

ÉTUDE SUR LES GLYCOPROTÉINES XLIX ISOLEMENT ET
STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DE LA FRACTION
NEUTRE DES ACÉTOLYSATS DE GLYCOPEPTIDES DE
L'OVOMUCOÏDE*

BERNARD BAYARD†, BERNARD FOURNET, STEPHANE BOUQUELET, GERARD STRECKER§,
GENEVIEVE SPIK ET JEAN MONTREUIL

Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille,
B.P. n° 3567-Lille Cedex (France) et Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des
Sciences et Techniques de Lille I, B.P. n° 36, 59650-Villeneuve d'Ascq (France)

(Reçu le 11 janvier 1972, accepté après modification le 11 août 1972)

ABSTRACT

Thirteen oligosaccharides were isolated from the neutral fraction of the acetolysis product of asialoglycopeptide β , which had been obtained by pronase hydrolysis of avian ovomucoid. The structures of the oligosaccharides are as follows: O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-mannopyranose, O - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-mannopyranose, O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose.

*Dédicé au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire. Les principaux résultats de ce travail ont été mentionnés dans une revue générale récente¹. Ils ont, en outre, été rassemblés dans le mémoire de thèse de 3ème cycle de B. Bayard.

†Attaché de Recherche au C.N.R.S.

§Charge de Recherche au C.N.R.S.

SOMMAIRE

Treize oligosaccharides ont été isolés à partir de la fraction neutre des acetolysats de l'asialoglycopeptide β obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde de poule. Ces composés possèdent les formules suivantes : O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-mannopyranose, O - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-mannopyranose, O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose, O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose.

INTRODUCTION

Dans le mémoire précédent², nous avons décrit un procédé général de fractionnement par chromatographie sur résines échangeuses d'ions des acetolysats de polysaccharides libres ou conjugués qui fournit, dans le cas particulier de sialoglycopeptides, trois séries de composés des sialosides, des oligosaccharides neutres et des glycoprotides correspondant, respectivement, aux parties externe, centrale et interne des groupements glycanniques. Dans le présent mémoire, nous décrivons les procédés qui nous ont permis d'isoler et de déterminer la structure de 13 oligosaccharides présents dans la fraction neutre des acetolysats du glycopeptide β de l'ovomucoïde²⁻⁴.

PARTIE EXPERIMENTALE

Acétolyse et fractionnement des acetolysats — L'asialoglycopeptide β (25 g) de l'ovomucoïde^{3,4} de Fredericq et Deutsch⁵ a été acétolysé pendant 4 jours, puis saponifié par le méthylate de sodium et fractionné sur des colonnes (8 \times 60 cm) de Dowex 50 (X-2, 100 « mesh », H⁺) et de Duolite A-102 D (25-50 « mesh », HCO₃⁻) selon le mode opératoire antérieurement décrit². On obtient, de cette manière, 12 g environ de Fraction Neutre (FN). Celle-ci est soumise à une chromatographie sur

colonne (4×50 cm) de charbon-Célite⁶ Le D-galactose et le D-mannose sont éliminés par le passage de 5 l d'eau distillée et les oligosaccharides sont élués par des solutions aqueuses d'éthanol à 1,5, 3,5, 5, 7,5, 10 et 15% (v/v) (débit 15 ml/h) On obtient, de cette manière, les fractions FNC₁₋₅ à FNC₁₅ à partir desquelles l'isolement des oligosaccharides et la purification de chacun d'eux sont réalisés en soumettant d'abord chaque fraction à une chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3 dans les systèmes de solvants suivants Solv 1 alcool butylique-acide acétique-eau (4 1 5, v/v) (durée de la chromatographie 1 à 4 jours), Solv 2 acetate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 5 1 3, v/v) (durée de la chromatographie 1 à 2 jours) Dans quelques cas particuliers, nous avons, en outre, utilisé l'electrophorèse préparative sur papier Whatman n° 3 dans les conditions suivantes tampon borate de sodium à 1% (p/v) de pH 9,2, cuve d'électrophorèse en toit, 7 V/cm pendant 4 h, purification de l'oligosaccharide par passage sur une colonne (1 × 5 cm) de charbon-Célite et élution du composé par une solution aqueuse d'éthanol à 50%, après un lavage soigneux à l'eau distillée

Identification et dosage des monosaccharides — Les quantités de monosaccharides neutres et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose présents dans chaque oligosaccharide ont été déterminées par l'application des procédés colorimétriques que nous avons décrits dans le mémoire précédent² Les monosaccharides neutres (D-galactose, D-mannose) ont été identifiés par chromatographie sur papier dans les solvants décrits dans le paragraphe précédent après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2M, à 100° pendant 2 h, des oligosaccharides et purification des hydrolysats sur résines échangeuses d'ions⁷

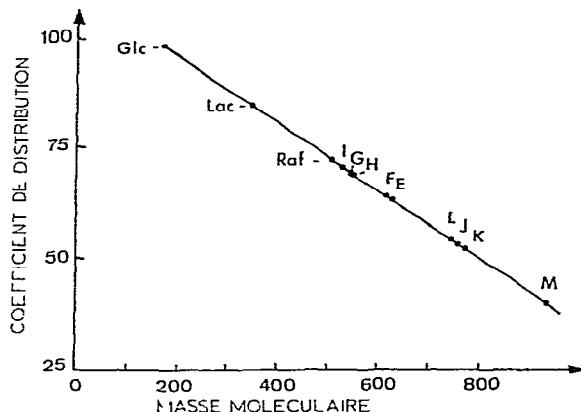


Fig 1 Determination de la masse moléculaire des oligosaccharides E à M (voir Tableau I) par chromatographie sur gel de Sephadex selon Bhatti et Clamp⁸ Conditions expérimentales 0,4 mg de substance en solution dans 0,2 ml de chlorure de sodium 0,15M, colonnes ($1,8 \times 130$ cm) de Sephadex G-25 « fine » déplacement par le chlorure de sodium 0,15M (débit 0,2 ml/min), repérage des composés par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique¹⁹ Le coefficient de distribution a été déterminé par rapport au D-glucose et au Bleu Dextran Glc D-glucose, Lac lactose, Raf raffinose

Détermination de la masse moléculaire des oligosaccharides — La masse moléculaire des oligosaccharides a été déterminée par une méthode de réduction à l'aide d'un borohydrure alcalin et par chromatographie sur gel de Séphadex. Dans la réduction par le borohydrure de sodium, le mode opératoire d'Adam-Chosson et Montreuil⁷ a été légèrement modifié de la manière suivante : les oligosaccharides réduits sont purifiés par une chromatographie sur échangeurs de cations et l'acide borique de l'effluent préalablement évaporé à siccité est éliminé en reprenant 4 fois successivement le résidu sec par 20 ml de méthanol-acide acétique (4/1) que l'on élimine par distillation sous pression réduite. La composition des oligosaccharides est ensuite déterminée par l'application des procédés colorimétriques et chromatographiques décrits ci-dessus. En outre, le polyol présent dans les hydrolysats chlorhydriques (acide chlorhydrique 2M à 100° pendant 2 h) des oligosaccharides préalablement purifiés sur Duolite A-102 D (25-50 « mesh », HCO_2^-) est identifié par chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le Solv 2 (R_{Man} du 2-amino-2-desoxy-D-glucitol 0,56, du 2-amino-2-desoxy-D-glucose 0,68, du D-galactose 0,80, du D-mannitol 0,88).

La chromatographie sur gel de Séphadex a été effectuée selon la méthode de Bhatti et Clamp⁸ (Fig. 1).

Détermination de la structure des oligosaccharides par la méthode de méthylation — Les oligosaccharides ont été méthylés par l'iodure de méthyle dans la *N,N*-diméthylformamide selon Kuhn *et al.*⁹ Le produit obtenu est ensuite repris par 1 ml d'iodure de méthyle 250 mg d'oxyde d'argent et 150 mg de sulfate de calcium anh sont ajoutés et le mélange est chauffé à reflux pendant 20 h, en ajoutant toutes les 4 h les mêmes quantités des trois réactifs. On filtre, lave le filtre avec du chloroforme puis évapore à siccité sous pression réduite.

Les oligosaccharides perméthylés sont traités par 1 acide chlorhydrique 4M, à 100° pendant 4 h, puis l'acide chlorhydrique est éliminé par distillation sous vide à 30°. Les éthers méthyliques des monosaccharides sont ensuite identifiés par une électrophorèse préparative dans un tampon acétate de pyridine de pH 3,9, on sépare, de cette manière, les monosaccharides méthylés neutres et les dérivés méthylés du 2-amino-2-désoxy-D-glucose¹⁰. Les premiers sont d'abord transformés en méthylglycosides par l'action du gaz chlorhydrique M dans le méthanol en tubes scellés sous vide, pendant 8 h à 100°. La solution est ensuite traitée par du carbonate de plomb, filtrée et évaporée à siccité sous vide. Le résidu est repris par du chloroforme ou par du méthanol et analysé par chromatographie en phase gazeuse (voir Tableau II). Les éthers méthyliques du 2-amino-2-desoxy-D-glucose sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse des *O*-acétyl-*O*-méthyl-D-arabinitol formés par désamination oxydative des dérivés *O*-méthylés du 2-amino-2-désoxy-D-glucose par la ninhydrine¹¹.

Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides — Nous avons utilisé les glycosidases suivantes : β -D-galactosidase (E C 3 2 1 23) de la rate de bœuf¹², α -D-galactosidase (E C 3 2 1 22) des graines de fenugrec¹³, α -D-mannosidase (E C 2 2 1 24) de la fève Jack¹⁴, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (E C 3 2 1 30) de la fève Jack¹⁵. L'hydrolyse des oligosaccharides (2MM) a été effectuée en présence de 0,1 à 1 unité d'enzyme,

à 37° pendant 48 h, dans un tampon citrate de sodium 0,01M-phosphate disodique 0,1M de pH 4,6 pour la β -D-galactosidase et pour l' α -D-mannosidase, de pH 5,4 pour la N-acetyl- β -D-glucosaminidase et de pH 5,5 pour l' α -D-galactosidase. Après arrêt de l'action des enzymes par chauffage à 70° pendant 1 à 2 min, les monosaccharides libérés ont été dosés par reductimétrie¹⁶ et le 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose par colorimétrie à l'aide d'un réactif au borate-*p*-diméthylaminobenzaldehyde¹⁷, après purification des hydrolysats sur Dowex 50 (X-8, 25-50 « mesh », H⁺) puis sur Duolite A-102 D (25-50 « mesh », HCO₃⁻)

Action du chlorure de triphényltétrazolium — Pour confirmer, dans les oligosaccharides C, E et F, la substitution du groupement hydroxyle en position 2 du résidu de D-mannose placé en position terminale réductrice nous avons utilisé le réactif au chlorure de triphényltétrazolium¹⁸ qui fournit une coloration rouge uniquement avec les glucides dont le groupement hydroxyle en position α du groupement carbonylé est libre

Acétolyse des oligosaccharides — Les oligosaccharides de masse moléculaire supérieure, natifs et réduits, ont été acétolysés pendant 1 à 2 jours et les acétolysats ont été saponifiés et purifiés sur échangeurs d'ions dans les conditions décrites dans le précédent mémoire². Les glucides, natifs ou réduits, présents dans la Fraction Neutre des acétolysats ont été isolés par chromatographie préparative sur papier et leur structure a été déterminée par l'application des procédés décrits ci-dessus

RÉSULTATS

Isolement des oligosaccharides — Toutes les fractions obtenues par chromatographie sur charbon-Celite sont hétérogènes, à l'exception de la Fraction FNC₅ qui ne contient que 1 oligosaccharide D (Tableau I). L'isolation des autres glucides a été réalisée par chromatographie et, parfois, par électrophorèse préparatives sur papier des différentes fractions FNC de la manière suivante. La Fraction FNC_{3,5} a donné par chromatographie sur papier dans le Solv 2 les oligosaccharides C, H et J à l'état pur. Dans un premier temps, la chromatographie sur papier de la Fraction FNC₅ dans le Solv 2 fournit 1 oligosaccharide M pur et le mélange des oligosaccharides A et B que l'on sépare, dans un second temps, par électrophorèse sur papier à pH 9,2. La chromatographie sur papier dans le Solv 2 de la Fraction FNC_{7,5} permet d'obtenir les oligosaccharides G, K et L⁴ purs. La Fraction FNC₁₀ contient les oligosaccharides E et F qui peuvent être séparés par chromatographie sur papier dans le Solv 1. Tous les oligosaccharides que nous avons obtenus sont homogènes en chromatographie et en électrophorèse. Cette homogénéité a été ultérieurement confirmée par les résultats des expériences de méthylation.

*Deux autres glucides (oligosaccharides N et O) ont, en outre, été isolés en faible quantité et nous n'avons pu déterminer, jusqu'à présent, que leur composition molaire. Il s'agit de 2 hexasaccharides constitués de 3 résidus de D-mannose et de 3 résidus de 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose.

TABLEAU 1
CARACTÉRISTIQUES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLÉS DE LA I RACTION NEUTRE DIS ACI TOLYSATS DE L'ASIALOGI Y COPRIPIDE β DE L'OVOMUCOIDE

Caractéristiques	Oligosaccharides												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Rendement (%) ^a	2,1	0,6	12,2	0,9	2,0	4,6	0,6	2,0	4,2	2,1	2,0	2,4	
Conc en éthanol (%) de l'éluant de la colonne	5	5	3,5	1,5	10	10	7,5	3,5	3,5	7,5	7,5	5	
Chromatographie sur papier, $R_{f\alpha t}$													
Solv 1	0,87	0,85	0,81	0,78	0,75	0,60	0,55	0,50	0,39	0,38	0,35	0,31	
Solv 2	0,96	0,93	0,81	0,79	0,74	0,69	0,63	0,48	0,40	0,46	0,36	0,27	
Electrophorèse sur papier <i>Mallinexach D</i> ^b	0,92	0,69	0,68	1	0,79	0,80	0,81	0,94	0,84	0,75	0,79	0,79	
Rapport des monosaccharides neutres au 2-acétamido-2-désoxy-D glucose													
Avant réduction	1,22	1,07	1,22	0,58	0,55	2,32	2,08	1,96	1,99	0,90	0,53	0,47	
Après réduction													
Composition moléculaire													
Avant réduction, D-galactose													
D-mannose	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	
2-acétamido 2-désoxy													
D glucose	0,82	0,93	0,82		1,71	1,80	0,86	0,96	1,02	1,83	2,21	2,10	3,22
Après réduction, D-galactose													
D-mannose	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
2-acétamido 2-désoxy-													
D glucose	0,83	0	0,81		1,70	1,81	1,01	0,78	1,11	1,87	2,11	2,00	3,30
Masse moléculaire déterminée													
par réduction													
par chromatographie sur Séphadex													
Révélation par le triphényletérazolium	+		—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	

^a A partir de l'asialoglycopptide β ^b Déplacément anodique relatif à l'oligosaccharide D

Structure des oligosaccharides — La structure complète des 13 oligosaccharides A à M a été déterminée sur la base des résultats expérimentaux suivants (a) Tous les oligosaccharides possèdent un résidu de D-mannose en position terminale réductrice, à l'exception de l'oligosaccharide B dans lequel cette position est occupée par un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, (b) l'hydrolyse des oligosaccharides perméthylés contenant un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose fournit toujours du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose, à l'exception de l'oligosaccharide B qui donne du 2-désoxy-3,6-di-O-méthyl-D-glucose. Dans tous ces oligosaccharides (sauf B), un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose se trouve donc en position terminale non réductrice, (c) en outre, les résultats particuliers suivants ont été obtenus.

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

L'oligosaccharide B possède toutes les propriétés chimiques (Tableaux I, II et III) du *O*- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose (*N*-acetyllactosamine) qui avait déjà été isolé des produits de l'hydrolyse ménagée de l'ovomucoïde⁷. Il est, en outre, totalement hydrolysé par la β -D-galactosidase de la rate de bœuf.

TABLEAU II

IDENTIFICATION^a, PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE^b, DES ETHERS MÉTHYL LIQUES DU D-MANNOSE PRÉSENTS DANS LES HYDROLYSATS DES OLIGOSACCHARIDES A-M PERMÉTHYLES

Methyl- α , β -D-mannoside	T _r ^c	Oligosaccharides													
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
2,3,4,6-Tetra-O-méthyl	1					+					—				
3,4,6-Tri-O-méthyl	2,16				+					+	—				
2,4,6-Tri-O-méthyl	2,46				+				+	+		+			
2,3,6-Tri-O-méthyl	3,23	+							+				+		
3,4-Di-O-méthyl	5														
2,4-Di-O-méthyl	6,13														
3,6-Di-O-méthyl	6,93							+				+		+	+
2,6-Di-O-méthyl	7,66										+	+		+	+
4,6-Di-O-méthyl	8,62						+								
2,3-Di-O-méthyl	9,36														

^aSous la forme de methyl- α , β -D-mannosides. ^bConditions expérimentales. Appareil Aerograph 1200 détection par ionisation de flamme, colonne de verre (0,2 × 300 cm), phase stationnaire 3% de Carbowax 6 000 sur Chromosorb WHMDS (60–80 « mesh »), température 170°, gaz vecteur azote (debit 30 ml/min). ^cTemps de retention relatif au methyl-2,3,4,6-tetra-O-méthyl- α , β -D-mannoside¹⁰.

TABLEAU III

IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES *O*-METHYL-*O*-ACETYL-D-ARABINITOLS OBTENUS A PARTIR DES ETHERS METHYLIQUES DU 2-ACETAMIDO-2-DESOXY-D-GLUCOSE PRESENTS DANS LES HYDROLYSATS DES OLIGOSACCHARIDES A-M PERMETHYLES^a

<i>O</i> -Methyl- <i>O</i> -acetyl-D-arabinitol	T_r^b	<i>Oligosaccharide</i>	
		<i>A, C a M</i>	<i>B</i>
1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl ^c	1		
1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl	0,77	+	
1,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,5-di- <i>O</i> -methyl	1,29		+

^aSelon Ref 10 et 11 ^bTemps de retention relatif au 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-arabinitol

^cCe témoin interne a été choisi à dessein car il ne figure pas parmi les produits de la désamination par la ninhydrine des éthers méthyliques du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose habituellement présents dans les hydrolysats de glycannes perméthylés

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

L'oligosaccharide D possède les propriétés d'un mannobiose le *O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose. Cette structure a été définie sur la base des résultats suivants la réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître la moitié du D-mannose tandis qu'apparaît du mannitol. Le disaccharide perméthyle donne du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose et du 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-mannose. Il est totalement hydrolysé par l' α -D-mannosidase de la fève Jack. Il est intéressant de signaler que le même mannobiose a été obtenu à partir des hydrolysats acides partiels de l'ovomucoïde²⁰.

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

L'oligosaccharide F a été identifié au *O*-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-D-mannopyranose de la manière suivante. Il est constitué de 2 résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et d'un résidu de D-mannose qui disparaît par réduction. Sa masse moléculaire mesurée par chromatographie sur Sephadex est de 610 (calc pour un trisaccharide 586). La méthylation fournit, outre du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose, du 3,6-di-*O*-méthyl-D-mannose. L'acétylase conduit à un mélange des deux.

disaccharides A et C Le trisaccharide est hydrolysé par la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase de la fève Jack en 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et en D-mannose Il n'est pas révélé par le réactif au chlorure de triphényltétrazolum

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

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

L'oligosaccharide I est un isomère des deux trisaccharides G et H précédents dont il diffère par la position du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose qui est, cette fois, conjugué sur le résidu de D-mannose en position terminale réductrice Il s'agit du *O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose Il possède donc, comme le trisaccharide H, les caractéristiques du trisaccharide G sauf en ce qui concerne les produits de la méthylation qui sont le 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose, le 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose et le 2,6-di-*O*-méthyl-D-mannose En outre, on obtient par acétolyse les oligosaccharides A et D et, par hydrolyse à l'aide de la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase de la fève Jack, du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le disaccharide D

L'oligosaccharide J est le *O*-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-*O*-[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose En effet, il renferme du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et du D-mannose en proportions identiques et la réduction par le borohydrure de sodium élimine la moitié des résidus de D-mannose, sa masse moléculaire précisée par chromatographie sur Séphadex est de 750 (calc pour un tétrasaccharide 748), on obtient par perméthylation, du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose, du 3,4,6-tri-*O*-méthyl-D-mannose et du 2,6-di-*O*-méthyl-D-mannose, l'acétolyse fournit une faible quantité de disaccharides A, C et D et une quantité importante des trisaccharides H et I, l'hydrolyse par la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase de la fève Jack libère du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le disaccharide D

L'oligosaccharide K est un tétrasaccharide isomère du précédent par la position des deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose qui sont fixés sur le résidu médian

de D-mannose. Il possède la structure du O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose. Certaines de ses propriétés sont donc celles de l'oligosaccharide J dont il diffère néanmoins par la nature de l'un des dérivés méthyles du D-mannose qui est le 2,4,6-tri- O -méthyl-D-mannose et par les produits de l'acétolyse qui sont les oligosaccharides F, G et H.

L'oligosaccharide L est aussi un isomère du tétrasaccharide J. Il s'agit du O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose. Il conduit, en effet, aux mêmes résultats expérimentaux que l'oligosaccharide J, aux différences près suivantes : la perméthylation fournit, outre du 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri- O -méthyl-D-glucose et du 2,6-di- O -méthyl-D-mannose, du 2,3,6-tri- O -méthyl-D-mannose et l'acétolyse libère les oligosaccharides A, D, G et I.

L'oligosaccharide M possède la structure du O -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- O -[2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- O - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O -[2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-D-mannopyranose. Cette structure a été déterminée de la manière suivante. Les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et de D-mannose sont dans le rapport 3/2. La moitié de la quantité de D-mannose qu'il renferme disparaît lors de la réduction par le borohydrure de sodium. Il s'agit donc d'un pentasaccharide d'une masse moléculaire, déterminée par chromatographie sur Séphadex, de 930 (calc pour un pentasaccharide 950). Après perméthylation, on identifie le 2-amino-2-désoxy-3,4,6-tri- O -méthyl-D-glucose, les 2,6- et 3,6-di- O -méthyl-D-mannoses. L'hydrolyse par la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase de la fève Jack libère du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Enfin, nous avons identifié dans les acétolysats les trisaccharides G, H et I et les tétrasaccharides J, K et L.

DISCUSSION

Les comportements des hétero-oligosaccharides au cours de la chromatographie sur charbon-Celite sont étonnantes et difficiles à prévoir, mis à part l'effet retardateur du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose⁷. En effet, des oligosaccharides isomères possèdent des comportements différents comme, par exemple, les trisaccharides H et G qui sont élusés, respectivement, avec de l'éthanol aqueux à 3,5 et à 7,5%. En outre, des oligosaccharides de masses moléculaires très distinctes comme, par exemple, les deux disaccharides A et B, d'une part, et le pentasaccharide M, d'autre part, sont déplacés par l'éthanol aqueux à 5%. Le comportement des oligosaccharides sur charbon est donc étroitement lié à leur structure sans qu'il nous soit possible, pour l'instant, de tirer des règles générales des résultats que nous avons obtenus. Toutefois, les chromatographies sur charbon sont extrêmement reproductibles et cette observation est à la base d'un procédé de carte chromatographique que nous avons décrit dans un mémoire antérieur²¹.

La connaissance de la structure de 13 oligosaccharides que nous avons isolés de

la Fraction Neutre des acétolysats de l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde permet de poser en hypothèse que l'acétolyse coupe préférentiellement les liaisons glycosidiques des monosaccharides neutres. En effet, aucun des oligosaccharides obtenus dans la Fraction Neutre, à l'exception de la *N*-acétyllactosamine, ne possède un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose en position terminale réductrice et nous avons démontré, dans le précédent mémoire², que les procédés d'acétolyse et de saponification des acétolysats n'entraînaient pas de destruction du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Toutefois, cette hypothèse demande à être confirmée par l'étude des composés glucidiques de la Fraction Basique et de la Fraction Acide des acétolysats. L'emploi de l'acétolyse dans l'exploration de la structure des glycannes n'exclut donc pas celui de l'hydrolyse partielle par les résines de polystyrène sulfoné. Les deux procédés sont, en effet, complémentaires puisque dans ce dernier cas la majeure partie des saccharides possèdent, en position terminale réductrice, un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dont les liaisons sont les moins stables vis-à-vis des agents acides d'hydrolyse⁷.

Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas interprétables du point de vue de la connaissance de la structure de la fraction glycannique de l'ovomucoïde. En effet, il est impossible de reconstituer quelque structure que ce soit à partir des trop nombreux fragments oligosaccharidiques que nous avons isolés. Tout au plus pourrions-nous faire figurer dans le schéma la formule du pentasaccharide M sans toutefois être à même de préciser sa position au sein du glycanne. De toute façon, la fraction des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde que nous avons étudiée provenait de deux variants de l'ovomucoïde (asialo-ovomucoïdes 1 et 2)^{2,2}. Chaque variant renfermant 2 groupements glycanniques, la fraction « glycopeptide β » est donc un mélange de 4 glycopeptides dont rien ne prouve *a priori* que leurs structures soient identiques. Les résultats de l'acétolyse pourront donc être interprétés seulement quand l'isolement de chacun des glycannes des ovomucoïdes 1 et 2 aura été réalisé.

Toutefois, les oligosaccharides que nous avons isolés en quantité importante sont, dès à présent, extrêmement précieux, d'une part pour mettre au point le procédé de carte chromatographique^{2,1} des produits d'acétolyse des glycopeptides que nous avons mentionné, d'autre part pour préparer certains éthers méthyliques du mannose et enfin pour étudier les relations entre la conformation des saccharides et l'activité ainsi que la spécificité de *N*-acétyl- β -D-glucosaminidases et d' α -D-mannosidases d'origines diverses.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Madame Danielle Roux, de Mademoiselle Anick Poitau et de Monsieur Yves Leroy auxquels nous adressons nos vifs remerciements. Il a bénéficié d'une aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Actions Concertées-Convention 66-CR-228), de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (Opération « Espoir ») et du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche Associée n° 320 Struc-

ture et Métabolisme des Glycoprotéines) Nous remercions le Professeur E Buddecke pour son échantillon de phényl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-glucopyranoside et le Professeur J. K. N Jones qui nous a fourni tous les éthers méthyliques de l'arabinitol

RÉFÉRENCES

- 1 J MONTREUIL, *Pure Appl Chem*, 27 (1971) 549
- 2 B BAYARD ET J MONTREUIL, *Carbohydr Res*, 24 (1972) 427
- 3 J MONTREUIL, G BISERTE ET A CHOSSON, *C R Acad Sci, Paris*, 256 (1963) 3372
- 4 M MONSIGNY, A ADAM-CHOSSON ET J MONTREUIL, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 857
- 5 E FREDERICQ ET H F DEUTSCH, *J Biol Chem*, 181 (1949) 499
- 6 R L WHISTLER ET D F DURSO, *J Amer Chem Soc*, 44 (1950) 166
- 7 A ADAM-CHOSSON ET J MONTREUIL, *Bull Soc Chim Biol*, 47 (1965) 1881
- 8 T BHATTI ET I R CLAMP, *Biochim Biophys Acta*, 170 (1968) 206
- 9 R KUHN, H H BAER ET A GAUHE, *Ber*, 89 (1956) 2514
- 10 B FOURNET ET J MONTREUIL, résultats non publiés
- 11 J C WILLIAMS ET J. K N JONES, *Can J Chem*, 45 (1967) 275.
- 12 E BUDDECKE ET E WERRIES, *Z Naturforsch*, 19b (1964) 798
- 13 S BEAUGIRAUD, F PERCHERON, J E COURTOIS ET C LANCHEC, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 621
- 14 Y T LI, *J Biol Chem*, 241 (1966) 1010
- 15 S C LI ET Y T LI, *J Biol Chem*, 245 (1970) 5133
- 16 J MONTREUIL ET N SCHEPPLER, *Bull Soc Chim Biol*, 41 (1959) 13
- 17 T A GOOD ET S P BESSMAN, *Anal Biochem*, 9 (1964) 253
- 18 W E TREVELYAN, D P PROCTER ET J S HARRISON, *Nature*, 444 (1950) 166
- 19 M DUBOIS, K GILLES, J K HAMILTON, P A REBERS ET F SMITH, *Nature*, 168 (1951) 167
- 20 B FOURNET, G TAKERKART, J BROHON ET J MONTREUIL, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 1351
- 21 B BAYARD, G STRECKER ET J MONTREUIL, *C R 6^e Symp Intern Électroph*, Bruxelles, 1970, Presses Acad Eur, 1971, p 240
- 22 E JAKUBCZAK ET J MONTREUIL, *C R Acad Sci, Paris, Ser D*, 171 (1970) 537