

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE LA PARTIE GLUCIDIQUE  
D'UNE GLYCOPROTÉINE DE MUQUEUSE GASTRIQUE D'AGNEAU  
PAR OXYDATION PERIODIQUE SÉQUENTIELLE\*

ROBERT HUGUET, MARYSE SOLERE ET NICOLE REMY-HEINTZ

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Pharmacie,  
Avenue Charles Flahault, 34-Montpellier (France)*

(Reçu le 18 novembre 1971, accepté après modification le 18 mars 1972)

ABSTRACT

A glycoprotein fraction from sheep gastric mucosa and a glycopeptide derived from it were subjected to two successive periodate degradations. After each cycle the sugars resistant to oxidation were determined and the polyols formed were characterized; the results suggest that 7 to 9% of the chains are composed of the sequence *N*-glycolylneuraminic acid-(2→6)-GalNAc-(1→3)-(?)Gal and 20% of the sequence Fuc-(1→2 or 1→6)-Gal-(1→6)-GNAc. Two-thirds of the mannose residues were oxidized during the first degradation and 60% of the polyols formed bear substituents at C-2 or C-6 (or at both) and 40% at C-4 and C-6. These residues are most probably linked to glucosamine as Man-(1→3 or 4) and are located in part or in totality at branching points. In the vicinity of the protein-carbohydrate linkages, the residues resistant to oxydation are glucosamine (2 moles), galactosamine (1 mole), galactose (1-2 moles), and mannose (1 mole).

SOMMAIRE

Une fraction glycoprotéique de muqueuse gastrique d'agneau et un glycopeptide obtenu à partir de celle-ci ont été soumis à deux dégradations successives par l'ion periodate. Après chaque cycle, nous avons évalué les glucides résistants à l'oxydation et caractérisé les polyols formés, ce qui a permis de préciser que 7 à 9 % des chaînes glucidiques sont composées de la séquence acide *N*-glycolylneuraminique-(2→6)-GalNAc-(1→3)-(?)Gal et 20% de la séquence Fuc-(1→2 ou 1→6)-Gal-(1→6)-GNAc. Les 2/3 des résidus de mannose sont oxydés au cours de la première oxydation et 60% des polyols formés sont substitués sur C-2 ou C-6 (ou sur les deux) et 40% sur C-4 et C-6. Ces résidus sont très probablement liés à la glucosamine comme Man-(1→3 ou 4)-GNAc et se situent en partie ou en totalité à des points de branchement de chaînes. Au voisinage des points de liaison avec la protéine les oses résistants à l'oxydation sont la glucosamine (2 moles), la galactosamine (1 mole), le galactose (1-2 moles) et le mannose (1 mole).

\*Dédicé au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

## INTRODUCTION

L'oxydation périodique suivie de réduction par le borohydrure (dégradation de Smith)<sup>1</sup> a déjà été employée pour l'étude de la structure glucidique de glycoprotéines telles que l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide<sup>2 3</sup>, la fetuine<sup>4</sup>, la taka-amylase<sup>5</sup> et une glycoprotéine isolée de la mucine du colon de mouton<sup>6</sup>. Nous avons appliquée cette technique à une fraction glycoprotéique de muqueuse de caillette d'agneau et à un glycopeptide obtenu à partir de celle-ci. Cette fraction glycoprotéique contient du galactose, du mannose, de la *N*-acétylglucosamine, de la *N*-acétylgalactosamine, du fucose et de l'acide *N*-glycolylneuraminique dans les proportions molaires 4 2 4,5 2,5 2 1. En outre, certaines précisions sur la structure glucidique ont déjà été obtenues par la cinétique de l'hydrolyse chlorhydrique et par des essais d'hydrolyses enzymatiques spécifiques<sup>7</sup>.

## PARTIE EXPÉIMENTALE

*Matériel* — La glycoprotéine est préparée suivant le procédé déjà décrit<sup>7</sup>. La fraction glycopeptidique débarrassée de l'acide sialique est obtenue par protéolyse à la Pronase, puis par hydrolyse à la neuraminidase (3 2 1 18) du *Vibrio cholerae* selon les mêmes techniques que celles utilisées précédemment<sup>7</sup>.

*Dégredation séquentielle* — Deux cycles successifs de dégradation de Smith<sup>8</sup> ont été effectués selon un protocole identique, d'une part sur la glycoprotéine initiale, d'autre part sur le glycopeptide obtenu après action de la neuraminidase.

L'oxydation périodique est effectuée en tampon acétate de sodium 0,1M de pH 4,5, à 4°, à l'obscurité. La concentration en métaperiodate de sodium est de 48 mM et celle en glycoprotéine de 0,2% (p/v). Le periodate consommé est dosé par la méthode de Fleury et Lange<sup>9</sup>. La réduction est faite au borohydrure de sodium 0,15M pendant 15 h à température ambiante, l'hydrolyse des polyols est effectuée par l'acide chlorhydrique 0,1M pendant 18 h.

*Méthodes analytiques* — Les oses neutres totaux sont dosés par la méthode à l'orcinol-acide sulfurique et le fucose par la méthode à la cystéine-acide sulfurique<sup>10</sup>. Après hydrolyse (acide chlorhydrique 2M, 2 h, 100°) et neutralisation par addition de Dowex 1 (X-8, 100–200 mesh,  $\text{HCO}_3^-$ ) suivant le procédé de Hartree<sup>11</sup>, le taux de chaque hexose est déterminé par chromatographie quantitative sur papier selon la méthode de Wilson<sup>12</sup> dans le solvant alcool butylique-pyridine-eau (6 4 3, v/v). Après hydrolyse (acide chlorhydrique 4M, 6 h, 100°), les hexosamines sont évaluées par la méthode de Ludowieg et Benmaman<sup>13</sup>. L'acide *N*-glycolylneuraminique est hydrolysé (acide sulfurique, 20 mM, 1 h, 80°), adsorbé sur une colonne de Dowex 1 (X-8, 100–200 mesh,  $\text{HCO}_3^-$ ), désorbé par l'acide formique 0,3M, puis recherché soit par la méthode de Warren<sup>14</sup>, soit par chromatographie sur papier dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3 1 3, v/v) et révélation par le réactif de Svennerholm et Svennerholm<sup>15</sup>. Le taux de protéine est déterminé par la méthode de Lowry<sup>16</sup>.

Le glycérol et les téritols sont mis en évidence par chromatographie sur papier

dans le solvant alcool butylique-acide acétique-eau (4:1:5, v/v) et révélation par le nitrate d'argent ammoniacal<sup>17</sup>

## RÉSULTATS

La consommation de periodate par la fraction glycoproteique en fonction du temps présente deux points d'infexion, le premier après 1 h, le second entre 8 et 9 h Aussi, l'oxydation périodique est-elle arrêtée à chaque cycle après 6 h pour minimiser toute suroxydation éventuelle La consommation en periodate évaluée après chaque cycle d'oxydation est constante, 1,52–1,60 (1<sup>er</sup> cycle) et 1,59–1,65 (2<sup>e</sup> cycle) moles de periodate par mole d'ose oxyde pour la glycoprotéine, 1,41–1,52 (1<sup>er</sup> cycle) et 1,48–1,57 (2<sup>e</sup> cycle) moles pour le glycopeptide L'acide formique produit n'a pu être déterminé car le milieu tamponné rend son dosage par iodométrie impossible et la titriacidimétrie en présence de thymolphthaléine ou de bleu de bromothymol donne des résultats discordants

La séquence de deux cycles successifs de dégradation a été répétée quatre fois avec la fraction glycoprotéique et trois fois avec la fraction glycopeptidique obtenue après action de la neuramidinase (Tableaux I et II) Au cours des deux premiers cycles, l'étendue de l'oxydation est à peu près aussi importante puisqu'elle s'élève globalement à 57 et 54 % respectivement du nombre total d'unités glucidiques La totalité

TABLEAU I

OXYDATION PÉRIODIQUE SEQUENTIELLE DE LA GLYCOPROTEINE ORIGINALE

Produits	Constituants glucidiques <sup>a</sup>							
	Hex	Gal	Man	HexN	GN	GalN	Fuc	NGNA
Produit de départ (mmole/100 g)	56	37,5	18,5	61	40	21	20	9
1 <sup>er</sup> Cycle d'oxydation								
Produits oxydés, mmoles	26,5	18,5	8	28	20	8	20	9
%	47,2	49,2	43	46,3	49,5	37,6	100	100
Produits non-oxydés (P <sub>1</sub> ) <sup>b</sup> (mmoles/100 g)	29,5	19	10,5	30	19	11	0	0
2 <sup>e</sup> Cycle d'oxydation								
Produits oxydés, mmoles <sup>c</sup>	5,5	4	1,5	13	9	4		
%	18,2	19,8	13,5	42,8	44,5	37,7		
Produits non-oxydés (P <sub>2</sub> ) <sup>b</sup> (mmoles/100 g)	24	15	9	17	10	7		
Total des glucides oxydés, mmoles <sup>d</sup>	32	22,5	9,5	41	29	12		
%	57,1	60	51,3	67,2	72,5	57,1		

<sup>a</sup> Abréviations Hex, hexoses, Gal, galactose, Man, mannose, HexN, hexosamines GN, glucosamine, GalN, galactosamine, Fuc, fucose, NGNA, acide N-glycolylneuraminique <sup>b</sup>P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> représentent la partie du compose non-oxydée respectivement après le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>e</sup> cycle <sup>c</sup>Les quantités données sont calculées par rapport à la composition centésimale de P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> respectivement <sup>d</sup>La totalité des unités oxydées pendant la séquence des deux cycles est calculée en pourcentage par rapport à la composition initiale de la glycoprotéine et du glycopeptide originaux, respectivement

TABLEAU II

OXYDATION PERIODIQUE SEQUENTIELLE DU GLYCOPEPTIDE OBTENU APRÈS ACTION DE LA NEURAMINIDASE

Produits	Constituants glucidiques <sup>a</sup>							
	Hex	Gal	Man	HexN	GN	GalN	Fuc	NGNA
Produit de départ (mmole/100 g)	102	68	34	114	75	39	36	3 (?)
1 <sup>er</sup> Cycle d'oxydation								
Produits oxydés, mmoles	55	31,5	23,5	44,5	31	13,5	36	3 (?)
%	54	46,2	67,9	39,1	41,4	35	100	100
Produits non-oxydés ( $p_1$ ) <sup>b</sup> (mmoles/100 g)	47	36,5	10,5	64,5	42	22,5		
2 <sup>e</sup> Cycle d'oxydation								
Produits oxydés, mmoles <sup>c</sup>	35	29,5	5,5	47,5	31	16,5		
%	74,3	80,6	54	73,6	74	73		
Produits non-oxydés ( $p_2$ ) <sup>b</sup> (mmoles/100 g)	12	7	5	17	11	6		
Total des glucides oxydés, mmoles <sup>d</sup>	90	61	29	92	62	30		
%	88,3	89,7	85,3	80,7	82,7	76,9		

<sup>a b c d</sup>Voir notes du Tableau I

des résidus de fucose et d'acide *N*-glycolylneuraminique sont oxydés. L'élimination des résidus de galactose et celle des résidus d'hexosamines (en particulier de la galactosamine) sont semblables. Seule l'élimination des résidus de mannose est beaucoup plus importante, pendant le premier cycle, dans le glycopeptide que dans la glycoprotéine. Au cours des deux seconds cycles l'intensité de l'oxydation est en revanche très différente dans les deux séquences. Seulement 31 % des unités glucidiques du composé  $P_1$  résultant de l'oxydation de la glycoprotéine sont détruites alors que le composé  $p_1$  résultant de l'oxydation du glycopeptide subit une perte de 74 % de ses glucides.

Ce résultat peut s'expliquer par l'observation que le mannose est le seul glucide à présenter une perte plus grande pendant le premier cycle à partir de la fraction glycopeptidique, au cours de la cinétique de l'hydrolyse acide, nous avions déjà observé que la libération des résidus de mannose était la cause ou l'indice d'un démantellement de la partie interne des chaînes polysaccharidiques<sup>7</sup>. D'autre part, Hughes et Jeanloz<sup>2</sup> ainsi que Barker et Whitehead<sup>18</sup> ont remarqué qu'après plusieurs cycles d'oxydation périodique séquentielle sur une glycoprotéine contenant de l'acide sialique, une quantité importante de glucides reste non oxydée, alors qu'après libération de l'acide sialique, le nouveau composé est beaucoup plus sensible à l'action de l'acide périodique. Hughes et Jeanloz<sup>2</sup> mettent en cause la présence du groupement aldéhydique formé par l'oxydation entre C-7 et C-8 de la partie aliphatique de l'acide sialique, ce groupement aldéhydique peut former des liaisons intramoléculaires qui perturberaient l'oxydation ultérieure des chaînes glucidiques. Sato *et al.*<sup>3</sup>, avec le même composé qu'Hughes et Jeanloz, suivant la même technique, obtiennent des résultats identiques avec les échantillons pourvus et dépourvus d'acide sialique,

quand l'hydrolyse ménagée après le premier cycle est effectuée à 80° pendant 1 h avec de l'acide sulfurique 25MM Ils supposent que ces conditions plus énergiques d'hydrolyse permettent de détacher le produit d'oxydation résultant de l'acide sialique à partir de la molécule intacte

Dans le cas présent, il est possible, non seulement que les deux facteurs interviennent, mais aussi qu'ils interfèrent et que l'acide sialique dégradé protège secondairement une partie des résidus de mannose même au cours du premier cycle. Malgré cette différence dans l'intensité de l'oxydation, certaines similitudes apparaissent entre les deux cycles. Le galactose est le glucide le plus détruit. De plus, il existe une correspondance dans les deux séquences entre la quantité de mannose oxydée pendant le premier cycle et celle de la glucosamine oxydée pendant le deuxième cycle. La composition molaire des composés  $P_2$  et  $p_2$ , résistants à deux cycles d'oxydation, indique une certaine stabilité dans les proportions des divers glucides entre eux. Les proportions molaires pour la glucosamine, la galactosamine, le galactose et le mannose s'élèvent dans le composé  $P_2$  à 2 1,5 3 2 et dans le composé  $p_2$  à 2 1 1,5 1. Sur la base de 2 moles de glucosamine, il y a une sorte de duplication des autres unités glucidiques entre ces deux composés, ce qui pourrait indiquer que la glucosamine est l'unité de liaison avec la partie protéique.

L'analyse des dialysats après chaque cycle dans les deux séquences a montré une absence totale d'hexoses dans tous les dialysats, et la présence d'hexosamines uniquement après les premiers cycles des deux séquences représentant 4 à 5 % des résidus d'hexosamines dans la molécule primitive. On trouve du glycérol après tous les cycles. De l'érythritol est identifié seulement après le deuxième cycle dans la séquence partant de la fraction glycoprotéique, alors qu'il est présent dans la séquence partant de la fraction glycopeptidique uniquement après le premier cycle.

#### DISCUSSION

Nous avons pu mettre en évidence par des résultats précédemment acquis<sup>7</sup> que dans les enchaînements à acide sialique terminal, la *N*-acétylgalactosamine est en position terminale non réductrice après scission de l'acide *N*-glycolylneuraminique, et que la liaison qui l'unit à l'ose suivant n'est probablement pas du type (1→4) et certainement pas du type (1→2). Dans le présent travail, pendant les premiers cycles d'oxydation périodique, le pourcentage d'oxydation de la galactosamine est identique en présence ou en l'absence de l'unité terminale, alors que le résidu suivant, le galactose, n'est pas sensible à l'action de l'acide périodique pendant le premier cycle. La *N*-acétylgalactosamine est donc substituée en C-6 par l'acide *N*-glycolylneuraminique et liée probablement en C-3 du galactose.

Pour les enchaînements à fucose terminal, les résultats de l'oxydation périodique séquentielle concordent avec ceux qui ont été observés précédemment<sup>7</sup>. Les quantités de glucosamine et de galactose oxydées au cours des premiers cycles sont identiques et équivalentes aux quantités de fucose présentes dans la fraction initiale. À ce stade les dialysats ne contiennent que du glycérol, aucune molécule de thréitol n'a pu être

décelée Le galactose ne peut donc être substitué qu'en C-2 ou en C-2 et C-6 Dans le cas de la glucosamine, la liaison avec le galactose n'est possible que sur C-6

Les résidus de mannose présentent un comportement différent dans les deux premiers cycles Les 8 moles qui sont oxydées à partir de la glycoprotéine originale ne peuvent pas présenter d'autres substitutions que celles du galactose oxydé puisque le dialysat ne renferme pour ce cycle que du glycérol, c'est-à-dire que ces 8 moles de mannose peuvent occuper soit une position terminale non réductrice, soit être liées en C-1 et C-2, ou 1 et 6, ou 1,2 et 6 La position terminale est à écarter, étant donné l'apparition très tardive du mannose observée précédemment pendant la cinétique de l'hydrolyse acide<sup>7</sup> On peut donc considérer que ces 8 moles de mannose sont liées aux autres résidus par C-1 et -2 ou -6, ou -1 ou -2 et -6, ou encore -1, -2 et -6

À partir du glycopeptide, 68 % des résidus de mannose sont oxydés, ce qui représente 13 moles de la glycoprotéine originale Déduction faite des 8 moles oxydées à partir de la glycoprotéine, il reste 5 moles de mannose qui semblent susceptibles d'être oxydées dès le premier cycle Dans cette séquence, seul le mannose a été plus atteint par l'action de l'acide périodique Il est donc possible qu'il soit à l'origine de la formation de l'érythritol dans le dialysat Ces 5 moles de mannose seraient de ce fait substituées en C-1, 4, ou 6, ou C-1 et C-4 ou C-6, ou C-1 ou C-4 et C-6, ou encore C-1, -4 et -6 De plus, le mannose semble protéger pendant le premier cycle un certain nombre d'unités de glucosamine qui sont oxydées au second cycle, ce qui permet de supposer une liaison en C-3 ou C-4 de la glucosamine Les structures suivantes ont donc pu être précisées 7 à 9 % des enchaînements sont composés d'acide *N*-glycolyl-neuramique-(2→6)-GalNAc-(1→3)-(?)Gal et 20 % des enchaînements de Fuc-(1→2 ou 1→6)-Gal-(1→6)-GNAc Les 18,5 moles % de mannose se répartissent en 8 moles portant des substituants en C-2 ou -6, ou C-2 et -6, 5 moles portant des substituants en C-4 et C-6, 5-6 moles portant des substituants en C-3, ou C-2 et -4, ou C-2, -4 et -6 Les 13 premières de ces moles sont très probablement liées à la glucosamine dans un enchaînement du type Man-(1(?)→3 ou 4)-GNAc et sont situées en partie ou en totalité à des points de branchement de chaînes Enfin, au voisinage des points de jonction avec la partie protéique, nous avons mis en évidence la présence, pour 2 moles de glucosamine, de 1 mole de galactosamine, 1-2 moles de galactose et 1 mole de mannose

Comme l'ont souligné Hughes et Jeanloz<sup>2</sup>, étant donné que chaque chaîne polysaccharidique reliée à la partie protéique peut avoir une longueur, une composition et une structure différentes, les résultats obtenus ne peuvent être que limités En outre, parmi les renseignements recueillis, certaines observations peuvent être considérées comme acquises, d'autres déductions, tout en étant compatibles avec les résultats des expériences, ne peuvent être considérées que comme des hypothèses de travail.

Nous tentons maintenant, par réduction et rupture de ponts disulfure, d'isoler des sous-unités glycoprotéiques homogènes, susceptibles d'être fragmentées et étudiées sous forme de petits glycopeptides

## RÉFÉRENCES

- 1 R W JEANLOZ, *Protides Biol Fluids, Proc Colloq*, 12 (1964) 305
- 2 R C HUGHES ET R W JEANLOZ, *Biochemistry*, 5 (1966) 253
- 3 T SATO, Z YOSIZAWA, M MASABUCHI ET F YAMAUCHI, *Carbohydr Res*, 5 (1967) 19
- 4 R G SPIRO, *J Biol Chem*, 239 (1964) 567
- 5 H YAMAGUSHI, T IKENAKA ET Y MATSUSHIMA, *J Biochem (Tokyo)*, 68 (1970) 843
- 6 P W KENT, *Exposes Annu Biochim Med*, 30 (1970) 97
- 7 N REMY-HEINTZ, *These Doctorat Pharm*, Montpellier, 1969, 208 pp
- 8 I J GOLDSTEIN, G W HAY, B A LEWIS ET F SMITH, *Methods Carbohydr Chem*, 5 (1965) 361
- 9 P FLEURY ET J LANGE, *J Pharm Chem*, 17 (1933) 107
- 10 J MONTREUIL ET G SPIK, *Microdosage des Glucides*, Monogr Lab Chim Biol Fac Sci Lille, 1963, fasc 1
- 11 E F HARTREE, *Anal Biochem*, 7 (1964) 103
- 12 C M WILSON, *Anal Chem*, 31 (1959) 1199
- 13 J LUDOWIEG ET J BENMAMAN, *Anal Biochem*, 19 (1967) 80
- 14 L WARREN, *J Biol Chem*, 234 (1959) 1971
- 15 E SVENNERHOLM ET L SVENNERHOLM, *Nature*, 181 (1958) 1154
- 16 O H LOWRY, N J ROSEBROUGH, A L FARRAUD ET R J RANDALL, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265
- 17 T PROV, *These Doctorat Pharm*, Montpellier, 1966, p 19
- 18 S A BARKER ET P H WHITEHEAD, *Clin Chem Acta*, 8 (1963) 848