

DETERMINATION DE LA STRUCTURE D'UN HEPTASACCHARIDE ISOLE DU LAIT DE FEMME: LE LACTO-*N*-FUCOHEPTAOSE

Louis GRIMMONPREZ, Michel DELAUTRE, Stéphane BOUQUELET et Jean MONTREUIL

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I et L.A.

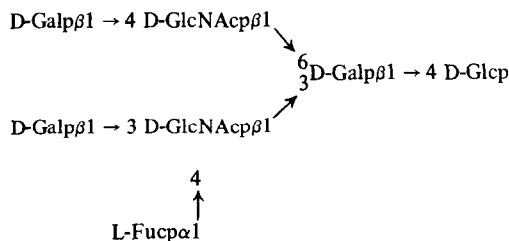
n° 217 du C.N.R.S., B.P. n° 36, 59650 - Villeneuve d'Ascq, France

Received 3 December 1974

Revised version received 8 January 1975

Summary

A new heptasaccharide, lacto-*N*-fucoheptaose has been isolated from human milk. It contains D(+)-galactose, D(+)-glucose, L(-)-fucose and *N*-acetyl-D(+)-glucosamine in a 3 : 1 : 1 : 2 ratio. The glucose residue is at the reducing end of the oligosaccharide. Data obtained by partial acid hydrolysis, permethylation and enzymic hydrolysis establish the structure of lacto-*N*-fucoheptaose as follows:



1. Introduction

Dans des mémoires antérieurs [1,2], nous avons décrit 30 nouveaux oligosaccharides que nous avons isolés de la fraction du lait de Femme non précipitable par le sulfate d'ammonium à saturation et à pH 3,6. L'un d'eux était un heptasaccharide constitué de D(+) – galactose, de D(+) – glucose, de L(–) – fucose et de *N*-acétyl-D(+) – glucosamine dans les rapports molaires suivants: 3 : 1 : 1 : 2, le résidu de glucose étant en position terminale réductrice. Par l'application de procédés classiques nous avons déterminé la structure de cet heptasaccharide et nous la décrivons dans le présent mémoire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Hydrolyse acide partielle

L'hydrolyse par H₂SO₄ 0.05 N, à 100°C pendant

1 h coupe sélectivement la liaison fucosyl et libère un oligosaccharide qui est purifié par chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant de Jermyn et Isherwood [3]: pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2).

L'hydrolyse par H₂SO₄ 0.5 N, à 100°C pendant 15 mn, libère 12 oligosaccharides. La chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant précédent permet d'obtenir d'emblée 10 oligosaccharides purs et une fraction refermant 2 tétrasaccharides qui sont isolés, dans un second temps, en soumettant cette fraction à une chromatographie préparative dans le système-solvant *n*-propanol/eau (70 : 30)

2.2. Perméthylation

L'heptasaccharide natif ou défucosylé a été réduit par le borohydrure de sodium, puis perméthylé en appliquant successivement les procédés de Kuhn et al.

[4] et de Hakomori [5]. Les oligosaccharides perméthylés ont été hydrolysés par HCl 4 N, à 100°C pendant 4 h. Après élimination sous vide de l'acide chlorhydrique, les éthers méthyliques ont été identifiés en appliquant le procédé de Fournet et al. [6].

L'hydrolysats est soumis à une électrophorèse préparative sur papier Whatman n° 3 dans le tampon de Michl [7] de pH 3,9 (pyridine/acide acétique/eau : 3 : 10 : 387; 7 V/cm pendant 15 h) qui fournit une fraction 'neutre' et une fraction 'basique'. Après métyl-glycosylation (méthanol-HCl 0.5 N; 100°C pendant 8 h), la fraction 'neutre' est reprise par du méthanol, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse (colonne de verre de 0.3 × 300 cm remplie de Carbowax 6000 à 3 p. 100 sur Chromosorb W de 'mesh' 60-80; température programmée de 140°C à 190°C; débit du gaz vecteur (azote): 20 ml/min). La fraction 'basique' est triméthylsilylée, reprise par l'heptane, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse (colonne de verre de 0.2 × 180 cm remplie de Silicone OV 17 à 3 p. 100 sur Chromosorb W de 'mesh' 100-200; température 140°C; débit du gaz vecteur (azote): 20 ml/min).

2.3. Hydrolyses enzymatiques

Les deux tétrasaccharides isomères obtenus par hydrolyse sulfurique partielle ont été soumis à l'action des glycosidases suivantes, dans les tampons de McIlvaine [8] : à pH 5,3 de la *N*-acétyl-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30) et de la β-D-galactosidase (EC 3.2.1.23) de fève Jack [9], ce derenzyme hydrolysant facilement le lactose; à pH 5, de la β-D-galactosidase (EC 3.2.1.30) de foie de Boeuf (Sigma, grade III), cette dernière préparation n'hydrolysant pas le lactose et manifestant, en outre, une activité *N*-acétyl-β-D-glucosaminidasique équivalente au tiers environ de l'activité β-D-galactosidasique.

Le tétrasaccharide obtenu après hydrolyse enzymatique de l'heptasaccharide par la β-D-galactosidase et la *N*-acétyl-β-D-glucosaminidase de fève Jack a été soumis à l'action de l'α-L-Fucosidase (EC 3.2.1.-) de *Charonia lampas* [10] dans le tampon de McIlvaine de pH 4.6.

Les hydrolysats ont été purifiés sur colonnes de résines échangeuses de cations et d'anions, puis chromatographiés sur papier Whatman n° 3 MM dans le système-solvant pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2) en vue d'identifier les produits de dégradation enzymatique.

3. Résultats et discussion

L'hydrolyse par H₂SO₄ 0.05 N détache le résidu de fucose et un hexasaccharide.

L'hydrolyse par H₂SO₄ 0.5 N libère 12 oligosaccharides parmi lesquels;

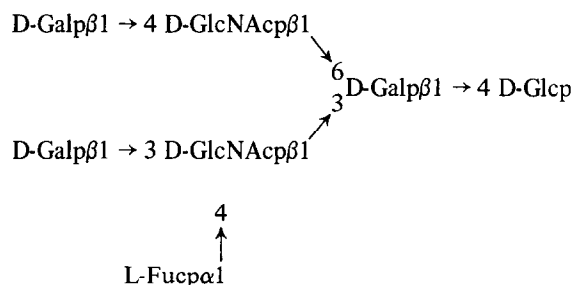
1) 2 tétrasaccharides dont les structures sont celles du lacto-*N*-tétraose (voir les revues générales de Kuhn [11] et de Montreuil [12]): Galβ1 → 3 GlcNAcβ1 → 3 Galβ1 → 4 Glc et d'un nouveau tétrasaccharide: Galβ1 → 4 GlcNAcβ1 → 6 Galβ1 → 4 Glc

2) 6 oligosaccharides qui ont été identifiés, d'après leur comportement chromatographique et leur composition, aux lacto-*N*-trioses I (Galβ1 → 3 GlcNAcβ1 → 3 Gal) et II (GlcNAcβ1 → 3 Galβ1 → 4 Glc), aux lacto-*N*-bioses I (Galβ1 → 3 GlcNAc) et II (GlcNAcβ1 → 3 Gal) de Kuhn [10], à la *N*-acétyllactosamine (Galβ1 → 4 GlcNAc) et au lactose.

Dans les hydrolysats des oligosaccharides perméthylés, nous avons identifié les monosaccharides méthylés suivants: *Oligosaccharide natif*: le 2,3,4,6 tétra-*O*-méthylgalactose, le 2,4 di-*O*-méthylgalactose, le 1,2,3,5,6 penta-*O*-méthylglucitol, la 3,6 di-*O*-méthylglucosamine et la 6-*O*-méthylglucosamine. *Oligosaccharide défucosylé*: les monosaccharides méthylés obtenus sont identiques à ceux que fournit l'oligosaccharide natif à l'exception des dérivés de la glucosamine qui sont la 3,6 et la 4,6 di-*O*-méthylglucosamine.

Les glycosidases du foie de Boeuf libèrent quantitativement 2 résidus de galactose, 1 résidu de *N*-acétylglucosamine et 1 résidu de lactose. Les glycosidases de la fève Jack libèrent 2,3 à 2,6 résidus de galactose, 0,4 à 0,7 résidu de glucose, 1 résidu de *N*-acétylglucosamine et 0,3 à 0,6 résidu de lactose. La préparation enzymatique de *Charonia lampas* libère 0,3 à 0,5 résidu de fucose.

Les résultats obtenus permettent d'attribuer à l'heptasaccharide la formule suivante:



Cette structure résulte de la substitution de lacto-*N*-hexaose de Kobata et Ginsburg [13] par un résidu de fucose, ce qui justifie la terminologie proposée de lacto-*N*-fucoheptaose.

Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements à Y. Leroy pour sa précieuse collaboration technique. Ce travail a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé n° 217: Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) et de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

Références

- [1] Grimmonprez, L. (1972) Thèse Doct. Sci., Lille.
- [2] Grimmonprez, L. et Montreuil, J. Biochimie (sous presse).
- [3] Jermyn, M. A. et Isherwood, F. A. (1949) Biochem. J. 44, 402.
- [4] Kuhn, R., Baer, H. H. et Gauhe, A. (1956) Ber. 89, 2519.
- [5] Hakomori, S. (1964) J. Biochem. 55, 205.
- [6] Fournet, B., Leroy, Y., Montreuil, J. et Mayer, J. (1974) Actes du Colloque International du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd., 111.
- [7] Michl, H. (1951) Monatsch, Chem. 82, 489.
- [8] McIlvaine, J. C. (1921) J. Biol. Chem. 49, 183.
- [9] Li, S. C. et Li, Y. T. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5153.
- [10] Egami, F. (1974) Actes du Colloque International du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd., 289.
- [11] Kuhn, R. (1958) Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 297.
- [12] Montreuil, J. (1960) Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 1399.
- [13] Kobata, A. et Ginsburg, V. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1525.