

ÉTUDES SUR LES GLYCOPROTÉINES XLVIII DESCRIPTION D'UN PROCÉDÉ DE FRACTIONNEMENT DES ACÉTOLYSATS*

BERNARD BAYARD** ET JEAN MONTREUIL

Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille,
B.P. n° 3567, 59020-Lille Cedex (France) et Université des Sciences et Techniques de Lille I,
Laboratoire de Chimie Biologique, B.P. n° 36, 59650-Villeneuve d'Ascq (France)

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

ABSTRACT

Acetolysis, followed by quantitative de-*O*-acetylation with sodium methylate of the chloroform extract of the acetolyzates and chromatographic fractionation, was applied to the sialoglycopeptide α and asialoglycopeptide β obtained by pronase hydrolysis of ovomucoid. The acetolysis yielded small amounts of monosaccharides and a large proportion of oligosaccharides without transglycosylation. It does not split off the acetamido groups and, on the other hand, the sialosyl and the 2-acetamido-*N*-(L-aspart-4-oyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosylamine bonds are protected to a high degree. After de-*O*-acetylation, three fractions are obtained from the chloroform phase in the case of a sialoglycoprotide and two in the case of an asialoglycoprotide by chromatography on ion-exchange resins. The first fraction, not retained, contains neutral oligosaccharides from the median portion of the carbohydrate moieties. The second fraction, present only in the acetolyzates of the sialoglycopeptides and released from the anion-exchange resin, contains sialo-oligosaccharides from the outer part of the carbohydrate moieties. The last fraction, eluted from the cation-exchange resin, contains the glycopeptides and represents the carbohydrate components near the site of attachment to the peptide chain.

SOMMAIRE

L'acetolyse suivie d'une saponification quantitative par le méthylate de sodium des produits extraits des acétolysats par le chloroforme et le fractionnement chromatographique de ces derniers ont été appliqués au sialoglycopeptide α et à l'asialoglycopeptide β obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde. Contrairement à l'hydrolyse ménagée par les acides ou par les résines de polystyrene sulfone, l'acétolyse libère des quantités très faibles de monosaccharides et une proportion élevée d'oligosaccharides sans provoquer de transglycosylation. Elle respecte les groupements acetamido des *N*-acétylhexasamines et une partie importante des liaisons sialosyl et

*Dédicace au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire. Ces résultats ont été rassemblés dans le mémoire de thèse de 3ème cycle de B. Bayard et ont fait l'objet d'une courte note préliminaire¹.

**Attaché de Recherche du C.N.R.S.

2-acétamido-N-(L-aspart-4-oyl)-2-désoxy- β -D-glucopyranosylamine En outre, elle ne provoque pas de *N*-acetylation de la fraction protidique Le fractionnement sur échangeurs de cations et d'anions de la phase chloroformique préalablement saponifiée donne trois fractions La première n'est pas retenue par les résines et contient les oligosaccharides neutres qui proviennent de la partie «centrale» des groupements glycanniques La seconde, présente seulement dans les acétolysats de sialoglycopeptides, est déplacée de l'échangeur d'anions et contient des sialo-oligosaccharides qui appartiennent à la partie la plus externe des groupements glycanniques La troisième, éluée de l'échangeur de cations, renferme des glycoprotides et correspond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache avec la chaîne peptidique

INTRODUCTION

L'hydrolyse acide partielle des glycoprotides a été utilisée par de nombreux auteurs (voir Montreuil *et al*² et Neuberger et Marshall³) Elle présente néanmoins les inconvenients majeurs suivants : libération d'une quantité élevée de monosaccharides au détriment du rendement en oligosaccharides, libération quantitative des acides sialiques qui prive les hydrolysats des sialo-oligosaccharides et risque de transglycosylation et de formation artificielle d'oligosaccharides Parmi les méthodes susceptibles d'éliminer ces inconvénients, l'acétolyse⁴ a retenu notre attention car elle a été largement utilisée avec succès dans l'étude de polysaccharides d'origine animale ou végétale⁵⁻⁶ Au contraire, elle a été très peu employée dans le domaine des glycoprotides, l'étude des acétolysats étant limitée à l'isolement d'un ou deux di- ou trisaccharides à partir de substances spécifiques de groupes sanguins⁷⁻¹⁰ et du glycopeptide du colostrum de vache¹¹

Dans le présent mémoire, nous décrivons un procédé original de fractionnement des acétolysats de glycoprotides qui fournit, dans le cas de sialoglycoprotides, trois groupes de composés des sialo-oligosaccharides, des oligosaccharides neutres et des glycoprotides qui proviennent, respectivement, des parties «externes», «centrales» et «internes» des groupements glycanniques En outre, nous avons réalisé une étude poussée des oligosaccharides neutres dont les résultats sont rassemblés dans le mémoire suivant¹²

PARTIE EXPERIMENTALE

Glycoprotides glucides et dénus — Les sialoglycopeptides α et β ont été isolés à partir des hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde¹³ selon le mode opératoire décrit précédemment¹⁴⁻¹⁵ La composition en glucides du sialoglycopeptide α est la suivante : monosaccharides neutres (D-mannose/D-galactose 2,6) 37,3%, 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose 39,4%, acide *N*-acetylneuramique 7,8%, celle de l'asialoglycopeptide β est : monosaccharides neutres (D-mannose/D-galactose 5) 31,1%, 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose 64,6% Le lactose, le cellobiose, le maltose, le melibiose, le D-galactose, le 2-amino-2-désoxy-D-glucose et le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose

étaient des préparations commerciales (Nutritional Biochem Corp , Cleveland, Ohio) Le chitobiose a été isolé par chromatographie préparative sur papier d'un acetolysat de chitine¹⁶ Le 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-D-galactose et le 2-acetamido-1,3,4,6-tétr-*O*-acétyl-2-désoxy-D-glucose ont été obtenus par acétylation des monosaccharides correspondants

*Dosages colorimétriques des glucides*¹⁸ — Les monosaccharides neutres ont été doses par la méthode à l'orcinol sulfurique¹⁹ modifiée²⁰, les hexosamines par le procede de Belcher *et al*²¹, apres une hydrolyse chlorhydrique (acide chlorhydrique 4M exempt de fer à 100° pendant 4 h, en tubes scelles sous vide), les *N*-acetylhexosamines par la technique de Reissig *et al*²² modifiée par Levvy et McAllan²³ et les acides sialiques par la méthode de Werner et Odin²⁴ et par le procédé de Warren²⁵

Nous avons en outre, été amenés à mettre au point un procede de caracterisation et de dosage, en presence de 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose libre, des chromogènes formés en milieu alcalin à partir de 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose Dans un premier temps, nous dosons, par la methode de Levvy et McAllan²³, l'ensemble des *N*-acetylhexosamines et des chromogènes Nous effectuons ensuite une seconde serie de détermination en l'absence du borate de potassium qui était destine à transformer le 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose en chromogènes dans ces conditions, nous dosons uniquement les chromogenes preexistants et nous calculons, par difference, la quantite de *N*-acétylhexosamines

Chromatographie des monosaccharides et de leurs dérives O-acetyles — Les monosaccharides neutres et le 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose et leurs derives *O*-acetylés ont été separees par chromatographie sur papier Whatman n° 1 ou n° 3 et sur papier Schleicher et Schull 2040 b, dans les systemes de solvants suivants Solv 1 alcool butylique-acide acetique-eau (4 1 5, v/v), Solv 2 acetate d'éthyle-pyridine-eau (2 1 2, v/v), Solv 3 2-butanol sature d'eau Les derives acetylcs des monosaccharides ont été analyses par chromatographie sur couche mince de gel de silice G dans le Solv 4 benzène-methanol (9 1, v/v) Ils ont été reveles sur papier par le reactif à l'oxalate d'aniline²⁶ et sur silice par le reactif à l'hydroxamate ferrique de Tate et Bishop²⁷ Les *N*-acetylhexosamines ont été mises en évidence, d'une maniere spécifique, par la reaction d'Ehrlich « indirecte »²⁸ et les chromogenes par la reaction d'Ehrlich « directe »²⁸

Les monosaccharides neutres ont été doses par chromatographie sur papier²⁹ après avoir été purifées par un passage successif sur des resines échangeuses de cations (Dowex 50 X-8, 25-50 « mesh », H⁺), puis d'anions (Duolite A-102 D, 25-50 « mesh », HCO₃⁻)

Analyses électrophoretiques — L'electrophorese sur papier a été appliquee a l'étude des *N*-acetylhexosamines dans les conditions expérimentales suivantes cuves « en toit », papier Whatman n° 3, solution tampon à 1% (p/v) de borate de sodium (pH 9,2)³⁰, 7 v/cm pendant 4 h, revelation des électrophoregrammes, préalablement séches à l'étuve à 100° pendant 15 min, par pulvérisation du reactif au *p*-dimethylaminobenzaldehyde³¹ Le fractionnement des sialo-oligosaccharides a été réalisé dans les mêmes conditions mais dans un tampon acétate (pH 3,9)³²

Dosages des acides aminés — Les acides aminés ont été identifiés et dosés à l'Auto-analyseur Technicon après des temps d'hydrolyse (acide chlorhydrique 5,6M, 105°) de 24, 48 et 72 h

Hydrolyse acide ménagée des glycopeptides² — Les hydrolysats obtenus par traitement de 100 mg de glycopeptides en solution dans 10 ml d'eau, en présence de 10 g de Dowex 50 X-8 (25-50 « mesh », H⁺) à 100°, pendant des temps variant de 5 min à 4 h, ont été évaporés à siccité sous pression réduite et analyses par chromatographie sur papier Whatman n° 3 (Solv 1). En outre, ils ont été soumis à un fractionnement sur colonne de charbon-Celite^{3,3}

Acétolyse des glycopeptides — Nous avons appliqué le protocole expérimental décrit par Kuhn et Ekong^{1,1} que nous avons modifié en réalisant la précipitation quantitative des glucides peracétylés contenus dans la phase d'extraction chloroformique par l'éther de pétrole. Les glycopeptides rigoureusement anhydres sont ajoutés par petites fractions, dans la proportion de 1 g pour 25 ml, à un mélange maintenu à 4° d'acide acétique glacial, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique conc (10 10 1, v/v). La solution obtenue est maintenue à 20° pendant 1 à 4 jours sous agitation constante. Dans quelques expériences, nous avons en outre introduit du D-mannose-1-¹⁴C (20 µCi par ml de solution acétolysante) afin de vérifier, par autoradiographie des chromatogrammes, l'absence de réaction de transglycosylation.

Les solutions d'acétolyse sont versées goutte à goutte sur 75 g de glace pilée. Après décongélation, le pH du mélange est amené à 4,5 par l'addition d'hydrogénocarbonate de sodium. La gelée transparente visqueuse qui renferme les glucides acétylés est extraite 8 fois par 200 ml de chloroforme pur. Les extraits chloroformiques sont rassemblés, lavés par 150 ml d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 1% et séchés sur chlorure de calcium anh. La solution obtenue est concentrée sous pression réduite à environ 20 ml. L'addition de 2 l d'éther de pétrole provoque la précipitation quantitative des glucides peracétylés que l'on recueille par centrifugation après un repos de 18 h à 4°. On obtient ainsi la « Phase Chloroformique » (précipité) dont les constituants sont immédiatement saponifiés. Quant à la « Phase Aqueuse », elle est directement soumise à la chromatographie sur échangeurs de cations.

O-Désacétylation des composés peracétylés de la Phase Chloroformique — Nous avons jugé nécessaire d'effectuer une étude critique systématique des méthodes classiques de O-désacétylation car celles-ci avaient été appliquées essentiellement à des dérivés acétylés de monosaccharides neutres ou à des produits d'acétolyse de polysaccharides dépourvus de N-acetylhexosamines. Or celles-ci sont sensibles à l'action des agents alcalins quand elles se trouvent en position terminale réductrice et quand, en outre, leur groupement hydroxyle en C-4 est libre. Dans ces conditions, elles donnent, en effet, naissance à des chromogènes qui demeurent fixes au reste de la chaîne glucidique ou qui s'en détachent selon que la N-acetylhexosamine est conjuguée en C-6 ou en C-3. Nos essais ont été effectués sur le D-galactose pentaacétate et sur le 2-amino-2-désoxy-D-glucose pentaacétate. La composition en glucides des solutions obtenues a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques, chromatographiques et spectrographiques.

graphiques et électrophorétiques décrites dans les paragraphes précédents et les chromogènes ont été recherchés par chromatographie sur papier dans le Solv 3 et révélés par le *p*-diméthylaminobenzaldehyde³¹

*Saponification par l'hydroxyde de sodium*³⁴ À 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,1M, on ajoute 50 ml d'une solution acetonique renfermant 100 mg de composé acétyle. La solution est maintenue constamment à 4° et des prélèvements de 20 ml sont effectués à des temps variant de 5 à 75 min. L'excès d'hydroxyde de sodium est dosé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1M. Chaque fraction ainsi neutralisée est purifiée par un passage successif sur une colonne (2 × 40 cm) de Dowex 50 (X-8, 25–50 « mesh », H⁺) puis de Duolite A-40 (HCO₃⁻). Les effluents neutres auxquels on joint les eaux de lavage des résines sont concentrés à 10 ml.

*Saponification par le méthanol ammoniacal*³⁵ Les composés peracetylés sont dissous à raison de 10 mg dans 1 ml de méthanol saturé d'ammoniac. La solution est maintenue à 4° pendant 6 h, sous agitation magnétique. Le solvant est ensuite rapidement éliminé par évaporation sous vide à 20° et le résidu sec est repris avec une quantité déterminée d'eau distillée.

*Saponification par la triméthylamine*³⁶ Les D-galactose et 2-amino-2-désoxy-D-glucose pentaacétates (100 mg de chacun) sont dissous dans le mélange méthanol-eau (8/1, v/v) auquel on ajoute une solution de triméthylamine à 45% (3 vol). La solution est maintenue à 4° pendant 18 h et concentrée ensuite sous pression réduite.

*Saponification par le méthylate de sodium*³⁷ Les composés acetylés (50 mg de chacun) sont dissous dans 100 ml de solution méthanolique de concentration finale en méthylate de sodium 0,5–0,1 et 0,01M. Les solutions sont maintenues à 4° pendant des temps variant de 10 à 60 min. Elles sont ensuite débarrassées des ions sodium par passage sur une colonne (1 × 10 cm) de Dowex 50 (X-8, 25–50 « mesh », H⁺). La solution effluente est ensuite concentrée sous pression réduite à 5 ml.

Fractionnement chromatographique des produits de l'acétolyse — Les solutions aqueuses des constituants de la « Phase Chloroformique » préalablement saponifiées ont été soumis à la chromatographie sur Dowex 50 (X-2, 50–200 « mesh », H⁺) et de Dowex 1 (X-4, 200–400 « mesh », HCO₃⁻). On obtient deux fractions dans le cas d'asialoglycopeptides : la « Fraction Neutre » qui résulte du passage sur les deux types d'échangeurs d'ions et la « Fraction Basique I » déplacée de l'échangeur de cations par une solution d'ammoniaque à 5% (v/v). Dans le cas de sialoglycopeptides, on obtient une troisième fraction, la « Fraction Acide », par le traitement de l'échangeur d'anions avec une solution d'acide formique à 2% (v/v).

La « Phase Aqueuse » est passée, sans saponification préalable, sur une colonne (2 × 25 cm pour des aliquotes correspondant à 100 mg de glycopeptide) de Dowex 50 (X-2, 100–200 « mesh », H⁺) qui fixe les peracetyl-glycoprotides hydrosolubles. Après un lavage soigneux de la résine avec de l'eau distillée, ceux-ci sont déplacés par une solution d'ammoniaque à 5% (v/v) qui réalise, à la fois, le déplacement des composés et leur saponification. Cette fraction constitue la « Fraction Basique II » de la « Phase Aqueuse ».

Nous avons fractionné les oligosaccharides sur des colonnes de charbon-Celite³³.

(mélange à poids égaux de charbon Activit X-100 et de Celite 535 préalablement laves, le premier, avec de l'acide chlorhydrique conc puis avec de l'eau distillée et, la seconde, avec de l'eau distillée) La taille des colonnes était déterminée sur la base de $0,8 \times 10$ cm pour 10 mg de glucides totaux

Le fractionnement de quelques composés de faible masse moléculaire a été réalisé par chromatographie sur Séphadex G-15 dans les conditions suivantes (pour 10 mg de substance) colonnes de 2×86 cm, élution par l'eau, débit 5,6 ml/h, volume des fractions 2,8 ml

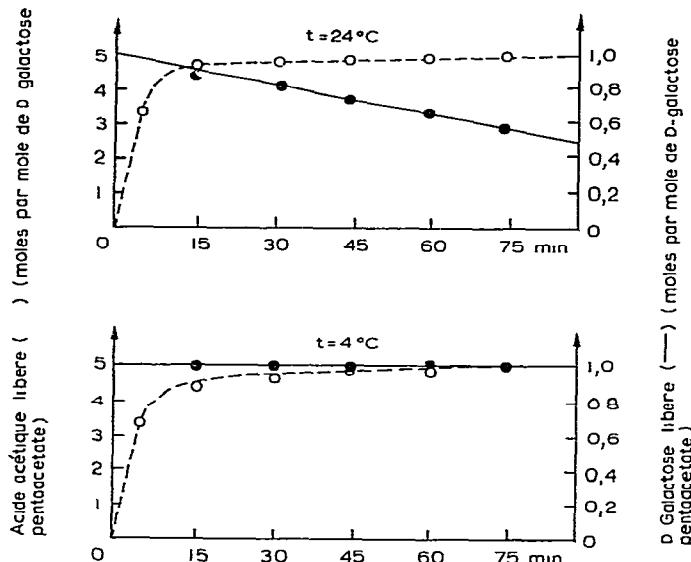


Fig. 1 Saponification du D-galactose pentaacétate par l'hydroxyde de sodium 0,08M à 24° et à 4°

RÉSULTATS

Choix d'un procédé de O-desacétylation — Les résultats que nous avons fournis l'étude critique des différents procédés de O-desacétylation en milieu alcalin, appliqués aux dérivés peracétylés du D-galactose et du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose choisis comme modèles, peuvent se résumer de la manière suivante

On observe que, dans le cas de l'hydroxyde de sodium 0,08M à 24° et à 4° sur le peracétyl-D-galactose (Fig. 1), la saponification est totale en 60 min mais que l'action à 24° est à proscrire car on ne peut éviter la destruction d'une proportion importante de D-galactose (35% après 60 min). Au contraire, à 4°, le D-galactose libéré est retrouvé quantitativement (Tableau I) dans le milieu réactionnel, même au-delà du temps nécessaire pour réaliser une saponification totale. Nous avons étudié par chromatographie et électrophorèse sur papier le comportement du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose pentaacetate en présence d'hydroxyde de sodium 0,08M à 4° pendant

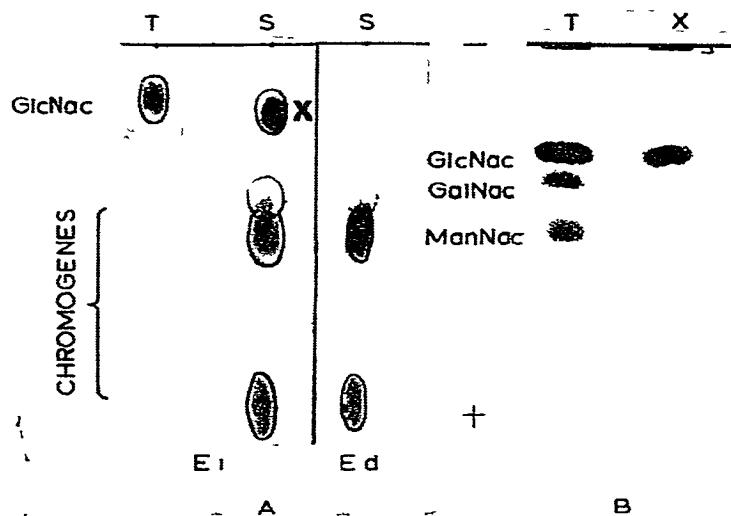


Fig 2 (A) Chromatographie des composés formés par l'action de l'hydroxyde de sodium 0,08M à 4° pendant 1 h sur le 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy-D-glucose suivie d'une purification sur échangeurs de cations Chromatographie dans du 2-butanol saturé d'eau, papier Whatman n° 1 pendant 16 h révélation par la réaction d'Ehrlich « indirecte » (E 1) et « directe » (E d), T témoin de 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose (GlcNac), S solution de saponification, X composé identifié par électrophorèse (B) au 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose (B) Electrophorèse du composé X isolé par chromatographie préparative sur papier dans les conditions décrites en A Electrophorèse selon Foster et Stacey³⁰ sur papier Arches 304 en tampon de borate de sodium de pH 9.2 12 V/cm pendant 4 h révélation par le réactif d'Ehrlich, T témoin de 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose (GlcNac) 2-acetamido-2-desoxy-D-galactose (GalNac) et 2-acetamido-2-desoxy-D-mannose (ManNac)

60 min La chromatographie sur papier (Fig. 2A) révèle la présence, à côté d'un composé X que nous avons isolé par chromatographie préparative sur papier et identifié par électrophorèse au 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose (Fig. 2B) d'une proportion importante de chromogénés (28,5 %, Tableau I) La saponification des oligosaccharides peracétyles par l'hydroxyde de sodium ne pouvait donc pas être retenue car elle fait courir un risque de destruction du 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose situé en position terminale réductrice dans les oligosaccharides

Le méthanol ammoniacal ne peut être employé comme agent de saponification car il donne lieu à la formation de glycosylamines (Fig. 3) et provoque la formation de chromogénés (Tableau I)

Le triméthylamine réalise une saponification assez satisfaisante du D-galactose pentaacetate mais elle transforme aussi une proportion importante du 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose en chromogénés (Tableau I) Pas plus que les précédents, ce procédé ne peut donc être utilisé pour saponifier les glucides réducteurs peracétyles

La cinétique d'action du méthylate de sodium à différentes concentrations sur le 2-amino-2-desoxy-D-glucose pentaacetate a été étudiée en fonction du temps (Tableau I et Fig. 4) On voit que, seul le méthylate de sodium 0,01M agissant pendant 1 h à 4°

TABLEAU I
ACTION DE DIVERS AGENTS DE *O*-DISACRYLATION SUR LE 1,2,3,4,6-PENTA-*O*-ACETYL-D GALACTOSE ET SUR LE 2-ACETAMIDO 1,3,4,6-TETRA-*O*-ACETYL-
2-DISOXY-D GLUCOSE

Agents ^a	Temp (°)	Temps (h)	Gal (%) ^a	GNAc (%) ^b	Réactions secondaires	
					Glycosamines	Chromogènes ^c
Hydroxyde de sodium 0,08M	4	1	101	71,5	0	28,5
Méthanol ammoniacal	4	6	44	79,2	+	16,1
Triméthylamine	4	18	92	65,1	0	32,7
Méthylate de sodium 0,01M	4	1	100	94,5	0	0

^aD-Galactose récupéré, dosé par chromatographie quantitative sur papier ^b2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose récupéré, dosé par la méthode colorimétrique de Reissig *et al.*²², modifiée par Levy *et al.*²³ ^cVon Partie Expérimentale

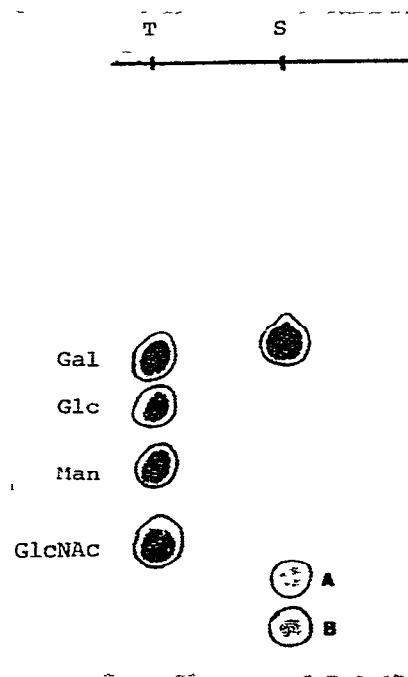


Fig. 3 Chromatographie des composés formés au cours de l'action du méthanol ammoniacal sur le D-galactose pentaacétate sur papier Schleicher et Schull n° 2040 b pyridine-acétate d'éthyle-eau (1:2:2, v/v) pendant 18 h, révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline²⁶, T témoins de D-galactose (Gal), D-glucose (Glc), D-mannose (Man) et 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose (GlcNAc) S solution de saponification, A, B α - et β - (ou pyrano- et furano-) D-galactosylamines (cf Cerezo et Deulofeu³⁹) de R_{Gal} 1,83 et 2,00 respectivement

réalise la saponification quantitative de ce composé sans provoquer la formation de chromogènes

Fractionnement sur échangeurs d'ions des acétolysats de glycopeptides — Nous avons appliquée à l'asialoglycopeptide β de l'ovomucoïde les procédés d'acétolyse (durée de la réaction 4 jours) et d'extraction des composés peracétyles que nous avons décrits dans les paragraphes précédents. La composition centésimale et molaire en glucides et en amino-acides de chacune des fractions est précisée dans le Tableau II. La « Fraction Neutre » saponifiée est la plus importante puisqu'elle représente 75% du glycopeptide natif. Elle ne renferme pas d'acides aminés et est donc exclusivement de nature glucidique. La « Fraction Basique I » saponifiée (4,5% environ du glycopeptide natif) contient des acides aminés conjugués : acide aspartique et threonine. Le comportement chromatographique de cette fraction basique retenue par l'échangeur de cations prouve que les fonctions aminées des acides aminés n'ont pas été acétylées au cours de l'acétolyse. La « Fraction Basique II » (12,4% environ du glycopeptide natif) est constituée, elle aussi, par des glycopeptides renfermant une proportion relativement plus faible de glucides. Elle renferme des composés perace-

TABLEAU II
COMPOSITION CHIMIQUE ET MOLAIRE DES FRACTIONS OBTENUS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS DES PHASIS CHLOROFORMIQUE
ET AQUEUSE DES ACIDES POLYSAIS DE L'ANALOG GLYCOPÉPTIDI β DE L'OVOMUCOID

Caractéristiques	Glycopeptide β	Fractions	« Neutre »		« Bisique I »		« Bisique II »	
			« Neutre »	« Bisique I »	« Bisique II »	« Bisique I »	« Bisique II »	« Bisique II »
Rendements (%)		74,8		4,5		12,4		
Composition centésimale (%)								
Monosaccharides neutres	11,1	29,6	42	28,1				
2-Acétylamido-2-désoxy-D glucose	64,6	70,1	49,5	53,6				
Prorides totaux	4,4	0	9,3	17,2				
Rapport 2-acétylamido-2-désoxy-D glucose à monosaccharides neutres	1,68	1,91	0,95	1,54				
Composition moléculaire ^a								
D-Galactose	1	1	0,6	0				
D-Mannose	5	5,8	3,2	1,16				
2-Acétylamido-2-désoxy-D glucose	10,3	11	3,2	1,8				
Acide aspartique	1,15	0	1	1				
Threonine	0,85	0	0,2	0,6				

^aEn moles par mole de glycopeptide dans le cas du glycopeptide β et des « Fractions Bisiques », en moles par mole de D-galactose dans le cas de la « Fraction Neutre »

TABLEAU III
COMPOSITION CHIMIQUE ET MOLAIRE DES FRACTIONS OBTIENNUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS DES PHASES CHLOROFORMIQUE
ET AQUEUSE DES ACÉTOXYATS DU SIALOGLYCOPEPTIDE DE L'OVOMUCOÏDE

Caractéristiques	Glycopeptide α	Fractions			
			« Neutre »	« Acide »	« Basique I »
Rendements (%)		49,3	13,6	5,1	13,5
Composition centésimale (%)		44,6	32,8	38,5	20,2
Monosaccharides neutres	37,3	53,9	9,4	43,9	40,7
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	39,4	0	57,0	0	0
Acide N-acétylneuramique	7,8	0	0	17,4	38,9
Protides totaux	14,0	0			
Rapport 2 acétamido 2 désoxy D glucose à monosaccharides neutres	1,02	1,02	0,23	0,93	1,62
Rapport monosaccharides neutres à acide N-acétylneuramique	4,00		0,58		
Composition molaire ^a					
D Galactose	1	1	1	0	0
D Mannose	2,6	2,8	1,2	2,7	0,74
2 Acétamido-2-désoxy-D glucose	3,8	3,8	0,5	2,5	1,22
Acide N-acétylneuramique	0,8	0	0,8	0	0
Acide aspartique	1,07	0	0	1	1
Threonine	0,33	0	0	0	0,17

^aEn moles par mole de glycopeptide dans le cas du glycopeptide α et des « Fractions Basiques », en moles par mole de D-galactose dans le cas de la « Fraction Neutre » et de la « Fraction Acide »

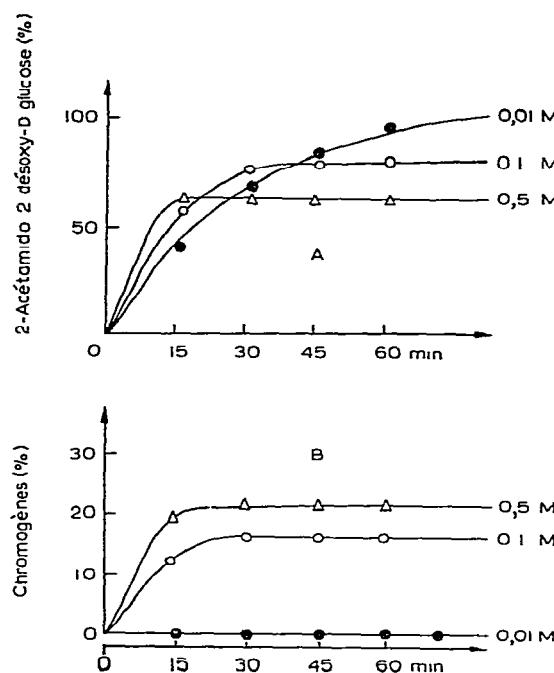


Fig 4 Action du methylate de sodium 0,01, 0,1 et 0,5M sur le 2-acétamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acétyl-2-désoxy-D-glucose A formation du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose B formation des chromogènes En abscisses durée de la réaction en min En ordonnées pourcentage (par rapport au 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose) de chromogènes présents dans le milieu réactionnel préalablement purifié sur échangeur de cations

tylés rendus hydrosolubles en milieu acide par l'importance de la copule peptidique hydrophile en regard de la copule glucidique peracétylée hydrophobe

L'application au sialoglycopeptide α des mêmes procédés d'acétolyse et de fractionnement fournit, outre les 3 fractions précédentes, une « Fraction Acide ». Les principales caractéristiques des quatre fractions obtenues sont décrites dans le Tableau III. Les « Fractions Basiques I et II » présentent beaucoup d'analogies avec les fractions homologues obtenues à partir de l'asialoglycopeptide β . En effet, les rendements sont très voisins et, comme dans le cas précédent, il s'agit de deux fractions de nature glycopeptidique. Enfin, leur composition en glucides sont semblables. La seule différence apparente porte sur la présence de D-galactose dans la « Fraction Basique I » fournie par l'asialoglycopeptide β alors que ce glucide est absent dans la fraction homologue fournie par le sialoglycopeptide α . La « Fraction Neutre » ne représente plus que 50% environ du sialoglycopeptide α au lieu de 75% dans le cas de l'asialoglycopeptide β . L'appauvrissement en oligosaccharides neutres de cette fraction s'est fait au profit de la « Fraction Acide » des sialo-oligosaccharides. Le caractère neutre de cette fraction s'explique par l'absence d'acide sialique et d'acides aminés. A cet égard, elle est donc uniquement de nature glucidique. La « Fraction Acide » est la seule à contenir de l'acide sialique. Comme elle est dépourvue d'acides

aminés, nous pouvons conclure qu'elle est composée de sialosides de mono- et d'oligosaccharides

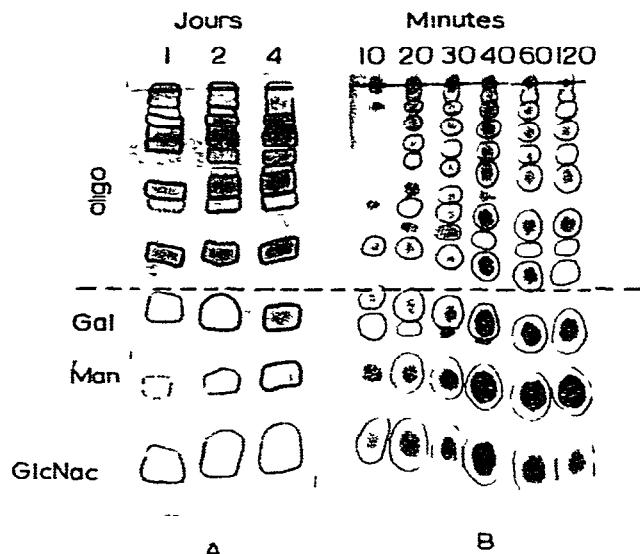


Fig 5 Chromatographie des glucides neutres presents dans l'acetolysat (A) et dans l'hydrolysat partiel (B) par le Dowex 50 du glycopeptide β de l'ovomucoïde, sur papier Whatman n° 3, systeme-solvant pyridine-acetate d'éthyle-eau (1 2 2 v/v) pendant 18 h révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline²⁶ Oligo zone des oligosaccharides, Gal D-galactose Man D-mannose, GlcNac 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose

Fraction Neutre — La chromatographie sur papier de la « Fraction Neutre » des acetolysats du glycopeptide β (Fig. 5) montre que ces derniers renferment une proportion très faible de monosaccharides (D-galactose, D-mannose 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose) et une quantité importante d'oligosaccharides. Le nombre et la quantité des oligosaccharides sont maximaux au bout de 4 jours d'acetolyse. Nous avons donc retenu, dans la suite de nos expériences, cette durée de l'acetolyse. Dans le cas de l'acetolyse effectuée en présence de D-mannose- $I^{14}C$, l'autoradiographie des chromatogrammes précédents révèle la présence d'une seule tache à l'emplacement du D-mannose. Ce résultat démontre que l'acetolyse ne provoque pas de transglycosylation. Dans le cas de l'asialoglycopeptide β , la chromatographie sur charbon-Celite (Tableau IV) confirme la démonstration par chromatographie sur papier que l'acetolyse libère relativement peu de monosaccharides.

Fraction Basique I — La chromatographie et l'électrophorese sur papier n'ont pas permis de séparer d'une manière satisfaisante les constituants de cette fraction en raison de leur masse moléculaire relativement élevée, dans le cas de la chromatographie, et de l'identité des charges, dans le cas de l'électrophorese. Au contraire, la chromatographie sur gel de Sephadex G-15 nous a donné 2 pics principaux, tous deux

TABLEAU IV

COMPOSITION DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CHARBON-CELITE
DE LA « FRACTION NEUTRE » DE LA PHASE CHLOROFORMIQUE D'UN ACETOLYSAT DE
L'ASIALOGLYCOPEPTIDE β DE L'OVOMUCOÏDE

Caractéristiques	Fractions		
	Aqueuse	Éthanolique (1,5%) ^a	Éthanolique (50%) ^a
Rendements (%) ^b	9,0	11,3	79,7
Monosaccharides neutres (%)	96,5		33,8
D-Galactose (%)	53,6		4,1
D-Mannose (%)	42,9		29,7
2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose (%)	0	c	65,8
Rapport D-mannose à D-galactose	0,8 ^d		7,1 ^d

^aV/v ^bEn % (p/p) de la « Fraction Neutre » soumise à la chromatographie ^cCette fraction renferme uniquement du 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose ^dÀ titre de comparaison, les valeurs du même rapport pour le glycopeptide α natif et pour la « Fraction Neutre » totale sont, respectivement, 5 et 5,8

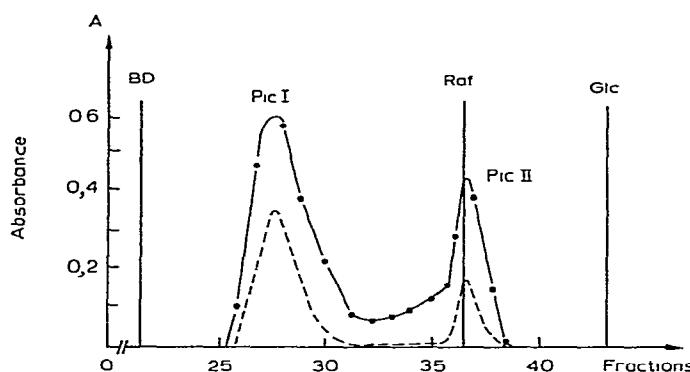


Fig 6 Chromatographie sur colonne (2 × 86 cm) de Sephadex G-15 de 10 mg de la « Fraction Basique » de l'acetyl-sat du glycoprotid α de l'ovomucoïde 2,8 ml, réaction à l'orcinol (—) et à la ninhydrine (---). Les traits pleins verticaux correspondent au volume d'exclusion du Bleu Dextran (BD) du raffinose (Raf) et du D-glucose (Glc)

de nature glycoprotidique (Fig 6). Le Pic I est hétérogène en électrophorèse. Il renferme des glycoprotides dont la masse moléculaire maximale, déterminée sur la base du volume d'exclusion du Bleu Dextran, est de l'ordre de 820 et qui sont composés de D-mannose et de 2-acetamido-2-desoxy-D-glucose (en quantité équimolaire), d'acide aspartique et de thréonine. Le Pic II possède une masse moléculaire de l'ordre de 500 et renferme du D-mannose, du 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose et de l'acide aspartique (accompagné parfois de traces de thréonine), dans des proportions sensiblement équimolaires. Sur la base de résultats antérieurement acquis¹⁵, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il présente l'enchaînement suivant Man → GNAc → Asn (Thr)

Fraction Basique II — Contrairement aux glycoprotides de la Phase Chloroformique, ceux de la Phase Aqueuse renferment une plus faible proportion de glucides et leur masse moléculaire est en moyenne plus basse. Dans le cas du sialoglycopeptide α , en particulier, la « Fraction Basique II » contient près de 40 % de protides totaux. La chromatographie sur papier dans le Solv 1 nous a permis d'isoler l'un de ses constituants composé, en proportions équimolaires, d'acide aspartique, de thréonine et de 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose. En nous fondant à nouveau sur des résultats antérieurement acquis¹⁵, nous pensons qu'il s'agit du glycopeptide GNAc \rightarrow Asn (Thr).

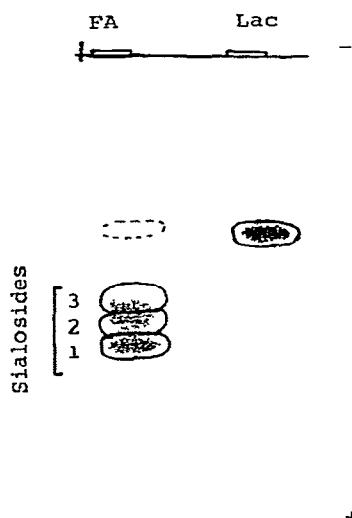


Fig. 7 Électrophorèse de la « Fraction Acide » (FA) de l'acetolysat du glycopeptide α de l'ovomucoïde sur papier Whatman n° 2 en tampon de Michl³² de pH 3,9 7 v/cm pendant 4 h, révélation à l'oxalate d'aniline²⁶. T témoin de lactose (Lac)

Fraction Acide — L'électrophorèse sur papier à pH 3,9 (Fig. 7) montre que la « Fraction Acide » de l'acetolysat du sialoglycopeptide α ne renferme que des traces de composés neutres et que les glucides acides se résolvent en trois fractions : l'une ($R_{Lactose}$ 1,70) correspond à l'acide *N*-acétylneuraminique libéré au cours de l'acéto-lyse, les deux autres ($R_{Lactose}$ 1,52 et 1,40) correspondent à des sialosides que nous n'avons pas encore identifiés.

La chromatographie sur charbon-Célite de la « Fraction Acide » a fourni un disaccharide elué par l'éthanol à 20 % et composé d'acide *N*-acétylneuraminique et de D-galactose en proportions équimolaires et un mélange de sialosides elués par l'éthanol à 25 % (v/v) et composé d'acide *N*-acétylneuraminique, de D-mannose, de D-galactose et de 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose dans les proportions relatives 2 2 1 1.

DISCUSSION

La dégradation des glycoprotides par acétoxyse réalisée dans le but d'obtenir des fragments oligosaccharidiques représente un avantage certain sur l'hydrolyse ménagée par les acides dilués ou par les résines de polystyrène sulfoné. En effet, contrairement à l'hydrolyse, l'acétoxyse libère des quantités très faibles de monosaccharides et une proportion élevée d'oligosaccharides, ne fait courir aucun risque de transglycosylation, ne provoque pas de *N*-désacétylation des *N*-acétylhexosamines, ne rompt qu'une partie des liaisons sialosyl comme l'avaient démontré antérieurement Kuhn et Ekong¹¹ et Kuhn et Wiegandt³⁸, ne réalise pas la *N*-acétylation de la fraction peptidique et respecte en partie ou en totalité les liaisons asparagine-2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Par contre, nous ignorons pour l'instant son action sur les liaisons glycosidiques.

Nous avons tiré parti de ces propriétés pour mettre au point, avec des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde, un procédé de fractionnement de l'extrait chloroformique des acétoxyats par chromatographie sur des résines échangeuses de cations et d'anions. Nous obtenons de cette manière, dans le cas particulier d'un sialoglycoprotide, trois fractions. La première, non retenue par les résines, contient des oligosaccharides neutres qui proviennent de la partie « centrale » des groupements glycanniques. La seconde, acide, déplacée de l'échangeur d'anions est constituée par des sialo-oligosaccharides qui appartiennent à la fraction la plus « externe » des groupements glycanniques (cette fraction n'existe évidemment pas dans les acétoxyats d'asialoglycoprotides). La troisième, éluee de l'échangeur de cations, renferme des glycoprotides dont la copule glucidique est de nature oligosaccharidique et correspond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache de la chaîne peptidique. A ce dernier groupe de composés s'ajoute une deuxième fraction basique. Elle provient de la chromatographie sur échangeurs de cations des peracétylglycoprotides hydrosolubles qui sont retenus par la résine et dont on réalise à la fois l'élution et la saponification par le passage d'une solution d'ammoniaque diluée. Ces glycoprotides sont constituées de très courts chaînons glucidiques, mono-ou disaccharidiques, conjugués à la chaîne peptidique. Ils représentent donc la partie la plus « interne » de la fraction glycannique du glycoprotide natif.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Madame Danielle Roux, de Mademoiselle Annick Poitau et de Monsieur Lucien Berthiaux que nous remercions vivement. 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 la Cancer (Opération « Espoir »), du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche Associée n° 320 Structure et Métabolisme des Glycoprotéines) et du Commissariat à l'Energie Atomique.

RÉFÉRENCES

- 1 B BAYARD ET J MONTREUIL, *Z Physiol Chem*, 350 (1969) 3
- 2 J MONTREUIL, A. ADAM-CHOSSON ET G. SPIK, *Bull Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1867.
- 3 A NEUBERGER ET R D MARSHALL, dans A GOTTSCHALK (Ed.), *Glycoproteins, Their Composition Structure and Function*, Elsevier, Amsterdam, 1966, p 257
- 4 A FRANCHIMONT, *Ber*, 12 (1879) 1938
- 5 R D GUTHRIE ET J F MCCARTHY, *Advan Carbohyd Chem*, 22 (1967) 11
- 6 B BAYARD, These de 3^{eme} cycle, Fac Sci, Lille, 1970
- 7 Z YOSIZAMA, *Tohoku J Exptl Med*, 51 (1949) 51, 52 (1950) 111
- 8 H MASAMUNE, H SINOMARA ET T OKUYAMA, *Tohoku J Exptl Med*, 68 (1958) 165
- 9 H MASAMUNE ET H SINOMARA, *Tohoku J Exptl Med*, 69 (1958) 59
- 10 S A BARKER, A B FOSTER, H STACEY ET J M WEBBER, *J Chem Soc*, (1958) 2218
- 11 R KUHN ET D E KONG, *Chem Ber*, 96 (1963) 683
- 12 B BAYARD, F FOURNET, S BOUQUELET, G STRECKER, G SPIK ET J MONTREUIL, *Carbohydr Res*, 24 (1972) 445
- 13 E FREDERICQ ET H F DEUTSCH, *J Biol Chem*, 181 (1949) 499
- 14 J MONTREUIL, G BISERTE ET A CHOSSON, *C R Acad Sci, Paris*, 256 (1963) 3372
- 15 M MONSIGNY, A ADAM-CHOSSON ET J MONTREUIL, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 857
- 16 M BERGMANN, L ZERVAS ET S SILBERKWEIT, *Ber*, 64 (1931) 2436
- 17 R W JEANLOZ ET P J STOFFYN, *Methods Carbohydr Chem*, 1 (1962) 221
- 18 J MONTREUIL ET G SPIK, *Microdosage des Glucides*, Monog Lab Chim Biol Fac Sci, Lille, 1 (1963)
- 19 J TILLMANS ET K PHILIPPI, *Biochem Z*, 215 (1929) 36
- 20 C RIMINGTON, *Biochem J*, 25 (1931) 1062, 34 (1940) 931
- 21 R BELCHER A J NUTTEN ET C M SAMBROOK, *Analyst*, 79 (1954) 201
- 22 J L REISSIG J L STROMINGER ET L F LELOIR, *J Biol Chem*, 217 (1955) 127
- 23 G A LEVY ET A McALLAN, *Biochem J*, 73 (1959) 127
- 24 I WERNER ET L ODIN, *Acta Soc Med Upsal*, 57 (1952) 230
- 25 L WARREN, *J Biol Chem*, 234 (1959) 1971
- 26 S M PARTRIDGE *Biochem J*, 48 (1942) 238
- 27 M E TATE ET C T BISHOP, *Can J Chem*, 40 (1962) 1043
- 28 A GOTTSCHALK, *The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*, Cambridge University Press, London, 1960, p 45
- 29 R C HUGHES ET R W JEANLOZ, *Biochemistry*, 3 (1964) 1555
- 30 A B FOSTER ET M STACEY, *J Appl Chem (London)*, 3 (1953) 19
- 31 M R J SALTO, *Biochim Biophys Acta*, 34 (1959) 308
- 32 H MICHL, *Monasth Chem*, 82 (1951) 489
- 33 R L WHISTLER ET D F DURSO, *J Amer Chem Soc*, 44 (1950) 166
- 34 A KUNZ ET C S HUDSON, *J Amer Chem Soc*, 48 (1926) 1978
- 35 R KUHN ET S KIRSCHENLOHR, *Chem Ber*, 87 (1954) 384
- 36 P JERKEMAN, *Acta Chem Scand*, 17 (1963) 2769
- 37 G ZEMPLÉN ET A KUNZ, *Ber*, 56 (1923) 1705
- 38 R KUHN ET WIEGANDT, *Chem Ber*, 96 (1963) 866
- 39 A S CEREZO ET V DEULOFEU, *Carbohydr Res*, 2 (1966) 35