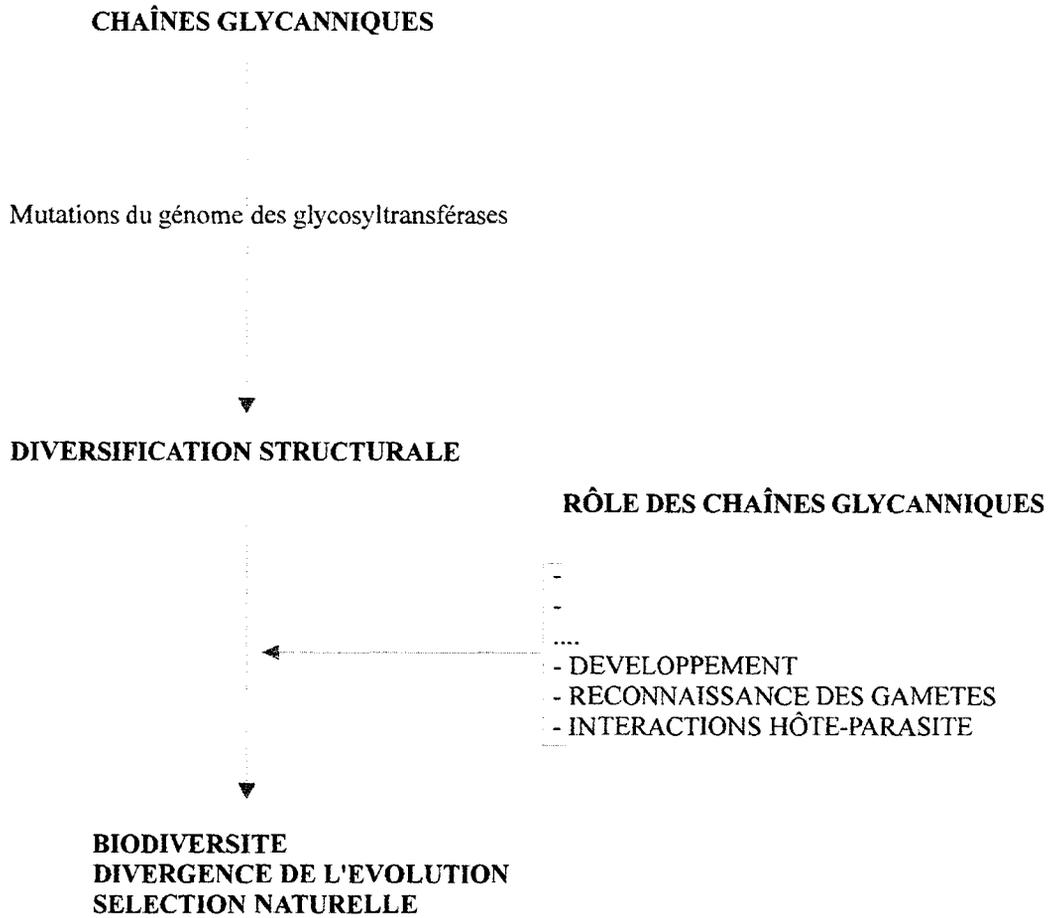
Puisque nous exprimons l'hypothèse que les structures glycaniques constituent un élément fondamental de la biodiversité, nous tenterons maintenant d'argumenter à propos de la signification biologique de ce concept.

Les chaînes glycaniques peuvent avoir un rôle relativement trivial (ex: stabilité et immunogénicité des glycoprotéines), mais peuvent également être impliquées dans des mécanismes biologiques comme l'adhésion cellulaire, la différenciation cellulaire, le développement et l'oncogenèse. Il apparaît également de plus en plus évident qu'elles participent à la reconnaissance des gamètes et aux interactions hôte-parasite. C'est à ces deux fonctions que nous nous intéresserons plus particulièrement, et principalement au parasitisme, arbitre de l'évolution.

Bien que nous ignorions le nombre d'espèces vivantes et encore celui de parasites, il existe vraisemblablement autant d'espèces parasites que d'espèces libres dans le monde vivant. L'association hôte-parasite impose un renouvellement constant de leur diversité génétique et le parasitisme constitue donc un facteur essentiel de la sélection naturelle et de l'évolution.

Sans prétendre que la diversité structurale des chaînes glycaniques soit le facteur essentiel qui favorise la rencontre entre hôte et parasite, nous suggérons néanmoins que la diversification structurale des glycoconjugués a pu jouer un rôle non négligeable de sélection naturelle déviant les processus de reconnaissance cellulaire impliqués dans les mécanismes spécifiques des gamètes, d'ontogenèse et de colonisation de l'hôte par les parasites.

## CONCLUSIONS : SUCRES MARQUEURS DE L'EVOLUTION



---

# **Bibliographie**

## VI. BIBLIOGRAPHIE

Austin C. R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 236-237.

Baker A. P. and Sawyer J. L. (1975) Glycosyltransferases in human respiratory tissue. Alterations in subjects with hypersecretion of mucus. *Biochem. Med.*, 14, 42-50.

Barbieri F. D. and del Pino E.J. (1975) Jelly coats and diffusible factor in anouran fertilization. *Arch. Biol.*, 86, 311-321.

Barbieri F. D. and Raisman J.S. (1969) Non-gametic factors involved in fertilization of *Bufo arenarum* oocytes. *Embryologia*, 10, 363-372.

Barnum S. R. and Brou G. G. (1983) Effects of lectins and sugars on primary sperm attachment in the horreshoe crab, *Limulus polyphemus L.*, *Dev. Biol.*, 95, 352-359.

Bataillon E. (1919) Analyse de l'activation par la technique des oeufs nus et la polyspermie expérimentale chez les Batraciens. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol.*, 10, 1-38.

Birr C. A. (1979) Immunoelectrophoretic studies of the jelly coat ligand for the cortical granule lectin of *Xenopus laevis* eggs. Ph. D. Thesis, University of California, Davis.

Boisseau C. (1975) Etude ultrastructurale de l'oviducte du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah III. Action de l'oestradiol 17 $\beta$  sur la différenciation des cellules sécrétrices de l'oviducte moyen de la femelle immature. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27, 430-449.

Bolognani L., Bolognani Fantin A. M., Lusignani R. and Zonta L. (1966) Presence of sialopolysaccharide components in egg gelatinous mantle of *Rana latastei* and *Bufo vulgaris*. *Experienta*, 22, 601-603.

Breg J., van Halbeek H., Vliegthart 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 combination of 500-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and quantitative sugar analysis. 2. Structure of 19 oligosaccharides having the GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol core (type3) or the GlcNAc( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol core (type 4). *Eur. J. Biochem.*, 171, 643-654.

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.

Brockhausen I., Yang J., Burchell J., Whitehouse C. and Taylor-Papadimitriou J. (1995) Mechanism underlying aberrant glycosylation of the MUC 1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, 233, 607-617.

Cabada M. O., Mariano M. I. and Raisman J. S. (1978) Effects on trypsin inhibitors and concanavalin A on the fertilization of *Bufo arenarum* coelomic oocytes. *J. Exp. Zool.*, 204, 409-416.

Carlson D. M. (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.*, 243, 616-626.

Carlsson H. E., Sundblad G., Hammarstöm S. and Lönngrén J. (1978) Structure of some oligosaccharides derived from rat intestinal glycoproteins. *Carbohydr. Res.*, 64, 181-188.

- Caroll E. J., Wei S. M., Nagel G. M. and Ruibal R. (1991) Structure and macromolecular composition of the egg and embryo jelly coats of the anuran *lepidobatrachus laevis*. *Develop. Growth and 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  $^1\text{H-NMR}$  study. *Eur. J. Biochem.*, 203, 257-268.
- Charbonneau M., Moreau M., Picheral B., Vilain J. P. and Guerrier P. (1983) Fertilization of Amphibien eggs: a composition of electrical responses between anurans and urodeles. *Dev. Biol.*, 98, 304-318.
- Ciucanu I. and Kerek F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 131, 209-217.
- Dabelsteen E. (1996) Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J. Pathol.*, 358-369.
- Dumont J. M. and Brummett A. R. (1985) Eggs envelopes in vertebrates. In: *development Biology, a comprehensive synthesis: Oogenesis*, vol. 1. L. Browder, ed. Plenum Press, New York, pp. 235-228.
- 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. (1974) A comparative examination of amphibian sperm proteolytic activity. *Biol. Reprod.*, 11, 406-412.

Feizi T. (1982) Antigenicities of mucins-their relevance to tumour associated and stage specific embryonic antigens. In *Mucus in Health and Disease*, vol. II (E. N. Chandler, J. B. Elder and M. Elstein, ed.). Plenum Press, New York, pp. 29-37.

Fiat A. M., Jolles P., Vliegenthart J. F. G. and van Halbeek H. (1984) Proc XIIth Int. Carbohydr. Symp., Vliegenthart J. F. G., Kamerling J. P., Veldink G. A., eds. P. 426, Zeist, the Netherlands: Vonk Publishers.

Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria* ; Characterisation of the sequence HSO<sub>3</sub>(3)GlcA( $\beta$ 1-3)Gal. *Carbohydrate Research*, 302, 179-189.

Folkes B. F., Grant R. A. and Jones J. K. N. (1950) Frog-spaw mucin. *J. Chem. Soc.*, 440, 2136-2140.

Fonovich de Schroeder T. M., Gauna L. and Pechen de D'Angelo A. M. (1993) Is buffering capacity the principal role of the jelly coat in *Bufo arenarum* fertilization? *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A, 533-537.

Fontaine M-D., Wieruszkeski 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*. Characterisation of the sequence fucosyl( $\alpha$ 1-2)[fucosyl( $\alpha$ 1-3)]fucosyl( $\alpha$ 1-4)-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid. *Eur. J. Biochem.*, 231, 424-433.

Fournet B., Strecker G., Leroy Y. and Montreuil J. (1981) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.*, 116, 489-502.

- 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.
- Good G. M. and Daniel J. F. (1943) Fertilization of coelomic eggs of triturus. *Univ. Cal. Publ. Zool.*, 51, 149-163.
- 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.
- Greve L. C., Prody G.A. and Hedrick J. L. (1985) N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in the cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *Gamete Res.*
- Grey R. D., Bastiani M. J., Welb D. J. and Shutel 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.
- Grey R. D., Wolf D. P. and Hedrick J. L. (1974) Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. *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. *Devel. 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 coelom to oviduct in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 201, 73-84.
- Gunnarsson A. (1987) N- and O-alkylation of glycoconjugates and polysaccharides by solid base in dimethylsulphoxide/alkyl iodide. *Glycoconjugate J.*, 4, 239-245.

Hagen F. K., Nehrke K. and Layden M. J. (1998a) The initial step in mucin O-glycosylation is conserved from worms to man. *Glycobiology*, Vol. 8,n° 11, november 1998,14.

Hagen K. G., Hagen F. K., Balys M. M., Van Wuyckhuysse B. and Tabak L. A. (1998b) Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *J. Biol. Chem.*, 1998 Oct 16; 273(42): 27749-54.

Hagen F. K., Hazes B., Raffo R., deSa D. and Tabak L. A. (1999) Structure-function of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Essential residues lie in a predicted active site cleft resembling a lactose repressor fold. *J. Biol. Chem.*, 1999 Mar 5; 274(10): 6797-803.

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. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharid catalysed by methylsulfinyl carbonion in dimethylsulfoxide. *J. Biochem.*, 55, 205-208.

Hakomori S.- I. and Kobata A. (1974) Blood group antigens. In *The Antigens* (Sela M. ed.). Academic Press, New York, vol. II, 79-140.

Hakamori S.-I., Clausen H. and Levery S. B. (1987) A new series of blood group A and H antigens expressed in human erythrocytes and the incompatible A antigens expressed in tumours of blood group O and B individuals. *Biochem. Soc. Trans.*, 15, 593-596.

Hanish F.-G., Uhlenbruck G., Peter-Katalinic J., Egge H., Dabrowski J. and Dabrowski U. (1989) Structures of neutral O-linked Polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. *A*

novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6) repeating units. *J. Biol. Chem.*, 264, 872-883.

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.

Hearn Y. M., Goodwin S. D. and Watkins W. M. (1970) Biosynthesis of blood group active glycoproteins: a peptidyl:  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyl transferase from human submaxillary gland and stomach mucosal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1279-1286.

Heasman J., Holwill S. and Wylie C. C. (1991) Fertilization of cultured *Xenopus laevis* 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.

Hennebicq S., Tetaert D., Soudan B., Boersma A., Briand G., Richet C., Gagnon J. and Degrand P. (1998) Influence of the amino acid sequence on the MUC5AC motif peptide O-glycosylation by human gastric UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase(s). *Glycoconj. J.*, 1998 Mar; 15(3): 275-82.

Hill H. D., Schwyzer M., Steinman H. M. and Hill R. L. (1977) Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine: mucin transferase. *J. Biol. Chem.*, 252, 3799-3804.

Hoshi M., De Santis R., Pinto M. R., Cotelli F. and Rosati F. (1983) Is sperm  $\alpha$ -L-fucosidase responsible for sperm-egg binding in *Ciona intestinalis*? In "the sperm cell" (J. Andre Ed.) Marinus Nijhoff, the Hague.

- Hounsell E. F., Fukuda M., Powell M. E., Feizi T. and Hakomori S. (1980) A new O-glycosidically linked tri-hexosamine noyau structure in sheep gastric mucin: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 1143-1150.
- 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 oncofoetal antigens. *Eur. J. Biochem.*, 148, 367-377.
- Hounsell E. F., Lawson A. M. and Feizi T. (1982) Structural and antigenic diversity in mucin carbohydrate chains. In *Mucus in Health and Disease*, vol. II (E. N. Chandler, J. B. Elder and M. Elstein, ed.). Plenum Press, New York, pp. 39-41.
- 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.
- Hykes O. V. (1927) Rôles de l'enveloppe gélatineuse de l'oeuf dans la première période de développement de la grenouille. *C. R. Acad. Biol. Paris*, 98, 1029-1039.
- Ishihara K., Hosono J., Kantani 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) Properties of the vitelline coat lysin from toad sperm, *J. Exp. Zool.*, 219, 87-95.
- Jaffe L. A. and Schilchter L. C. (1985) Fertilization-induced ionic conductances in eggs of the frog, *Rana pipiens*. *J. Physiol.*, 258, 299-319.

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.

Jégo P. (1978) Analyse chimique et immunochimique des gangues ovulaires sécrétrices par l'oviducte du *Pleurodèle*; effets de l'oestradiol sur les activités enzymatiques des cellules sécrétrices. Th. Etat, Univ. Rennes, série c, n° de série 80.

Kambara S. (1953) Role of jelly envelopes of toad eggs in fertilization. *Annot. Zool. Japon*, 26, 78-84.

Kamerling J. P. and Vliegthart J. F. G. (1992) High resolution  $^1\text{H}$  nuclear resonance spectroscopy of oligosaccharide-alditols released from mucin-type, O-glycoproteins (Berliner L. J. and Rebej J. eds). *Biol. Magn. Reson.*, 10, 1-194.

Katagiri C. (1961) On the fertilization of the frog egg. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser VI, 14, 606-613.

Katagiri C. (1965) The fertilizability of coelomic and oviducal eggs of the toad, *Bufo bufo formosus*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser VI, 15, 633-643.

Katagiri C. (1966) Fertilization of dejellied uterine toad eggs in various experimental conditions. *Embryologia*, 9, 159-169.

Katagiri C. (1967) Occurrence of the fertilization capacity of toad sperm in heterologous egg-jellies. *Annot. Zool. Jap.*, 40, 67-73.

Katagiri C. (1968) Immunological relationship among anuran 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-capacitation activity. *Dev. Growth Differ.*, 15, 81-92.

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 anuran 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.

Klein A., Carnoy C., Lamblin G., Roussel P., van Kuik J. A. and Vliegthart J. F. G. (1993) Isolation and structural characterisation of novel sialylated oligosaccharide-alditols from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis. *Eur. J. Biochem.*, 211, 491-500.

Klein A., Carnoy C., Wieruszkeski 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.

Ko G. K. W. and Raghupathy E. (1972) Glycoprotein biosynthesis in the developing rat brain. II. Microsomal galactosaminyltransferase utilizing endogenous and exogenous protein acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 264, 129-143.

Kurosaka A., Nakajima H., Funakoshi I., Matsuyama M., Nagayo T. and Yamashima I. (1983) Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 258, 11594-11598.

Kurosawa N., Hamamoto T., Lee Y. C., Nakaoka N., Kojima N. and Tsuji S. (1994a) Molecular cloning and expression of GalNAc $\alpha$ 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 269, 1402-1409.

Kurosawa N., Kojima N., Inoue M., Hamamoto T. and Tsuji S. (1994b) Cloning and expression of chick Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 2-3)sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 269, 19048-19053.

Laine R. A. (1994) A calculation of all possible oligosaccharide and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, 4, 759-767.

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( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 2-3)sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 269, 377-385.

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.

Lindberg B. (1972) Methylation analysis of polysaccharids. *Methods Enzymol.*, 28, 178-195.

Lindberg B. and Lönngrén J. (1978) Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods enzymol.*, 50, 3-33.

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<sup>a+b</sup>) patient suffering from chronic bronchitis. *Glycoconj. J.*, 14, 113-125.

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.

Lotan R., Skutelsky E., Danon D. and Sharon N. (1975) The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.*, 250, 8518-8523.

Maes E., Florea D., Delplace F., Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G. (1997a) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*. *Glycoconjugate Journal*, 14, 127-146.

Maes E. (1997b) Biodiversité des chaînes glycaniques des mucines oviducales d'amphibiens. Etude par résonance magnétique nucléaire de la structure primaire des oligosaccharide-alditols libérés par  $\beta$ -élimination. Thèse, USTL, 1997.

Maes E., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Primary structure of acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of *Ambystoma tigrinum*. Occurrence of oligosaccharides with fucosyl( $\alpha$ 1-5)[fucosyl( $\alpha$ 1-4)]-3-deoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid and fucosyl( $\alpha$ 1-2)galactosyl( $\alpha$ 1-3)-N-acetylgalactosamine sequences. *Eur. J. Biochem.*, 230, 146-156.

Martensson S., Levery S. B., Fang T. T. and Bendiak B. (1998) Neutral noyau oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. Use of lead tetraacetate in the cold for establishing branch positions. *Eur. J. Biochem.*, 258, 603-622.

McGuire E. J. and Roseman S. (1967) Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin. *J. Biol. Chem.*, 242, 3745-3747.

McLaughliss 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.

McNaught A. D. (1997) Nomenclature of carbohydrates. Carbohydr. Res., 297, 1-92.

Micelli D. C., Fernandez S. N., Raisman J. S. and Barbieri F. D. (1978) A trypsin-like oviducal proteinase involved in *Bufo arenarum* fertilization. J. Embryol. Exp. Morphol., 48, 79-91.

Moore K. L., Eaton S. F., Lyons D. E., Lichenstein H. S., Cummings R. D. and McEver R. P. (1994) The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. J. Biol. Chem., 269, 23318-23327.

Morelle W. and Strecker G. (1997a) Structural analysis of hexa to dodecaoligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from oviducal mucins of *Bufo bufo*. Glycobiology, vol. 7, n°8, pp. 1129-1151.

Morelle W. and Strecker G. (1997b) Structure analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from oviducal mucins of *Bufo bufo*: characterisation of the carbohydrate sequence Gal( $\alpha$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-2)]Gal. Glycobiology, vol. 7, n°6, pp. 777-790.

Morelle W. and Strecker G. (1997c) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from the jelly coat of *Rana utricularia* eggs. Biochem. J., 321, 879-887.

Morelle W., Cabada M-O. and Strecker G. (1998a) Structural analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from the jelly coats of the anuran *Bufo arenarum*. Eur. J. Biochem. 252, 253-260.

- Morelle W. and Strecker G. (1998b) Isolation of the O-glycosidically linked oligosaccharides obtained by alkaline borohydride degradation from oviducal mucins of the toad *Bufo bufo*. *Journal of Chromatography B.*, 706, 101-111.
- Morelle W. and Strecker G. (1998c) Structural analysis of a new series of oligosaccharide-alditols released by reductive  $\beta$ -elimination from oviducal mucins of *Rana utricularia*. *Biochem. J.*, 330, 469-478.
- Omata S. and Katagiri C. (1993) Relative roles of jelly layers in successful fertilization of *Bufo japonicus*. *The journal of experimental zoology*, 265, 329-335.
- Omata S. and Katagiri C. (1996) Involvement of carbohydrates moieties of the toad egg vitelline coat in binding with fertilizing sperm. *Develop. Growth Differ*, 38, 663-672.
- Peres A. and Bernardini G. (1985) The effective membrane capacity of *Xenopus* eggs: its relation with membrane conductance and cortical granule exocytosis. *Pflugers Arch.*, 404, 266-272.
- 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.
- Prieels J., Monnom D., Dolmans M., Beyer T. and Hill R. L. (1981) Copurification of the Lewis blood group N-acetylglucosaminide  $\alpha$ 1-4-fucosyltransferase and an N-acetylglucosaminide  $\alpha$ 1-3-fucosyltransferase from human milk. *J. Biol. Chem.*, 256, 10456-40463.
- Raisman J. S. and Cabada M. O. (1977) Acrosomic reaction and proteolytic activity in the spermatozoa of an anuran amphibian, *Leptodactylus chaquensis*. *Dev. Growth Differ.*, 19, 227-232.

Raisman J. S. and Pisano A. (1970) Fertilization of jelly-less *Bufo arenarum* oocytes in the presence of high sperm concentrations. *Acta Embryol. Exp.*, 1970, 3-11.

Raisman J. S., de Cunio R. W., Cabada M. O., del Pino E. J. and Mariano M. I. (1980) Acrosome breakdown in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibian Anura) spermatozoa. *Dev. Growth Differ.*, 22, 289-297.

Salthe S. N. and Mecham J. S. (1974) Reproductive and courtship patterns, 309-521. In LOFTS B., *Physiology of the Amphibia*, vol. 11, Acad. Press.

Savage A. V., Donoghue C. M., D'arcy S. M., Koeleman C. A. M. and van den Eijnden D. H. (1990) Structure determination of five sialylated trisaccharides with noyau types 1, 3 or 5 isolated from bovine submaxillary mucin. *Eur. J. Biochem.*, 192, 427-432.

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 Brockhausen I. (1992) The biosynthesis of serine(threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugate: composition, structure and function* (Allen H. J. and Kisialus E. C. Eds). Marcel Dekker Inc., New York, 263-332.

Schachter H. and Williams D. (1982) Biosynthesis of mucus glycoproteins. In *Mucus Health and Disease* (Chandler E. N., Elder J. B. and Elstein M., ed.). Plenum Press, New York, vol. 2, 3-28.

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.

Shaver J. R. (1966) Immunobiological studies of the jelly-coats of anuran eggs. *Am. Zool.*, 6, 75-87.

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. 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.

Soulier S. and Gaye P. (1981) Enzymatic O-glycosylation of k-caseinomacropeptide by ovine mammary golgi membranes. *Biochimie*, 63, 619-628.

Springer G. F., Taylor C. R. and Howard D. R. (1985) Tn, a carcinoma-associated antigen reacts with anti-Tn of normal human sera. *Cancer*, 55, 561-569.

Steinke J. H. and 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.

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  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy study. *Glycoconj. J.*, 4, 329-337.

Strecker G., Wieruszeski J.M., Fontaine M-O. and Plancke Y. (1994) Structure of the major neutral oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of *Axolotl maculatum*.

Characterisation of the carbohydrate sequence GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3/6). *Glycobiology*, vol. 4, n°5, pp. 605-609.

Strecker G., Wieruszkeski J-M., Michaleski J-C. and Montreuil J. (1992a)  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy of 2-oxo-3-desoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid-containing oligosaccharide-alditols bearing Lewis X, Lewis Y and A Lewis Y determinants isolated from the jelly coat of *Pleurodeles waltl* eggs. *Biochem. J.*, 287, 905-909.

Strecker G., Wieruszkeski J-M., Michaleski J-C., Alonso C., Boilly B. and Montreuil J. (1992b) Characterisation of Le<sup>X</sup>, Le<sup>Y</sup> and A Le<sup>Y</sup> antigen determinants in KDN-containing O-linked glycan chains from *Pleurodeles Waltlii* jelly coat eggs. *Federation of European Societies*, vol. 298, n°1, 39-43.

Strecker G., Wieruszkeski J-M., Michaleski J-C., Alonso C., Leroy Y., Boilly B. and Montreuil J. (1992c) Primary structure of neutral and acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of *Mexican axolotl*. Occurrence of oligosaccharides with fucosyl( $\alpha$ 1-3)[fucosyl( $\alpha$ 1-4)]-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid and galactosyl( $\alpha$ 1-4)[fucosyl( $\alpha$ 1-2)]galactosyl( $\beta$ 1-4)-N-acetylglucosamine sequences. *Eur. J. Biochem.*, 207, 995-1002.

Strecker G., Wieruszkeski J-M., Plancke Y. and Boilly B. (1995) Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran *Xenopus laevis* by reductive  $\beta$ -elimination. *Glycobiology*, vol. 5, n°1, pp. 137-146.

Takamune K., Yoshizaki N. and Katagiri C. (1986) Oviducal *pars recta* -induced degradation of vitelline coat proteins in relation to acquisition of fertilizability of toad eggs. *Gamete res.*, 14, 215-224.

Tchou-su and Wang Y. L. (1956) Etudes expérimentales sur le rôle du mucus des oviductes dans la fécondation chez le crapaud, et la considération générale sur le mécanisme de la pénétration spermatique. *Acta Exp. Biol. Sinica*, 5, 75-122.

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.

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.

Valz-Gianinet J. N., del Pino E. J. and Cabada M. O. (1991) Glycoproteins from *Bufo arenarum* vitelline envelopes with fertility impairing effect on homologous spermatozoa. *Dev. Biol.*, 146, 416-422.

Van Halbeek H., Strang A. M., Lhermitte M., Rahmoune H., Lamblin G. and Roussel P. (1994) Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O,Le<sup>a+b-</sup>) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure. *Glycobiology*, 4, 203-219.

Vavasseur F., Dole K., Yang J., Dole K., Paulsen H. and Brockhausen I. (1995) Characterisation of O-glycan core 3 of UDP-GlcNAc: GalNAc-R  $\beta$ 3-N-acetylglucosaminyltransferase activity from colonic tissues. Loss of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology*, 5, 351-357.

Webb D. J. and Nuccitelli R. (1985) Fertilization potential and electrical properties of the *Xenopus laevis* egg. *Dev. Biol.*, 107, 395-406.

Wieruszkeski J. M., Michalski J. C., Montreuil J., Strecker G., Peter-Katalinic J., Egge H., van Halbeek H., Mustaers J. H. G. M. and Vliegthart 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.

Wolf D. P. (1974) On the contents of the cortical granules from *Xenopus laevis* eggs. *Dev. Biol.*, 38, 14-29.

Wolf D. P. and Hedrick J. L. (1971) A molecular approach to fertilization II. Viability and artificial fertilization of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 25, 348-359.

Wolf D. P., Nishihara T., West D. M., Wyrick R. E. and Hedrick J. L. (1976) Isolation, physicochemical properties and the macromolecular composition of the vitelline and fertilization envelopes from *Xenopus laevis* eggs. *Biochemistry*, 15, 3671-3678.

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.

Yang J. M., Byrd J., Siddiki B., Chung Y., Okuno M., Sowa M., Kim Y. S., Matta K. L. and Brockhausen I. (1994) Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology*, 4, 873-884.

Yawaza S., Abbas S. A., Madiyalakan R., Barlow J. J. and Matta K. L. (1986) N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarien 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.

Yoshizaki N. (1984a) Immunoelectron microscopic demonstrations of the pre-fertilization layer in *Xenopus laevis* eggs. *Dev. Growth Differ.*, 26, 191-195.

Yoshizaki N. and Katagiri 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 the toad *Bufo bufo japonicus*. *Gamete Res.*, 6, 343-352.

Yoshizaki N. and Katagiri C. (1984b) Necessity of oviducal *pars recta* secretions for the formation of the fertilization layer in *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.*, 1, 255-264.

Yurewicz E. C., Oliphant G. and Hedrick J. L. (1975) The macromolecular composition of *Xenopus laevis* egg jelly coat. *Biochemistry*, 14, 3101-3107.

