

PROCEDES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

JEAN MONTREUIL

*Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et des
Techniques de Lille I ; Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de
Recherches sur le Cancer de Lille, France*

ABSTRACT

At this present time, no isoglycan (branched glycan) structure is completely determined. We shall analyse the main reasons why classical methods for studying polysaccharide structures do not work in this particular case. These reasons are:

1. Complexity of the isoglycanic structures.
2. Occurrence of variants and of several different carbohydrate residues for a single variant leading to 'statistical' results only.
3. Interference with protein moieties.
4. Analytical methods that are not completely satisfactory.

Chance of success is related to application of the following imperative rules:

1. Isolation of the different variants and each of their glycanic residues.
2. Application of analytical methods on glycopeptides but never on the native glycoproteins.
3. Finding of new methods for specific ruptures of glycosidic bonds.
4. Improvement of the permethylation methods of polysaccharides and of the further analysis of the *O*-methyl derivatives of monosaccharides.
5. Spreading of the research fields in purification methods of exoglycosidases and studies of their specific actions. Search for endoglycosidases.

INTRODUCTION

I. Proposition de règles de nomenclature

1. *Glycoprotides*. Composés résultant de la conjugaison de glucides (glycannes) avec des protides: protéines (*glycoprotéines* ou *protéinyl-glycannes*), peptides (*glycopeptides* ou *peptidyl-glycannes*) ou acides aminés (*glyco-amino-acides* ou *amino-acyl-glycannes*).

2. *n-Glycannes*. Glycannes linéaires (type: mucopolysaccharides acides); *isoglycannes*: glycannes branchés (type: orosomucoïde).

3. *Alloglyco-homoprotéines*. Variants glycoprotéiniques différents par la composition et la structure de la fraction glucidique (exemple: les variants

de l'orosomucoïde). *Homoglyco-alloprotéines*: variance portée par la protéine seule. *Alloglyco-alloprotéines*: variance portée, à la fois, par le glycanne et par la protéine.

II. Problèmes posés par la structure des glycanes

Les problèmes que pose la structure des glycanes sont, à l'heure actuelle, surtout limités aux iso-glycanes. En effet, les *n*-glycanes sont généralement de composition et de structure simple puisqu'ils résultent de l'enchaînement linéaire d'unités disaccharidiques et il est relativement aisé de préparer le chaînon de répétition et d'en déterminer la structure. Au contraire, la structure des iso-glycanes n'a été jusqu'à présent que très partiellement élucidée en raison 1) de sa complexité; 2) du polymorphisme des glycoprotéines; 3) de l'interférence du protide; 4) du manque de méthodes analytiques.

1. *Complexité structurale des iso-glycanes*. Les iso-glycanes résultent de la conjugaison de 10 à 20 résidus de monosaccharides de nature très différente et dont les liaisons glycosidiques sont de stabilités très variables. En outre, contrairement au cas des protéines, il existe peu de procédés de rupture spécifique de ces liaisons. L'application des procédés d'hydrolyse partielle se fait donc d'une manière empirique et la reconstitution du 'puzzle' à partir des oligosaccharides obtenus par ces méthodes est pratiquement impossible. D'autre part, la structure branchée des chaînes polysaccharidiques crée de nombreux empêchements stériques qui troublent fortement les réactions chimiques et enzymatiques.

2. *Polymorphisme des glycoprotéines*. Des glycoprotéines qui répondent

Tableau 1. Propriétés des variants de l'ovomucoïde (Jakubczak, Charet, Spik, Monsigny et Montreuil^{16, 17})

	Ovomucoïde pur	Désignation des fractions (a)					
		1	2	3	4	5+6	6+7
Rendement (b)	—	1.9	3	2.4	1.65	0.45	0.18
Point isoélectrique	—	4.45	4.40	4.21	4.05	3.92	3.72
Constante de sédimentation	2.50	2.55	2.51	2.50	2.50	2.63	2.63
Volume spécifique partiel	0.685	0.681	0.684	0.684	0.685	0.683	0.683
Activité anti-trypsique (c)		Identique (7.50)					
Composition en acides aminés		Identique					
C-terminal		Lysine					
N-terminal		Alanine					
<i>Composition centésimale en glucides (d)</i>							
Oses 'neutres'	8	10	7.60	9.40	9.70	13	11.60
<i>N</i> -acétyl-glucosamine	13.50	17	13.60	12.20	10.70	15.20	12.20
Acide <i>N</i> -acétylneuraminique	0.93	0	0	1.30	2	4.10	4.50
Oses 'neutres'/Osamines	0.59	0.58	0.55	0.77	0.90	0.85	0.95
Mannose/Galactose	5	3	9	4.5	3.5	2.7	2

(a) Ces fractions ont été obtenues en associant la chromatographie sur CM-cellulose et sur DEAE-cellulose. Elles correspondent aux fractions électrophorétiques de la Figure 1.

(b) en g pour 15 mg d'ovomucoïde pur fractionné (préparation d'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch débarrassée de l'ovoflavoprotéine, de l'ovoinhibiteur de Matsushima et de l'ovoglycoprotéine de Ketterer).

(c) en µg d'ovomucoïde qui réduisent de 50 p. 100 l'activité estérasiqque de 20 µg de trypsine.

(d) en g p. 100 de la glycoprotéine.

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

aux critères classiques de pureté sont cependant constituées par un mélange de composés dont les propriétés physico-chimiques sont très voisines et dont la séparation ne peut être effectuée que dans des conditions expérimentales exceptionnelles. Ce polymorphisme a été mis en évidence par Schmid (voir, à ce sujet, la revue générale de Schmid³¹) à propos de l'orosomucoïde dont les préparations apparemment 'homogènes' donnent jusqu'à 8 bandes en électrophorèse en gel d'amidon. Ces variants ont été récemment isolés par chromatographie sur DEAE-cellulose et leur composition a été étudiée : tous possèdent la même protéine et diffèrent par la composition de leurs fractions glycaniques³⁴.

Des résultats analogues ont été obtenus avec la fétuine²⁶, l'ovo-inhibiteur trypsique de Matsushima⁸ et l'ovomucoïde¹⁷. La Figure 1 et le Tableau 1

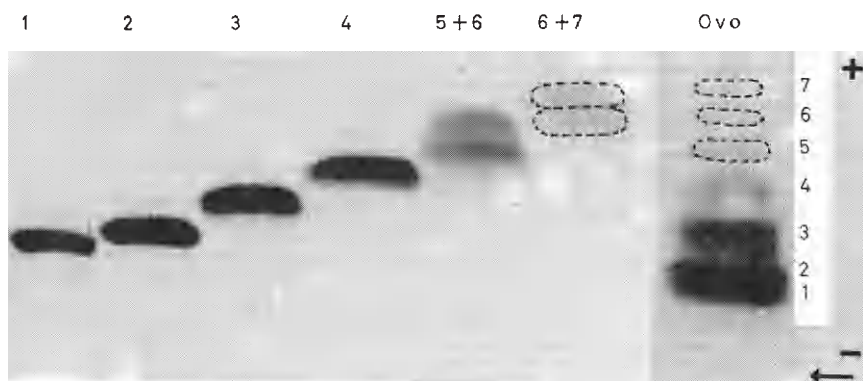


Figure 1. Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'ovomucoïde pur. Tampon acétate d'ammonium 0.05 M de pH 4.45 ; 10 V/cm pendant 3,5 h. Révélation avec le réactif à l'Amidoschwarz. Les chiffres de 1 à 7 correspondent aux fractions obtenues par chromatographie sur celluloses échangeuses d'ions de l'ovomucoïde pur (d'après Jakubczak ; résultats non publiés). Les propriétés de ces fractions sont décrites dans le Tableau 1.

qui illustrent des résultats obtenus dans notre laboratoire à propos de l'ovomucoïde sont, à cet égard, démonstratifs. On voit, en effet, que la fraction protéine semble être identique pour tous les variants (composition en acides aminés ; amino-acides N- et C-terminaux) tandis que la composition en glucides des fractions glycaniques varie dans de larges proportions (la teneur en acide N-acétylneuraminique, en particulier, qui explique les différences qu'on observe dans le comportement électrophorétique des variants).

Nous proposons d'appeler ces composés *alloglyco-homoprotéines*.

Le polymorphisme des glycoprotéines pose de sérieux problèmes dans le détermination de la composition centésimale et molaire, d'une part, et dans l'étude de la structure des glycoprotéines, d'autre part. Il introduit, en effet, une erreur à la base car il n'est plus douteux, à présent, que les unités glycaniques qui se conjuguent à la protéine (5 dans l'orosomucoïde, 2 dans la transferrine, 23 dans la thyroglobuline, par exemple) possèdent des compositions en oses et des structures différentes (voir, à cet égard, les travaux de Schmid

et coll.²⁸ et de Yamashina et coll.³⁴). Les résultats donnés par les auteurs à propos des propriétés et de la structure de certaines glycoprotéines, comme l'orosomucoïde, sont donc *statistiques* et représentent des valeurs moyennes. En effet, si chaque variant de l'orosomucoïde possède 5 unités glycaniques et puisqu'il existe 8 variants, on analyse, en fait, un mélange de 40 structures glucidiques vraisemblablement différentes!

Ce problème ne peut être résolu que par le fractionnement de glycopeptides obtenus par des ruptures sélectives—chimiques ou enzymatiques—des chaînes peptidiques de manière à isoler chacun des glycopeptides correspondant aux différentes unités glycaniques présentes dans une glycoprotéine. Nous sommes parvenus, au laboratoire, à obtenir à partir d'hydrolysats trypsiques de la transferrine, les deux glycopeptides dont les schémas de structure sont précisés dans la *Figure 2* et qui correspondent chacun à

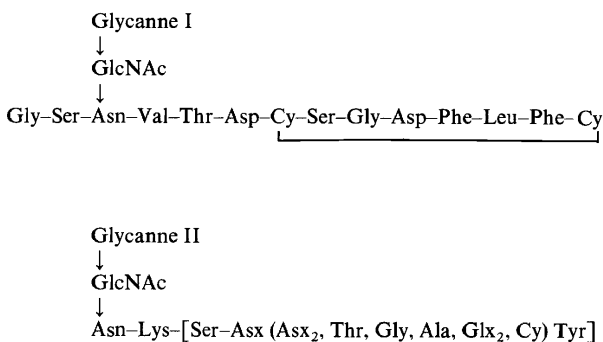


Figure 2. Structure des deux glycopeptides isolés des hydrolysats trypsiques (Charet, Monsigny, Spik et Montreuil⁷) et chymotrypsiques (segments peptidiques placés entre crochets: Charet⁶) de la transferrine humaine.

l'une des deux unités glycaniques de la glycoprotéine^{6,7}. Les premières analyses semblent montrer que les deux glycanes de la transferrine sont physico-chimiquement différents.

3. *Interférence du protide.* La fraction protidique interfère au cours de l'oxydation périodique et de la perméthylation. Elle gêne, en outre, l'action des enzymes. C'est pourquoi, la plupart des procédés d'exploration de la structure des sucres doivent être appliqués à des glycopeptides obtenus par hydrolyse protéinasiqne poussée des glycoprotéines.

4. *Imperfection des méthodes.* L'emploi des enzymes et de la méthode de perméthylation des osides qui pourraient apporter des renseignements précieux sur la structure des isoglycanes sont rarement applicables. En effet, peu de glycosidases ont été obtenues à l'état pur, leur spécificité de substrat est encore mal définie et beaucoup d'entre elles possèdent une activité glycosyl-transférasique. D'autre part, la perméthylation est difficilement interprétable car l'identification des oses méthylés d'un glycane ne peut se faire qu'en comparant leur mobilité chromatographique et leurs propriétés physico-chimiques avec celles de témoins de synthèse. Or, d'une part, les dérivés méthylés des oses sont nombreux (15 pour un hexose) et, d'autre part, leur synthèse est délicate. Si bien qu'il est souvent impossible d'identifier

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

et de doser les dérivés méthylés obtenus par hydrolyse d'un glycanne perméthylé.

Il n'existe donc pas de procédé unique de détermination de la structure des glycannes et les méthodes suivantes doivent être associées dans ce genre de recherche :

I. Méthodes de dégradation ménagée des glycannes (hydrolyse acide; acétolyse; coupure sélective des liaisons glycosaminidyl; hydrolyse enzymatique).

II. Oxydation periodique.

III. Perméthylation.

PROCEDES D'ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

I. Procédés de dégradation ménagée des glycannes

Le but poursuivi est d'effectuer, dans un premier temps, des coupures —sélectives dans la mesure du possible— des liaisons glycosidiques de manière à obtenir des oligosaccharides dont la structure peut être, en général, aisément déterminée. Dans un second temps, on essaie de réassocier les fragments obtenus pour reconstituer la molécule complète. Ces procédés sont généralement associés à des expériences 'cinétiques' qui consistent à suivre l'apparition des produits de dégradation en fonction du temps, en postulant que les premiers apparus se trouvent en position 'externe' par rapport à la fraction plus stable de la molécule.

Les procédés utilisés sont les suivants :

A. Hydrolyse acide ménagée.

B. Acétolyse.

C. Coupure sélective des liaisons *N*-acétylglycosaminidyl.

D. Hydrolyse enzymatique.

A. Hydrolyse acide ménagée

1. L'hydrolyse des glycannes par les *acides dilués* dégrade progressivement la fraction glucidique en libérant préférentiellement des oses et une très faible quantité d'oligosaccharides²⁴. Elle apporte donc de précieux renseignements dans la détermination des positions relatives des monosaccharides dans les glycannes. Toutefois, la plus grande prudence doit être observée dans l'interprétation des cinétiques de libération des oses par hydrolyse acide des glycannes qui doit se limiter aux temps très courts et aux temps les plus longs de l'hydrolyse, car les liaisons glycosidiques ne possèdent pas toutes la même stabilité.

2. Contrairement à l'hydrolyse par les acides dilués, l'hydrolyse des glycoprotéines par les *résines de polystyrène sulfoné* libère de nombreux oligosaccharides¹ (Figure 3). Ce procédé représente donc une bonne méthode pour effectuer l'isolement de quantités élevées d'oligosides, prélude à l'exploration de la structure de la fraction glucidique. Il offre, en outre, l'avantage d'une grande simplicité puisque, d'une part, l'agent d'hydrolyse peut être facilement éliminé par une simple filtration et qu'il réalise, d'autre part, la purification de l'hydrolysate en fixant les produits de dégradation de la partie protéique du glycoprotéide ainsi que la glucosamine provenant de la désacétylation de la *N*-acétyl-glucosamine. Toutefois, les rendements

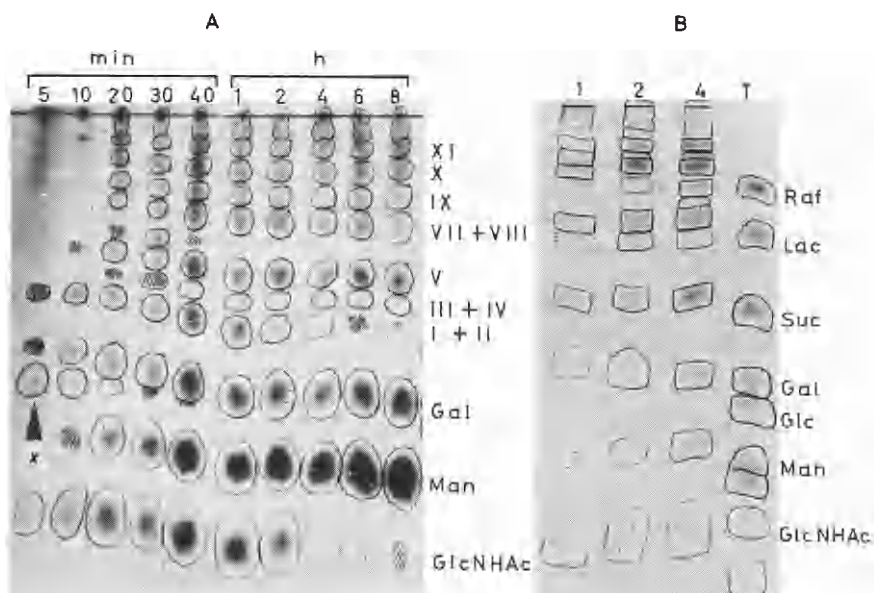


Figure 3. Comparaison des résultats de l'hydrolyse par une résine polystyrène sulfonée (Dowex 50 x 8; H⁺) (A) et de l'acétolyse (B) de l'ovomucoïde. Les chiffres indiquent en heures (A) ou en jours (B) la durée des expériences. T: mélange témoin de glucides. Gal: galactose; Glc: glucose; Man: mannose; GlcNHAc: N-acétylglucosamine; Suc: sucrose; Lac: lactose; Raf: raffinose. En A, les chiffres romains désignent les oligosaccharides du Tableau 2. Système-solvant: n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5); révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline de Partridge.

sont faibles car on ne peut éviter la formation de quantités importantes de monosaccharides. En outre, l'expérimentateur n'est pas à l'abri de réactions de transosidation. Celles-ci peuvent toutefois être mises en évidence par l'emploi de ¹⁴C-monosaccharides introduits dans les solutions d'hydrolyse

Tableau 2. Composition en oses et schémas de structure d'oligosaccharides isolés de l'hydrolysate de l'ovomucoïde par un échangeur de cations (Dowex 50) (Adam-Chosson et Montreuil¹)

I	Gal	$\xrightarrow{\beta-1,4}$	GlcNHAc (N-acétyllactosamine)
II	Gal	\rightarrow	Man
III	Man	\rightarrow	Man
IV	Man	\rightarrow	Man
V	Man	\rightarrow	GlcNHAc
VI	GlcNHAc	\rightarrow	Man
VII	Man	\rightarrow	(Man, Man)
VIII	Man	\rightarrow	Man \rightarrow GlcNHAc
IX	(Man, GlcNHAc)	\rightarrow	Man
X	Gal	\rightarrow	Man \rightarrow GlcNHAc
XI	Gal	\rightarrow	GlcNHAc \rightarrow Man
XII	Man	\rightarrow	(Man \rightarrow Man) \rightarrow GlcNHAc
XIII	(Man, Man, GlcNHAc)	\rightarrow	Man
XIV	(Man, Man, GlcNHAc)	\rightarrow	GlcNHAc
XV	GlcNHAc	\rightarrow	(Man \rightarrow (Man \rightarrow Man) \rightarrow GlcNHAc)

et par la recherche d'oligosaccharides radioactifs dans les hydrolysats par autoradiographie.

Appliquée à l'ovomucoïde, l'hydrolyse par les résines de polystyrène sulfoné nous a permis d'isoler naguère 15 oligosaccharides dont les schémas, pour la plupart incomplets en raison des quantités trop faibles recueillies, sont donnés dans le *Tableau 2*.

B. Acétolyse

Nous avons effectué au laboratoire une étude systématique des effets de l'acétolyse et des procédés de fractionnement des acétolysats. Les résultats que nous avons obtenus et qu'il est intéressant de comparer à ceux de l'hydrolyse acide peuvent se résumer de la manière suivante^{3, 5}.

1. Effets de l'acétolyse

(a) L'ordre de stabilité des liaisons glycosidiques est le suivant : $1,6 < 1,4 < 1,3$; $\beta > \alpha$; *N*-acétylglucosamine > mannose > galactose > acides sialiques. Cet ordre est donc, sauf pour les acides sialiques, l'inverse de celui qui concerne l'hydrolyse acide.

(b) Contrairement à l'hydrolyse acide, l'acétolyse ne fait courir aucun risque de transosidation.

(c) Contrairement à l'hydrolyse ménagée par les acides ou par les résines de polystyrène sulfoné, l'acétolyse libère des quantités très faibles d'oses et une proportion élevée, qualitativement et quantitativement, d'oligosides (*Figure 3*). Elle représente donc le procédé de choix pour provoquer la dégradation partielle des glycanes et pour préparer, à partir de ceux-ci, des quantités importantes d'osides.

(d) Les fonctions acétamido des *N*-acétylosamines sont respectées tandis qu'elles sont sensibles à l'action des acides.

(e) Les liaisons sialosyl sont plus stables vis-à-vis de l'acétolyse que vis-à-vis de l'hydrolyse. Une partie de ces liaisons est donc préservée et on obtient, dans les acétolysats, une proportion parfois importante de sialosyl-oligosaccharides.

(f) Les fonctions amines des amino-acides ne sont pas acétylées par le réactif d'acétolyse.

(g) L'acétolyse respecte les liaisons asparaginyll-*N*-acétyl-glucosamine et conduit donc à la formation de protidyl-oligo et de protidyl-monosaccharides.

2. Fractionnement des acétolysats

Nous avons tiré parti de ces différentes propriétés pour fractionner les acétolysats sur échangeurs d'ions (*Figure 4*). On découpe ainsi les produits de l'acétolyse des glycoprotéines en quatre groupes :

(1) Le premier, 'acide', est constitué par les sialosides et provient de la partie la plus 'externe' de la molécule de glycanne.

(2) Le second, 'neutre', représente la fraction 'médiane' de cette dernière.

(3) La troisième, 'basique', est constituée par des protidyl-oligosaccharides qui proviennent de l'extrémité la plus 'interne' du glycanne qui est conjuguée à la chaîne peptidique.

(4) La quatrième, hydrosoluble, est composée de protidyl-monosaccharides qui, sous une forme *O*-peracétylée, restent solubles dans l'eau en milieu acide grâce à l'effet de solvation apporté par la fraction protidique.

Sialoglycopeptide

Dissolution dans un mélange d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique (10:10:1) (Kuhn et Ekong¹⁸). Action à 20° C. pendant 1 à 5 j. Addition de 3 à 4 vol. d'eau glacée. Extraction par le chloroforme à pH 4.5

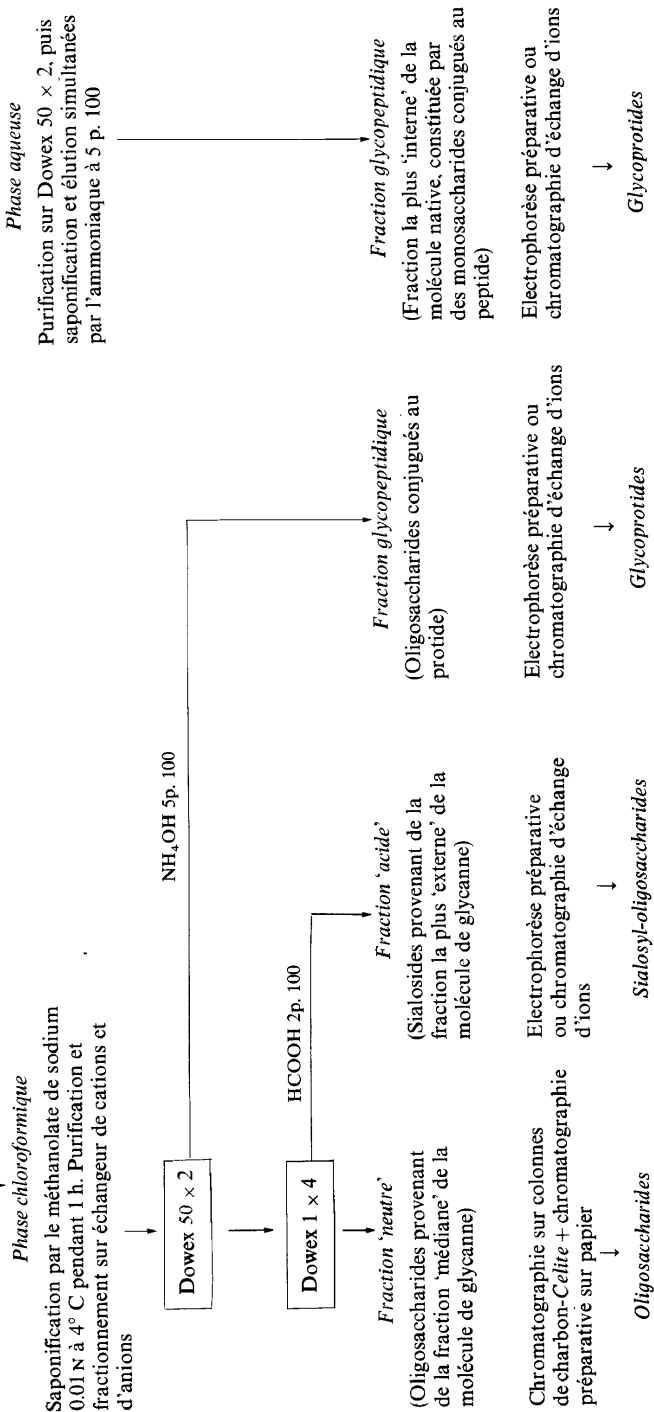


Figure 4. Acétolyse d'un oside. Saponification et fractionnement des dérivés peracétylés obtenus (Bavard et Montreuil³⁻⁵).

3. Application à l'ovomucoïde

Nos travaux¹ ont porté sur l'asialo-glycopeptide β isolé des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch. Le fractionnement des acétolysats nous a fourni un glycopeptide et une quinzaine d'oligosaccharides dont nous avons, pour 12 d'entre eux, déterminé la structure complète (Tableau 3).

Tableau 3. Structure d'oligosaccharides et d'un peptidyl-glycane isolés des acétolysats de l'ovomucoïde (Bayard, Fournet, Bouquelet, Spik et Montreuil⁴)

(A) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man	(B) Gal $\xrightarrow{\beta-1.4}$ GlcNAc
(C) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.2}$ Man	(D) Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man
(F) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.2}$ Man $\uparrow \beta-1.4$ GlcNAc	(G) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man
(H) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.2}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man	(I) Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.4$ GlcNAc
(J) Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.2$ $\uparrow \beta-1.4$ GlcNAc GlcNAc	(K) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.2$ GlcNAc
(L) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.4$ GlcNAc	(M) GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.2$ $\uparrow \beta-1.4$ GlcNAc GlcNAc
GlcNAc \downarrow Asn—Thr	

4. Mise au point d'un procédé de 'finger printing' des acétolysats

Nous sommes parvenus à définir les conditions de l'acétolyse des glycoprotides d'une manière telle qu'il nous est devenu possible de mettre au point un procédé très reproductible de 'finger printing' des fractions 'neutres' (voir Figure 5) des acétolysats de 10 mg de glycopeptides. Ce procédé dont le principe s'inspire de la méthode d'Ingram, nous fournit rapidement des informations sur les structures comparées de glycannes d'origines différentes. Il devrait nous permettre, dans un avenir proche, de déterminer les structures des glycannes avec autant d'efficacité que la méthode de 'finger printing' appliquée aux hydrolysats ribonucléasiques des ARN de transfert.

Le principe de la technique que nous avons mise au point est le suivant : les glucides de la fraction 'neutre' des acétolysats sont d'abord élués de colonnes de charbon-Celite avec de l'eau puis avec des solutions éthanoliques de concentrations croissantes (1,5—3,5—5—7,5 et 10 p. 100 d'éthanol). Chacune des fractions obtenues est ensuite soumise à une chromatographie sur papier dans les conditions précisées dans la Figure 5. On obtient, de cette manière, des cartes chromatographiques 'pseudo-bidimensionnelles' qui sont parfaitement reproductibles.

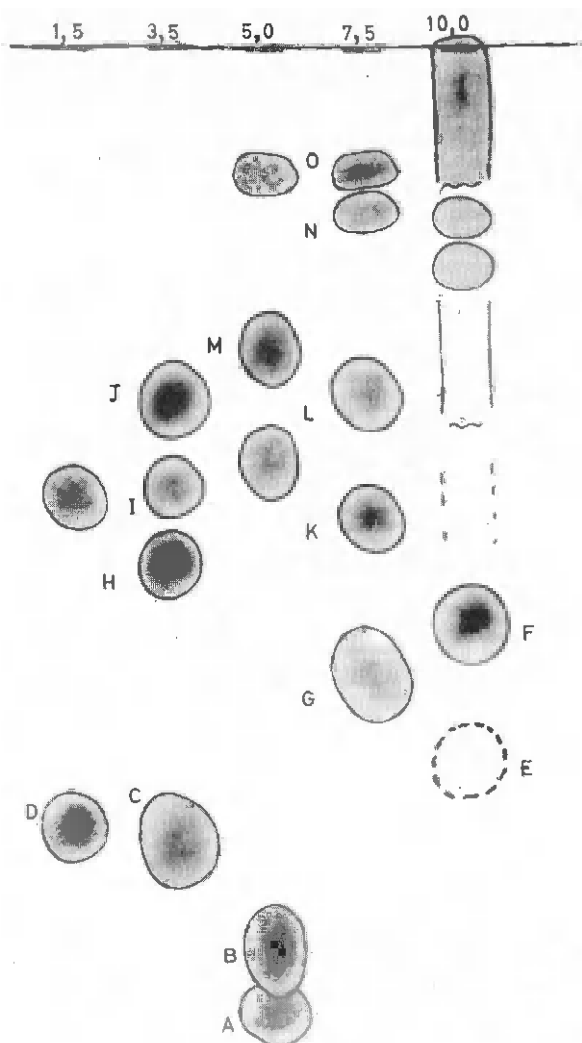


Figure 5. Carte chromatographique d'un acétolysat du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Chromatographie sur papier Whatman no. 3 pendant 28 h; système-solvant: pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:1:3); révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline de Partridge. Les nombres précisent les concentrations p. 100 en éthanol auxquelles a été effectuée l'élution des oligosaccharides adsorbés sur charbon-Celite. Les lettres désignent les oligosaccharides du Tableau 3.

C. Hydrazinolyse et coupures sélectives des liaisons N-acétylglycosaminidiques

L'hydrazine anhydre coupe spécifiquement les liaisons amides dans les conditions expérimentales suivantes: solution de glycoprotéine anhydre à 10 p. 100 (p:v) dans l'hydrazine anhydre^{29,30}, additionnée parfois de 1 p. 100 de sulfate d'hydrazine³⁵; 100°C pendant 10 à 20 h en tubes scellés.

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

Appliquée aux glycoprotides, elle désacétyle les *N*-acétylosamines et détache, en outre, les glycanes conjugués au protide par une liaison 'asparaginy-*N*-acétylglucosamine'. La coupure sélective des liaisons osaminidyl peut alors être réalisée de deux manières :

1. *Procédé de Lloyd et Evans*¹⁹, La dinitrophénylation des glycanes libérés par l'hydrazinolyse permet de substituer les fonctions NH₂ des osamines. Les groupements DNP ainsi formés sont très stables en milieu acide et on tire parti de cette propriété, d'une part, et de la grande fragilité des liaisons glycosidiques des osamines *N*-substituées, d'autre part, pour couper sélectivement les liaisons *N*-DNP-osaminidyl (*Figure 6*). Ce procédé appliqué par Lloyd et Evans à l'héparine a fourni un disaccharide (DNP-glucosaminidyl $\xrightarrow{\alpha-1.4}$ glucuronate) et un tétrasaccharide (DNP-glucosaminidyl $\xrightarrow{\alpha-1.4}$ glucuronosidyl- $\xrightarrow{\alpha-1.4}$ DNP-glucosaminidyl $\xrightarrow{\alpha-1.4}$ glucuronate).

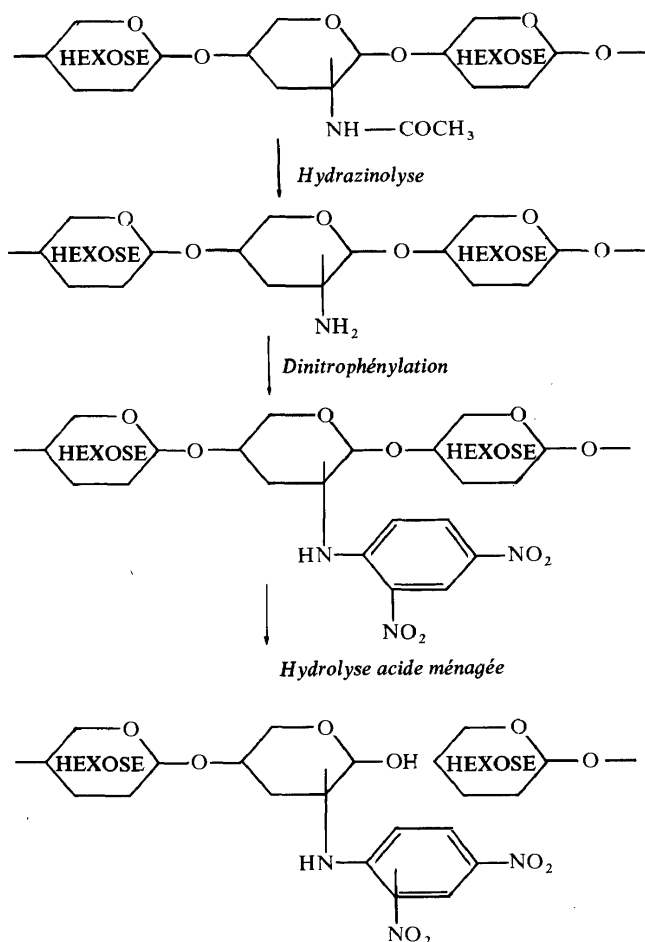


Figure 6. Hydrazinolyse des glycoprotides et coupure sélective des liaisons osaminidyl après dinitrophénylation (d'après Lloyd et Evans¹⁹).

2. *Procédé de Matsushima et Fujii*²¹. La diazotation des glycanes obtenus par hydrazinolyse provoque une coupure spontanée des liaisons osaminyl par un réarrangement intramoléculaire qui conduit à la formation d'une structure semi-acétalique très labile (*Figure 7*). On obtient, dans ces conditions, des oligosides qui possèdent, en position terminale 'réductrice', un résidu de 2,5-anhydro-hexose (chitose, dans le cas de la glucosamine) que l'on caractérise facilement au cours des analyses chromatographiques grâce aux colorations que donne ce composé avec les réactifs à l'urée ou au résorcinol chlorhydrique. Matsushima et Fujii ont appliqué ce procédé à

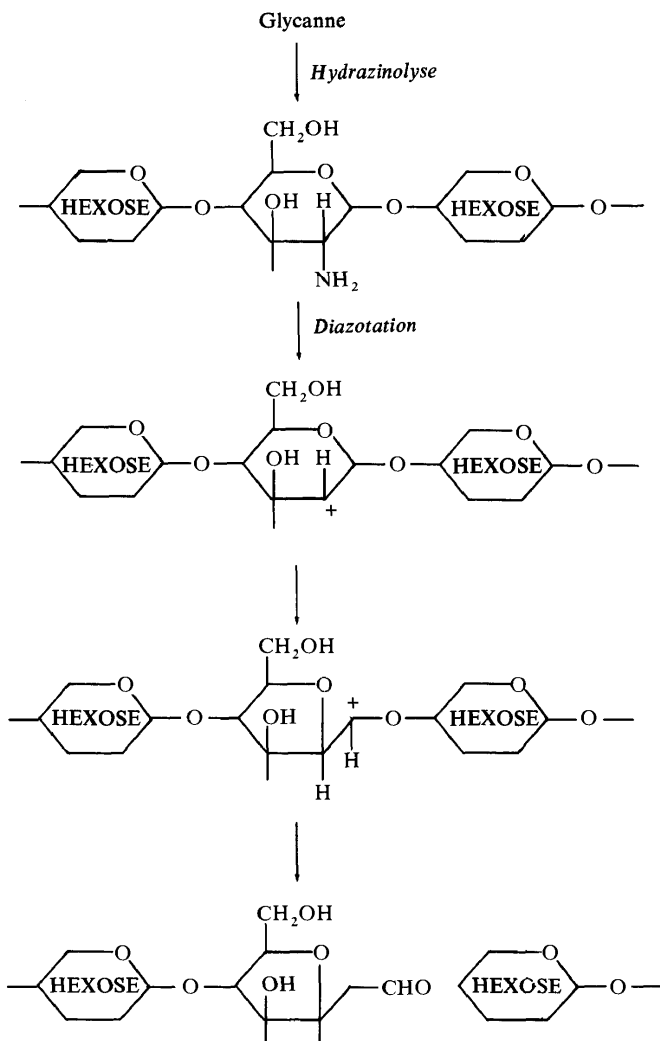


Figure 7. Hydrazinolyse des glycoprotides et coupure sélective des liaisons osaminidyl par diazotation (d'après Matsushima et Fujii²¹).

l'acide chondroïtine sulfurique et ont obtenu plusieurs oligosaccharides possédant un résidu d'anhydro-hexose en position terminale.

Ces deux procédés ne donnent pas encore des résultats quantitatifs et n'ont encore fait l'objet que d'un nombre très limité d'applications. Toutefois, nous sommes convaincu qu'ils fourniront, après avoir été perfectionnés, des renseignements précieux sur la structure des glycanes contenant des osamines.

D. *Hydrolyses enzymatiques*

L'emploi des glycosidases revêt une importance capitale à deux égards dans l'exploration de la structure des glycanes.

En premier lieu, elles permettent de déterminer la nature α et β des liaisons glycosidiques, ce que les procédés physico-chimiques sont impuissants à préciser. Ce premier groupe de recherches ne nécessite pas l'utilisation d'enzymes purs et des extraits possédant des activités multiples conviennent parfaitement, à condition toutefois que chaque glycosidase envisagée ne soit active que sur un seul type anomérique de liaison. Par exemple, un mélange d' α -*N*-acétylneuraminidase, de β -galactosidase et de β -*N*-acétylglucosaminidase du Pneumocoque I a été utilisé avec succès par Jeanloz et coll.¹⁴ pour explorer la nature des liaisons glycosidiques des extrémités de chaînes dans l'orosomucoïde et les glycosidases lysosomales ont été employées par Mahadevan *et al.*²⁰ pour étudier l'ovomucoïde et la fêtuine.

En second lieu, l'action successive de glycosidases différentes permet de dégrader par récurrence les groupements glycaniques. On obtient, de cette manière, des renseignements intéressants sur les positions relatives des différents monosaccharides et on parvient même, dans certains cas, jusqu'à l'ose conjugué au protide. Dans le cas de la mucine sous-maxillaire, par exemple, des neuraminidases enlèvent la totalité de l'acide sialique qui se trouve en position externe, puis des *N*-acétylhexosaminidases détachent les résidus de *N*-acétylgalactosamine en libérant la chaîne peptidique¹². Il est évident que, pour effectuer ce genre d'expérimentation, il est nécessaire de disposer d'enzymes purs ou de préparations contenant des mélanges de glycosidases dont l'activité d'une seule puisse être conservée en bloquant celle des autres par une variation du pH ou par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques : par exemple, la pyridine inhibe toutes les glycosidases sauf les α -*D*-mannosidases et les lactones inhibent, en général, compétitivement les glycosidases correspondantes.

De l'exposé de ces deux principes, on conçoit aisément que l'utilisation des glycosidases ait été limitée, jusqu'à présent, à des cas simples et relativement peu nombreux. En effet, l'emploi des enzymes a contribué essentiellement à déterminer la structure complète de *n-glycannes* comme ceux de la substance fondamentale (action successive de la hyaluronidase, puis de glucuronosidases et de *N*-acétylosaminidases), de la muréine (action successive du lysozyme, puis de β -*N*-acétylglucosaminidases et des mucines sous-maxillaires (voir ci-dessus)) et à de rares *isoglycannes* comme ceux des substances de groupes sanguins. Au contraire, dans le cas des *isoglycannes* complexes — comme ceux de l'orosomucoïde, de la transferrine ou des globulines immunes, par exemple — les résultats restent très fragmentaires et se limitent généralement à la connaissance de la zone la plus 'externe' de ce type de glycanne car les enzymes purs dont on dispose actuellement

sont, en effet, essentiellement des neuraminidases, des galactosidases et des *N*-acétylosaminidases. Les raisons de ces échecs provisoires sont les suivantes :

1. *Problèmes posés par la préparation des glycosidases*

Les isoglycannes sont de composition complexe. En effet, ils renferment généralement de 5 à 7 monosaccharides différents. Dans le cas particulier de l'orosomucoïde qui est constitué de galactose, de mannose, de fucose, de *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétylneuraminique, l'hydrolyse totale par récurrence de ses groupements glycaniques nécessiterait, théoriquement — en tenant compte des formes anomériques α et β — l'emploi de 10 glycosidases pures différentes. Or, un nombre peu élevé de ces osidases existe actuellement à l'état pur : des α -neuraminidases, des β -galactosidases et de *N*-acétylglucosaminidases et -galactosaminidases qui ne permettent pas de pénétrer profondément dans les molécules de glycannes. Les autres glycosidases existent, en général, sous la forme de mélanges complexes. Le problème actuel consiste donc essentiellement à rechercher des sources micro-organiques, végétales ou animales riches en glycosidases et à isoler ces dernières dans un état de pureté absolue.

Ce genre de recherches est semé d'embûches car la détermination de l'activité des préparations se heurte à de nombreuses difficultés comme, par exemple, l'absence de certains substrats dont il faut alors, avant toute chose, réaliser la synthèse. En outre, la fragilité de certaines glycosidases oblige l'expérimentateur à observer quelques précautions, comme le maintien permanent des préparations à basse température (-170°C), la stabilisation du pH, le rejet de toute lyophilisation.

Tableau 4. Activité (en p. 100 d'acide sialique libéré) de neuraminidases d'origines différentes sur divers oligosaccharides (d'après Drzeniek⁹)

Substrat	Vibriocholerae	Virus A ₂	NDV†	FPV†
Sialyl-2,3-lactose	100	100	100	100
Sialyl-2,6-lactose	85		2	
Sialyl-2,6- <i>N</i> -acétyllactosamine	99		4	
Sialyl-2,6-lacto- <i>N</i> -tétraose	81		2	
Sialyl-2,8-sialyl-2,3-lactose	100	—	100	12

† NDV: Newcastle disease virus; FPV: Fowl plague virus.

Tableau 5. Activité (en p. 100 de galactose libéré) de β -D-galactosidases d'origines différentes sur divers oligosaccharides (d'après Bouquelet, Spik et Montreuil. Résultats non publiés).

Substrat	Rate	Aspergillus niger
<i>p</i> -Nitrophényl- β -D-galactoside	100	100
Gal $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Glc (lactose)	83	96
Gal $\xrightarrow{\beta-1.4}$ GlcNAc (<i>N</i> -acétyllactosamine)	100	0
Gal $\xrightarrow{\beta-1}$ Ser	27	55

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

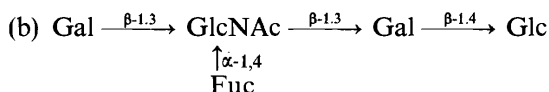
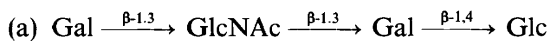
2. Problèmes posés par la spécificité d'action des glycosidases

De nombreuses glycosidases qui se sont révélées actives sur des substrats synthétiques simples sont sans action sur des oligo- ou sur des polysaccharides naturels complexes (Tableaux 5 et 6). Cette observation pose le problème des relations entre l'activité d'une glycosidase et la structure de l'oside qu'on lui présente. Nous avons rassemblé dans les Tableaux 4, 5 et 6 quelques résultats relatifs à l'activité de glycosidases d'origines différentes

Tableau 6. Activité (en p. 100 de *N*-acétylglucosamine libérée) de *N*-acétyl- β -D-glucosaminidases d'origines différentes sur divers oligosaccharides (d'après Bouquelet, Spik et Montreuil. Résultats non publiés).

Substrat	Rate	<i>Aspergillus niger</i>
<i>p</i> -Nitrophényl- <i>N</i> -acétyl- β -D-glucosaminide	100	100
1. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man	0	100
2. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.2}$ Man	100	100
3. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.2}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man	100	100
4. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\uparrow \alpha-1.3$ Man	0	0
5. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\uparrow \beta-1.2$ GlcNAc	50	0
6. GlcNAc $\xrightarrow{\beta-1.4}$ Man $\xrightarrow{\alpha-1.3}$ Man $\uparrow \beta-1.2$ GlcNAc	50	0

sur divers substrats. On voit que cette activité dépend (a) de l'origine des enzymes et (b) de la structure des osides. Le cas de la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase est particulièrement significatif (Tableau 6): l'enzyme de la rate coupe les liaisons β -1,2 glycosidasiques tandis que celui de l'*Aspergillus* possède des activités β -1,2 et β -1,4 glycosidasiques (action sur les osides 1 et 2) qui sont inhibées dans le cas des osides 5 et 6 alors que l'activité de l'enzyme splénique reste entière. En outre, l'activité β -1,4 glycosidasique des deux préparations d'enzyme est inhibée par le branchement α -1,3 du mannose dans l'oside 4. Un résultat analogue a été obtenu par Watkins avec une β -D-galactosidase de *Trichomonas foetus* qui, active sur le lacto-*N*-tétraose (a), est inhibée par le branchement d'un résidu d' α -fucose sur la *N*-acétylglucosamine dans le lacto-*N*-fucopentaose II (b)



En conclusion, l'action négative d'une glycosidase sur un glycanne doit toujours être interprétée avec prudence car nous ignorons pratiquement

tout de l'influence de la configuration moléculaire d'un oligo- ou d'un polysaccharide sur l'activité d'un enzyme. On ne peut, en outre, exclure *a priori* l'hypothèse de l'existence d'autant d'enzymes qu'il y a de possibilités de liaisons (de 1,2—1,3—1,4 et 1,6- β -D-galactosidases, par exemple) ainsi que l'hypothèse d'une influence de la nature du sucre auquel l'ose est conjugué puisque la galactosidase de l'*Aspergillus niger* hydrolyse le lactose et est sans action sur la N-acétyllactosamine (Tableau 6).

3. Problèmes posés par l'activité transférasiqve des glycosidases

De nombreuses glycosidases possèdent une activité transférante qui est susceptible d'introduire des causes d'erreur. En effet, les dosages des quantités de monosaccharides libérés sont faussés. En outre, les oses détachés par de tels enzymes sont recombinés sous la forme d'oligosaccharides ou bien encore sont transférés sur la molécule de glycanne en voie de dégradation et donnent alors lieu à la formation de nouvelles structures artificielles.

Malgré ces restrictions à l'emploi des glycosidases, il est évident que l'avenir est, en ce qui les concerne, extrêmement prometteur. Il reste toutefois à effectuer un gigantesque travail d'isolement et de purification des enzymes qui devra obligatoirement être complété par la détermination de la spécificité d'action des glycosidases en relation avec la structure spatiale des glycannes. Il convient cependant de ne pas perdre de vue que les méthodes enzymatiques permettent seulement de déterminer la nature α et β des liaisons glycosidiques et de préciser les positions relatives des monosaccharides dans les molécules de glycanne. Elles doivent donc être nécessairement associées à des procédés chimiques comme la méthylation et l'oxydation periodique si l'on veut parvenir à la connaissance de la structure complète d'un glycanne.

II. Oxydation periodique des glycannes

L'oxydation periodique est généralement effectuée à 4°C, à l'obscurité et en milieu acide (pH 4,5 p.e.) pendant des temps variant de 1 à 20 jours. La quantité d'acide periodique consommée est déterminée soit par des procédés de dosages iodométrique, soit par spectrométrie dans l'ultra-violet (à 320 nm) qui est absorbé par le periodate et non par l'iodate. En outre, on dose l'acide formique (dosage acidimétrique) et le formaldéhyde (dosage par l'acide chromotropique : coloration jaune) libérés. Les résultats obtenus permettent de calculer le nombre et la nature des fonctions α -glycoliques (et α -amino-alcool) présentes dans le glucide et d'en déduire la position des points d'attache de liaisons glycosidiques.

Toutefois, on conçoit aisément que la méthode n'est précise que dans le cas d'oligosides de faible masse moléculaire offrant un petit nombre de possibilités de points de conjugaison des oses entre eux. Dans le cas de molécules plus importantes — dans celui des isoglycannes, en particulier — il devient plus intéressant de faire le bilan des monosaccharides détruits et des monosaccharides restés intacts. En effet, les hexoses qui ont résisté à l'action de l'acide periodique sont soit monosubstitués en 3, soit bisubstitués (et, *a fortiori*, trisubstitués) dans la zone des carbones 2, 3 et 4. Les N-acétylhexosamines détruites ne sont pas substituées en 3 et 4.

Il convient, enfin, de préciser que l'oxydation periodique n'est pas à l'abri de causes d'erreur dues, en particulier, à l'oxydabilité des protéines et

au phénomène de suroxydation provoqué par l'action de l'acide periodique sur les premiers produits formés.

1. *Oxydation periodique des glycoprotides*

(a) Des nombreuses expériences qui ont été réalisées par différents auteurs, on peut conclure que l'oxydation periodique des glycoprotéines natives doit être rejetée car la fraction protéinique interfère dans la réaction et conduit à des résultats insaisissables et ininterprétables. Au contraire, le procédé est parfaitement applicable aux glyco-oligo-peptides et aux glyco-amino-acides.

(b) Dans les premières minutes, l'action de l'acide periodique se porte essentiellement sur les résidus 'externes' d'acide sialique. La coloration donnée par les électrophorogrammes de glycoprotéines avec le réactif au PAS est donc apportée principalement par les acides sialiques²⁵.

(c) L'oxydation periodique a permis, dans certains cas, de confirmer la structure de glycannes. Par exemple, le fait que la *N*-acétylgalactosamine des groupements glycanniques de la mucine sous-maxillaire de Mouton soit détruite à plus de 80 p. 100 est en faveur de la fixation de l'acide neuraminique sur le carbon 6 de l'osamine. Toutefois, il faut convenir que l'oxydation periodique des glycannes complexes a apporté peu de renseignements. Elle a cependant permis de montrer que la fraction la plus 'interne' des glycannes de plusieurs glycoprotéines — comme l'orosomucoïde et l'ovomucoïde — était riche en mannose et en glucosamine. Par exemple, l'oxydation periodique de glycopeptides de l'ovomucoïde détruit la totalité de l'acide sialique et du galactose, 7 des 10 résidus de *N*-acétylglucosamine et 2 des 5 résidus de mannose. L'application, à ce glycopeptide oxydé, du procédé de Smith (voir ci-dessous) permet d'isoler un nouveau glycopeptide renfermant trois résidus de *N*-acétylglucosamine et trois résidus de mannose. L'oxydation periodique confirme donc les résultats apportés par l'hydrolyse acide partielle à propos de la position 'interne' du mannose dans les chaînes d'isoglycannes.

2. *Dégradation récurrente de Smith*

Les polyaldéhydes formés, dans un premier temps, par oxydation periodique de glycopeptides, sont réduits, dans un second temps, par un borohydruure alcalin. Ainsi prennent naissance des polyols dont les liaisons 'glycosidiques' sont extrêmement labiles en milieu acide. Elles peuvent donc être coupées dans des conditions telles (HCl 0.1 N à 20°C, pendant 24 h) que les liaisons glycosidiques des oses demeurés intacts sont respectées²⁷.

Les hydrolysats sont ensuite fractionnés, sur Sephadex par exemple, de manière à séparer et à étudier les petits fragments libérés par l'hydrolyse de la fraction glycopeptidique. Celle-ci peut être soumise à de nouvelles dégradations récurrentes qui permettent de se rapprocher progressivement de la fraction protidique et même de parvenir au monosaccharide conjugué à cette dernière lorsque ce sucre n'est pas oxydable (cas de la *N*-acétylglucosamine substituée en 3 ou en 4 et d'un hexose substitué en 3). La méthode de Smith représente, à cet égard, un excellent procédé d'étude de la structure du point d'attache glucide-protide. Par exemple, Yamashina et coll.³³ obtiennent des quantités élevées d'asparaginy-*N*-acétylglucosamine par dégradation récurrente de Smith d'un aspartyl-glycanne isolé des hydrolysats pronasiques de l'ovalbumine.

Quant aux menus fragments détachés par l'hydrolyse acide des polyols, leur étude peut apporter des renseignements intéressants. Dans un premier temps, on effectue une hydrolyse complète de cette fraction (HCl 1 N, à 100°C pendant 2 h, par exemple) et on dresse le bilan des composés libérés : les monosaccharides restés intacts et les dérivés hydroxylés. Ces derniers, identifiés et dosés par chromatographie sur papier ou par chromatographie en phase gazeuse, apportent les informations suivantes :

- (a) Les hexoses non substitués en 2 et en 3 donnent du thréitol (ou de l'érythritol) et de l'aldéhyde glycolique. Ils sont donc conjugués en 4 ou en 4,6.
- (b) Les hexoses dont les hydroxyles en 3 et 4 sont libres (hexoses en position terminale non réductrice ou substitués en 6, en 2 ou en 2,6) fournissent du glycérol (substitution en 2 ou en 2,6) ou du glycérol et de l'aldéhyde glycolique (position terminale non réductrice ou substitution en 6).
- (c) Le fucose en position terminale ou substitué en 2 conduit au propane-1,2-diol et au glycolaldéhyde.
- (d) La *N*-acétylglucosamine substituée en 6 donne du glycérol et du 2-amino-3-hydroxy-propionaldéhyde (ou sérinal).

III. Perméthylation des glycannes

La méthode de perméthylation qui a permis de déterminer la structure de nombreux polysaccharides végétaux ou animaux n'a pas connu le même succès avec les glycoprotéines et son application à l'exploration de la structure des glycannes — principalement, des isoglycannes — pose de nombreux problèmes qui n'ont pas tous reçu, jusqu'à présent, de solution satisfaisante. Nous nous proposons donc de nous limiter à l'exposé des difficultés que l'on rencontre dans l'application de la méthode.

A. Problèmes posés par la perméthylation

1. Difficulté d'appliquer les critères de perméthylation

Le dosage chimique des groupements 'méthoxy' et la RMN nécessitent des quantités importantes de glycoprotides. L'emploi de l'infra-rouge est souvent interdit à cause du caractère hygroscopique des glycoprotides perméthylés. Ces procédés ne sont donc pas toujours applicables.

Au laboratoire, nous préférons suivre par chromatographie, après chaque cycle de méthylation, l'évolution de la composition en monosaccharides méthylés des hydrolysats des glycannes méthylés et nous arrêtons l'expérience quand nous n'observons plus de variations qualitatives et quantitatives. Notre attention se porte plus particulièrement sur les modifications des diagrammes chromatographiques des éthers méthyliques des osamines. En effet, comme la méthylation des *N*-acétylosamines est particulièrement difficile, la 'stabilisation' des chromatogrammes d'osamines *O*-méthylées représente, à nos yeux, un critère de perméthylation des glycannes.

2. Difficulté de perméthyliser les glycoprotides

La perméthylation des glycannes est particulièrement délicate pour les raisons suivantes :

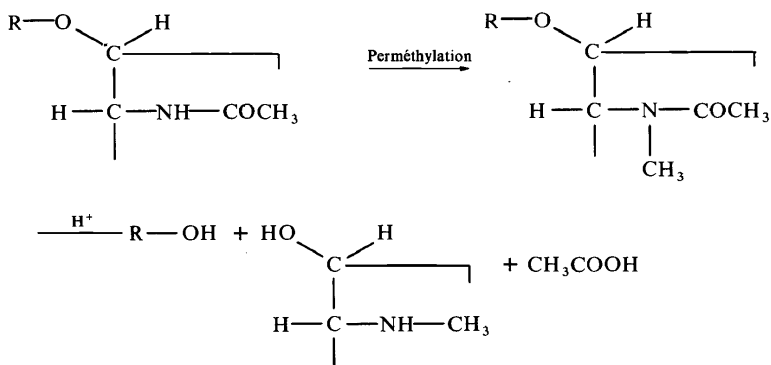
- (a) Les nombreuses ramifications des isoglycannes sont des facteurs d'encombrements stériques qui sont susceptibles de protéger de la méthylation des hydroxyles libres.
- (b) La configuration spatiale du groupement acétamido des *N*-acétyl-

osamines ralentit, par empêchement stérique, la méthylation des OH en 3 et en 4 de ces sucres.

(c) La présence d'un protide (acide aminé, peptide ou protéine) est une source de difficultés supplémentaires dans l'application de la méthode de perméthylation. En effet, le protide gêne la solubilisation des glycopeptides dans les milieux organiques de perméthylation et compromet cette dernière. En outre les fonctions ionisables du protide provoquent une solvataion des perméthyl-glycopeptides dans l'eau et empêchent ceux-ci d'être extraits par les solvants organiques. Enfin, la méthode ne peut pas être appliquée aux glycoprotéines natives mais seulement aux glyco-oligopeptides ou aux glyco-amino-acides. En effet, les fractions protéiniques dévient une proportion importante de l'agent de méthylation dont l'action se porte préférentiellement sur les groupements NH des liaisons peptidiques et sur les fonctions OH et NH₂ libres des acides aminés. En outre, ces différentes fonctions, une fois méthylées, jouent un effet protecteur sur les groupements glycanniques à la suite, vraisemblablement, de remaniements moléculaires qui 'enterrent' ces derniers.

3. Difficulté d'éviter la N-méthylation des N-acétylosamines

L'hydrogène de la fonction amide du groupement N-acétamido est très mobile et est facilement substitué par des radicaux méthylés. L'hydrolyse acide d'un glycanne perméthylé conduit donc à la formation de N-méthyl-osamines :



Cette réaction secondaire est susceptible d'introduire des causes d'erreur. Elle est totale avec la méthode d'Hakomori et nulle avec les procédés de Kuhn. Malheureusement, ces derniers possèdent parfois une efficacité moindre et, dans certains cas, il est nécessaire d'appliquer la technique d'Hakomori. Cette manière de faire offre peu d'inconvénients car les dérivés O-méthylés des N-méthyl-osamines possèdent pratiquement le même comportement chromatographique que leurs homologues aminés sur les colonnes d'échangeurs de cations (Monsigny et Delmotte, communication personnelle). Ils se révèlent, en outre, parfaitement avec la ninhydrine et avec les réactifs d'Elson et Morgan.

4. Problème posé par la labilité de certaines liaisons glycanne-protide en milieu alcalin

La méthylation des glycoprotides s'effectue toujours à des pH basiques.

Or, les liaisons glycanne-protide de type ester ou *O*-glucosidique sont très labiles en milieu alcalin et cette propriété fait courir un risque de destruction partielle ou totale à la fraction glycanne libérée avec un ose réducteur en position terminale. A cet égard, le procédé de Hakomori qui doit, en partie, son efficacité et sa rapidité à la grande basicité du milieu de réaction doit être rejeté car il est inapplicable aux glucides réducteurs.

On sait, d'autre part, que les liaisons 1,3-glycosidiques sont facilement rompues en milieu alcalin par un mécanisme de β -élimination. La méthylation d'un glycanne conjugué *O*-glycosidiquement à un protide et riche en liaisons 1,3 est donc particulièrement délicate car le glucide, une fois détaché du protide, risque d'être profondément dégradé par récurrence.

B. Problèmes posés par l'identification et le dosage des *O*-méthylmonosaccharides

1. Cas des oses 'neutres'

La séparation complète par chromatographie en phase gazeuse de tous les dérivés méthylés d'un seul type de monosaccharides 'neutres' (15 composés au total) est difficilement réalisable. Le problème se complique encore lorsqu'il s'agit de mélanges de dérivés *O*-méthylés de différents oses et il n'a pas été trouvé de solution satisfaisante dans le cas de perméthyl-glycannes complexes, comme ceux de l'orosomucoïde par exemple. Sa résolution peut toutefois s'entrevoir en trois étapes de la manière suivante :

(a) élimination des osamines méthylées des hydrolysats acides de perméthylglycannes;

(b) chromatographie préparative sur papier des dérivés méthylés des oses 'neutres' de manière à isoler les groupes des mono-, di-, tri- et tétraméthyl-dérivés (dans le système-solvant *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5), par exemple);

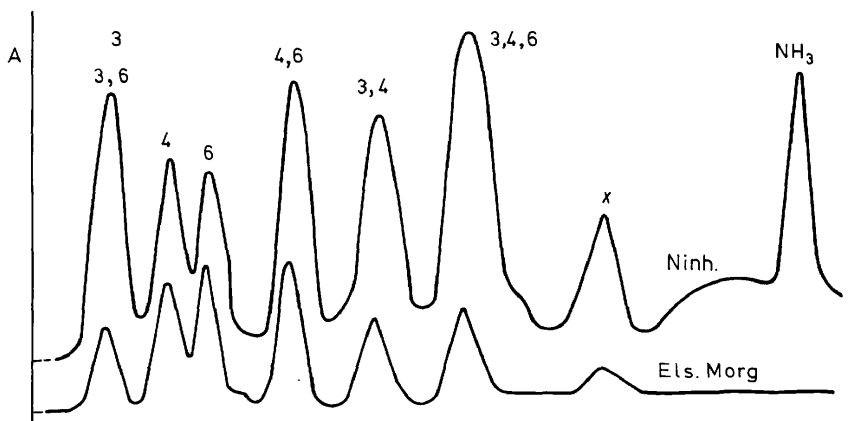


Figure 8. Chromatographie sur échangeur de cations des éthers méthyliques de la glucosamine, effectuée à l'Auto-analyseur Technicon. Tampon de citrate de sodium de pH 2.87 et de chlorure de sodium (gradient de concentration de 0.2 à 2.5 M). Révélation simultanée par la ninhydrine et par le réactif d'Elson et Morgan modifié par Monsigny²³. Les chiffres désignent la position des groupements méthoxy.

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

(c) mise au point de l'analyse chromatographique quantitative en phase gazeuse de ces différents groupes à condition d'être en possession de tous les dérivés méthylés de chacun des monosaccharides.

2. Cas des osamines

L'identification et le dosage des éthers méthyliques de la glucosamine ne posent pas de problème car des procédés d'analyse chromatographique ont été mis au point :

(a) Chromatographie automatique sur colonne d'échangeurs de cations des hydrolysats de perméthyl-glycannes qui ne nécessite pas l'élimination préalable des dérivés méthylés des monosaccharides neutres (Adams, Yaguchi et Perry²; Monsigny et Delmotte, résultats non publiés) (Figure 8).

(b) Chromatographie en phase gazeuse selon Williams et Jones³² des dérivés *O*-acétylés des *O*-méthyl-arabinitols obtenus par réduction à l'aide d'un borohydrure alcalin des éthers méthyliques de l'arabinose formés par désamination oxydative des éthers méthyliques de la glucosamine : 2-, 3-, 5-, 2,3-, 2,5, 3,5- et 2, 3, 5-*O*-méthylarabinitols — provenant respectivement des 3-, 4-, 6-, 3,4-, 3,6-, 4,6- et 3,4,6-*O*-méthylglucosamines — sont aisément identifiés et dosés comme le montre la Figure 9. Ce procédé nécessite la séparation préalable des *O*-méthylamines que nous réalisons au laboratoire par une électrophorèse préparative sur papier Whatman no. 3 (tampon pyridine/acide acétique/eau de pH 3.9; 8 V/cm)¹¹.

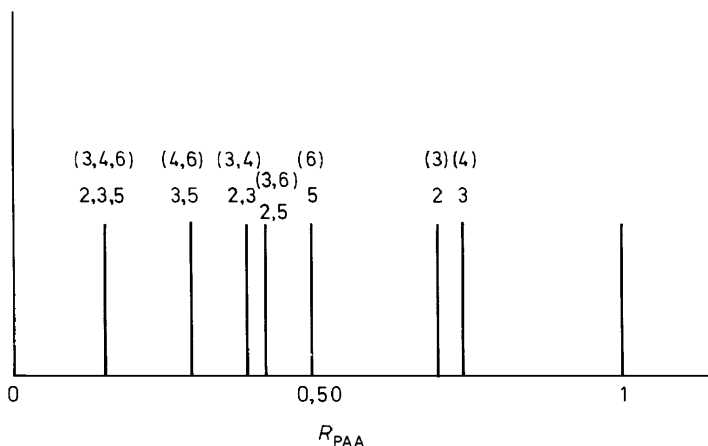


Figure 9. Chromatographie en phase gazeuse des dérivés *O*-acétylés des éthers méthyliques de l'arabinitol (15% PEGS/Chromosorb W; 200°C). d'après William et Jones³². Les chiffres précisent la position des groupements méthoxy dans l'arabinitol (rangée inférieure) et dans la glucosamine (rangée supérieure). R_{PAA} : temps de rétention comparés à celui du peracétyl-arabinitol.

GLYCOPEPTIDES ET CODAGE PAR LES CHAINES PEPTIDIQUES DE LA CONJUGAISON GLYCANNÉ-PROTIDE ET DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCANNES

Dans le paragraphe précédent, nous avons souligné l'importance des glycopeptides qui se révèlent comme un matériau précieux pour aborder

l'étude de la structure générale des glycoprotéines. Préparés par une hydrolyse protéinase *poussée* — par la pronase, par exemple — ils permettent d'hydrolyser par les enzymes, de perméthyliser et d'oxyder par l'acide periodique, d'une manière satisfaisante, les glycannes et de déterminer les modalités de la conjugaison glycanne-protéide. Préparés par une hydrolyse protéinase *ménagée* — par la trypsine, par exemple — ils permettent d'isoler les différents glycannes d'une même glycoprotéine sous la forme de glyco-oligo-peptides. Toutefois, l'intérêt qu'ils présentent ne se limite pas à l'exploration de la structure moléculaire des glycoprotéines; il s'étend, en outre, à certains aspects de leur métabolisme que nous nous proposons d'évoquer dans la dernière partie de notre étude (voir, à ce sujet, Eylar¹⁰; Gottschalk¹³; Hunt et Dayhoff¹⁵; Neuberger et Marshall²⁶).

L'élaboration de la structure même des glycannes reste une énigme. S'effectue-t-elle d'une manière anarchique et, dans ce cas, les glycannes devraient posséder des enchaînements de hasard ? Ou bien, au contraire, est-elle harmonieuse et soumise alors à un contrôle ? Dans ce cas, les structures des glycannes seront synthétisées d'une manière toujours identique et il faudra alors admettre l'existence d'un codage de la synthèse des glycannes. La réponse à l'une ou à l'autre de ces deux questions ne sera apportée que lorsque nous connaîtrons la structure complète des glycannes de quelques glycoprotéines. Pour l'instant on ne peut que poser des hypothèses.

Pour notre part, nous pensons que la biosynthèse des glycannes ne s'effectue pas au hasard mais suivant un code porté, dans les premières étapes de la synthèse, par la protéine, puis dans les étapes ultérieures, par les premiers enchaînements glycosidiques du glycanne lui-même. En effet, même en écartant l'idée philosophique que la Vie est Harmonie et qu'il ne peut exister dans une cellule de synthèse non contrôlée, on peut fonder l'hypothèse d'un codage de la synthèse des glycannes sur la base des observations suivantes :

1. Il existe une certaine unité de structure des isoglycannes, en particulier vers les extrémités terminales non réductrices des chaînes.
 - (a) On trouve, en effet, très souvent les séquences suivantes : neuraminyl (ou fucosyl)-galactosyl-*N*-acétylglucosamine.
 - (b) Dans le cas des groupes sanguins, les séquences terminales sont spécifiques des différents groupes.
 - (c) Les acides sialiques, le fucose, différents oses liés α -glycosidiquement (α -*N*-acétyl-galactosamine et α -galactose, respectivement, dans les substances spécifiques de groupes sanguins A et B) et le reste sulfuryl sont, dans la plupart des cas, en position terminale. Sur cette observation, on admet généralement que la conjugaison, sur une chaîne isoglycannique, d'un résidu d'acide sialique, de fucose, d'un anomère α ou d'un reste sulfuryl représente le signal de fin de synthèse de cette dernière.
2. Les molécules de *n*-glycannes sont 'géométriques'. Elles sont, en effet, constituées d'enchaînements réguliers d'unités disaccharidiques et on peut imaginer que, dans un premier temps, la conjugaison des oses 'neutres' sur la protéine est codée par celle-ci, puis que l'association des *N*-acétyl-osamines et des acides uroniques est dirigée, dans un second temps, par la conformation spatiale du trisaccharide Gal \rightarrow Gal \rightarrow Xyl, le galactose terminal appelant l'action d'une uronyltransférase, l'acide uronique celle d'une

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

N-acétylosaminyl transférase, la *N*-acétylosamine celle, de nouveau, d'une uronosyl-transférase et ainsi de suite.

Puisque la biosynthèse des *n*-glycannes s'effectue d'une manière ordonnée, on peut admettre *a priori* qu'il en est de même dans le cas des isoglycannes. 3. Selon toute vraisemblance, la conjugaison de la *N*-acétylglucosamine sur l'asparagine, dans le cas de liaisons glycanne-protide de type 2-acétamido-1-β(L-β-aspartamido)-1,2-didéoxy-D-glucose, est codée par la chaîne peptidique. Nous avons émis cette hypothèse, pour la première fois, en 1964. Nous avons, en effet, observé que huit glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de glycoprotéines diverses (orosomucoïde, ovomucoïde, globulines IgG d'origines diverses, transferrine) possédaient un β-hydroxy-amino-acide (sérine ou thréonine) directement lié à l'asparagine sur laquelle était conjugué le glycanne. Nous avons alors postulé que 'l'existence de ce chaînon structural possédait certainement une signification métabolique et jouait peut-être un rôle dans le branchement des glycannes sur les chaînes peptidiques' (cité par Monsigny²²).

En 1965, l'hypothèse du codage de la conjugaison de la *N*-acétylglucosamine par la séquence des amino-acides au voisinage du point d'attache fut

Tableau 7. Séquences tripeptidiques au voisinage du point de conjugaison de la *N*-acétylglucosamine et de l'asparagine dans quelques glycoprotéines

Avidine	Asn-Met-Thr
α ₂ -Ba-glycoprotéine (Homme)	Asn-Asx-Thr
Caséine (Vache)	Asn-Val-Thr
Désoxyribonucléase (Boeuf)	Asn-Ala-Thr
Fibrinogène (Homme)	Asn-Lys-Thr
Immunoglobulines IgG	Asn-Ser-Thr
Chaîne de Bence-Jones HA (Homme)	Asn-Gly-Thr
Chaîne de Bence-Jones BO (Homme)	Asn-Asp-Thr
Orosomucoïde (Homme)	Asn-Gly-Thr ; Asn-Lys-Thr ; Asn-Thr-Thr ; Asn-Ala-Thr
Ovalbumine	Asn-Leu-Thr
Ribonucléases B, C, D (Boeuf)	Asn-Leu-Thr
Ribonucléase (Rat)	Asn-Cys-Thr ; Asn-Thr-Thr
Ribonucléase (Porc)	Asn-Met-Thr ; Asn-Ser-Thr
Thyroglobuline (Homme)	Asn-Ala-Thr
Transferrine (Homme)	Asn-Val-Thr
Lactotransferrine (Homme)	Asn-Glx-Thr
Conalbumine	Asn-Arg-Thr
Bromelaïn	Asn-Glu-Ser
Chaîne de Bence-Jones (Souris)	Asn-Ile-Ser
Chaîne de Bence-Jones (Cobaye)	Asn-Arg-Ser
Immunoglobulines IgM	Asn-Asp-Ser
Lactalbumine (Vache)	Asn-Ile-Ser
Ribonucléase (Porc)	Asn-Ser-Ser
Transferrine (Homme)	Asn-Lys-Ser
Orosomucoïde	Asn-Lys-Ser

reprise par Eylar qui envisageait alors deux possibilités : le codage par un résidu de thréonine adjacent ou voisin d'un résidu d'asparagine.

Plus récemment, grâce à une meilleure connaissance de la structure des chaînes peptidiques au voisinage des points d'attache, on a admis (Neuberger, 1968 ; Montreuil, 1969 ; Gottschalk, 1969 ; Spiro, 1969) que la 'phrase code' était : Asn—X—Thr. sur la base des résultats expérimentaux suivants :

(a) De nombreuses glycoprotéines possèdent cette séquence C-terminale au voisinage du point de conjugaison glycanne-asparagine (*Tableau 7*). On ne peut toutefois exclure, au vu de quelques résultats (8, jusqu'à présent), que la séquence Asn—X—Ser possède la même signification que la précédente et on généralise cette notion de code en disant que le greffage d'un résidu de *N*-acétylglucosamine sur un résidu d'asparagine présent dans une chaîne peptidique se fait grâce à un tripeptide dans lequel un β -hydroxy-amino-acide se trouve en 'position β ' de l'asparagine, du côté C-terminal de la chaîne peptidique.

(b) Le cas des ribonucléases B, C et D de Boeuf est très significatif. En effet, dans ces glycoprotéines, le groupement glycanne se fixe sur l'asparagine 34 alors qu'il existe 9 autres résidus de cet amino-acide dans la molécule de ribonucléase. Or, la séquence du tripeptide accepteur est la suivante : ³⁴Asn—Leu—Thr, tandis que les séquences des autres tripeptides sont ²⁴Asn—Tyr—Cys, ²⁷Asn—Gln—Met, ⁴⁴Asn—Thr—Phe, ⁶²Asn—Val—Ala, ⁶⁷Asn—Gly—Gln, ⁷¹Asn—Cys—Tyr, ⁹⁴Asn—Cys—Ala, ¹⁰³Asn—Lys—His, ¹¹³Asn—Pro—Tyr.

Le schéma général de synthèse des chaînes d'isoglycannes que nous proposons est donc le suivant. La première étape est marquée par la conjugaison d'une *N*-acétyl-glucosamine sur une asparagine, codée par la séquence Asn—X—Thr (ou Ser). La deuxième étape est constituée par une courte série de transosylations dirigées par des séquences peptidiques au voisinage du point d'attache, différentes de la première (ou l'englobant), séquences que reconnaîtraient les transférases. La troisième étape serait celle des transglycosylations codées par le 'noyau' glycanne formé au cours des deux premières étapes. La nature des oses et leur point d'attache seraient alors déterminés par des transférases spécifiques qui interviendraient en reconnaissant des motifs structuraux portés par le glycanne immature néoformé. Dans une dernière étape agirait, toujours attirées par la configuration des chaînes, des fucosyl-transférases, des neuraminyl-transférases et des α -glycosyl-transférases dont l'action marquerait la fin de la synthèse des chaînes d'isoglycannes.

L'hypothèse que nous proposons reste très spéculative en raison même de l'ignorance où nous nous trouvons de la structure des isoglycannes et des séquences peptidiques au voisinage du point de conjugaison de ces derniers. Toutefois, le chemin est clairement tracé et la mise au point de méthodes d'exploration de la structure des glycannes se révèle d'une urgence extrême. Un énorme travail de méthodologie reste donc à effectuer.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. Adam-Chosson et J. Montreuil. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1881 (1965)
- ² G. A. Adams, M. Yaguchi et M. B. Perry. *Carbohydrate Res.* **12**, 267 (1970).

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES ISOGLYCANNES

- ³ B. Bayard. Thèse Doct. 3ème Cycle, Lille, 1970.
- ⁴ B. Bayard, B. Fournet, S. Bouquelet, G. Spik et J. Montreuil. Résultats non publiés.
- ⁵ B. Bayard et J. Montreuil. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* **77**, 564 (1969).
- ⁶ P. Charet et J. Montreuil. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **273D**, 533 (1971).
- ⁷ P. Charet, M. Monsigny, G. Spik et J. Montreuil. *C.R. Acad. Sci., Paris* **269D**, 1019 (1969);
P. Charet, G. Spik et J. Montreuil, *C.R. Acad. Sci., Paris*, **273D**, 422 (1971).
- ⁸ J. G. Davies, J. C. Zahnley et J. W. Donovan. *Biochemistry* **8**, 2044 (1969).
- ⁹ P. Drzeniek. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 631 (1967).
- ¹⁰ E. H. Eylar. *J. Theoret. Biol.* **10**, 89 (1965).
- ¹¹ B. Fournet et J. Montreuil. Résultats non publiés.
- ¹² A. Gottschalk, in E. Rossi et E. Stoll. *Biochemistry of Glycoproteins and Related Substances, Cystic Fibrosis* **2**, 108, Karger éd., Bâle (1968)
- ¹³ A. Gottschalk. *Nature* **222**, 452 (1969).
- ¹⁴ R. C. Hughes et R. W. Jeanloz. *Biochemistry* **3**, 1535 (1964).
- ¹⁵ L. T. Hunt et M. O. Dayhoff. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 757 (1970).
- ¹⁶ E. Jakubczak, P. Charet, G. Spik, M. Monsigny et J. Montreuil. Résultats non publiés.
- ¹⁷ R. Jakubczak et J. Montreuil. *C.R. Acad. Sci., Paris* **271 D**, 537 (1970).
- ¹⁸ R. Kuhn et D. Ekong. *Chem. Ber.* **96**, 683 (1963).
- ¹⁹ P. F. Lloyd et B. Evans. *Carbohydrate Res.* **8**, 372 (1968).
- ²⁰ S. Mahadevan, C. J. Dillard et A. L. Tappel. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 525 (1969).
- ²¹ Y. Matsushima et N. Fujii. *Bull. Chem. Soc. Japan* **30**, 48 (1957).
- ²² M. Monsigny. *Compt. Rend. Symp. Technicon* Paris (1965).
- ²³ M. Monsigny. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1263 (1969).
- ²⁴ J. Montreuil, A. Adam-Chosson et G. Spik. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1867 (1965).
- ²⁵ J. Montreuil et G. Biserte. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **41**, 959 (1959).
- ²⁶ A. Neuberger et R. D. Marshall. Aspects of the structure of glycoproteins, in H. W. Schulz, R. F. Cain et R. W. Wrolstad. *First Symposium on Foods: Carbohydrates and their roles*. Oregon State University, July 1968, The Air Pub. Co., Westpoint, Conn. éd.
- ²⁷ J. A. Rothfus et E. L. Smith. *J. Biol. Chem.* **238**, 1402 (1963).
- ²⁸ M. Satake, T. Okuyama, K. Ishihara et K. Schmid. *Biochem. J.* **95**, 749 (1965).
- ²⁹ T. Sato, Z. Yosizawa, T. Kotobu et M. Masubuchi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 642 (1967).
- ³⁰ T. Sato, Z. Yosizawa, M. Masubuchi et F. Yamauchi. *Carbohydrate Res.* **5**, 387 (1967).
- ³¹ K. Schmid, in E. Rossi et E. Stoll. *Biochemistry of Glycoproteins and Related Substances, Cystic Fibrosis* **2**, 4, Karger éd., Bâle (1968).
- ³² S. C. Williams et J. K. N. Jones. *Can. J. Chem.* **45**, 275 (1967).
- ³³ M. Makino et I. Yamashina. *J. Biochem. (Japan)* **60**, 262 (1966).
- ³⁴ T. Yamauchi et I. Yamashina. *J. Biochem. (Japan)* **66**, 213 (1969).
- ³⁵ Z. Yosizawa, T. Sato et K. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 417 (1966).