

## MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON ASPARTAMIDO-GLYCOSAMINIDIQUE DANS LES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE DE L'AORTE \*

Madeleine MOCZAR

*Laboratoire de Biochimie du Tissu Conjonctif, Equipe de Recherche CNRS No. 53,  
5ter, rue d'Alésia, Paris 14e, France*

Reçu le 27 Juillet 1968

The nature of the carbohydrate-peptide linkage in the glycopeptides isolated after proteolytic digestion of the structural glycoproteins of the insoluble stroma of porcine and horse aorta was studied. The isolation and identification of 2-acetamido-1-(L- $\beta$ -aspartamido)-1,2-dideoxy- $\beta$ -D-glucose from an electrophoretically purified glycopeptide proves the presence of aspartamido-glucosaminidic linkage in these glycoproteins.

### 1. Introduction

Les glycoprotéines de structure (GPS) ont été extraites et purifiées à partir de nombreux types de tissu conjonctif, comme la cornée, la sclérotique, l'aorte, la peau et le cartilage [1]. Nous nous sommes attachés à l'étude des GPS de l'aorte qui semblent jouer un rôle dans le déclenchement d'un processus athéromateux chez le lapin [2]. La méthode que nous avons proposé récemment [3,4] permet de fractionner l'extrait urée brut de l'aorte et de séparer les GPS des substances lipidiques et des peptides 'liposolubles'. Le résidu délipidé contient les glycoprotéines de structure de l'aorte.

Dans la présente note nous rapportons les résultats concernant la nature de la liaison glycanne-protide dans les glycopeptides isolés des hydrolysats pronasiques des glycoprotéines de structure de l'aorte de porc et de cheval. Nous avons mis en évidence une liaison du type 'N- $\beta$ -aspartyl-N-acétylglucosaminylamine'.

\* Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention 66 00 441).

### 2. Préparation et propriétés des glycopeptides

Les glycoprotéines de structure délipidées sont soumises à une hydrolyse pronasique et au fractionnement sur colonne de Sephadex G-25 comme décrit [3]. L'électrophorèse sur papier à 5000 V dans un système de solvant pyridine-eau-acide acétique (25 : 1 : 225) tamponné à pH 6,3 nous permet de séparer quatre à sept constituants réagissant avec la ninhydrine et parmi lesquels les deux plus importants ont un caractère 'neutre' (léger déplacement vers l'anode). Ces deux fractions majeures ont été isolées par électrophorèse préparative et désignées comme glycopeptides A et B. Leur rendement est de 7,9 et 6,4 mg pour 10 g de glycoprotéine de structure délipidé (aorte de porc).

Le tableau 1 donne la composition glucidique de ces deux glycopeptides. Le dosage colorimétrique des hexoses est effectué par la méthode à l'orcinol [5] et celui des hexosamines par la réaction d'Elson-Morgan modifiée par Palmer, Smyth et Meyer [6]. La détermination des rapports molaires des oses est réalisée par chromatographie sur couche mince en polycarbonate (feuilles chromatographiques de Kodak 511 V) suivie d'une évaluation quantitative par photodensitométrie [7].

Tableau 1

Composition en oses et osamines des glycopeptides séparés par électrophorèse à partir des GPS purifiées de l'aorte de porc.

	oses neutres (%)	hexosamines (%)	rapport molaire		
			gal	man	glucose
Glycopeptide A	28	13	1	1	0,9
Glycopeptide B	35	20	1	1,5	1,4

La composition en acides aminés du glycopeptide A et du glycopeptide B déterminée par chromatographie sur couche mince est la suivante: — glycopeptide A: alanine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, sérine et thréonine. — glycopeptide B: alanine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, hydroxylysine, proline, thréonine et cystine.

### 3. Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine

Les glycopeptides A et B résistent à l'action de la soude 0,5 N pendant 48 h à 20°. Ce fait n'exclue pas l'existence de la liaison *O*-séryl ou *O*-thréonyl-glycosidique en position C-terminale [8,9]. Nous avons donc appliqué aux glycopeptides A et B de l'aorte de porc et de cheval le procédé d'hydrolyse partielle (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N à 100° pendant 20 min) décrit par Bogdanov, Kaverzneva et Andrejeva [10] à propos de l'ovalbumine [11]. Dans un essai témoin la 1-*N*-( $\beta$ -aspartyl)-1,2-di-déoxy-2-acétamido-glucosylamine a été isolé à partir de l'hydrolysat sulfurique du glycopeptide de l'ovalbumine.

L'hydrolysat acide obtenu selon Bogdanov et al. [10] a été neutralisé par l'eau de baryte. Après centrifugation, l'hydrolysat est concentré et soumis à l'électrophorèse préparative. A pH 6,3 dans la solution tampon pyridine-eau-acide acétique (25:1:225) les taches ayant une mobilité analogue à celle de l'asparagine sont élues et chromatographiées pendant 36 heures, en présence de 1-*N*-( $\beta$ -aspartyl)-1,2-di-déoxy-2-acétamido-glucosylamine comme témoin, en cuve horizontale dans les systèmes de solvants: *n*-butanol-acide acétique-eau, 12:3:5; *n*-butanol-pyridine-eau, 6:4:3 [10]. Les éluats sont hydrolysés et chromatographiés pour l'identification des acides aminés.

Après révélation à la ninhydrine, précédée d'une pulvérisation de diéthylamine-méthyléthylcétone-éthanol

(0,1:1:98,9), la tache donnant une coloration orange-marron [12] et ayant le même *R*<sub>f</sub> que la substance témoin dans le système de solvants *n*-butanol-pyridine-eau (6:4:3) est élue; l'hydrolysat chlorhydrique 6N de l'éluat a fourni comme unique constituant l'acide aspartique et la glucosamine.

La vitesse de migration de la *N*- $\beta$ -aspartyl-*N*-acétyl glucosaminylamine isolée des GPS par rapport à celle de l'asparagine est de 0,70 dans le *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5) et de 0,91 dans le *n*-butanol-pyridine-eau (6:4:3).

### 4. Conclusions

Nous avons isolé les deux glycopeptides majeurs de l'hydrolysat pronasique des glycoprotéines de structure de l'aorte. Après hydrolyse sulfurique de ces glycopeptides nous avons isolé et caractérisé la *N*- $\beta$ -aspartyl-*N*-acétylglucosaminylamine. Ces résultats prouvent qu'une partie au moins de la couple glucidique des glycoprotéines de structure de l'aorte est liée par des liaisons *N*-glycosidiques à la chaîne peptidique.

### Bibliographie

- [1] L.Robert, P.Oudea, A.Zweibaum, J.Parlebas et B.Robert, in: *Biochemistry and Physiology of Connective and Skeletal Tissue* (Butterworth, London, 1965) p. 406.
- [2] L.Robert, M.Robert, M.Moczar et E.Moczar, in: *Le rôle de la paroi artérielle dans l'athérogénèse*. Colloques Internationaux du CNRS No. 169, Paris 1967, pp.395-425.
- [3] M.Moczar, E.Moczar et L.Robert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 380.
- [4] M.Moczar, L.Robert et E.Moczar, en préparation.
- [5] J.Tillmans et K.Philippi, *Biochem. Z.* 215 (1929) 36.
- [6] J.W.Palmer, E.M.Smyth et K.Meyer, *J. Biol. Chem.* 119 (1937) 491.
- [7] E.Moczar, M.Moczar, G.Schillinger et L.Robert, *J. Chromatog.* 31 (1967) 561.
- [8] N.Duquesne, M.Monsigny et J.Montreuil, *Comptes Rendus* 262 (1966) 2536.
- [9] J.Montreuil, M.Monsigny et M.T.Buchet, *Comptes Rendus* 264 (1967) 2068.
- [10] V.Bogdanov, E.Kaverzneva et A.Andrejeva, *Biochem. Biophys. Acta* 65 (1962) 168.
- [11] A.Neuberger, *Biochem. J.* 32 (1938) 1435.
- [12] J.Yamashina et M.Makino, *J. Biochem. (Tokyo)* 51 (1962) 539.