

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Structure primaire des chaînes glycaniques de l'inhibiteur de C1 estérase normale (C1-INH) après l'analyse en RMN à 400 MHz.* Note de Gérard Strecker, Marie-Paule Ollier-Hartmann, Herman van Halbeek, Johannes Friederik Gerardus Vliegthart, Jean Montreuil et Lucien Hartmann, présentée par René Wurmser.

La structure des chaînes O- et N-glycaniques de l'inhibiteur de la C1 estérase isolée de sérum de sujets normaux a été établie par résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz. Chaque molécule de C1-INH de masse moléculaire 116 000 daltons possède 24 chaînes O-glycaniques : NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-3) GalNAc, 4 chaînes N-glycaniques : NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) [NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)] Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc et 2 chaînes N-glycaniques : NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) [NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)] Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc. 30% des chaînes N-glycaniques sont fucosylées.

MOLECULAR BIOLOGY. — Primary structure elucidation of carbohydrate chains of normal C1-esterase inhibitor (C1-INH) by 400-MHz $^1\text{H-NMR}$ study.

The primary structural analysis of O- and N-linked carbohydrate chains of the C1-esterase inhibitor purified from normal serum was carried out by 400-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. C1-esterase inhibitor protein of a molecular weight of 116,000 daltons contains 24 O-glycans: NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-3) GalNAc, 4 N-glycans: NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4) (GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) [NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)] Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc and 2 N-glycans: NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) [NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)] Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc. 30% of the N-glycans are fucosylated.

INTRODUCTION. — L'inhibiteur de la C1 estérase présent dans les sérums de sujets normaux à raison de $33,4 \pm 8,6$ mg pour 100 ml, est une glycoprotéine dont la composition centésimale en glucides varie de 28 à 33 p. cent. Sa masse moléculaire est estimée à 116 000 daltons [1]. Une étude préliminaire a mis en évidence une glycosylation mixte de la molécule dans un rapport d'une chaîne N-glycosylée pour quatre chaînes O-glycosylées [2]. L'objet du présent travail consiste à proposer la structure des chaînes glycaniques de C1-INH normal. Cette connaissance prend toute son importance au cours de l'œdème angioneurotique héréditaire (OANH), affection pendant laquelle la perte d'activité inhibitrice de la molécule s'accompagne d'une diminution de la O-glycosylation ([3], [4]).

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES. — *Isolement et purification de C1-INH normale.* — Le C1-INH est isolé et purifié à partir de sérums de sujets sains par trois étapes chromatographiques successives conduites à $+4^\circ\text{C}$:

- chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephacel, en utilisant un gradient de chlorure de sodium de 0 à 0,3 M dans un tampon phosphates de sodium 40 mM, pH 7,00;
- chromatographie d'interaction hydrophobe sur CNBr-Sephrose 4 B couplé à une solution d'hexylamine 1 M. L'élué est faite par un tampon phosphate de sodium 40 mM, pH 7,00 en présence de sulfate d'ammonium 0,4 M;
- chromatographie d'affinité sur CNBr-Sephrose 4 B couplé avec un immunoadsorbant. L'élué est faite par un tampon phosphate de sodium 40 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,40;
- le degré de purification est contrôlé par des méthodes immunochimiques ([5], [6]) et la concentration protéique évaluée par colorimétrie [7] et immunochimie [8];
- la solution protéique de C1-INH est lyophilisée après dessalage sur colonne de gel de polyacrylamide (Biogel P 6) en milieu aqueux à pH 7,40.

Isolement et analyse des oligosaccharides. — Le C1-INH est soumis à une β -élimination en milieu réducteur (NaOH 0,05 N; KBH_4 1 M; 37°C ; 48 h) et en présence de $^3\text{H-NaBH}_4$. Les N-glycopeptides et les oligosaccharides-alditols obtenus sont ensuite fractionnés sur « Biogel P 6 » et la fraction N-glycopeptidique isolée par ce procédé est soumise à l'action de l'hydrazine anhydre à 100°C pendant 16 h. Après évaporation de l'hydrazine, les oligosaccharides libérés sont N-réacétylés dans une solution saturée de bicarbonate de sodium (1 ml) par cinq additions successives de 20 μl d'anhydride acétique, puis réduits par KBH_4 . Les oligosaccharides-alditols ainsi détachés de leur liaison N-glycosidique sont alors soumis à une chromatographie d'affinité sur une colonne de Concanavalline A-Sephrose (I.B.F., France) et le matériel retenu par la lectine est élué par une solution d' α -méthylglucoside 20 mM.

L'analyse chromatographique des oligosaccharides-alditols a été réalisée sur couche mince de silice (Si 60, Merck) dans les systèmes-solvants suivants : n° 1 : n-butanol-acide acétique-eau (20 : 10 : 15); n° 2 : éthanol-n-butanol-acide acétique-pyridine-eau (100 : 10 : 3 : 10 : 30). Les sucres ont été détectés à l'aide d'une solution d'orcinol à 0,2 % dans l'acide sulfurique 6 N.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz du proton a été réalisée sur un spectromètre « Bruker AM-400 ». Les oligosaccharides étaient dissous dans D_2O à pD 7, après avoir subi plusieurs échanges successifs par dissolution dans D_2O (pureté 99,96 %), puis lyophilisation.

Les glissements chimiques sont exprimés en parties par million par rapport au 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium, à l'aide d'acétone comme référence interne ($\delta = 2,225 \cdot 10^{-6}$), ou encore de l'ion acétate ($\delta = 1,908 \cdot 10^{-6}$). Les mesures étaient effectuées à 300 K.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — *Fractionnement des chaînes O- et N-glycanniques.* — Le traitement de C \bar{I} -INH par le mélange NaOH 0,05 N-KBH $_4$ 1 M à 37°C pendant 48 h permet de libérer les chaînes O-glycanniques, tandis que les chaînes N-glycanniques demeurent liées à des fragments peptidiques de faible masse moléculaire. Les oligosaccharides-alditols sont isolés par chromatographie de tamisage moléculaire. Les N-glycopeptides, après traitement par l'hydrazine, réacétylation, réduction, puis fractionnement sur « Con A-Sepharose », ne fournissent qu'une seule fraction, entièrement fixée sur la colonne de lectine immobilisée.

L'analyse en chromatographie sur couche mince montre l'homogénéité du matériel de faible masse moléculaire, qui possède la vitesse de migration d'un trisaccharide dans le système-solvant n° 1. Les glycannes détachés par hydrazine présentent, dans le système-solvant n° 2, une certaine hétérogénéité qui peut être due à la présence de différents types de liaison de l'acide N-acétylneuraminique.

Structure primaire de la chaîne O-glycannique. — L'analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de l'oligosaccharide-alditol libéré par β -élimination (tableau I et fig. 1) permet d'établir qu'il s'agit d'un trisaccharide dont la structure est la suivante : NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-3) GalNAc-ol. En effet, les paramètres du spectre RMN sont en tous points identiques à ceux décrits pour des glycannes qui possèdent cette même structure et ont été isolés à partir de κ -caséine du lait de Vache [9] ou de la glycophorine humaine [10]. Les glissements chimiques des protons H-3 ax ($\delta = 1,799 \cdot 10^{-6}$) et H-3 éq ($\delta = 2,772 \cdot 10^{-6}$) sont significatifs de la liaison NeuAc (α 2-3) Gal (β 1) et les valeurs observées pour H-1 et H-3 du galactose confirment que celui-ci est un β -glycoside ($J \simeq 8$ Hz) et qu'il est substitué sur son carbone n° 3. Le glissement chimique de H-2 du résidu N-acétylgalactosaminitol est caractéristique d'une substitution portant sur le carbone n° 3, tandis que le signal correspondant au carbone H-6 se confond avec le massif non analysable du spectre ($\delta = 3,5-3,9 \cdot 10^{-6}$), montrant ainsi l'absence d'une substitution sur ce carbone par une seconde molécule d'acide sialique [9].

Structure primaire des chaînes N-glycanniques. — L'analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire des oligosaccharides-alditols obtenus par hydrazinolyse de C \bar{I} -INH montre qu'il s'agit d'un mélange de sialyl-oligo-saccharides bi-antennés. Leurs structures primaires ont été établies sur la base des observations suivantes (tableau II, et fig. 2).

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1. — Spectre de RMN à 400 MHz de l'oligosaccharide-alditol libéré par β -élimination réductrice.

Fig. 1. — 400 MHz 1H -NMR spectrum of oligosaccharide-alditol released from C \bar{I} -INH by reductive β -elimination.

Fig. 2. — Spectre de RMN à 400 MHz des oligosaccharides-alditols obtenus par hydrazinolyse des N-glycopeptides de C \bar{I} -INH.

Fig. 2. — 400 MHz 1H -NMR spectrum of oligosaccharide-alditols obtained by hydrazinolysis of C \bar{I} -INH glycopeptides.

O-GLYCANNE

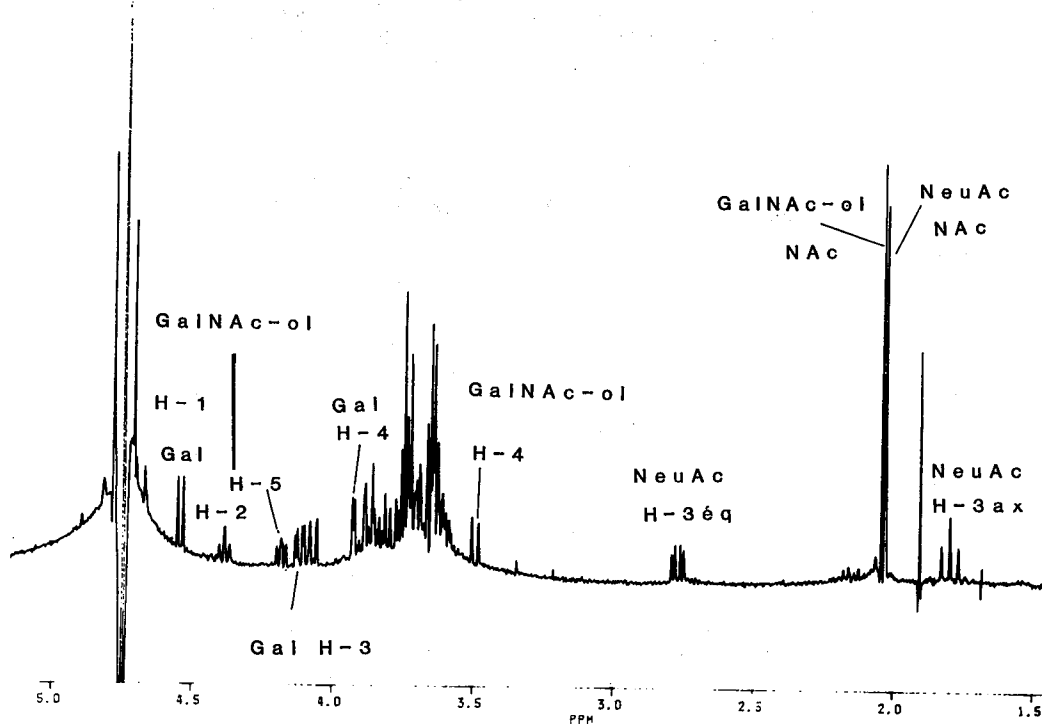


Fig. 1

N-GLYCANNE

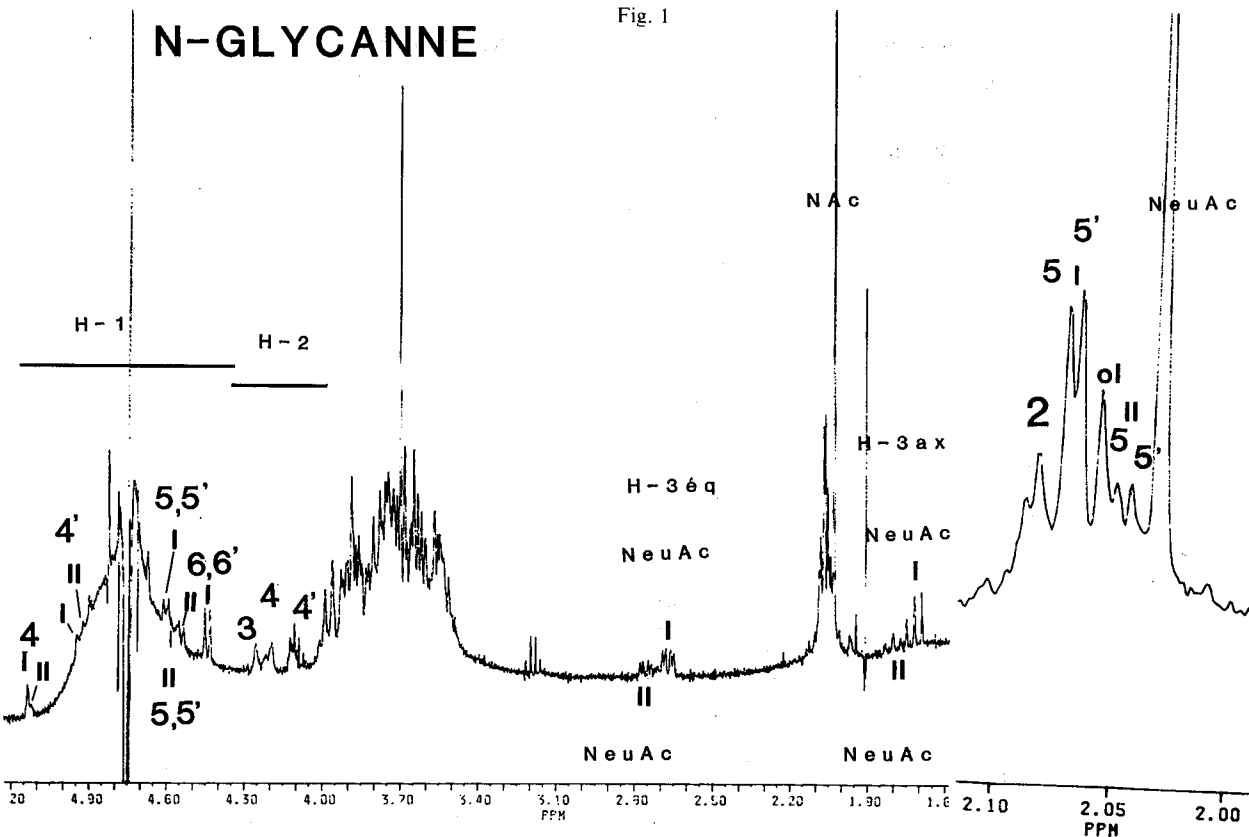


Fig. 2

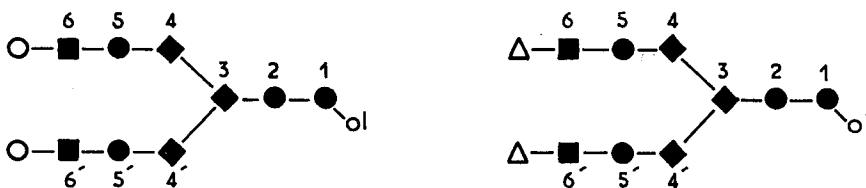
TABLEAU I

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire de l'oligosaccharide-alditol détaché de C I-INH par β -élimination.
¹H chemical shifts of structural-reporter groups of constituent monosaccharides for oligosaccharide-alditol released from C I-INH by β -elimination.

Monosaccharide		Glissement chimique (δ)	
		Référence ([9], [10])	C I-INH
GalNAc-ol.....	H-2	4,389	4,387
	H-3	4,070	4,072
	H-4	3,501	3,496
	H-5	4,193	4,186
	H-6	3,5-3,9	n. d.
	NAc	2,045	2,045
Gal.	H-1	4,548	4,544
	H-2	3,5-3,9	n. d.
	H-3	4,120	4,117
	H-4	3,927	3,924
NeuAc.	H-3 ax	1,802	1,799
	H-3 éq	2,774	2,772
	NAc	2,032	2,032

TABLEAU II

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des oligosaccharides-alditols détachés de C I-INH par hydrazinolyse.
¹H chemical shifts of structural groups of constituent monosaccharides for oligosaccharide-alditols released from C I-INH by hydrazinolysis.



		I	II	
H-1.....	GlcNAc 2	4,68	(^a) n. d.	
	Man 3	(^a) n. d.	(^a) n. d.	
	Man 4	5,132	5,115	
	Man 4'	4,946	4,921	
	GlcNAc 5	4,603	4,573	
	GlcNAc 5'	4,603	4,573	
	Gal 6	4,443	4,544	
	Gal 6'	4,443	4,544	
	H-2.....	Man 3	4,256	n. d.
		Man 4	4,198	n. d.
Man 4'		4,116	n. d.	
H-3 ax.....	NeuAc (α 2-6)	1,718	-	
	NeuAc' (α 2-6)	1,718	-	
	NeuAc (α 2-3)	-	1,798	
	NeuAc' (α 2-3)	-	1,798	
	H-3 éq.....	NeuAc (α 2-6)	2,672	-
NeuAc' (α 2-6)		2,672	-	
NeuAc (α 2-3)		-	2,747	
NeuAc' (α 2-3)		-	2,747	
NAc.....		GlcNAc-ol	2,056	2,056
	GlcNAc 2	2,082	2,082	
	GlcNAc 5	2,071	2,049	
	GlcNAc 5'	2,065	2,042	
	NeuAc	2,030	2,030	

(^a) n. d., non déterminé; O, acide N-acétylneuraminique (α 2-6); Δ , acide N-acétylneuraminique (α 2-3); ■, galactose; ●, N-acétylglucosamine; ◆, mannose; ●-ol, N-acétylglucosaminitol.

1. L'analyse des signaux relatifs aux protons H-3ax et H-3eq de l'acide N-acétylneuraminique montre l'existence de liaisons α 2-6 et α 2-3, dans le rapport de 2 pour 1 ([11], [12]).

2. La structure bi-antennée des chaînes glycaniques est déduite des glissements chimiques du proton H-2 des résidus de mannose ($\delta = 4,25, 4,19$ et $4,11 \cdot 10^{-6}$). Seuls les signaux relatifs à GlcNAc 5 ($\delta = 2,071$ et $2,049 \cdot 10^{-6}$) et GlcNAc 5' ($\delta = 2,065$ et $2,042 \cdot 10^{-6}$) sont présents. Le dédoublement observé pour chacun de ces signaux est provoqué par la présence d'acide sialique lié à l'extrémité de la chaîne oligosaccharidique, soit en α 2-6 (signaux d'intensité élevée à $\delta = 2,071$ et $2,065 \cdot 10^{-6}$), soit en α 2-3 (signaux de plus faible intensité à $\delta = 2,049$ et $2,042 \cdot 10^{-6}$). Le signal à $\delta = 2,056 \cdot 10^{-6}$ est attribuable au groupement acétamido du N-acétylglucosaminitol [13], tandis que la valeur $\delta = 2,082 \cdot 10^{-6}$ est caractéristique de GlcNAc 2 [13]. Quelques signaux de faible intensité (ex : $\delta = 2,086 \cdot 10^{-6}$) sont probablement dus au fait que l'hydrazinolyse des N-glycoprotéines fournit, après les étapes de N-réacétylation et de réduction, un certain nombre de sucres modifiés comme la di-N-acétylhydrazinoglucosamine, la 1-désoxy-N-acétylglucosamine et un mélange de 1-désoxy-hexitols épimères [14]. Ces constituants, dont le taux peut atteindre 35 %, fournissent des signaux supplémentaires et sont responsables de l'hétérogénéité des signaux du groupement NAc de GlcNAc-ol 1 et GlcNAc 2. L'analyse de cette région du spectre ne permet pas d'identifier de signal correspondant à une N-acétylglucosamine supplémentaire liée aux mannoses 4 ou 4'.

3. Les résidus de galactose 6 et 6' sont totalement substitués par de l'acide N-acétylneuraminique, puisque le signal caractéristique d'un galactose terminal (δ H-1 = $4,468-4,472 \cdot 10^{-6}$) est absent du spectre. Les signaux relatifs au proton H-1 du galactose 6 ou 6' sont ici observés à $\delta = 4,443 \cdot 10^{-6}$, dans le cas d'une substitution sur le carbone n° 6, et à $\delta = 4,544 \cdot 10^{-6}$, dans le cas d'une substitution sur le carbone n° 3.

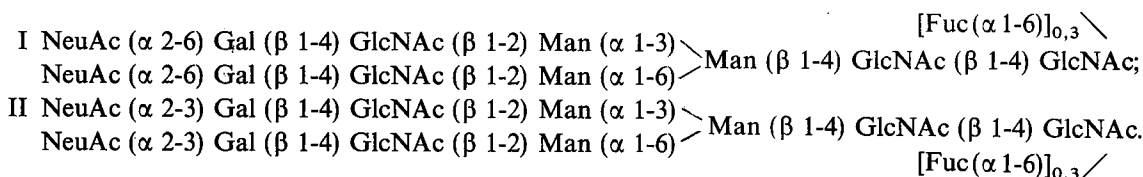
4. L'influence de la liaison de l'acide N-acétylneuraminique sur les valeurs des glissements chimiques du proton H-1 de Man 4 et 4' est également observable. La présence de liaisons NeuAc (α 2-6) sur chacun des résidus de galactose conduit aux valeurs $\delta = 5,132$ et $4,946 \cdot 10^{-6}$ pour H-1 de Man 4 et 4', et $\delta = 5,115$ et $4,911 \cdot 10^{-6}$ dans le cas de liaisons NeuAc (α 2-3).

5. Des signaux de faible intensité à $\delta = 4,898$ et $4,225 \cdot 10^{-6}$ montrent la présence de Fuc lié en α 1-6 sur le résidu de GlcNAc-ol.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons donc proposer la structure primaire des O- et N-glycannes de C I-INH :

Structure O-glycanique : NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-3) GalNAc-ol.

Structures N-glycaniques :



Des résultats antérieurs ([1], [2]) ont montré que le C I-INH possédait 6 ou 7 chaînes glycaniques et 24 ou 29 chaînes O-glycaniques par molécule dont la masse moléculaire est estimée à 116 000 daltons [1].

Les résultats exposés ci-dessus, qui montrent que les structures I et II existent dans un rapport de 2 : 1, sont en faveur de la seconde estimation [2] et le nombre respectif de

chaînes glycaniques est donc de 4 N-glycannes de type I, de 2 N-glycannes de type II et de 24 O-glycannes. La composition molaire en monosaccharides de C \bar{I} -INH avait été établie comme suit : Fuc : 0,33; Gal : 5,92; Man : 3; GlcNAc : 4,63; GalNAc : 3,98; NeuAc : 8,82 (2), ou encore : Fuc : 0,20; Gal : 5,70; Man : 3; GlcNAc : 4,60; GalNAc : 4,10; NeuAc : 10,20 [1]. La présence de quatre résidus de N-acétylgalactosamine pour trois résidus de mannose et le fait qu'un galactose est lié sur chaque N-acétylgalactosamine n'autorise qu'une valeur possible du rapport Gal/Man au sein des N-glycannes, soit 2 Gal pour 3 Man. Le nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique ne devrait pas être supérieur à six, toujours par rapport à trois mannoses, alors que 8,82 [2] ou 10,20 [1] résidus ont été dosés. Une étude critique des méthodes de dosage des sucres, appliquée au C \bar{I} -INH devra donc être envisagée. Ces éléments de discussion ne devraient pas avoir de conséquence importante sur le déroulement de l'étude structurale que nous effectuons sur les C \bar{I} -INH IA et II, isolés de sérums de patients atteints d'œdème angioneurotique héréditaire [2]. En effet, dans ces cas pathologiques, le défaut de glycosylation est tel qu'il sera aisé de vérifier s'il s'agit de modifications purement quantitatives ou également qualitatives.

Nous remercions vivement M. Jean-Michel Wieruszkeski qui a enregistré les spectres de résonance magnétique nucléaire ainsi que M^{me} Pierrette Aschenbrenner pour la dactylographie du manuscrit. Notre reconnaissance va à la Région Nord/Pas-de-Calais, au C.N.R.S. et au Ministère de la Recherche et de la Technologie, qui ont contribué à l'acquisition du spectromètre de RMN à 400 MHz.

Remise le 1^{er} juillet 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. A. HARRISON, *Biochem.*, 22, 1983, p. 5001-5007.
- [2] M. P. OLLIER-HARTMANN, G. STRECKER, J. MONTREUIL et L. HARTMANN, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 667-669.
- [3] M. P. OLLIER, L. HARTMANN et H. BRECY, *Nouv. Pres. Méd.*, 7, 1978, p. 2933-2938.
- [4] L. HARTMANN, *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 167, 1983, p. 343-351.
- [5] L. HARTMANN et M. TOILLIEZ, *Rev. Fr. Étud. Clin. et Biol.*, 2, 1957, p. 197-199.
- [6] M. P. OLLIER et L. HARTMANN, *Biomed.*, 21, 1974, p. 444-447.
- [7] M. BRADFORD, *Anal. Biochem.*, 72, 1976, p. 248-254.
- [8] C. B. LAURELL, *Anal. Biochem.*, 15, 1966, p. 45-52.
- [9] H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. Vliegenthart, A. FIAT et P. JOLLES, *Biochim. Biophys. Acta*, 628, 1980, p. 295-300.
- [10] F. HERKT, J. PAZ PARENTE, Y. LEROY, B. FOURNET, D. BLANCHARD, J. P. CARTRON, H. VAN HALBEEK et J. F. G. Vliegenthart, *Eur. J. Biochem.*, 146, 1985, p. 125-129.
- [11] L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J. F. G. Vliegenthart, G. STRECKER, J. C. MICHALSKI, B. FOURNET, G. SPIK et J. MONTREUIL, *Eur. J. Biochem.*, 87, 1978, p. 323-329.
- [12] J. F. G. Vliegenthart, L. DORLAND et H. VAN HALBEEK, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41, 1983, p. 209-374.
- [13] J. PAZ PARENTE, G. STRECKER, Y. LEROY, J. MONTREUIL, B. FOURNET, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND et J. F. G. Vliegenthart, *F.E.B.S. Letters*, 152, 1983, p. 145-152.
- [14] J. C. MICHALSKI, J. PETER-KATALINIC, H. EGGE, J. PAZ PARENTE, J. MONTREUIL et G. STRECKER, *Carbohydr. Res.*, 134, 1984, p. 177-189.

G. S. et J. M. : *Laboratoire de Chimie biologique, L.A.-C.N.R.S., n° 217, Université des Sciences et Techniques de Lille-I, 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex;*

M.-P. O.-H. et L. H. : *Laboratoire de Chimie Clinique et Biologie moléculaire, Institut Biomédical des Cordeliers, Association Claude-Bernard, C. 20, U. 202 I.N.S.E.R.M. et U.A.-C.N.R.S. n° 627, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75270 Paris Cedex 06.*

H. v. H. et J. F. G. V. : *Department of Bio-Organic Chemistry, State University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht, The Netherlands.*