

N° d'ordre : 638

50376
1984
241

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Jean-Claude MICHALSKI

Chargé de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.



RECHERCHES SUR LES GLYCOPROTEINOSES
- ETUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT DIFFERENTS
TYPES DE GLYCOPROTEINOSES
- MISE EN EVIDENCE D'UN NOUVEAU GROUPE DE MALADIES :
LES SIALIDOSES

Présentée le 3 décembre 1984 devant la Commission d'Examen

| | |
|---------------|--|
| Président : | J. MONTREUIL |
| Rapporteurs : | P. MAROTEAUX R. SCHAUER G. STRECKER |
| Examineurs : | G. BISERTE J.P. FARRIAUX J.F.G. VLIEGENTHART |

A mes parents

A Catherine, Anne-Sophie et Nicolas

A Gérard,

Tu as guidé mes premiers pas dans la recherche, puis tu m'as accompagné durant ces neuf années par tes encouragements et tes conseils. Tu as su me faire partager ton goût pour la recherche, ton enthousiasme et ta constante bonne humeur.

Sois assuré de ma profonde gratitude et de ma sincère amitié.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueilli dans votre Laboratoire, pour l'aide et la confiance que vous m'avez accordées, notamment en favorisant mon intégration dans un organisme de recherche. Conscient de l'énorme tâche qui fut et qui est la vôtre pour la création et le développement de votre école, permettez-moi de vous dire à quel point je suis fier aujourd'hui d'en faire partie.

Soyez assuré de mon profond et respectueux attachement.

To Professeur Roland SCHAUER,

You were extremely kind to wellcome me at your Laboratory for one year. During that time, thanks to you, I had all the facilities to carry out my work in the best conditions. I took great advantages of the knowledge you have on sialic acid metabolism. Since then, I am honored to have your friendship. On this occasion, I want to express my gratitude for your advices and the kindness you always showed me.

A Monsieur le Professeur Pierre MAROTEAUX,

Je vous remercie pour le grand honneur que vous m'avez fait en acceptant de parrainer mon travail de recherche, ainsi que pour l'aide et l'intérêt que vous avez toujours manifesté en nous fournissant les échantillons biologiques nécessaires à nos études.

Votre grande compétence dans le domaine des maladies de surcharge me font solliciter votre indulgence pour juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Gérard BISERTE,

Vous avez bien voulu m'accueillir pendant près de trois ans dans votre établissement. J'ai pu durant ces années apprécier les qualités scientifiques et humaines qui sont les vôtres.

Je vous remercie du grand honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre FARRIAUX,

Ce travail n'a pu être effectué que par une collaboration suivie entre cliniciens et biochimistes. Les contacts que nous avons eu ont toujours été empreints d'une grande cordialité.

Je tiens à vous exprimer toute ma sympathie et vous remercie pour avoir bien voulu accepter de juger cette thèse.

To Professor Johannes Vliegenthart,

This work is the result of a close collaboration with your group. I take this opportunity to give you proof of my gratitude for the constant interest and the efficacy you have always brought in the RMN analysis of the "urinary oligosaccharides". I want to associate to my acknowledgements your coworkers Bert DORLAND and Hermann Van HALBEEK

Mes remerciements s'adressent aussi à

Mon Ami Anthony CORFIELD avec qui le travail sur les neuraminidases hépatiques humaines a été réalisé ;

Aux Professeurs Heinz EGGE, Bernard FOURNET, Stéphane BOUQUELET, A Monsieur Bernard CARTIGNY pour leur amicale collaboration ;

A tous les Cliniciens qui ont bien voulu nous fournir les échantillons biologiques notamment aux Professeurs DURAND et SPRANGER, aux Docteurs Olivier DULAC et Edouard PASCHKE ;

A Messieurs Yves LEROY, Guy RICART, Jean-Michel WIERUSZESKI pour leur aide et leurs conseils dans les analyses de g.l.c./m.s. ;

A Madame Catherine ALONSO pour sa précieuse collaboration technique ainsi que son aide dans la présentation de ce travail ;

A Mademoiselle Brigitte MAHIEU qui avec expertise, bonne humeur et beaucoup de patience a réalisé la frappe et la mise en page de ce mémoire ;

A Madame Jocelyne CELEN qui avec gentillesse et beaucoup d'habilité s'est occupée du montage photographique et de la réalisation matérielle de ce manuscrit ;

A tous mes camarades de l'Institut de Recherches sur le Cancer, du Biochemisches Institut de Kiel, du Laboratoire de Chimie Biologique et notamment du "Labo 110" ;

Que tous ceux qui à des titres divers m'ont accordé leur aide et leur amitié soient ici remerciés.

A Monsieur le Professeur Gérard BISERTE,

Vous avez bien voulu m'accueillir pendant près de trois ans dans votre établissement. J'ai pu durant ces années apprécier les qualités scientifiques et humaines qui sont les vôtres.

Je vous remercie du grand honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre FARRIAUX,

Ce travail n'a pu être effectué que par une collaboration suivie entre cliniciens et biochimistes. Les contacts que nous avons eu ont toujours été empreints d'une grande cordialité.

Je tiens à vous exprimer toute ma sympathie et vous remercie pour avoir bien voulu accepter de juger cette thèse.

To Professor Johannes VLIEGENTHART,

This work is the result of a close collaboration with your group. I take this opportunity to give you proof of my gratitude for the constant interest and the efficacy you have always brought in the RMN analysis of the "urinary oligosaccharides". I want to associate to my acknowledgements your coworkers Bert DORLAND and Hermann Van HALBEEK

Mes remerciements s'adressent aussi à

Mon Ami Anthony CORFIELD avec qui le travail sur les neuraminidases hépatiques humaines a été réalisé ;

Aux Professeurs Heinz EGGE, Bernard FOURNET, Stéphane BOUQUELET,
A Monsieur Bernard CARTIGNY pour leur amicale collaboration ;

A tous les Cliniciens qui ont bien voulu nous fournir les échantillons biologiques notamment aux Professeurs DURAND et SPRANGER,
aux Docteurs Olivier DULAC et Edouard PASCHKE ;

A Messieurs Yves LEROY, Guy RICART, Jean-Michel WIERUSZESKI pour leur aide et leurs conseils dans les analyses de g.l.c./m.s. ;

A Madame Catherine ALONSO pour sa précieuse collaboration technique ainsi que son aide dans la présentation de ce travail ;

A Mademoiselle Brigitte MAHIEU qui avec expertise, bonne humeur et beaucoup de patience a réalisé la frappe et la mise en page de ce mémoire ;

A Madame Jocelyne CELEN qui avec gentillesse et beaucoup d'habileté s'est occupée du montage photographique et de la réalisation matérielle de ce manuscrit ;

A tous mes camarades de l'Institut de Recherches sur le Cancer, du Biochemisches Institut de Kiel, du Laboratoire de Chimie Biologique et notamment du "Labo 110" ;

Que tous ceux qui à des titres divers m'ont accordé leur aide et leur amitié soient ici remerciés.

Ces travaux ont été réalisés sous la direction de Monsieur Gérard STRECKER, Maître de Recherches au C.N.R.S., dans les Laboratoires de Chimie Biologique du Professeur Jean MONTREUIL, à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 "Relations Structures-fonctions des constituants membranaires"), à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Gérard BISERTE) ainsi que sous la direction du Professeur Roland SCHAUER (Biochemisches Institut, Universität KIEL, R.F.A) en ce qui concerne l'étude des α -neuraminidases humaines.

Ils ont bénéficié d'une aide de L'I.N.S.E.R.M. (C.R.L. n° 78.1.0523) et du Deutsche Forschungsgemeinschaft (Scha 202/9).

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| M. CONSTANT Eugène | Electronique |
| M. FOURET René | Physique du Solide |
| M. GABILLARD Robert | Electronique |
| M. MONTREUIL Jean | Biochimie |
| M. PARREAU Michel | Analyse |
| M. TRIDOT Gabriel | Chimie appliquée |
| M. VIVIER Emile | Biologie cellulaire |
| M. WERTHEIMER Raymond | Physique atomique et moléculaire |

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

| | |
|-------------------------|--------------------|
| M. BACCHUS Pierre | Astronomie |
| M. BEAUFILS Jean Pierre | Chimie physique |
| M. BIAYS Pierre | Géographie |
| M. BILLARD Jean | Physique du solide |
| M. BOILLY Bénoni | Biologie |

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| M. BOUGHON Pierre | Algèbre |
| M. BOURIQUET Robert | Biologie végétale |
| M. BREZINSKI Claude | Analyse numérique |
| M. CELET Paul | Géologie générale |
| M. CHAMLEY Hervé | Géotechnique |
| M. COEURE Gérard | Analyse |
| M. CORDONNIER Vincent | Informatique |
| M. DEBOURSE Jean-Pierre | Gestion des entreprises |
| M. DYMENT Arthur | Mécanique |
| M. ESCAIG Bertrand | Physique du solide |
| M. FAURE Robert | Mécanique |
| M. FOCT Jacques | Métallurgie |
| M. GRANELLE Jean-Jacques | Sciences économiques |
| M. GRUSON Laurent | Algèbre |
| M. GUILLAUME Jean | Microbiologie |
| M. HECTOR Joseph | Géométrie |
| M. LABLACHE COMBIER Alain | Chimie organique |
| M. LAGOSTE Louis | Biologie végétale |
| M. LAVEINE Jean-Pierre | Paléontologie |
| M. LEHMANN Daniel | Géométrie |
| Mme LENOBLE Jacqueline | Physique atomique et moléculaire |
| M. LHOMME Jean | Chimie organique biologique |
| M. LOMBARD Jacques | Sociologie |
| M. LOUCHEUX Claude | Chimie physique |
| M. LUCQUIN Michel | Chimie physique |
| M. MAILLET Pierre | Sciences économiques |
| M. PAQUET Jacques | Géologie générale |
| M. POUZET Pierre | Analyse numérique |
| M. PROUVOST Jean | Minéralogie |
| M. ROUSSEAU Jean-Paul | Physiologie animale |
| M. SALMER Georges | Electronique |
| M. SEGUIER Guy | Electrotechnique |
| M. STANKIEWICZ François | Sciences économiques |
| M. TILLIEU Jacques | Physique théorique |
| M. VIDAL Pierre | Automatique |
| M. ZEYTOUNIAN Radyadour | Mécanique |

PROFESSEURS - 2ème classe

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| M. AL FAKIR Sabah | Algèbre |
| M. ALLAMANDO Etienne | Electronique et électrotechnique |
| M. ANCIAN Bernard | Spectrochimie |
| M. ANTOINE Philippe | Analyse |
| M. BART André | Biologie animale |
| Mme BATTIAU Yvonne | Géographie |
| M. BEGUIN Paul | Mécanique |
| M. BELLET Jean | Physique atomique et moléculaire |
| M. BERZIN Robert | Analyse |
| M. BKOUCHE Rudolphe | Algèbre |
| M. BODARD Marcel | Biologie végétale |
| M. BOIVIN Jean-Claude | Chimie minérale |
| M. BONNELLE Jean-Pierre | Catalyse |
| M. BOSCOQ Denis | Probabilités |
| M. BOUQUELET Stéphane | Biochimie structurale |
| M. BRASSELET Jean-Paul | Géométrie et topologie |

| | |
|-------------------------------|---|
| M. BRIDOUX Michel | Chimie physique |
| M. BRUYELLE Pierre | Géographie |
| M. CAPURON Alfred | Biologie animale |
| M. CARREZ Christian | Informatique |
| M. CHAPOTON Alain | Electronique |
| M. COQUERY Jean-Marie | Psychophysiologie |
| Mme CORSIN Paule | Paléontologie |
| M. CORTOIS Jean | Physique nucléaire et corpusculaire |
| M. COUTURIER Daniel | Chimie organique |
| M. CRAMPON Norbert | Hydrogéologie et environnement |
| M. CROSNIER Yves | Electronique |
| Mlle DACHARRY Monique | Géographie |
| M. DAUCHET Max | Informatique |
| M. DEBRABANT Pierre | Géologie appliquée |
| M. DEGAUQUE Pierre | Electronique |
| M. DELORME Pierre | Physiologie animale |
| M. DE MASSON D'AUTUME Antoine | Sciences économiques |
| M. DEMUNTER Paul | Sociologie |
| M. DENEL JACQUES | Informatique |
| M. DE PARIS Jean-Claude | Analyse |
| M. DEPREZ Gilbert | Physique du solide et cristallographie |
| M. DERIEUX Jean-Claude | Microbiologie |
| Mlle DESSAUX Odile | Spectroscopie de la réactivité chimique |
| M. DEVRAINNE Pierre | Chimie minérale |
| M. DHAINAUT André | Biologie animale |
| Mme DHAINAUT Nicole | Biologie animale |
| M. DORMARD Serge | Sciences économiques |
| M. DOUKHAN Jean-Claude | Physique du solide |
| M. DUBOIS Henri | Spectroscopie hertzienne |
| M. DUBRULLE Alain | Spectroscopie hertzienne |
| M. DUBUS Jean-Paul | Spectrométrie des solides |
| M. DUPONT Christophe | Vie de la firme (I.P.A.) |
| Mme EVRARD Micheline | Chimie appliquée |
| M. FONTAINE Hubert | Dynamique des cristaux |
| M. FOUQUART Yves | Optique atmosphérique |
| M. FOURNET Bernard | Biochimie structurale |
| M. FRONTIER Serge | Ecologie numérique |
| M. GAMBLIN André | Géographie urbaine, industrielle et démographie |
| M. GLORIEUX Pierre | Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques |
| M. GOBLOT Rémi | Algèbre |
| M. GOSSELIN Gabriel | Sociologie |
| M. GOUDMAND Pierre | Chimie Physique |
| M. GREMY Jean-Paul | Sociologie |
| M. GREVET Patrick | Sciences économiques |
| M. GUILBAULT Pierre | Physiologie animale |
| M. HENRY Jean-Pierre | Génie mécanique |
| M. HERMAN Maurice | Physique spatiale |
| M. HOUDART René | Physique atomique et moléculaire |
| M. JACOB Gérard | Informatique |
| M. JACOB Pierre | Probabilités et statistiques |
| M. JACQUILLAT Bertrand | Gestion |
| M. JEAN Raymond | Biologie des populations végétales |
| M. JOFFRE Patrick | Vie de la firme (I.P.A.) |
| M. JOURNEL Gérard | Spectroscopie hertzienne |
| M. KREMBEL Jean | Biochimie |
| M. LANGRAND Claude | Probabilités et statistiques |

| | |
|----------------------------|---|
| Mme LECLERCQ Ginette | Catalyse |
| M. LEFEVRE Christian | Pétrologie |
| Mlle LEGRAND Denise | Algèbre |
| Mlle LEGRAND Solange | Algèbre |
| Mme LEHMANN Josiane | Analyse |
| M. LEMAIRE Jean | Spectroscopie hertziennne |
| M. LE MAROIS Henri | Vie de la firme (I.P.A.) |
| M. LEROY Jean Marie | Chimie appliquée |
| M. LEROY Yves | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. LESENNE Jacques | Electrotechnique |
| M. LHENAFF René | Géographie |
| M. LOCQUENEUX Robert | Physique théorique |
| M. LOSELD Joseph | Informatique |
| M. LOUAGE Francis | Electronique |
| M. MACKE Bruno | Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques |
| M. MAHIEU Jean-Marie | Physique atomique et moléculaire |
| M. MAIZIERES Christian | Automatique |
| M. MESMACQUE Gérard | Génie mécanique |
| M. MESSELYN Jean | Physique atomique et moléculaire |
| M. MESSERLIN Patrick | Sciences économiques |
| M. MIGNOT Fulbert | Analyse numérique |
| M. MONTEL Marc | Physique du solide |
| M. MONTUELLE Bernard | Biologie et biochimie appliquées |
| Mme MOUNIER Yvonne | Physiologie des structures contractiles |
| Mme N'GUYEN VAN CHI Régine | Géographie |
| M. NICOLE Jacques | Chimie analytique |
| M. NOTELET Francis | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. PARSY Fernand | Mécanique |
| M. PASZKOWSKI Stéphan | Analyse numérique |
| Mlle PAUPARDIN Colette | Biologie physiologie végétales |
| M. PECQUE Marcel | Chimie organique |
| M. PERROT Pierre | Chimie appliquée |
| M. PERTUZON Emile | Physiologie animale |
| M. PETIT Francis | Chimie organique, minérale et analytique |
| M. PONSOLLE Louis | Chimie physique |
| M. PORCHET Maurice | Biologie animale |
| M. POVY Lucien | Automatique |
| M. RACZY Ladislas | Electronique |
| M. RAOULT Jean-François | Géologie structurale |
| M. RICHARD Alain | Biologie animale |
| M. RIETSCH François | Physique des polymères |
| M. ROGALSKI Marc | Analyse |
| M. ROY Jean-Claude | Psychophysiologie |
| M. SCHAMPS Joël | Spectroscopie moléculaire |
| Mme SCHWARZBACH Yvette | Géométrie |
| M. SIMON Michel | Sociologie |
| M. SLIWA Henri | Chimie organique |
| M. SOMME Jean | Géographie |
| Mlle SPIK Geneviève | Biochimie |
| M. STERBOUL François | Informatique |
| M. TAILLIEZ Roger | Génie alimentaire |
| M. THERY Pierre | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. TOULOTTE Jean-Marc | Automatique |
| M. TURREL Georges | Spectrochimie infrarouge et Raman |
| M. VANDORPE Bernard | Chimie minérale |
| M. VAST Pierre | Chimie inorganique |
| M. VERBERT André | Biochimie |
| M. VERNET Philippe | Génétique |
| M. VILETTE Michel | Résistance des matériaux |

| | |
|------------------------|-------------------------------------|
| M. WALLART Francis | Spectrochimie infrarouge et Raman |
| M. WARTEL Michel | Chimie inorganique |
| M. WATERLOT Michel | Géologie générale |
| M. WERNER Georges | Informatique fondamentale appliquée |
| M. WOSNIAK Michel | Hydrométallurgie |
| Mme ZINN Justin Nicole | Algèbre |

ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| Asp | : acide L-aspartique |
| Asn | : L-asparagine |
| Cer | : Ceramide |
| Cys | : L-cysteine |
| Fuc | : L-Fucose |
| F.A.B. | : "Fast atom bombardment" |
| Gal | : D-galactose |
| GalNAc | : N-acétyl-D-galactosamine |
| G.L.C. | : "Gas Liquid Chromatography" |
| Glc | : D-glucose |
| GlcNAc | : N-acétyl-D-glucosamine |
| ¹ H-NMR | : "Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance" |
| HPLC | : "High Performance Liquid Chromatography" |
| ICD | : "I cell Disease" |
| Man | : D-mannose |
| MLP | : Mucolipidose |
| MPS | : Mucopolysaccharidose |
| M.S. | : "Mass spectrometry" |
| NeuAc | : Acide 5-N-acétyl neuraminique |
| NeuGl | : Acide 5-N-glycolyl neuraminique |
| Pro | : L-proline |
| Ser | : L-Sérine |
| TLC | : "Thin Layer Chromatography" |
| Xyl | : L-xylose |

INTRODUCTION

GENERALITES

LES LYSOSOMES

| | |
|---|-------|
| | p. 7 |
| I - <u>ORIGINE</u> | p. 7 |
| II - <u>CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES</u> | p. 8 |
| A - <u>PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE</u> | p. 10 |
| B - <u>LE pH INTRALYSOSOMAL</u> | p. 10 |
| III - <u>RÔLE DES LYSOSOMES</u> | p. 11 |
| A - <u>HETEROPHAGIE</u> | p. 11 |
| 1 - LA PHAGOCYTOSE | p. 11 |
| 2 - LA PINOCYTOSE | p. 12 |
| B - <u>AUTOPHAGIE</u> | p. 14 |
| C - <u>EXOCYTOSE</u> | p. 15 |
| IV - <u>PATHOLOGIE LYSOSOMALE</u> | p. 15 |
| A - <u>RUPTURE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE</u> | p. 16 |
| B - <u>DEVERSEMENT DES ENZYMES DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE</u> | p. 16 |
| C - <u>SURCHARGE LYSOSOMALE</u> | p. 16 |
| 1 - SURCHARGES PHYSIOLOGIQUES | p. 17 |
| 2 - SURCHARGES PAR DEFICIT ENZYMATIQUE HEREDITAIRE | p. 17 |
| | |
| LES GLYCOSIDASES LYSOSOMALES | p. 21 |
| I - <u>CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES HYDROLASES ACIDES</u> | p. 21 |
| A - <u>pH DEPENDANCE ET STABILITE</u> | p. 21 |

| | |
|---|-------|
| B - <u>PROPRIETES STRUCTURALES</u> | p. 22 |
| C - <u>SPECIFICITES ET FORMES MULTIPLES</u> | p. 22 |
| 1 - <u>ORIGINE DES ISOENZYMES</u> | p. 23 |
| | |
| II - <u>BIOSYNTHESE ET TRANSPORT INTRACELLULAIRE DES HYDROLASES ACIDES</u> | p. 26 |
| A - <u>LE SYSTEME DE RECONNAISSANCE PHOSPHOMANNOSYL DES ENZYMES LYSOSOMAux</u> | p. 26 |
| 1 - LE SIGNAL A MANNOSE-6-PHOSPHATE (Man 6P) | p. 26 |
| 2 - ETUDE STRUCTURALE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES ENZYMES LYSOSOMAux | p. 28 |
| 3 - LE RECEPTEUR A MANNOSE-6-PHOSPHATE | p. 30 |
| B - <u>BIOSYNTHESE ET MATURATION DES SIGNAUX DE RECONNAISSANCE PHOSPHOMANNOSYL DES ENZYMES LYSOSOMAux</u> | p. 31 |
| 1 - PHOSPHORYLATION DU MANNOSE | p. 31 |
| 2 - MATURATION DE LA CHAINE PROTEIQUE | p. 32 |
| C - <u>ROUTES ALTERNATIVES</u> | p. 32 |
| D - <u>CONCLUSION - CYCLE DE VIE DES ENZYMES LYSOSOMAux</u> | p. 34 |
| | |
| III - <u>NATURE DU DEFICIT ENZYMATIQUE</u> | p. 36 |
| A - <u>MUTATION D'UN GENE REGULATEUR</u> | p. 36 |
| B - <u>MUTATION D'UN GENE STRUCTURAL</u> | p. 38 |
| | |
| MALADIES HEREDITAIRES DE SURCHARGE LYSOSOMALE DES GLYCOCONJUGUES | p. 41 |
| I - <u>LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES</u> | p. 41 |
| A - <u>CARACTERISTIQUES GENERALES DU CATABOLISME DES MUCOPOLYSACCHARIDES</u> | p. 41 |
| B - <u>NOTION DE FACTEUR CORRECTIF</u> | p. 45 |

| | |
|--|-------|
| II - <u>LES GLYCOSPHINGOLIPIDOSES</u> | p. 47 |
| A - <u>CATABOLISME GENERAL DES GLYCOLIPIDES</u> | p. 47 |
| 1 - ROLE ET DISTRIBUTION | p. 47 |
| 2 - DEGRADATION ENZYMATIQUE | p. 49 |
| 3 - PROTEINES ACTIVATRICES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GLYCOLIPIDES | p. 51 |
| B - <u>SURCHARGES EN GLYCOLIPIDES</u> | p. 51 |
| III - <u>LES GLYCOGENOSES</u> | p. 53 |
| IV - <u>LES GLYCOPROTEINOSES</u> | p. 55 |
| A - <u>SCHEMA GENERAL DE STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES</u> | p. 55 |
| 1 - LES O-GLYCOSYLPROTEINES | p. 57 |
| 2 - LES N-GLYCOSYLPROTEINES | p. 59 |
| B - <u>CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES</u> | p. 64 |
| 1 - REPRISE SPECIFIQUE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES | p. 64 |
| 2 - DEGRADATION ENZYMATIQUE | p. 69 |
| C - <u>LES GLYCOPROTEINOSES</u> | p. 70 |
| GLYCOPEPTIDES ET OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE NORMALE | |
| | p. 75 |
| I - <u>LES GLYCOPEPTIDES DE L'URINE NORMALE</u> | p. 75 |
| A - <u>GLYCOPEPTIDES RICHES EN FUCOSE</u> | p. 76 |
| B - <u>GLYCOPEPTIDES RICHES EN ACIDES SIALIQUES</u> | p. 76 |
| C - <u>AUTRES GLYCOPEPTIDES</u> | p. 77 |
| II - <u>OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE NORMALE</u> | p. 79 |
| A - <u>OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN</u> | p. 79 |

| | |
|--|-------|
| 1 - CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES NORMALES | p. 79 |
| 2 - GROSSESSE ET LACTATION | p. 79 |
| 3 - SURCHARGE EN GALACTOSE OU LACTOSE | p. 79 |
| B - <u>OLIGOSACCHARIDES NON RELIES AU GROUPE SANGUIN</u> | p. 83 |

| | |
|------------|-------|
| CONCLUSION | p. 84 |
|------------|-------|

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE 1

| | |
|---|-------|
| DESCRIPTION D'UN NOUVEAU GROUPE DE GLYCOPROTEINOSES : LES SIALIDOSES | p. 86 |
| I - <u>CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES ET BIOCHIMIQUES DES MUCOLIPIDOSES</u> | p. 86 |
| A - <u>MUCOLIPIDOSE DE TYPE I (MLP I)</u> | p. 86 |
| B - <u>VARIANTS DE LA MUCOLIPIDOSE I</u> | p. 87 |
| 1 - MUCOLIPIDOSES INFANTILES GRAVES | p. 87 |
| 2 - MUCOLIPIDOSE SANS ATTEINTE NEUROLOGIQUE | p. 87 |
| 3 - "CHERRY-RED SPOT MYOCLONUS SYNDROME" | p. 87 |
| 4 - MUCOLIPIDOSE AVEC DEFICIT EN β -GALACTOSIDASE | p. 88 |
| C - <u>MUCOLIPIDOSES DE TYPE II et III (MLP II, MLP III)</u> | p. 88 |
| 1 - CLINIQUE | p. 88 |
| 2 - ETUDE HISTOLOGIQUE | p. 89 |
| 3 - INVESTIGATIONS CHIMIQUES (<i>Nature du matériel accumulé</i>) | p. 89 |
| 4 - ETUDES ENZYMATIQUES | p. 89 |
| 5 - THEORIES SUR LA PATHOGENESE DES MUCOLIPIDOSES II et III | p. 92 |
| D - <u>MUCOLIPIDOSE DE TYPE IV</u> | p. 93 |

| | |
|--|--------|
| II - <u>ÉTUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT LES</u> <u>DIFFÉRENTS TYPES DE MUCOLIPIDOSES</u> | p. 94 |
| A - <u>ÉTUDE CHIMIQUE</u> | p. 94 |
| B - <u>ÉTUDE EN RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A 300-MHz</u> | p. 113 |
| C - <u>CONCLUSION</u> | p. 123 |
| III - <u>MISE EN ÉVIDENCE D'UN DÉFICIT EN α-NEURAMINIDASE</u> <u>ASSOCIÉ À LA MUCOLIPIDOSE DE TYPE II</u> | p. 124 |
| A - <u>METHODE DE DOSAGE</u> | p. 124 |
| B - <u>CONCLUSION</u> | p. 129 |
| IV - <u>ÉTUDE COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ NEURAMINIDASIQUE DANS</u> <u>LES DIFFÉRENTS TYPES DE SIALIDOSE</u> | p. 129 |
| V - <u>ÉTUDE DES ACTIVITÉS α-NEURAMINIDASQUES DU FOIE</u> <u>HUMAIN</u> | p. 136 |
| VI - <u>CONCLUSION À L'ÉTUDE DES SIALIDOSES</u> | p. 161 |
| A - <u>NATURE DU DEFICIT EN α-NEURAMINIDASE</u> | p. 161 |
| B - <u>NATURE DU DEFICIT ENZYMATIQUE PRIMAIRE DANS</u> <u>MUCOLIPIDOSES II ET III</u> | p. 163 |
| C - <u>DEFICIT COMBINE EN β-GALACTOSIDASE ET</u> <u>α-NEURAMINIDASE</u> | p. 167 |

CHAPITRE 2

| | |
|--|--------|
| ÉTUDE COMPAREE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT DEUX MALADIES A DEFICIT EN β -GALACTOSIDASE : LA GM ₁ GANGLIOSIDOSE ET LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B | p. 170 |
|--|--------|

| | |
|--|--------|
| I - <u>LA GM₁ GANGLIOSIDOSE</u> | p. 170 |
| A - <u>INTRODUCTION</u> | p. 170 |
| B - <u>SYMPTOMATOLOGIE DES GM₁ GANGLIOSIDOSES</u> | p. 170 |
| 1°) GM ₁ GANGLIOSIDOSE INFANTILE (TYPE I) | p. 171 |
| 2°) GM ₁ GANGLIOSIDOSE JUVENILE (TYPE II) | p. 171 |
| C - <u>HISTOPATHOLOGIE</u> | p. 171 |
| D - <u>ETUDE BIOCHIMIQUE</u> | p. 173 |
| 1°) NATURE DU MATERIEL ACCUMULE | p. 173 |
| 2°) NATURE DU DEFICIT ENZYMATIQUE | p. 175 |
| II - <u>LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B</u> | p. 176 |
| A - <u>SYMPTOMATOLOGIE</u> | p. 176 |
| B - <u>ETUDE BIOCHIMIQUE</u> | p. 176 |
| III - <u>ISOLEMENT ET DÉTERMINATION STRUCTURALE DE 6 OLIGOSACCHARIDES URINAIRES CARACTÉRISTIQUES DE LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B</u> | p. 177 |
| IV - <u>ÉTUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT LA GANGLIOSIDOSE DE TYPE I (MALADIE DE LANDING)</u> | p. 191 |
| A - <u>FRACTIONNEMENT DE L'URINE</u> | p. 191 |
| B - <u>METHODES STRUCTURALES</u> | p. 191 |
| C - <u>RESULTATS</u> | p. 193 |
| 1°) FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES | p. 193 |
| 2°) COMPOSITION MONOSACCHARIDIQUE | p. 193 |
| 3°) ANALYSE PAR METHYLATION ET RMN A 360 MHz | p. 193 |
| V - <u>CONCLUSION</u> | p. 202 |

CHAPITRE 3

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES SUPERIEURS
EXCRETES LORS DE LA MANNOSIDOSE

I - ÉTUDE CLINIQUE

p. 207

p. 207

II - ENZYMOLOGIE

p. 208

III - ÉTUDE CHIMIQUE DU MATÉRIEL ACCUMULÉ

p. 209

IV - DISCUSSION

p. 227

CHAPITRE 4

ETUDE DES GLYCOASPARAGINES ACIDES
DE L'URINE D'ASPARTYLGLYCOSAMINURIE

I - ÉTUDE CLINIQUE

p. 232

p. 232

II - ENZYMOLOGIE

p. 233

III - NATURE DU MATÉRIEL ACCUMULÉ

p. 233

IV - DISCUSSION

p. 248

CHAPITRE 5

EXEMPLE DE SURCHARGE LYSOSOMALE SECONDAIRE,
ETUDE DU MATERIEL URINAIRE EXCRETE LORS DE
LA MALADIE DE GAUCHER.

p. 250

CONCLUSION

p. 266

CHAPITRE 6

| | |
|--|--------|
| MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT DIFFERENTS TYPES D'EPILEPSIE MYOCLONIQUE | p. 268 |
| I - <u>MISE EN ÉVIDENCE D'UNE N-GLYCOPEPTIDURIE DANS UN CAS D'ÉPILEPSIE MYOCLONIQUE JUVÉNILE</u> | p. 269 |
| II - <u>MISE EN ÉVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDURIE ASSOCIÉE À UN CAS D'ENCÉPHALOPATHIE MYOCLONIQUE PRÉCOCE AVEC ÉPILEPSIE</u> | p. 272 |
| A - <u>OBSERVATION CLINIQUE</u> | p. 273 |
| B - <u>ETUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE</u> | p. 274 |
| C - <u>CONCLUSION</u> | p. 284 |
| CONCLUSION GENERALE ET RESUME | p. 285 |
| I - <u>INTERET DIAGNOSTIQUE TOUT D'ABORD</u> | p. 285 |
| II - <u>COMPREHENSION DU CATABOLISME DES CHAINES GLYCANNIQUES DES GLYCOPROTEINES</u> | p. 286 |
| III - <u>APPORT A LA CONNAISSANCE STRUCTURALE DES CHAINES OLIGOSAC- CHARIDIQUES DES N-GLYCOSYL PROTEINES</u> | p. 289 |

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, les erreurs innées du métabolisme se sont enrichies de la description d'un vaste groupe d'affections dont le mécanisme commun réside dans l'incapacité de la cellule à dégrader des molécules complexes : ce sont les maladies lysosomales congénitales. Pour chacune de ces affections, le mécanisme pathogénique est essentiellement le même : une hydrolase lysosomale fait défaut par suite d'une anomalie héréditaire, et en conséquence la ou les substances qui sont normalement digérées dans les lysosomes s'accumulent dans ces particules. A la mort cellulaire, le matériel de surcharge se déverse dans le milieu extérieur, est filtré par le rein et passe dans l'urine. L'élucidation de la nature du matériel urinaire, directement en rapport avec l'enzyme déficient, constituera pour ces maladies un élément diagnostique majeur.

La nature du matériel accumulé sert généralement de base à la classification des maladies de surcharge, c'est ainsi que l'on distinguera les lipidoses, les mucopolysaccharidoses ou encore les glycogénoses. Les années 1966 à 1969 virent la description d'un certain nombre de syndromes présentant certaines des caractéristiques cliniques des mucopolysaccharidoses mais s'en différenciant toutefois par l'absence de mucopolysaccharidurie. L'ensemble de ces maladies fut rassemblé dans un premier temps au sein d'un "groupe d'attente" très hétérogène sous le terme général de "mucolipidoses". Les études biochimiques succédant aux études cliniques permirent d'associer à bon nombre de ces affections une déficience en hydrolase acide intervenant dans le catabolisme des chaînes glycaniques des glycoconjugués : glycolipides et notamment glycoprotéines.

Le blocage métabolique se traduit dans ce dernier cas par une excrétion urinaire massive d'oligosaccharides ou de glycopeptides, trouvant leur origine dans les chaînes glycaniques des glycoprotéines de l'ensemble de l'organisme. Les maladies ainsi définies ont été reclassifiées sous l'éponyme de "glycoprotéinoses", terme plus en accord avec la nature chimique du matériel accumulé.

Notre travail a consisté en la caractérisation, l'isolement et l'analyse structurale détaillée des oligosaccharides ou glycopeptides excrétés au cours de ces affections. Cette étude est réalisée dans un double but :

- diagnostic tout d'abord : l'analyse de l'oligosaccharidurie associée aux données cliniques permet le diagnostic différentiel des glycoprotéinoses et peut être utilisé comme base pour l'identification de l'enzyme responsable du blocage métabolique.

- aux fins d'études plus fondamentales ensuite telles que : compréhension des différentes étapes du catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines ou apport d'éléments structuraux relatifs à l'architecture de ces mêmes glycannes.

Nous décrirons successivement les études réalisées sur l'analyse du matériel oligosaccharidique ou glycopeptidique excrété lors des maladies suivantes : sialidose, GM₁-gangliosidose et maladie de Morquio type B, mannosidose, aspartylglycosaminurie et maladie de Gaucher.

Les travaux effectués sur le groupe des sialidoses se sont complétés d'études enzymatiques menées sur les neuraminidases leucocytaires et fibroblastiques des malades ainsi que d'une étude des formes enzymatiques du foie normal.

Dans un dernier temps, nos méthodes d'analyse ont été élargies à certains troubles neurologiques du nourrisson d'étiologie inconnue.

Nous avons fait précéder l'exposé de nos travaux par un chapitre "GENERALITES" où sont résumés les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans les différentes maladies de surcharge, ainsi que nos connaissances actuelles quant aux structures et rôles des chaînes glycaniques des glycoprotéines.

Notre travail sur les glycoprotéinoses a fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - G. STRECKER, J.C. MICHALSKI, J. MONTREUIL and J.P. FARRIAUX
Déficit in neuraminidase associated with Mucopolipidosis II (I cell Disease)
Biomed. Exp., 1976, 25, 238-240

- 2 - G. STRECKER, M.C. PEERS, J.C. MICHALSKI, T. HONDI-ASSHAH, B. FOURNET,
G. SPIK, J. MONTREUIL, J.P. FARRIAUX, P. MAROTEAUX and P. DURAND
Structure of urine sialyl-oligosaccharides excreted in urine of eleven
patients with three different types of sialidosis
Eur. J. Biochem., 1977, 75, 391-403

- 3 - J.C. MICHALSKI, G. STRECKER, B. FOURNET, M. CANTZ and J. SPRANGER
Structure of sialyl-oligosaccharides excreted in the urine of a
patient with Mucopolipidosis I.
FEBS-Letters, 1977, 79, 101-104

- 4 - J.C. MICHALSKI et G. STRECKER
Une nouvelle méthode de l'activité α -neuraminidasique appliquée au
dosage des sialidoses
In J.P. FARRIAUX, Les Oligosaccharidoses, Crouan et Roques ed., Lille,
1977, 133-136

- 5 - P. DURAND, R. GAITTI, S. CAVALIERI, M. TONDEUR, J.C. MICHALSKI and G. STRECKER
Sialidosis type I.
Helv. Paediat. Acta, 1977, 32, 391-400

- 6 - G. STRECKER and J.C. MICHALSKI
Biochemical basis of sialidosis
FEBS-Letters, 1977, 85, 10-25

- 7 - L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J.F.G. Vliegenthart, G. STRECKER, J.C. MICHALSKI,
B. FOURNET, G. SPIK and J. MONTREUIL
360 MHz-¹H nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of sialyl-oligosaccha-
rides from patients with sialidosis (mucopolipidosis I and II)
Eur. J. Biochem., 1978, 87, 323-329

- 8 - P. MAROTÉAUX, R. HUMBEL, G. STRECKER, J.C. MICHALSKI et R. MANDE
Un nouveau type de sialidose avec atteinte rénale : la néphrosialidose.
Etude clinique, radiologique et nosologique.
Arch. Franç. de Pédiat., 1978, 35, 819-829

- 9 - G. STRECKER and J.C. MICHALSKI
Sialidosis a new type of inborn disease
In Diagnostic significance of enzymes and proteins in urine, Dubach and Schmidt ed., Hans Huber Publishers, Bern, 1979, pp 370-382

- 10 - G. STRECKER, J.C. MICHALSKI, M.C. HERLANT-PEERS, B. FOURNET and J. MONTREUIL
Structure of 40 oligosaccharides and glycopeptides accumulating in the urine from patients with catabolism defect of glycoconjugates (sialidosis, fucosidosis, mannosidosis and Sandhoff disease)
Proc. IVth Symp. on Glycoconjugates, Woods Hole, 27 september-1 october 1977, Academic Press ed., New York (1979) pp. 945-948

- 11 - H. van HALBEEK, L. DORLAND, G.A. VELDINK, J.F.G. Vliegenthart, J.C. MICHALSKI and W.E. HULL
Structure elucidation of oligomannoside-type asparagine bound carbohydrate chains by 500 MHz ¹H-n.m.r. spectroscopy
FEBS-Letters, 1980, 221, 65-70

- 12 - H. van HALBEEK, L. DORLAND, G.A. VELDINK, J.F.G. Vliegenthart, G. STRECKER, J.C. MICHALSKI, J. MONTREUIL and W.E. HULL
A 500 MHz ¹H-n.m.r. study of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis
FEBS-Letters, 1980, 121, 71-77

- 13 - A. FEDERICO, A. CECIO, G. APPONI-BATTINI, J.C. MICHALSKI, G. STRECKER and G.C. GUAZZI
Macular cherry red spot and myoclonus syndrome, juvenile form of sialidosis
J. of Neurological Sciences, 1980, 48, 157-169

- 14 - A. FEDERICO, A. GUAZZI, C. FRUSCHELLI, G. PALLADINI, L. MEDOLOGOALBANI, J.C. MICHALSKI and G. STRECKER
Glycopeptidosis a new inherited disorder of glycoconjugates metabolism affecting the central nervous system
J. of Inher. Metabol. Dis., 1981, 4, 141-142

- 15 - H. EGGE, J.C. MICHALSKI and G. STRECKER
Heterogeneity of urinary oligosaccharides from mannosidosis : mass spectrometric analysis of permethylated Man 9, Man 8 and Man 7 derivatives
Arch. Biochem. Biophys., 1982, 213, 318-326

- 16 - R. GATTI, P. BUTTITA, J.C. MICHALSKI, G. STRECKER, C. BORRONE and D. SALEMI
L'aspartylglucosaminuria in una ragazza di origine siciliana : caratterizzazione delle glicospargini urinarie
Riv. Ital. Ped., 1982, 8, 87-91

- 17 - J.C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND and J.F.G. VLIEGENTHART
The structures of six urinary oligosaccharides that are characteristic for a patient with Morquio syndrome type B.
Carbohydrate Res., 1982, 100, 351-363

- 18 - J.L. DHONDT, J.P. FARRIAUX, B. CARTIGNY and J.C. MICHALSKI
Lactobionic acid : a pitfall in screening for oligosaccharidurias
J. Inher. Metabol. Dis., 1982, 5, supp 1, p. 7

- 19 - J.C. MICHALSKI, A.P. CORFIELD and R. SCHAUER
Solubilization and affinity chromatography of a sialidase from human liver
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1982, 363, 1097-1102

- 20 - J.C. MICHALSKI, J. MONTREUIL and G. STRECKER
A thin layer chromatographic method for screening for sialurias
Clin. Chim. Acta, 1983, 129, 99-101

- 21 - J.C. MICHALSKI, J. MONTREUIL, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J.F.G. VLIEGENTHART, B. CARTIGNY and J.P. FARRIAUX
Primary structure of three mannosyl-glycosparagines and nine sialyl-oligosaccharides isolated from the urine of two patients with Gaucher's disease (infantile form).
Eur. J. Biochem., 1983, 132, 375-401

- 22 - J.C. MICHALSKI, S. BOUQUELET, J. MONTREUIL, G. STRECKER, O. DULAC and A. MUNNICH
Abnormal galactoside excretion in urine of a patient with early myoclonic epileptic encephalopathy
Clin. Chim. Acta, 1984, 137, 43-51

AUTRES PUBLICATIONS

- 23 - R. MAGET-DANA and J.C. MICHALSKI
Horse erythrocytes gangliosides : preparation of the major hematoside : NeuNG₁-Lac-Cer
Lipids, 1980, 15, 682-685
- 24 - A.P. CORFIELD, J.C. MICHALSKI and R. SCHAUER
The substrate specificity of sialidases from microorganisms and mammals
In Perspectives in Inherited Metabolic Diseases, 1981, vol. 4, pp. 3-70,
ERMES S.r.I. ed., Milano, Italy
- 25 - A.P. CORFIELD, R.W. VEH, M. WEMBER, J.C. MICHALSKI and R. SCHAUER
The release of N-acetyl and N-glycolloyl neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases
Biochem. J., 1981, 197, 293-299
- 26 - R.W. VEH, J.C. MICHALSKI, A.P. CORFIELD, M. SANDER-WEVER, D. GIES and R. SCHAUER
New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides
J. Chromato., 1981, 212, 313-322
- 27 - L.M. LOOMES, K.I. UEMURA, R.A. CHILDS, J.C. PAULSON, G.N. ROGERS, P.R. SCUDDER, J.C. MICHALSKI, E.E. HOUNSELL, D.T. ROBINSON & T. FEIZI
Erythrocyte receptors for Mycoplasma pneumoniae are sialylated oligosaccharides of Ii antigen type
Nature, 1984, 307, 560-563

GENERALITES

LES LYSOSOMES

L'étude des lysosomes représente l'un des meilleurs exemples de travail symbiotique entre biologistes spécialistes de la microscopie électronique, histochimistes et biochimistes. Les premières descriptions de lysosomes en microscopie électronique en tant que "corps denses" précédèrent de peu la localisation des hydrolases acides dans ces organelles.

C'est en 1955 que De Duve et al. (1) attribuent le terme de "lysosomes" à un groupe de particules cytoplasmiques contenant près de 40 enzymes hydrolytiques dont l'activité optimale se situe à pH acide, d'où la désignation d'hydrolases acides qui leur est attribuée. Ces petits sacs digestifs sont limités par une membrane destinée à circonscrire le foyer de digestion et d'empêcher l'attaque du cytoplasme environnant. A cause de l'hétérogénéité de formes et de fonctions du lysosome, différentes terminologies ont été employées pour décrire ces organites cellulaires, nous emploierons quant à nous celle proposée par NOVIKOFF 1973 (2).

I - ORIGINE

Dans les cellules à activité macrophagique, tels les granulocytes, les macrophages ou les monocytes, les lysosomes dérivent directement de l'appareil de Golgi suivant la route classique de synthèse et d'empaquetage des protéines (PALADE 1975 (3)). Dans les autres types cellulaires, les lysosomes semblent se former par vésiculation d'une région spécifique de l'appareil de Golgi nommée le "GERL", acronyme anglosaxon désignant la région riche en hydrolases de la face interne ou "trans" de l'appareil de Golgi ou "Golgi associated smooth Endoplasmic Reticulum that forms Lysosomes" (NOVIKOFF 1976 (4)). La relation Golgi-Lysosomes a en particulier été mise en évidence par cytochimie, utilisant des enzymes marqueurs telle la phosphatase acide (PINO et al. 1981 (5)).

4 types de lysosomes semblent dériver directement du GERL (Figure 1) :

1 - Les corps résiduels : contenant les résidus de la digestion intracellulaire ;

2 - Les "coated vesicles" : ce terme désigne de petites vésicules recouvertes d'un parement protéique particulier la clathrine leur donnant un aspect hérissé. Ces vésicules contiennent les hydrolases acides nouvellement synthétisées n'ayant pas encore participé aux réactions de digestion et donnent naissance aux lysosomes primaires ;

3 - Les vacuoles autophagiques de type I : dans lesquelles les portions de GERL enveloppent des portions de cytoplasme contenant des organelles telles les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou des peroxyosomes. Une fois ces vésicules formées, on assiste au déversement des hydrolases acides dans ces vacuoles et au début de la digestion ; la vacuole autophagique finit par devenir corps résiduel ;

4 - Les vacuoles autophagiques de type II : dans ce cas c'est une portion de cytosol ou de glycogène qui est englobée par le GERL et digérée.

II - CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

Les lysosomes peuvent être préparés à partir d'homogénats cellulaires par les méthodes classiques de centrifugation différentielle. Les détails méthodologiques pourront être trouvés dans la monographie de DINGLE 1977 (6).

La caractéristique essentielle permettant d'identifier une population d'organelles comme étant des lysosomes est évidemment la cosédimentation des hydrolases acides ; ces dernières étant englobées dans des vésicules limitées par une membrane, une autre caractéristique des préparations lysosomales sera la "latence enzymatique". La membrane lysosomale étant généralement imperméable aux substrats enzymatiques, l'activité des enzymes ne peut se manifester qu'après rupture préalable de la membrane par des méthodes physiques ou chimiques telles la sonication ou l'emploi de détergents.

A - PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMIALE

Les propriétés de la membrane lysosomale ont fait l'objet d'une revue par REIJNGOUD et TAGER 1977 (8). Comme les autres membranes à phospholipides, la membrane lysosomale est perméable aux acides et bases faibles, et imperméable aux ions monovalents (K^+ , Cl^-). Concernant les autres types de molécules, les résultats sont plus fragmentaires. La membrane lysosomale est en particulier perméable aux composés polyhydroxylés de faible poids moléculaire comme les monosaccharides (EHRENREICH et COHN 1969 (9)), par contre elle est relativement imperméable aux oligosaccharides. La perméabilité semble être plus élevée vis-à-vis des amino-acides ou des peptides. L'accumulation intralysosomale de certains composés tel l'acide sialique dans la maladie de SALLA (RENLUND et al. 1983 (10)) ou de la cystine dans la cystinose (SCHNEIDER et SCHULMAN 1982 (11)) semble être en faveur de mécanismes de transport actif qui permettent dans des conditions physiologiques normales, leur passage dans le cytosol.

B - LE pH INTRALYSOSOMAL

Comme nous l'avons préalablement mentionné, les enzymes lysosomaux ont dans leur grande majorité un pH optimum acide et la plupart d'entre elles sont inactives à pH neutre. Cette observation a conduit COFFEY et DE DUVE 1968 (12) à émettre l'hypothèse d'un pH intralysosomal très bas en comparaison du cytosol environnant. Le problème se posait donc de savoir comment ce pH acide était formé et comment il était régulé. Deux mécanismes sont généralement avancés, le premier étant un mécanisme énergétique faisant intervenir une pompe à protons (DUNCAN 1966 (13)), le deuxième mécanisme invoquant quant à lui un équilibre acide-base de type Donnan au niveau de la membrane lysosomale. Cette dernière hypothèse est généralement retenue, la matrice lysosomale pouvant être assimilée à une solution isotonique contenant des glycoprotéines de points isoélectriques très bas assurant ainsi un pH intralysosomal acide. Les glycoprotéines et les glycolipides de la face interne de la membrane lysosomale peuvent également jouer un rôle dans le maintien du pH (YAMAMOTO et al. 1980 (14)), BURNSIDE et SCHNEIDER 1982 (15)).

III - RÔLE DES LYSOSOMES

Grâce aux hydrolases acides, dont les propriétés seront discutées au paragraphe suivant, les lysosomes auront une fonction hétérophagique intéressant les substances extracellulaires, ainsi qu'une fonction autophagique portant sur les constituants endocellulaires.

A - HETEROPHAGIE

Le matériel extracellulaire pénètre dans la cellule grâce au phénomène d'endocytose à la faveur d'une invagination de la membrane cytoplasmique qui enveloppe totalement la substance à ingérer. La vacuole ainsi nouvellement formée portera le nom d'hétérophagosome ; les hétérophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes primaires, pour donner des lysosomes secondaires à l'intérieur desquels s'effectue la digestion. Classiquement l'endocytose peut être divisée en deux types :

- le terme de phagocytose est utilisé pour décrire l'internalisation de grosses particules visibles au microscope (environ 1/10 μM) ;
- le terme de pinocytose est quant à lui réservé à l'ingestion de petites molécules.

1 - LA PHAGOCYTOSE

Expérimentalement la phagocytose peut être divisée en deux étapes

- l'attachement de la particule cellulaire
- l'internalisation de la particule

Chacune de ces étapes dépend d'un grand nombre de processus qui ont été résumés comme suit par STOSSEL 1976 (16).

- . la particule reconnaît le récepteur membranaire
- . le phagocyte reçoit le message de reconnaissance
- . le phagocyte transmet le message au cytoplasme environnant
- . la membrane plasmique adhère fortement à la particule
- . des pseudopodes entourent la particule
- . les pseudopodes fusionnent pour former une vésicule.

Différents facteurs influencent la phagocytose, en particulier l'hydrophobicité, la charge et la nature chimique de la particule jouent un rôle important dans la détermination de la nature de l'interaction particule-cellule. Ces différentes propriétés de la surface de la particule peuvent être modifiées par des substances du milieu environnant, ce dernier phénomène étant la base du concept d'opsonisation (WILKINSON 1976 (17)), où des protéines sériques enveloppent la particule et aide à son attachement et à son ingestion par les phagocytes (GUDEWICZ et al. 1980 (18)).

Les propriétés de la surface membranaire du phagocyte influencent au même titre les propriétés d'endocytose de la cellule ; en particulier SHAW et GRIFFIN 1981 (19) démontrent qu'une apposition totale de la particule et des récepteurs membranaires est nécessaire à la transmission du signal de phagocytose, en particulier une mobilité latérale dans le plan membranaire du complexe particule-récepteur semble être nécessaire à la génération du signal de phagocytose. Il demeure cependant incertain que des portions spécifiques de la membrane plasmique soient spécialisées dans les processus de phagocytose.

2 - LA PINOCYTOSE

Suivant que la particule pinocytée entre dans la cellule en suspension dans le fluide englobé par la vésicule de pinocytose ou lié à un récepteur de la membrane de la vésicule on parlera respectivement de pinocytose en phase fluide ou de pinocytose adsorptive. (Figure 2).

a - Pinocytose en phase fluide : La pinocytose en phase fluide représente pour la cellule l'étape diamétralement opposée au phénomène d'exocytose cellulaire dont elle ne peut être dissociée, et fait intervenir les mêmes types de membranes qui sont sans cesse recyclées. La pinocytose sert avant tout à un approvisionnement continu de la cellule en substances extracellulaires qui sont dégradées dans le lysosome. En particulier BESTERMAN et al. 1982 (20) ont montré le rôle joué par la pinocytose des protéines exogènes couplée à leur dégradation lysosomale en tant que source d'acides aminés servant à la biosynthèse protéique, dans des cas de déprivation.

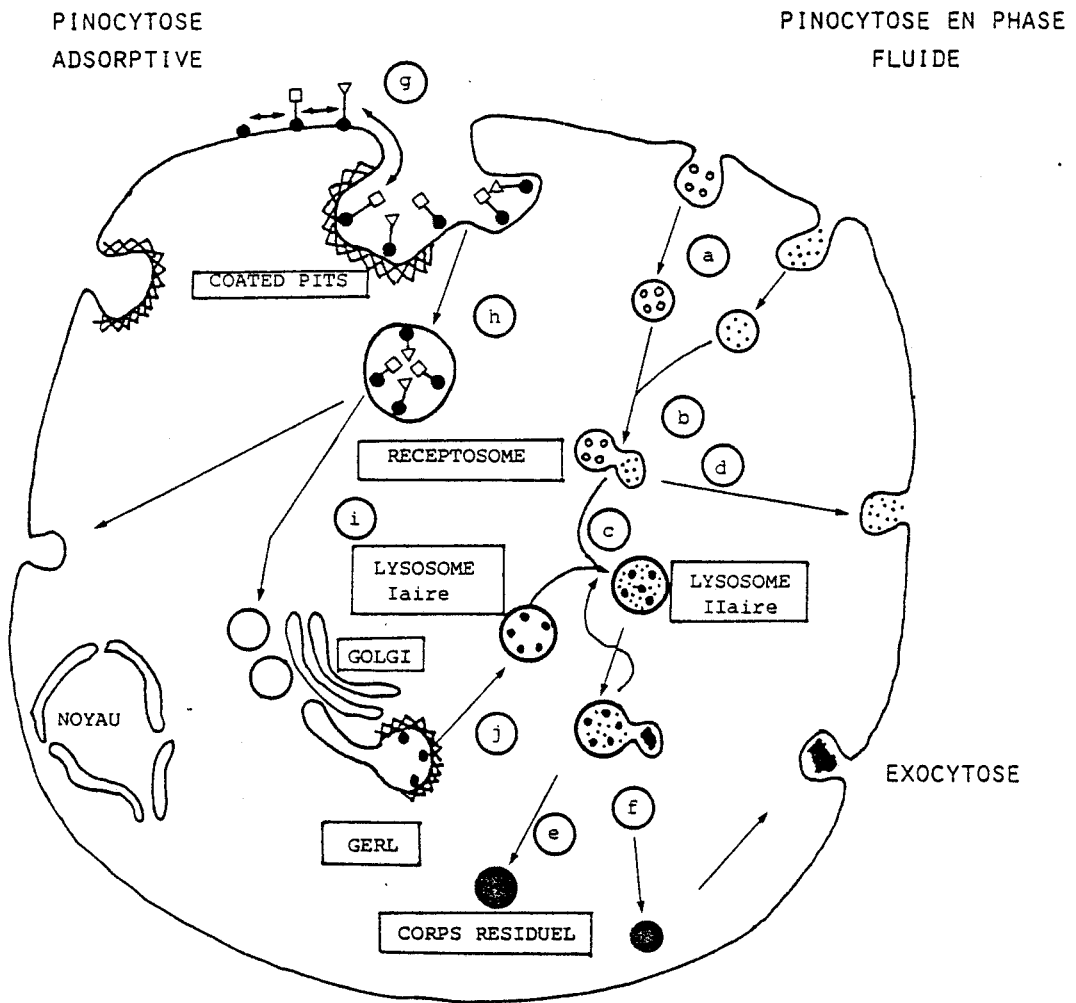


FIGURE 2

Représentation schématique des différents mouvements membranaires accompagnant la pinocytose

- XXXXX Clathrine
- Récepteur
- Δ Ligands

PINOCYTOSE EN PHASE FLUIDE

- a - formation de pinosomes par invagination
- b - fusion des pinosomes entre-eux
- c - fusion des pinosomes avec le lysosome primaire pour donner le lysosome secondaire
- d - circuit court. Fusion de la vésicule de pinocytose avec la membrane plasmique et exocytose
- e - formation de corps résiduels après digestion
- f - exocytose

PINOCYTOSE ADSORPTIVE

- g - rassemblement des complexes ligands-récepteurs dans des puits de la membrane plasmique recouverts de clathrine
- h - formation de vésicules spécialisées, les réceptosomes
- i - transfert des réceptosomes vers le Golgi
- j - formation de lysosomes primaires à partir du GERL

b - Pinocytose adsorptive : La majorité des types cellulaires possèdent, disséminés à leur surface, un certain nombre de récepteurs (d'hormones, de protéines, de virus...). Lorsque le ligand spécifique se fixe à ces récepteurs, on assiste à un déplacement latéral du complexe ainsi formé (ligand-récepteur) vers des régions spécialisées de la membrane, où les complexes se voient rassemblés et enfermés dans un genre de puits tapissé d'une protéine particulière la clathrine PEARSE 1976 (21). L'assemblage moléculaire spatial particulier de cette protéine, appelé "trisqueleton" donne un aspect "hérissé" au puits qui en est tapissé d'où le terme anglais de "bristle coated pits" qui leur est donné. Les parois du puits se referment ensuite pour donner de petites vésicules les "coated vesicles". Récemment sur des données d'ordre ultrastructural et biochimique (WILLINGHAM et PASTAN 1980 (22)), suggèrent que le manteau de clathrine reste en permanence attaché à la membrane. Une fois englobés dans les "coated pits" les ligands liés aux récepteurs sont transférés dans un autre type de vésicule se formant par une ouverture dans le manteau de clathrine, et nommées "réceptosomes" (PASTAN et WILLINGHAM 1981 (23)). Les réceptosomes sont ensuite guidés vers l'appareil de Golgi par l'intermédiaire du système microtubulaire, et de là les protéines sont adressées vers leur destination finale. Ce processus de pinocytose, contrairement à la pinocytose en phase fluide permet l'internalisation rapide de substances en des endroits déterminés de la membrane plasmique, limitant ainsi l'internalisation de quantités significatives de composés membranaires. Ce type de processus est impliqué dans les phénomènes de recapture enzymatique des enzymes lysosomiaux (WILLINGHAM et al. 1981 (24)), ou des asialo-protéines plasmatiques (WALL et al. 1980 (25)) dont il sera fait mention dans la suite de l'exposé.

B - AUTOPHAGIE

La propriété pour la cellule de détruire certains de ses constituants usagés (mitochondrie, réticulum-endoplasmique...) a été mise en évidence par ERICSSON en 1969 (26). Les processus sont les mêmes que ceux impliqués dans l'hétérophagie, la zone à détruire étant circonscrite par une membrane pour donner une vacuole nommée "autophagosome", qui va venir fusionner avec un lysosome primaire ou secondaire.

C - EXOCYTOSE

Comme nous l'avons mentionné préalablement seules les petites molécules produites par la digestion lysosomale peuvent diffuser librement au travers de la membrane ou être réutilisées spécifiquement dans les processus de biosynthèse. Cependant une certaine quantité de matériel non dégradé subsiste généralement à l'intérieur du lysosome. Le phénomène d'exocytose ou décharge en bloc du matériel non dégradé dans le milieu extracellulaire ne s'effectue que très rarement en raison de la nocivité que pourraient exercer les substances rejetées sur les cellules avoisinantes. Physiologiquement les résidus sont retenus au sein du lysosome qui évolue ainsi en corps résiduels renfermant du matériel de dégradation d'aspect réfringent en microscopie électronique.

IV - PATHOLOGIE LYSOSOMALE

Pour bien accomplir leur mission les lysosomes doivent être capables de digérer tous les substrats qui leur sont présentés. Cette digestion doit d'autre part s'effectuer sans danger pour la cellule, à l'abri des autres organites cellulaires. Dans les cas de dysfonctionnement de la fonction digestive, une surcharge des lysosomes par du matériel non dégradé est de règle. De même, une altération de la membrane lysosomale conduit à un déversement des enzymes dans le cytoplasme et à une lyse cellulaire. Dans les deux cas, le résultat est identique, la cellule est lésée et finit par mourir. Les lysosomes sont ainsi impliqués d'une manière ou d'une autre dans un grand nombre de conditions pathologiques de la cellule ou de l'organisme tels les processus inflammatoires, les maladies infectieuses. Nous ne nous étendrons pas sur le rôle particulier des lysosomes dans ces différentes maladies (voir la revue de DE DUVE 1974 (27)), mais décrirons plus particulièrement les différents phénomènes conduisant aux maladies de surcharge lysosomale.

A - RUPTURE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE

Dans certaines circonstances telles l'anoxie, les états de choc, l'acidose, il peut y avoir rupture de la membrane lysosomale et déversement des enzymes dans la cellule aboutissant à une autophagie de cette dernière. Les cas les plus connus de rupture de la membrane lysosomale sont ceux survenant chez les malades atteints de pneumoconiose (silicose), où les membranes lysosomales des macrophages alvéolaires sont déchirées par les cristaux de silice ingérés. Une "perforation" analogue des lysosomes est engendrée par l'accumulation d'acide urique. Il faut noter que certaines substances telles les vitamines liposolubles (A, K, D, E) et les hormones sexuelles stéroïdes exercent une action labilisante vis-à-vis de la membrane lysosomale ; il en est de même pour certains agents physiques tels les rayons U.V. et la congélation.

B - DEVERSEMENT DES ENZYMES DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE

Un second type de dommage peut intervenir à la suite d'un déversement accidentel des enzymes lysosomaux dans le milieu extracellulaire au cours d'accidents phagocytaires appelés "régurgitation cellulaire" dûs à une fusion prématurée des lysosomes avec une invagination endocytaire avant que celle-ci ne se soit refermée. On aboutit alors à un état inflammatoire local, ou à des affections dégénératives des structures conjonctives dans les os ou les articulations.

C - SURCHARGE LYSOSOMALE

Les maladies par encombrement des lysosomes sont très nombreuses. Elles comprennent toutes les situations où il existe un déséquilibre qualitatif ou quantitatif entre les substrats qui pénètrent dans les lysosomes et les hydrolases chargées de les dégrader. L'anomalie peut se situer selon les cas du côté des substrats ou de celui des hydrolases.

1 - SURCHARGES PHYSIOLOGIQUES

L'encombrement des lysosomes peut se produire après endocytose de substances indigestes. Il en est ainsi pour la tuberculose ou la lèpre, la paroi acide des mycobactéries responsables de ces troubles étant en effet résistante à la digestion lysosomale. On note alors la présence de macrophages géants, dont les lysosomes sont bourrés de bactéries mortes et vivantes. Un encombrement semblable se produit lorsque le lysosome est dépourvu de l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation d'une substance. C'est le cas des lipopigments (céroïdes et lipofuschines) qui sont des lipides polaires à haut degré de polymérisation et d'insaturation. Ces produits non dégradés se retrouvent dans les corps denses. Des surcharges expérimentales peuvent également être créées chez l'animal par injection de dextran, saccharose ou de polymères synthétiques, tels la polyvinylpyrrolidone (COHN et EHRENREICH 1969 (28)). On note alors l'apparition de cellules possédant d'énormes vacuoles, qui ne sont en fait que les lysosomes gonflés de la substance non dégradée ou d'eau qui pénètre à l'intérieur de la cellule par un processus osmotique.

2 - SURCHARGES PAR DEFICIT ENZYMATIQUE HEREDITAIRE

a - Concept : Le concept de maladie génétique de surcharge lysosomale fut établi par HERS en 1965 (29) lorsqu'il pût préciser de façon formelle la localisation intralysosomale de la maltase acide, enzyme déficient dans la glycogénose de type II. Par définition, les maladies génétiques de surcharge, représentent des conditions pathologiques initiées par un déficit primaire d'une protéine lysosomale qu'il s'agisse d'une hydrolase acide ou d'une protéine structurale. Le blocage métabolique se traduit par une accumulation de polymères partiellement dégradés au sein des lysosomes. La biosynthèse continuant à un taux normal ne fait qu'aggraver le processus provoquant l'apparition d'inclusions cytoplasmiques, d'énormes vacuoles et de lysosomes engorgés de matériel non dégradé qui sont les marques histochimiques de ces maladies. Quand les produits accumulés sont de faible masse moléculaire ou solubles dans l'eau, une excrétion accrue de ces produits est observée dans l'urine qui comme nous le verrons constituera un matériel de choix pour l'étude biochimique de ces troubles.

b - Nature du matériel accumulé : L'accumulation de matériel au sein des lysosomes modifie profondément leur morphologie, qui diffère d'ailleurs suivant la nature chimique du matériel non dégradé : c'est ainsi que des aspects tout à fait typiques peuvent être observés au microscope électronique dans certaines lipidoses ou mucopolysaccharidoses donnant parfois certaines informations diagnostiques ; nous ne citerons que les figures en rosette du glycogène dans la maladie de POMPE, les tubules dans la maladie de GAUCHER, les structures lamellaires dans la maladie de TAY-SACHS, les corps zébrés dans la maladie de HURLER ou encore, l'aspect en arête de poisson du matériel accumulé dans la leucodystrophie métachromatique (Figure 3).

Tous les tissus contenant l'enzyme génétiquement déficient sont atteints, et le déficit peut être décelé par analyse de n'importe quel matériel biologique, qu'il s'agisse du cerveau, du foie, du muscle, des leucocytes, des fibroblastes, du sérum ou même de l'urine et des larmes. Cependant, le degré d'atteinte de chaque type cellulaire variera profondément en fonction du rôle particulier joué par l'enzyme déficient dans ces cellules et la quantité de matériel qui doit normalement y être dégradé. C'est ainsi que la symptomatologie clinique des glycolipidoses est restreinte au cerveau, organe riche en gangliosides. Dans la majorité des cas la nature du matériel accumulé est hétérogène, ceci étant lié au fait, comme nous le verrons plus loin, que la plupart des enzymes digestifs sont plus spécifiques d'un type de liaison que d'un type de molécule. Néanmoins, dans la suite de l'exposé nous adopterons une classification basée sur la nature du composé accumulé majeur, tout en sachant que cette classification est bien sûr restrictive, et que par exemple, bon nombre de glycoprotéinoses sont tout à la fois des "gangliosidoses".

c - Pathogénèse : Plus d'une vingtaine de maladies lysosomales congénitales ont pu être décrites aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (voir les revues de BRADY 1978 (30), KOLODNY et CABLE 1982 (31), PATTERSON et al. 1982 (32)).

La plupart de ces maladies sont transmissibles suivant un mode autosomal récessif, quelques unes d'entre elles, telle la maladie de FABRY (déficit en α -galactosidase) ou la maladie de HUNTER (déficit



FIGURE 3

Aspect caractéristique des lysosomes lors des maladies de surcharge. Fibroblaste de mucopolysaccharidose type II, montrant de nombreuses inclusions cytoplasmiques, délimitées par une membrane unique, et au contenu polymorphe. D'après HERS et VAN HOOF. (échelle 1 μ)

en sulphoïduronate sulfatase) sont liées au sexe. Le tableau clinique et l'évolution de ces affections varie suivant la nature des dépôts, leur localisation préférentielle et la vitesse à laquelle ils se forment. On note une grande variabilité dans l'âge d'apparition et la sévérité de la maladie. On distinguera généralement, pour une même enzymopathie, une forme infantile très grave, une forme juvénile atténuée et une forme adulte. Si les dysmorphies faciales et osseuses sont généralement de règle, la symptomatologie la plus sévère apparaît dans les maladies où le système nerveux central est atteint. Le mécanisme pathogénique généralement observé est la démyélination secondairement à un dysfonctionnement des cellules de SCHWANN ; le retard psychomoteur sera un caractère généralement observé dans les maladies de surcharge.

LES GLYCOSIDASES LYSOSOMALES

Près de trente ans nous séparent de la découverte des lysosomes et plus d'une cinquantaine d'hydrolases acides ont été décrites à ce jour ; il serait difficile ici de résumer l'abondante littérature couvrant ce sujet (voir la revue systématique de BARRETT et HEATH 1977 (33)) ; nous ne ferons que préciser les propriétés générales des glycosidases, en insistant sur leur origine et leur rôle dans la pathologie lysosomale.

I - CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES HYDROLASES ACIDES

A - pH DEPENDANCE ET STABILITE

La pH dépendance de l'activité enzymatique est probablement le caractère le plus étudié des enzymes lysosomaux. Le pH optimum peut varier avec différents facteurs comme la nature du substrat, le tampon utilisé, la force ionique du milieu et la présence éventuelle d'activateurs. Toujours est-il que la majorité des hydrolases acides présentent un maximum d'activité dans une zone de pH allant de 4.0 à 5.5, à l'exception toutefois de l'aspartylglucosaminidase qui présente un pH optimum d'environ 8.0 (DUGAL et STROMME 1977 (34)). *In vivo* les enzymes lysosomaux sont rassemblés dans un milieu de pH d'environ 6.5 (REIJNGOUD et TAGER 1977 (35)) et au voisinage d'un grand nombre d'enzymes protéolytiques. Les hydrolases acides semblent échapper à l'activité protéasique, en raison de leur stabilité en milieu acide (GOLDBERG et St JOHN 1976 (36)), la dénaturation acide semble en effet être une étape préalable à la dégradation protéolytique. Cette résistance peut être due à une conformation particulière des protéines enzymatiques, mais une stabilisation métabolique est également apportée par la chaîne glycanique, comme il l'a été démontré pour la ribonucléase B ou la carboxypeptidase Y (CHU et MALEY 1982 (37), TASHIRO et TREVITHICK 1977 (38)).

Nous avons peu d'informations quant au "turnover" des enzymes *in vivo*. Les seules données viennent des expériences de "recapture" enzymatique par des lignées fibroblastiques réalisées par BARTON et NEUFELD 1971 (39), qui ont trouvé des demi-vies respectives de 3 et 9 jours pour la β -glucuronidase et l' α -L-iduronidase.

B - PROPRIETES STRUCTURALES

Les hydrolases acides représentent une population de protéines très hétérogène dont le poids moléculaire s'étale de 15 000 à 280 000 pour la β -glucuronidase. Comme nous le verrons plus loin ces enzymes sont souvent constitués de sous-unités protéiques pouvant être dissociées après traitement au sodium dodécyl sulfate ou au chlorhydrate de guanidine. Le contenu en cystéine de ces protéines varie de 0,3 % à 6,2 % et semble être inversement proportionnel à la taille des enzymes.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la plupart des glycosidases sont des glycoprotéines. Peu d'informations structurales relatives aux chaînes glycaniques sont disponibles à l'heure actuelle, en raison des difficultés rencontrées dans la purification de ces enzymes.

Le Tableau I rassemble les compositions glucidiques des hydrolases acides les plus accessibles. Récemment des études plus poussées ont été réalisées quant à la détermination structurale exacte de ces chaînes glycaniques, au regard de leur rôle primordial dans les phénomènes de ségrégation subcellulaire, ces résultats seront rapportés sous le chapitre biosynthèse.

C - SPECIFICITES ET FORMES MULTIPLES

(Voir les revues de ROBINSON 1974 (40), SPIK 1977 (41), SCHRAM ET TAGER 1981 (42))

Le terme "izozymes" fut introduit par MARKERT et MÖLLER en 1959 (43) pour décrire des familles enzymatiques ayant même propriétés catalytiques mais se distinguant par des propriétés physiques telles :

- le pH optimum
- le point isoelectrique (pHi)
- la mobilité électrophorétique
- la stabilité à la chaleur ou aux agents dénaturants
- leurs paramètres cinétiques

La notion de formes enzymatiques multiples est maintenant bien établie.

Une hétérogénéité est d'abord rencontrée au niveau de la distribution subcellulaire des glycosidases. Si la majorité de ces enzymes ont une localisation lysosomale, d'autres formes isoenzymatiques sont généralement présentes dans les différents compartiments cellulaires. Ainsi, la sialidase est également présente au niveau des membranes plasmiques, de l'appareil de Golgi, ou du cytosol (CORFIELD et al. 1981 (55), ZIEGLER et BACH 1981 (56)). L'utilisation de substrats artificiels pour la mesure des activités glycosidasiques a elle aussi conduit de façon indirecte, à la découverte de formes enzymatiques multiples. On admet maintenant que les hydrolases acides sont spécifiques d'un type de liaison plutôt que d'un substrat déterminé. Un exemple significatif est celui des α -mannosidases ; si les mannosidases lysosomales sont capables d'hydrolyser préférentiellement les liaisons α -1,6 et α -1,3 rencontrées dans les chaînes glycaniques des N-glycoprotéines (OPHEIM et TOUSTER 1978 (57)), les mannosidases microsomales sont quant à elles plutôt spécifiques des liaisons α -1,2 du mannose dans les chaînes glycaniques en cours de maturation (TULSIANI et al. 1982a (58)).

1 - ORIGINE DES ISOENZYMES

La présence de formes isoenzymatiques peut être déterminée par deux types d'évènements :

- génétiques
- modifications post-traductionnelles.

a - Variations génétiquement déterminées : Comme toutes les protéines, les enzymes lysosomaux présentent généralement un polymorphisme important au sein d'une population liée à des variations alléliques. Ces variations donnent naissance à des chaînes peptidiques

différentes, ces différences pouvant être facilement détectées par électrophorèse (SWALLOW et al. 1974 (59)). Une autre cause de variation génétiquement déterminée est l'association multimérique. Un certain nombre d'enzymes sont constitués de sous-unités, la combinaison différente de ces sous-unités aboutissant à la naissance de variants enzymatiques. Un des exemples les mieux étudiés est celui des hexosaminidases (LOWDEN et al. 1981 (60)). Chez l'Homme, les hexosaminidases sont constituées à partir de trois chaînes polypeptidiques différentes α , β_a et β_b d'un poids moléculaire de 50 000 et 25 000 respectivement. Ces chaînes sont codées par deux gènes structuraux différents, portés par le chromosome 15 pour la chaîne α et le chromosome 5 pour les chaînes β . La combinaison de ces trois types de chaînes donne naissance à différentes isoenzymes, 3 formes lysosomales A, B et S ; une forme microsomale C et 3 formes sériques P, I₁ et I₂. C'est ainsi que l'hexosaminidase A est un hétéropolymère ($\alpha \beta_a \beta_b$), l'hexosaminidase B étant un homopolymère $(\beta_a \beta_b)_2$ (MAHURAN et al. 1982 (61)).

b - Modifications post-traductionnelles : Des variations enzymatiques résultant de différences physiques détectables au sein d'une famille isoenzymatique, peuvent provenir de modification de la protéine une fois synthétisée.

- aggrégation : la β -galactosidase acide humaine présente trois formes isoenzymatiques A₁, A₂ et A₃, qui sont en fait des formes monomériques, dimériques et décameriques du même enzyme (HEYWORTH et al. 1981 (62)). Ce phénomène d'aggrégation est dépendant du pH et de la force ionique et semble réguler l'activité enzymatique.

- glycosylation : comme nous le verrons plus loin, la glycosylation joue un rôle primordial quant à la localisation subcellulaire des hydrolases. En outre, les enzymes lysosomaux diffèrent généralement par leur degré de sialylation (GOLDSTONE et KOENIG 1973 (63)) entraînant des mobilités électrophorétiques différentes. La sialylation semble être déterminée par des gènes spécifiques.

TABLEAU I : COMPOSITION OLIGOSACCHARIDIQUE DE QUELQUES HYDROLASES ACIDES LYSOSOMALES

| ENZYME | SUCRES (mg/100 mg protéine) | | | | | | REFERENCES | |
|--------------------|-----------------------------|------|------|------|--------|-------|------------|-----------------------------------|
| | Fuc | Gal | Glc | Man | GlcNAc | NeuAc | | |
| β-Glucuronidase | foie souris | - | 0,23 | 0,44 | 4,52 | 2,10 | - | Tomino <u>et al.</u> 1975 (44) |
| | foie rat | 0,30 | 0,20 | 0,42 | 2,94 | 2,07 | - | Tulsiani <u>et al.</u> 1978 (45) |
| | glande prépatiale de rat | 0,21 | 0,17 | 0,17 | 2,82 | 1,92 | - | Tulsiani <u>et al.</u> 1975 (46) |
| α-L-fucosidase | foie rat | 0,35 | 0,80 | 0,90 | 3,20 | 3,20 | 0,80 | Opheim et Touster 1977 (47) |
| | foie humain | 0,56 | 0,30 | 0,58 | 3,00 | 1,87 | 0,55 | Alhadef et Freeze 1977 (48) |
| β-hexosaminidase A | Placenta humain | - | 0,52 | 1,11 | 2,17 | 1,96 | 0,18 | Freeze <u>et al.</u> 1979 (49) |
| | foie humain | - | 0,47 | - | 3,85 | 1,37 | 0,45 | Joziassse <u>et al.</u> 1981 (50) |
| | cerveau boeuf | - | 1,24 | - | 2,70 | 2,06 | 0,18 | Overdijk <u>et al.</u> 1982 (51) |
| β-hexosaminidase B | Placenta humain | - | 0,35 | 0,32 | 2,37 | 1,36 | 0,09 | Freeze <u>et al.</u> 1979 (52) |
| | foie humain | - | 0,61 | - | 3,96 | 1,43 | 0,70 | Joziassse <u>et al.</u> 1981 (53) |
| | cerveau boeuf | - | 0,82 | - | 1,72 | 1,33 | 0,18 | Overdijk <u>et al.</u> 1982 (54) |

- association avec d'autres molécules : l'association des hydrolases acides avec de petites molécules peut entraîner des modifications de conformation ou de charge et une affinité différente pour le substrat (HOPKINSON et HARRIS 1971 (64)). Une association avec d'autres protéines comme les activateurs de glycolipides (LI et LI 1981 (65)) ou avec certains polysaccharides (KINT 1973 (66)) peut également avoir lieu.

II - BIOSYNTÈSE ET TRANSPORT INTRACELLULAIRE DES HYDROLASES ACIDES

Quelles sont les voies de transport des enzymes, vers le lysosome ? Cette question a été posée à la suite aux observations du groupe de NEUFELD (NEUFELD et CANTZ 1971 (67)), montrant que les déficits enzymatiques des cellules pathologiques pouvaient être corrigés par adjonction dans le milieu de culture, d'enzyme provenant de cellules normales, ou par co-culture avec ces mêmes cellules. La sélectivité et la saturabilité du phénomène de "sécrétion-recapture" ainsi décrit et schématisé sur la figure 4, suggérait un mécanisme d'absorption par pinocytose.

Depuis ce travail de pionnier des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de l'histoire naturelle des enzymes lysosomaux mettant l'accent sur le rôle essentiel joué par les chaînes glycaniques de ces glycoprotéines particulières, dans la détermination de leur destination subcellulaire.

A - LE SYSTEME DE RECONNAISSANCE PHOSPHOMANNOSYL DES ENZYMES LYSOSOMAX

1 - LE SIGNAL A MANNOSE-6-PHOSPHATE (Man 6P)

Des études cinétiques ont montré que la pinocytose des hydrolases acides était un phénomène de transport actif faisant intervenir un récepteur membranaire (LAGUNOFF et al. 1973 (68)), ainsi qu'un signal glucidique porté par l'enzyme (HICKMAN et NEUFELD 1972 (69)). Sur cette base les hydrolases acides peuvent être subdivisées en deux groupes :

- un groupe à reprise rapide (enzymes urinaires)
- un groupe à reprise lente (enzymes hépatiques, sériques...)

Les premières indications concernant la nature du signal de reconnaissance enzymatique vinrent des travaux de KAPLAN et al. 1977 (70) sur la β -glucuronidase plaquettaire (forme à reprise rapide). Ces auteurs montrent en effet que les polymannanes de blé, renfermant des résidus de phosphomannose et en particulier le mannose-6-phosphate (Man-6-P) étaient des inhibiteurs compétitifs de la pinocytose des enzymes. D'autre part, un traitement à la phosphatase alcaline des enzymes à reprise rapide empêche ces enzymes d'être reconnus par la cellule, sans toutefois en modifier les propriétés catalytiques.

Des études réalisées par la suite, sur d'autres systèmes enzymatiques corroborèrent ces premiers résultats (SANDO et NEUFELD 1977 (71), DISTLER et al. 1979 (72), von FIGURA et al. 1979 (73)), supportant la généralité d'un signal de reconnaissance de type phosphomannosyl porté par la chaîne glycanique des enzymes lysosomaux.

Les preuves directes de l'existence d'un tel signal vinrent de l'effort conjugué de plusieurs laboratoires, en particulier NATOWICZ et al. 1979 (74), se basant sur une estimation enzymatique du Man-6-P, montrent

- que l'hydrolyse acide de la β -glucuronidase isolée de rate humaine libère du Man-6-P ;
- que les résidus de Man-6-P sont portés par des chaînes glycaniques sensibles à l'action de l'endo-N-acétylglucosaminidase H, donc de type polymannosidique ;
- et qu'enfin, la proportion en Man-6-P des chaînes glycaniques était directement en relation avec la plus ou moins grande capacité de l'enzyme à être pinocyter.

D'autres auteurs, HASILIK et NEUFELD 1980 (75), BACH et al. 1979 (76), TABAS et KORNFELD 1980 (77), mettent en évidence l'incorporation directe de phosphate dans les précurseurs protéiques des enzymes lysosomaux.

FISHER et al. 1980a (78) suggèrent que plus d'un résidu de Man-6-P par molécule d'enzyme seraient impliqués dans les phénomènes de reconnaissance par le récepteur. Ces faits sont confirmés par MURRAY et NEVILLE 1980 (79), ainsi que par KARSON et al. 1980 (80) qui par l'utilisation de néoglycoprotéines multivalentes montrent que ces dernières présentent des affinités beaucoup plus grandes que le Man-6-P seul pour le récepteur.

VARKI et KORNFELD 1980 (81) confirment ces observations en montrant que plusieurs résidus de Man-6-P peuvent être portés par la même chaîne glycanique, faisant des hydrolases acides des ligands multivalents pouvant interagir avec plusieurs récepteurs de pinocytose. Récemment CREEK et SLY 1982 (82) et FISHER et al. 1982 (83) étudiant la fixation d'oligosaccharides phosphorylés sur un récepteur lysosomal immobilisé et la pinocytose de ces mêmes oligosaccharides par les fibroblastes en culture ont montré que le signal de reconnaissance privilégié était constitué par une chaîne oligosaccharidique de type polymannosidique portant deux résidus de Man-6-P.

2 - ETUDE STRUCTURALE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES ENZYMES LYSOSOMAUX

Comme nous l'avions précédemment mentionné, l'étude structurale des chaînes glycaniques des enzymes avait été limitée par la difficulté d'obtenir ces protéines en quantité appréciable et dans un état de pureté satisfaisant. Les premières informations structurales vinrent conjointement de deux groupes VARKI et KORNFELD 1980 (84) et HASILIK et al. 1980 (85) qui confirmèrent la nature polymannosidique de la chaîne glycanique, et montrèrent en outre que le phosphate était engagé dans des liaisons phosphodiester, le passage au phosphate monoester étant obtenu après hydrolyse acide douce ou action de l' α -N-acétylglucosaminidase confirmant les résultats de TABAS et KORNFELD 1980 (86) qui selon lesquels les enzymes nouvellement synthétisés renfermaient des résidus phosphate engagés dans des liaisons diester entre l' α -N-acétylglucosamine et le mannose. Cinq sites de phosphorylation ont été proposés et sont schématisés sur la figure 4 . NATOWICZ et al. 1982 (87), HOWARD et al. 1982 (88) ont étudié de façon plus détaillée les chaînes glycaniques de la

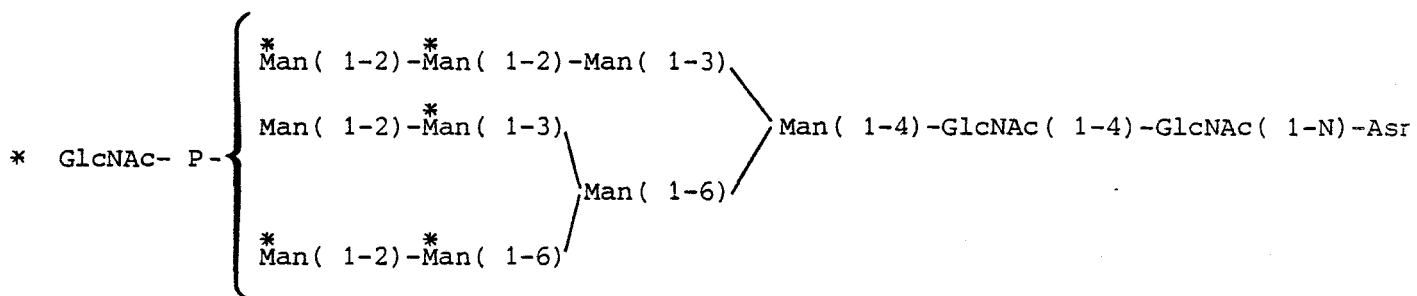


FIGURE 4

Localisation des résidus de phosphate sur les chaînes polymannosidiques des enzymes lysosomiaux d'après VARKI et KORNFELD 1980 (89).

β -glucuronidase humaine mettant en évidence des chaînes différemment phosphorylées, 63 % des glycanes ne possédant qu'un seul phosphate engagé dans une liaison diester. MIZUOCHI et al. 1981 (90), étudiant quant à eux la forme lysosomale de la β -glucuronidase, montrent que la chaîne glycanique est alors limitée à 5 résidus de mannose, ayant subi l'action des α -mannosidases microsomales.

3 - LE RECEPTEUR A MANNOSE-6-PHOSPHATE

a - Propriétés générales : Comme nous l'avons préalablement mentionné l'existence de récepteurs à Man-6-P fut supposée au vue des caractères de sélectivité, saturabilité et d'inhibition par le Man-6-P de la pinocytose des enzymes lysosomales. La fixation directe des enzymes aux fibroblastes fut démontrée par ROME et al. 1979 (91) qui estimèrent à 14 000 le nombre de sites enzymatiques par cellule pour l' α -L-iduronidase.

b - Distribution subcellulaire : Plus de 80 % des récepteurs des fibroblastes sont localisés au niveau des systèmes membranaires intracellulaires (FISCHER et al. 1980b (92)). Cette observation est en accord avec la théorie de SLY et al. 1979 (93) selon laquelle ces récepteurs joueraient un rôle dans la régulation du transport intracellulaire des hydrolases acides nouvellement synthétisées en entraînant une ségrégation de ces enzymes des autres produits de biosynthèse du réticulum endoplasmique et en les dirigeant vers le lysosome. Dans le foie de rat 80 % des récepteurs sont trouvés dans le réticulum endoplasmique, 7 % au niveau de l'appareil de Golgi, 5 % dans les lysosomes et 10 % dans la membrane plasmique. Les récepteurs sont localisés sur la face interne de vésicules dérivant du réticulum endoplasmique, ou sur la face externe des membranes plasmiques.

c - Recyclage des récepteurs : Des calculs basés sur le taux maximum d'enzymes fixés et le taux maximum d'internalisation montrent que les récepteurs de surface doivent être remplacés ou réutilisés approximativement toutes les cinq minutes. Ces résultats sont incompatibles avec une synthèse *de novo* des récepteurs, mais

plutôt avec une réutilisation constante de l'ensemble des récepteurs intracellulaires. Le phénomène de recyclage des récepteurs s'est vu confirmé par des études utilisant la chloroquine ou des sels d'ammonium quaternaire. Ces amines dites "lysomotropiques" ont pour effet d'inhiber la pinocytose des enzymes, et d'accroître leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (TIETZE et al. 1980 (94)). Ce phénomène pourrait s'expliquer (TIETZE et al. 1982 (95) ; GONZALEZ-NORIEGA et al. 1980 (96)) par une hausse du pH intralysosomal, suite à une protonisation des amines au sein du lysosome, cette hausse de pH empêchant la dissociation du complexe enzyme-récepteur, entraîne une saturation des récepteurs par les ligands et une abolition du phénomène de recyclage. Le taux de biosynthèse enzymatique continuant à un taux normal, les enzymes nouvellement synthétisés ne trouvent plus de récepteurs disponibles et sont directement excrétés vers le milieu extracellulaire.

d - Solubilisation et purification des récepteurs : Différents auteurs (SAHAGIAN et al. 1981 (97) ; STEINER et ROME 1982 (98) ; FISHER et al. 1982 (99)) ont isolé le récepteur à mannose-6-phosphate des enzymes lysosomaux par chromatographie d'affinité sur phosphomannose-Sépharose. Ce récepteur peut être assimilé à une protéine précédemment isolée des membranes de cellules épithéliales de rat nommée "ligatine" JAKOI et al. 1976 (100) ; JAKOI et al. 1981 (101).

B - BIOSYNTHESE ET MATURATION DES SIGNAUX DE RECONNAISSANCE PHOSPHOMANNOSYL DES ENZYMES LYSOSOMAux

1 - PHOSPHORYLATION DU MANNOSE

Les études de HASILIK et al. 1981 (102) et de REITMAN et KORNFIELD 1981 (103), montrent que les hydrolases acides sont phosphorylées par transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine 1-P à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine sur l'hydroxyle en position 6 du mannose d'une chaîne oligosaccharidique de type polymannosidique, par l'intermédiaire d'un enzyme particulier l'UDP-N-acétylglucosamine : glycoprotéine-N-acétylglucosamine transférase ; cet enzyme a pu être localisé dans la partie cis de l'appareil de Golgi (POHLMAN et al. 1982 (104)).

Comme il a été dit précédemment le motif α -GlcNAC-1-P-Man ne semble pas être reconnu par les récepteurs enzymatiques. La seconde étape sera donc une hydrolyse de la N-acétylglucosamine par une phosphodiesterase spécifique localisée également au niveau de l'appareil de Golgi (WAHEED et al. 1981 (105) ; VARKI et KORNFELD 1981 (106)). La suite de réactions conduisant à la synthèse du signal Man-6-P est résumée sur la figure 5.

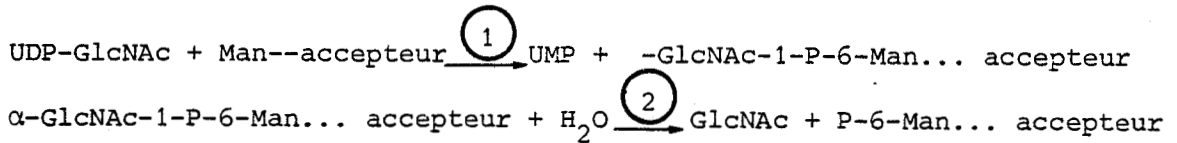
Des études réalisées par ROBBINS et al. 1981 (107) et KRAG et ROBBINS 1982 (108), utilisant des mutants cellulaires dépourvus en α -glucosidase, ont montré que l'action des α -glucosidases spécifiques des résidus d' α -glucose des chaînes oligosaccharidiques nouvellement synthétisées était une étape préalable à l'action de la phosphotransférase.

2 - MATURATION DE LA CHAÎNE PROTÉIQUE

La question se posait de savoir comment était déterminée la phosphorylation des enzymes lysosomaux aboutissant à leur ségrégation à partir de l'ensemble des autres glycoprotéines synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. Une réponse vint des travaux de HÄSILIK et NEUFELD 1980b (109) montrant que les enzymes lysosomaux sont synthétisés sous forme de proenzymes de haut poids moléculaire, la maturation protéique ne s'effectuant qu'une fois les enzymes arrivés au sein du lysosome. Un signal peptidique spécifique pourrait donc déterminer la phosphorylation, d'une manière analogue au phénomène décrit par BLOBEL et DOBBERSTEIN 1975 (110), MEYER 1982 (111), pour la ségrégation entre protéines de sécrétion et protéines membranaires. Un tel signal de reconnaissance a été démontré récemment pour la cathepsine D (ERICKSON et al. 1981 (112)) et pour la β -glucuronidase (ROSENFELD et al. 1982 (113)).

C - ROUTES ALTERNATIVES

Certains enzymes fortement liés aux membranes telles la β -glucocérébrosidase ou la phosphatase acide pourraient intégrer les lysosomes par des voies différentes de celles du Man-6-P. En particulier, le récepteur à Mannose/N-acétylglucosamine des cellules réticuloendothéliales et des macrophages, qui sera décrit dans la suite de notre exposé,



- ①: UDP-N-acétylglucosamine : glycoprotéine N-acétylglucosamine transférase
- ②: -N-acétylglucosamine phosphodiesterase

FIGURE 5

Biosynthèse du signal mannose-6-phosphate des enzymes lysosomaux

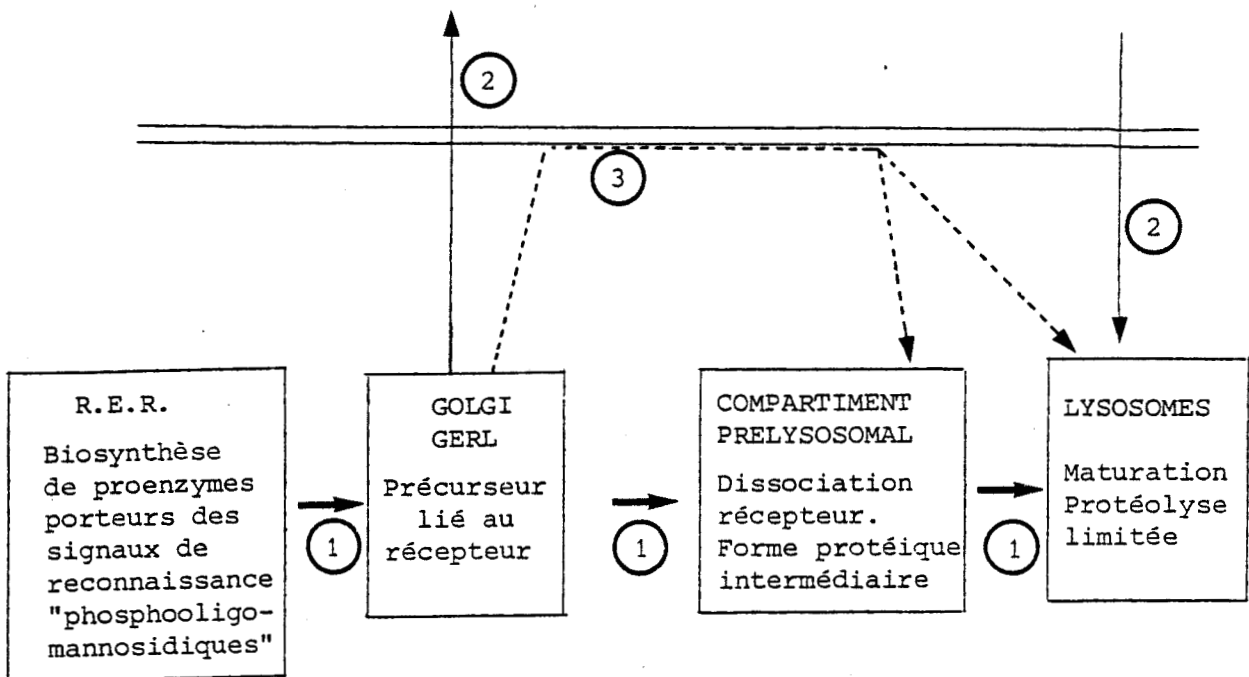


FIGURE 6

Différentes voutes d'intégration des hydrolases acides dans le lysosome

- ① Transfert intracellulaire (SLY)
- ② Sécrétion-Recapture (NEUFELD)
- ③ Transfert via la membrane plasmique (VON FIGURA)

semble être le récepteur responsable de la "reprise" de nombreuses hydrolases acides du plasma (STAHL et SCHLESINGER 1980 (114), ACHORD et al. 1978 (115)). Ce récepteur pourrait jouer un rôle particulier dans la recapture des enzymes libérés, lors de la lyse cellulaire.

D'autres récepteurs semblent déterminer l'orientation des enzymes vers des compartiments cellulaires différents du lysosome. Le cas le plus frappant est celui des β -glucuronidases ; deux formes de l'enzyme sont connues, produites par un même gène structural, si l'une des formes atteint le lysosome via le récepteur à Man-6-P, une seconde forme est transportée vers le micrososome associée à une protéine spécifique l'"égasyne" BROWN et al. 1981 (116). D'autres voies mineures de transport intracellulaire existent également et sont schématisées sur la figure 6.

D - CONCLUSION - CYCLE DE VIE DES ENZYMES LYSOSOMAux

La figure 7 schématise les différentes étapes de biosynthèse et de transfert des enzymes lysosomaux vers le lysosome primaire pouvant se résumer comme suit :

- 1 - transcription de 40 à 50 gènes différents pour les hydrolases acides dans le noyau ;
- 2 - translocation des mRNA sur les polysomes liés ;
- 3 - transfert du motif $(Glc)_3(Man)_9(GlcNAC)_2$ des intermédiaires lipidiques sur les résidus d'asparagine des chaînes polypeptidiques nascentes ;
élimination des*glucoses ;
- 4 - transfert du GlcNAC-1-P à partir d'UDP-GlcNAC sur la position 6 des mannoses ; ou maturation de la chaîne oligosaccharidique et sécrétion ;
- 5 - libération du résidu GlcNAC par une phosphodiesterase spécifique, exposition des groupements Man-6-P ;
- 6 - attachement des enzymes aux récepteurs, assemblage en vésicules (lysosomes primaires). Si l'attachement ne s'effectue pas : sécrétion ;
- 7 - diminution de pH et dissociation des complexes enzymes-récepteurs, suivie d'un recyclage des récepteurs ;
- 8 - Maturation intralysosomale des enzymes
 - . action d'une phosphatase acide entraînant une inactivation des récepteurs
 - . action des protéases entraînant une maturation de la chaîne protéique ;

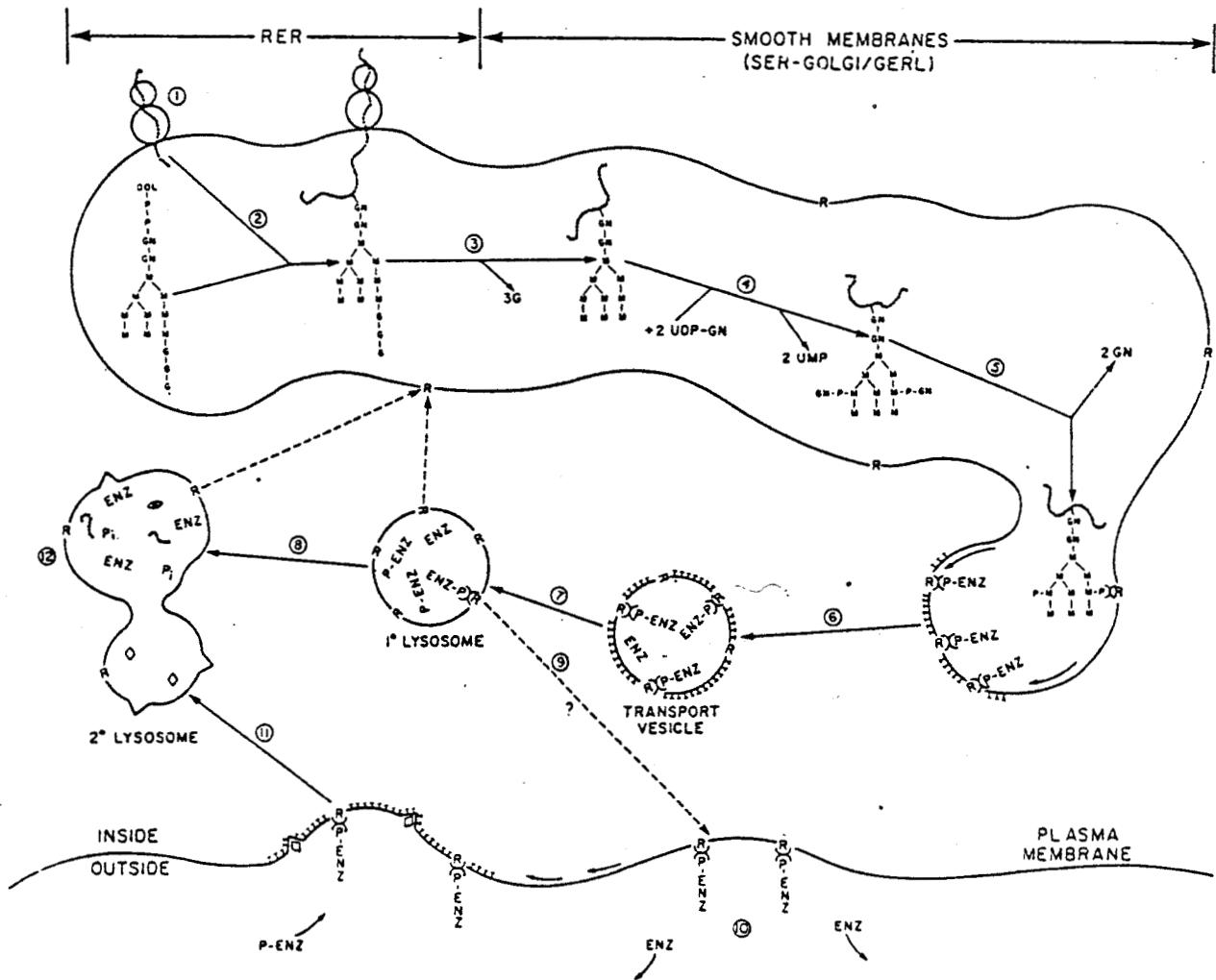


FIGURE 7

Différentes étapes de transfert des hydrolases acides vers le lysosome.
(Les détails sont donnés dans le texte)

M : Mannose

P : Phosphate

G : Glucose

ENZ : Enzyme

GN : N-acétylglucosamine

R : Récepteur phosphomannosyl

Dol : Dolichol

- 9 - Participation des enzymes aux activités dégradatives du lysosome ;
- 10 - Dégradation des enzymes après exposition aux enzymes protéolytiques voisins

III - NATURE DU DÉFICIT ENZYMATIQUE

Les maladies génétiques peuvent être divisées en deux catégories (PARKER et BEARN 1963 (117)) :

- celles pour lesquelles on peut mettre en évidence une modification moléculaire du produit protéique dirigé par le gène (en l'occurrence l'enzyme), attribuables presque certainement à une lésion de structure ;

- celles qui semblent comporter uniquement une modification quantitative de la synthèse enzymatique, pouvant être attribuées à une anomalie d'un gène régulateur (Tableau II).

A - MUTATION D'UN GENE REGULATEUR

La synthèse des enzymes lysosomaux est régulée par trois types de gènes (PAIGEN 1981 (118)) :

- les gènes régulateurs de l'organisme déterminant le taux de synthèse enzymatique dans les différents types cellulaires ;
- les gènes temporels : un programme génétiquement déterminé existe pour chaque enzyme, spécifiant les changements de concentration enzymatique accompagnant la différenciation dans chaque tissu ;
- les gènes de régulation physiologique : augmentant la synthèse enzymatique en réponse à des effecteurs physiologiques tels les hormones.

Une anomalie d'un gène régulateur peut avoir deux conséquences opposées (DREYFUS 1972 (119)) :

- le répresseur n'est pas synthétisé on assiste alors à une "mutation constitutive" avec gain de fonction et synthèse permanente de l'enzyme, le répresseur ne pouvant interagir avec le gène structural ;
- le gène régulateur synthétise de façon permanente le répresseur réagissant avec l'opérateur commandant les gènes de structure, on assiste alors à une "mutation super-répresseur" aboutissant à une perte complète de la synthèse enzymatique.

1) GENE REGULATEUR

2) GENE STRUCTURAL

- absence totale de biosynthèse
- modification de la chaîne peptidique
 - diminution affinité enzyme-substrat
 - sensibilité accrue aux protéases
- déficience d'un seul isoenzyme
- déficience d'un facteur d'activation
- modification post-translationnelles
 - chaîne glycanique
 - récepteurs
- transport des organelles

TABEAU II : NATURE DES MUTATIONS POUVANT CONDUIRE A UN DEFICIT ENZYMATIQUE APPARENT

B - MUTATION D'UN GENE STRUCTURAL

Dans ce cas la nature du déficit peut revêtir un grand nombre de formes qui sont résumées sur le tableau II.

1 - UNE DELETION peut affecter le gène structural qui ne s'exprime absolument plus. L'activité enzymatique sera alors totalement nulle. C'est le cas de l' α -glucosidase dans la forme généralisée de la maladie de Pompe (glyco-génose de type II).

2 - LA MUTATION PEUT ENTRAINER UNE ERREUR DANS LA BIOSYNTHESE DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE DE L'ENZYME. Les molécules d'enzyme modifiées sont néanmoins synthétisées à un taux normal et donnent une réaction croisée avec un antiserum préparé à partir d'enzyme normal. L'activité enzymatique mesurée sera dans ce cas généralement comprise entre 5 et 30 % de l'activité normale. La modification de la chaîne peptidique entraîne généralement une modification de conformation de la protéine pouvant se traduire comme dans la mannosidose par une diminution de l'affinité enzyme-substrat (HULTBERG et MASSON 1977 (120)), ou par une sensibilité accrue de l'enzyme à l'action protéasique, nous citerons ici l'exemple de l' α -glucosidase dans la forme adulte de la maladie de POMPE (STECKEL et al. 1982 (121)).

3 - ABSENCE D'UNE SEULE FORME ENZYMATIQUE. Le cas le mieux étudié est certainement celui des β -hexosaminidases dans les différents variants de la GM₂ gangliosidose, SANDHOFF et CHRISTOMANOU 1979 (122). Comme nous l'avons préalablement mentionné, ces enzymes sont constitués d'un assemblage de deux types de chaînes peptidiques α et β . Différentes mutations affectent ces chaînes, et on peut ainsi distinguer la maladie de TAY-SACHS due à une mutation de la chaîne α , n'affectant que les hexosaminidases A et S, de la maladie de Sandhoff, due à une mutation des chaînes β communes aux hexosaminidases A et B, et se traduisant par une perte de l'activité de ces deux formes isoenzymatiques.

4 - DEFICIENCE D'UN FACTEUR D'ACTIVATION. L'activité vis-à-vis du substrat naturel peut demander la coopération de plusieurs protéines. L'hydrolyse des glycolipides en particulier demande la participation outre des hydrolases

acides, de facteurs dits "d'activation" qui se conjuguant au substrat hydrophobe, favorisent l'interaction enzyme-substrat.

Déficiences du facteur d'activation de l'hydrolase

- des gangliosides GM₂ et GA₂ dans le variant AB de la GM₂ gangliosidose (CONZELMANN et SANDHOFF 1978 (123)) ;
- du cérébroside sulfate dans une forme infantile de la leucodystrophie métachromatique (FISCHER et JATZKEWITZ 1978 (124)) ;
- de la sphingomyéline dans la maladie de Niemann-Pick type C.

D'autres facteurs protéiques sont également impliqués dans la protection et la stabilisation des hydrolases acides face aux attaques protéasiques. Une déficience de tels facteurs pourrait notamment être responsable de la déficience combinée neuraminidase/ β -galactosidase, dans un variant de la sialidose type II (D'AZZO et al. 1982 (125)) ou encore de la mucosulfatidose (WAHEED et al. 1982 (126)).

5 - MUTATIONS AFFECTANT LES MODIFICATIONS POST-TRANSLATIONNELLES DES ENZYMES

LYSOSOMAUX. - Mutation de la chaîne glycanique : comme nous le verrons plus loin, la localisation subcellulaire des enzymes est déterminée par la nature de la chaîne glycanique. Une mutation affectant la synthèse d'un enzyme intervenant dans la glycosylation des chaînes peptidiques des glycohydrolases, peut entraîner une localisation subcellulaire anormale de ces dernières comme dans la Mucopolysaccharidose II ou III (HASILIK et al. 1981 (127), HASILIK et al. 1982 (128)).

- Mutation du récepteur enzymatique : les enzymes transitent du lieu de biosynthèse vers leur destination subcellulaire ancrées à des récepteurs assemblés en vésicules. La déficience en β -glucuronidase microsomale chez la souris Eg^o est due à l'absence d'une protéine, l'égasyne (LUSIS et al. 1976 (129)), nécessaire au transport et à l'ancrage de la β -glucuronidase au niveau des membranes lysosomales (LUSIS et PAIGEN 1977 (130)).

6 - MUTATIONS AFFECTANT LE TRANSPORT DES ORGANELLES. Les organites cellulaires sont animés d'un mouvement propre nécessaire aux relations intracellulaires. Une série de mutations affecte le transport des lysosomes (SWANK et al. 1978 (131)). Le syndrome de CHEDIAK-HIGASHI serait en particulier dû à une anomalie touchant la sécrétion des enzymes lysosomaux par les cellules épithéliales du rein vers l'urine, suite à une mutation affectant le transport des lysosomes au travers de la bordure en brosse de ces cellules (BRANDT et al. 1975 (132)).

7 - DEFICIENCES EN TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES. Dans certaines maladies lysosomales telle la cystinurie (GAHL et al. 1983 (133)) ou la maladie de Salla (RENLUND et al. 1979 (134)) l'engorgement du lysosome semble être dû à l'absence de transporteurs membranaires spécifiques, nécessaires au passage de certaines molécules provenant du catabolisme cellulaire (telles l'acide sialique ou la cystine) au travers de la membrane lysosomale.

MALADIES HEREDITAIRES DE SURCHARGE LYSOSOMALE DES GLYCOCONJUGUES

I - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

En 1919 Gertrud HURLER (135) décrit en détail deux patients présentant un syndrome caractérisé par une dysmorphie faciale prononcée, des anomalies squelettiques multiples, des opacités cornéennes, une hépatosplénomégalie ainsi que des lésions cardiaques. Cette description devint le prototype d'un grand nombre de syndromes qui furent regroupés par ELLIS et al. (136) sous l'éponyme de "gargoylisme" en raison de la similitude du faciès des patients avec certaines gargouilles des cathédrales médiévales. Ce n'est qu'en 1952 qu'après identification de la nature chimique du matériel accumulé dans le foie de certains patients que BRANTE (137) proposa le terme de "mucopolysaccharidoses". La classification actuellement retenue (Tableau III) est inspirée de celle de Mc KUSICK et al. 1965 (138) basée sur la nature chimique des mucopolysaccharides excrétés dans l'urine, HOOGHWINKEL G.J.M. 1982 (139). A l'exception de la maladie de HUNTER qui est liée au chromosome X, toutes les mucopolysaccharidoses sont transmissibles suivant un mode autosomal récessif.

A - CARACTERISTIQUES GENERALES DU CATABOLISME DES MUCO- POLYSACCHARIDES

Mise à part la maladie de MORQUIO (PEDRINI et al. 1962 (140) toutes les mucopolysaccharidoses sont essentiellement dues à un dysfonctionnement du catabolisme lysosomal de deux hétéropolymères, le dermatane et l'héparane sulfaté (DORFMAN et MATALON 1976 (141)). Ces polymères d'environ 100 résidus de sucre sont composés de motifs alternés d'hexosamine sulfaté (glucosamine ou galactosamine) et d'acide uronique (glucuronique ou L-iduronique). A l'exception du keratane sulfaté, la liaison sucre-protéine est du type O-glycosidique entre le trisaccharide réducteur terminal Gal → Gal → Xyl et la sérine de la chaîne protéique

TABLEAU III : CLASSIFICATION DES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

| MALADIE | | ENZYME DEFICIENT |
|--|---------------------------------|--|
| <u>ACCUMULATION DERMATANE + HEPARANE SULFATE</u> | | |
| | Hurler (MPS IH) | |
| Hurler Syndrome | Scheie (MPS IS) | α -L-iduronidase |
| | Hurler/Scheie (MPS H/S) | |
| | Forme grave | |
| Hunter Syndrome (MPS II) | | L-iduronate-2sulfate sulfatase |
| | Forme atténuée | |
| Maladie de SLY (MPS VII) | | β -glucuronidase |
| Mucosulfatidose | | Sulfatases multiples (iduronide, GalNAc-6-SO ₄ , GlcNAc-6-SO ₄ sulfatases) |
| <u>ACCUMULATION HEPARANE SULFATE</u> | | |
| | Type A | Heparan-N-sulfamidase (Sulfamatas) |
| Sanfilippo Syndrome (MPS III) | Type B | α -N-acétyl-D-glucosaminidase |
| | Type C | Acétyl-CoA : α -glucosaminide N- acétyltransférerase |
| | Type D | N-acétylglucosamine-6 sulfate sulfatase |
| <u>ACCUMULATION DERMATANE SULFATE</u> | | |
| Maroteaux-Lamy Syndrome (MPS VI) | (Formes graves et atténuées) | Arylsulfatase B (N-acétylgalactosamine-4-sulfatas) |
| <u>ACCUMULATION KERATANE SULFATE</u> | | |
| | Type A | N-acétylgalactosamine-6-sulfatase |
| Morquio Syndrome (MPS IV) | | |
| | Type B | β -galactosidase |
| <u>ACCUMULATION KERATANE/HEPARANE SULFATE</u> | | |
| Syndrome de Matalon (MPS VIII) | | N-acétyl-glucosamine-6-sulfate sulfatase |

TABLEAU IV : COMPOSITION DES PRINCIPAUX PROTEOGLYCANES

| | Usual molecular weight of polysaccharide chain | Component sugars | Location of sulfate | Linkage | Major Source |
|---|--|--|---------------------|--|--|
| Hyaluronic acid | 1 - 3 x 10 ⁶ | <i>N</i> -acetylglucosamine glucuronic acid | - | β -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 3) | synovial fluid, vitreous humor of the eye, umbilical cord, cock's comb |
| Chondroitin 4-sulfate (chondroitin sulfate A) | 2 - 5 x 10 ⁴ | <i>N</i> -acetylgalactosamine glucuronic acid | 4 | β -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 3) | human cartilage, aorta |
| Chondroitin 6-sulfate (chondroitin sulfate C) | 2 - 5 x 10 ⁴ | <i>N</i> -acetylgalactosamine glucuronic acid | 6 | β -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 3) | heart valves |
| Dermatan sulfate (chondroitin sulfate B) | 2 - 5 x 10 ⁴ | <i>N</i> -acetylgalactosamine iduronic acid glucuronic acid | 4 | β -(1 \rightarrow 4) α -(1 \rightarrow 3) β -(1 \rightarrow 3) | skin, blood vessels, heart valves |
| Heparin | 1 - 3 x 10 ⁴ | glucosamine glucuronic acid iduronic acid | 3,6,N 2 | α -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 4) α -(1 \rightarrow 4) | lung, mast cells |
| Heparan sulfate (heparitin sulfate) | 2 - 10 x 10 ³ | glucosamine <i>N</i> -acetylglucosamine glucuronic acid iduronic acid | N ? 3,6 2 | α -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 4) α -(1 \rightarrow 4) | blood vessels, cell surfaces |
| Keratan sulfate | 5 - 20 x 10 ³ | <i>N</i> -acetylglucosamine galactose | 6 6 | β -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 4) | cornea of the eye, nucleus pulposus, cartilage |

(HARDINGHAM 1981 (142)), d'où le terme de "protéoglycane" actuellement employé pour désigner ces composés (BALAZS 1970 (143)). Le tableau IV donne la composition des principaux glycosaminoglycannes d'origine humaine . La dégradation intracellulaire des protéoglycannes s'effectue au sein des lysosomes (ROME et CRAIN 1981 (144)). La plupart des enzymes de dégradation intervenant dans le catabolisme des glycosaminoglycannes sont d'ailleurs d'origine lysosomale à l'exception toutefois de l'acetyl-coA : α -glucosaminide-N-acétyltransférase qui a une double localisation lysosomale et microsomale (POHLMAN et al. 1981 (145)). La voie catabolique principale s'effectue par l'action séquentielle d'exoenzymes, glycosidases et sulfatases (VON FIGURA 1981 (146)). Ces dernières possèdent d'ailleurs un haut degré de spécificité (FLUHARTY 1981 (147)) et il est généralement admis que les exoglycosidases sont enzymatiquement inactives si le sucre terminal est porteur d'un groupement sulfate, bien que récemment KRESSE et al. (148) aient mis en évidence une libération de la N-acétylglucosamine-6-sulfate par l'hexosaminidase A.

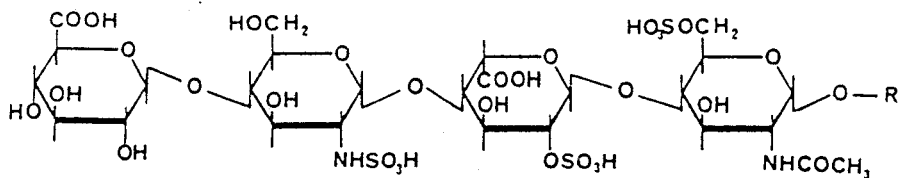
En addition aux exoenzymes, des endoenzymes sont également impliqués dans la dégradation des glycosaminoglycannes. Une activité endoglycosidasique a été mise en évidence dans le lysosome de rat (HÖÖK et al. 1975 (149)), puis dans différents tissus humains ainsi que dans les plaquettes et le placenta (KLEIN et VON FIGURA 1979 (150)). L'analyse des extrémités terminales réductrices des fragments libérés par les endoglycosidases montre qu'il s'agit essentiellement d'endoglucosaminidases et d'endoglucuronidases (KLEIN et al. 1976 (151), KLEIN et VON FIGURA 1976 (152)). Le rôle physiologique des endoglycosidases peut résider en une activation du catabolisme des polysaccharides en augmentant la quantité de substrat disponible pour les exoglycosidases. Dans des conditions normales le catabolisme aboutit à la formation de sulfate qui est excrété, ainsi que d'hexosamine et d'acide uronique qui sont respectivement recyclés dans la voie glycolytique ou dans celle dérivée des hexoses phosphate.

La Figure 8 schématise les différentes étapes du catabolisme de l'héparane sulfate avec les maladies qui lui sont associées. Le catabolisme anormal de ces hétéropolymères dans les différentes mucopolysaccharidoses, aboutit à une accumulation intralysosomale de fragments osidiques plus ou moins importants, et à une excrétion de ces mêmes composés dans l'urine COHAN et al. 1977 (153). La recherche de mucopolysaccharides urinaires représente la voie diagnostique la plus utilisée LORINCZ et al. 1982 (154), toutefois en raison de la complexité des voies cataboliques la discrimination entre les différentes maladies ne peut s'effectuer que par l'emploi de substrats naturels pour les différentes glycosidases (voir la revue de DI NATALE 1982 (155)).

B - NOTION DE FACTEUR CORRECTIF

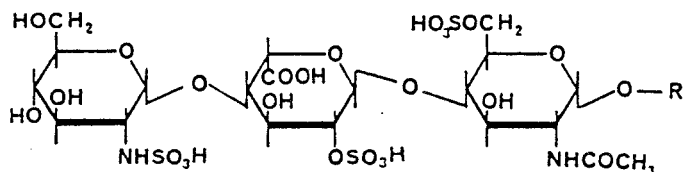
L'identification des déficiences enzymatiques responsables des mucopolysaccharidoses s'est faite par une voie détournée en raison de l'ignorance de la structure primaire de l'héparane et du dermatane sulfate à l'époque où les études ont été effectuées. Des études utilisant le $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ comme précurseur FRARANTONI et al. 1968 (156) avaient permis de mettre en évidence une accumulation de mucopolysaccharides dans les fibroblastes en culture des malades. Cette accumulation anormale pouvait être réduite ou "corrigée" en ajoutant au milieu de culture, des sécrétions de cellules normales ou encore des concentrés urinaires NEUFELD et CANTZ 1971 (157). Ces composés entraînant une action normalisatrice du catabolisme des mucopolysaccharides furent dénommés "facteurs correctifs". Par la suite beaucoup d'entre eux furent purifiés de l'urine et identifiés comme étant les enzymes déficients spécifiques des différentes maladies NEUFELD et al. 1975 (158). C'est ainsi que le facteur correctif pour la maladie de HURLER et de SCHEIE fut identifié comme étant l' α -L-iduronidase BACH et al. 1972 (159), l'iduronate sulfatase étant quant à elle le facteur correctif de la maladie de HUNTER (BACH et al. 1972b (160)).

En fait, un examen attentif des systèmes de correction montre qu'il n'y a pas toujours identité entre enzyme et facteur de correction, SHAPIRO et al. 1976 (161). En effet, comme nous l'avons préalablement mentionné chaque enzyme existe sous différentes formes,



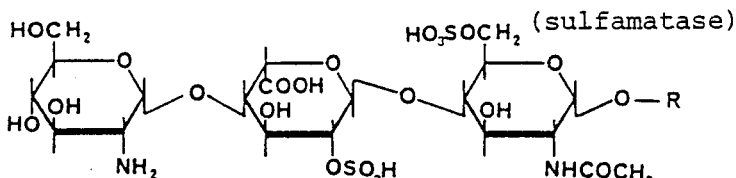
β -glucuronidase

MPS VII



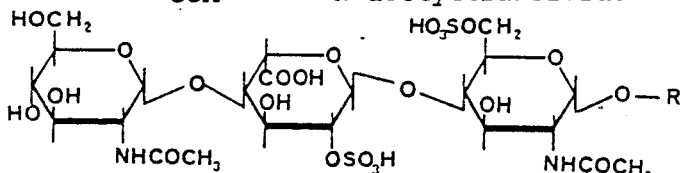
2-deoxyglucoside
2 sulfamate sulfatase

SANFILIPPO A



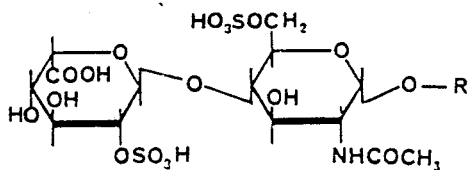
Acetyl CoA
CoA
AcCoA α -glucosaminide
N-acetyltransférase

SANFILIPPO C



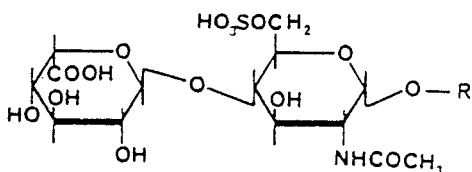
α -N-acétylglucosaminidase

SANFILIPPO B



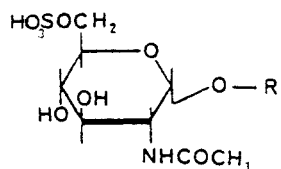
iduronide-2-sulfate sulfatase

HUNTER



α -L-iduronidase

HURLER



N-acétyl-glucosamine
6-sulfate-sulfatase

SANFILLPPO D

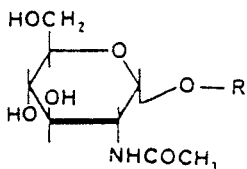


FIGURE 8

Catabolisme pathologique de dermatan sulfate

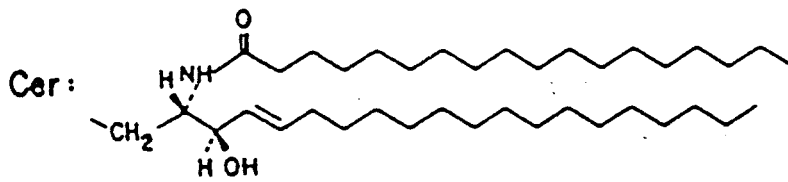
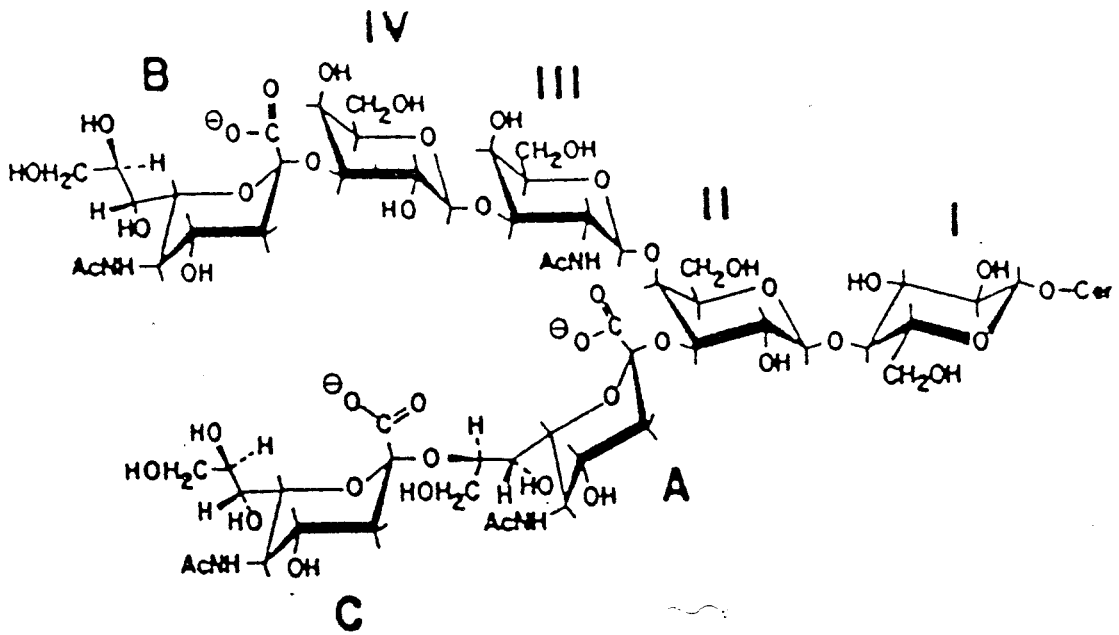
une forme de reprise lente et une forme de reprise rapide NEUFELD et al. 1977 (162) et seule cette dernière qui arbore le signal Man-6-P est reprise spécifiquement par la cellule et internalisée dans le lysosome, par les processus préalablement décrits au chapitre II.

II - LES GLYCOSPHINGOLIPIDOSES

A - CATABOLISME GENERAL DES GLYCOLIPIDES

1 - ROLE ET DISTRIBUTION

Les glycosphingolipides sont des constituants membranaires des cellules animales HAKOMORI 1981 (163), KANNAGI et al. 1982 (164). Ce sont des composés bipolaires constitués d'une partie lipidique (céramide) à laquelle est attachée une partie oligosaccharidique (Figure 9). En fonction de la nature de cette chaîne glycanique, les glycosphingolipides peuvent être subdivisés en différents groupes dénommés trivialement : ganglio, globo, lacto et muco-glycosylceramides, WIEGANDT 1980 (165). Parmi tous les glycolipides, les gangliosides sont certainement les mieux étudiés. Ces glycolipides acides, caractérisés par la présence d'acide sialique, sont des constituants majeurs du système nerveux central, où ils ont été localisés pour la première fois en 1939 par KLENK (166). Ils se retrouvent principalement au niveau des membranes neuronales et des membranes synaptiques, d'où leur rôle possible dans les phénomènes de transmission nerveuse, LEDEEN 1978 (167), NAGAI et IWAMORI 1980 (168). Cette distribution dans le système nerveux central explique également les troubles neurologiques très graves observés dans la majorité des sphingolipidoses. Dans les tissus extraneuronaux les glycolipides jouent en outre un grand nombre de rôles biologiques, en particulier dans les phénomènes d'interactions cellulaires, de différenciation, d'oncogénèse, ainsi que dans les phénomènes d'interaction avec des facteurs biologiquement actifs, tels les glycoprotéines, les hormones, les toxines et les virus, HAKOMORI 1981 (169), FISHMAN 1982 (170). Il convient également de mentionner leur rôle immunologique primordial en tant qu'antigènes de groupes sanguins (ABH, Le^a, Le^b, Ii, P...) ou antigènes de différenciation, HAKOMORI 1981b (171) et MARCUS et al. 1981 (172).



- G_{M1} : I, II, III, IV, A
- G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B
- G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C
- G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C

FIGURE 9

Structure des principaux gangliosides du cerveau de mammifère

2 - DEGRADATION ENZYMATIQUE

La voie dégradative pour beaucoup de glycosphingolipides n'a été élucidée que ces dernières années, coïncidant avec la découverte des enzymes impliqués dans leur catabolisme. Les hydrolases dégradant les glycosphingolipides du cerveau ont fait en particulier l'objet de nombreux travaux en raison peut être de l'importance quantitative de ces lipides dans cet organe et la variété des troubles neurologiques rattachés à leur métabolisme, DAWSON 1978 (173).

La voie dégradative des gangliosides (Figure 10) a souvent été considérée séparément de celle des glycosphingolipides neutres, mais il est maintenant apparent que les deux catabolismes ont des enzymes en commun et que leurs voies convergent.

Tout semble indiquer que la chaîne oligosaccharidique est dégradée de manière récurrente, avec libération des sucres et enfin du céramide. Ce dernier s'il n'est pas réutilisé, est hydrolysé en acide gras et sphingosine qui peut elle même continuer à être dégradée. Contrairement aux glycoprotéines, aucune endoglycosidase ne semble être impliquée dans la dégradation des chaînes oligosaccharidiques. GATT 1970 (174) a postulé que les enzymes responsables de l'hydrolyse des gangliosides cérébraux étaient réunis en un système multienzymatique similaire à celui impliqué dans leur biosynthèse (ROSEMAN 1970 (175)).

Tous les enzymes du catabolisme des glycosphingolipides présentent un pH optimum acide et beaucoup d'entre eux sont liés aux lysosomes. Cependant des enzymes des membranes plasmiques telle la neuraminidase (SANDHOFF et PALLMANN 1978 (176)) ou microsomales (SCHELL et al. 1982 (177)) interviennent également dans la dégradation de ces substances.

La plupart des enzymes responsables du catabolisme des glycosphingolipides entrent également dans le catabolisme d'autres molécules complexes, toutefois, il existe des formes isoenzymatiques particulières dont l'activité se limite à l'hydrolyse des glycolipides, telles la

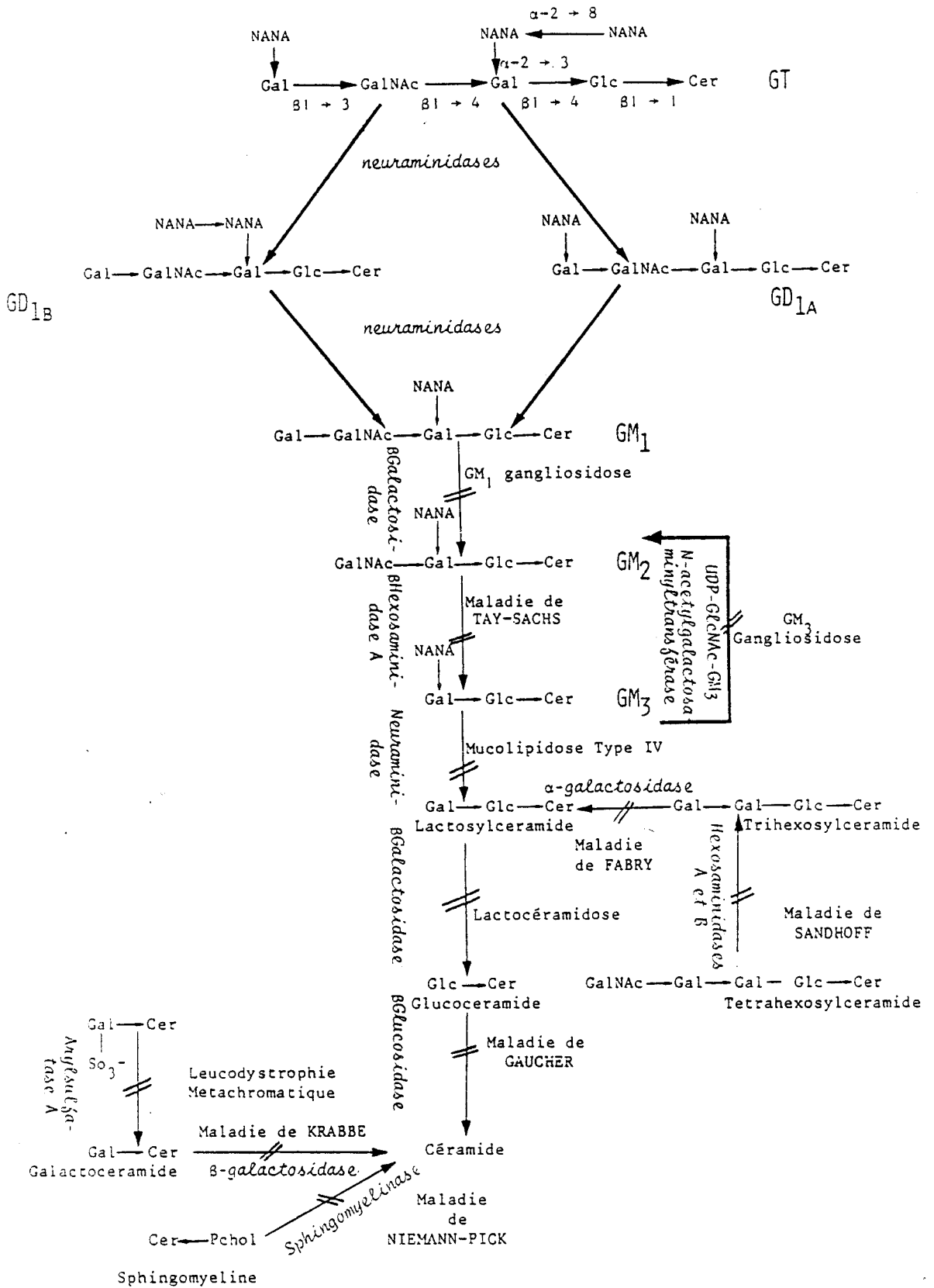


FIGURE 10

Catabolisme normal et pathologique des gangliosides

β -galactocérébrosidase déficiente dans la maladie de KRABBE ou la β -glucocérébrosidase déficiente dans la maladie de Gaucher.

Les gangliosides sont de tous les glycosphingolipides ceux qui présentent le "turnover" le plus rapide, leur demi-vie étant d'environ 10 jours.

3 - PROTEINES ACTIVATRICES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GLYCOLIPIDES

En solution aqueuse les glycolipides forment de gros agrégats appelés micelles, SANDHOFF 1980 (178), qui rendent ces substances moins accessibles aux hydrolases acides hydrophiles. C'est pourquoi l'hydrolyse enzymatique des glycolipides in vitro est fortement augmentée en présence de détergents tels les sels de cholate.

In vivo, les lipides sont incorporés dans les membranes où ils sont également difficilement accessibles. Dans ce cas l'activation peut être effectuée par l'intermédiaire de protéines non enzymatiques. C'est ainsi que des facteurs d'activation ont été décrits pour un bon nombre d'hydrolases. LI et LI 1976 (179) ont décrit un facteur d'activation de l'hydrolyse du GM₁ ganglioside par la β -galactosidase ; CONZELMANN et SANDHOFF 1979 (180) décrivent un facteur différent pour l'hydrolyse du GM₂ ganglioside par l'hexosaminidase. Le fait que l'hydrolyse des substrats hydrosolubles tels les méthylumbelliferyl sucres, n'est pas augmentée en présence d'activateurs, laisse suggérer que l'activateur n'interagit pas avec l'enzyme, mais plutôt avec le substrat, entraînant sa solubilisation, d'une manière analogue au processus décrit pour les sulfatides par FISCHER et JATZKEWITZ 1978 (181). Le vrai substrat pour l'enzyme est donc en fait le complexe protéine activatrice-glycolipide, chaque type de glycolipide possédant un activateur protéique différent.

B - SURCHARGES EN GLYCOLIPIDES

Le tableau V donne une classification des différentes lipidoses basée sur la nature chimique du matériel accumulé. L'analyse des caractères cliniques permet de diviser ces maladies en différentes formes qui du point de vue biochimique peuvent s'expliquer :

TABLEAU V : CLASSIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDOSES

| MALADIE | FORMES | DEFICIT | SUBSTANCES ACCUMULEES |
|---|---------------------------|--|---|
| GM ₁ GANGLIOSIDOSE | Type I infantile | β-galactosidase | GM ₁ ganglioside oligosaccharides |
| | Type II juvénile | | |
| GM ₂ GANGLIOSIDOSE | TAY-SACHS | hexosaminidase A | GM ₂ ganglioside |
| | SANDHOFF | hexosaminidase A et B | GM ₂ + oligosaccharides |
| | Variant AB | facteur activation GM ₂ | GM ₂ ganglioside |
| GM ₃ GANGLIOSIDOSE | - | UDP-GalNac-GM ₃ -N-acetyl-galactosyltransférase | GM ₃ ganglioside |
| MUCOLIPIDOSE IV | - | neuraminidase | GM ₃ , GD ₃ , GD _a , GD _b |
| LEUCODYSTROPHIE METACHROMATIQUE (SULFATIDOSE) | Infantile juvénile adulte | arylsulfatase A | sulfatides |
| | type C | activateur cérébroside sulfate sulfatase | sulfatides |
| KRABBE | - | galactocérébrosidase | galactocérébroside |
| FABRY | - | α-galactosidase A | céramide trihexoside |
| GAUCHER | type I non neurologique | β-glucocerebrosidase | glucocérébroside |
| | type II } neurologiques | | + |
| | type III } | | glycopeptides |
| NIEMANN-PICK | A neuropathique | sphingomyelinase | sphingomyeline |
| | B non neuropathique | sphingomyelinase | |
| | C | facteur d'activation | |
| | D Nova Scotia | ? | |
| FARBER | - | céramidase | céramide |
| <u>AUTRES LIPIDOSES</u> | | | |
| WOLMAN | | lipase acide | triglycérides |
| BATTEN (lipofuscinose) | | polyprenol esterase ? | dolichols |

- par des mutations alléliques d'un même gène conduisant à des "composés génétiques" comme dans le cas des mucopolysaccharidoses ;
- par des déficiences isoenzymatiques différentes comme pour les β -galactosidases, RITTMANN et O'BRIEN 1981 (182), ou les hexosaminidases, SANDHOFF et CHRISTOMANOU 1978 (183) ;
- par la déficience de protéines activatrices comme c'est le cas pour la GM₂ gangliosidose variant AB, CONZELMANN et SANDHOFF 1978 (184) ;
- ou enfin par des modifications post-translotionnelles des enzymes comme c'est le cas pour la β -glucocérébrosidase dans la maladie de GAUCHER (GINNS et al. 1982 (185)).

Il est également à noter que contrairement aux autres glycosphingolipidoses, la GM₃ gangliosidose semble être due à un déficit en enzyme biosynthétique la GM₃-N-acétylgalactosamine transférase (FISHMAN et al. 1975 (186)). Tout comme la maladie de FABRY, cette maladie est liée au sexe (chromosome X).

III - LES GLYCOGÉNOSES

Le glycogène est un polysaccharide composé entièrement de résidus de glucose assemblés par des liaisons α 1,4 et α 1,6. Ces deux types de liaisons donnent à la molécule une structure ramifiée, les liaisons α 1,6 assurant les points de branchement (MEYER et BERNFELD 1940 (187) ; HUIJING 1975 (188)).

Parmi les 8 types de glycogénoses décrites à ce jour (Tableau VI) seule la glycogénose de type II ou maladie de POMPE, est due à la déficience d'un enzyme lysosomal, l' α -glucosidase acide (HERS 1963 (189)). Cet enzyme est capable d'hydrolyser les liaisons α 1,4 du glucose mais aussi à un taux plus faible les liaisons α 1,6 aboutissant à une dégradation complète du glycogène (JEFFREY et al. 1970 (190)). L'absence de maltase acide dans la glycogénose de type II entraîne une accumulation de glycogène dans la plupart des tissus, en particulier au niveau du foie et des muscles, BAUDHUIN et al. 1964 (191). Une excrétion anormale d'oligosaccharides à glucose a également été décrite par LENNARTSON et al. 1978 (192).

TABLEAU VI : CLASSIFICATION DES GLYCOGENOSES d'après HUIJING 1975 (193)

| CLASSIFICATION | ENZYME DEFICIENT |
|----------------|--|
| type I | glucose-6-phosphate (foie, rein, intestin) |
| type II | α -glucosidase |
| type III | enzyme débranchant (α 1,6 glucosidase) |
| type IV | enzyme branchant |
| type V | phosphorylase musculaire |
| type VI | phosphorylase hépatique |
| type VII | phosphofructokinase |
| type VIII | phosphorylase kinase hépatique |

IV - LES GLYCOPROTÉINOSES

La décennie qui vient de s'écouler à vu apparaître au côté des mucopolysaccharidoses, un nouveau groupe d'affections dont la symptomatologie est assez proche, mais dans lesquelles l'excrétion des mucopolysaccharides urinaires est normale (MAROTEAUX et HUMBEL 1976 (194)). Ces maladies présentent généralement les signes cliniques des mucopolysaccharidoses et des sphingolipidoses, d'où le terme de "mucolipidoses" qui fut proposé par SPRANGER et WIEDEMANN 1970 (195), pour les regrouper. Si le terme de "mucolipidose" s'avérait utile du point de vue concept, il était toutefois erroné en tant que désignation chimique, les mucolipides ne représentant aucune classe de composés chimiques connus. Comme il sera montré dans la suite de notre exposé, la plupart de ces maladies présentent en commun une excrétion urinaire d'oligosaccharides spécifiques provenant du catabolisme incomplet des chaînes glycaniques des glycoprotéines d'où la désignation d'"oligosaccharidoses" proposée par, FARRIAUX 1976 (196) ; MAROTEAUX et HUMBEL 1976 (197) ; LEROY 1982 (198). En fait, plus que l'excrétion d'oligosaccharides, qui est souvent doublée d'une excrétion de glycolipides ou mucopolysaccharides, le caractère commun à toutes ces affections est avant tout un déficit enzymatique touchant la voie catabolique des chaînes glycaniques des glycoprotéines. Nous préférons donc quant à nous définir ces maladies comme "glycoprotéinoses", terme qui fut introduit par STRECKER en 1977 (199).

Afin de mieux comprendre les bases biochimiques de ces maladies nous résumerons dans un premier temps nos connaissances actuelles relatives aux structures primaires des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines, et à leur catabolisme.

A - SCHEMA GENERAL DE STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES

Nous ne ferons ici que résumer à l'aide principalement de tableaux et figures, les principes généraux énonçant les structures des chaînes glycaniques des glycoprotéines, en nous étendant principalement, sur les N-glycosylprotéines, car comme nous le verrons plus loin, les

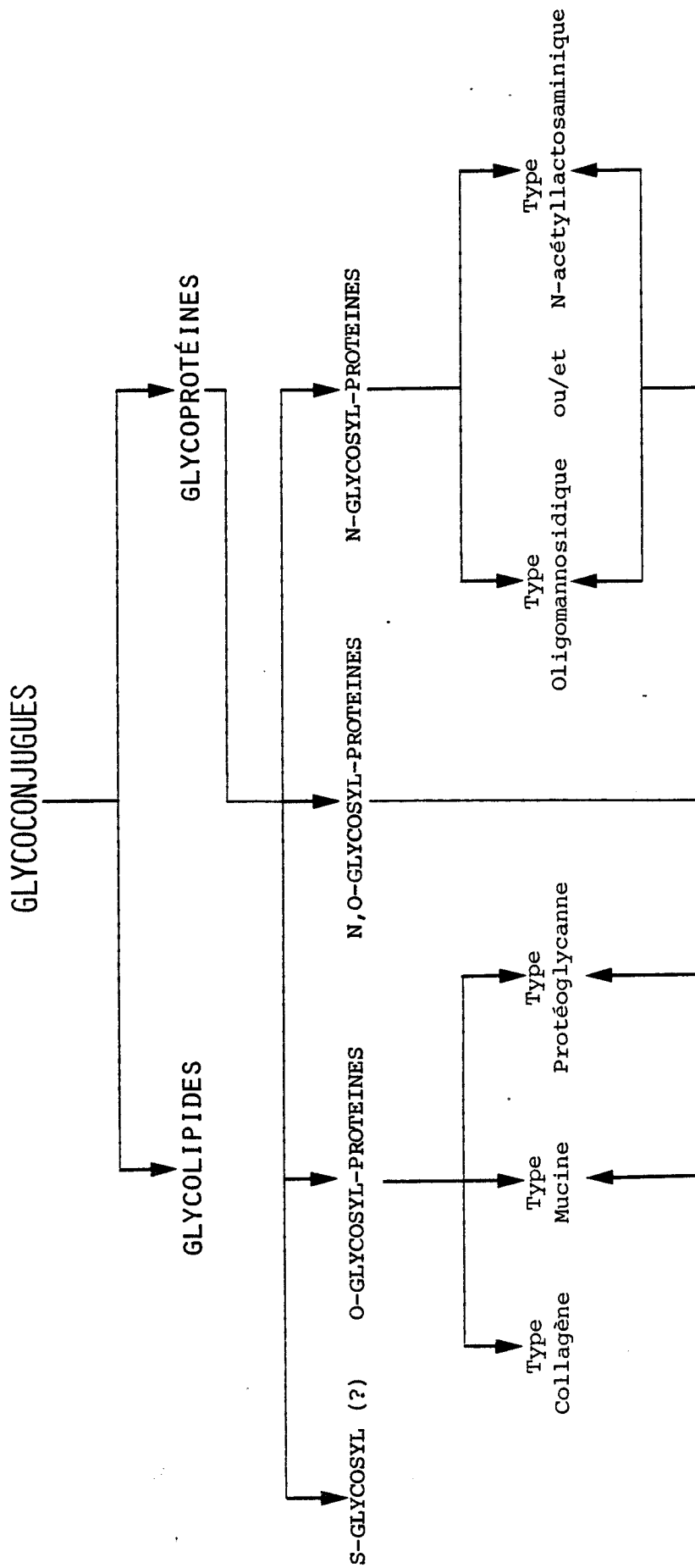


FIGURE 11

Classification des glycoconjugués, d'après STRECKER et MONTREUIL 1979 (200)

glycoprotéinoses s'accompagnent de l'excrétion urinaire de composés riches en mannose, caractère permettant de les rattacher au catabolisme des glycoprotéines à liaison N-acétylglucosamine-asparagine. Plusieurs revues font le point sur les acquisitions récentes concernant ce sujet : KORNFIELD et KORNFIELD 1980 (201), STRECKER et MONTREUIL 1979 (202), MONTREUIL 1980 (203), LENNARZ 1980 (204), BERGER et al. 1982 (205), MONTREUIL 1982 (206).

Les glycoprotéines résultent de l'association covalentielle d'un polysaccharide ou glycane avec une protéine. D'une façon générale les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison glycane-protéine (Figure 11). Les glycannes sont conjugués aux chaînes peptidiques par deux types de liaisons principales :

- les liaisons O-glycosidiques entre un monosaccharide et un résidu de sérine, thréonine ou hydroxylysine conduisant aux O-glycosylprotéines.
- les liaisons N-glycosidiques entre la N-acétylglucosamine et l'asparagine conduisant aux N-glycosylprotéines.

1 - LES O-GLYCOSYLPROTEINES

Deux sous-groupes pourront être distingués en fonction de la nature de l'acide aminé impliqué dans la liaison sucre-protéine :

- liaison du glycane à la sérine ou à la thréonine ;
- liaison du glycane à l'hydroxylysine ou l'hydroxyproline.

a - Liaison glycane à la sérine/thréonine

- Liaison sérine-galactosamine : Ce type de liaison se rencontre principalement dans les mucines de sécrétion des cellules épithéliales, HOROWITZ et PIGMAN 1977 (207) mais aussi dans les substances de groupe sanguin et les glycoprotéines telles la fétuine ou la glycophorine. Le seul élément structural commun des glycannes de type "mucine" est le motif α -GalNAc-Ser qui peut être substitué par différents motifs oligosaccharidiques conduisant à une grande hétérogénéité allant du disaccharide au glycane complexe des substances de groupe sanguin (Tableau VII).

TABLEAU VII : O-GLYCOSYLPROTEINES DE TYPE "MUCINE"

| STRUCTURE | ORIGINE | REFERENCE |
|--|---|--|
| α -GalNAc-Ser α -NeuAc-(2,6) | mucines submaxillaires | GOTTSCHALK 1972 (208) |
| β -Gal-(1,3) \diagdown α -GalNAc-Ser | glycoprotéine "antifreeze" épiglyganine cellules TA ₃ | DE VRIES <u>et al.</u> 1971 (209) CODINGTON <u>et al.</u> 1975 (210) |
| α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1,3) \diagdown α -GalNAc-Ser | IgA lait humain | PIERCE-CRETEL <u>et al.</u> 1981 (211) |
| α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1,3) \diagdown α -GalNAc-Ser α -NeuAc-(2,6) / | fétuine | SPIRO et BHOYROO 1974 (212) |
| β -Gal-(1,3)- β -GlcNAc-(1,3) \diagdown α -GalNAc-Ser | mucine bronchique | VAN HALBEEK <u>et al.</u> 1982 (213) |
| α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1,3) \diagdown α -GalNAc-Ser β -Gal-(1,4)- β -GlcNAc-(1,6) / | K caséine de vache | VAN HALBEEK <u>et al.</u> 1980 (214) |
| (H) α -Fuc-(1,2) (Le ^b) (B, A) α -GalNAc-(1,3) (Le ^a) (B, A) α -GalNAc-(1,3) (H) α -Fuc-(1,2) α -Fuc-(1,3) (SSEA-1) | α -Fuc-(1,4) \diagdown β -Gal-(1,3)- β -GlcNAc-(1,3) \diagdown β -Gal-(1,3)- β -GlcNAc-(1,4) \diagdown β -Gal-(1,4)- β -GlcNAc-(1,6) \diagdown α -Fuc-(1,3) \diagdown β -Gal-(1,3/4)- β -GlcNAc-(1,3)- β -Gal-(1,3) \diagdown β -Gal-(1,4)- β -GlcNAc-(1,6) \diagdown α -GalNAc-Ser | Mégalosaccharide des substances de groupes sanguins d'après KABAT 1978 (215) |

1
58
1

- Liaison xylose-sérine/thréonine : La liaison Xyl $\beta(1 \rightarrow 0)$ -Ser se rencontre dans les protéoglycannes des tissus connectifs tels le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et l'héparine (voir la revue de RODEN 1980 (216)). Nous ne nous étendrons pas sur les données structurales de ces composés dont il a été préalablement fait mention sous le chapitre "mucopolysaccharidoses".

- Autres types de liaison : D'autres monosaccharides peuvent assurer la liaison avec la sérine, il s'agit :

. du mannose, dans les mannoprotéines de la paroi de certaines levures (BALLOU et al. 1980 (217)), dans certaines glycoenzymes la glucoamylase (PAZUR et al. 1980 (218)), ou dans certains protéoglycannes du cerveau de rat (FINNE et al. 1979 (219)) ;

. du galactose, dans certains types de collagène d'invertébrés (MUIR et LEE 1969 (220)) ;

. et enfin du fucose, dans certains tissus du rat (LARRIBA 1978 (221)), ainsi que dans certaines lignées cellulaires normales ou transformées (STEINER et al. 1978 (222)).

b - Liaison glycanne à l'hydroxyllysine ou l'hydroxyproline

La liaison Gal $\beta(1 \rightarrow 0)$ Hyl se rencontre dans les collagènes, ainsi qu'au niveau de la membrane basale glomérulaire BUTLER 1978 (223). Les chaînes oligosaccharidiques sont généralement constituées dans ce cas par le disaccharide α -Glc-(1,2)-Gal.

Des liaisons du type arabinose-hydroxyproline ou galactose-hydroxyproline se rencontrent également chez les plantes supérieures ainsi que chez les algues vertes. Les chaînes oligosaccharidiques sont alors constituées d'unités répétitives β -Ara-(1,2)-Ara se terminant par un résidu d'arabinose en α -(1,3) (ASHFORD et al. 1982 (224)).

2 - LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Comme nous l'avons préalablement mentionné, un seul type de branchement glycanne-protéine entre la N-acétylglucosamine et l'asparagine caractérise cette classe de glycoprotéines.

b - Chaînes oligosaccharidiques de type N-acétyllactosaminique

Les glycanes de type N-acétyllactosaminique résultent de la substitution du noyau inv par un nombre variable de chaînons N-acétyllactosaminiques Gal-(β 1,4)-GlcNAc. En fonction du nombre de résidus de N-acétyllactosamine on obtiendra des structures dites mono-, di-, tri- ou tétra-"antennées" (Figure 12). Une branche supplémentaire peut venir s'ajouter sur le Man 4' conduisant à des structures de type pentaantennés telles qu'elles ont été récemment décrites dans l'ovomucoïde de tourterelle ou de poule (FRANCOIS-GERARD et al. 1980 (231) ; PAZ PARENTE et al. 1982 (232)). Un résidu de GlcNAc dit "intercalaire" peut également venir substituer le Man 3.

Les différentes branches de lactosamine peuvent être elles-mêmes substituées de différentes manières (RAUVALA et FINNE 1979 (233)), conférant aux chaînes N-glycanniques une grande hétérogénéité et des rôles biologiques différentes. Les substitutions les plus fréquemment rencontrées résultent de l'addition de résidus d'acide sialique liés en (α 2,3) ou (α 2,6) au galactose, ou de fucose en liaison (α 1,6) sur la GlcNAc 1 du point d'attache ou en (α 1,3) sur les résidus de GlcNAc périphériques.

Le tableau VIII rassemble quelques exemples de structures de type N-acétyllactosaminique.

c - Chaînes oligosaccharidiques de type mixte

Dans ce type de glycanes, le noyau trimannosyl-N-N'-diacétylchitobiosique est substitué à la fois par des résidus de mannose, sur le mannose 4' et par des résidus de N-acétyllactosamine sur le mannose 4. Dans le plus fort des cas le résidu de GlcNAc intercalaire est également présent (Tableau VIII). Ce type de structures a été caractérisé dans l'ovalbumine de poule, YAMASHITA et al. 1980 (234).

TABLEAU VIII : EXEMPLES DE STRUCTURE N-ACETYLLACTOSAMINIQUES

| STRUCTURES | | | |
|--|---|--|--|
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ | Sérotransferrine humaine | SPIK <i>et al.</i> 1975 (235) |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ | | | |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ $\alpha\text{-Fuc-(1,3)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ $\alpha\text{-Fuc-(1,6)}$ | Lactotransferrine humaine | SPIK <i>et al.</i> 1982 (236) |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ | | | |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ $\alpha\text{-Fuc-(1,6)}$ | IgG sérique humaine | BAENZIGER <i>et</i> KORNFELD 1974 (237) |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,3)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ | | | |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,6)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ | Fétuine | NILSSON <i>et al.</i> 1979 (238) |
| $\alpha\text{-NeuAc-(2,3)-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ | | | |
| $\alpha\text{-Fuc-(1,3)}$ $\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ $\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,6)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ | Asialo- orosomucoïde | FOURNET <i>et al.</i> 1978 (239) |
| $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,6)}$ | | | |
| STRUCTURE PENTAANTENNEE | | | |
| $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,6)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ | Ovomucoïde de Poule | PAZ PARENTE <i>et al.</i> 1982 (240) |
| $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,2)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1,6)}$ | | | |
| STRUCTURE POLY-N-ACETYLLACTOSAMINIQUE | | | |
| $[\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,3)}]_3\text{-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,6)}$ $[\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,3)}]_3\text{-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,3)}$ $[\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,3)}]_3\text{-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ | $\beta\text{-Man-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-Asn}$ $\alpha\text{-Fuc(1,6)}$ | Cellules ovariennes de Hamster chinois | LI <i>et al.</i> 1980 (241) |
| $[\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,3)}]_3\text{-}\beta\text{-Gal-(1,4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1,2)-}\alpha\text{-Man-(1,6)}$ | | | |

B - CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

1 - REPRISE SPECIFIQUE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES

Si le signal de la dégradation des glycoprotéines cellulaires ne sont pas encore connus, le catabolisme des glycoprotéines exocellulaires s'est vu en grande partie élucidé par les travaux de pionniers d'ASHWELL et MORELL 1974 (242). Ces derniers ont en effet démontré que les glycoprotéines circulantes pouvaient être spécifiquement reconnues par des récepteurs des membranes plasmiques de l'hépatocyte pour être ensuite spécifiquement pinocytées par la cellule et être dégradées par la cellule. Ce mécanisme ainsi décrit met en jeu d'une part les chaînes glycaniques des glycoprotéines et d'autre part des "lectines" membranaires qui reconnaissent spécifiquement des monosaccharides ou des motifs oligosaccharidiques. (Voir les Revues de NEUFELD et ASHWELL 1980 (243), MONTREUIL 1981 (244), ASHWELL et HARFORD 1982 (245)).

Plusieurs récepteurs hépatiques pouvant jouer un rôle dans le catabolisme des glycoprotéines ont été identifiés (Tableau IX) nous rappellerons brièvement quelques unes de leurs propriétés.

a - Récepteur hépatique des asialoglycoprotéines

La démonstration du rôle particulier joué par les glycannes des glycoprotéines sériques, vient de l'observation faite par le groupe d'Ashwell, suivant laquelle l'injection d'une préparation d'asialocéruloplasmine à des lapins, se traduisait par une disparition rapide de l'asialoglycoprotéine de la circulation, la glycoprotéine native présentant quant à elle une demi-vie de plusieurs jours. Le démasquage des résidus de galactose en position pénultième sur la chaîne glycanique semblait être l'évènement responsable de la "clearance" puisqu'une désialylation, suivie d'une modification du galactose par traitement à la galactose oxydase, ou l'enlèvement du galactose à l'aide d'une β -galactosidase aboutissait à un rétablissement d'une demi-vie normale, MORELL et al. 1968 (246). Les asialo-glycoprotéines sont spécifiquement séquestrées par l'hépatocyte où elles seront dégradées au sein des lysosomes, GREGORIADIS et al. 1970 (247).

| RECEPTEUR | SPECIFICITE | REFERENCE |
|--|--|--|
| Récepteur hépatique des asialoglycoprotéines | α -GalNAc > β -GalNAc > α -Glc > β -Gal > α -Gal | MORELL <u>et al.</u> 1968 (248) SARKAR <u>et al.</u> 1979 (249) |
| Récepteurs cellules réticulo-endothéliales | GlcNAc, Man(α 1,6) Fuc, Glc | STAHL <u>et al.</u> 1976 (250) |
| Récepteur hépatique microsomal | Man, GlcNAc | MAYNARD et BAENZIGER 1982 (251) |
| Récepteur hépatique du fucose | Fuc(α 1,3) | PRIEELS <u>et al.</u> 1978 (252) |

TABLEAU X : DIFFERENTS RECEPTEURS HEPATIQUES POUVANT INTERVENIR DANS LE CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

De ces observations est né le concept du mécanisme de base responsable de la régulation physiologique du catabolisme des glycoprotéines sériques. La désialylation est une marque de vieillissement des glycoprotéines sériques, cette désialylation entraîne le démasquage d'un signal de reconnaissance spécifique, en l'occurrence le galactose, qui est reconnu spécifiquement par une lectine membranaire de l'hépatocyte, la fixation de la glycoprotéine sur la lectine servant de signal à la pinocytose sélective, et à la dégradation de la glycoprotéine ainsi internalisée.

- Spécificité du récepteur : Une étude préliminaire de VAN DEN HAMER et al. 1970 (253) montre que l'exposition de deux résidus de galactose sur toute la glycoprotéine est suffisante pour entraîner sa reprise hépatique. La spécificité du site récepteur vis-à-vis de différents monosaccharides a été étudiée par SARKAR et al. 1979 (254). Les études montrent que seules des monosaccharides sont reconnus par la lectine et que la N-acétylgalactosamine présente plus d'affinité pour le récepteur que le galactose lui-même. La lectine est en outre incapable de discriminer les conformations D-gluco et D-galacto, pouvant ainsi internaliser des néoglycoprotéines porteuses de résidus de glucose, STOWELL et LEE 1978 (255). D'autres déterminants structuraux du glycoside capables d'influencer les paramètres de fixation ont été défini à l'aide de néoglycoprotéines par STOWELL et al. 1980 (256). BAENZIGER et FIETE 1980 (257), montrent que la fixation de ligands multivalents possédant un encombrement spatial déterminé, est seule capable d'induire le changement de conformation du récepteur nécessaire à l'endocytose. C'est ainsi que si la lectine hépatique fixe de la même manière des glycopeptides de type "biantennés", ou "triantennés", seuls ces derniers seront internalisés par la cellule.

- Distribution subcellulaire des récepteurs : Comme la plupart des récepteurs, les récepteurs hépatiques à galactose sont situés dans des régions de la membrane plasmique spécialisées dans l'endocytose les "coated pits" que nous avons décrit préalablement (WALL et al. 1980 (258) ; KOLB-BACHOFEN 1981 (259)). Ce récepteur possède d'autre part une localisation transmembranaire (HARFORD et ASHWELL 1981 (260)), donnant la possibilité à la partie localisée du côté cytosolique d'interagir avec d'autres composés cellulaires.

Les récepteurs à galactose ont été localisés au niveau de la plupart des systèmes membranaires intracellulaires ; appareil de Golgi, microsomes et lysosomes (PRICER et ASHWELL 1976 (261) ; TANABE et al. 1979 (262) ; SAWAMURA et al. 1980 (263)). En fait, l'activité réceptrice semble être prépondérément intracellulaire et certaines observations montrent que toutes les molécules réceptrices de la cellule ne participent pas à la fixation des ligands ; les récepteurs seraient recyclés de manière analogue à ce qui a été précédemment décrit pour les récepteurs à Man-6-P des enzymes lysosomales (TOLLESHAUG et al. 1979 (264) ; REGOECZI et al. 1978 (265)). Une étude de la topologie des récepteurs, TANABE et al. 1979 (266) montre en outre que si les récepteurs sont cryptiques au niveau du Golgi et des membranes microsomales, les récepteurs lysosomiaux sont quant à eux orientés vers le cytosol. Ce positionnement est contraire à ce qui serait attendu dans l'hypothèse d'un transit intravésiculaire des complexes ligands-récepteurs vers le lysosome. Il faut donc admettre une dissociation ligand-récepteur au niveau des lysosomes primaires, et une translocation des récepteurs dans la membrane lysosomale, vraisemblablement afin d'éviter l'attaque protéolytique.

- Nature des récepteurs : Le récepteur hépatique fut purifié dès 1974 par HUDGIN et al. (267) à partir du foie de lapin. Il s'agit d'une glycoprotéine d'un poids moléculaire apparent de 260 000 présentant une grande tendance à l'aggrégation KAWASAKI et ASHWELL 1976 (268), et pouvant se dissocier en 6 sous-unités. Le récepteur hépatique récemment isolé par BAENZIGER et MAYNARD 1980 (269) possède le même type de propriétés.

Il s'agit dans tous les cas d'une glycoprotéine, possédant une chaîne glycanique de type triantenné (LOWE et NILSSON 1983 (270)).

b - Les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine

Des préparations d'enzymes lysosomiaux injectées par voie intraveineuse, se comportent de façon identique aux asialoglycoprotéines sériques, disparaissant rapidement du plasma, pour se retrouver

principalement au niveau des lysosomes hépatiques mais aussi au niveau de la rate et des os (ACHORD et al. 1977 (271) ; STAHL et al. 1976 (272) ; SCHLESINGER et al. 1976 (273)). Ce phénomène peut être inhibé par différents mannanes ainsi que par l'asialo-agalactoorosomucoïde (possédant des résidus de N-acétylglucosamine externes) (ACHORD et al. 1977b (274)). La reconnaissance de deux motifs monosaccharidiques différents (Mannose et N-acétylglucosamine) par un même système de pinocytose, fut confirmée par l'isolement du récepteur à partir du foie de rat (KAWASAKI et al. 1978 (275)). Des études biochimiques et autoradiographiques (SCHLESINGER et al. 1978 (276) ; HUBBARD et al. 1979 (277)) montrèrent que le récepteur était localisé spécifiquement au niveau des cellules du système réticulo-endothélial du foie (cellules de KUPFER, cellules sinusoidales) ; le même récepteur fut par la suite caractérisé au niveau des membranes des macrophages alvéolaires et péritonéaux, STAHL et al. 1978 (278).

Plus récemment, différents auteurs (TOWNSEND et STAHL 1981 (279) ; MIZUNO et al. 1981 (280) ; MAYNARD et BAENZIGER 1982 (281)) ont rapporté l'existence d'un récepteur similaire au niveau de l'hépatocyte. Ce récepteur présentant une localisation spécifiquement microsomale, se différencie du récepteur réticuloendothélial par l'inhibition avec des anticorps spécifiques et jouerait un rôle biologique différent.

Il est enfin à noter que chez les reptiles et les oiseaux le récepteur hépatique à galactose est remplacé par un récepteur spécifique de la N-acétylglucosamine, LUNNEY et ASHWELL 1976 (282) présentant de nombreuses similitudes avec le récepteur à Man/GlcNAc précédemment décrit.

c - Le récepteur à fucose

Dans une étude réalisée avec la lactotransferrine, PRIEELS et al. 1978 (283) montre que des glycoprotéines possédant des résidus de fucose liés en $\alpha 1,3$ disparaissent rapidement du sérum pour se retrouver spécifiquement au niveau du foie. Une reprise hépatique analogue a été décrite pour la β -glucocérébrosidase, FURBISH et al. 1980 (284).

2 - DEGRADATION ENZYMATIQUE

Une fois endocytées par les processus de reconnaissance spécifiques que nous venons de décrire, les glycoprotéines vont être soumises à l'action des différents enzymes hydrolytiques du lysosome, protéases et exoglycosidases. Nous ne reviendrons pas sur les propriétés des différentes exoglycosidases qui ont été décrites précédemment.

Comme les autres hétéropolymères osidiques, les chaînes glycaniques des glycoprotéines seront dégradées de manière récurrente à partir de l'extrémité terminale non réductrice ; c'est ainsi qu'agiront tour à tour la neuraminidase, la fucosidase, la β -galactosidase, l'hexosaminidase et enfin la mannosidase. Comme nous l'avons précédemment mentionné les exoenzymes présentent deux types de spécificité :

- une spécificité osidique
- une spécificité contre l'aglycone.

* La spécificité osidique dépendra non seulement de la nature du sucre, mais aussi de sa configuration anomérique. C'est ainsi que le catabolisme du noyau trimannosidique nécessitera l'action conjuguée d'une α -mannosidase et d'une β -mannosidase.

* La spécificité aglyconique dépendra quant à elle du type de liaison dans lequel est engagé l'ose terminal, ainsi que des molécules osidiques avoisinantes qui dans certains cas exerceront un empêchement stérique, déterminant l'ordre d'action des différentes exoglycosidases (GATHMANN et AMINOFF 1981 (285)).

La dégradation de la chaîne protéique par les protéases lysosomales semble être un évènement préalable à l'action des exoglycosidases qui sont nettement plus actives sur des glycopeptides que sur la protéine native.

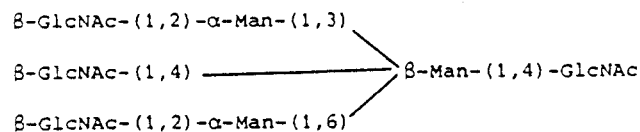
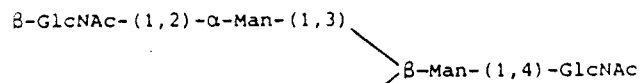
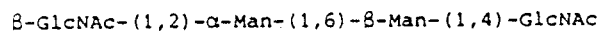
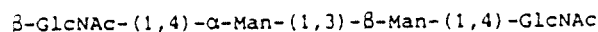
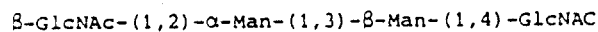
Parallèlement aux exoglycosidases, des endoglycosidases coupant à l'intérieur des chaînes glycaniques ont été caractérisées. En particulier, une activité endo- β -N-acétylglucosaminidase capable d'hydrolyser le motif N,N'-diacétylchitobiose liant la chaîne glycanique à l'asparagine, a été détectée dans différents tissus de mammifères

(NISHIGAKI et al. 1974 (286) ; TARENTINO et MALEY 1976 (287) ; PIERCE et al. 1979 (288)) et chez l'homme plus en particulier (OVERDIJK et al. 1981 (289)). L'étude de la spécificité enzymatique, PIERCE et al. 1979 (290) ; TACHIBANA et al. 1982 (291), montre qu'à la fois les glycanes de type polymannosidique et lactosaminique sont sensibles à l'action de l'endoglycosidase. Dans le cas des glycanes lactosaminiques, la présence d'un résidu de galactose en position terminale non réductrice, ainsi que l'hydrolyse préalable du fucose lié à la N-acétylglucosamine du point d'attache semblent être des conditions préalables à l'action endoglycosidasique. Une étude détaillée réalisée par PIERCE et al. 1980 (292) montre que les activités "galacto-endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase" et "manno-endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase" seraient liées à deux enzymes différentes. La localisation cytosolique de ces activités enzymatiques, serait d'autre part en faveur d'un rôle, joué par ces enzymes, dans la régulation de la biosynthèse des chaînes glycaniques (MONTREUIL 1982 (293)).

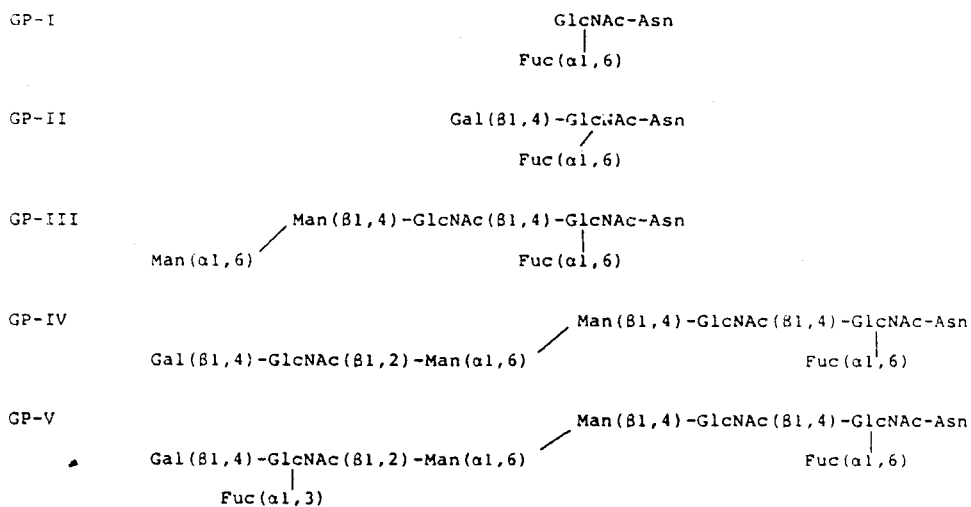
C - LES GLYCOPROTEINOSSES

Les glycoprotéinoses sont des maladies métaboliques caractérisées par un déficit total ou partiel de l'activité des hydrolases acides, responsable du catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines. L'absence d'activité enzymatique pourra être due soit à une modification transcriptionnelle de l'enzyme ou d'un de ses cofacteurs, soit à une modification post-transcriptionnelle affectant les signaux de reconnaissance qui permettent de l'intégrer au site cellulaire spécifique comme c'est le cas dans la mucopolidose de type II (I cell disease) (HASILIK et al. 1981 (294)).

Dans tous les cas le blocage métabolique se traduit par une accumulation de polymères incomplètement dégradés au sein du lysosome et la biosynthèse continuant à un rythme normal ne fait qu'aggraver le processus. Quand le matériel accumulé est soluble ou de poids moléculaire relativement faible comme dans le cas des glycoprotéinoses plusieurs centaines de milligrammes d'oligosaccharides ou de glycopeptides provenant du catabolisme incomplet des chaînes glycaniques des glycoprotéines s'accumulent dans l'urine et les tissus des malades.



a



b

FIGURE 13

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES ET GLYCOPEPTIDES ISOLES DE DEUX TYPES DE GLYCOPROTEINOSES : a - maladie de Sandhoff
 b - fucosidose

Ces composés sont spécifiques de la maladie et possèdent en position terminale non réductrice, le motif monosaccharidique n'ayant pu être hydrolysé, suite à la déficience enzymatique. La figure 13 représente les structures d'oligosaccharides et de glycopeptides isolés respectivement de l'urine de malades atteints de la maladie de Sandhoff et de fucosidose.

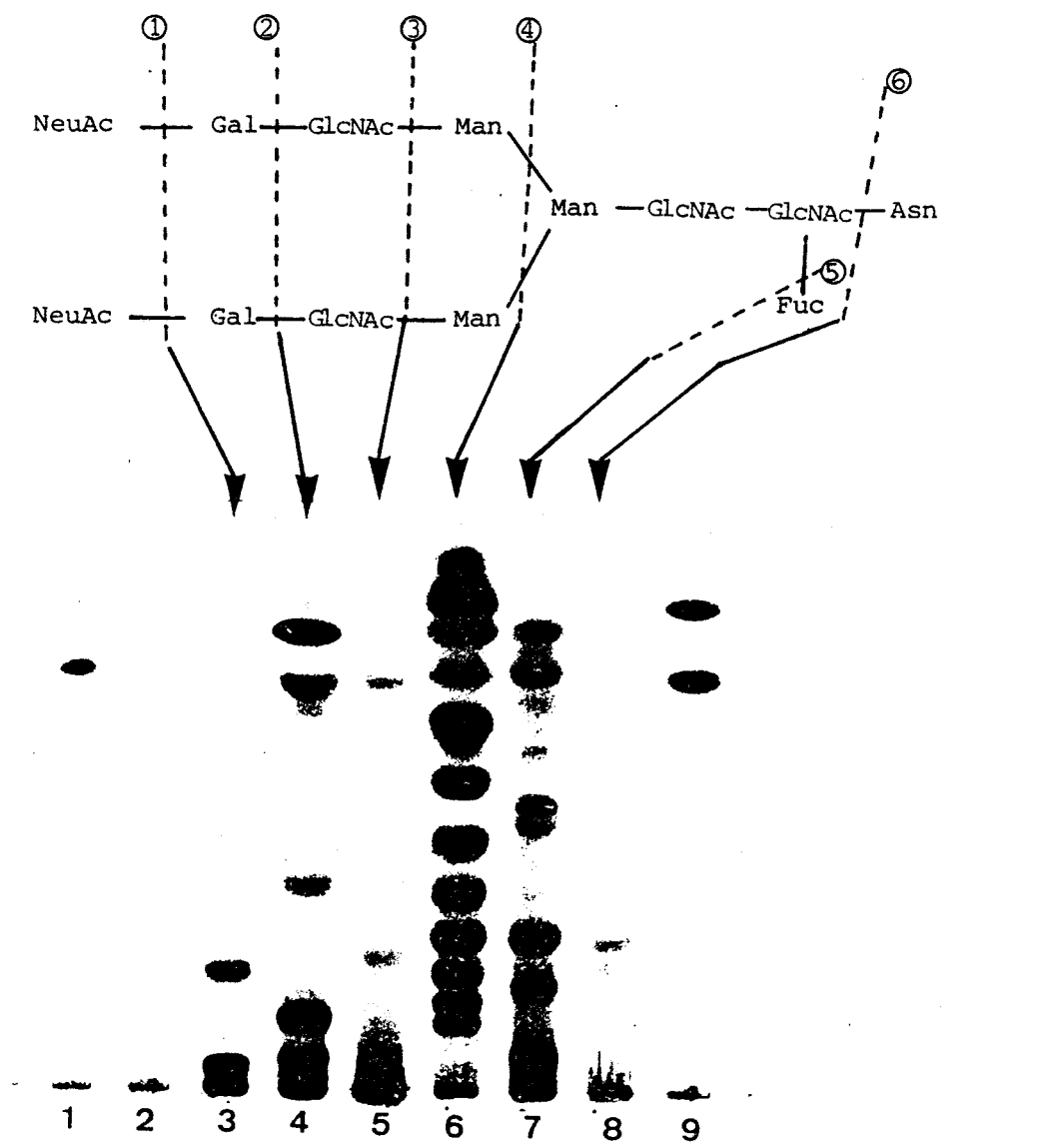
L'oligosaccharidurie accompagnant les glycoprotéinoses peut être mise en évidence, par un test simple telle la chromatographie couche-mince de l'urine, faisant apparaître un certains nombres d'oligosaccharides de poids moléculaire supérieur au lactose, absents de l'urine normale (Figure 14).

Le groupe des glycoprotéinoses rassemble à l'heure actuelle environ 10 maladies différentes résumées dans le Tableau X.

Toutes les glycoprotéinoses connues à ce jour sont dues à un déficit en exoglycosidases, il est cependant bien certain qu'un déficit en endoglycosidase peut exister et reste à découvrir. Il est également à noter que la β -mannosidose décrite chez la Chèvre, JONES et DAWSON 1981 (295), n'a pour l'instant pas été découverte chez l'Homme, bien qu'une forme lysosomale de la β -mannosidase ait été décrite, DAWSON 1982 (296).

Du point de vue clinique, toutes les glycoprotéinoses se traduisent par une dysmorphie faciale rappelant celle des mucopolysaccharidoses, par des troubles de la croissance staturale, et par une dégradation mentale très variable. Une hépatomégalie, pouvant s'accompagner d'une splénomégalie est généralement observée. La présence de lymphocytes vacuolés dans le sang et la moelle est également symptomatique.

Toutes ces maladies sont transmissibles suivant un mode autosomal récessif. L'aspect clinique est cependant généralement insuffisant, pour l'établissement du diagnostic et la confirmation biochimique est souvent essentielle.



- | | | | |
|--------|---------------------------------|---|------------------------|
| 1 et 9 | témoins lactose, saccharose | 6 | Mannosidose |
| 3 | Sialidose | 7 | Fucosidose |
| 4 | Gangliosidose à GM ₁ | 8 | Aspartylglycosaminurie |
| 5 | Maladie de Sandhoff | | |

FIGURE 14

MISE EN EVIDENCE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT LES GLYCOPROTEÏNOSES
PAR CHROMATOGRAPHIE COUCHE MINCE

(3 développements, 6 heures solvant : Butanol/acide acétique/eau
2 : 1 : 1 (v/v/v)).

| DEFICIT | MALADIES |
|---|---|
| α -Neuraminidase | { I Cell disease Pseudo-Hurler polydystrophie Sialidoses (Mucopolidose type I) Sialidose à déficit combiné Neu ⁻ /Gal ⁻ (Syndrome de Goldberg) |
| β -Galactosidase | GM ₁ gangliosidose Maladie de MORQUIO type B |
| α -Fucosidase | Fucosidose |
| α -Mannosidase | Mannosidose |
| β -Mannosidase | β -Mannosidose (pas de forme humaine connue) |
| β -N-acétylhexosaminidases A et B | Maladie de SANDHOFF |
| Aspartylglucosamine amidohydrolase | Aspartylglucosaminurie |

TABEAU X : CLASSIFICATION DES GLYCOPROTEINOSES

GLYCOPEPTIDES ET OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE NORMALE

Ce chapitre a pour but de faire un catalogue des composés osidiques caractérisés dans l'urine dans des conditions physiologiquement normales, afin de mieux faire ressortir les différences observées lors des glycoprotéinoses.

L'urine normale est une source très riche pour différentes glycoprotéines, glycopeptides et oligosaccharides (STRECKER 1972 (297)). A peu près 30 différentes protéines plasmatiques ont été recensées dans l'urine (BERGGÅRD 1970 (298) ; SCHULTZE 1966 (299)), mais approximativement 75 % du matériel de nature oligosaccharidique ou glycopeptidique est ultrafiltrable et apparait avoir un poids moléculaire inférieur à 10 000, MALLEVAIS-GOUBET 1969 (300) ; LUNDBLAD 1966 (301). Ces composés de faible poids moléculaire présentent une énorme hétérogénéité et seuls quelques uns ont été isolés et caractérisés, parmi lesquels différents oligosaccharides et quelques glycopeptides possédant différents types de liaisons protéine-sucre (LUNDBLAD 1978 (302) ; STRECKER et LEMAIRE-POITAU 1977 (303)). L'origine et la fonction de ces composés demeurent inconnues ; certains d'entre eux sont vraisemblablement d'origine biosynthétique et leur origine liée à l'absorption par voie orale de certains monosaccharides, d'autres oligosaccharides résultent plus vraisemblablement du catabolisme de différents glycoconjugués tissulaires, STRECKER et MONTREUIL 1979 (304).

I - LES GLYCOPEPTIDES DE L'URINE NORMALE

Si la présence dans l'urine de glucides conjugués à des protides est connue depuis les travaux de MÖRNER en 1895, (305), la nature des oses liés quant à elle ne fut précisée pour la première fois que par MONTREUIL et BOULANGER en 1953 (306). Il existe dans l'urine un grand nombre de substances de masse moléculaire inférieure

à 15 000 renfermant jusqu'à 80 % d'oses (LUNDBLAD 1978b (307) ; BOURRILLON 1972 (308)). Il est malaisé encore à l'heure actuelle de définir exactement ces constituants, car très peu ont pu être isolés à l'état pur ; néanmoins il est possible de distinguer trois groupes de glycopeptides :

- des glycopeptides riches en fucose et possédant assez souvent des activités de groupe sanguin ;
- des glycopeptides riches en acide sialique dérivant vraisemblablement de glycoprotéines plasmatiques et tissulaires ;
- des glycopeptides riches en acide uronique et hydroxyproline, dérivant des mucopolysaccharides acides et du collagène.

A - GLYCOPEPTIDES RICHES EN FUCOSE

Un grand nombre de fractions glycopeptidiques riches en fucose ont été isolées et partiellement caractérisées (KING et al. 1961 (309) ; BOURRILLON et al. 1961 (310) ; BOURRILLON et al. 1962 (311) ; LUNDBLAD 1965 (312)), ces composés très hétérogènes possèdent un poids moléculaire compris entre 2 000 et 10 000 et leur structure peut être rapprochée de celle de substances à activité de groupe sanguin bien qu'elles soient généralement dépourvues d'activité sérologique.

B - GLYCOPEPTIDES RICHES EN ACIDE SIALIQUE

Différentes fractions urinaires riches en acide sialique ont pu être isolées et partiellement caractérisées par BERGGÅRD 1963 (313) ainsi que par CARRION et al. 1969 (314) et GOUSSAULT et BOURRILLON 1970 (315). En 1972, LEMONNIER et al. (316) ont isolé un glycopeptide contenant 35 % d'hexoses (mannose et galactose), 28,1 % de N-acétylglucosamine et 23,2 % d'acide N-acétylneuraminique, possédant des propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'activité agglutinante et mitogénique de la lectine isolée de *Robinia pseudo-acacia*.

Un sialoglycopeptide de type mucine a d'autre part, été mis en évidence par LEMONNIER et BOURRILLON 1975 (317) dans l'urine de femme enceinte.

C - AUTRES GLYCOPEPTIDES

Un certain nombre d'autres glycopeptides urinaires dérivent du catabolisme des mucopolysaccharides acides ou du collagène.

EN 1969, BASU (318) isole et cristallise un glycopeptide renfermant de l'acide glucuronique, du xylose et de la galactosamine. Le glycopeptide xylosyl-sérine est isolé en 1965 par TOMINAGA et al. (319). 80 % de l'hydroxylysine urinaire est glycosylée, ASKENASI 1975 (320). Les glycopeptides α -D-glucopyranosyl-(1 → 2)- β -D-galactopyranosyl- δ -hydroxylysine et β -D-galactopyranosyl-S-hydroxylysine ont été caractérisés par CUNNINGHAM et al. 1967 (321). Leur excrétion n'est pas affectée par la diète indiquant une origine endogène.

Le glycopeptide aspartylglucosamine qui représente le point d'attache des N-glycannes est également présent en faible quantité dans l'urine, ROWLEY et HAMILTON 1972 (322).

D'autres types de liaisons protéine-sucre ont également été décrits. C'est ainsi que LOTE et WEISS 1971 (323) ont isolé un glycopeptide possédant le chaînon digalactosylcystéine, pouvant être rapproché des structures trigalactosylcystéine trouvées au niveau des membranes érythrocytaires, WEISS et al. 1971 (324). En 1975, HALLGREN (325) isole de l'urine le glycopeptide β -D-glucopyranosyl-(1 → 3)- α -L-fucopyranosyl-L-threonine, l'excrétion de ce glycopeptide est indépendante du caractère sécréteur ou du groupe sanguin des individus. Une série de composés analogues ont récemment été isolés à partir du foie de rat (KLINGER et al. 1981 (326)), bien que leur origine biosynthétique demeure inconnue.

Le tableau XI résume les structures des glycopeptides isolés à l'état pur à partir de l'urine dans des conditions non pathologiques.

TABLEAU XI : STRUCTURES DES GLYCOPEPTIDES DE L'URINE NORMALE

| Structures | Quantité mg/l | Références |
|---|------------------|------------------------------------|
| Gal-GalNac-Ser / NeuAc NeuAc | | LEMONNIER et BOURRILLON 1975 (327) |
| Gal-Gal-Cys | 0.03 | LOTE et WEISS 1971 (328) |
| β -D-Xyl-L-Ser | 1 | TOMINAGA et al. 1965 (329) |
| α -D-Glc(1,2)- β -D-Gal- δ -L-Hyl | 7 | CUNNINGHAM et al. 1967 (330) |
| β -D-Gal- δ -L-Hyl | 12 | CUNNINGHAM et al. 1967 (331) |
| β -D-GlcNac-L-Asn | 4 | ROWLEY et HAMILTON 1972 (332) |
| β -D-Glc-(1,3)- α -L-Fuc-L-Thr | 0.2-0.3 | HALLGREN et al. 1975 (333) |
| α -NeuAc-(2,3)- β -Gal(β 1,3)-GalNac-(α 1,0)-Ser / α -NeuAc-(2,6) | 0.2 à 1 | PARKKINEN et FINNE 1983 (334) |

II - OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE NORMALE

A - OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN

1 - CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES NORMALES

Les travaux de LUNDBLAD 1966 (335) et STRECKER ET MONTREUIL 1969 (336) ont montré que le taux de fucose excrété dans l'urine était fonction du caractère sécréteur ou non sécréteur des individus, et que d'autre part, le profil oligosaccharidique était variable suivant le groupe sanguin des sujets étudiés. Plusieurs de ces oligosaccharides ont pu être purifiés, STRECKER et MONTREUIL 1973 (337) ; STRECKER et al. 1973 (338) ; LUNDBLAD et al. 1973 (339) ; LUNDBLAD et SVENSSON 1973 (340) ; BJÖRNDAL et LUNDBLAD 1970 (341) ; DERAPPE et al. 1980 (342). Leurs structures sont rassemblées dans le Tableau XII. Ces structures sont pour la plupart analogues aux déterminants A, B, H des glycoprotéines à activité de groupe sanguin (WATKINS 1972 (343)).

2 - GROSSESSE ET LACTATION

Durant le dernier trimestre de grossesse, et durant la lactation un taux élevé d'oligosaccharides est excrété dans l'urine (DATE 1964 (344) ; HALLGREN et LUNDBLAD 1977 (345), 1977b (346)). La plupart de ces oligosaccharides ont une structure analogue à ceux rencontrés dans le lait (KOBATA 1978 (347)). Leur structure est également dépendante du caractère sécréteur ou du groupe sanguin du sujet. Une augmentation de sialyloligosaccharides a également été observée (MAURY 1976 (348)). LEMONNIER et BOURRILLON 1976 (349) ont en particulier isolé une heptasaccharide dont la structure est représentée sur la figure 15.

3 - SURCHARGE EN GALACTOSE OU LACTOSE

Les galactosuries spontanées ou provoquées s'accompagnent d'une oligosaccharidosurie qui est caractérisée par l'apparition de nouveaux composés, dont les structures sont en relation avec la nature du groupe sanguin du sujet (STRECKER et al. 1973 (350) ; LUNDBLAD et al. 1973 (351) ; CHESTER et al. 1979 (352)). De la nature des composés décrits

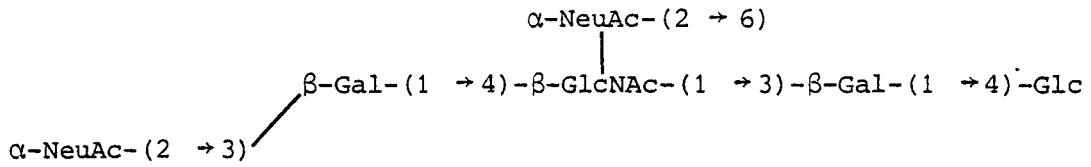


FIGURE 15

STRUCTURE D'UN DISIALYL-HEPTASACCHARIDE ISOLE DE L'URINE DE FEMME ENCEINTE (LEMONNIER et BOURRILLON 1976 (353)).

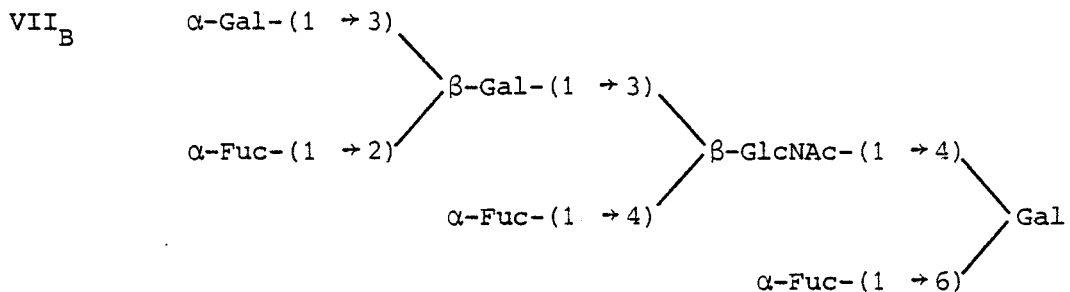
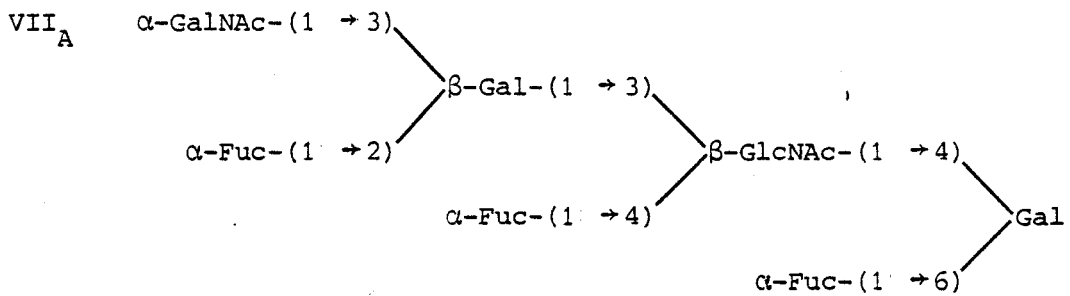
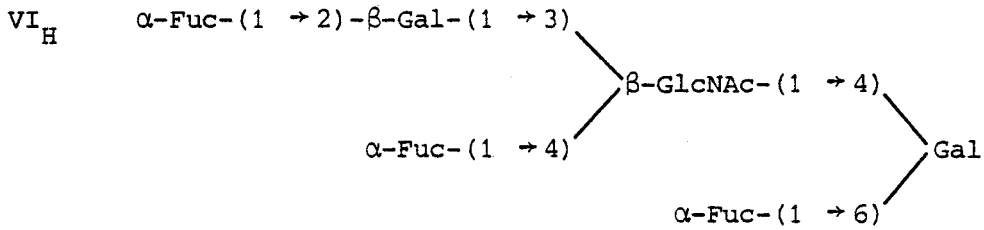
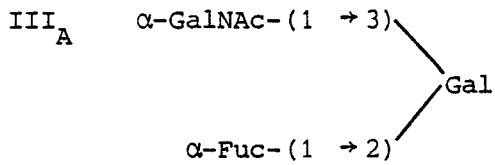
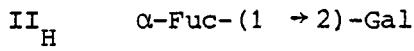


FIGURE 16

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES APRES INGESTION DE 40 g DE GALACTOSE "per os"

TABLEAU XIII

OLIGOSACCHARIDES NON RELIES A DES ACTIVITES DE GROUPE SANGUIN DE L'URINE NORMALE

| OLIGOSACCHARIDE | QUANTITE mg/litre | STRUCTURE | REFERENCE |
|--------------------------------|-------------------|---|--|
| 3-Xylosylglucose | 5 - 10 | α -Xyl-(1,3)-Glc | LUNDBLAD et SVENSSON 1973 (354) |
| 2-Fucosylglucose | 5 - 10 | α -Fuc-(1,2)-Glc | LUNDBLAD et SVENSSON 1973 (355) |
| Fucosylinositol | 0,4 - 3,2 | α -Fuc-myoinositol | LENNARTSON <u>et al.</u> 1976 (356) |
| Tétrasaccharide à glucose | 0,1 - 2,5 | $[\alpha\text{-Glc-(1,4)-}\alpha\text{-Glc}]_2$ | HALLGREN <u>et al.</u> 1974 (357) ZOPF <u>et al.</u> 1982 (358) |
| Glucosyl-galactose | - | α -Glc-(1,2)-Gal | |
| 3'-sialyllactose | - | α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1,4)-Glc | KOSEKI et TSURUMI 1977 (360) |
| 6'-sialyllactose | - | α -NeuAc-(2,6)- β -Gal-(1,4)-Glc | |
| 6'-sialyllactosamine | - | α -NeuAc-(2,6)- β -Gal-(1,4)-GlcNAC | HUTTUNEN 1966 (361) |
| Mannosyl-glucosamine | - | β -Man-(1,4)-GlcNAC | LEMONNIER <u>et al.</u> 1982 (362) |
| Oligosaccharide "mucin like" | 0,2 - 1 | α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1,3)GalNac- α -NeuAc-(α 2,6) | PARKKINEN et FINNE 1983 (363) |
| Phosphosialyl-oligosaccharides | - | α -NeuAc-(2,3 ou 6)- β -Gal-(1,4)-GlcNAC-1-(P) | PARKKINEN et FINNE 1983 (364) |
| | - | α -NeuAc-(2,3)- β -Gal-(1-3)-GalNac-1-(P) | |

dans la figure 16 , il apparait que des surcharges glucidiques déclenchent des réactions de transglycosylation, s'effectuant sur les glucides inducteurs, conduisant à la formation d'oligosaccharides dont la structure dépend des systèmes glycosyltransférasiques normalement impliqués dans la biosynthèse de groupes sanguins.

B - OLIGOSACCHARIDES NON RELIES AU GROUPE SANGUIN

Différents oligosaccharides ne possédant aucune activité de groupe sanguin donnée ont été caractérisés dans l'urine (Tableau XIII). Si certains proviennent du catabolisme des glycoprotéines, gangliosides ou glycogène, l'origine de certains autres tel le fucosylmyoinositol est totalement inconnue.

CONCLUSION

Les chapitres qui précèdent rapportent de façon synthétique les données actuelles concernant le déroulement de la fonction digestive accomplie au sein de la cellule par les lysosomes, et nous nous sommes principalement attaché aux différentes étapes conduisant à la dégradation des polymères glucidiques. Nous avons également essayé de montrer que si les hydrolases acides sont aujourd'hui bien cataloguées et les phénomènes conduisant à leur intégration dans le lysosome en voie d'être élucidés, leur mode d'action ainsi que leur exacte spécificité demeurent dans bon nombre de cas méconnus.

Nous avons évoqué les différents types de dérèglement d'ordre génétique de la machinerie enzymatique, conduisant à des états pathologiques où le blocage de la dégradation d'un type moléculaire déterminé, entraîne son accumulation au sein du lysosome créant ainsi le phénomène de "surcharge". A la mort cellulaire, les substances accumulées sont déversées dans le milieu circulant, sont ensuite vraisemblablement concentrées au niveau rénal et excrétées dans l'urine. La nature chimique des composés ainsi excrétés est spécifiquement dictée par la nature du déficit enzymatique et pourra servir de base à la classification de ces dernières. Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement attaché à la description des maladies affectant le catabolisme des glycoconjugués : mucopolysaccharidoses, gangliosidoses, glycogénoses. L'essentiel de nos travaux a porté sur l'élucidation de la structure du matériel accumulé lors de troubles génétiques affectant le catabolisme des chaînes oligosaccharidique d'une classe de glycoconjugués particulière représentée par les glycoprotéines

A l'époque où nous débutions nos travaux, seules deux enzymopathies avaient pu être directement rattachées à une anomalie du catabolisme de ces composés. Par analogie aux autres maladies de surcharge, les troubles génétiques du catabolisme des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines conduisant à une accumulation tissulaire et urinaire d'oligosaccharides ou de glycopeptides furent par la suite regroupés sous le terme de "glycoprotéinoses".

Nous nous proposons de démontrer les intérêts d'ordre diagnostique, mais surtout d'ordre fondamental (hétérogénéité et bases structurales des chaînes glycaniques, compréhension des différentes étapes de leur catabolisme) que peut revêtir l'étude du matériel oligosaccharidique urinaire excrété lors de ces différentes maladies. Plusieurs maladies ont fait l'objet de notre étude : sialidoses, GM₁ gangliosidose, maladie de Morquio B, mannosidose, maladie de Gaucher ainsi que d'autres maladies neurologiques d'étiologie inconnue. Nous ferons précéder chaque étude d'un bref rappel concernant les données cliniques et paracliniques de chaque maladie considérée.

TRAVAUX PERSONNELS

DESCRIPTION D'UN NOUVEAU GROUPE DE GLYCOPROTEINOSSES : LES SIALIDOSES

Le terme de "Mucolipidose" fut introduit en 1970 par SPRANGER et WIEDEMANN (364), pour rassembler un certain nombre de formes atypiques de surcharge en lipides ou mucopolysaccharides, présentant à la fois les signes cliniques des mucopolysaccharidoses et des sphingolipidoses, sans qu'il y ait toutefois de mucopolysaccharidurie. Selon les propres termes des auteurs, il s'agissait là d'un groupe d'attente très hétérogène et comme nous l'avons préalablement mentionné, bon nombre de maladies classées initialement sous ce vocable, sont aujourd'hui reclassées comme "glycoprotéinoses".

Au terme de mucolipidose est venu aujourd'hui s'associer celui de "sialidose", résultat direct des études menées sur l'élucidation de la nature chimique du matériel accumulé au cours de ces maladies, ainsi que de la compréhension des mécanismes moléculaires responsables.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux concernant l'étude de l'oligosaccharidurie et du dérèglement enzymatique accompagnant ces différents syndromes par un rappel des traits cliniques et notamment des principales caractéristiques biochimiques ayant justifié l'amorce de nos travaux en 1976.

I - CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES ET BIOCHIMIQUES DES MUCOLIPIDOSES

A - MUCOLIPIDOSE DE TYPE I (MLP I)

La mucolipidose de type I ou "lipomucopolysaccharidose" est une maladie neurodégénérative présentant les caractères cliniques d'une forme atténuée de la maladie de HURLER (SPRANGER 1975 (365)). Les principales caractéristiques cliniques de la maladie sont l'atteinte du

système nerveux central, se manifestant par une hypotonie et une ataxie cérébelleuse, le faciès grossier, la présence d'une tache rouge cerise au niveau de la rétine (KELLY et al. 1981 (366)). Une hépatomégalie est généralement observée, l'examen en microscopie électronique fait apparaître une vacuolisation importante des cellules de Kupfer. De grandes vacuoles claires, optiquement vides se retrouvent au niveau des cellules de la moelle osseuse.

B - VARIANTS DE LA MUCOLIPIDOSE I

Une grande hétérogénéité est observée dans les descriptions cliniques des mucolipidoses, et en particulier plusieurs formes atypiques, voisines de la mucolipidose de type I, ont été décrites. Nous ne ferons ici qu'énoncer leurs principales caractéristiques, leur classification précise en fonction de critères biochimiques sera reprise dans la discussion.

1) MUCOLIPIDOSES INFANTILES GRAVES (patients L.W. et A.W. de notre étude)

Ces patients présentent un faciès "Hurler-Like" dès la naissance, avec hépatosplénomégalie, dysostose multiple, cellules vacuolées dans la moelle osseuse (KELLY et GRAETZ 1977 (367) ; RICHES et SMUCKLER 1983 (368)). Chez certains patients, au tableau clinique précédemment évoqué s'ajoute une néphropathie glomérulaire grave (MAROTEAUX et al. 1978 (369) ; AYLSWORTH et al. 1980 (370)). Dans tous les cas l'évolution de la maladie est fatale dans les premières années.

2) MUCOLIPIDOSE SANS ATTEINTE NEUROLOGIQUE (patient P.A. de notre étude)

Ce cas très voisin de la mucolipidose I, ne présente toutefois aucune atteinte neurologique (MAROTEAUX et al. 1978b (371)).

3) "CHERRY-RED SPOT MYOCLONUS SYNDROME" (patients De P. et Noc de notre étude)

Ces patients présentent une symptomatologie neurologique discrète et progressive avec myoclonie, l'atteinte mentale est quant à elle variable. Une tache rouge cerise bilatérale est observée en fond d'oeil.

Aucune organomégalie ou dysmorphie squelettique n'est enregistrée. Une vacuolisation des hépatocytes et cellules de Kupfer est à noter. Ce syndrome pourrait représenter une forme adulte de la mucopolipidose I (DURAND et al. 1977 (372) ; RAPIN et al. 1978 (373) ; THOMAS et al. 1978 (374) ; FEDERICO et al. 1980 (375)).

4) MUCOLIPIDOSE AVEC DEFICIT EN β -GALACTOSIDASE

Ces patients initialement classés comme variants de la GM₁ gangliosidose (GOLDBERG et al. 1971 (376) ; GALJAARD et al. 1975 (377)), présentent les principales caractéristiques de la mucopolipidose de type I, sans qu'il y ait toutefois d'organomégalie. Un déficit en β -galactosidase est observé dans la majorité des tissus étudiés.

Une forme adulte de la maladie a été décrite principalement au Japon (MIYATAKE et al. 1979 (378) ; KURIYAMA et al. 1980 (379)) dont les caractéristiques cliniques, outre le déficit en β -galactosidase sont superposables au "cherry red spot myoclonus syndrome" préalablement décrit.

C - MUCOLIPIDOSES DE TYPE II et III (MLP II, MLP III)

La première description de la mucopolipidose de type II fut faite en 1967 par LEROY et DEMARS (380), à la suite de la découverte d'inclusions cytoplasmiques granulaires denses dans les fibroblastes en culture d'enfants présentant un tableau clinique évocateur d'une maladie de Hurler. L'entité ainsi décrite fut pour cette raison dénommée "I cell disease" ou maladie des cellules à inclusion.

1) CLINIQUE

Les principales caractéristiques cliniques de la maladie (FARRIAUX et al. 1976 (381)) sont les anomalies morphologiques évoquant la maladie de Hurler (dysmorphie faciale, hypertrophie gingivale, déformations thoraciques, hernies ombilicales), les anomalies articulaires et le retard statuzo pondéral. Le retard psychomoteur est constant et s'aggrave progressivement. L'examen radiologique montre une dysostose multiple. L'évolution conduit généralement à une issue fatale lors de la première année.

La mucopolipidose de type III ou pseudo-polydystrophie de Hurler décrite par MAROTEAUX et LAMY en 1966 (382) diffère de l'I-Cell disease par l'âge d'apparition des symptômes, ainsi que par l'atteinte squelettique nettement plus discrète. Le retard mental n'est pas systématiquement recensé (KELLY et al. 1975 (383)).

2) ETUDE HISTOLOGIQUE

Le phénotype "I Cell" est caractérisé par la présence dans le cytoplasme des fibroblastes en culture de granulations réfringentes en microscopie en contraste de phase (Fig. 17). Ces granules cytoplasmiques donnent une coloration positive au PAS et au noir soudan, suggérant une surcharge mixte à la fois glucidique et lipidique. En microscopie électronique, les vacuoles apparaissent comme délimitées par une membrane. Les mêmes inclusions se retrouvent en moins grand nombre dans les fibroblastes de mucopolipidose type III. On note également une vacuolisation des chondrocytes, des ostéocytes ainsi que des lymphocytes.

3) INVESTIGATIONS CHIMIQUES (*Nature du matériel accumulé*)

Les tentatives faites pour élucider la nature du matériel accumulé n'ont donné que des résultats assez fragmentaires et pour le moins contradictoires. DAWSON et al. 1972 (384) ont néanmoins pu mettre en évidence la présence de glycosphingolipides dans les fibroblastes en culture. Dans ces mêmes fibroblastes, la présence de mucopolysaccharides acides sulfatés a également été démontrée (SMICKEL et al. 1975 (385)). Les résultats les plus intéressants sont néanmoins ceux obtenus par THOMAS et al. 1976 (386) montrant une élévation massive du taux d'acide sialique intracellulaire dans les fibroblastes en culture. Cette observation est à mettre en parallèle avec les études d'ORRILL et al. 1972 (387) montrant une élévation du taux d'acide sialique sérique et celle de BERMAN et al. 1974a (388) montrant la présence de glycopeptides sialylés dans l'urine des malades.

4) ETUDES ENZYMATIQUES

Les mucopolipidoses II et III sont tout à fait caractéristiques

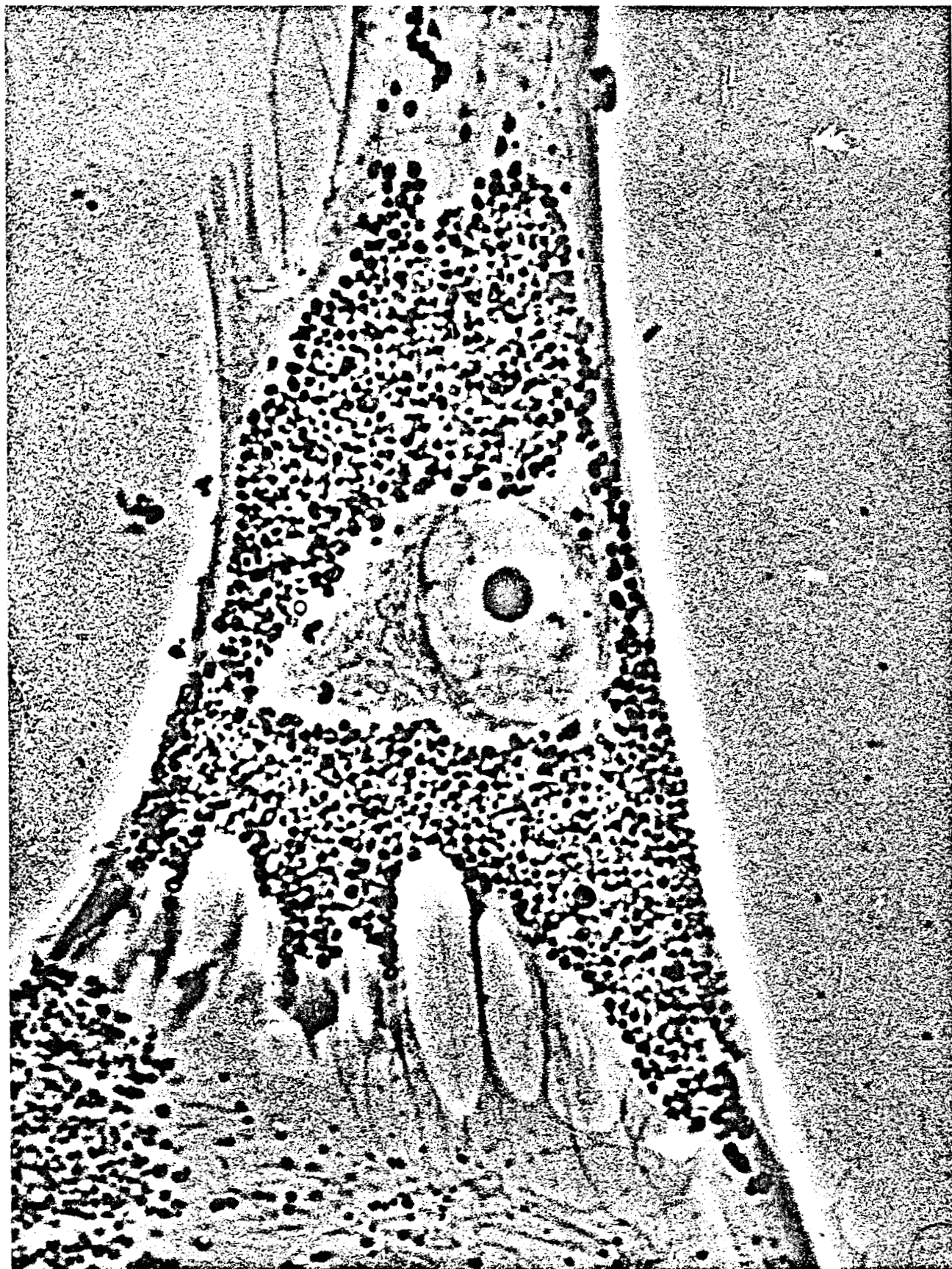


FIGURE 17

Aspect caractéristique des fibroblastes "I Cell" en microscopie de contraste de phase (Cliché fourni par le Professeur J. LEROY (ANVERS)).

de part les anomalies enzymatiques rencontrées, notamment au niveau du fibroblaste en culture.

Deux types d'anomalies sont rencontrées :

a - Distribution subcellulaire anormale des hydrolases acides au niveau des fibroblastes en culture, avec dépression de l'activité enzymatique intracellulaire, contrastant avec une élévation de ces mêmes enzymes dans le milieu de culture des cellules. Seuls trois enzymes voient leur activité inchangée : la phosphatase acide, la xylosidase et la β -glucosidase (WEISMANN et al. 1971 (389)). Une hyperactivité enzymatique est également observée dans les milieux biologiques sérum et urine notamment (HERD et al. 1978 (390)). Les enzymes leucocytaires et tissulaires conservent une activité normale à l'exception toutefois de la β -galactosidase qui voit son activité fortement abaissée. Ces anomalies de distribution ne touchent que les enzymes lysosomaux, l'activité des enzymes cytosoliques demeure inchangée.

b - Electronégativité anormale. Plusieurs auteurs ont rapporté une anomalie des migrations électrophorétiques des enzymes lysosomaux dans les mucopolysaccharidoses II et III (LIE et al. 1973 (391) ; VLADUTIU et RATAZZI 1975 (392) ; CHAMPION et SHOWS 1977 (393)), les enzymes excrétés par les fibroblastes I Cell en culture présentent en effet une électronégativité plus grande que celles sécrétées par les fibroblastes normaux. Ce phénomène serait consécutif à une hypersialylation plus grande des enzymes sécrétés par les fibroblastes "I Cell", une migration normale étant rétablie après traitement des enzymes par la neuraminidase (VLADUTIU et RATAZZI 1978 (394)). Il est à noter que l'adénosine déaminase, enzyme de nature glycoprotéinique non lysosomal voit également sa migration électrophorétique altérée.

Ces observations sont à mettre en parallèle avec certaines modifications des propriétés chromatographiques des hydrolases acides ELLIS et al. 1975 (395), ainsi qu'à leur affinité accrue pour certaines lectines telle la ricine (HIRANI et al. 1982 (396)).

5) THEORIES SUR LA PATHOGENESE DES MUCOLIPIDOSES II ET III

Différentes théories se proposaient d'expliquer les anomalies enzymatiques observées, les unes proposant une anomalie membranaire, les autres basées sur une altération des chaînes glycaniques des enzymes.

a - Anomalies membranaires.

- Altération de la membrane lysosomale : WEISMANN et HERSCHKOWITZ 1974 (397) expliquent la compartimentation enzymatique anormale, par une perméabilité excessive de la membrane du lysosome, ayant pour effet une "fuite" des enzymes vers le milieu extérieurs.

- Altération de la membrane plasmique : SLY et al. 1976 (398) se fondant sur le fait que des fibroblastes "I Cell" congelés sont difficilement remis en culture, émettent l'hypothèse d'une altération de la membrane fibroblastique. Ils constatent en outre (SCHLESINGER et al. 1978 (399) que des virus Sindbis cultivés sur fibroblastes "I Cell" présentent une sensibilité très grande à la congélation-décongélation, ainsi qu'une inactivation exagérée par le Triton X-100. Ces résultats semblent en faveur d'une altération phénotypique des virus pouvant être attribuée à des modifications de l'enveloppe virale dérivant directement de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ces modifications peuvent donc être directement rattachées au déficit génétique primaire responsable de l'"I Cell disease" (VLADUTIU et al. 1981 (400)). Les altérations membranaires ainsi observées semblent par ailleurs affecter la glycosylation puisque DI DONATO et al. 1977 (401) mettent en évidence l'activité anormale de diverses ectosyltransférases du fibroblaste.

b - Exocytose anormale. Se basant sur le fait que les fibroblastes "I Cell" puissent normalement internaliser les enzymes de fibroblastes normaux (HICKMAN et NEUFELD 1972 (402) ; VLADUTIU et RATTAZZI 1975 (403)) proposent que le taux élevé des hydrolases acides dans le milieu de culture ne serait pas dû à une fuite des enzymes des lysosomes secondaires, mais serait le résultat d'une exocytose anormale à la suite d'une fusion préférentielle des lysosomes primaires dérivant du Golgi avec la membrane

plasmique au lieu des vésicules pinocytiques. L'hypersialylation des enzymes préalablement notée empêcherait alors leur réinternalisation par un processus de reconnaissance de type "Ashwell". Un phénomène d'exocytose anormale est également invoqué par LLOYD 1977 (404) pour qui l'altération résiderait en la déficience d'un récepteur permettant l'"ancrage" des enzymes à la membrane du lysosome, ces derniers se déverseraient alors dans le milieu extracellulaire lors des phénomènes de recyclage membranaire.

c - *Modification des chaînes glycaniques des enzymes.* L'hypothèse de la "secrétion-recapture" énoncée par NEUFELD et al. 1977 (405), et préalablement mentionnée dans le chapitre "Généralités" de ce mémoire, est la plus couramment retenue pour rendre compte du déficit primaire dans les mucopolipidoses II et III. Le fait que les enzymes secrétés par les fibroblastes "I Cell" soient incapables d'être internalisés par les fibroblastes normaux (HICKMAN et al. 1974 (406)) a conduit NEUFELD a mettre en hypothèse la modification d'un signal de reconnaissance, vraisemblablement de nature glucidique, nécessaire à l'endocytose des enzymes lysosomaux par les cellules, suivant un processus ligand-récepteur analogue à celui décrit par ASHWELL pour les protéines plasmatiques. Des études de composition en sucre d'enzymes purifiés à partir de cellules ou de milieux biologiques de mucopolipidose II et III (MILLER et al. 1981 (407) ; KRESS et al. 1980 (408) ; HIRANI et al. 1982 (409)) confortent cette hypothèse, soulignant une forte élévation du taux de galactose et d'acide sialique par rapport au mannose.

D - MUCOLIPIDOSE DE TYPE IV

Nous ne ferons que mentionner cette maladie qui n'a pas fait l'objet de notre étude, mais dont tous les caractères cliniques et surtout histochimiques permettent sa classification comme mucopolipidose.

Le premier cas de cette maladie relativement rare atteignant les Juifs Askenazes fut décrit par BERMAN et al. 1974a (410), comme un syndrome neurodégénératif à évolution lente, sans atteinte squelettique ou hépatosplénomégalie, avec opacités cornéennes bilatérales. Les principales observations sont d'ordre ultrastructural mettant en évidence la présence

d'inclusions granulaires et/ou de corps lamellaires dans la majorité des tissus (LIVNI et MERIN 1978 (411)).

Une surcharge mixte, à la fois mucopolysaccharidique et gangliosidique (GM_3 et GD_3) a été caractérisée dans les fibroblastes (BACH et al. 1975 (412) ; BACH et al. 1977 (413)).

II - ÉTUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT LES DIFFÉRENTS TYPES DE MUCOLIPIDOSES

A - ÉTUDE CHIMIQUE

L'ensemble des observations histochimiques et chimiques concernant la nature du matériel accumulé au cours des mucolipidoses, notamment l'élévation anormale du taux d'acide sialique était en faveur d'un dérèglement du catabolisme des glycoconjugués glycoprotéines ou gangliosides.

Dans cette optique, STRECKER et al. 1976 (414) avait recherché une éventuelle oligosaccharidurie chez les malades pouvant refléter un tel dysfonctionnement. Cette première étude s'était concrétisée par l'isolement et la caractérisation de 3 sialyl-oligosaccharides anormaux dans l'urine de patients atteints de mucolipidose de type II.

Nous avons quant à nous étendu cette étude à l'urine et aux tissus de patients atteints de différents types de mucolipidoses, et nous nous sommes attachés à l'isolement et l'étude chimique de plus de 20 sialyloligosaccharides de l'urine de ces malades. Ces travaux sont rapportés dans les ARTICLES 1 et 2.

Structure of Nine Sialyl-Oligosaccharides Accumulated in Urine of Eleven Patients with Three Different Types of Sialidosis Mucopolidosis II and Two New Types of Mucopolidosis

Gérard STRECKER, Marie-Claire PEERS, Jean-Claude MICHALSKI, Théophile HONDI-ASSAH, Bernard FOURNET, Geneviève SPIK, Jean MONTREUIL, Jean-Pierre FARRIAUX, Pierre MAROTEAUX, and Paolo DURAND

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I
et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique No. 217, Villeneuve d'Ascq;
Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules Driessens)
et Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille;
Service de Pédiatrie de la Cité Hospitalière de Lille; Hôpital des Enfants-Malades, Paris;
and Istituto Giannina Gaslini, Geneva Quarto

(Received November 22, 1976)

Urine of 11 patients with three different types of mucopolidosis characterized by a total or partial sialidase deficiency, were studied. In all cases, we found an important accumulation of sialyl-oligosaccharides. The structure of 9 of them has been determined:

α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)- β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)- β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)[α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)]
 α -Man-(1→3)- β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[α -AcNeu-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc,
 α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→3)[α -AcNeu-(2→6)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc-(1→2)- α -Man-(1→6)] β -Man-(1→4)-GlcNAc.

All these compounds are products of incomplete catabolism of glycoproteins and result from the action of a new type of β -endo-*N*-acetylglucosaminidase able to act on sialylated glycoproteins or glycopeptides. The term sialidosis is proposed for these three types of oligosaccharidosis.

Mucopolidosis II (I-Cell disease) is a genetic error of metabolism associated with mental retardation, early severe clinical symptoms such as hypertrophy

of the gingiva, thickened skin, minimal hepatosplenomegaly, joint limitations, severe bony abnormalities like those found in mucopolysaccharidosis [1–4]. The decrease of the activities of numerous hydrolases in cultured fibroblasts and the increase of these same activities in serum and culture medium, as well as the absence of abnormal mucopolysacchariduria are the essential points of the diagnosis. In addition, we found an increased level of urinary sialyl-oligosaccharides and a sialidase deficiency in leucocytes [5–7]. This observation has been confirmed for fibroblasts [8].

G.S. and P.M. are Maîtres de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique.

Abbreviations. Gal, D-galactose; Fuc, L-fucose; Man, D-mannose; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; AcNeu, *N*-acetylneuraminic acid.

Enzymes. Neuraminidase (EC 3.2.1.18); β -galactosidase (EC 3.2.1.23); β -*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.30); α -mannosidase (EC 3.2.1.24); β -mannosidase (EC 3.2.1.25).

Sialyl-Oligosaccharides from Urine of Patients with Sialidosis

Mucopolipidosis W. (Mande, unpublished results) is characterized by clinical and radiological aspects similar to other mucopolipidosis, but with renal insufficiency. An increase of the activity of some hydrolases in the cells was observed. Excretion of urinary sialyl-oligosaccharides is 10 times higher than in the case of I-Cell disease [5]. Sialidase activity is lacking in the leucocytes, as in the case of I-Cell disease (to be published).

The only clinical characteristic of mucopolipidosis De P. (Durand, unpublished results) is a red spot on the bottom of the eyes and dyschromatopsy. Diagnosis of this new type of mucopolipidosis is based only on the observation of a very large excretion of urinary sialyl-oligosaccharides [5,6]. The sialidase activity in leucocytes was 18 and 20% of the normal values for the brother and sister, who are still alive (22 and 9 years old), and do not show new significant clinical symptoms or mental retardation.

In a first paper, we proposed the structure of the three major components isolated from the urine of five patients [6]. In the present paper, we give the structure of nine sialyl-oligosaccharides present in the urine of eleven patients we studied. On the other hand, we found the same oligosaccharides in the liver and in the brain of one patient with I-Cell disease.

MATERIAL AND METHODS

Fractionation of Urines

Urines of 11 patients: Cathia and Sylvana R., Rose-Hélène and Marie-France D., Séverine K., Karin Z. and Nicolas N., with mucopolipidosis II (I-Cell disease), Pierre Alexandre and Laura W., with a new type of mucopolipidosis (mucopolipidosis W.), and Fiorenzo and Christina De P. (mucopolipidosis De P.) were fractionated according to the scheme described on Fig. 1.

Fractionation of Liver Oligosaccharides

Liver was homogenized and extracted with water. Oligosaccharides were isolated from the aqueous solution as described for urinary extracts.

Chromatography and Electrophoretic Procedures

Solvent, ethyl acetate, pyridine, acetic acid/water (5/5/1/3, by vol.); buffer pH 5.4, pyridine 15 ml, water 1935 ml, pH adjusted to 5.4 with acetic acid; buffer pH 3.9, pyridine/acetic acid/water (30/100/3870, by vol.). Spots were stained with aniline oxalate (aniline 2 ml; ethanol 100 ml; 2.5% oxalic acid; water 150 ml), and the chromatograms heated at 120 °C for 15 min.

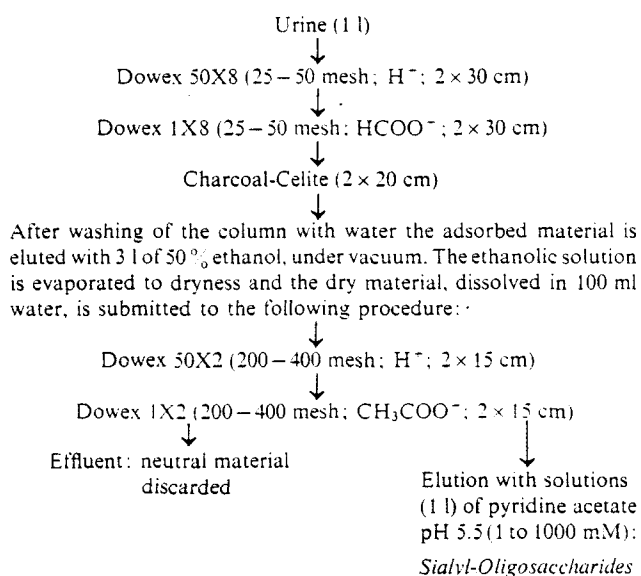


Fig. 1. Urine fractionation

Analytical Methods

The molar ratios of hexoses, *N*-acetylhexosamines and *N*-acetylneuraminic acid were determined according to Zanetta [9], after methanolysis with methanol/0.5 M HCl, for 24 h at 100 °C. Molar ratios of glucosamine and amino acids were determined using a Beckman analyser, after hydrolysis in 4 N or 5.6 M HCl for 12 or 24 h at 100 °C.

Structural Methods

The sugar at the reducing position was identified as a polyol after reduction with potassium borohydride and hydrolysis with 4 N CF₃COOH for 4 h at 100 °C. The nature of the substitution on *N*-acetylglucosamine in reducing position was determined by analysis of chromogens obtained after the action of 1.25 M sodium carbonate for 15 min at 100 °C. The reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde-HCl is negative in the case of (1 → 4) linkage, positive in the other cases: (1 → 3) and (1 → 6).

Methylation was carried out according to Hakomori [10] after reduction of the oligosaccharides by potassium borohydride. *O*-Methyl ethers were identified according to Fournet and Montreuil [11].

Smith degradation was carried out as follows: 10 mg of reduced oligosaccharide were dissolved in 15 ml of 0.02 M NaIO₄, 0.05 M NaCH₃COO (pH 4.5). After being allowed to react at 4 °C for at least 2 days, the oxidized sample was adjusted to pH 7.0 and treated with potassium borohydride. After one night at 4 °C, the excess borohydride was destroyed by adjusting the solution to pH 4.0 and then readjusting to neutrality. The oxidized-reduced oligosaccharide was isolated on a column (2 × 80 cm) of Sephadex G-10

and then hydrolyzed with 0.05 M H₂SO₄ (20 °C, 18 h). After purification with anion exchanger (Dowex 1X8; 25–50 mesh; HCOO⁻), the oligosaccharide was submitted to a second step of Smith degradation.

Acetolysis was carried out according to Bayard and Montreuil [12]. The time of reaction was reduced to 1 h in order to split specifically (1→6) linkages. Hydrazinolysis-nitrous deamination and fractionation of the products of the reaction were carried out according to Bayard *et al.* [13]. Oligosaccharides were successively digested with the following enzymes: neuraminidase from *Clostridium perfringens*, β-galactosidase and *N*-acetyl-β-hexosaminidase from ox spleen, α-mannosidase from Jack bean meal and β-mannosidase from *Aspergillus niger* [14]. Liberated monosaccharides and resulting oligosaccharides were analysed and isolated by paper chromatography.

RESULTS

Fractionation of Sialyl-Oligosaccharides

As it can be seen in Tables 1 and 3 and in Fig. 2 and 3, the fractions eluted from the anion-exchange column by a discontinuous gradient of pyridine acetate contain only a small amount of sialyl-oligosaccharides in the case of normal urines. On the contrary, in the 11 cases of mucopolipidosis we studied, large amounts of sialyl-oligosaccharides were found. These were characterized by paper chromatography, developed for 5 to 36 days (Fig. 2–5). The chromatograms were very similar in all cases. Electrophoresis was also a convenient procedure for the characterization of these acidic components (Fig. 6).

Isolation of Sialyl-Oligosaccharides

The acidic components present in the 11 urines were isolated by paper chromatography developed for 6 to 36 days. The purity of products was verified by electrophoresis in pH 3.9 and 5.4 buffers which were further used for preparative electrophoresis. It was impossible to estimate the homogeneity of isolated products without another solvent system capable of high resolution and the purity was judged with regard to the molar ratios and the analysis of results of permethylation. The majority of the products accumulated in the urine were oligosaccharides, but some glycopeptides were also found.

In all cases we studied, 9 to 11 oligosaccharides were isolated in a pure state, and more than 10 other components were characterized which will be further investigated.

The fact that the chromatographic patterns are identical is in a good agreement for the identity of the structure of the sialyl-oligosaccharides excreted in these three diseases.

Structure of Oligosaccharides Excreted in Urine of One Case of Mucopolipidosis II (Cathia R.)

Ten major components were isolated and the structure of nine of them was studied. Molar ratios were determined (Table 1) and results of methylation (Table 2) and enzymatic hydrolysis allowed us to propose the structures given in Fig. 10.

Oligosaccharide I. Methanolysis of oligosaccharide I, followed by trifluoro-acetylation, gave trifluoroacetate ethers of methylsides of galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 0.91 : 2 : 2.07 : 1.05. The methylation analysis gave methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside and methyl 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside in the molar proportions of 1.0 : 1.25 : 0.88. *N*-Methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine was also identified. *N*-Acetylglucosamine in reducing position was identified as glucosaminitol after reduction and hydrolysis. This *N*-acetylglucosamine was substituted in C-4 position, since no free or conjugated chromogen was obtained after alkaline treatment. The oligosaccharide I was successively digested with the following enzymes: α-neuraminidase, α-neuraminidase plus β-galactosidase, α-neuraminidase plus β-galactosidase plus β-*N*-acetylglucosaminidase. We obtained successively the liberation of neuraminic acid, galactose and *N*-acetylglucosamine. After the third step of enzymatic degradation, an oligosaccharide was obtained, having the same migration rate that the compound α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc isolated from urine of a patient with mannosidosis. This oligosaccharide was isolated by paper chromatography and submitted to enzymatic hydrolysis with α-mannosidase and α-mannosidase plus β-mannosidase, which liberated mannose and a disaccharide, in a first step, and mannose and *N*-acetylglucosamine, in a second step. In addition, one step of Smith degradation of reduced oligosaccharide I gave disaccharide mannose-*N*-acetylxylosaminitol, proving the element of structure: Man-(1→3)-Man-(1→4)-GlcNAc. These results together show that oligosaccharide I has the structure α-AcNeu-(2→3)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc.

Oligosaccharide II contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 1.04 : 2 : 1.78 : 1.02. *N*-Acetylglucosamine was identified as a reducing end and did react with *p*-dimethylaminobenzaldehyde after alkaline treatment, proving a C-4 substitution. The methylation analysis gave methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside and methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside in the molar ratios of 1.0 : 1.12 : 0.90. *N*-Methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine was also identified. The exact structure was established in regard to the results obtained by en-

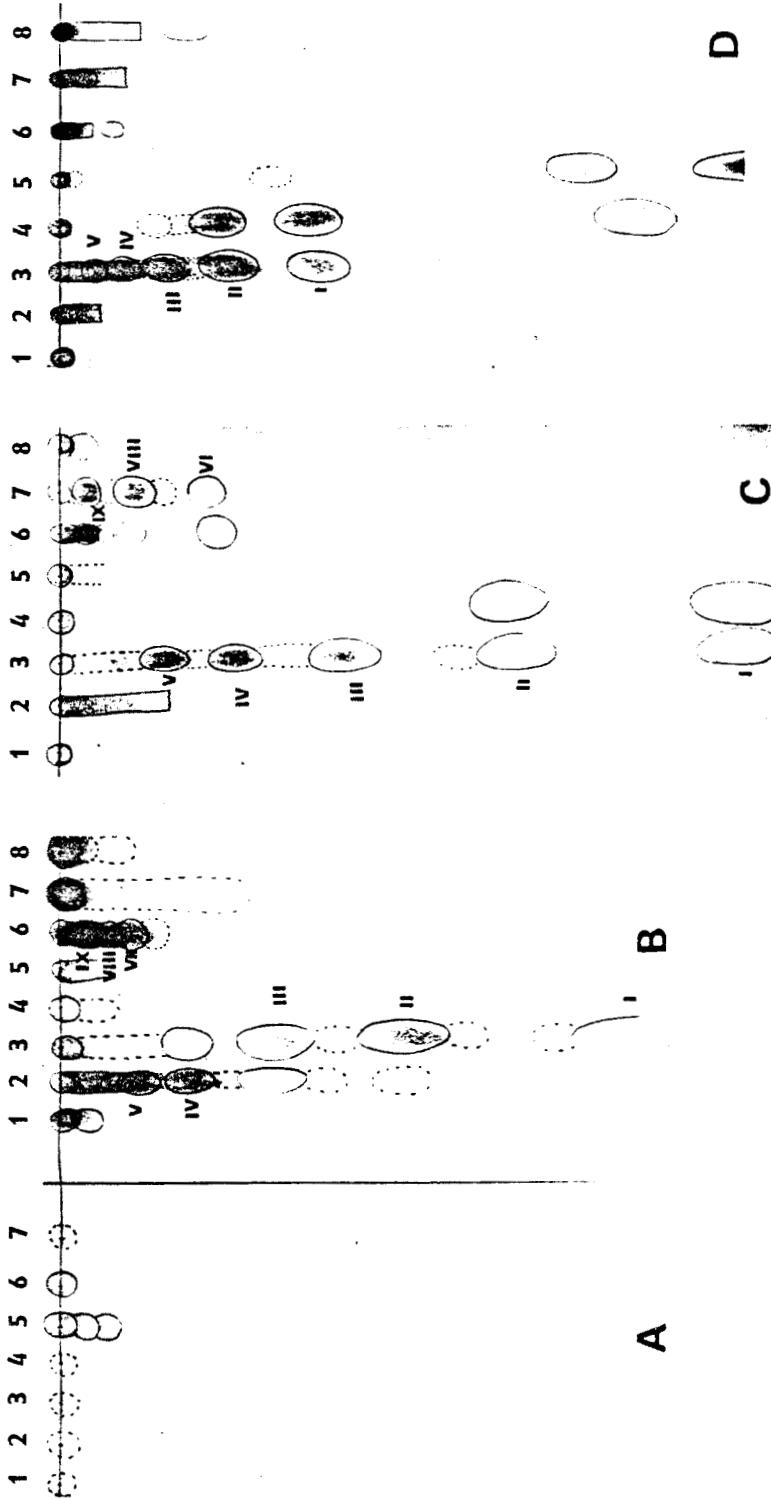


Fig. 2. *I-Cell disease*. Paper chromatography of urinary sialyl-oligosaccharides eluted from anionic exchanger by discontinuous gradient of pyridine acetate. 1: 1 mM; 2: 2 mM; 3: 5 mM; 4: 10 mM; 5: 20 mM; 6: 50 mM; 7: 100 mM; 8: 200 mM; 9: 500 mM; 10: 1000 mM. (A) Normal urine. (B, C and D) *I-Cell disease* urines. Solvent: ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5/5/1/3). Time of migration: A, B and C: 12 days; D: 6 days

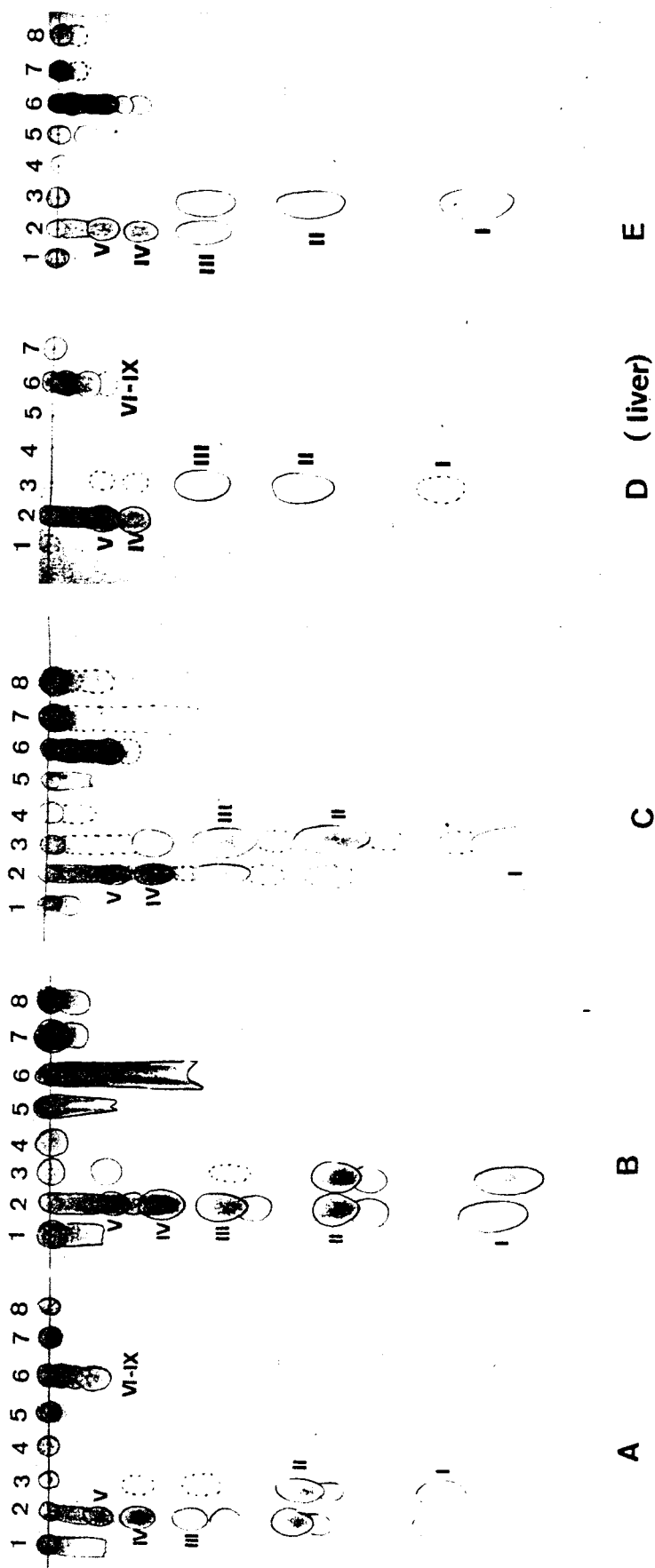


Fig. 3. *I-Cell* disease. (A, B, C and E) Urine of 4 other patients. (D) Liver extract of patient E. Chromatography conditions, 8 days. See legend to Fig. 2 for further details

BHS

Sialyl-Oligosaccharides from Urine of Patients with Sialidosis

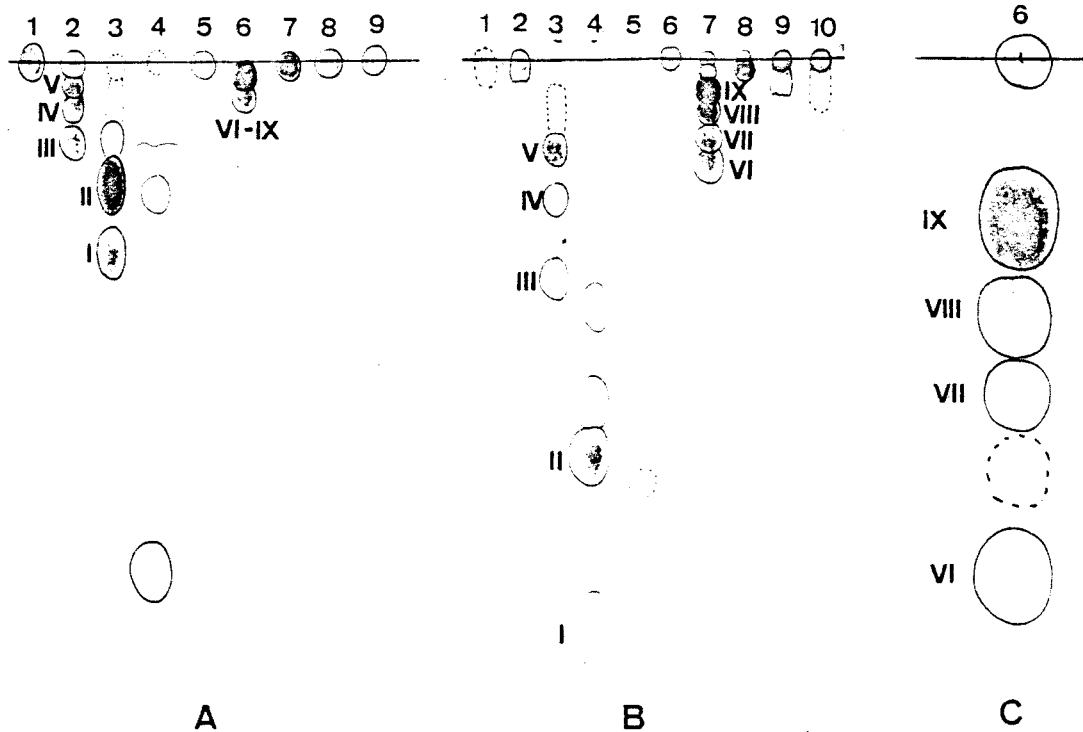


Fig. 4. *Mucopolipidosis W.* (A) Pierre-Alexandre W.; (B) Laura W. Time of migration: 5 days for A and 10 days for B. (C) Fraction 6 of A chromatographed during 36 days. See legend to Fig. 2 for further details

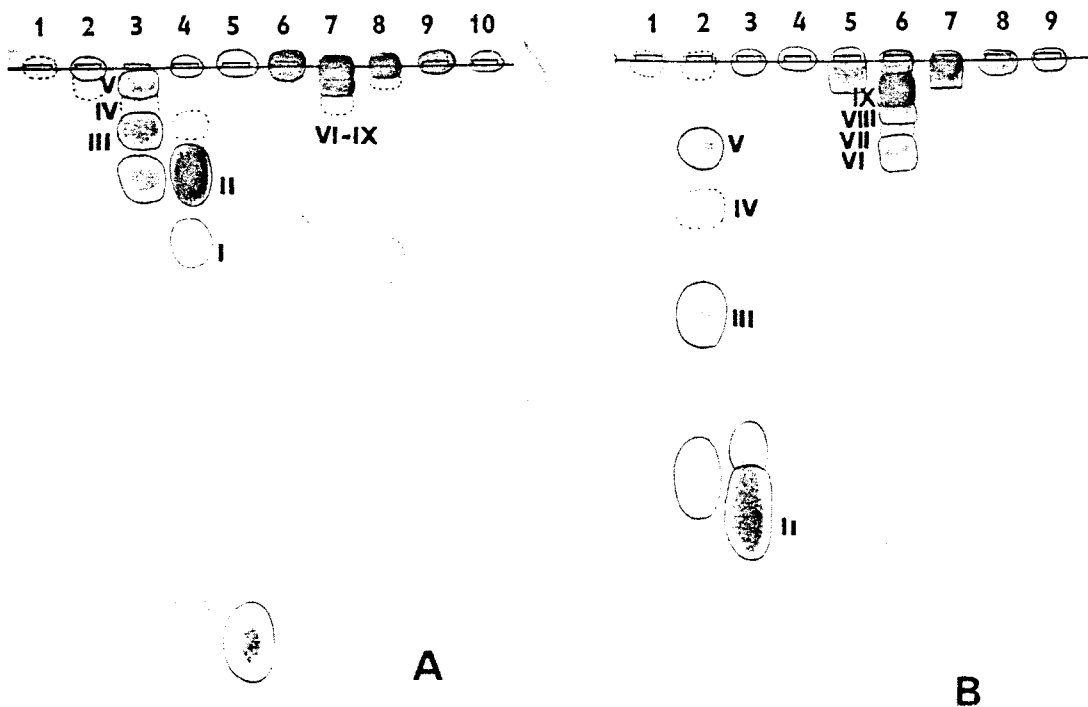


Fig. 5. *Mucopolipidosis De P.* (A) Fiorenzo De P. (B) Christina De P. Time of migration: A, 4 days; B, 14 days. See legend to Fig. 2 for further details

zymatic hydrolysis and Smith degradation, which gave the same results than in the case of oligosaccharide I. The structure of oligosaccharide II was established as follows: α -AcNeu-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)- β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc.

Oligosaccharide III contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 0.95 : 3 : 2.28 : 0.95. *N*-Acetylglucosamine was in reducing position and substituted on carbon 4. The methylation analysis gave methyl 2,3,4,6-

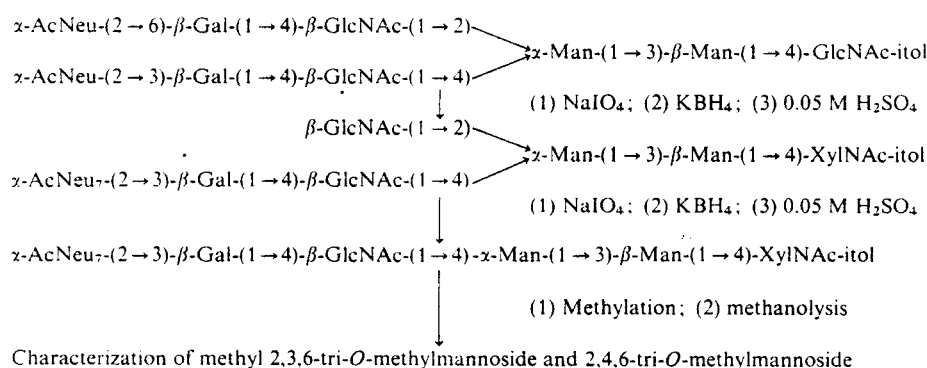


Fig. 7. Smith degradation of reduced oligosaccharide VI. AcNeu₇, 5-acetamido-3,5-dideoxy-L-arabino-2-heptulosonic acid; XylNAc-itol, N-acetyl-D-xylosaminitol

tetra-*O*-methylmannoside, methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside and methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside in the molar proportions of 0.75 : 1.0 : 0.77 : 0.92 and *N*-methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine. After the action of α -mannosidase, we obtained a compound having the same migration rate than oligosaccharide II and which gave, after methylation analysis, methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside and methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside. The structure of oligosaccharide III was established as follows: $\alpha\text{-AcNeu}-(2 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 3)[\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 6)]\beta\text{-Man}-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcNAc}$.

Oligosaccharide IV contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 1.69 : 3 : 2.90 : 0.95. *N*-Acetylglucosamine was identified as a reducing end, and did not give chromogens after alkaline treatment. Methylation analysis gave methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactoside, methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside and methyl 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside in the molar proportions of 1.14 : 2.0 : 0.82 : 1.24. The methylated osamine was identified as *N*-methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine. The conjugated action of β -galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase liberated an oligosaccharide identical to oligosaccharide I, as it was demonstrated by methylation analysis. In conclusion, the following structure was proposed: $\alpha\text{-AcNeu}-(2 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 3)[\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 6)]\beta\text{-Man}-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcNAc}$.

Oligosaccharide V contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 1.89 : 3 : 3.09 : 0.96. Methylation analysis gave methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactoside, methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside and methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside in the molar proportions of 1.12 : 2 : 1.12

: 0.94. *N*-Methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine was also identified. After the action of β -galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase we obtained an oligosaccharide identical to compound II, as it was demonstrated by methylation analysis. The following structure was proposed for oligosaccharide V: $\alpha\text{-AcNeu}-(2 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 3)[\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 6)]\beta\text{-Man}-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcNAc}$.

Oligosaccharide VI contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylneuraminic acid in the molar proportions of 1.72 : 2 : 2.95 : 1.96. Methylation analysis gave methyl 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside, methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside and methyl 3,6-di-*O*-methylmannoside in the molar proportions of 1.0 : 1.14 : 0.84 : 0.82 and *N*-methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine. The position of sialic acid residues was elucidated according to the scheme described in Fig 7. After two steps of Smith degradation, methylation of oxidized reduced oligosaccharide gave a mixture of methyl 2,3,6-tri-*O*-methylmannoside and 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside, proving the proposed structure. Enzymatic hydrolysis was carried out with a mixture of α -neuraminidase, β -galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase and gave a compound having the same migration rate than the oligosaccharide $\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Man}-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcNAc}$. These results allowed us to propose the structure $\alpha\text{-AcNeu}-(2 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 2)\text{-}[\alpha\text{-AcNeu}-(2 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1 \rightarrow 4)]\text{-}\alpha\text{-Man}-(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Man}-(1 \rightarrow 4)\text{-GlcNAc}$.

Oligosaccharide VII contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 1.75 : 3 : 2.93 : 1.89. Methylation analysis gave methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside and methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside in the molar proportion of 2.0 : 2.14 : 0.88, and *N*-methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine. Enzymatic hydrolysis was carried out according

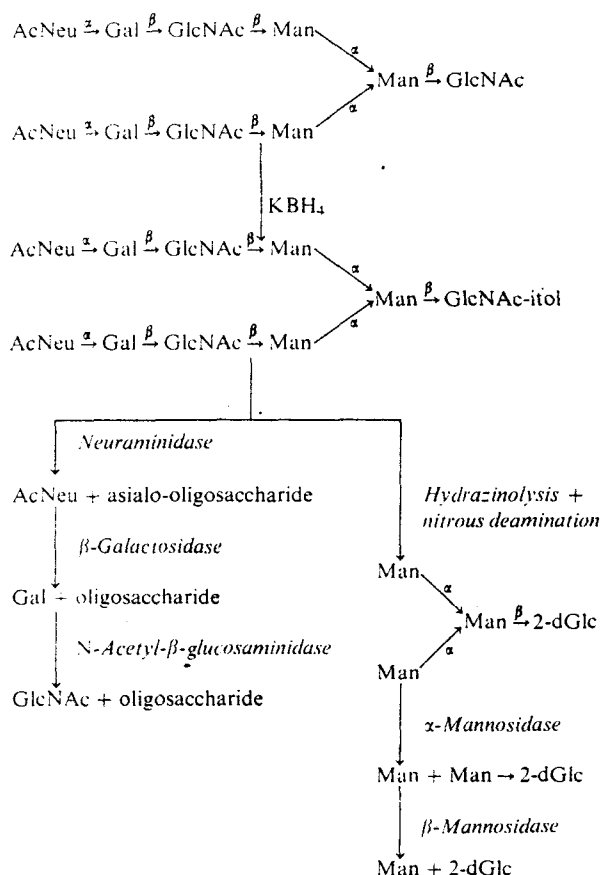


Fig. 8. Enzymatic and chemical degradation of oligosaccharides VII, VIII and IX. GlcNAc-itol, *N*-acetylglucosaminitol; 2-dGlc, 2-deoxyglucose

to the scheme described in Fig. 8. The structure of oligosaccharide VII was established as follows: $\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)[}\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)]}\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc}$.

Oligosaccharide VIII contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 1.91 : 3 : 2.89 : 1.81. Methylation analysis gave methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside, methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside and methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside in the molar proportions of 2.0 : 1.14 : 1.12 : 0.94. Methylated hexosamine was *N*-methyl 3,6-di-*O*-methylglucosamine. Partial acetolysis of oligosaccharide VIII liberated an oligosaccharide having the same migration rate as oligosaccharide II. Oligosaccharide I was not found in acetolysates, and, considering the extreme lability of (1 \rightarrow 6) linkage, the following structure has been proposed: $\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)[}\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)]}\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc}$.

Table 3. Sugar composition of oligosaccharides isolated from urine of a patient with a new type of mucopolidosis (Laura W.) For quantity see legend of Table 1

| Oligo-saccharide | Quantity mg/l | Molar ratios | | | |
|------------------|------------------|--------------|-----|--------|-------|
| | | Gal | Man | GlcNAc | AcNeu |
| I | 28 | 1.02 | 2 | 2.12 | 0.94 |
| II | 125 | 1.01 | 2 | 1.89 | 0.96 |
| III | 15 | 1.06 | 3 | 1.87 | 1.11 |
| IV | 5 | 2.24 | 3 | 3.20 | 0.96 |
| V | 10 | 2.20 | 3 | 3.00 | 1.10 |
| VI | 15 | 1.72 | 2 | 2.95 | 2.18 |
| VII | 24 | 1.74 | 3 | 2.76 | 1.95 |
| VIII | 48 | 1.72 | 3 | 2.84 | 2.20 |
| IX | 160 | 2.12 | 3 | 2.99 | 2.08 |
| X | 17 | 2.84 | 3 | 3.66 | 1.66 |
| XI | 8 | 3.20 | 3 | 3.75 | 1.90 |

Oligosaccharide IX contains galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine and neuraminic acid in the molar proportions of 2.12 : 3 : 3.08 : 1.96. Methylation analysis gave methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside, methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside and methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside in the molar proportions of 2.0 : 2.12 : 1.16. Enzymatic hydrolysis was carried out according to the scheme described in Fig. 8. The structure of oligosaccharide IX was established as follows: $\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)[}\alpha\text{-AcNeu-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)]}\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc}$.

Structure of Oligosaccharides Excreted in Urine of Mucopolidosis W.

Eleven sialyl-oligosaccharides were isolated and molar ratios are given in Table 3. The results of methylation of compounds I to IX are described in Table 4 and Fig. 9. These results, associated with enzymatic hydrolysis and Smith degradation, prove the identity of these structures with those of Cathia R. oligosaccharides.

Structure of Oligosaccharides Excreted in Urine of Mucopolidosis De P.

Using the same methods, we demonstrated that the structures of the 9 major oligosaccharides isolated in this case were identical to those previously described. For the patient (Fiorenzo De P.) we studied, the amount of each component was as follows (mg/l): I: 4 mg; II: 140 mg; III: 14 mg; IV: 2 mg; V: 20 mg; VI: 8 mg; VII: 1.5 mg; VIII: 5 mg; IX: 110 mg.

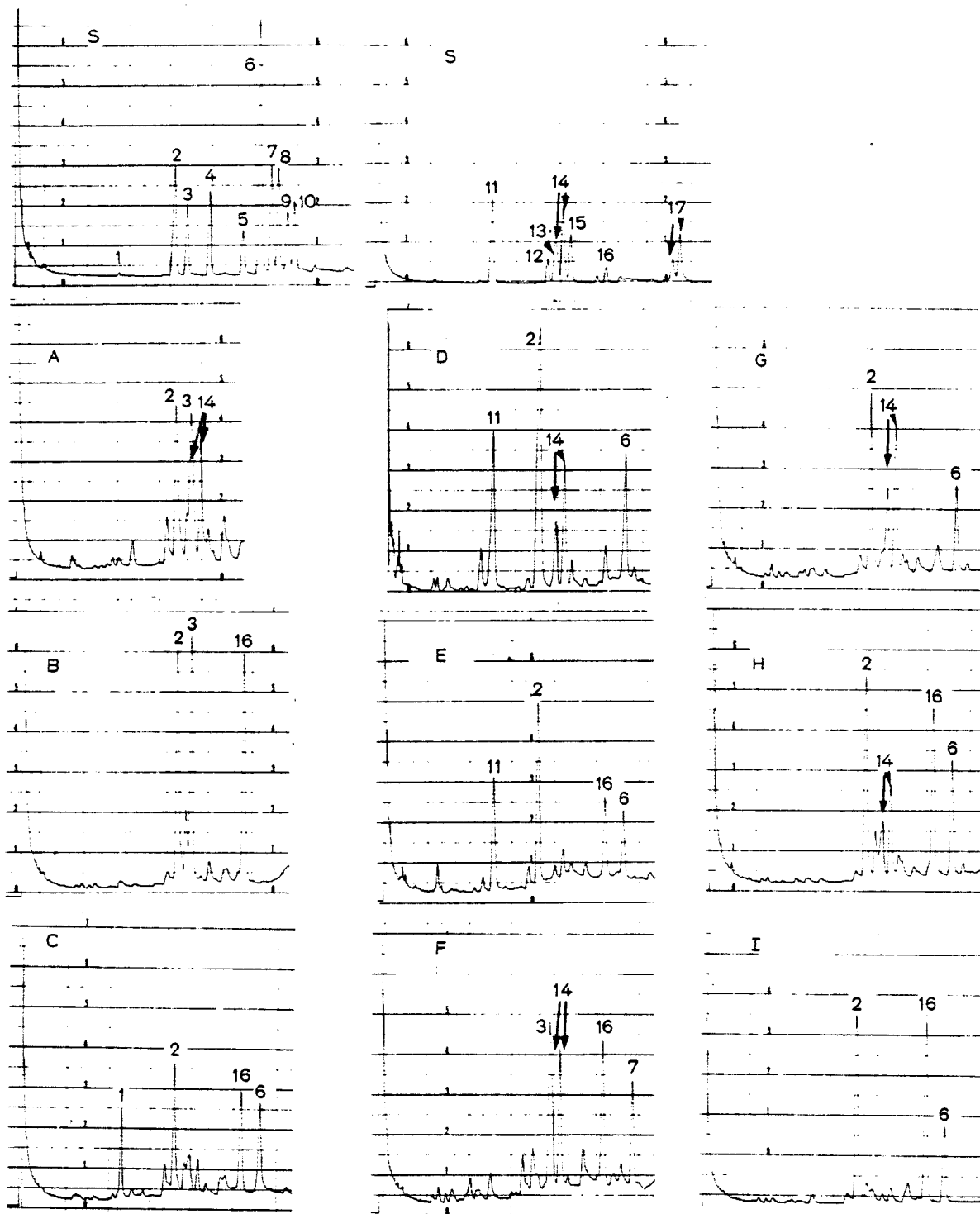


Fig.9. *Mucopolipidosis W.* (Laura W.). Gas chromatography of neutral monosaccharides methyl ethers obtained by methanolysis of permethylated oligosaccharides. Aerograph 1200 apparatus, glass column (0.2 x 300 cm), 3%, of Carbowax 6000 on Chromosorb W-HMTS (60-80 mesh), 110 to 200°C (2°C/min), nitrogen: 30 ml/min. (S) standards: (1) methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannoside; (2) methyl 3,4,6-tri-*O*-methylmannoside; (3) methyl 2,4,6-tri-*O*-methylmannoside; (4) methyl 2,3,6-tri-*O*-methylmannoside; (5) methyl 3,4-di-*O*-methylmannoside; (6) methyl 2,4-di-*O*-methylmannoside; (7) methyl 3,6-di-*O*-methylmannoside; (8) methyl 2,6-di-*O*-methylmannoside; (9) methyl 4,6-di-*O*-methylmannoside; (10) methyl 2,3-di-*O*-methylmannoside; (11) methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactoside; (12) methyl 2,3,6-tri-*O*-methylglucoside; (13) methyl 3,4,6-tri-*O*-methylgalactoside; (14) 2,4,6-tri-*O*-methylgalactoside; (15) methyl 2,3,6-tri-*O*-methylglucoside; (16) methyl 2,3,4-tri-*O*-methylgalactoside; (17) methyl 2,4-di-*O*-methylgalactoside. (A to I) oligosaccharides I to IX

in literature. The electrophoretic changes in excreted *N*-acetylhexosaminidases in I-Cell disease [15], as well as the non-uptake of abnormal lysosomal enzymes excreted from I-Cell fibroblasts [16,17] by normal fibroblasts suggest that in I-Cell disease a defect in the control of exocytosis resulting in abnormal enzyme excretion is probably the direct consequence of sialidase deficiency, in regard to Ashwell's theory [18]. However many points remain obscure. First, it is difficult to understand the mechanism of the accumulation of sialyl-oligosaccharides in liver and brain, which is in contradiction with the observations of Ashwell *et al.* [18]. Secondly, the mucopolipidosis W. and De P. are not accompanied by the release of cellular hydrolases. However, it is possible that the enzymatic defect, in these two cases of mucopolipidosis, concerns another form of sialidase, since we observe (Fig. 2-5 and Tables 1 and 3) that the relative proportions of sialyl linkages (2→6)/(2→3) for the accumulated products are approximately 1 for I-Cell disease, 5 to 8 for mucopolipidosis W. and 20 for mucopolipidosis De P. The neuraminidase assay was realized on leucocytes with a natural substrate having sialyl (2→6) linkage [7]. The results were zero percent for I-Cell disease, 6% for mucopolipidosis W. and 18 and 22% for the two cases of mucopolipidosis De P. Thus it could be suggested that I-Cell disease is accompanied by a total deficit in $\alpha(2\rightarrow3)$ and $\alpha(2\rightarrow6)$ sialidase, while mucopolipidosis De P. is characterized by only a partial $\alpha(2\rightarrow6)$ sialidase deficit and we are trying to demonstrate this specificity of sialidases.

It is also interesting to observe that liver of a patient with I-Cell disease preferentially accumulated oligosaccharides with $\alpha(2\rightarrow6)$ sialyl linkages (Fig. 3D). This observation can be explained by a selective synthesis of glycanic structures with sialyl (2→6) linkage by the liver, or by a selective catabolism or uptake of sialyl conjugates according to their sialyl linkage. A comparison of the accumulated sialyl-oligosaccharides with literature data concerning glycoproteins [19] shows that only oligosaccharides II, III, V and IX have been observed in known glycoprotein structures, in opposition to other structures containing $\alpha(2\rightarrow3)$ sialyl linkage or $\alpha(2\rightarrow3)$ and (2→6) sialyl linkages in the same molecule. On the other hand, the urines we studied contained 10 to 15 other minor components, the structures of which are being studied. If we hypothesize that these sialyl-oligosaccharides correspond to all the possible structures of glycans found in the human organism, we can already predict all possible glycoprotein structures. The present results demonstrate a very large heterogeneity of these structures and it will be interesting to study their localization in tissues.

Of particular interest is the observation that all these oligosaccharides possess a *N*-acetylglucosamine residue in the terminal reducing position. This result

is in a good agreement with the hypothesis of the existence of a β -endo-*N*-acetylglucosaminidase which is able to split glycans even if they are sialylated [19,20] as in the case of glycans of "oligomannosidic type" [19,21]. This enzyme remains to be characterized among mammalians.

In agreement with literature, we have used the term of mucopolipidosis in this paper. As the word "mucopolipidosis" does not correspond to any accepted term of nomenclature for glycoconjugates, we propose to call these three types of oligosaccharidosis "sialidosis", in regard to the nature of enzymatic defect and accumulated material as was done for mannosidosis [22] and fucosidosis [23].

This work was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé n° 217: Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués and ATP Pharmacodynamie et chimiothérapie, contract 5703)*, by the *Fondation pour la Recherche Médicale Française* and by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*. The authors are indebted to Y. Leroy (C.N.R.S. technician), J. P. Decottignies, A. F. Bouquelet and A. Lemaire-Poitau for their skilful technical assistance.

REFERENCES

1. Wiesman, U. N., Vassella, F. & Herschkowitz, N. N. (1974) *Acta Paediatr. Scand.* 63, 9-16.
2. Terashima, Y., Tsuda, K., Isomura, S., Sugiura, Y. & Nogami, H. (1975) *Am. J. Dis. Child.* 129, 1083-1090.
3. Blank, E. & Linder, D. (1974) *Pediatrics*, 54, 797-805.
4. Leroy, J. G. & DeMars, R. I. (1967) *Science (Wash. D.C.)* 157, 804-805.
5. Strecker, G., Fournet, B., Hondi-Assah, T., Spik, G., Montreuil, J., Maroteaux, P., Durand, P. & Farriaux, J.-P. (1976) *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* 282, 671-673.
6. Strecker, G., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Maroteaux, P., Durand, P. & Farriaux, J.-P. (1976) *Biophys. Biochem. Acta*, 444, 349-358.
7. Strecker, G., Michalski, J.-C., Farriaux, J.-P. & Montreuil, J. (1976) *Bioméd. Exp.* 25, 238-240.
8. Thomas, G. H., Tiller, G. E., Reynolds, L. W., Miller, C. S. & Bace, J. W. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 188-195.
9. Zanetta, J. P., Breckendrige, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-301.
10. Hakomori, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205-208.
11. Fournet, B. & Montreuil, J. (1973) *J. Chromatogr.* 75, 29-37.
12. Bayard, B. & Montreuil, J. (1972) *Carbohydr. Res.* 24, 427-443.
13. Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) *Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués*, pp. 209-218, C.N.R.S. éd., Paris.
14. Spik, G., Bouquelet, S. & Decottignies, J. P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
15. Vladutiú, G. D. & Rattazi, M. C. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 956-964.
16. Hickman, S. & Neufeld, E. F. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 992-999.
17. Hickman, S., Shapiro, L. J. & Neufeld, E. F. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 55-61.
18. Aswell, G., Morell, A. G. (1971) *Glycoproteins of Blood Cells and Plasma* (Jamieson, G. A. & Greenwalt, T. J., eds) p. 173. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

G. Strecker *et al.*

19. Montreuil, J. (1975) *Pure Appl. Chem.* 42, 431–477.
20. Strecker, G. & Montreuil, J. (1977) *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* in press.
21. Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Abrakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., Inoue, Y. & Kobata, A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8569–8575.
22. Öckerman, P. A. (1974) in *Lysosomes and Storage Diseases* (Hers. H. G. & Van Hoof, F., eds) pp. 291–304, Academic Press, New York.
23. Durand, P., Borrone, C. & Della Cella, G. (1969) *J. Pediatr.* 75, 665–674.

G. Strecker*, M.-C. Peers, J.-C. Michalski, T. Hondi-Assah, B. Fournet, G. Spik, and J. Montreuil
Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technique de Lille I,
Boîte postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

J.-P. Farriaux, Clinique Pédiatrique, Cité Hospitalière de Lille, Place de Verdun, F-59033 Lille-Cedex, France

P. Maroteaux, Hôpital des Enfants-Malades, 145 Rue de Sèvres, F-75015 Paris, France

P. Durand, Istituto Giannina Gaslini, I-16148 Geneva Quarto, Italy

* To whom correspondence should be addressed.

STRUCTURES OF SIALYL-OLIGOSACCHARIDES EXCRETED IN THE URINE OF A PATIENT WITH MUCOLIPIDOSIS I

J. C. MICHALSKI, G. STRECKER and B. FOURNET

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au CNRS No. 217, BP No. 36, Villeneuve d'Ascq and Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules Driessens) et Unité 124 de l'INSERM, BP No. 3567, 59020 Lille Cédex, France

and

M. CANTZ and J. SPRANGER

Children's Hospital, University of Mainz, FRG

Received 25 April 1977

1. Introduction

Mucopolipidosis I is a rare congenital disorder of complex carbohydrate metabolism, characterized clinically by coarse facial features, skeletal dysplasia, neurodegeneration, cherry-red macular spot, mental retardation, and early death [1-3]. An abnormal accumulation of sialic acid-containing compounds in cultured fibroblasts and leukocytes, and a profoundly diminished activity of an α -neuraminidase (sialidase) in the former suggested a defect in the catabolism of sialoglycopeptides and/or gangliosides as the metabolic basis of this disease [3,4]. In this communication, we report on the excessive excretion and the structure of urinary sialyl-oligosaccharides in a patient with mucopolipidosis I.

2. Materials and methods

Sialyl-oligosaccharides were fractionated as described in previous papers [5,6]. Their structures were determined by methylation, periodate oxidation, hydrazinolysis-nitrous deamination, and NMR spectroscopy. The chemical investigations will be developed in a following article [7].

3. Results

As shown in fig.1, more than 10 sialyl-oligosaccharides were identified in the urine of patient D. F. by paper chromatography of fractions eluted from a Dowex 1 \times 2 column. The quantitation and carbohydrate composition of the 10 major oligosaccharides are presented in table 1. When compared to the normal, the excretion of these compounds is increased from about 80-800-fold. Figure 2 shows the complete structures of these sialyl-oligosaccharides, which closely resemble the glycan portions found in many glycoproteins. Invariably, the *N*-acetylneuraminic acid residues are located at a non-reducing terminus in either α 2-6 or α 2-3 linkage to galactose. The reducing termini consist of *N*-acetylglucosamine, suggesting that each saccharide results from the action of an endo- β -*N*-acetylglucosaminidase on the parent sialoglycopeptide.

4. Discussion

The excessive urinary excretion of these sialyl-oligosaccharides must arise from the α -neuraminidase deficiency in the patients tissues, which causes a block

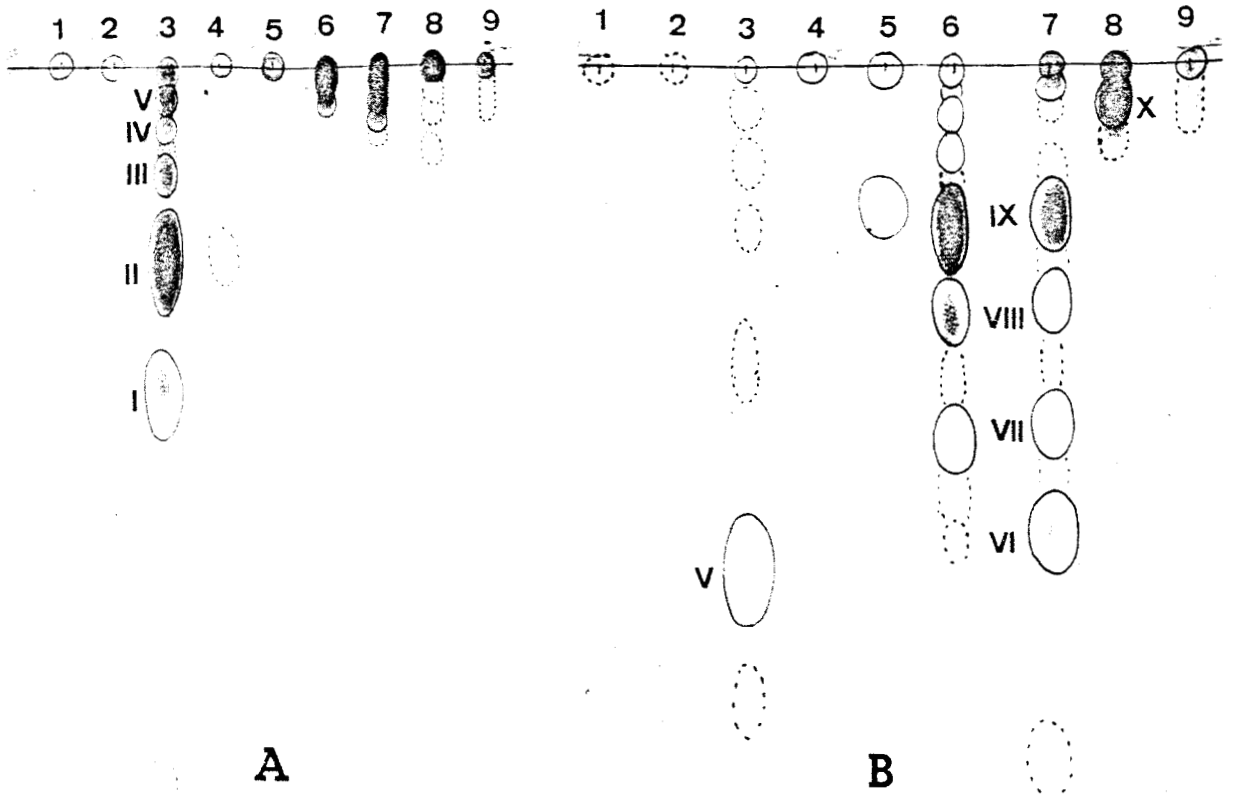


Fig.1. Paper chromatography of sialyl-oligosaccharides eluted from Dowex 1 x 2 (200-400 mesh; acetate form) by a discontinuous gradient of pyridine acetate (pH 5.4); 1 : 1 mM; 2 : 2 mM; 3 : 5 mM; 4 : 10 mM; 5 : 20 mM; 6 : 50 mM; 7 : 100 mM; 8 : 200 mM; 9 : 500 mM. Paper Whatman No. 3. Solvent: ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5:5:1:3), developed during 5 days (A) or 40 days (B). Chromatograms were stained with alanine oxalat reagent.

Table 1
Carbohydrate analysis of urinary sialyl-oligosaccharides

| | Quantity (mg/l) | | Molar ratios | | | |
|------|-------------------|--------------|--------------|-----|--------|--------|
| | Mucopolipidosis I | Normal urine | Gal | Man | GlcNAc | Ac Neu |
| I | 16 | 0.1-0.3 | 0.96 | 2 | 1.84 | 0.86 |
| II | 185 | 0.2-0.3 | 1.12 | 2 | 1.94 | 0.92 |
| III | 22 | 0.1-0.3 | 0.86 | 3 | 1.85 | 0.94 |
| IV | 18 | < 0.1 | 2.16 | 3 | 3.06 | 0.99 |
| V | 32 | 0.1-0.5 | 1.84 | 3 | 2.76 | 0.84 |
| VI | 38 | < 0.1 | 1.91 | 3 | 2.84 | 2.04 |
| VII | 11 | < 0.1 | 1.84 | 3 | 2.96 | 1.96 |
| VIII | 6 | < 0.1 | 2.05 | 3 | 3.04 | 1.94 |
| IX | 225 | 0.1-1.0 | 3.00 | 3 | 3.02 | 2.05 |
| X | 112 | ? | 3.21 | 3 | 3.95 | 2.78 |

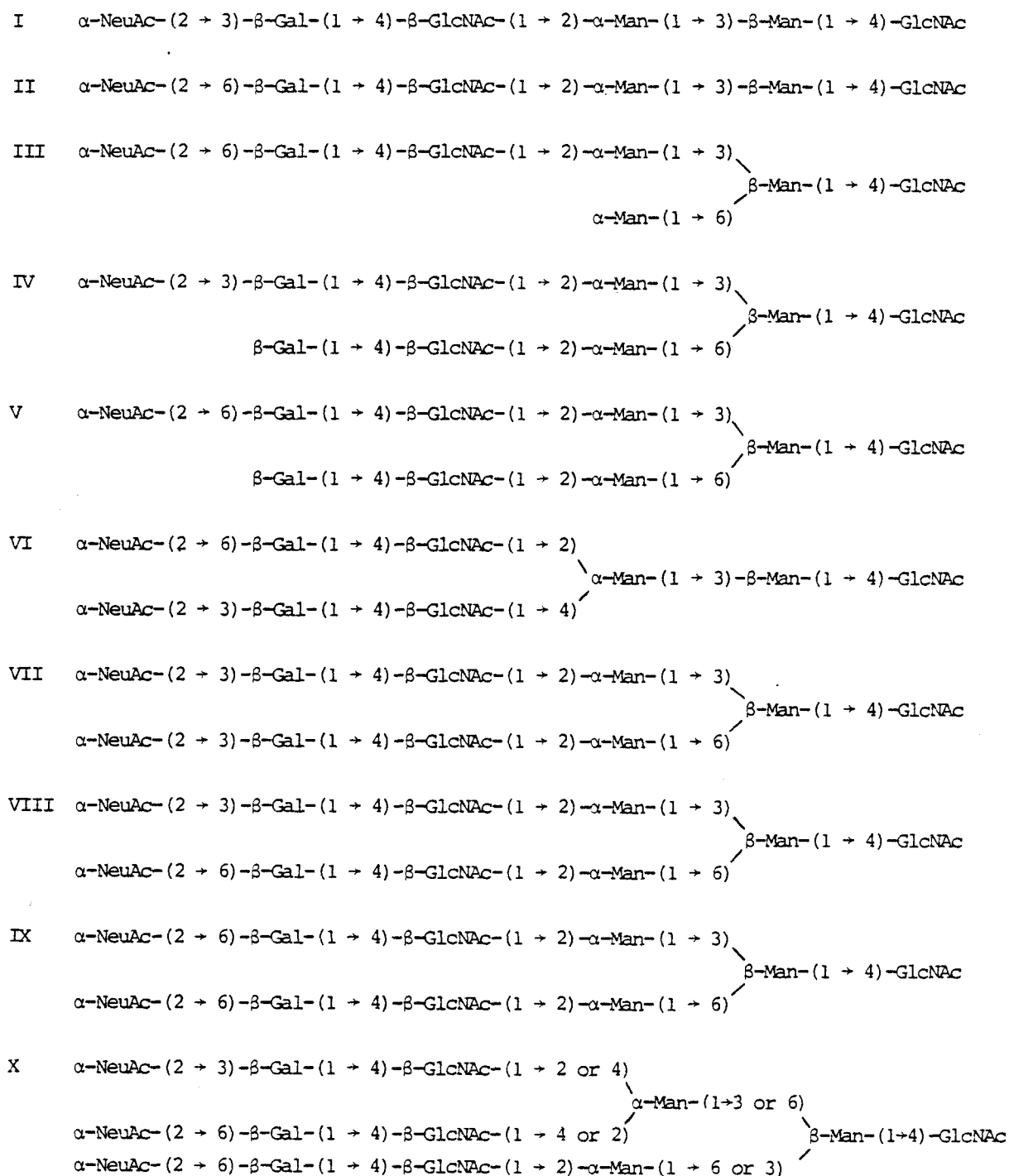


Fig.2. Structure of the 10 major sialyl-oligosaccharides isolated from MLP I urine. The structure of compound X here described results from preliminary investigations.

in the further catabolism of the chains by exoglycosidases. Urinary oligosaccharides of identical structures have been observed in three other genetic disorders with deficiency of an α -neuraminidase: mucopolipidosis II and two 'new' types of mucopolipidosis [6,8-10]. In mucopolipidosis II, the neuraminidase deficiency probably results from a defect in lysosomal enzyme localization involving many such hydrolases [11].

In mucopolipidosis I and the other two forms of mucopolipidosis, however, the neuraminidase deficiency is singular, suggesting the mutation of a gene which directly codes for the expression of a neuraminidase. At present, it cannot be decided whether the marked differences in phenotype between these latter types of mucopolipidoses are due to allelic mutations at a single neuraminidase gene, to a deficiency of different neuraminidases, or to still another mechanism.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire associé No. 217: Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124: Unité de Recherches Ultrastructurales et biochimiques sur les cellules normales et cancéreuses) and the Fondation pour la Recherche Médicale Française. The authors are indebted to A. Lemaire, Y. Leroy and A. F. Bouquelet for their skillful technical assistance.

References

- [1] Bérard, M., Toga, M., Bernard, R., Dubois, D., Mariani, R and Hassoun, J. (1968) *Pat. Europ.* 3, 172.
- [2] Spranger, J., Wiedemann, H. R., Tolksdorf, M., Graucob, E. and Caesar, R. (1968) *Z. Kinderheilk.* 103, 285.
- [3] Spranger, J., Gehler, J. and Cantz, M. (1977) *Am. J. Med. Genet.* in press.
- [4] Cantz, M., Gehler, J. and Spranger, J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 732-738.
- [5] Strecker, G. and Lemaire-Poitau, A. J. (1977) *Chromatog. Biomed. Appl.* in press.
- [6] Strecker, G., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Maroteaux, P., Durand, P. and Farriaux, J. P. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 444, 349-358.
- [7] Michalski, J. C., Strecker, G., Dorland, L. and Fournet, B. (1977) in preparation.
- [8] Strecker, G., Peers, M. C., Michalski, J. C., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Farriaux, J. P., Maroteaux, P. and Durand, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* in press.
- [9] Maroteaux, P., Humbel, R. and Mande, R. (1975) Un nouveau type d'oligosaccharidose. IIe Symposium Européen sur les mucopolysaccharidoses, Anvers, 25-26 April.
- [10] Durand, P., Gatti, R., Borrone, C., Strecker, G. and Tondeur, M. (1977) *Lancet* in press.
- [11] Neufeld, E. F. (1974) in: *Progress in Medical Genetics*, (Steinberg, A. G. and Bearn, A. G. eds) Vol. X, pp. 81-101, Grunc and Stratton Inc., New York.

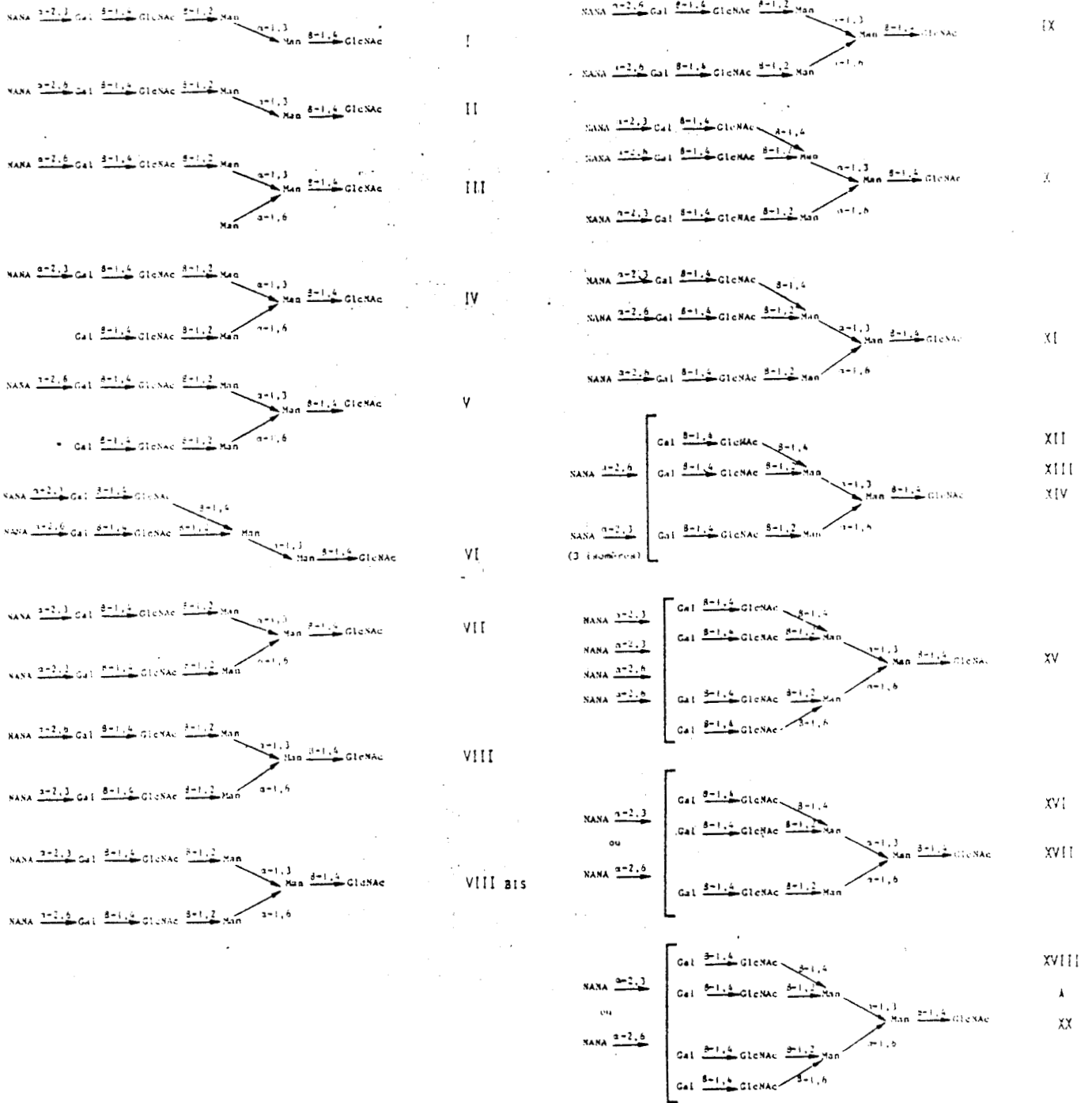


FIGURE 18

Structure des 20 principaux sialyl-oligosaccharide isolés de l'urine de différents types de mucopolysaccharidose.

La figure 18 rassemble les structures des sialyl-oligosaccharides majeurs isolés de l'urine des patients. Des chromatographies préparatives de longue durée (70 jours) ont permis l'isolement d'isomères supérieurs portant à 20 le nombre de composés différents isolés de l'urine.

Tous les oligosaccharides isolés de l'urine des patients atteints de sialidose sont construits sur le même modèle que l'on peut subdiviser en classes (Figure 19). Les classes E et F pouvant elles-mêmes se subdiviser en sous-classes selon le nombre de résidus d'acide sialique externes. Ces résultats confirment le schéma général de structure des glycoprotéines de type lactosaminique proposé par MONTREUIL 1975 (415). Il est remarquable de constater qu'un tel schéma général de structure est compatible avec un nombre élevé de structures différentes si l'on tient compte de la possibilité offerte à chaque galactose externe d'être ou non substitué par de l'acide sialique en position ($\alpha 2,3$) ou ($\alpha 2,6$). Le nombre de structures possibles est d'ailleurs multiplié par la présence éventuelle de résidus de fucose sur la N-acétyl-glucosamine du point d'attache ou en position périphérique. Il est à noter que KURIYAMA *et al.* 1981a (416) ont mis en évidence deux isomères des sialosides I et II, différents par le type de liaison du mannose (liaison $\alpha 1,6$ ou $\alpha 1,3$). D'autre part, LECAT *et al.* 1984 (417) ont rapporté l'existence de glycopeptides de type "O glycosidiques" dans l'urine de patients atteints de mucopolysaccharidose de type I. Il est cependant à noter que ce type de structures préexiste dans l'urine normale (PARKKINEN et FINNE 1983 (418)) et que l'élévation du taux de ces composés chez les malades est nettement plus faible que celle des structures de type N-glycannique.

B - ETUDE EN RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A 300-MHZ

Le fait de disposer d'une série homogène d'oligosaccharides de complexité structurale croissante a permis l'étalonnage d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le groupe hollandais du Professeur VLIEGENTHART (Utrecht). Les informations réunies dans l'ARTICLE 3 montrent qu'il est possible par la seule technique de RMN à haut champ d'établir la structure primaire d'oligosaccharides ou de glycopeptides.

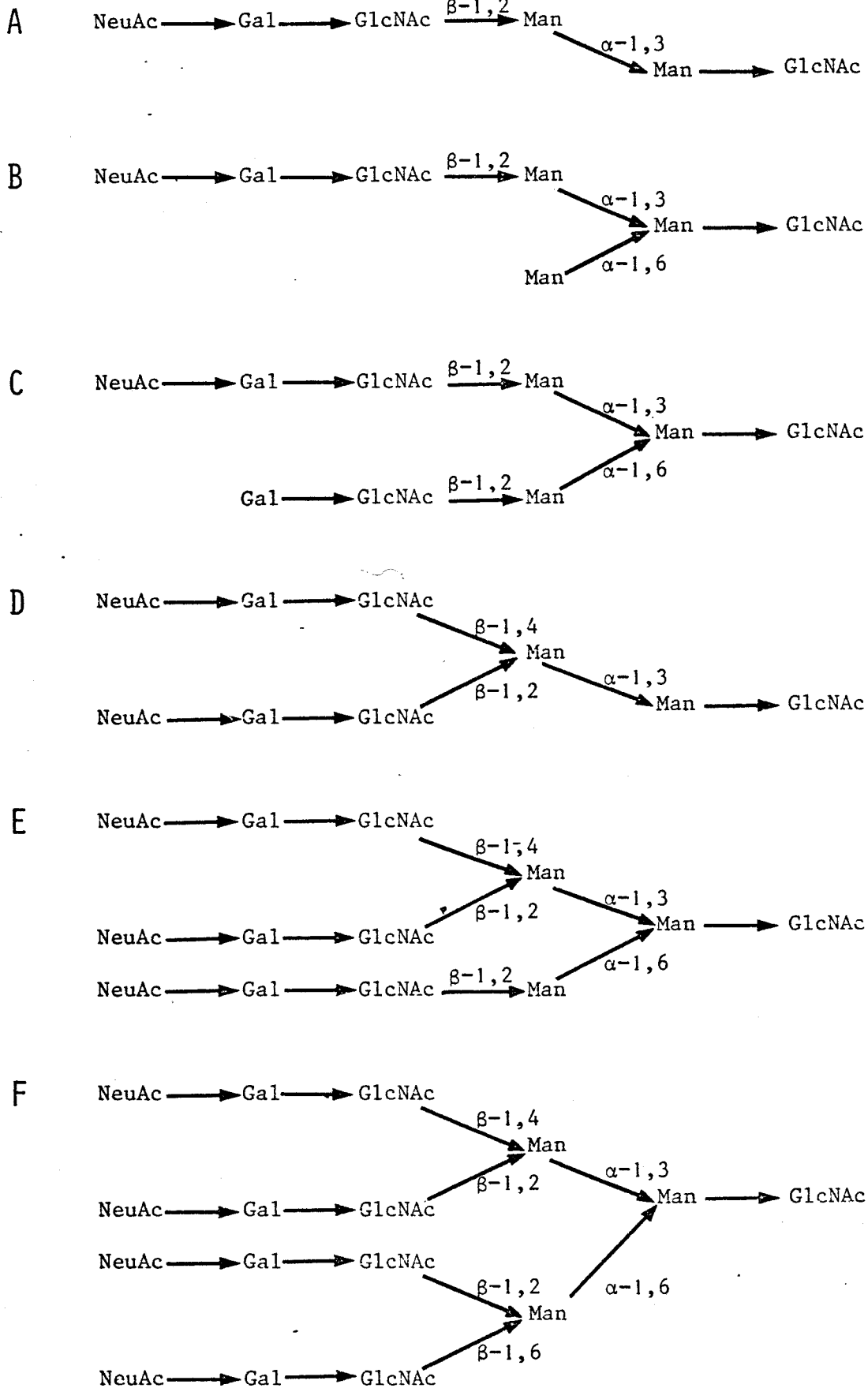


FIGURE 19

360-MHz ^1H Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy of Sialyl-Oligosaccharides from Patients with Sialidosis (Mucopolidosis I and II)

Lambertus DORLAND, Johan HAVERKAMP, Johannes F. G. Vliegenthart, Gérard STRECKER, Jean-Claude MICHALSKI, Bernard FOURNET, Geneviève SPIK, and Jean MONTREUIL

Organisch Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit Utrecht and Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille et Laboratoire associé au Centre National de la Recherche Scientifique no. 217, Villeneuve d'Ascq

(Received January 27, 1978)

360-MHz proton nuclear magnetic resonance spectra were recorded of 10 sialyl-oligosaccharides isolated from urine of sialidosis patients. Their structures are related to the complex asparagine-linked glycan chains of glycoproteins. By correlation of these spectra and comparison with spectra of reference glycopeptides and sialyl-lactose isomers it was possible to assign all signals belonging to anomeric, mannose H-2, sialic acid H-3 and *N*-acetyl protons. The number of the constituting monosaccharide residues of the oligomers can be obtained by integration of the above-mentioned signals. The chemical shifts of the anomeric and mannose H-2 protons give information about the type of glycan structure (mono-, bi-, triantennary) and the presence of terminal sialic acid at each of the antennas. The chemical shifts of sialic acid H-3 protons are typical for sialic acid residues in 2 → 3 or 2 → 6 linkage to galactose.

Recently it has been shown that the application of 360-MHz ^1H -NMR spectroscopy is a highly powerful technique in the structure elucidation of oligosaccharides and glycopeptides [1–5]. Most of the signals of anomeric protons in these high-resolution spectra are well separated. Their resonance positions are characteristic for the structure and in fact can be used as indicators for the type and position of the various glycosidic linkages and for the sequence of the constituting monosaccharide residues. The resonances of the non-anomeric protons can provide valuable additional information as has been demonstrated in particular for the H-2 protons of the mannose residues of the frequently occurring manno-triosido branching core of complex glycans [2–5].

In this paper the investigation of oligosaccharides and glycopeptides containing one or more sialic acid residues is described. The greater part of these compounds stem from the urine of patients suffering from inborn errors of metabolism associated with neuraminidase deficiency. These mucopolidosis (sialidosis) patients have increased levels of urinary sialyl-oligosaccharides [6] which originate from incomplete glycoprotein catabolism. The structures of these oligo-

saccharides have been determined by chemical methods [6, 7] and are related to the complex biantennary type of glycan chain [8].

MATERIALS AND METHODS

The isolation of oligosaccharides I–X from urine of patients with sialidosis [6, 7], of GP-1 and GP-2 from human serotransferrin [2, 9] and of sialyl-lactose isomers [10] has been described before. The structures of the compounds are presented in Table 1.

Solutions of the oligosaccharides and glycopeptides were neutralized if necessary and exchanged three times in $^2\text{H}_2\text{O}$ with intermediate lyophilization. Spectral analysis of 0.02–0.05 M solutions of the compounds in $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.9%, Aldrich) was carried out on a Bruker HX-360 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at probe temperatures of 25 °C or 60 °C. Chemical shifts at 25 °C are given relative to sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate (indirectly to acetone in $^2\text{H}_2\text{O}$: $\delta = 2.225$ ppm).

RESULTS AND DISCUSSION

From all compounds listed in Table 1 360-MHz ^1H NMR spectra were recorded at 25 °C (δ HO ^2H

Abbreviations. Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Gal, galactose; Man, mannose; AcNeu, *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid); Asn, asparagine; NMR, nuclear magnetic resonance.

High-Resolution ¹H NMR Spectroscopy of Urinary Sialyl-Oligosaccharides

Table 1. Structures of the urinary sialyl-oligosaccharides and the reference compounds
The coding of monosaccharide units in all compounds corresponds to those given for GP-1, VI and X

| | |
|------|--|
| GP-1 | $\begin{array}{l} \beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{3}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{2}}{\beta}\text{-GlcNAc}1\text{-}\overset{\underline{1}}{\text{Asn}} \end{array}$ |
| GP-2 | $\begin{array}{l} \beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{6'}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{5'}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\overset{\underline{6'}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5'}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4'}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{3}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{2}}{\beta}\text{-GlcNAc}1\text{-}\overset{\underline{1}}{\text{Asn}} \end{array}$ |
| I | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \end{array}$ |
| II | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \end{array}$ |
| III | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| IV | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| V | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| VI | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\overset{\underline{8}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{7}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4) \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\overset{\underline{6}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{3}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{2}}{\beta}\text{-GlcNAc}1\text{-}\overset{\underline{1}}{\text{Asn}} \end{array}$ |
| VII | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| VIII | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| IX | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow6) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-GlcNAc} \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\overset{\underline{8}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{7}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4) \end{array}$ |
| X | $\begin{array}{l} \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\overset{\underline{6}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{3}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{2}}{\beta}\text{-GlcNAc}1\text{-}\overset{\underline{1}}{\text{Asn}} \\ \alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\overset{\underline{6'}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5'}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4'}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow6) \end{array}$ |
| SL-3 | $\alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow3)\text{-}\overset{\underline{6'}}{\beta}\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-}\overset{\underline{5'}}{\beta}\text{-GlcNAc}-(1\rightarrow2)\text{-}\overset{\underline{4'}}{\alpha}\text{-Man}-(1\rightarrow6)$ |
| SL-6 | $\alpha\text{-AcNeu}-(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-Gal}-(1\rightarrow4)\text{-Glc}$ |

≈ 4.78 ppm) and at 60°C ($\delta \text{HO}^2\text{H}$ shifted to ≈ 4.35 ppm). As a typical example of the compounds I–V and VII–IX which are all related to the biantennary structure GP-1, the spectrum of VIII is given in Fig. 1. The compounds VI and X have an additional sialyl-*N*-acetylglucosamine branch linked to mannose 4 (for coding of monosaccharide residues see Table 1) and are therefore derived from the triantennary type of complex glycan chains [8]. The spectrum of X is given in Fig. 2. The chemical shifts of the anomeric, *N*-acetyl, mannose H-2, and sialic acid H-3 axial and equatorial protons of all compounds are compiled in Table 2.

The assignment of the signals of the anomeric protons in the sialo compounds was made by using the resonance positions in the spectrum of GP-1 as reference data. Extension of both branches of GP-1 with sialic acid in $2 \rightarrow 6$ linkage to galactose (GP-2) introduces a few significant changes in the chemical shifts of the anomeric protons of the residues 6, 6', 5, 5', 4 and 4'. Deletion of the $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asn}$ part which affords structure IX has no effect on the chemical shifts of the above-mentioned anomeric protons.

In compound V the sialic acid residue in the lower branch is missing. In comparison to the asialo structure GP-1 it is evident that sialic acid causes only shift increments for Gal-6, GlcNAc -5 and Man-4, leaving the anomeric protons of the lower branch unaffected. The same effects are observed in II and III wherein the lower branch is shortened up to residue 3 or 4' respectively.

Compound VII differs from IX only in the type of linkage of the sialic acid residues to galactose, being $2 \rightarrow 3$ instead of $2 \rightarrow 6$. Attachment of sialic acid residues by $2 \rightarrow 3$ linkages to Gal-6 and 6' introduces only shift increments for H-1 of Gal-6 and 6' when compared to GP-1; the long-distance effects as described for a $2 \rightarrow 6$ -linked sialic acid residue do not occur. From the spectral data of the partial structures I and IV it is clear that the $2 \rightarrow 3$ -linked sialic acid residue affects only the H-1 of the directly attached galactose residue and not the H-1 of galactose in the other branch.

Both types of sialic acid linkages occur in VIII each giving rise to its typical effects as described above. The NMR data indicate immediately to which branch the $2 \rightarrow 6$ -linked sialic acid residue is connected since the H-1 signal of Man-4 shows the characteristic shift increment ($5.119 \rightarrow 5.138$ ppm) whereas the H-1 of Man-4' is unaffected (4.926 ppm). For this kind of assignment the chemical shifts of the anomeric protons of Gal-6 and 6' cannot be used because these protons are indistinguishable. The same holds for the anomeric protons of GlcNAc -5 and 5'. The influence on anomeric protons in the glycan chain of attachment of a sialic acid residue to the 3 or 6 position of galactose

are summarized in Table 3. Sialic acid linked to galactose affects also the resonance positions of the *N*-acetyl protons of the *N*-acetylglucosamine units but these effects are independent of the type of sialic acid linkage (see Table 3).

An interesting phenomenon in the spectra of the sialo compounds is the position of the axial and equatorial H-3 protons of sialic acid. These protons do not coincide with the bulk of the non-anomeric protons. Their chemical shifts are characteristic of the type of linkage of the sialic acid residue to any galactose moiety of *N*-acetylglucosamine as indicated in Table 4. From Table 2 it becomes clear that the resonance position of a sialic acid *N*-acetyl group depends on the type of glycosidic bond of the sialic acid residue as well as on the branch on which it is present.

The biantennary structures (IV, V, VII, VIII, IX) can be recognized on the basis of the resonance pattern of the H-2 protons of the mannotrioso branching core (resonances at 4.12, 4.20 and 4.26 ppm, see Table 2). If the lower branch is completely absent, the resonance position of H-2 of Man-3 is changed ($4.26 \rightarrow 4.24$ ppm, compounds I, II). In III the H-2 resonance of Man-4' is buried in the bulk of the non-anomeric protons because Man-4' is not glycosylated in position 2.

Extension of the biantennary structure with the additional sialyl *N*-acetylglucosamine chain as in X is expressed in the resonance position of H-2 of Man-3 and Man-4 (both at 4.22 ppm). It has been found that in other structures of this type the same set of parameters occurs (unpublished results). The determination of the positions of the $2 \rightarrow 3$ and $2 \rightarrow 6$ -linked sialic acid residues in X can easily be carried out on the basis of the NMR data. Integration of the axial and equatorial H-3 protons of sialic acid shows that the molar ratio of $2 \rightarrow 3$ -linked to $2 \rightarrow 6$ -linked residues is 1:2. The chemical shifts of the H-1 protons of residues 4, 4', 5, 5', 6, 6', 7 and 8 point to the presence of $2 \rightarrow 6$ -linked residues in the upper (4, 5, 6) and the lower (4', 5', 6') branch of the molecule, whereas the $2 \rightarrow 3$ -linked sialic acid residue is attached to Gal-8. Structure VI can be conceived as derived from X by deletion of the lower (4', 5', 6') branch. This is reflected by the absence of the signal at 4.94 ppm (H-1 of Man-4') and by the integral values of the signals at 4.60, 4.44 and 4.12 ppm (see Table 2).

With regard to the sialyllactose isomers it has to be noted that the chemical shifts of the H-3 protons in SL-3 are identical to those for $2 \rightarrow 3$ -linked sialic acid residues in the oligosaccharides I–X. However the H-3 protons in SL-6 occupy deviating resonance positions with regard to the corresponding protons in the oligosaccharides. The *N*-acetyl protons of the sialic acid residues in SL-3 as well as in SL-6 resonate at 2.030 ppm. This is in contrast to the positions of

High-Resolution ¹H NMR Spectroscopy of Urinary Sialyl-Oligosaccharides

Table 2. ¹H chemical shifts of anomeric, mannose H-2, sialic acid H-3 and N-acetyl protons for sialyl-oligosaccharides I-X and reference compounds

Chemical shifts in ²H₂O at 25 °C are given in ppm downfield from sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate. For coding of monosaccharide residues and complete structures see Table 1: ● = neutral or amino sugar residue; Δ = AcNeu(2 → 3); ○ = AcNeu(2 → 6). The α and β anomeric protons of a reducing unit were in the molar ratio of 0.65:0.35. Values at ≈ 4.72 and ≈ 4.77 ppm cannot be determined more accurately (± 0.01 ppm) due to interference of the HO²H line at 25 °C

| Compound | Schematic Structure | H-1 of residue | | | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|----------|----------|------------|--|------------|----------|------------|----------|----------|
| | | <u>1</u> | <u>2</u> _α | <u>2</u> _β | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>4</u> ' | <u>5</u> | <u>5</u> ' | <u>6</u> | <u>6</u> ' | <u>7</u> | <u>8</u> |
| GP-1 | | 5.072 | - | 4.616 | ~4.77 | 5.119 | 4.926 | 4.581 | 4.581 | 4.470 | 4.470 | - | - |
| GP-2 | | 5.073 | - | 4.598 | ~4.77 | 5.133 | 4.946 | 4.598 | 4.598 | 4.447 | 4.447 | - | - |
| I | | - | 5.206 | ~4.72 | ~4.77 | 5.122 | - | 4.579 | - | 4.544 | - | - | - |
| II | | - | 5.206 | ~4.72 | ~4.77 | 5.139 | - | 4.601 | - | 4.446 | - | - | - |
| III | | - | 5.212 | ~4.72 | ~4.77 | 5.138 | 4.919 | 4.604 | - | 4.443 | - | - | - |
| IV | | - | 5.212 | ~4.72 | ~4.77 | 5.123 | 4.930 | 4.578 | 4.578 | 4.552 | 4.471 | - | - |
| V | | - | 5.213 | ~4.72 | ~4.77 | 5.131 | 4.929 | 4.603 | 4.583 | 4.447 | 4.468 | - | - |
| VI | | - | 5.209 | ~4.72 | ~4.77 | 5.139 | - | 4.593 | - | 4.446 | - | 4.549 | 4.549 |
| VII | | - | 5.211 | ~4.72 | ~4.77 | 5.117 | 4.920 | 4.571 | 4.571 | 4.546 | 4.546 | - | - |
| VIII | | - | 5.212 | ~4.72 | ~4.77 | 5.138 | 4.926 | 4.609 | 4.578 | 4.447 | 4.546 | - | - |
| IX | | - | 5.213 | ~4.72 | ~4.77 | 5.136 | 4.952 | 4.605 | 4.605 | 4.444 | 4.444 | - | - |
| X | | - | 5.214 | ~4.72 | ~4.77 | 5.134 | 4.943 | 4.601 | 4.601 | 4.443 | 4.443 | 4.550 | 4.550 |
| SL-3 | | - | - | - | - | - | - | 5.221(α) ^d 4.663(β) ^d | - | 4.531 | - | - | - |
| SL-6 | | - | - | - | - | - | - | 5.224(α) ^d 4.666(β) ^d | - | 4.427 | - | - | - |

^a Signal of two protons.

^b In the case of an AcNeu residue linked to position 3 of galactose, the H-3 of that residue resonates in the range of 4.11–4.12 ppm which makes a more accurate calculation of δ for H-2 of Man-4' difficult.

^c Values may be interchanged.

^d Glucose residue.

^e Signal of two methyl groups.

High-Resolution ¹H-NMR Spectroscopy of Urinary Sialyl-Oligosaccharides

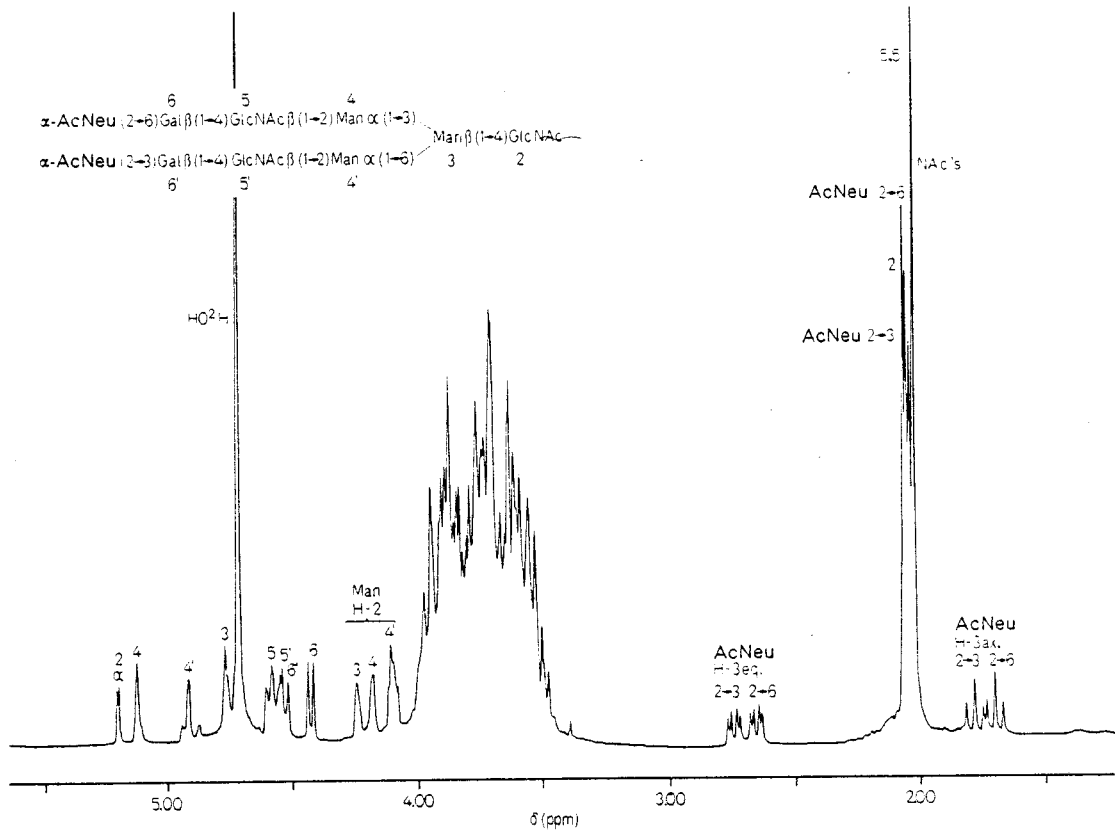


Fig. 1. 360-MHz ¹H-NMR spectrum of oligosaccharide VIII isolated from urine of a sialidosis patient

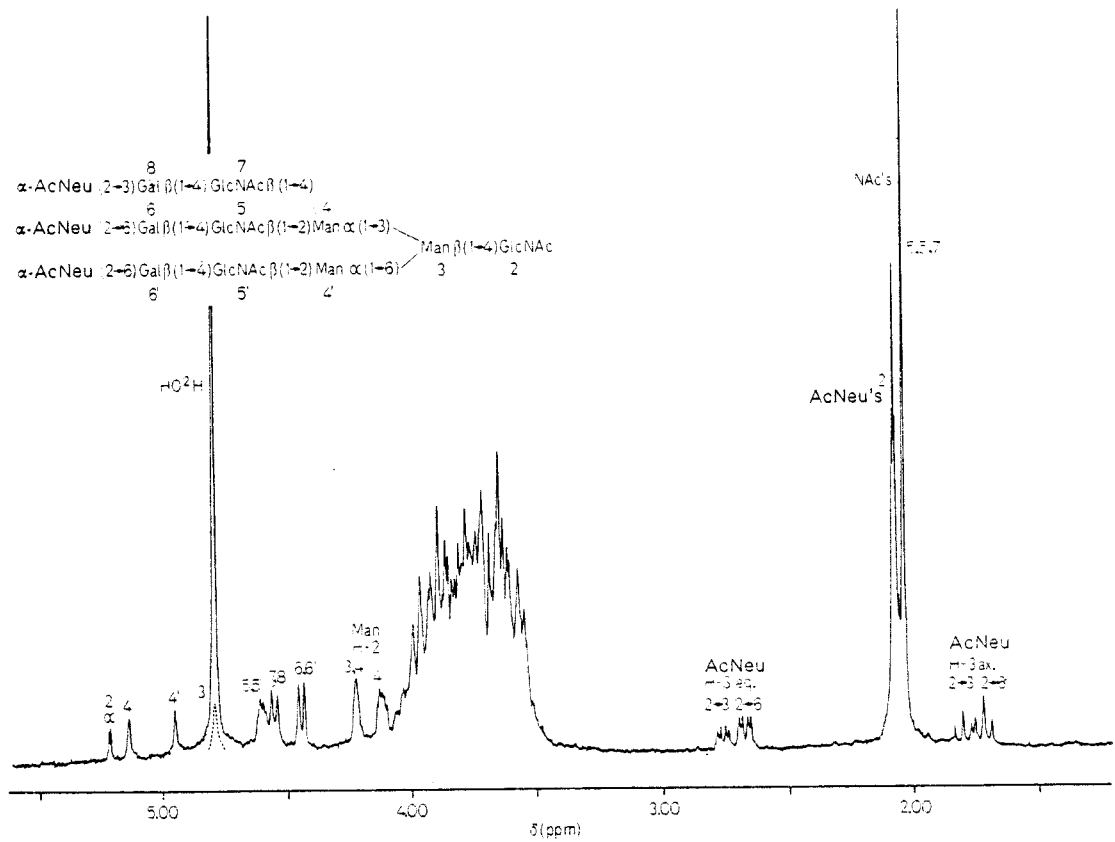


Fig. 2. 360-MHz ¹H-NMR spectrum of oligosaccharide X

L. Dorland, J. Haverkamp, J. F. G. Vliegthart, G. Strecker, J.-C. Michalski, B. Fournet, G. Spik, and J. Montreuil

Table 3. Influence of 2 → 3-linked and 2 → 6-linked terminal AcNeu residues on the chemical shift of anomeric and N-acetyl protons of other sugar residues in oligosaccharides I-X and GP-2

All results are mean values ± S.D. calculated from data of Table 2 with the number of branches in which the effect is observed in parentheses. All reference values were from GP-1, except those for Gal-8 and NAc-7 which were from glycopeptides with carbohydrate structures identical to that of asialo-X (L. Dorland, J. Haverkamp & J. F. G. Vliegthart, unpublished results)

| AcNeu linkage | Residues influenced | Chemical shift of | |
|---------------|---------------------|--------------------------|------------------------|
| | | asialo chain (reference) | sialo chain (observed) |
| ppm | | | |
| (2 → 3) | Gal-6, 6' | 4.470 | |
| | Gal-8 | 4.469 | 4.548 ± 0.003 (7) |
| | NAc-5, 5' | 2.047 | |
| | NAc-7 | 2.078 | 2.030 ± 0.001 (7) |
| (2 → 6) | Gal-6, 6' | 4.470 | 4.445 ± 0.002 (11) |
| | GlcNAc-5, 5' | 4.581 | 4.602 ± 0.005 (11) |
| | Man-4 | 5.119 | 5.136 ± 0.003 (8) |
| | Man-4' | 4.926 | 4.947 ± 0.005 (3) |
| | NAc-5, 5' | 2.047 | 2.030 ± 0.001 (11) |

Table 4. Dependence of sialic acid H-3 chemical shifts on the type of glycosidic linkage of the sialic acid residue for oligosaccharides I-X and glycopeptide GP-2

Results are mean values ± S.D. calculated from data of Table 2 with the number of branches in which these sialic acid residues are present in parentheses

| Linkage | Chemical shift of H-3 | |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| | equatorial | axial |
| ppm | | |
| α-AcNeu-(2 → 6)-Gal → | 2.670 ± 0.002 (11) | 1.721 ± 0.004 (11) |
| α-AcNeu-(2 → 3)-Gal → | 2.758 ± 0.001 (7) | 1.800 ± 0.003 (7) |

these protons in the oligosaccharides I-X which depend on the type of the sialic acid linkage.

The results described in this study show that high-resolution ¹H-NMR spectroscopy is very suitable for

characterizing sialo-oligosaccharides and glycopeptides which are related to the complex asparagine-bound carbohydrate chains of glycoproteins. In particular the number of constituting monosaccharides (integration), the type of branching of the glycan chain and the type of glycosidic linkage of sialic acid to the different branches can be determined in a convenient way. The NMR method is non-destructive and thus leaves open the possibility of subsequent chemical and enzymic investigation.

This investigation was supported by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé no. 217: Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués), and the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contract 75-7-1334).

REFERENCES

- Dorland, L., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Strecker, G., Fournet, B., Spik, G. & Montreuil, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* **73**, 93-97.
- Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* **77**, 15-20.
- Strecker, G., Herlant-Peers, M.-C., Fournet, B., Montreuil, J., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G. & Farriaux, J.-P. (1977) *Eur. J. Biochem.* **81**, 165-171.
- Fournet, B., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J., Schmid, K., Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L. & Vliegthart, J. F. G. (1978) *Proceedings of the 4th International Symposium on Glycoconjugates*, 1977 Woods Hole, Massachusetts, in the press.
- Montreuil, J. & Vliegthart, J. F. G. (1978) *Proceedings of the 4th International Symposium on Glycoconjugates*, 1977 Woods Hole, Massachusetts, in the press.
- Strecker, G., Peers, M.-C., Michalski, J.-C., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Farriaux, J.-P., Maroteaux, P. & Durand, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* **75**, 391-403.
- Michalski, J.-C., Strecker, G., Fournet, B., Cantz, M. & Spranger, J. (1977) *FEBS Lett.* **79**, 101-104.
- Montreuil, J. (1975) *Pure Appl. Chem.* **42**, 431-477.
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquetet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* **50**, 296-299.
- Huttunen, J. K. (1966) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **44** (suppl. 12), 1-60.

L. Dorland, J. Haverkamp, and J. F. G. Vliegthart, Organisch-Chemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit te Utrecht, Postbus 5055, NL-3502 JB Utrecht, The Netherlands

G. Strecker, B. Fournet, G. Spik, and J. Montreuil, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Boîte postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

Nous reprendrons ici les informations essentielles fournies par l'analyse d'un spectre RMN, quant à la structure primaire des chaînes glycaniques. L'examen du spectre du sialoside VIII par exemple (page 120) montre que si la majorité des protons non anomériques du squelette résonnent dans une même zone comprise entre $\delta 3,5$ et $\delta 3,9$ ppm donnant un massif de signaux complexe ; les signaux d'un certain nombre de protons se distinguent toutefois du massif et résonnent à des positions parfaitement caractéristiques du spectre, ne dépendant que de la structure primaire de la chaîne oligosaccharidique considérée. Les déplacements chimiques (δ), les constantes de couplage et la largeur de ces signaux caractéristiques fourniront l'essentiel des informations structurales nous renseignant sur le nombre et l'anomérisation des monosaccharides constituant la molécule et leur type de branchement. (VLIEGENTHART et al. 1983 (419)).

Les signaux ainsi pris en compte seront ceux :

- des protons anomériques
- des protons H-2 du mannose, dont le glissement chimique varie selon la substitution du noyau trimannosidique.
- des protons des radicaux méthyl(fucose) et méthylène (acide N-acétylneuraminique).
- et enfin des protons des groupements N-acétyl des N-acétylhexosamines et de l'acide N-acétylneuraminique.

L'expérience montre que le noyau pentasaccharidique (tri-mannosido-di-N-acétylchitobiose) commun à toutes les N-glycosylprotéines possède un spectre RMN tout à fait caractéristique. La substitution de ce noyau par addition de résidus de N-acétyllactosamine ou comme nous le verrons plus loin de résidus de mannose, va apporter deux types de modifications :

- l'apparition de signaux additifs correspondant aux nouveaux monosaccharides introduits dans la molécule ;
- une modification spécifique du glissement chimique des signaux existants.

Il est enfin à noter que l'addition de résidus terminaux d'acide sialique ou de fucose notamment, influence de façon tout à fait caractéristique, les glissements chimiques des protons anomériques des autres sucres. Les tableaux 3 et 4 (page 121)

montrent que les modifications des glissements chimiques sont différents suivant le type de liaison ($\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$) de l'acide sialique en bout de chaîne. Il apparaît notamment qu'une liaison sialyl ($\alpha 2,6$) modifie de façon appréciable les valeurs $\delta H-1$ des galactoses 6 et 6', des N-acétylglucosamine 5 et 5' et surtout des mannoses 4 et 4'; la liaison sialyl ($\alpha 2,3$) est quant à elle sans effet sur les glissements chimiques des mannoses. Ce fait est à mettre en parallèle avec une rigidité plus grande de la liaison ($\alpha 2,3$) en comparaison de la libre rotation de la liaison ($\alpha 2,6$).

En conclusion, il apparaît que la RMN à haut champ constitue une méthode de choix dans l'établissement de la structure primaire des chaînes glycaniques, cette méthode pouvant en particulier nous renseigner quant à la nature, au nombre et au type de liaison des différents monosaccharides constituant la molécule. L'étude des sialosides a en particulier démontré qu'il était possible par cette méthode de déterminer la nature de la liaison de l'acide N-acétylneuraminique en bout de chaîne.

C - CONCLUSION

Outre les constatations structurales préalablement mentionnées, l'observation majeure se dégageant des structures trouvées et que dans tous les cas, il s'agit de sialyl-oligosaccharides. De tels composés sont présents dans l'urine normale mais à des quantités nettement plus faibles (de l'ordre du 1/10 de mg) ; il est donc fortement vraisemblable que leur origine soit liée au processus pathologique commun à ces maladies, l'hypothèse métabolique la plus vraisemblable étant celle d'un déficit en α -neuraminidase. L'action sialidasique ne s'effectuant pas, la dégradation récurrente des chaînes glycaniques par les autres exoglycosidases est rendue impossible, et expliquerait l'engorgement cellulaire et l'excrétion urinaire de sialyl-oligosaccharides.

III - MISE EN ÉVIDENCE D'UN DÉFICIT EN α -NEURAMINIDASE ASSOCIÉ À LA MUCOLIPIDOSE DE TYPE II

A - METHODE DE DOSAGE

Afin de vérifier l'hypothèse préalablement énoncée selon laquelle un déficit en α -neuraminidase, pouvait être responsable de l'excrétion accrue de sialyl-oligosaccharides dans l'urine et les tissus de patients atteints de mucopolysaccharidose, nous avons dans un premier temps développé une méthode de radiodosage applicable à de faibles concentrations en protéines. En effet, les méthodes conventionnellement utilisées pour la mesure de l'activité neuraminidasique, basées sur la méthode colorimétrique à l'acide thiobarbiturique de WARREN 1959 (420) s'avéraient trop peu sensibles pour la détection de l'activité enzymatique sur des homogénats cellulaires. D'autre part, les substrats synthétiques de type méthyl-umbelliféryl-acide sialique n'étaient pas disponibles commercialement à l'époque où nous débutions ce travail.

Nous avons donc décidé d'utiliser comme substrats naturels de l'enzyme, les deux sialyl-oligosaccharides majeurs isolés de l'urine des patients, les sialosides n° I et n° II préalablement décrits, possédant respectivement une liaison sialyl α 2,3 et α 2,6. Les substrats sont marqués sur la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, par réduction au borohydrure tritié, et le dosage est réalisé comme sur la figure 20. Cette méthode très sensible permet d'estimer une hydrolyse du substrat de l'ordre de la picomole.

Etant donné qu'une déficience enzymatique multiple était observée au niveau des fibroblastes I-Cell en culture, notre choix s'est porté sur les leucocytes où les activités des principales hydrolases acides mesurées étaient dans la limite de la normale.

Nous avons dans un premier temps comparé l'activité neuraminidasique des leucocytes normaux et celle de patients atteints de mucopolysaccharidose de type II. Les résultats obtenus sont rapportés dans L'ARTICLE 4.

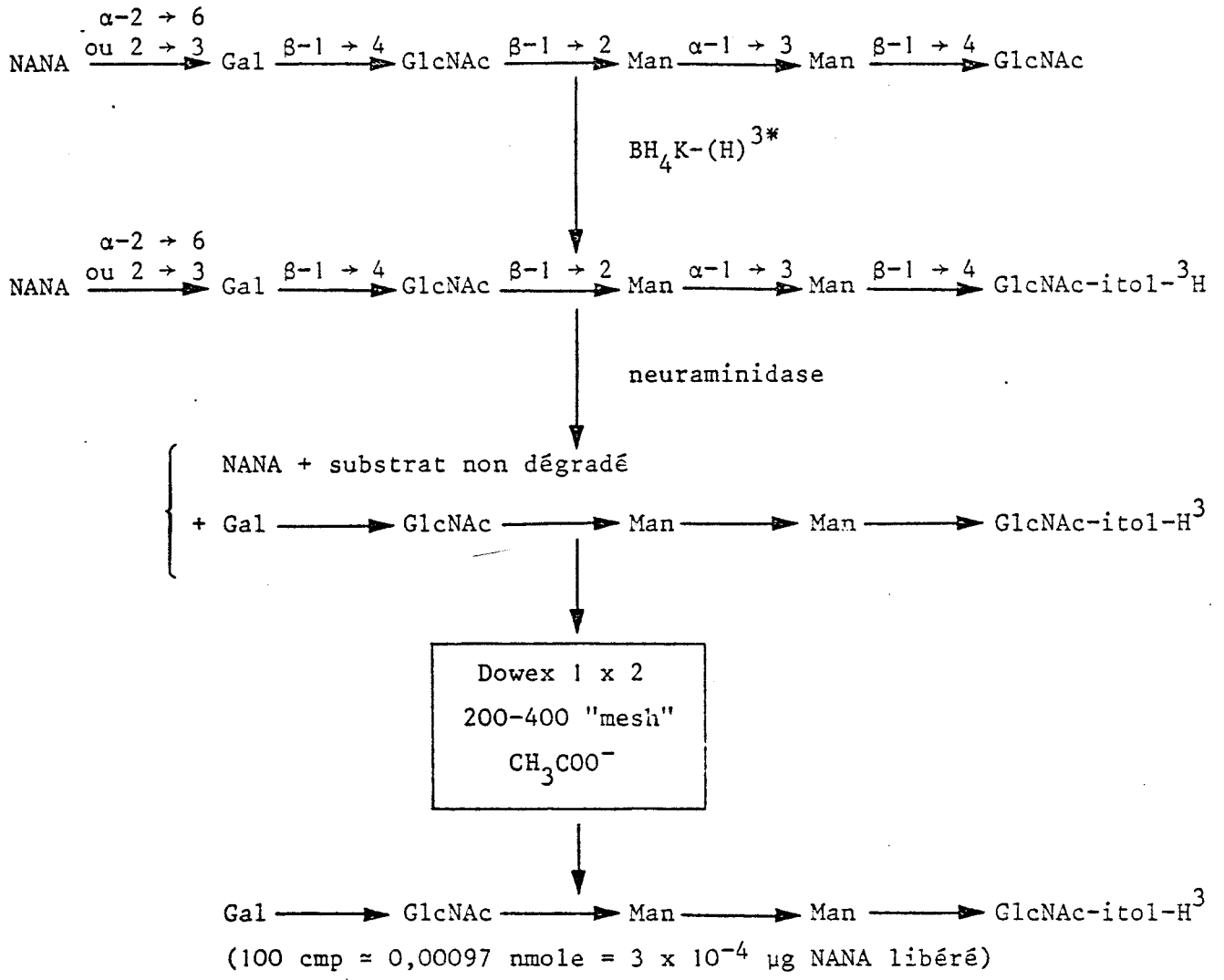


FIGURE 20

Méthode de dosage de la neuraminidase

Biomedicine, 1976, 25, 238-239.

DEFICIT IN NEURAMINIDASE ASSOCIATED WITH MUCOLIPIDOSIS II (I-CELL DISEASE)

SUMMARY

Using a tritiated sialyloligosaccharide as a substrate, the authors showed that mucopolipidosis II is characterized by a lack of neuraminidase activity in leucocytes, while the other acidic hydrolases activities are normal. According to Ashwell, terminal galactose is the required signal for glycoproteins uptake by the cells. Thus, a neuraminidase deficit may explain the increase of sialylated hydrolases activities in the plasma and the non-recognition of these enzymes by cultured fibroblasts.

activité enzymatique au niveau des leucocytes d'un patient atteint de mucopolipidose II, alors que les activités des autres hydrolases acides sont restées normales. La nature de ce déficit enzymatique est susceptible d'expliquer l'augmentation du taux des autres hydrolases acides dans le plasma et la non-reconnaissance de ces enzymes par le fibroblaste en culture, à cause du masquage du galactose qui constitue le signal de reconnaissance nécessaire à l'endocytose des glycoprotéines selon la théorie d'Ashwell.

RÉSUMÉ

La mise au point d'une ultra-microméthode originale de dosage de l'activité neuraminidasiqque des tissus a permis de mettre en évidence un déficit total de cette

Mucopolipidosis II (I-Cell disease) is an hereditary disease the semiology of which is very similar to those of mucopolysaccharidosis: the differential diagnostic elements are the absence of pathological mucopolysacchariduria, the occurrence of numerous cytoplasmic inclusions in cultured skin fibroblasts

G. STRECKER, J. C. MICHALSKI, J. MONTREUIL AND J. P. FARRIAUX

(I-Cell phenotype), the increase of the activity of several lysosomal hydrolases in extracellular fluids and in fibroblast culture medium, contrasting with the decrease of these same activities in the cultured fibroblasts (3, 2, 8, 7). Moreover, we have found, in five personal cases, a massive excretion of sialyl-oligosaccharides (30 to 60 fold the normal amount) the structures of which have been described (5).

These results suggested a primary defect in neuraminidase and in order to verify this hypothesis we developed an appropriate micromethod. We used as a natural substrate a sialyl-hexasaccharide excreted in large amount in urines of mucopolipidosis II. This compound was labelled by reducing the N-acetylglucosamine terminal residue with tritiated potassium borohydride. Thus, the formula of the substrate was as follows : NANA $\alpha(2 \rightarrow 6)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNac $\beta(1-2)$ Man $\alpha(1 \rightarrow 3)$ Man $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNac-itol-1-³H.

Neuraminidase activity was determined on 200 to 300 μ g of leucocyte proteins obtained by ultrasonication. After a 2 hour-incubation at 37 °C in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.5), the neutral pentasaccharide : Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNac $\beta(1 \rightarrow 2)$ Man $\alpha(1 \rightarrow 3)$ Man $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNac-itol-1-³H was obtained and isolated in pure form using a column (5 \times 80 mm) of anion exchanger (Dowex 1 \times 2; 200-400 mesh; acetate form). In these conditions, free N-acetylneuraminic acid and N-acetylneuraminic acid-containing substrate were quantitatively retained. The neutral oligosaccharide-containing fraction, plus 5 ml

of washing water, were directly collected in counting vials. After drying at 80 °C, the radioactivity was determined with Bray scintillating liquid : in our experimental conditions, we obtained 10³ cpm per 0.16 nmoles of free N-acetylneuraminic acid (0.05 μ g). Standards without enzyme were studied in the same conditions.

The results we obtained (Table) clearly show that no leucocyte neuraminidase activity is detectable in the first patient and that an activity of only 10 % of the normal value is found in the second patient.

The activities of the other hydrolases were normal, except the β -galactosidase activity of the first patient which was only 15 % of the normal value (Table).

It should be very interesting to compare other cases of mucopolipidosis II in order to verify if this deficit is a general phenomenon. Nevertheless, the nature of this deficit is in good agreement with many observations which have been done in mucopolipidosis II : massive excretion of sialyl-oligosaccharides (5), increase of hydrolases activities in the sera (8) and in the media of cultured fibroblasts (7), increase of electronegativity of hydrolases secreted by cultured fibroblasts compared to intracellular hydrolases. It has been proposed that a recognition marker, different from the catalytic site, was altered in the case of secreted hydrolases in mucopolipidosis II (1). In rat liver, this marker has been identified as galactose (4). A neuraminidase deficit might explain the increase of electro-negativity of secreted enzymes and the failure of their uptake by the cells.

TABLE
Hydrolase activities in leucocytes (nmoles/h/mg proteins)

| | Presumed normal subjects | 1st patient | 2nd patient |
|---|-------------------------------|------------------|---------------------|
| α -Neuraminidase | 0.128 to 0.488 ^(a) | 0 ^(b) | 0.02 ^(c) |
| β -Galactosidase ^(d) | 143.4 \pm 88.2 | 20.4 | 150 |
| β -Glucosaminidase ^(d) | 783.6 \pm 51.6 | 300 | 960 |
| β -Glucuronidase ^(d) | 320 \pm 151 | 60 | 354 |
| β -Glucosidase ^(d) | 9 \pm 6 | 2.88 | 3 |
| α -Galactosidase ^(d) | 41.4 \pm 34 | 23.4 | 12 |
| α -Mannosidase ^(d) | | | |
| pH 3.5 | 83 \pm 29 | 127 | — |
| pH 4.5 | 141 \pm 59 | 222 | — |
| Arylsulfatase A ^(d) | 299 \pm 176 | 216 | — |

(a) 10 determinations results of which are : 0.132, 0.132, 0.128, 0.152, 0.182, 0.244, 0.250, 0.257, 0.467, 0.488.

(d) 3 different determinations gave the same result.

(c) Results of 3 measures : 0, 0.02, 0.03.

(d) Artificial substrates (umbelliferyl derivatives).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (L. A. n° 217 : Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués), by the Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (U124 : Unité de Recherches ultrastructurales et biochimiques sur les cellules normales et cancéreuses), the Fondation pour la Recherche Médicale Française and by the Commissariat à l'Énergie Atomique.

REFERENCES

1. Hickman S. & Neufeld E. F. A hypothesis for I-cell disease : defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 49, 922.
2. Leroy J. G. & De Mars R. I. Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science*, 1967, 157, 804.
3. Leroy J. G., De Mars R. I. & Opitz J. M. I cell disease. P. 174 in : Birth Defects. *Original Article Series*, vol. 5, n° 4, *The National Foundation*, New York, 1969.
4. Morell A. G., Gregoriadis G., Scheinberg I. H., Hickman J. & Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 146.
5. Strecker G., Hondi-Assah Th., Fournet B., Spik G., Montreuil J., Maroteaux P., Durand P. & Farriaux J. P. Structure of the three major sialyl-oligosaccharides excreted in the urine of five patients with three distinct inborn diseases : « I-cell disease » and two new types of mucopolipidosis. *C.R. Acad. Sci.*, 1976, 282, 671.
6. Vladutiu G. D. & Rattazzi M. C. Abnormal lysosomal hydrolases excreted by cultured fibroblasts in I-cell disease (mucopolipidosis II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 67, 956.
7. Wiesmann U. N., Lightbody J., Vassella F. & Herschkowitz N. N. Multiple lysosomal enzyme deficiency due to enzyme leakage? *New Engl. J. Med.*, 1971, 284, 109.
8. Wiesmann V. N., Vassella F. & Herschkowitz N. N. I-cell disease : leakage of lysosomal enzymes into extracellular fluids. *New Engl. J. Med.*, 1971, 285, 1090.

G. STRECKER, J. C. MICHALSKI, J. MONTREUIL and J. P. FARRIAUX.

(Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et L.A. n° 217 du C.N.R.S., B.P. n° 36, 59650 Villeneuve d'Ascq, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules Driessens) et U. 124 de l'INSERM, B.P. n° 3567 59000 Lille Cédex et Service de Pédiatrie, Cité Hospitalière, Place de Verdun, 59000 Lille (France).

Reprints : Dr G. Strecker, Laboratoire de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq.

B - CONCLUSION

Un déficit total en α -neuraminidase vis-à-vis du sialoside II ($\alpha 2,6$) est observé dans les leucocytes des patients atteints de mucopolipidose de type II.

Le déficit en sialidase est vraisemblablement à l'origine de l'excrétion anormale de sialyl-oligosaccharides observés chez les malades et permet d'expliquer certaines des caractéristiques étiologiques de la maladie telle l'hypersialylation des enzymes lysosomaux, ce dernier point sera discuté plus en détail au paragraphe suivant.

Par analogie avec les autres types de glycoprotéinoses connues, nous proposons de désigner les affections caractérisées par une accumulation de sialosides et un déficit en α -neuraminidase par le terme général de "Sialidoses".

IV - ÉTUDE COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ NEURAMINIDASIQUE DANS LES DIFFÉRENTS TYPES DE SIALIDOSE

Une étude comparative de la sialyl-oligosaccharidurie accompagnant les différentes mucopolipidoses (ARTICLE 1) a montré que le taux relatif des différents sialyloligosaccharides variait suivant le type de la maladie. C'est ainsi que les oligosaccharides possédant respectivement des liaisons sialyl($\alpha 2,6$) et ($\alpha 2,3$) sont dans les rapports 1 : 1 dans le cas des mucopolipidoses II et III et de 8 à 30 : 1 dans les autres mucopolipidoses. Cette observation laisserait supposer des déficits affectant des espèces isoenzymatiques différentes. Nous avons effectué une étude comparative des activités neuraminidasiques en utilisant comme substrats naturels des sialyl-oligosaccharides possédant respectivement une liaison sialosyl $\alpha 2,6$ ou $\alpha 2,3$. Ces résultats sont rapportés dans l'ARTICLE 5.

BIOCHEMICAL BASIS OF SIX DIFFERENT TYPES OF SIALIDOSIS

G. STRECKER and J. C. MICHALSKI

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au CNRS No. 217, BP No. 36, 59650-Villeneuve d'Ascq and Institut de Recherches sur le Cancer (Institut Jules Driessens) et Unité 124 de l'INSERM, BP No. 3567, 59020-Lille Cédex, France

Received 26 September 1977

1. Sialidosis

Presently, six different inborn diseases can be defined as sialidosis. The semiology of mucopolipidosis II (I-Cell disease) is well known: the occurrence of numerous cytoplasmic inclusions in cultured fibroblasts, the increase of the activity of several lysosomal hydrolases (except β -glucosidase and acid phosphatase) in extracellular fluids contrasting with a decrease of the same activities in cultured fibroblasts are the most significant elements of diagnosis [1-3]. An elevated excretion of urinary sialyl-oligosaccharides has been observed [4,5], with a total lack of α -neuraminidase activity in leukocytes, while the other hydrolase activities are normal [6]. This defect of α -neuraminidase activity has been also found in cultured fibroblasts [7,8], but was not characteristic, in this case, of a primary defect, since the other hydrolases were also defective. This primary defect in α -neuraminidase is in good agreement with many other observations which have been made on mucopolipidosis II such as an increase of electronegativity of secreted hydrolases compared to intracellular or normal plasma hydrolases [9], and failure of their uptake by different types of cells [10]. Recognition markers of secreted glycoproteins, including acidic hydrolases, have been identified for different types of tissues as galactose, *N*-acetylglucosamine or mannose [11-13], and an α -neuraminidase deficiency might explain the abnormal

exocytosis of hydrolases in ICD fibroblasts by masking the recognition marker.

Mucopolipidosis III can be considered as an attenuated form of mucopolipidosis II. A partial defect of leukocyte α -neuraminidase activity (15% of the normal value) and a moderate excretion of urinary sialyl-oligosaccharides (10-20-fold the normal level) were also characterized [14,15].

Other known mucopolipidosis present quite different pathogenesis. Mucopolipidosis I is characterized by a profoundly diminished activity of α -neuraminidase and abnormal accumulation of sialic acid-containing compounds in cultured fibroblasts [8]. Nevertheless, the hydrolase activity abnormalities found in mucopolipidosis II and III are here not present. Structures of sialyl-oligosaccharides accumulating in urine have been described [16] and are identical to those of mucopolipidosis II.

Mucopolipidosis W. (provisionally named by the initial of the patient) is very similar to mucopolipidosis I, with additional renal insufficiency [17]. An accumulation of urinary sialyl-oligosaccharides and a total lack of leukocyte α -neuraminidase activity have been observed [4,5].

Patients De P. [18] and N. (Guazzi, Federico, Carlemagno, Michalski and Strecker) are adolescent and adults, without significant symptoms, except cherry-red macular spot and moderate neurological troubles. In these two 'new' types of mucopolipidosis (which are probably attenuated forms of mucopolipidosis I), a massive excretion of urinary sialyl-oligosaccharides has been observed and an α -neuraminidase deficiency was confirmed for the two patients De P. [5,15].

Abbreviations: Na, *N*-acetylneuraminic acid; Gal, galactose; Man, mannose; GNAc, *N*-acetylglucosamine; β -endo-GlcNase, β -endo-*N*-acetylglucosaminidase

Table 1
 α -Neuraminidase activity^a in leukocytes (nmol/h/mg protein)

| | Substrate | |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | α -AcNeu-(2 \rightarrow 6)-R | α -AcNeu-(2 \rightarrow 3)-R |
| 1. Concentration of substrate | 20 nmol/ 200 μ l | |
| Normal subjects | 0.128-0.488 (0.330; n = 30) | n.d. ^b |
| Sialidosis A | | |
| MLP II case no. 1 | 0.00 | n.d. |
| MLP II case no. 2 | 0.020 | n.d. |
| MLP III | 0.045 | n.d. |
| Sialidosis B | | |
| MLP W. | 0.006 | n.d. |
| MLP De P. brother | 0.036 | n.d. |
| MLP De P. sister | 0.045 | n.d. |
| 2. Concentration of substrate | 400 nmol/200 μ l | 320 nmol/200 μ l |
| Normal subjects | 13.77-29.60 (19.60; n = 12) | 8.00-12.90 (12.40; n = 12) |
| Sialidosis A | | |
| MLP II case no. 3 | 2.00 | 1.60 |
| MLP II case no. 4 | 0.02 | 2.45 |
| Sialidosis B | | |
| MLP W. | 0.00 | 9.92 |
| MLP I case no. 1 | 0.00 | 10.90 |

^a All the other hydrolase activities are normal or slowly increased, except β -galactosidase (15% of the normal value for MLP case no. 1)

^b n.d. not determined

Table 2
 α -Neuraminidase activity in cultured fibroblasts (nmol/h/mg protein)

| | Substrate | |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | α -AcNeu-(2 \rightarrow 6)-R | α -AcNeu-(2 \rightarrow 3)-R |
| Concentration of substrate | 20 nmol/200 μ l | 40 nmol/200 μ l |
| Control 1 | 0.436 | 0.339 |
| Control 2 | 0.835 | 0.668 |
| Sialidosis B ^a | | |
| MLP De P. (brother) | 0.020 | 0.267 |
| MLP I (case no. 2) | 0.00 | 0.607 |

^a All the other hydrolase activities are normal or slowly increased

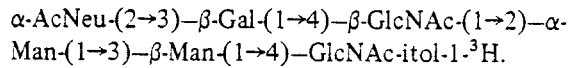
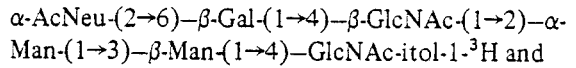
From a biochemical point of view, these six types of sialidosis can be divided into two classes: sialidosis type A, (mucopolipidosis II and III) with an α -neuraminidase defect, a moderate excretion of urinary sialyl-oligosaccharides (10–20-fold the normal value for mucopolipidosis III and 40–120-fold for mucopolipidosis II) and a leakage of lysosomal hydrolases into extracellular fluids; sialidosis type B, (mucopolipidosis I, W. De P. and N.) with an α -neuraminidase defect and massive excretion of urinary sialyl-oligosaccharides (500–1000-fold the normal value), but without lysosomal hydrolase exocytosis. On the other hand, it is interesting to note [5] that the accumulated compounds show a ratio of α -(2→6) to α -(2→3)-sialyl linkages of 1 for sialidosis A and of 10–30 for sialidosis B.

2. Enzymatic studies

All the above facts can be explained by the hypothesis that sialidosis A is due to a defect of both

α -(2→3) and α -(2→6) neuraminidase activities, while sialidosis B is only characterized by the single defect of α -(2→6) neuraminidase activity.

In order to verify this hypothesis, we determined the α -neuraminidase activities using as natural substrates two sialyl-oligosaccharides isolated from the urine of the patients. After reduction with tritiated potassium borohydride, their formulae were as follows:



The neuraminidase activity was determined according to the procedure described [6]. The results we obtained (tables 1 and 2) confirm the hypothesis of a specific defect of α -(2→6) neuraminidase in the case of sialidosis B.

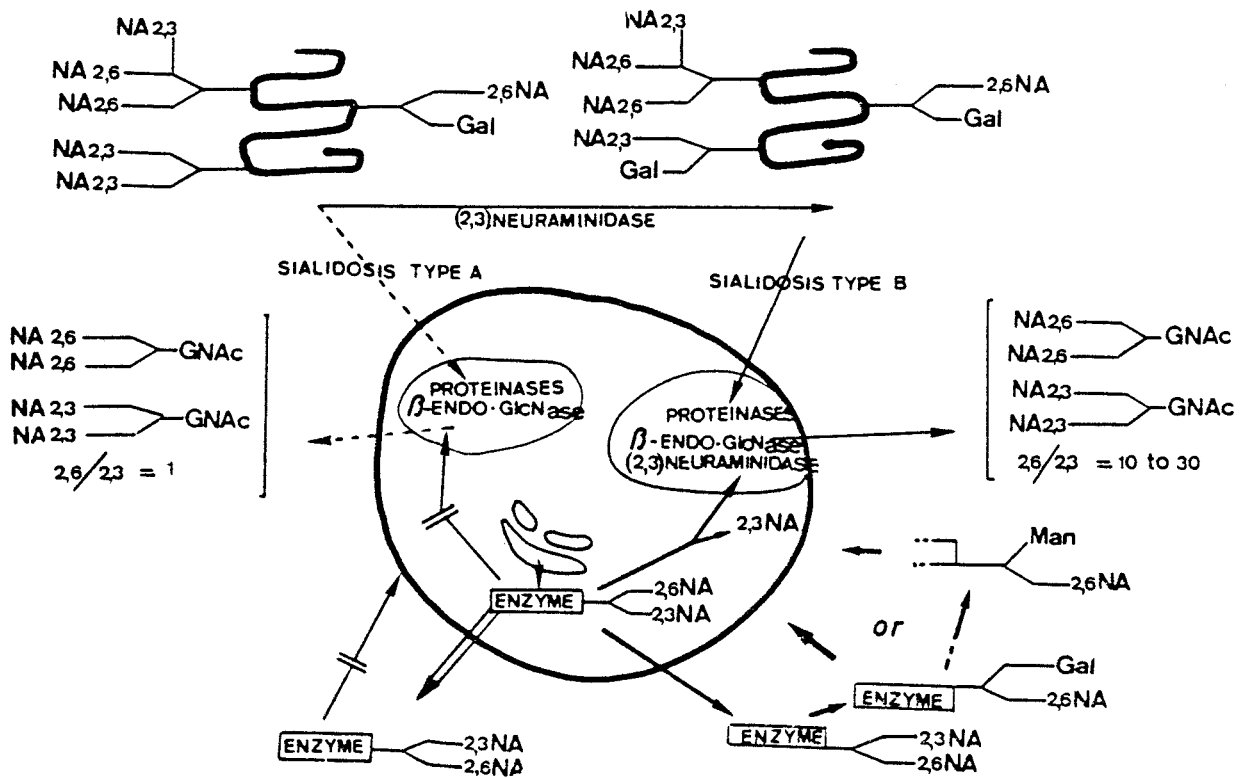
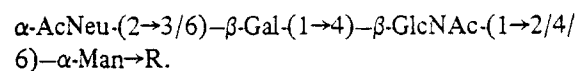


Fig.1. Catabolism of glycoproteins and packaging of lysosomal hydrolases in sialidosis A and B.

3. Discussion

It has been recently shown that plasma hydrolases are normally sialylated (except for β -glucosidase, β -xylosidase and acid phosphatase) in contrast to liver hydrolases [19]. It has been also shown that the release of only two sialyl residues on the twelve present in ceruleoplasmin was sufficient to result in endocytosis of the glycoprotein [11]. In view of these facts, we propose a scheme (fig.1) which might explain the differential etiology of the two types of sialidosis. The broken line (-||→) indicates the failure of hydrolase packaging which characterizes sialidosis A. In the case of sialidosis B, a single defect of α -(2→6) neuraminidase activity allows a normal uptake of lysosomal hydrolases. The moderate excretion of sialyl-oligosaccharides in the case of sialidosis A is probably due to the slackening of glycoprotein endocytosis (dotted line, fig.1).

It has been also found that desialylation of ICD-excreted β -hexosaminidase with *Clostridium perfringens* neuraminidase did not enhance enzyme uptake by β -hexosaminidase-deficient, non-ICD cells [20]. However, Ullrich and von Figura [21] found that endocytosis of α - and β -N-acetylglucosaminidase by human skin fibroblasts was inhibited by D-mannose and L-fucose and that of β -glucuronidase by mannose. These facts do not confirm the hypothesis of a masking of recognition markers due to a primary defect in α -neuraminidase. since glycoproteins, and probably hydrolases, possess this common terminal structure:



The desialylation of excreted hydrolases could not restore their endocytosis, in the case of cultured fibroblasts.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé No. 217: Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124:

Unité de Recherches ultrastructurales et biochimiques sur les cellules normales et cancéreuses), the Fondation pour la Recherche Médicale Française and the Commissariat à l'Énergie Atomique. We are indebted to Drs J. P. Farriaux, P. Durand, P. Maroteaux, M. Poissonnier and D. Fontan for supplying biological material. We are grateful to Professor J. Montreuil for interest and encouragement.

References

- [1] Leroy, J. G., DeMars, A. I. and Opitz, J. M. (1969) in: Proc. 1st Conf. The Clinical Delineation of Birth Defects (Bergsma, D. and Mc Kusick, V. A. eds) Birth Defects, Orig. Ser. Vol. V, pp. 174-185.
- [2] Weissmann, U. N., Vassella, F. and Herschkowitz, N. (1971) N. Engl. J. Med. 285, 1090-1091.
- [3] Leroy, J. G., Ho, M. W., Mc Brinn, M. C., Zielze, K., Jacob, J. and O'Brien, J. S. (1972) Pediat. Res. 6, 752-761.
- [4] Strecker, G., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Maroteaux, P., Durand, P. and Farriaux, J. P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 444, 349-358.
- [5] Strecker, G., Peers, M. C., Michalski, J. C., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Farriaux, J. P., Maroteaux, P., and Durand, P. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 391-403.
- [6] Strecker, G., Michalski, J. C., Montreuil, J. and Farriaux, J. P. (1976) Biomed. Exp. 25, 238-240.
- [7] Thomas, G. H., Tiller, G. E., Reynolds, L. W., Millers, C. S. and Bace, J. W. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 188-195.
- [8] Cantz, M., Gehler, J. and Spranger, J. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 732-738.
- [9] Vladutiu, G. O. and Rattazzi, M. C. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 956-964.
- [10] Hickman, S. and Neufeld, E. F. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 992-999.
- [11] Ashwell, G. and Morell, A. G. (1974) Adv. Enz. 41, 99-128.
- [12] Stahl, P., Six, H., Rodman, J. S., Schlesinger, P., Tulsiani, D. R. P. and Touster, O. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4045-4049.
- [13] Hieber, V., Distler, J., Myerowitz, R., Schminkel, R. D. and Jourdan, G. W. (1976) Biochem. Res. Commun. 73, 710-717.
- [14] Strecker, G. (1977) in: Les Oligosaccharidoses (Farriaux, J. P. ed) pp. 13-25, Crouan-Roques, Lille and Patn. Biol. (1977) in press.
- [15] Michalski, J. C. and Strecker, G. (1977) in: Les Oligosaccharidoses (Farriaux, J. P. ed) pp. 127-130, Crouan-Roques, Lille.
- [16] Michalski, J. C., Strecker, G., Fournet, B., Cantz, M. and Spranger, J. (1977) FEBS Lett. 79, 101-104.

- [17] Maroteaux, P., Humbel, R. and Mande, R. (1975) in: Un nouveau type d'oligosaccharidose. IIe Symp. Eur. Mucopolysaccharidoses, Anvers, 25-26 April.
- [18] Durand, P., Gatti, R., Cavaliere, S., Tondeur, M., Michalski, J. C. and Strecker, G. (1977) *Helv. Paediat. Acta* in press.
- [19] Willcox, P. and Renwick, A. G. C. (1977) *Eur. J. Biochem.* 73, 579-590.
- [20] Vladutiu, G. O. and Rattazzi, M. C. (1977) *Pediat. Res.* 11, 465.
- [21] Ullrich, K. and Von Figura, K. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.

L'activité α -neuraminidasique estimée sur des homogénats de leucocytes et de fibroblastes a permis de montrer que les activités (α 2,6) et (α 2,3) neuraminidasiques étaient pratiquement nulles dans les cas de mucopolysaccharidose de type II et III. Dans les cas de mucopolysaccharidose de type I, W et De P., si l'activité (α 2,6) est totalement nulle, l'activité (α 2,3) neuraminidasique conserve cependant une activité normale ou partielle.

Dans le cas de la mucopolysaccharidose de type II, l'absence totale d'activité neuraminidasique est susceptible d'expliquer la non-reconnaissance des hydrolases acides, anormalement sialylées par les fibroblastes suivant un processus vraisemblablement analogue à celui décrit à propos de la reconnaissance spécifique des glycoprotéines sériques par la membrane hépatique. L'hypersialylation peut également expliquer les propriétés anormales des membranes plasmiques des fibroblastes I-Cell. Dans le cas de la mucopolysaccharidose de type I et de ses variants (De P et W.) la fuite des hydrolases acides lysosomiaux vers le milieu extracellulaire n'est pas observée, bien qu'une légère augmentation des hydrolases sériques accompagnée d'une électronégativité accrue ait été décrite. Nous pouvons donc supposer, que l'activité résiduelle en α 2,3 neuraminidase soit compatible avec une séquestration fonctionnelle des hydrolases par le lysosome.

L'étude comparée des anomalies biochimiques précédemment décrites, semble en faveur d'une subdivision des différentes formes de sialidoses en

a - Sialidose de type A (MLPII et III) caractérisées par une élévation de certaines hydrolases sériques, une diminution de ces mêmes activités dans le fibroblaste en culture, une excrétion modérée de sialosides urinaires et un déficit total de l'activité α -neuraminidasique du leucocyte (dont toutes les autres activités hydrolasiques sont demeurées normales).

b - Sialidose de type B (MLPI, W., De P. et N.) caractérisées par des activités normales des hydrolases sériques ou fibroblastiques, l'excrétion

massive de sialyl-oligosaccharides urinaires et un déficit total ou partiel de l'activité α -neuraminidasique du leucocyte ou du fibroblaste en culture.

Les faits observés à propos de la sialidose de type B ne permettent pas d'envisager un dysfonctionnement identique à celui décrit pour la mucopolidose de type II. Le seul point essentiel opposant ces deux types de sialidoses, mis à part le problème des anomalies enzymatiques consiste en l'observation d'une déficience du rapport des liaisons $(\alpha 2,6)\text{NeuAc}/(\alpha 2,3)\text{NeuAc}$ pour les oligosaccharides accumulés qui est de 1 pour la sialidose de type A et de 8 à 30 pour la sialidose de type B.

Les différences biochimiques observées à propos des sialidoses A et B pourraient s'expliquer d'un point de vue génétique par des mutations ponctuelles des unités oligomériques constitutives des α -neuraminidases. Il faudrait alors supposer que ces hydrolases soient de la forme $(\alpha)_m$ pour l' $\alpha 2,3$ neuraminidase et $(\alpha_m\beta_n)$ pour l' $\alpha 2,6$ neuraminidase. La mutation de la sous-unité α correspondrait dans ce cas à la sialidose de type A, la mutation de la sous-unité β à la sialidose de type B.

V - ÉTUDE DES ACTIVITÉS α -NEURAMINIDASQUES DU FOIE HUMAIN

Afin de vérifier l'hypothèse préalablement mentionnée de l'existence de différentes formes isoenzymatiques d' α -neuraminidases dans les tissus humains, nous nous sommes attachés à l'étude de la spécificité de ces enzymes au niveau du foie humain. Le choix de cet organe se justifiait par le fait qu'il s'agit de l'un des sièges majeurs du catabolisme des glycoprotéines au niveau de l'organisme, et d'autre part par la quantité de protéines accessibles en vue d'une éventuelle purification enzymatique. L'ensemble de ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire du Professeur SCHAUER à Kiel (R.F.A.), et sont résumés dans les ARTICLES 6 et 7.

PROPERTIES OF HUMAN LIVER LYOSOMAL NEURAMINIDASE

EVIDENCE FOR TWO PARTICULATE FORMS OF THE ENZYME WITH DIFFERENT SUBSTRATE SPECIFICITIES

Jean-Claude MICHALSKI^{*}, Anthony P. CORFIELD^{**} and Roland SCHAUER^{***}
Biochemisches Institut, Christian Albrechts Universität, D-2300 KIEL (G.F.R.)

KEY WORDS : human liver, sialidases, lysosomes, glycoproteins, gangliosides

ENZYMES : sialidase, acylneuraminyl hydrolase (E.C. 3.2.1.18) still
recommanded name : neuraminidase

SIALYLHEXASACCHARIDES :

Sialoside I : NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,3)Man(β 1,4)GlcNAc

Sialoside II : NeuAc(α 2,6)Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,3)Man(β 1,4)GlcNAc

All oligosaccharides and glycolipids are abbreviated according to the
recommandations of the IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature
(cf Lipids (1977) 12, 455-468)

* Present address : Laboratoire de Chimie Biologique, Université des
Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex
(France)

** Present address : University of Bristol, Department of Medecine,
Bristol Royal Infirmary, BRISTOL BS2 8HW, England.

*** To whom all correspondance should be sent.

SUMMARY

The intracellular localization of sialidase from human liver was investigated. The enzyme activity was mainly localized in the lysosomal fraction, no activity could be detected in the cytosol. The lysosomes exhibit activity toward sialyl-lactose, sialyloligosaccharides, BSM mucin, fetuin and gangliosides. All type of sialosyl-linkages are cleaved with the rate $\alpha 2,3 > \alpha 2,6 > \alpha 2,8$.

Ca^{++} ions stimulate the sialidase activity towards sialyl-lactose, but have no effect on the rate of cleavage of gangliosides. Hg^{++} and Cu^{++} ions inhibit both sialyl-lactose and gangliosides hydrolysis. After hypotonically disruption of the lysosomes. The total sialidase activity is recovered in the pellet indicating a membrane localization of the enzyme. The use of Triton X-100 leads to the solubilization of an enzymatic form active only on gangliosides and mucins, the activity towards oligosaccharides and glycoproteins remains in the pellet. The use of sialidase inhibitors : N-4-nitrophenyl oxamic acid, and N-acetyl 2,3-dehydro-2 deoxy neuraminic acid (Neu5Ac 2en), also demonstrates different inhibition pattern respectively for the "ganglioside" or "glycoprotein" sialidases.

INTRODUCTION

Neuraminidases (sialidases, acylneuraminylglycohydrolase E.C. 3.2.1.18) are involved in hydrolyzing sialic acid residues α -ketosidically bound to oligosaccharides, glycoproteins, glycopeptides and glycolipids (1,2). They have been demonstrated in several mammalian organs (3-5) and in various subcellular fractions (6-8). Most of the sialidase activity has been found associated with the lysosomes (9,10). If the activity found in different animals organs is well documented, only a few informations are available concerning the human enzymes. The recent discovery of genetic diseases (Mucopolipidoses and sialidoses) associated with sialidases defects (2,11) has greatly increased the interest of human forms of the enzyme, and several investigations, mostly clinically oriented have been realized on cultured fibroblasts and leucocytes (2,11). Previous reports of Meyer *et al.* (12) and Alhadeff and Wolfe (13) described the presence of a neuraminidase activity in human liver mostly associated with the lysosomal fraction. This report describes the subcellular localization of human liver neuraminidases, the general properties and substrate specificity of the lysosomal activity. Evidence on the occurrence of two particulate forms of the lysosomal enzyme with different substrate specificities is given.

MATERIALS AND METHODS

* Subcellular fractionation.

Normal human liver obtained at autopsy 6-10 h after death was kindly provided by Dr. H. Stein (Department of Pathology, University of Kiel). For subcellular localization studies fresh tissues were used. For other experiments tissues were stored at -80°C prior to use. All procedures were carried out at $0-4^{\circ}\text{C}$. Approximately 300 x g of liver was washed with ice-cold 0.154 M KCl to remove blood and was then passed through a meat grinder. The ground liver was suspended in a 0.5 fold vol. of 0.154 M KCl solution containing 1 mM phenylmethane-sulfonylfluoride (PMSF) as proteinase inhibitor and homogenized by two

strokes of a motor-driven loose fitting Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate was centrifuged 15 min at 1500 x g in a Sorvall GSA rotor to yield the nuclear fraction. The mitochondrial fraction was obtained by centrifuging the supernatant 3 min at 33.000 x g. The resulting supernatant was centrifuged at 63.000 x g, 10 min to yield the lysosomal fraction ; the supernatant as well as the fluffy pink layer of the pellet (microsomes) were discarded and centrifuged at 105.000 x g 30 min in a Beckman 50 TI rotor, to give the microsomal and cytosolic fractions.

* Preparation of the lysosomal membranes

The lysosomal fraction was suspended in a 10 vol. hypotonic solution of 5 mM acetate buffer pH 5.5 stirred for 30 min at 0°C and then centrifuged at 3000 x g for 15 min ; the milky supernatant was discarded and the pellet was resuspended in a 10 fold vol. of 1 M NaCl, stirred for 14 at 0°C and centrifuged at 105.000 x g for 30 min to give a supernatant (NaCl washings) and a pellet (lysosomal membranes). In solubilization experiments, the membranes were suspended in 5 vol. of 20 mM Tris/HCl solution containing 1 % Triton-X-100, adjusted to pH 6.0, stirred for 1 h, and during this time twice submitted to a 20 s sonication in a cooling bath with a "Branson" sonifier (model B-12, microtip setting 7.5 A) and centrifuged at 105.000 x g.

* Enzyme assays

For sialidase assays, the incubation mixtures contained 0.05 to 0.1 mg protein from the fraction and 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0 in a final volume of 0.2 ml. Substrates were added in aqueous solution to give a final concentration of 1 mM glycosidically bound sialic acid.

The control incubation mixtures (blanks) were performed using boiled enzyme. Some oligosaccharides or the 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid made a small contribution to the absorbance which was corrected with the appropriate blanks.

Ganglioside sialidase was assayed as in (14). International units of enzyme activity were employed being that amount of enzyme required to release 1 μ mol sialic acid/min. Routinely incubations were made at 37°C

for 2 h and stopped by freezing or adding the periodate agent for the periodic acid/thiobarbituric acid test (15). Microadaptations of the periodic acid/thiobarbituric acid method were used for the estimation of free sialic acid, and those of the orcinol/HCl/Fe³⁺ method for the estimation of total (free and bound) sialic acid.

All other enzymes were assayed as in (16).

* Substrates and inhibitors

Fetuin was obtained from Sigma and dialysed extensively against water before use. Sialyllactose isomers (II³ Neu5Ac Lac and II⁶ Neu5Ac Lac) were prepared according to (17). Bovine brain ganglioside mixture was prepared by the partition method of Folch *et al.* (22), and individual gangliosides were obtained as described by MOMOI *et al.* (18). Bovine submandibular gland mucus glycoprotein was obtained as detailed in (19). Sialylhexasaccharides were purified from sialidosis urine (20).

2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid and N-(4-nitro-phenyl)oxamic acid were gifts from Dr. R. Veh (Bochum).

* Protein assays

Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (21) using bovine albumin standards.

RESULTS

* Subcellular distribution of sialidase activity

In order to obtain a rough estimate of the intracellular distribution of sialidase in human liver, the fractionation scheme described under "methods" was followed. The relative purity of each fraction was followed by the assay of marker enzymes (succinate dehydrogenase for mitochondria, arylsulfatase for lysosomes and glucose 6-phosphatase for the microsomes), which showed expected distribution pattern.

Figure 1 shows that neuraminidase present the greatest specific activity in lysosomes ; some activity was also found in other fractions mainly the nuclear one (corresponding certainly to the plasmic membrane enzyme),

and also in microsomes. The activity of this latest enzyme seems to be increased when the assay is realized at pH 5.4. The activity found in the mitochondrial fraction corresponds to contaminant lysosomes as indicated by the marker enzymes. It should be noted that no sialidase activity is detected in cytosol even after concentration of this fraction. This result is in disagreement with previous report of Meyer et al. (11) and may be explained by the use of protease inhibitor in the fractionation procedure, as well as the use of fresh tissue for the experiment.

The data given in table 1 show that more than 90 % of the total activity of the lysosomal activity remain in the membrane after the treatment of hypotonic shock and washing with 1 M NaCl; 60 % of the total acid phosphatase activity (a lysosomal membranes' marker enzyme) remains associated with the membranes in the same condition. 53 % of the pellet activity can be solubilized by the Triton X-100/sonication procedure. The enzyme released by this method remain active only on gangliosides and mucins ; its purification has been described elsewhere (22).

* Properties of lysosomal sialidase

The optimum pH was 4.4. when determined with sialyl-lactose, and 4.1 with gangliosides mixture. This low pH optimum is typical for other sialidasases, especially those from lysosomal origin (2). The hydrolysis of both sialyl-lactose and gangliosides proceeds linearly for 4 hours, after which time there was a slight decrease in the hydrolysis rate. There was also a linear relationship between the concentration of enzyme and the amount of product formed.

* Stability of neuraminidase

Storage of a lysosomal suspension in acetate buffer at 4°C for 24 h causes 30 to 40 % loss of activity. 80 % of the activity was recovered after storage of the suspension one week at - 20°C. Only 50 % of the activity remains after two cycles of freezing and thawing. Mercaptoethanol or dithiothreitol (2 mM) inhibits the enzyme

and doesn't prevent the loss of activity during the storage. Preincubation of the enzyme 30 min at 40°C gives a 50 % decrease of the enzyme activity towards all the substrates tested. The enzyme activity was completely destroyed by a 30 min preincubation at 50°C.

* Influence of ions

The influence of different ions on sialidase activity has been tested and summarized in Fig. 2. Ca^{++} stimulated the hydrolysis of sialyl-lactose, but has no effect on the rate of hydrolysis of gangliosides. Hg^{++} and Cu^{++} inhibit both sialyl-lactose and gangliosides cleavage. Similar inhibition pattern has been previously described for sialidases of different sources (23,24).

* Inhibition studies

Two different inhibitors of sialidase were tested : N-acetyl 2,3-dehydro-2 deoxyneuraminic acid (Neu5Ac 2en) and N-4-nitrophenyl oxamic acid. Fig. 3 shows the inhibition pattern obtained for different substrates. It can be observed that Neu5Ac 2en inhibits the sialidase activity for the different gangliosides or sialyl-lactose ; activity towards glycoproteins (fetuin, orosomucoïd) as well as for oligosaccharides derived from glycoprotein carbohydrate chains (Sialoside I and II) remains unchanged. Oposite results are obtained with N-(4-nitrophenyl)oxamic acid which selectively inhibits gangliosides, but has no effect on glycoproteins. Similar results have previously been obtained for horse liver sialidases (25). These results confirmed those obtained by solubilization experiments and are in favour of two different enzymatic forms with different substrates specificities.

* Substrate specificities

The activity of lysosomal sialidase towards different sialyl-glycoconjugates with different type of sialosyl linkages has been tested. The results are summarized in Fig. 4. All types of substrates including sialyl-lactose, sialyl-oligosaccharides from different origin (milk or glycoproteins), mucins, gangliosides, glycoproteins are cleaved.

Different rate of cleavage are observed according to the type of sialosyl-linkage with the order $2,3 > 2,6 > 2,8$. It should be noted that no great differences can be observed according to the nature of the sialic acid (N-acetyl or N-glycosyl). A slow hydrolysis of GM₁ ganglioside is observed, but it can be related to the presence of β -galactosidase activity in the lysosomal suspension. Hydrolysis of 4-OAc-NeuAc-GM₃ ganglioside, which is known to be neuraminidase resistant (26) was observed. This fact may be associated with the presence of esterase activity in human liver (Schauer, unpublished).

Km values for different substrates at pH 4.0 were calculated using the Lineweaver and Burk plot (27) and are summarized in Table 2.

Our results concerning the sialidase activity of human liver demonstrate that the enzyme is mainly located in lysosomes. No activity is detected in the cytosol. This result in opposition with previous report concerning human liver (12), or rat liver enzyme (23), may be explained by the use of fresh tissues or the presence of proteases inhibitor in the fractionation procedure. The sialidase activity is firmly associated with the lysosomal membrane. The use of specific inhibitors demonstrate the presence of at least two forms of the enzymes. One form active on gangliosides or mucins can be solubilized by the use of Triton X-100 and sonication. If different hydrolysis rate have been demonstrated for sialosyl-linkages $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$, no one of the physical properties here reported seems in favour of the existence of specific isoenzymes for each types of linkages. The results presented herein should permit studies on the alterations of neuraminidase levels in pathological conditions.

REFERENCES

- 1 - CORFIELD, A.P. and SCHAUER, R. (1982) in *Sialic Acids : Chemistry, Metabolism and Function* (SCHAUER ed.) pp. 195-261, Springer Verlag, Wien
- 2 - CORFIELD, A.P., MICHALSKI, J.C. and SCHAUER, R. (1981) in *Perspectives in Inherited Metabolic Diseases*, Vol. 4, pp. 3-70, Ermes Ed., Milano
- 3 - ROSENBERG, A. and SCHENDGRUND, C.L. (1976) *Biological Roles of Sialic Acid*, Plenum Press, New York and London
- 4 - MORGAN, E.H. and LAURELL, C.B. (1963) *Nature* 197, 921-922
- 5 - CARUBELLI, R., TRUCCO, R.E. and CAPUTTO, R. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 60, 196-197
- 6 - MAHADEVAN, S., NDUAGUBA, J.C. and TAPPEL, A.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 212, 4409-4413
- 7 - SCHENDGRUND, C.L., REPMAN, M.A. and NELSON, J.T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 568, 377-385
- 8 - SCHENDGRUND, C.L. and ROSENBERG, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 6196-6200
- 9 - HORVAT, A. and TOUSTER, O. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 4380-4390
- 10 - MIYAGI, T. and TSUIKI, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* 141, 75-81
- 11 - LOWDEN, J.A. and O'BRIEN, J.S. (1979) *Am. J. Hum. Genet.* 31, 1-18
- 12 - MEYER, D.M., LEMONNIER, M. and BOURRILLON, R. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 1302-1303
- 13 - ALHADEFF, J.A. and WOLFE, S. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 975-980
- 14 - CANTZ, M. and MESSER, H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 97, 113-118
- 15 - SCHAUER, R. (1978) *Methods in Enzymology* 50C, 64-89
- 16 - DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. and APPELMANS, F. (1955) *Biochem. J.* 60, 604-617
- 17 - VEH, R.W., MICHALSKI, J.C., CORFIELD, A.P., SANDER-WEVER, M., GIES, D. and SCHAUER, R. (1981) *J. Chromatogr.* 212, 313-322
- 18 - MOMOI, T., ANDO, S. and NAGAI, Y. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* 441, 488-497
- 19 - TETTAMANTI, G. and PIGMAN, W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 41-50
- 20 - MICHALSKI, J.C., STRECKER, G., FOURNET, B., CANTZ, M. and SPRANGER, J. (1977) *FEBS Lett.* 79, 101-104

- 21 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL', R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 22 - MICHALSKI, J.C., CORFIELD, A.P. and SCHAUER, R. (1982) Hoppe Seyler's
Z. Physiol. Chem. 363, 1097-1102
- 23 - TULSIANI, D.R.P. and CARUBELLI, R. (1970) J. Biol. Chem. 215, 1821-1827
- 24 - SCHAUER, R., WEMBER, M. and TSCHESCHE, H. (1984) Hoppe Seyler's Z.
Physiol. Chem. 365, 419-426
- 25 - SANDER, M., VEH, R.W. and SCHAUER, R. (1979) in "Glycoconjugates Research
(Gregory, J.D. and Jeanloz, R.W. eds) Vol. II, pp. 927-931, Academic Press
New York
- 26 - SCHAUER, R. (1982) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40, 131-234
- 27 - LINEWEAVER, H. and BURK, D.J. (1934) J. Amer. Chem. Soc. 56, 659-665

| ENZYME | LYSOSOMES | O.05 M ACETATE WASHING | O.1 M NaCl WASHING | MEMBRANES | TRITON X-100 SOLUBLE FRACTION |
|----------------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------|-----------|----------------------------------|
| | S.A. | % | % | % | % |
| Protein (mg) | 8180 | 47 | 15 | 38 | 12 |
| Acid phosphatase | 2200 | 15 | 20 | 65 | 30 |
| β -N-acétylglucosaminidase | 760 \pm 46 | 25 | 70 | 5 | - |
| Sialidase * 2,3 sialyl-lactose | 150 \pm 12 | 2 | 5 | 93 | 2 |
| * GM ₃ | 420 \pm 25 | 10 | 9 | 81 | 53 |

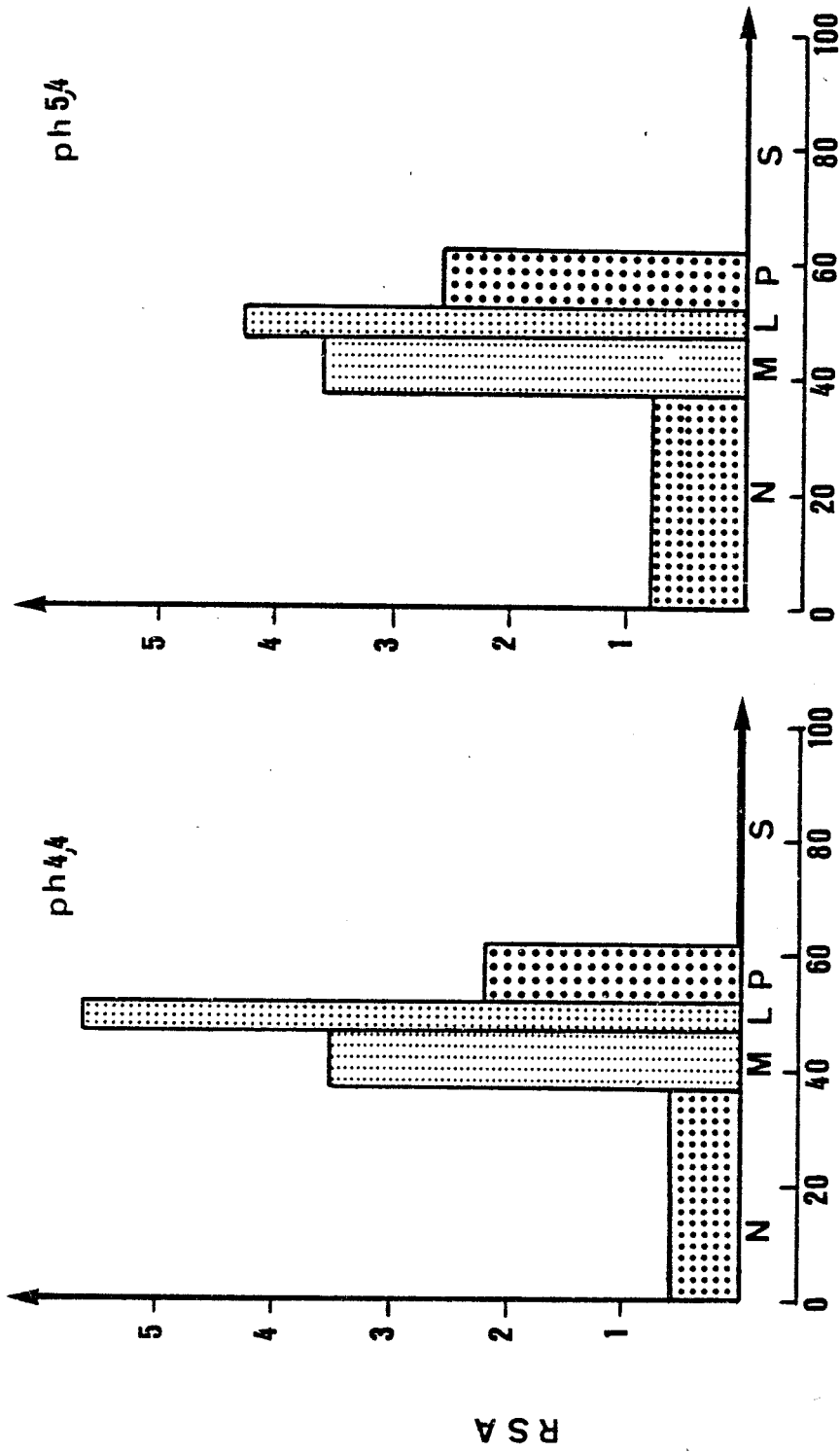
Table I : Distribution of enzymes and protein in the lysosomal subfractions. Yields are expressed as percentage of the whole lysosomal protein and activities. The specific activities (S.A.) of acid phosphatase, β -N-acetylglucosaminidase are defined as nmole of p-nitrophenol/min/mg protein. Activity of sialidase towards GM₃ and sialyl-lactose is given in μ /mg protein.

Table II : Kinetic parameters of human liver lysosomal sialidase towards different types of substrates.
 Km values were calculated at pH 4.0 using the lineweaver-Burk plot method.

| | Km 10^{-3} M |
|--|----------------|
| II ³ Neu5Ac Lac | 5.4 |
| II ⁶ Neu5Ac Lac | 3.2 |
| Sialoside I | 3.6 |
| Sialoside II | 1.6 |
| GM ₃ (II ³ Neu5Ac Lac Cer) | 8.4 |
| Fetuin | 3.2 |
| Disialyl-lactose (II ³ (Neu5AC) ₂ Lac) | 1.8 |
| Colominic | 1.4 |

LEGENDS TO FIGURES

- Figure 1 : Subcellular localization of human liver sialidase activity. Fractions are represented in the order of their isolation. (N : nucleus, M : mitochondria, L : lysosomes, P : microsomes, S : cytosol). Each fraction is represented separately by its own relative specific activity (percentage of total recovered activity/percentage of total protein recovered). In the abscissa scale, each fraction is represented (cumulatively from left to right) by its protein content, expressed as a percentage of the total protein. Sialidase was assayed with ^{32}P -sialyl-lactose as a substrate.
- Figure 2 : Effect of divalent cations on rat liver neuraminidases. The cations were added to the enzymes and the mixtures kept for 30 min at 4°C prior the enzyme assay. ■ Ca^{++} , ○ Zn^{++} , □ Mg^{++} , ● Cu^{++} , ▲ Hg^{++} .
- Figure 3 : Inhibition of human liver membrane bound lysosomal sialidase by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid a) and N-(4-nitrophenyl)-oxamic acid b) with the following substrates : α_1 -acid glycoprotein (●) ; fetuin (■) ; $\text{IV}^6\text{Neu5Ac1cOse}_4$ (▲) ; $\text{Neu5Ac2-6Gal-GlcNAc}(\text{Man})_2\text{GlcNAc}$ (○) ; $\text{II}^3\text{Neu5AcLacCer}$ (□) ; Ganglioside mixture (bovine brain) (Δ) ; $\text{II}^3\text{Neu5AcLac}$ (◐) ; $\text{II}^6\text{Neu5AcLac}$ (■) ; $\text{Neu5Ac2-6Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$ (▲).
- Figure 4 : Substrate specificity of human liver sialidase. 1U = 1 nmole 5NeuAc released/h/mg protein.



Total protein (%)

FIGURE 1

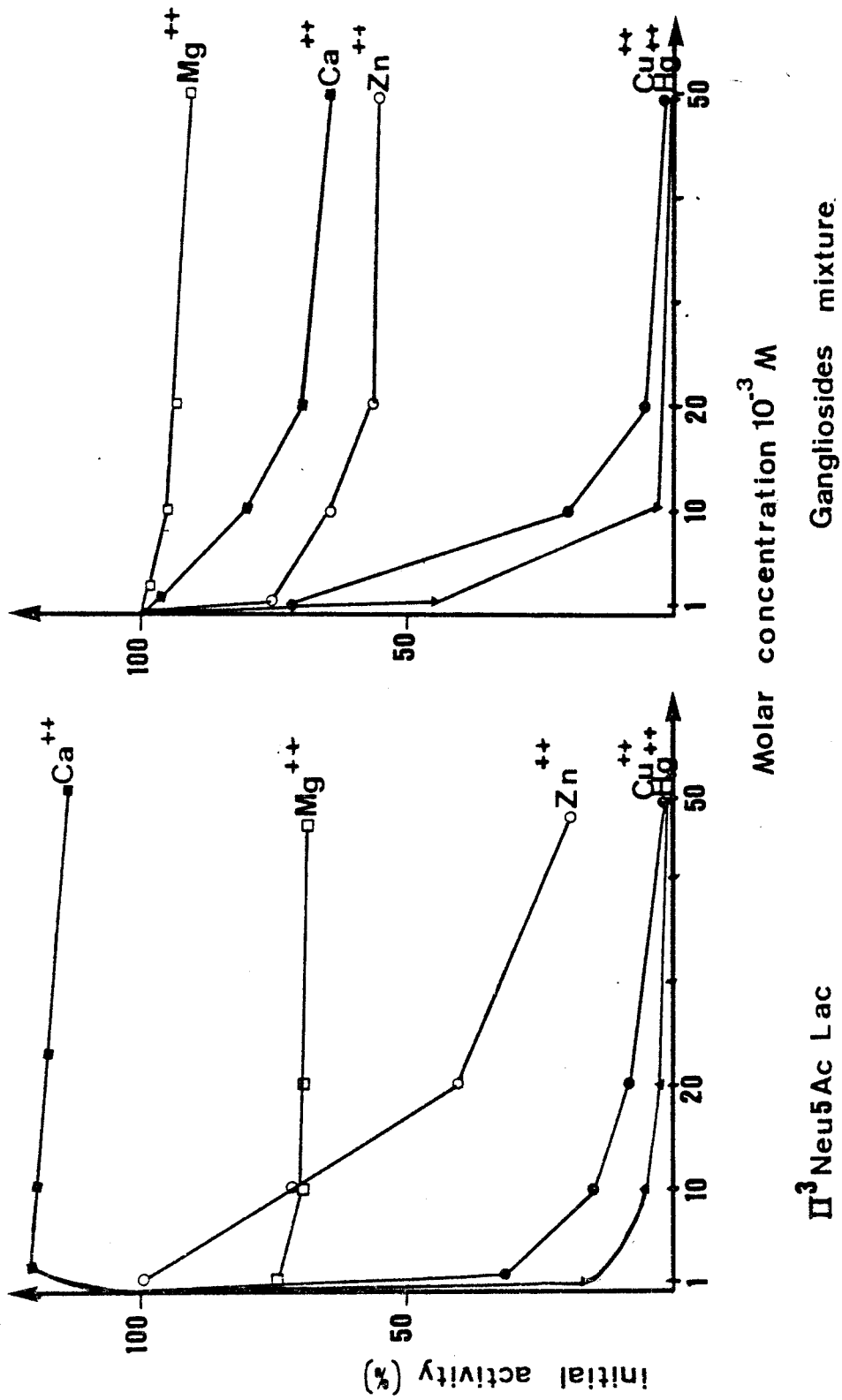


FIGURE 2

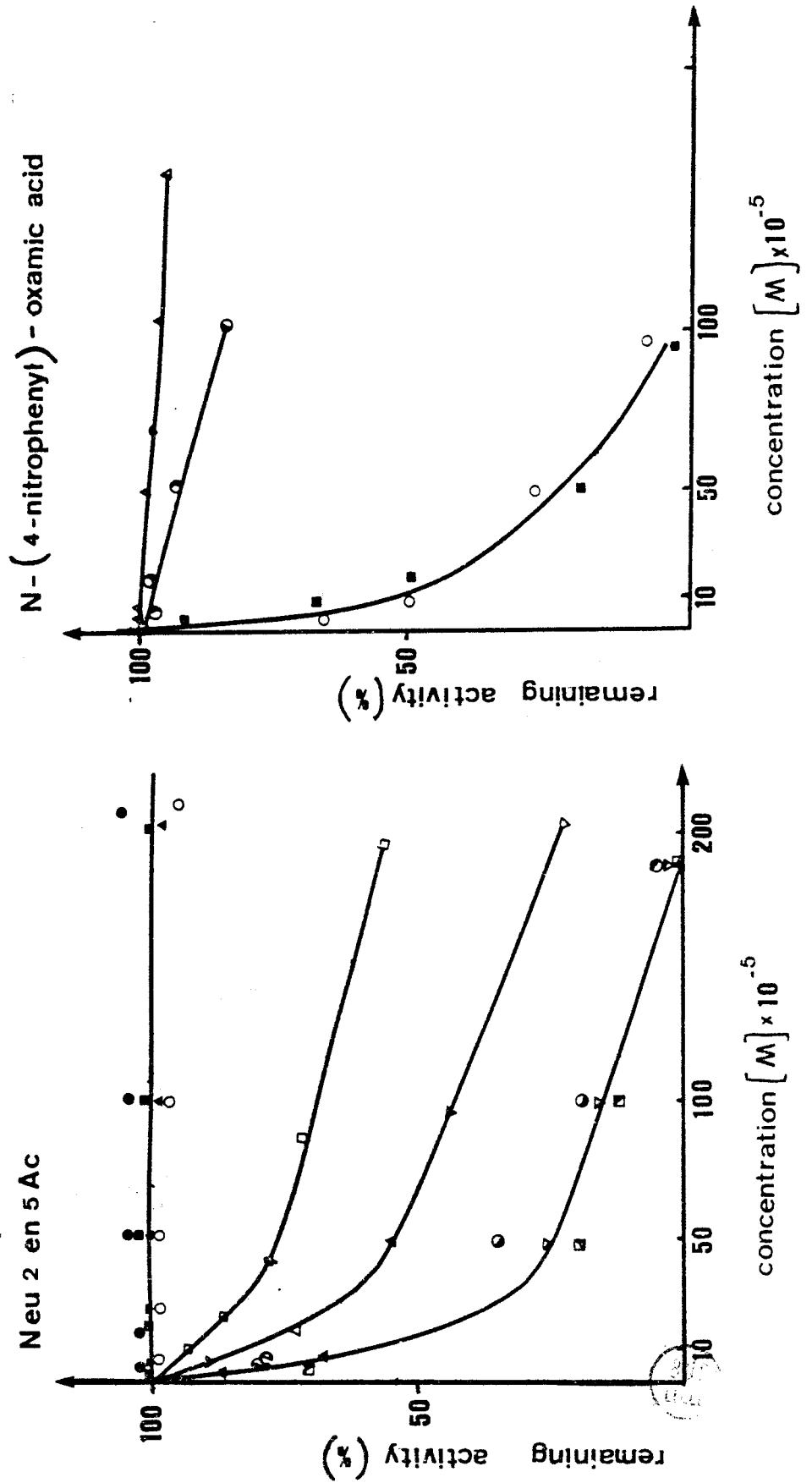


FIGURE 3

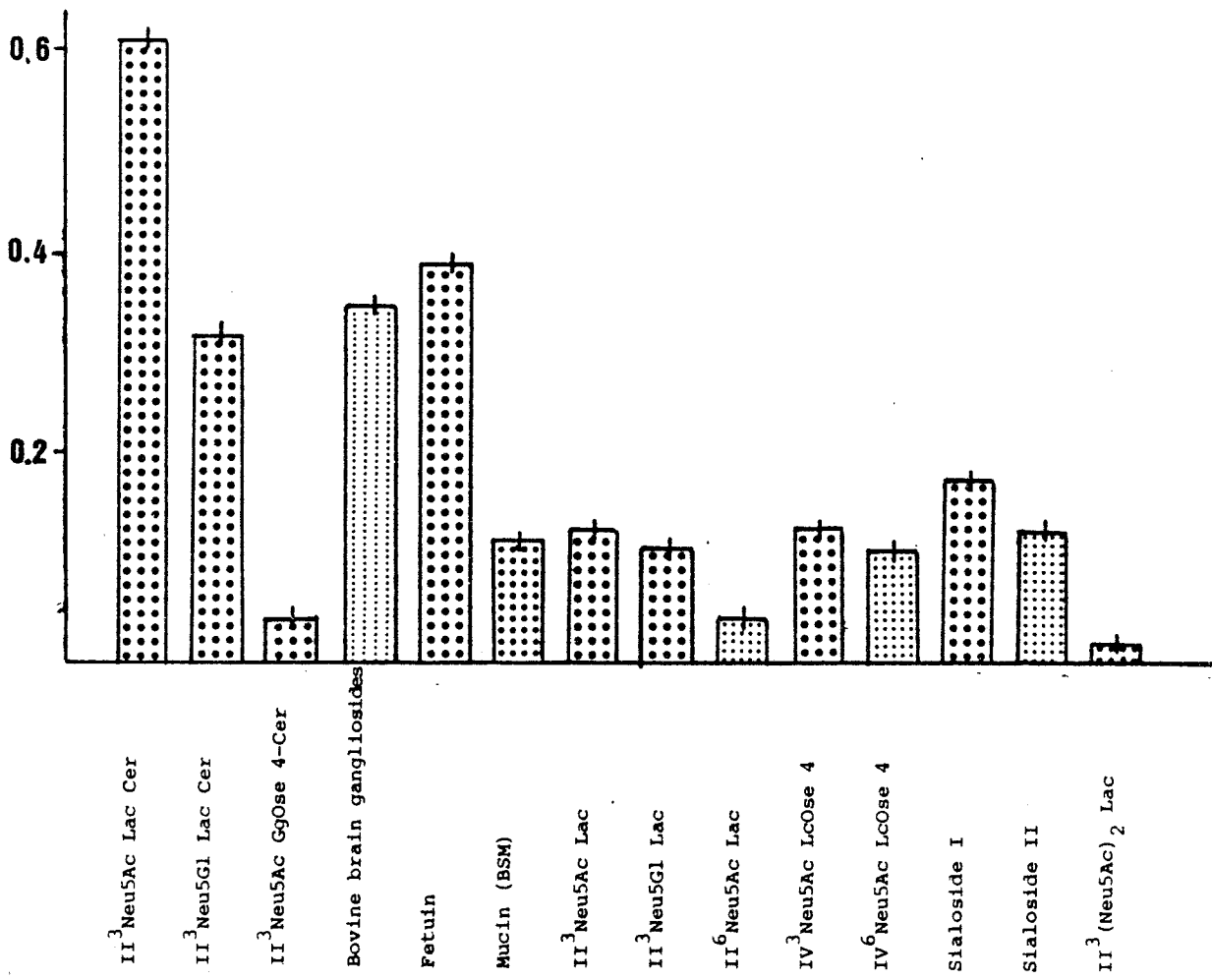


FIGURE 4

Solubilization and Affinity Chromatography of a Sialidase from Human Liver

Jean-Claude MICHALSKI, Anthony P. CORFIELD and Roland SCHAUER

Biochemisches Institut, Universität Kiel

(Received 24 May 1982)

Summary: A sialidase, acting on gangliosides and mucus glycoproteins (pH optimum 4.0-4.5) was solubilized by 1% Triton X-100 and short ultrasonication from a crude mitochondrial-lysosomal fraction isolated from human liver. The enzyme was enriched over 1000-fold with the aid of affinity chromatography on equine submandibular gland mucin bound to Sepharose and 20mM Tris/

HCl buffer, pH 7.5, as eluent. The sialidase exhibited a molecular mass of about 200000 Da on Sephadex G-200. On analytical gel electrophoresis, an enzymically active protein band of about 70000 Da was observed. A sialidase acting on sialyllactose remained in the membrane fraction and could not be solubilized.

Solubilisierung und Affinitätschromatographie einer Sialidase aus menschlicher Leber

Zusammenfassung: Eine Gangliosid- und Mucinspezifische Sialidase (pH-Optimum 4.0-4.5) wurde durch kurzes Beschallen einer aus Mitochondrien und Lysosomen bestehenden Fraktion menschlicher Leber in Gegenwart von Triton X-100 in Lösung gebracht. Die Enzymaktivität wurde affinitätschromatographisch auf Submandibulardrüsenmucin vom Pferd und unter Anwendung von 20mM Tris/HCl Puffer, pH 7.5, als Elu-

tionsmittel, über 1000-fach angereichert. Aus Sephadex G-200 eluierte das Enzym mit einer Molekularmasse von ungefähr 200000 Da, während bei analytischer Gelelektrophorese eine enzymatisch aktive Proteinbande mit etwa 70000 Da beobachtet wurde. Eine Sialyllactose-spezifische Enzymaktivität blieb in der Membranfraktion zurück und konnte nicht in Lösung gebracht werden.

Key words: Sialidase, human liver, affinity chromatography, equine submandibular gland mucin, gangliosides.

Enzyme:

β -N-Acetyl-D-hexosaminidase, 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexoside acetamidodeoxyhexohydrolase (EC 3.2.1.52);
 β -D-Galactosidase, β -D-galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.23);
 β -D-Glucosidase, β -D-glucohydrolase (EC 3.2.1.21);
Sialidase, acylneuraminyl hydrolase (EC 3.2.1.18), still recommended name neuraminidase.

Abbreviation:

ESM-Sepharose = Equine submandibular gland mucin-Sepharose.

0018-4888/82/0363-1097\$02.00

© Copyright by Walter de Gruyter & Co · Berlin · New York

The study of sialidases has been largely carried out with bacterial and viral enzymes^[1-3]. The investigation of mammalian sialidases has been limited by the complexity of mammalian cell systems and the mainly membrane-bound nature of the enzyme^[1-8]. Sialidases have been demonstrated in a variety of tissues, of which brain, liver and kidney have been extensively studied^[1-8]. A particulate form of the enzyme was described in lysosomes^[6], Golgi apparatus^[5] and plasma membrane^[7] of rat liver. The presence of a soluble activity has been reported in rat liver and brain^[8]. The discovery of sialidase deficiency in sialidosis as well as in mucopolipidosis II (I cell disease) and mucopolipidosis III (Pseudohurler polydystrophy)^[9-12] has focused attention on the molecular forms of human sialidase.

Purification of mammalian sialidases has not been widely reported^[2]. Recently, the separation of sialidases from pig kidney using immobilized α_1 -acid glycoprotein and *N*-(4-nitrophenyl)oxamic acid was published^[13]. We describe here the solubilization of a sialidase from human liver and a rapid partial purification of the enzyme by affinity chromatography.

Materials and Methods

Sialidase solubilization

All operations were carried out at 4 °C. Human autopsy liver (300 g) obtained 6–10 h after death was homogenized by two strokes of a motor-driven loose fitting Potter-Elvehjem homogenizer, in a 5-fold vol. of 0.154M KCl solution, containing 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride as proteinase inhibitor.

The homogenate was centrifuged 15 min at 1500 × *g* to yield the nuclear fraction, and a crude mitochondrial-lysosomal fraction was obtained by centrifuging the supernatant 15 min at 3000 × *g*. The latter fraction was suspended in 10 vol. of 5mM acetate buffer, pH 5.5, stirred for 30 min and centrifuged at 3000 × *g* for 15 min. The pellet was resuspended in a 10-fold volume of 1M NaCl, stirred for 1 h and centrifuged as above. The residue was suspended in 5 vol. of 20mM Tris/HCl solution containing 1% Triton X-100 and adjusted to pH 6.0, stirred for 1 h, and during this time twice submitted to a 20 s sonication in a cooling bath with a "Branson" sonifier (model B-12, microtip, setting 7.5 A). After centrifugation at 105000 × *g*, 30–50% of the total sialidase activity was found in the supernatant; the remaining pellet activity could not be solubilized even after 60 s sonication.

Affinity chromatography of sialidase

Equine submandibular gland mucin (ESM)-Sepharose 4B was prepared essentially as described by Corfield et al.^[14] for bovine submandibular gland mucus glycoprotein. One ml ESM-Sepharose contained 0.09 μmol sialic acid.

The soluble sialidase fraction obtained as described above was concentrated 2-fold using a PM-10 filter in an Amicon concentration cell and applied on a column (10 × 1 cm) packed with the ESM-Sepharose 4B gel, previously equilibrated with 20mM Tris/HCl solution adjusted to pH 6.0. The column was eluted at a flow rate of 1 ml per min and 2-ml fractions were collected. The elution was started using the solution for equilibration; after washing with 2 column volumes, sialidase was eluted by changing the pH of the 20mM Tris/HCl solution from 6.0 to 7.5. The sialidase-active fractions were concentrated as before.

The enzyme eluted from the affinity column was applied to a Sephadex G-200 column, equilibrated with 20mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, or submitted to electrophoresis on polyacrylamide gels (see below). Protein concentration was measured by the Lowry method^[15] using crystalline bovine serum albumin as a standard.

Electrophoresis

Discontinuous electrophoresis on an analytical scale in 8 cm 7.5% polyacrylamide gel for separation and 1 cm 3% gel for concentration was carried out in a Canalco electrophoresis apparatus with 0.4M Tris/HCl buffer, pH 8.9, as described before^[16]. Enzyme protein (50–100 μg) was dissolved in 60mM Tris/HCl buffer, pH 6.9, containing 0.001% bromophenol blue and 20% sucrose in a total volume of 100 μl. The concentration of protein was carried out at 150 V and the separation at 250 V in the course of approximately 4 h at 5 °C. The gels were stained for protein with Amido black as described before^[17] or, in parallel runs, studied for sialidase activity. The enzyme was localized in unstained gels after extraction of 0.5 cm sections with 200 μl 0.1M sodium acetate buffer, pH 4.5, for 30 min at 4 °C and incubation as described below. The marker proteins catalase, rabbit muscle aldolase, citrate synthetase, bovine serum albumin and ovalbumin purchased from Boehringer Mannheim GmbH, were employed in parallel runs to allow an estimation of the molecular mass^[17].

Enzyme assays

The incubation mixtures contained 0.05 to 0.1 mg protein from the enzyme fractions and 0.1M sodium acetate buffer, pH 4.0 or 4.5, in a final volume of 0.2 ml. Substrates were added in aqueous solution to give a final concentration of 1mM glycosidically bound sialic acid. The pH of the reaction mixture was at the optimum, pH 4.0 for gangliosides and pH 4.5 for submandibular

gland mucins and sialyllactose, as was established in preliminary experiments. The control incubation mixtures (blanks) were performed using boiled enzyme. Routinely, incubations were made at 37 °C for 2 h and stopped by freezing or adding the periodate agent for the periodic acid/thiobarbituric acid test^[18]. Incubations for longer times were under the same conditions as described above. Microadaptations of the periodic acid/thiobarbituric acid method were used for the estimation of free sialic acid and those of the orcinol/HCl/Fe³⁺ method for the estimation of total (free and bound) sialic acid^[18]. International units of enzyme activity were employed, being that amount of enzyme required to release 1 μmol sialic acid/min.

Protease, β-D-galactosidase and β-N-acetyl-D-hexosaminidase activities were determined as described in ref.^[17].

Substrates

Fetuin was obtained from Sigma and dialysed extensively against water before use. Sialyllactose (H³Neu5Ac-Lac) was prepared according to^[19] and equine submandibular gland mucin as described in^[20]. This protein contained 20% bound sialic acid after dialysis and saponification of the sialic acid ester groups. Bovine submandibular gland mucus glycoprotein was obtained as detailed in^[21]. Bovine brain ganglioside mixture was prepared by the partition method of Folch et al.^[22], and individual gangliosides were obtained as described by Momoi et al.^[23]. The purity of G_{M1} (H³Neu5Ac-GgOse₄Cer) was established by thin-layer chromatography.

Results and Discussion

Due to the protease activity associated with lysosomal preparations, a rapid purification technique of the sialidase was required, assisted by

the inclusion of the protease inhibitor phenylmethanesulfonyl fluoride during homogenization of the liver. The sialidase is strongly membrane-bound and cannot be released by either hypertonic shock or extraction by sodium chloride or detergents alone. Only the combination of extraction with Triton X-100 and short sonication gives a solubilization of 50% of the total sialidase activity. Increases in the duration of sonication or Triton X-100 concentration lead to loss of enzyme activity.

The procedure for partial purification of the human liver sialidase can be completed within 3–4 days and is summarized in the Table. Solubilization of the membrane-bound enzyme is followed by chromatography on an affinity column of ESM-Sepharose 4B, giving a yield of about 20% and a purification factor of more than a thousand. The majority of the contaminating proteins present in the soluble fraction, together with most of the Triton X-100, are removed during affinity chromatography on ESM-Sepharose 4B (Fig. 1). The solubilized sialidase activity is retarded on the column and is eluted by changing the pH of the Tris/HCl eluent from 6 to 7.5. The use of Tris/HCl at pH 6 avoids the need to change buffers during elution. At pH 6 the protein concentration is sufficient to buffer the solution.

The sialidase behaves as a high molecular mass protein (approximately 200 000 Da) on Sephadex G-200 (Fig. 2) and shows a specific activity of 7.73 mU/mg protein with bovine submandibular gland mucus glycoprotein and 5.07 mU/mg pro-

Table. Yields and specific enzyme activity towards mucus glycoprotein and gangliosides during the purification of sialidase from human liver.

| Fraction | Total protein [mg] | Mucus glycoprotein | | | Ganglioside mixture | | |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------------|-----------|---------------------|
| | | Specific activity [μU/mg protein] | Yield [%] | Purification factor | Specific activity [μU/mg protein] | Yield [%] | Purification factor |
| Mitochondrial-lysosomal pellet | 8180 | 6.16 | 100 | 1 | 3.6 | 100 | 1 |
| Washed pellet | 5150 | 8.66 | 88 | 1.4 | 5.7 | 98 | 1.6 |
| Triton X-100 soluble | 530 | 55 | 57 | 8.9 | 30 | 53.5 | 8 |
| ESM-Sepharose eluate | 1.6 | 6 233 | 19.7 | 1010 | 4367 | 23.5 | 1 200 |

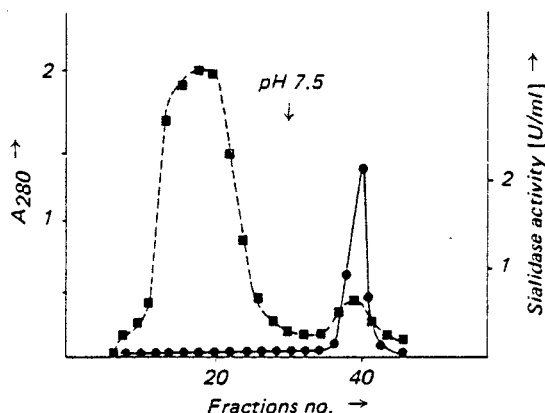


Fig. 1. Elution profile of solubilized human liver sialidase on ESM-Sephrose 4B. Sialidase was applied to a column (10 × 1 cm) of ESM-Sephrose 4B in 20mM Tris/HCl solution, pH 6.0, and eluted at 1 ml/min. The enzyme was eluted by the same buffer at pH 7.5. Fractions of 2 ml were collected. ■ - - - ■, protein content; ● - - - ●, sialidase activity tested with gangliosides.

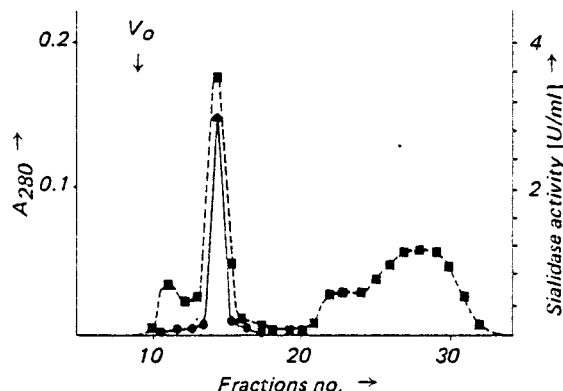


Fig. 2. Sephadex G-200 chromatography. The sialidase-containing fractions from ESM-Sephrose were concentrated by ultrafiltration (Amicon PM-10) to 0.5 ml and applied to a Sephadex G-200 column (1 × 100 cm) which was eluted with 20mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, at a speed of 10 ml/h. 2-ml fractions were collected. ■ - - - ■, protein content; ● - - - ●, sialidase activity towards ganglioside mixture.

tein with ganglioside substrate. The corresponding yield is ~ 14% and the overall purification between 1200- and 1400-fold with the mucus glycoprotein or gangliosides as substrates.

Analysis of the affinity-purified sialidase fraction by polyacrylamide gel electrophoresis reveals a major protein band at high molecular mass and another at approximately 70000 Da, only the latter corresponding with enzyme activity (Fig. 3). This result, together with the molecular mass from Sephadex G-200 suggests that the solubilized enzyme is present mainly as a high molecular mass complex or aggregate, which was partially disaggregated during electrophoresis to yield the 70000 Da band. Recovery of the sialidase activity on electrophoresis was only 10% of the starting material (ESM-Sephrose eluate).

The molecular mass of 70000 Da is in the range of molecular masses found for bacterial sialidases [2,17].

The partially purified enzyme can be stored at 4 °C in 20mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, for 48 h without appreciable loss of activity. However,

two cycles of freezing and thawing, or incubation for 5 min at 45 °C, lead to a 40% decrease of enzyme activity.

The enzyme preparation from affinity chromatography contained no detectable β-D-galactosidase, β-D-glucosidase, β-N-acetyl-D-hexosaminidase or protease activity.

The pH optimum in the region of pH 4 to 4.5 of the sialidase with mucus glycoproteins or gangliosides as substrates is typical for a lysosomal enzyme. The activity of the enzyme with different substrates is striking, in that mucus glycoprotein and gangliosides (including GM₁) are cleaved, but II³Neu5Ac-Lac and fetuin are very poor substrates (Fig. 4). Studies with rat liver^[4] and heart^[24] sialidases have also shown some of these characteristics.

The majority of the sialidase activity with II³Neu5Ac-Lac is not solubilized and remains in the pellet. This is consistent with the existence of two sialidases in human liver, one acting on gangliosides and mucin glycoproteins and the other on N-glycosidic type glycoproteins (e.g.

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of solubilized human liver lysosomal sialidase after chromatography on ESM-Sepharose 4B.

The gel is stained with Amido black. Parallel gels were run for determination of enzyme activity and molecular mass. Details of sialidase assay and extraction of gel slices are given in the text. The R_F values relative to bromophenol blue and the molecular masses of marker proteins are shown on the left hand side: 1, catalase; 2, aldolase; 3, citrate synthetase; 4, bovine serum albumin; 5, ovalbumin. Sialidase activity is indicated on the right hand side.

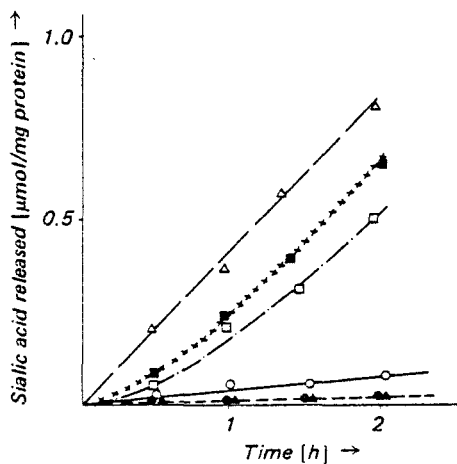
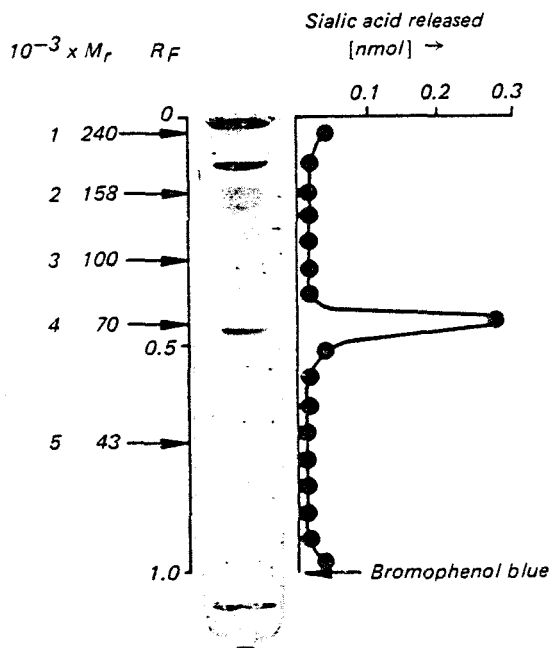


Fig. 4. Progress curves of sialidase obtained after elution from Sephadex G-200 towards different natural substrates.

Symbols: ●—●, sialyllactose; ▲—▲, fetuin; ○—○, G_M1 ganglioside; □—□, bovine brain ganglioside mixture; ■×××■, G_M3 ganglioside; △—△, bovine submandibular gland mucus glycoprotein. Conditions are as described in Materials and Methods.

Incubations contained 1mM final concentration of glycosidically bound sialic acid.

fetuin) and II³Neu5Ac-Lac^[2,25,26]. No evidence for separate activities with ganglioside and mucus glycoprotein substrates could be found on the basis of experiments presented here. Work with various substrates and sialidase inhibitors has provided evidence for the existence of probably three separate sialidase activities in human liver^[(27)] and Michalski et al., unpublished).

A recent report^[(28)] has described the presence of soluble and membrane-bound sialidase activity against sialyllactose in human liver. Both enzyme forms showed similar pH optima at ~pH 4, but no further purification or characterization was detailed.

The method described for the solubilization and partial purification of one form of human liver sialidase by affinity chromatography is simple and rapid. This is a valuable new tool for the study of this important enzyme. Proteolytic digestion, partly responsible for the great instability of the enzyme, can be avoided. The technique is applicable to the isolation of sialidas from different sources (e.g. human leucocytes, bacteria; Schauer, unpublished) and can be applied to the study of sialidas in pathological states such as sialidosis.

This work was supported by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (grant Scha 202/9). J.-C.M. was a recipient of an *EMBO* long-term fellowship. We are indebted to Dr. H. Stein (Department of Pathology, University of Kiel) for providing human liver and to M. Wember and M. El Madani for technical assistance.

Literature

- 1 Rosenberg, A. & Schengrund, C.-L. (1976) in *Biological Roles of Sialic Acid* (Rosenberg, A. & Schengrund, C.-L., eds.) pp. 295-359, Plenum Press, New York.
- 2 Corfield, A.P., Michalski, J.-C. & Schauer, R. (1981) in *Perspectives in Inherited Metabolic Diseases* (Tettamanti, G., Durand, P. & Di Donato, S., eds.) vol. 4, pp. 3-70, Edi Ermes Publ., Milano.
- 3 Drzeniek, R. (1973) *Histochem. J.* 5, 271-290.
- 4 Sandhoff, K. & Jatzkewitz, H. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 141, 442-444.
- 5 Kishore, G.S., Tulsiani, D.R.P., Bhavanandan, V.P. & Carubelli, R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2655-2659.
- 6 Horvat, A. & Touster, O. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 4380-4390.
- 7 Visser, A. & Emmelot, P. (1973) *J. Membr. Biol.* 14, 73-84.
- 8 Tulsiani, D.R.P. & Carubelli, R. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1821-1827.
- 9 Strecker, G. & Michalski, J.-C. (1978) *FEBS Lett.* 85, 20-24.
- 10 Lowden, J.A. & O'Brien, J.S. (1979) *Am. J. Hum. Genet.* 31, 1-18.
- 11 Cantz, M., Gehler, J. & Spranger, J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 732-738.
- 12 Miyatake, T., Yamada, T., Suzuki, M., Pallmann, B., Sandhoff, K., Ariga, T. & Atsumi, T. (1979) *FEBS Lett.* 97, 257-259.
- 13 Ziegler, D., Keilich, G. & Brossmer, R. (1980) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 301, 99-100.
- 14 Corfield, A.P., Parker, T.L. & Schauer, R. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 221-232.
- 15 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 16 Schauer, R., Haverkamp, J. & Ehrlich, K. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 641-648.
- 17 Nees, S., Veh, R.W. & Schauer, R. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 1027-1042.
- 18 Schauer, R. (1978) *Methods Enzymol.* 50C, 64-89.
- 19 Veh, R.W., Michalski, J.-C., Corfield, A.P., Sander-Wewer, M., Gies, D. & Schauer, R. (1981) *J. Chromatogr.* 212, 313-322.
- 20 Huser, H., Mody, E. & Faillard, H. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 749-759.
- 21 Tettamanti, G. & Pigman, W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 41-50.
- 22 Folch, J., Arsove, S. & Meath, J.A. (1951) *J. Biol. Chem.* 191, 819-831.
- 23 Momoi, T., Ando, S. & Nagai, Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441, 488-497.
- 24 Tallman, J.F. & Brady, R.O. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 434-443.
- 25 Sander, M., Veh, R.W. & Schauer, R. (1979) in *Glycoconjugate Research* (Gregory, J.D. & Jeanloz, R.W. eds.) vol. II, pp. 927-931, Academic Press, New York.
- 26 Bach, G., Zeigler, M., Schaap, T. & Kohn, G. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1341-1347.
- 27 Michalski, J.-C., Corfield, A.P. & Schauer, R. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 222-223.
- 28 Meyer, D.M., Lemonnier, M. & Bourrillon, R. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 1302-1309.

Dr J.-C. Michalski (permanent address), Université des Sciences et Technique de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique, B.P. 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq.

Dr A.P. Corfield (new address), University of Bristol, Department of Medicine Laboratories, Bristol Royal Infirmary, CB-Bristol BS2 8HW.

Prof. Dr R. Schauer, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Oishausenstraße 40-60, D-2300 Kiel.

En résumé les études réalisées sur l'activité neuraminidase du foie humain ont permis de faire les constatations suivantes :

- La majorité de l'activité α -neuraminidase est localisée dans la fraction lysosomale ; aucune activité cytosolique n'a été détectée. Ce dernier résultat en contradiction avec les observations préalables de MEYER et al. 1981 (421) peut s'expliquer par l'emploi d'inhibiteurs protéasiques au cours de l'homogénéisation.

- Au sein du lysosome l'activité neuraminidase est essentiellement liée à la membrane.

- Tous les types de liaisons de l'acide sialique sont hydrolysés, la cinétique d'hydrolyse étant $\alpha 2,3 > \alpha 2,6 > \alpha 2,8$.

- L'emploi d'inhibiteurs spécifiques (2,3-1-dehydro-NeuAc ou acide para-nitro-phenyl oxamique) permet de mettre en évidence des inhibitions différentes pour les gangliosides et mucines d'une part, glycoprotéines ou oligosaccharides d'autre part, suggérant l'existence de deux formes isoenzymatiques différentes ou tout au moins de deux sites catalytiques différents.

- L'emploi de détergent (Triton X-100) associé à la sonication a permis la solubilisation d'une forme enzymatique active sur les seuls gangliosides et mucines, l'activité vis-à-vis des glycoprotéines restant associée à la membrane. La "ganglioside sialidase" ainsi solubilisée peut être rapidement purifiée par chromatographie d'affinité sur ESM-sépharose.

- L'activité résiduelle du culot membranaire hydrolyse à la fois les liaisons $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ des sialyloligosaccharides, ou des chaînes glycaniques des glycoprotéines. Les deux activités sont inhibées de façon identique par différents inhibiteurs sialidasiques. Ces dernières propriétés semblent en défaveur de l'existence de formes isoenzymatiques spécifiques d'un type particulier de liaison.

En conclusion, les études menées sur les α -neuraminidases hépatiques humaines ont permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux formes isoenzymatiques différentes, l'une active sur les gangliosides et les mucines, l'autre active sur les glycoprotéines et les sialo-oligosaccharides en dérivant. Ces deux formes étant localisées dans la membrane lysosomale. Bien que des différences d'ordre cinétiques existent dans l'hydrolyse des liaisons sialosyl $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$, il ne nous a pas été permis de caractériser des formes isoenzymatiques spécifiques d'un type particulier de liaison.

VI - CONCLUSION À L'ÉTUDE DES SIALIDOSES

A - NATURE DU DEFICIT EN α -NEURAMINIDASE

Faisant suite aux observations préalablement décrites concernant l'excrétion anormale de sialyl-oligosaccharides associé à un déficit en α -neuraminidase chez les patients atteints de mucopolipidoses de type I et II, ce type d'anomalie fut recherché chez différents malades présentant les caractéristiques cliniques de ce type de maladies.

Un déficit en α -neuraminidase a ainsi été caractérisé dans un certain nombre de syndromes, de symptomatologie avoisinante celle des mucopolipidoses (Pour une revue, voir LOWDEN et O'BRIEN 1979 (422)). Dans la majorité des cas, le déficit a été démontré dans les fibroblastes et les leucocytes des malades à l'aide de substrats naturels (sialyl-lactose, sialylhexasaccharides, fétuine) ou synthétique (MU-NeuAc). En raison du manque d'uniformité dans les procédés expérimentaux, la comparaison des différentes études est rendue difficile. Il est cependant à noter que la majorité des dosages, effectués sur des homogénats cellulaires totaux sans purification enzymatique préalable, mettent en évidence une très faible activité neuraminidasique (0 à 10 % de la normale) aussi bien avec les sialyl-oligosaccharides qu'avec le MU-NeuAc. Toutefois, si les patients atteints de mucopolipidose II et III présentent une activité sialidasique affaiblie vis-à-vis des gangliosides, cette activité reste normale dans les cas de mucopolipidose de type I (CANTZ et MESSER 1979 (423), WENGER et al. 1978 (424)).

Un point de controverse important était néanmoins soulevé par l'hypothèse que nous avons émise concernant le déficit de la seule isoenzyme α 2,6 dans la mucopolipidose de type I, les mucopolipidoses W et De P. Les études réalisées par différents auteurs (CANTZ et MESSER 1979 (425), POTIER et al. 1979 (426), FRISCH et NEUFELD 1979 (427), KURIYAMA et al. 1981b(428)), démontrant un déficit des deux isoenzymes α 2,3 et α 2,6 dans ces maladies étaient notamment en opposition avec nos propres résultats.

Bien qu'il soit difficile d'expliquer ces différences dans les résultats, il est à noter que l'activité résiduelle $\alpha 2,3$ est généralement beaucoup plus élevée que l'activité $\alpha 2,6$. Notamment SWALLOW et al. 1979 (429) rapportent un patient ne présentant que 20 % de réduction de l'activité neuraminidase vis-à-vis de la fétuine, glycoprotéine renfermant majoritairement des liaisons sialyl $\alpha 2,3$.

Ces faits sont à mettre en parallèle avec les études réalisées avec des préparations enzymatiques purifiées, comme celle que nous avons obtenue à partir du foie humain, faisant ressortir une hydrolyse beaucoup plus rapide des liaisons sialosyl $\alpha 2,3$ par rapport aux liaisons $\alpha 2,6$. Ce fait est d'ailleurs confirmé par des études plus récentes réalisées sur l'enzyme leucocytaire (SCHAUER et al. 1984 (430)), fibroblastique (MENDLA et CANTZ 1984 (431)) ou hépatique (MIYAGI et TSUIKI 1984 (432)). Ces études semblent en outre écarter l'hypothèse de l'existence de deux formes isoenzymatiques différentes spécifiques d'un type de liaison déterminée. L'hypothèse de deux sites catalytiques différents reste néanmoins envisageable. Dans ce sens, les études réalisées avec la sialidase hépatique humaine montrent que l'hydrolyse du sialyl-lactose, d'une part et les sialyl-hexosaccharides dérivant des chaînes glycaniques des glycoprotéines d'autre part, peut être différemment inhibée par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques.

Le fait que les parents d'enfants atteints de mucopolysaccharidose de type I, présentent une activité diminuée de moitié à la fois pour des sialyl-oligosaccharides à liaison $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ (O'BRIEN 1981 (433)) semble néanmoins en faveur de la théorie un gène : un enzyme : plusieurs substrats énoncée préalablement pour les β -galactosidases (O'BRIEN 1975 (434)). VERHEIJEN et al. 1983 (435) ont récemment isolés deux formes α -neuraminidases leucocytaires différentes, toutes deux actives sur le MU-NeuAc. Cette observation est à rapprocher des travaux de NGUYEN-HONG et al. 1980 (436) ; SUZUKI et al. 1981a (437) et TSUJI et al. 1982 (438) qui sur la base d'expériences de dénaturation thermique avaient supposé l'existence de formes isoenzymatiques différentes dans le leucocyte. Il est intéressant

de noter que seule une des formes isoenzymatiques (présente majoritairement dans les lymphocytes) est déficiente dans les sialidoses. Cette constatation montre que les mesures d'activités neuraminidasiques effectuées sur les leucocytes doivent être considérées avec modération.

B - NATURE DU DEFICIT ENZYMATIQUE PRIMAIRE DANS LES MUCOLIPIDOSES II ET III

Si le déficit en α -neuraminidase semble être le déficit génétique primaire dans la mucopolidose de type I et dans certains variants tel le "Cherry-red spot myoclonus syndrome", plusieurs observations s'opposaient à un déficit similaire dans les mucopolidoses II et III ; notamment les parents de patients atteints de ces maladies présentent des activités sialidasiques normales (THOMAS et al. 1976 (439)).

De même un traitement des enzymes sécrétés dans le milieu extracellulaire par la neuraminidase ne rétablit pas la reprise des enzymes par la cellule déficiente (VLADUTIU et RATTAZZI 1978 (440)).

HASILIK et NEUFELD 1980 (441) appliquant les méthodes d'études de la biosynthèse des enzymes lysosomaux aux cellules "I-Cell" ont pu montrer que chez les malades, les enzymes étaient synthétisés sous forme de précurseurs de poids moléculaire apparemment normal mais non phosphorylés. Ces formes précurseurs étaient ensuite secrétées dans le milieu extracellulaire. Un déficit de la phosphorylation des hydrolases acides dans les fibroblastes I Cell est également démontrée par BACH et al. 1979 (442). Dès lors, un déficit dans l'assemblage du signal à mannose-6-phosphate responsable de l'"empaquetage" des hydrolases acides dans le lysosome (voir Chapitre Généralités) était suspecté.

REITMAN et al. 1981 (443), HASILIK et al. 1981 (444) démontrent un déficit en uridine 5'-diphosphate-N-acétylglucosamine : glycoprotéine N-acétylglucosaminyl phosphotransférase dans les fibroblastes I-Cell (Fig. 21).

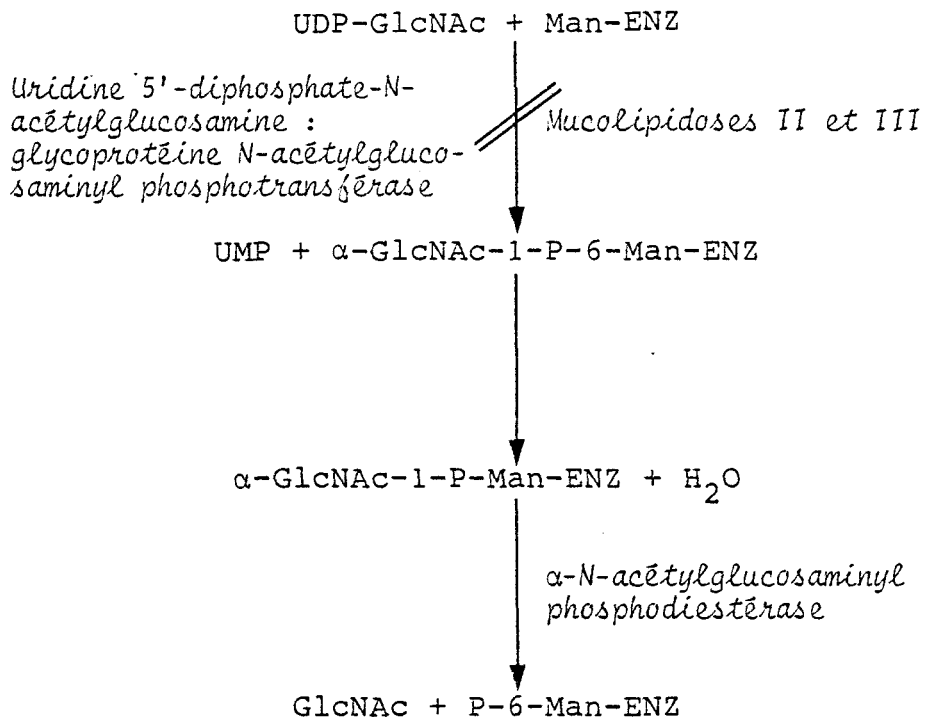


FIGURE 21

Nature du déficit enzymatique primaire dans les mucopolidoses II et III.

La déficience enzymatique a par la suite été démontrée dans d'autres tissus (WAHEED et al. 1982 (445)). Cette observation tout comme la constatation du caractère hétérozygote des parents pour l'enzyme (VARKI et al. 1982 (446)) atteste qu'il s'agit bien du déficit primaire responsable des troubles observés dans la maladie.

Le déficit en phosphotransférase explique notamment l'absence de phosphorylation des hydrolases acides synthétisées par les fibroblastes I-Cell. Le signal Man-6P n'étant pas assemblé, les enzymes sont déroutées de la voie d'intégration dans le lysosome et suivent celle des glycoprotéines de sécrétion. La Figure 22 schématise les altérations moléculaires consécutives à la déficience en phosphorylation.

Un déficit en N-acétylglucosamine 1-phosphotransférase a également été caractérisé dans la mucopolidose de type III (WAHEED et al. 1982(b) (447)). La déficience du même enzyme dans ces deux maladies explique la complémentation des fibroblastes de mucopolidoses II et III dans les expériences d'hybridation (HASILIK et NEUFELD 1980 (448)). Les mucopolidoses de type II et III semblent être causées par deux mutations différentes du même gène structural, donnant naissance à deux phénotypes d'expression clinique différente, d'une façon similaire à ce qui est observé dans les syndromes de HURLER et SCHEIE (BACH et al. 1972 (449)). Les expériences d'hybridation (SHOWS et al. 1982 (450) ; HONEY et al. 1982 (451) ou de surcharge en saccharose (KATO et al. 1982 (452) ; OKADA et al. 1983 (453)) ont permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité génétique aussi bien dans la mucopolidose de type II que de la mucopolidose de type III, où 3 groupes de complémentation ont été caractérisés. L'un des variants de mucopolidose de type III, présente notamment une N-acétylglucosaminyltransférase catalytiquement active mais incapable de phosphoryler les enzymes lysosomaux (VARKI et al. 1981 (454)).

Cette grande hétérogénéité peut s'expliquer par une structure multimérique complexe de la phosphotransférase (MUELLER et al. 1983 (455)). La mutation d'unités monomériques différentes étant impliqués dans la mucopolidose de type II ou III. Il faut néanmoins

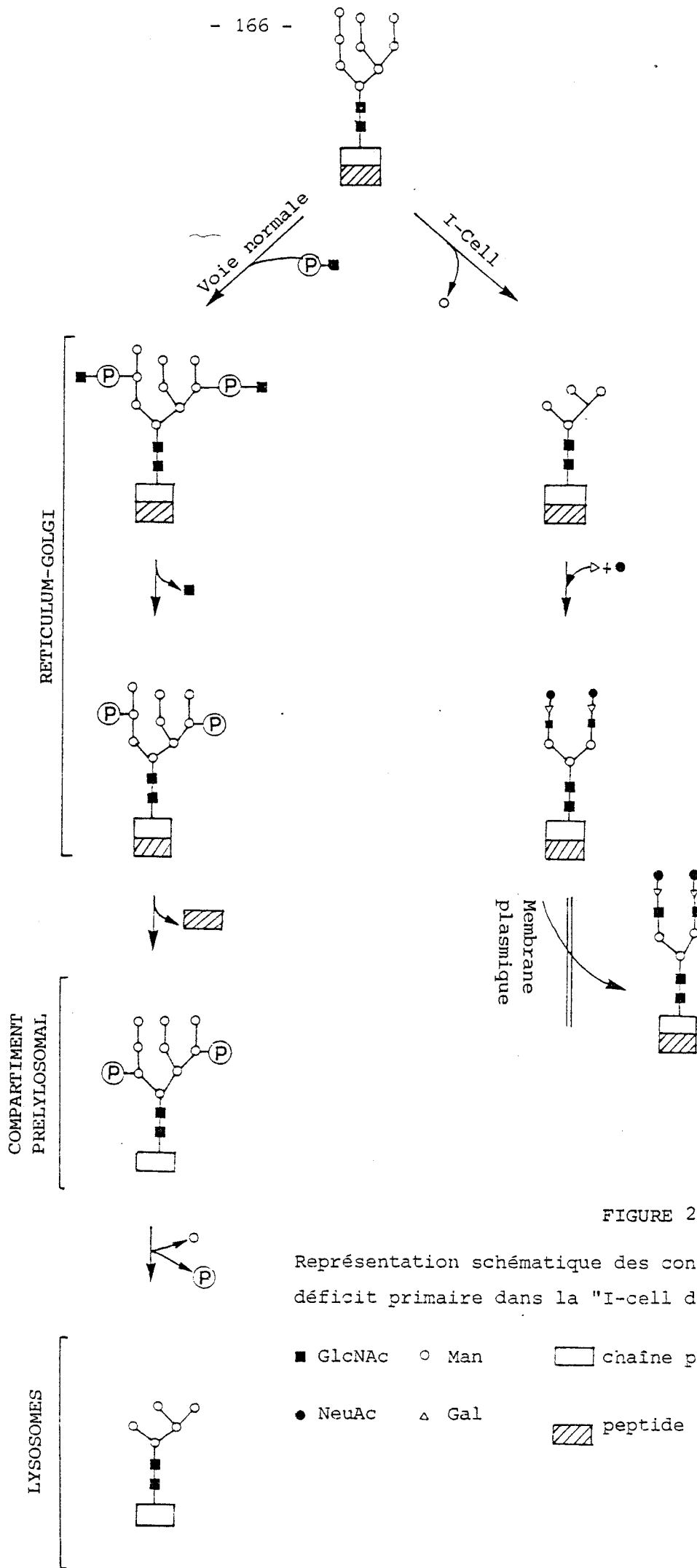


FIGURE 22

Représentation schématique des conséquences du déficit primaire dans la "I-cell disease"

- GlcNAc ○ Man □ chaîne polypeptidique
- NeuAc △ Gal ▨ peptide signal



garder en mémoire qu'une déficience en phosphodiesterase, second enzyme impliqué dans l'assemblage du signal Man-6P conduirait à une étiologie identique à celle observée dans les mucopolidoses.

C - DEFICIT COMBINÉ EN β -GALACTOSIDASE ET α -NEURAMINIDASE

Sur la base de l'activité résiduelle en α -neuraminidase LOWDEN et O'BRIEN 1979 (456) avaient proposé de subdiviser le groupe des sialidoses en sialidose de type I, regroupant essentiellement les malades présentant le "cherry-red spot myoclonus syndrome" et en sialidoses de type II, englobant la mucopolidose de type I et ses variants.

Cette classification tout comme celle que nous avons préalablement proposée, s'avérait néanmoins prématurée. En effet, HOOGEVEEN et al. 1980 (457) et MUELLER et SHOWS 1982 (458), sur la base d'expériences de complémentation entre lignées fibroblastiques de mucopolidose de type I et de ses variants cliniques, mirent en évidence deux classes génétiquement différentes au sein de la sialidose de type II ; notamment les malades présentant un déficit combiné en β -galactosidase et α -neuraminidase s'avéraient génétiquement différents de la mucopolidose de type I classique. Le fait que l'activité neuraminidasique dans les fibroblastes des malades pouvait être restauré en présence d'inhibiteurs protéasiques (SUZUKI et al. 1981b (459)) était en défaveur d'un déficit primaire en α -neuraminidase. HOOGEVEEN et al. 1981 (460) ; D'AZZO et al. 1982 (461) proposent que le déficit primaire chez les malades atteints de "galactosialidose" résulterait de l'absence d'une glycoprotéine nécessaire à la protection de la sialidase vis-à-vis de l'action protéasique lysosomiale. Cette protéine d'un poids moléculaire de 32.000 favoriserait l'aggrégation de la β -galactosidase et la sialidase en un complexe multimérique du type : multimères de β -galactosidase-sialidase-protéine d'aggrégation (HOOGEVEEN et al. 1983 (462)).

Les faits préalablement mentionnés montrent l'extrême diversité génétique des maladies où une déficience en α -neuraminidase a été enregistrée. Le déficit primaire en α -neuraminidase pouvant à ce jour se limiter aux seules "cherry-red spot myoclonus syndrome", mucopolidose de type I et néphrosialidose.

Le tableau XIV se propose de classifier les différents syndromes où un déficit en sialidase (primaire ou non) a été enregistré. Nous avons ajouté à cette classification la mucopolidose de type IV dans laquelle un déficit spécifique en "ganglioside sialidase" a été démontré (BENYOSEPH et al. 1982 (463) ; CAIMI et al. 1982 (464)).

Il est bien évident que cette classification comme celles préalablement proposées, ne peut être que provisoire et ne tient pas compte de l'hétérogénéité démontrée au sein des mucopolidoses II et III.

TABLEAU XIV

| | TYPE | FORME | DEFICIENCE |
|---------------|---|-----------------------------|--|
| SIALIDOSES | "Cherry-red spot myoclonus syndrome" | juvénile, adulte | glycoprotéine-sialidase |
| | mucolipidose de type I | infantile, juvénile | glycoprotéine-sialidase |
| | néphrosialidose | infantile, juvénile | glycoprotéine-sialidase |
| | "galactosialidose" | infantile, juvénile, adulte | protéine d'aggrégation β -galactosidase, α -neura- minidase |
| | mucolipidose de type IV (sialolipidose) | juvénile, adulte | ganglioside-sialidase |
| MUCOLIPIDOSES | de type II "I-cell disease" | infantile | UDP-GlcNAc phosphotransférase |
| | de type III "Pseudo-Hurler polydystrophy" | juvénile | UDP-GlcNAc phosphotransférase |
| | de type III Variant | juvénile | UDP-GlcNAc phosphotransférase |

ETUDE COMPAREE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT DEUX MALADIES A DEFICIT EN β -GALACTOSIDASE : LA GM₁ GANGLIOSIDOSE ET LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B

I - LA GM₁ GANGLIOSIDOSE

A - INTRODUCTION

Pendant longtemps le terme "d'idiotie amaurotique" fut utilisé pour décrire une multitude d'entités nosologiques présentant en commun un dysfonctionnement neuronal (ARONSON et al. 1960 (465)). Durant la dernière décennie, les études biochimiques réalisées sur ce groupe de maladies, ont révélé une variété de mécanismes moléculaires différents, aboutissant tous à la même symptomatologie (VAN HOOF 1973 (466)). En particulier des anomalies du catabolisme des gangliosides étaient démontrées comme responsables d'un premier sous-groupe d'idioties amaurotiques dénommées pour cette raison "gangliosidoses" ; deux types principaux de gangliosidoses peuvent être distingués suivant la nature du matériel accumulé, les GM₁ et GM₂ gangliosidoses respectivement. Les GM₂ gangliosidoses (maladie de TAY SACHS, maladie de Sandhoff, variant AB. Voir classification page 52) ne seront pas développés dans ce propos, l'oligosaccharidurie accompagnant la maladie de Sandhoff ayant été préalablement décrite par STRECKER et MONTREUIL 1972 (467) ; STRECKER et al. 1977 (468).

B - SYMPTOMATOLOGIE DES GM₁ GANGLIOSIDOSES

Deux types principaux de GM₁ gangliosidoses ont été décrits, différant par l'âge d'apparition de la maladie et par la présence ou non de viscéromégalie ou d'anomalies squelettiques. On distinguera ainsi la forme infantile de la maladie ou "maladie de Normann Landing" (GM₁ gangliosidose de type I), et la forme juvénile ou "Maladie de DERRY" (GM₁ gangliosidose de type II). L'absence de GM₁ ganglioside dans le foie et les organes des patients atteints de la forme juvénile de la maladie permet de distinguer biochimiquement les deux formes. Deux autres formes de la maladie, le type III (PINSKI et al. 1974(469)), ainsi que la forme adulte (type IV) ont également été décrites (GALJAARD et al. 1975 (470)).

1°) GM₁ GANGLIOSIDOSE INFANTILE (TYPE I)

Les patients manifestent généralement les symptômes durant la période néonatale (O'BRIEN 1978 (471)), présentant un faciès grossier, une viscéromégalie, des dysmorphies osseuses et un retard mental et moteur progressif. La respiration est difficile et irrégulière, et la broncho-pneumonie est fréquente, et est généralement responsable de la mort survenant vers l'âge de 2 ans. Des convulsions cloniques sont souvent observées, et si la survie excède la première année, l'image clinique est celle d'une décérébration totale avec rigidité musculaire, perte de la vue, surdité.

Une tache rouge cerise est observée lors de l'examen fond d'oeil des patients.

2°) GM₁ GANGLIOSIDOSE JUVENILE (TYPE II)

Le phénotype diffère de la forme précédente. L'apparition de la maladie est plus tardive, l'évolution est plus lente et l'atteinte squelettique beaucoup moins importante.

Le développement moteur et mental est souvent normal durant la première année. L'ataxie locomotrice apparaissant généralement au bout de la première année, constitue généralement le premier symptôme. L'incoordination des gestes, la perte du langage et l'hypotonie musculaire généralisée, sont généralement les symptômes les plus précoces. La détérioration mentale et motrice progresse rapidement par la suite. Des crises apparaissent après l'âge de 16 mois, ainsi que des infections répétitives telles les bronchopneumonies. Les organes conservent une taille normale ; la tache rouge cerise en fond d'oeil est absente. L'espérance de vie varie entre 3 et 10 ans.

C - HISTOPATHOLOGIE

Les principales modifications touchent le système nerveux central. Les neurones présentent de multiples vacuoles cytoplasmiques, renfermant un matériel granulaire ou flocculant. Des structures lamellaires

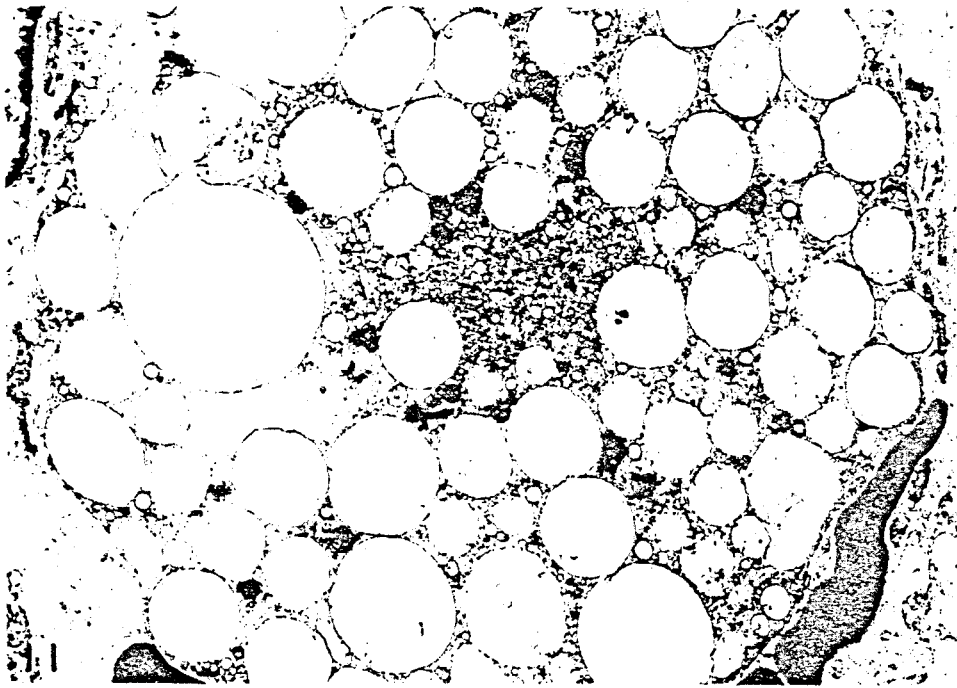


FIGURE 23

Aspect en microscopie électronique des cellules de Kupfer lors de la GM₁ gangliosidose type I (d'après TAKAHASHI et al. 1978 (472)).

- a - On note la présence de nombreuses inclusions vacuolaires (x 6500)
- b - A plus fort grossissement les vacuoles apparaissent délimitées par une membrane unique et contiennent un matériel flocculent finement réticulogranulé (x 24 000).

similaires aux "corps zébrés" observés dans certaines mucopolysaccharidoses peuvent également être observées (GONATAS et GONATAS 1965 (473)). Le même type d'inclusions est observé au niveau hépatique (hépatocytes et cellules de Kupfer) (Figure 23).

D - ETUDE BIOCHIMIQUE

1°) NATURE DU MATERIEL ACCUMULE

L'existence d'une maladie de surcharge en gangliosides différente de la maladie de Tay-Sachs (Gangliosidose GM₂) fut suggérée pour la première fois par Jatzkewitz et Sandhoff 1963 (474), lorsqu'ils rapportèrent la présence d'une quantité exceptionnellement importante du monosialoganglioside GM₁ dans le cerveau d'un patient atteint d'une forme d'idiotie amaurotique.

Le taux de GM₁ ganglioside atteint environ 10 fois le taux normal dans la matière grise du cerveau aussi bien dans la forme infantile que la forme juvénile de la maladie (O'BRIEN et al. 1972 (475)). Ce taux atteint 20 à 50 fois la normale dans le foie des patients dans la GM₁ gangliosidose type I. L'asialo-GM₁ ganglioside (GM₁) s'accumule également dans le cerveau des patients (LEDEEN et al. 1965 (476)).

Outre les glycolipides, SUZUKI 1968 (477) décrit une élévation de polysaccharides contenant du galactose et de l'hexosamine dans le foie des patients ; la structure de ces polysaccharides peut être directement reliée à celle du kératane sulfate d'origine squelettique. La structure d'un O-glycosylpeptide isolé du foie d'un patient fut par la suite établie par TSAY et al. 1975 (478) (Figure 24a).

WOLFE et al. 1970 (479) démontrent d'autre part l'excrétion de kératane sulfate partiellement désulfaté dans l'urine de patients atteints de la forme juvénile de la maladie. Ces mêmes auteurs (WOLFE et al. 1974 (480)) montrent d'autre part que le foie de patients renferme un oligosaccharide majeur dont la structure fut établie par différents procédés chimiques ainsi que par RMN (Figure 24b). Le même oligosaccharide fut par la suite isolé de l'urine de patients atteints de la forme infantile ou juvénile de la maladie (NG YING KIN et WOLFE 1975 (481) ; WOLFE et NG YING KIN 1976 (482) ; LUNDBLAD et al. 1978 (483)).

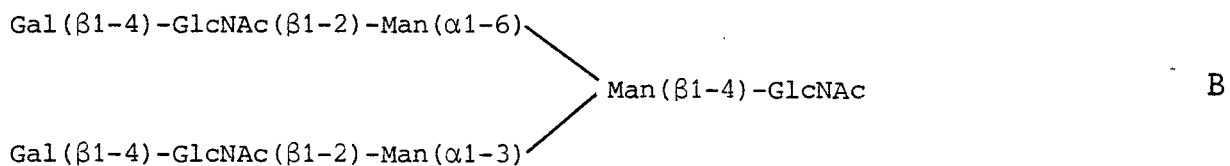
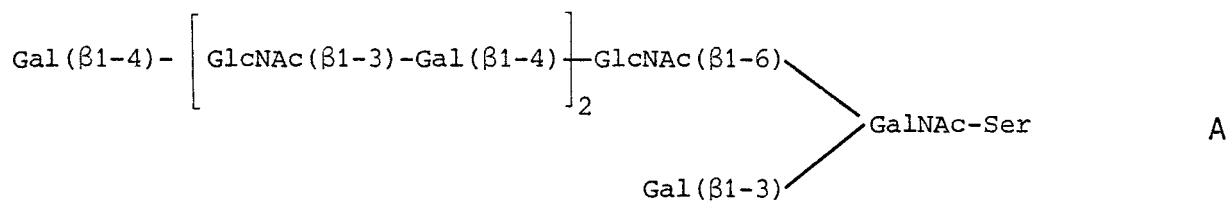


FIGURE 24

A - Structure d'un glycopeptide isolé du foie de patient atteint de GM₁ gangliosidose (TSAY et al. 1975 (478))

B - Structure de l'oligosaccharide majeur isolé du foie d'un patient atteint de GM₁ gangliosidose type II (WOLFE et al. 1974 (480)).

2°) NATURE DU DEFICIT ENZYMATIQUE

Dès 1965, O'BRIEN et al. (484) avait postulé que l'accumulation de GM₁ ganglioside était le résultat direct d'un déficit atteignant le système enzymatique de dégradation des gangliosides. En 1968, OKADA et O'BRIEN (485) mettent en évidence un déficit profond en β-galactosidase dans différents tissus des malades en utilisant le GM₁ ganglioside comme substrat. Dans les tissus normaux, la β-galactosidase existe sous différentes formes, 3 formes acides actives à pH 4-5 et thermolabiles, et des formes neutres actives à pH 4-5 (Pour une revue, voir HO et al. 1977 (486)). La forme acide majeure, ou GM₁ β-galactosidase A₁ est une protéine monomérique d'un poids moléculaire de 65 000. Deux autres formes isoenzymatiques sont également présentes : la β-galactosidase A₂, dimère de A₁, qui est la forme normalement active *in vivo* (FROST et al. 1978 (487)) et une forme multimérique A₃. Ces différentes formes enzymatiques sont capables d'hydrolyser différents substrats hydrophiles tels oligosaccharides, asialofétuine, lactose.

L'action vis-à-vis des substrats hydrophobes ne se manifeste qu'en présence de sels biliaires *in vitro*, et en présence d'une protéine activatrice *in vivo* (LI et al. 1974 (488)).

Seules les formes acides semblent altérées lors de la GM₁ gangliosidose bien que normalement synthétisées. Des modifications du pH optimum, de la migration électrophorétique, de l'activité enzymatique résiduelle lors de la GM₁ gangliosidose ont été démontrées (RITTMAN et O'BRIEN 1981 (489)). Il est cependant difficile de corrélérer ces modifications avec la variété de phénotypes observés dans la maladie, caractérisés par différents degrés dans l'accumulation de substrats naturels de l'enzyme (glycolipides, oligosaccharides, glycopeptides). Des mutations alléliques du gène structural de la GM₁ β-galactosidase peuvent être responsable de la production de protéines enzymatiques avec différents degrés d'activité vis-à-vis des différents substrats. Des expériences d'hybridation cellulaire, réalisées sur différents variants de la maladie (WIT-VERBEEK et al. 1978 (490)) montrent en outre que les variants adultes (type III et IV) sont dûs à des mutations d'un gène autre que le gène structural de la β-galactosidase codant pour une protéine nécessaire aux modifications post-translotionnelles de l'enzyme.

II - LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B

Comme nous l'avons préalablement signalé, à côté des GM₁ gangliosidoses de type I et II, de très nombreuses autres formes cliniques de déficit en β -galactosidase ont été décrites, différant par l'âge d'apparition des symptômes, l'atteinte viscérale, ou la présence ou non d'un retard mental (HOEKSEMA et al. 1980 (491)). Parmi ces différents phénotypes, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à une forme atténuée de la maladie de Morquio, appelée pour cette raison maladie de Morquio type B (ou mucopolysaccharidose IV B - voir classification page 42), caractérisée par un déficit marqué en β -galactosidase.

A - SYMPTOMATOLOGIE

Le syndrome de Morquio est une maladie génétique atteignant le catabolisme des mucopolysaccharides. Les patients présentent une intelligence normale, sont atteints de nanisme, avec un faciès gargoyle et de nombreuses anomalies squelettiques (dysplasie spondylo-épiphyssaire, protrusion sternale) (MAROTEAUX et LAMY 1965 (492)). On note une excrétion urinaire variable de kérotane sulfate. Cette forme clinique de la maladie de Morquio est due au déficit de l'activité d'une sulfatase spécifique, capable de libérer les groupements sulfates des résidus N-acétylgalactosamine-6-sulfate et galactose-6-sulfate, présents respectivement dans le chondroïtine-6-sulfate et le kérotane sulfate (MATALON et al. 1974 (493)). Récemment O'BRIEN et al. 1976 (494) ; ARBISSER et al. 1977 (495) ; GROEBE et al. 1980 (496) ont décrit des patients présentant en commun une dysplasie spondylo-épiphyssaire ménagée, des opacités cornéennes, mais l'absence d'atteinte du système nerveux central.

B - ETUDE BIOCHIMIQUE

Une excrétion urinaire anormale de kérotane sulfate est observée chez les malades, cependant contrairement à la maladie de Morquio classique, aucune modification de l'activité de la

N-acétylgalactosamine-6-sulfate n'est observée. Par contre la β -galactosidase ne présente que 5 à 7 % de l'activité normale, dans différents types cellulaires tels les fibroblastes ou les leucocytes. Cette déficience est retrouvée quelque soit le substrat utilisé (aryl β -D-galactosides, GM₁ ganglioside, kératane sulfate ou asialofétuine).

L'enzyme mutant présente des modifications de Km vis-à-vis du p-nitrophényl- β -D-galactoside, ainsi qu'une tendance accrue à l'aggrégation à pH 7.0 (PASCHKE et al. 1979 (497)).

D'autre part, PASCHKE et al. 1982 (498) démontrent que la β -galactosidase est normalement synthétisée dans la maladie, et qu'elle est ensuite normalement modifiée vers la forme mature. L'erreur génétique responsable de la maladie semble donc n'atteindre que les propriétés catalytiques de l'enzyme.

Les études enzymatiques et génétiques réalisées sur les différents phénotypes de déficit en β -galactosidase, ont fait ressortir l'évidence qu'au moins trois types de mutations pouvaient être responsables des différents variants cliniques observés (HOOGEVEEN et al. 1984 (499)). Il est en particulier envisageable que certaines de ces mutations puissent entraîner des déficiences en isoenzymes différents, eux-mêmes responsables de l'hydrolyse de liaisons osidiques différentes. Si cette assertion se vérifiait, elle conduirait sans nul doute à des modifications dans la nature chimique du matériel accumulé.

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude comparative du matériel oligosaccharidique urinaire excrété lors de deux variants génétiques de déficit primaire en β -galactosidase : la GM₁ gangliosidose de type I et la maladie de Morquio type B.

III - ISOLEMENT ET DÉTERMINATION STRUCTURALE DE 6 OLIGOSACCHARIDES URINAIRES CARACTÉRISTIQUES DE LA MALADIE DE MORQUIO TYPE B

L'essentiel de ces travaux est rapporté dans l'ARTICLE n° 8.

Carbohydrate Research, 100 (1982) 351-363

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands

THE STRUCTURES OF SIX URINARY OLIGOSACCHARIDES THAT ARE CHARACTERISTIC FOR A PATIENT WITH MORQUIO SYNDROME TYPE B

JEAN-CLAUDE MICHALSKI, GÉRARD STRECKER,

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. No. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France)

HERMAN VAN HALBEEK, LAMBERTUS DORLAND, AND JOHANNES F. G. Vliegenthart

Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht (The Netherlands)

(Received August 6th, 1981; accepted for publication, September 4th, 1981)

ABSTRACT

Morquio syndrome type B is an inherited, lysosomal storage disease characterised by a marked deficiency in acid β -D-galactosidase, while the 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactose 6-sulphate sulphatase activity is normal. Urinary oligosaccharides were studied in order to evaluate the effect of the diminished β -D-galactosidase activity on the catabolism of glycoconjugates and to compare their structures with those excreted by patients with GM₁-gangliosidosis. The following oligosaccharides were isolated: β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (1), β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (2a), β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (2b), β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (3), β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-{ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 6)]- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)}- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (4), β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)]-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcpNAc (5). Significant differences between Morquio syndrome type B and GM₁-gangliosidosis have been observed, with regard to the excretion rate and the specific structures of urinary oligosaccharides. Compounds 2a, 2b, and 5 are novel members of the series of oligosaccharides isolated from the urine of patients with inherited, lysosomal storage diseases.

INTRODUCTION

Morquio syndrome type B is an inborn error of metabolism, characterised by a marked diminution of acid β -D-galactosidase activity¹⁻³. Patients suffering from this syndrome show growth retardation, dysostosis multiplex, cloudy corneas,

J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. VLIEGENTHART

odontoïd anomalies, and excessive excretion of keratan sulphate. Growth retardation and skeletal dysplasia are less severe than for Morquio syndrome type A, which is caused by the deficiency of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactose 6-sulphate sulphatase⁴⁻⁶. The absence of any psychomotoric abnormalities and the presence of normal intelligence allow an easy differentiation from GM₁-gangliosidosis, which is caused by a virtually complete deficiency of β -D-galactosidase⁷.

The lysosomal deficiency of β -D-galactosidase leads to the accumulation of oligosaccharides in the urine of patients with Morquio syndrome type B or GM₁-gangliosidosis. Such oligosaccharides have a D-galactosyl group at the non-reducing end. We now report on six oligosaccharides isolated from the urine of a patient with Morquio syndrome type B. The oligosaccharides were characterised in order to evaluate the effect of the diminished β -D-galactosidase activity on the catabolism of glycoconjugates, and to compare their structures with those known to be excreted by patients suffering from GM₁-gangliosidosis.

EXPERIMENTAL

Materials. — The urine sample was kindly provided by Dr. E. Paschke, and collected from patient R.E. of ref. 3.

Fractionation of urinary oligosaccharides. — Urine (5 L) was demineralised on a column (5 × 40 cm) of charcoal-Celite. After washing with water (5 L), the carbohydrate material was eluted with 50% ethanol (5 L). The ethanolic solution was evaporated to dryness under reduced pressure, and the residue dissolved in water (200 mL). Glycopeptides and sialyl-oligosaccharides were removed by using columns (2 × 20 cm) of Dowex 50-X2 (200-400 mesh; H⁺) and Dowex 1-X2 (200-400 mesh; HCO₂⁻) resins. The neutral effluent was then fractionated on a column (2 × 20 cm) of charcoal-Celite by elution with a discontinuous gradient of ethanol in water (1.5→18%). The oligosaccharides present in the various fractions were isolated by preparative paper chromatography, and analysed.

Analytical procedures. — Descending paper chromatography was performed on Whatman No. 3 paper with pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (5:5:1:3) and detection by the aniline oxalate reagent⁸.

The molar ratios of hexoses and *N*-acetylhexosamines were determined by g.l.c. of the trifluoroacetyl derivatives, obtained⁹ after methanolysis of oligosaccharides (methanol-0.5M HCl, 24 h, 80°).

Methylation analysis. — Oligosaccharides were reduced with NaBD₄, methylated¹⁰, and methanolysed (methanol-0.5M HCl). The partially methylated methyl glycosides were acetylated¹¹ (pyridine-acetic anhydride, 1:1; 0.2 mL), and the products were analysed by g.l.c.-m.s. (Riber, model 10-10, Rueil-Malmaison, France), using a capillary column (0.35 mm × 60 m) coated with OV-101 or Carbowax 20-M (temperature programme, 100→220°, at 4°/min).

¹H-N.m.r. spectroscopy (500 MHz). — A Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier-transform mode, was used. Resolution enhancement of the

URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation from quadrature phase detection, according to Ernst¹². Before analysis, the oligosaccharides were treated five times with D₂O with intermediate lyophilisation, finally using 99.96% D₂O (Aldrich). The probe temperature was 27°. The chemical shifts (δ) are expressed in p.p.m. downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate (DSS), but were actually measured by reference to internal acetone (δ 2.225) with an accuracy of 0.001 p.p.m.

RESULTS

Isolation and purification of oligosaccharides. — In Fig. 1, the stained paper chromatogram of oligosaccharides eluted from the charcoal–Celite column by a discontinuous gradient of aqueous ethanol is depicted. Of the numerous oligosaccharides, 1–5 are characteristic for Morquio syndrome type B, whereas the other compounds are generally present in the urine of individuals with secretor phenotype¹³. Oligosaccharides 1–5 were isolated and purified by preparative paper chromatography.

Structure determination of 1–5. — The main characteristics of 1–5 are given in Table I. The sugar compositions suggest that they are products of the catabolism

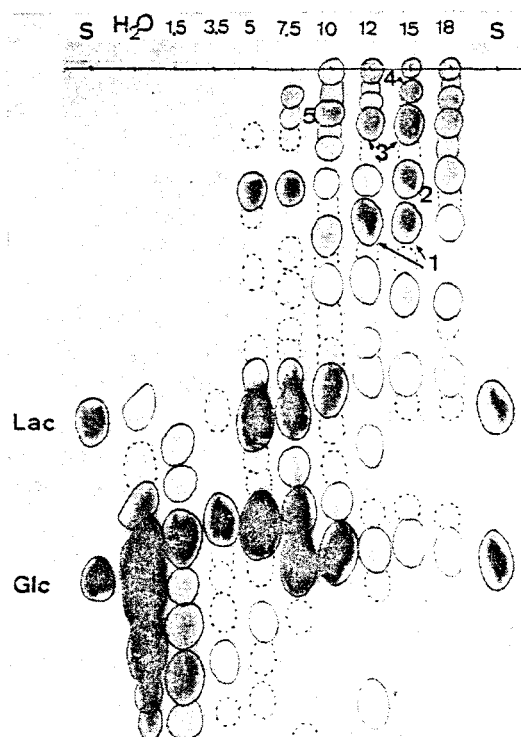
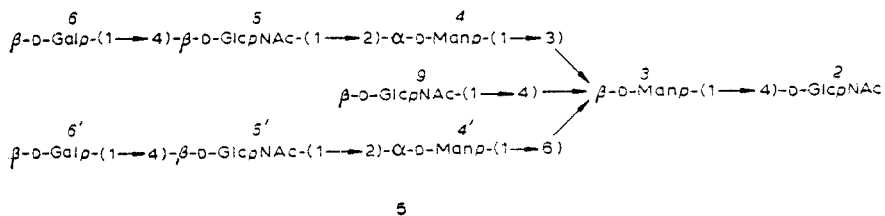
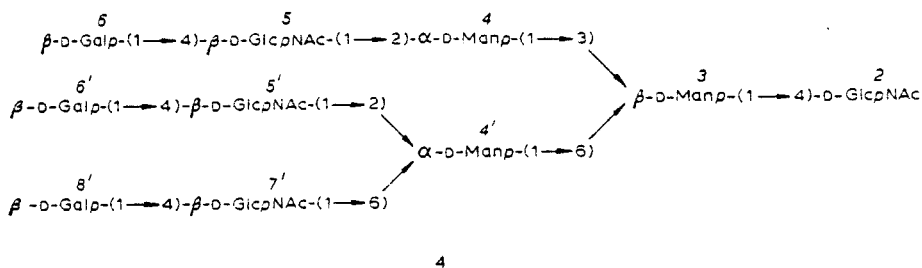
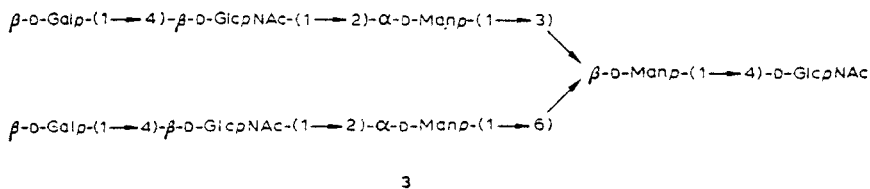
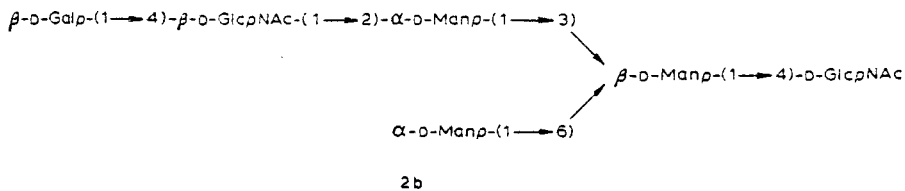
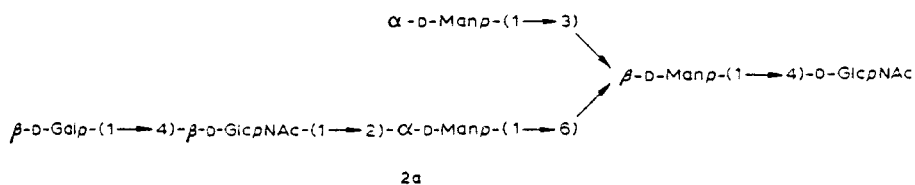
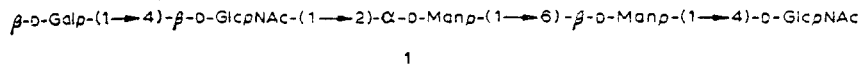


Fig. 1. Paper chromatogram of urinary oligosaccharides from a patient with Morquio syndrome type B, eluted from a charcoal–Celite column with a discontinuous gradient of aqueous ethanol (1.5 → 18%). Standards: Lac, lactose; Glc, D-glucose.

J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. VLIAGENTHART



URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

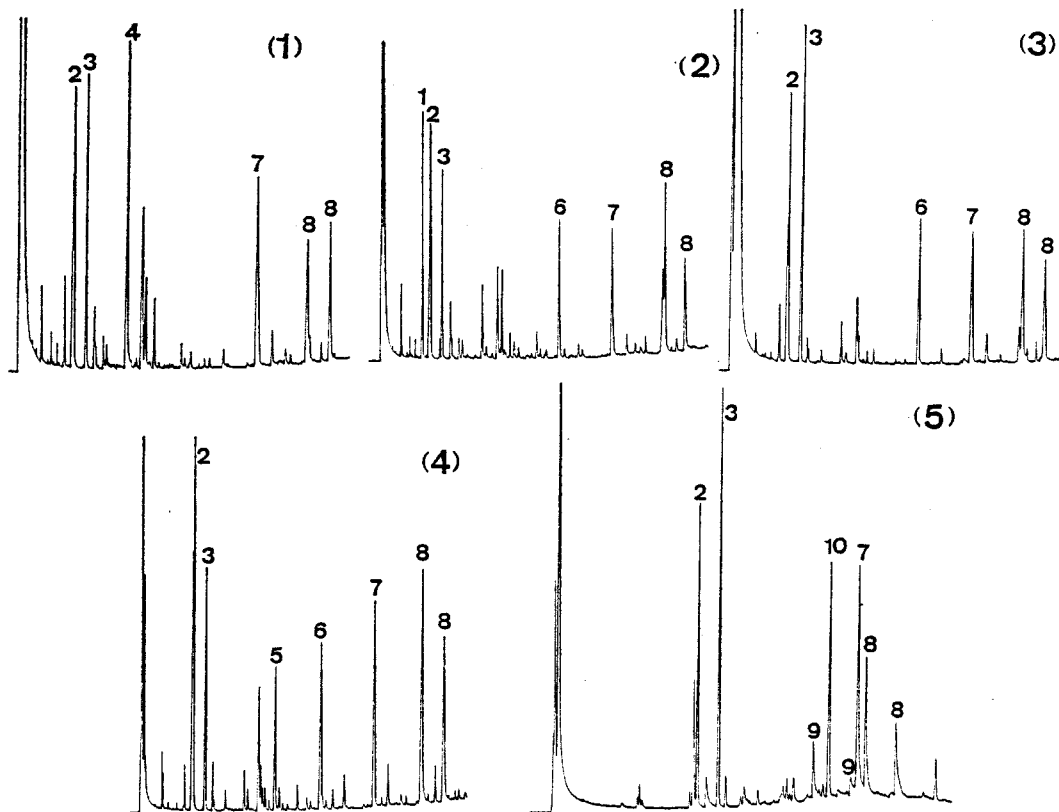


Fig. 2. G.l.c. analysis of partially methylated monosaccharide derivatives present in the methanolysates of the permethylated, reduced oligosaccharides 1-5: 1, 2,3,4,6-tetra-*O*-Me-Man; 2, 2,3,4,6-tetra-*O*-Me-Gal; 3, 3,4,6-tri-*O*-Me-Man; 4, 2,3,4-tri-*O*-Me-Man; 5, 3,4-di-*O*-Me-Man; 6, 2,4-di-*O*-Me-Man; 7, 1,3,5,6-tetra-*O*-Me-GlcN(Me)Ac-itol; 8, 3,6-di-*O*-Me-Glc(Me)Ac; 9, 3,4,6-tri-*O*-Me-GlcN(Me)Ac; 10, 2-*O*-Me-Man. For oligosaccharides 1-4: capillary column (0.35 mm \times 60 m) coated with Carbowax 20-M; for 5: capillary column (0.35 mm \times 60 m) coated with OV-101. Temperature 100 \rightarrow 220 $^{\circ}$, at 4 $^{\circ}$ /min.

TABLE I

ABUNDANCE AND MOLAR COMPOSITION OF THE OLIGOSACCHARIDES ISOLATED FROM THE URINE OF A PATIENT WITH MORQUIO SYNDROME TYPE B

| Oligosaccharide | Amount (mg/L) | Molar ratios ^a | | |
|-----------------|------------------|---------------------------|------|-----|
| | | GlcNAc | Gal | Man |
| 1 | 10 | 1.92 | 0.95 | 2.0 |
| 2 | 8 | 2.11 | 0.94 | 3.0 |
| 3 | 30 | 3.05 | 1.94 | 3.0 |
| 4 | 12 | 4.07 | 3.04 | 3.0 |
| 5 | 2.5 | 3.77 | 2.01 | 3.0 |

^aBased upon 2 or 3 mol of mannose/mol of oligosaccharide.

J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. VLIAGENTHART

TABLE II

MOLAR RATIOS OF PARTIALLY METHYLATED MONOSACCHARIDES PRESENT IN THE METHANOLYSATES OF THE PERMETHYLATED, REDUCED OLIGOSACCHARIDES FROM THE URINE OF A PATIENT WITH MORQUIO SYNDROME TYPE B

| Partially methylated monosaccharide | | Oligosaccharide | | | | |
|---|------------------|-----------------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Man | (1) ^a | — | 0.92 | — | — | — |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Gal | (2) | 1.15 | 1.12 | 1.95 | 2.85 | 1.98 |
| 3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Man | (3) | 0.87 | 0.88 | 1.90 | 0.84 | 1.97 |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-Man | (4) | 1.07 | — | — | — | — |
| 3,4-Di- <i>O</i> -Me-Man | (5) | — | — | — | 0.82 | — |
| 2,4-Di- <i>O</i> -Me-Man | (6) | — | 1.02 | 1.02 | 0.90 | — |
| 1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -Me-GlcN(Me)Ac-itol | (7) ^b | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 3,6-Di- <i>O</i> -Me-GlcN(Me)Ac | (8) | 1.16 | 1.34 | 1.65 | 2.60 | 1.62 |
| 3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-GlcN(Me)Ac | (9) | — | — | — | — | 0.71 |
| 2- <i>O</i> -Me-Man | (10) | — | — | — | — | 1.05 |

^aThe numbers in brackets refer to the designation of the partially methylated monosaccharides in Fig. 2. ^bThe molar ratios were determined on the basis of one residue of 1,3,5,6-tetra-*O*-Me-GlcN(Me)Ac-itol.

of *N*-glycosylproteins. The results of qualitative g.l.c. analysis of the partially methylated methyl glycosides, obtained by methylation analysis of 1–5, are shown in Fig. 2, and the molar ratios are summarised in Table II. The relevant ¹H-n.m.r. data, namely the chemical shifts of the structural reporter-groups¹⁴ of the constituent monosaccharides, for 1–5 are compiled in Table III.

Oligosaccharide 1. — The methylation studies (Table II) in combination with the molar carbohydrate composition (Table I) demonstrate that 1 contains a terminal Gal residue, whereas all of the other constituent monosaccharides are mono-substituted. Therefore, 1 is a linear pentasaccharide. The 500-MHz, ¹H-n.m.r. spectrum of 1 reveals the complete sequence of the monosaccharides and the configurations of their glycosidic linkages.

The spectrum shows the characteristic features of an *N*-acetyl-lactosaminic-type oligosaccharide, derived from a carbohydrate unit *N*-glycosylly linked to asparagine of a glycoprotein. As usual for reducing oligosaccharides of this type, terminating in a 4-substituted GlcNAc residue, denoted GlcNAc-2 (for the numbering system of sugars residues, see ref. 15), the n.m.r. spectrum of 1 is a superposition of the subspectra of the two anomers containing the α and β forms of Glc_pNAc-2^{14,16}. In D₂O solution at room temperature, these anomers occur in a ratio of ~2:1, as deduced from the intensity ratio of the GlcNAc-2 H-1 signals at δ 5.216 and 4.726, and also from the *N*-acetyl signals of this residue at δ 2.063 and 2.059.

A β -Man residue (Man-3) is (1→4)-linked to GlcNAc-2. Man-3 is characterised by the chemical shifts (Table III) and the shapes of its H-1 and H-2 signals, together

URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

TABLE III

¹H-CHEMICAL SHIFTS OF STRUCTURAL REPORTER-GROUPS OF CONSTITUENT MONOSACCHARIDES FOR SIX URINARY OLIGOSACCHARIDES, TYPICAL FOR A PATIENT WITH MORQUIO SYNDROME TYPE B.

| Reporter group | Residue ^a | Oligosaccharide anomer | Chemical shift in oligosaccharide ^a | | | | | |
|----------------|----------------------|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 1 | 2a | 2b | 3 | 4 | 5 |
| H-1 of | GlcNAc-2 | α | 5.216 | 5.213 | 5.213 | 5.211 | 5.206 | 5.204 |
| | | β | 4.726 | 4.725 | 4.725 | 4.721 | 4.721 | 4.721 |
| | Man-3 | α | 4.769 | 4.779 | 4.788 | 4.775 | 4.776 | 4.704 |
| | | β | 4.760 | 4.768 | 4.779 | 4.765 | 4.770 | 4.686 |
| | Man-4 | α | — | 5.106 | — | 5.122 | 5.133 | 5.059 |
| | | β | — | 5.102 | 5.122 | 5.120 | 5.131 | 5.057 |
| | Man-4' | α | 4.920 | 4.925 | 4.920 | 4.926 | — | 5.008 |
| | | β | 4.923 | 4.929 | 4.925 | 4.929 | 4.874 | 5.020 |
| | GlcNAc-5 | α,β | — | — | 4.579 | 4.582 | 4.585 | 4.583 |
| | | α | 4.582 | 4.583 | — | 4.582 | 4.592 | 4.579 |
| | GlcNAc-5' | β | — | — | — | — | — | 4.591 |
| | | α,β | — | — | 4.467 | 4.467 | 4.468 | 4.468 |
| | Gal-6 | α | 4.470 | 4.470 | — | 4.470 | 4.468 | 4.473 |
| | | β | 4.472 | 4.472 | — | 4.472 | 4.471 | 4.477 |
| | GlcNAc-7' | α,β | — | — | — | — | 4.555 | — |
| α,β | | — | — | — | — | 4.480 | — | |
| GlcNAc-9 | α | — | — | — | — | — | 4.466 | |
| | β | — | — | — | — | — | 4.468 | |
| H-2 of | Man-3 | α | 4.089 | 4.263 | 4.263 | 4.259 | 4.260 | 4.190 |
| | | β | 4.079 | 4.253 | 4.253 | 4.248 | 4.250 | 4.175 |
| | Man-4 | α,β | — | 4.071 | 4.193 | 4.192 | 4.200 | 4.258 |
| | | α | 4.104 | — | — | — | — | 4.148 |
| | Man-4' | β | 4.107 | 4.112 | <4.0 | 4.113 | 4.098 | 4.142 |
| | | α | — | — | — | — | — | — |
| NAc of | GlcNAc-2 | α | 2.063 | 2.061 | 2.058 | 2.060 | 2.059 | 2.064 |
| | | β | 2.059 | 2.058 | 2.055 | 2.057 | 2.056 | 2.060 |
| | GlcNAc-5 | α,β | — | — | 2.052 | 2.052 | 2.056 | 2.053 |
| | | α | 2.048 | 2.048 | — | 2.048 | 2.043 | 2.044 |
| | GlcNAc-5' | β | 2.047 | 2.046 | — | 2.046 | 2.046 | 2.039 |
| | | α,β | — | — | — | — | 2.039 | — |
| GlcNAc-9 | α,β | — | — | — | — | — | 2.064 | |

^aFor complete structures and numbering of monosaccharide residues, see formulae.

with its $J_{1,2}$ value of 1.0 Hz^{14,17}. Both signals are doubled, because 1 is a mixture of anomers as confirmed by the 2:1 intensity ratio for each pair of resonances. From the chemical shift of H-2 of Man-3 ($\delta \sim 4.08$), it can be concluded that this residue is mono-substituted at C-6 by an α -Man residue, denoted Man-4' (H-1, δ 4.92; $J_{1,2}$ 1.5 Hz)^{14,18}. Man-4' bears a β -GlcNAc residue (H-1, δ 4.582; $J_{1,2}$ 7.9 Hz) at C-2, as can be inferred from the chemical shift of H-2 of Man-4' (δ 4.10)¹⁸. The terminal Gal residue (H-1, δ 4.47; $J_{1,2}$ 7.8 Hz) is β -(1 \rightarrow 4)-linked to GlcNAc, completing the *N*-acetyl-lactosamine residue 5'-6'. The H-1 and H-2 signals of Man-4',

J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. VLIEGENTHART

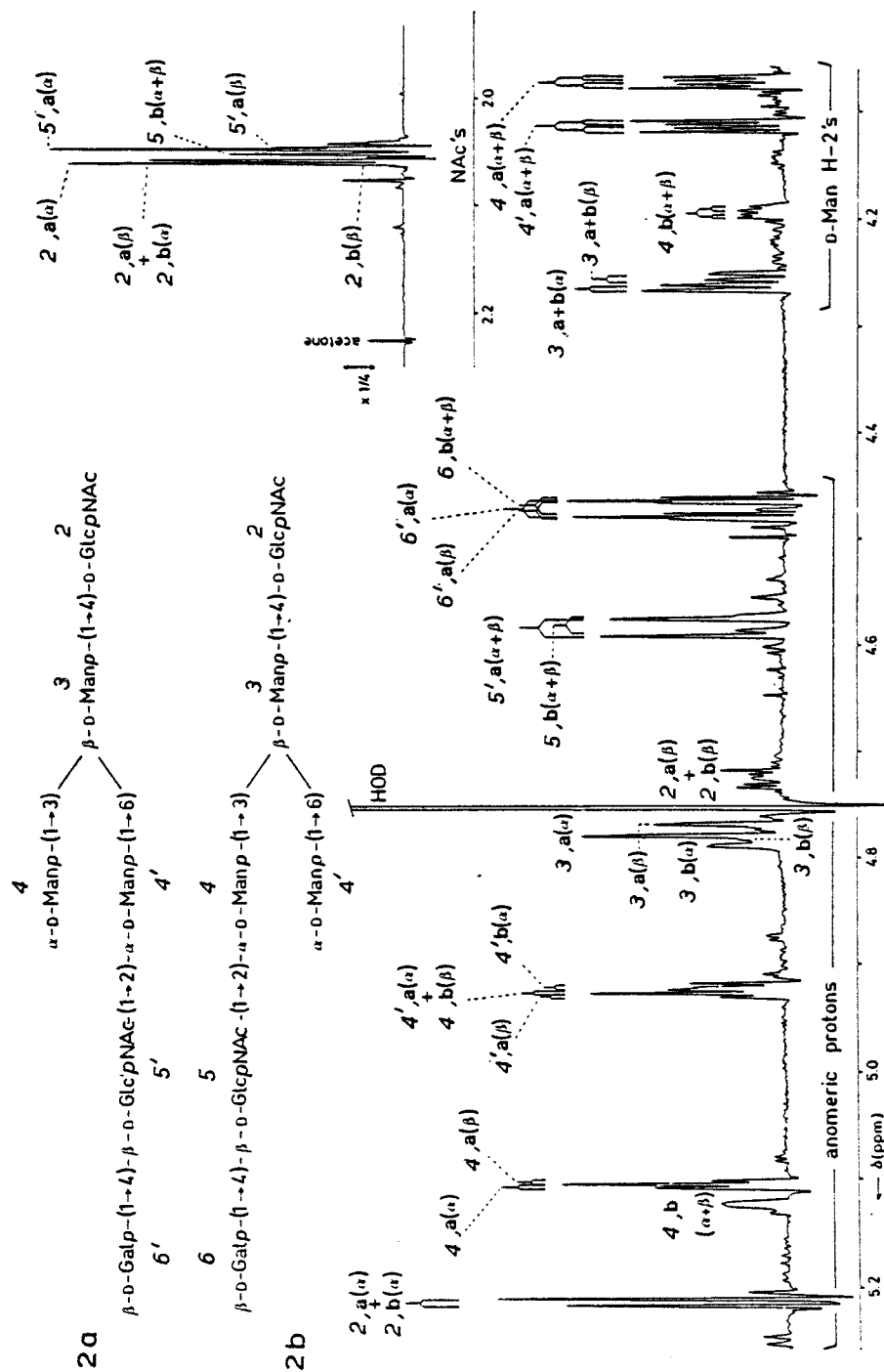


Fig. 3. Structural reporter-group regions of the resolution-enhanced, 500-MHz, ^1H -n.m.r. spectrum of the mixture of oligosaccharides **2a** and **2b**. The anomeric-proton signal designated by $4, a(\alpha)$ connotes H-1 of Man-4 in the α anomer of compound **2a**; *etc.* The intensity scale of the *N*-acetyl proton region (insertion) differs from that of the other part of the spectrum, as indicated.

URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

the *N*-acetyl signal of GlcNAc-5', and the H-1 doublet of Gal-6' are all doubled, in the anomeric ratio. This is in line with the earlier observation¹⁴ that the influence of anomeric configuration is rather pronounced in the signals of the 4'-5'-6' (lower) branch. Oligosaccharide 1 is therefore identified as a lower-branch, mono-antennary *N*-acetyl-lactosamine-type structure.

Oligosaccharide 2. — The results of the methylation analysis of 2 (Table II) show that the Gal residues present occupy terminal positions. Further, the three Man derivatives indicate the presence of a Man residue which is substituted at C-3 and C-6, a terminal Man residue, and a Man residue substituted at C-2. The 500-MHz, ¹H-n.m.r. spectrum of 2 (Fig. 3) reveals that it is a mixture of two isomeric hexasaccharides, both ending in GlcNAc-2. These hexasaccharide components have in common the mannotriose branching-core in β -(1 \rightarrow 4) linkage to GlcNAc-2, *i.e.*, a Man-3 residue which is substituted at C-3 and C-6 by α -Man-4 and α -Man-4', respectively. This is evident from the chemical shift of H-2 of Man-3 (Table III) in conjunction with the presence of Man-4 and Man-4' structural reporter-group signals (Fig. 3)^{14,17}.

The conclusion that a mixture of two oligosaccharides is involved is primarily based on the occurrence of a pair of well-separated signals for H-1 of Man-4 and for H-2 of Man-4, with relative intensities of 3:1 within each pair (Fig. 3). The main component (**2a**, 75%) contains a terminal Man-4. This can be deduced from the chemical shifts of H-1 and H-2 of this residue (δ 5.105 and 4.071, respectively). These values are identical with those for structurally related oligosaccharides containing a terminal Man-4 residue, namely, α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc¹⁶ and α -D-NeuAcp-(2 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc¹⁹. The relatively narrow lines of the H-1 signal for Man-4 at δ 5.105 reflect the relatively large flexibility of Man-4 with respect to the linkage conformation, inherent in a terminal sugar residue¹⁷. The Man-4' residue in **2a** bears a β -linked *N*-acetyl-lactosaminyl group at O-2, as is evident from the chemical shift for H-2 of Man-4' (δ 4.112) (*cf.* **1**, Table III). The n.m.r. features of GlcNAc-5' and Gal-6' in **2a** are in full agreement with those described for **1** (see Table III).

The set of signals with relatively low intensity (Fig. 3) is attributed to the minor component (**2b**, 25%) of the mixture. Compounds **2a** and **2b** differ in the location of the *N*-acetyl-lactosaminyl group. Compound **2b** contains a terminal Man-4', since the H-2 signal of Man-4' is hidden in the bulk resonance of sugar skeleton protons ($3.9 < \delta$ H-2 < 4.0) (not shown in Fig. 3). This criterion has been applied in the structural characterisation of various oligosaccharides and glycopeptides containing a terminal Man-4' residue^{14,16,18-20}. The substitution of Man-4 in **2b** at O-2 by a β -linked *N*-acetyl-lactosaminyl group is reflected in the downfield shifts for H-1 ($\Delta\delta$ 0.018) and H-2 ($\Delta\delta$ 0.122) of Man-4, as compared to **2a** (Table III). Furthermore, the chemical shifts of the structural reporter-groups of GlcNAc-5 and Gal-6 in **2b** are slightly, but significantly, different from those of GlcNAc-5' and Gal-6' in **2a**, respectively. This is in line with earlier, 500-MHz, ¹H-n.m.r. observations on

J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. Vliegenthart

related structures containing the 5-6 as well as the 5'-6' *N*-acetyl-lactosaminyl group^{14,17}. Finally, it is worth mentioning that the relatively small line-width of the H-1 signal of the terminal Man-4 in 2a renders possible the recognition of the influences of anomerisation upon the chemical shift of this structural reporter-group, whereas, for the substituted Man-4 in 2b, these are masked by considerable line-broadening.

Oligosaccharide 3. — The results of sugar and methylation analyses (Table I and II) of 3 point to a doubly branched structure, terminated in both branches by a Gal residue, and possessing a 3,6-substituted Man residue as the branch point. The ¹H-n.m.r. data (Table III) indicate that 3 is a di-antennary oligosaccharide of the *N*-acetyl-lactosamine type, with a GlcNAc-2 terminus. The presence of the mannotriose branching-core is inferred from comparison with the data for 2a and 2b. Both Man-4 (H-2, δ 4.192) and Man-4' (H-2, δ 4.113) bear an *N*-acetyl-lactosaminyl group at O-2. The spectral features of 3 accord with those of the asialo di-antennary oligosaccharide isolated from the urine of patients with GM₁-gangliosidosis¹⁴.

Oligosaccharide 4. — The methylation studies of 4 (Table II) demonstrate that all three Gal residues (Table I) occupy terminal positions. Comparison with the corresponding data for 3 indicates that one of the two α -Man residues is substituted at C-2 and C-6, indicating the presence of an additional substituent on this Man residue. The 500-MHz, ¹H-n.m.r. data for 4 suggest the presence of a tri-branched structure, containing three *N*-acetyl-lactosaminyl groups linked to the mannotriose branching-core. This is indicated by the occurrence of three Gal H-1 doublets (one of which is doubled in the anomeric, intensity ratio) at $4.4 < \delta < 4.5$ and three H-1 doublets belonging to non-reducing GlcNAc residues at $4.5 < \delta < 4.6$, together with the presence of all of the Man-3, Man-4, and Man-4' structural reporter-group signals (Table III). Both Man-4 and Man-4' bear an *N*-acetyl-lactosaminyl group at O-2 (Table II).

The assignment of the position of attachment of the third *N*-acetyl-lactosaminyl group to O-6 of Man-4' (and not Man-4) is based primarily on the shift decrements for H-1 and H-2 of Man-4' in comparison to 3 (Table III), whereas the chemical shifts for H-1 and H-2 of Man-4 remain unaltered. The shift decrements are similar to those observed for these protons as a result of the introduction of the β -(1→6)-linked *N*-acetyl-lactosaminyl group in the step from tri- to tetra-antennary glycopeptides of the *N*-acetyl-lactosamine type^{14,17}. Moreover, the chemical shifts for H-1 of the additional Gal (δ 4.481) and H-1 of the additional GlcNAc (δ 4.555) closely resemble those of the *N*-acetyl-lactosaminyl group 7'-8', β -(1→6)-linked to Man-4' in tetra-antennary structures¹⁷. The small downfield-shift for H-1 of GlcNAc-5' ($\Delta\delta$ 0.010, Table III) with respect to 3, concomitant with a considerable line-broadening of this resonance due to the attachment of the third unit, corroborates the tri'-antennary* *N*-acetyl-lactosamine-type structure for oligosaccharide 4.

*It is necessary to introduce this designation provisionally, in order to discriminate between the tri-antennary structure¹⁷ having the third *N*-acetyl-lactosaminyl group linked to O-4 of Man-4, and the structure of 4 presented here.

URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

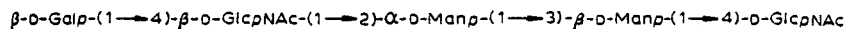
Oligosaccharide 5. — The methylation analysis of **5** (Table II) affords, *inter alia*, 2-*O*-methylmannoside, implicating the occurrence of a 3,4,6-substituted Man residue in the structure. Comparison of the results of sugar and methylation analyses for **5** and **3** (Tables I and II) leads to the hypothesis that **5** is a di-antennary *N*-acetyl-lactosamine-type oligosaccharide, having an additional GlcNAc residue linked to O-4 of Man-3. This assumption is confirmed by the ¹H-n.m.r. data for **5** (Table III) which reveal the presence of an additional GlcNAc residue, when compared to **3**; the chemical shifts for H-1 (δ 4.47) and the *N*-acetyl group (δ 2.064) of this residue, together with the $J_{1,2}$ value (8.4 Hz), provide strong evidence for its location in β -(1→4)-linkage to Man-3. Similar values have been reported for the chemical shifts of the structural reporter-groups of this intersecting GlcNAc residue (designated GlcNAc-9), which occurs in a heptasaccharide isolated from the urine of a patient having Sandhoff's disease (GM₂-gangliosidosis, variant O)²¹, and in the carbohydrate chain of chicken ovotransferrin²². The profound, characteristic influences of the attachment of GlcNAc-9 on the chemical shifts of the signals for H-1 and H-2 of Man-3, Man-4, and Man-4' (*cf.* the data for **3** and **5** in Table III) are completely analogous to those described earlier^{21,22}. Therefore, the structure of oligosaccharide **5** is identified.

DISCUSSION

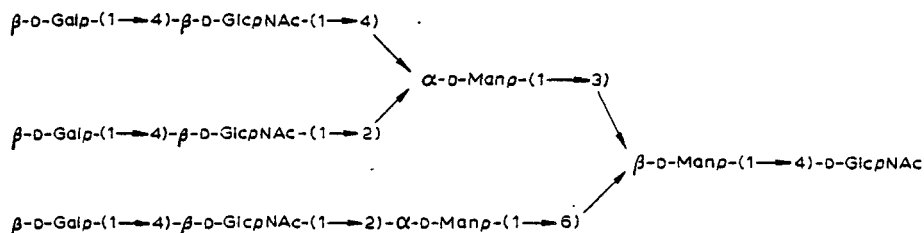
The structures of six urinary oligosaccharides that are typical for a patient with Morquio syndrome type B were elucidated by 500-MHz, ¹H-n.m.r. spectroscopy in combination with methylation analysis. Oligosaccharides **1**–**5** belong to the family of *N*-acetyl-lactosamine-type carbohydrate chains, which probably have been split off from the GlcNAc residue, *N*-glycosylically linked to asparagine of a glycoprotein, by the action of an endo- β -D-hexosaminidase¹⁵. A striking, common feature of the structures is the preponderance of lower branch *N*-acetyl-lactosaminyl groups β -(1→2)- or β -(1→6)-linked to Man-4'. In this respect, there is a clear difference between the structures of urinary oligosaccharides from patients with GM₁-gangliosidosis and those with Morquio syndrome type B. Oligosaccharides **1**, **3**, and **4** have been reported to be excreted also by patients suffering from GM₁-gangliosidosis¹⁵, but, in addition, oligosaccharides **6**–**8** have been found in the urine of these patients¹⁵. Oligosaccharides **2a**, **2b** and **5** are novel constituents in the series of oligosaccharides excreted by patients with lysosomal storage diseases.

The relationship of β -D-galactosidase deficiency in GM₁-gangliosidosis and in Morquio syndrome type B is not clear. The structure of the excreted oligosaccharides points to an impaired degradation of glycoconjugates in both disorders. The lower rate of excretion (10-fold less than in GM₁-gangliosidosis) and the absence of some oligosaccharide structures of the more-complete type (**6**–**8**) may be related to the presence of residual, acid β -D-galactosidase activity in Morquio syndrome type B. The mutant β -D-galactosidase in Morquio syndrome type B fibroblasts retains a residual activity of 5–10% of controls³ towards various natural substrates, including

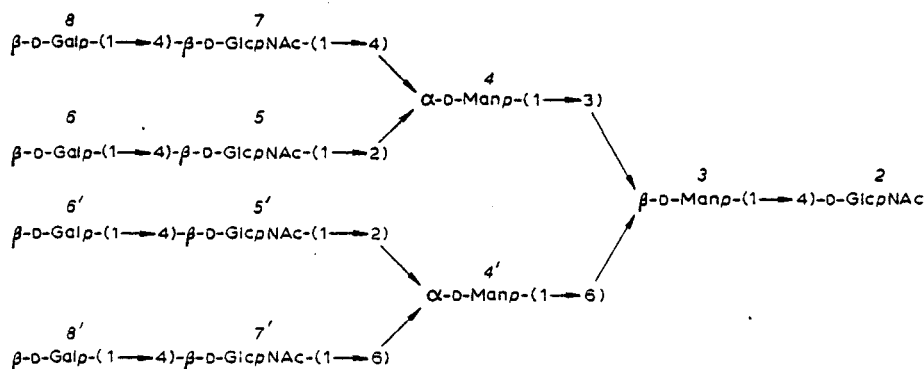
J.-C. MICHALSKI, G. STRECKER, H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J. F. G. VLIEGENTHART



6



7



8

asialofetuin, keratan sulphate, GM₁-ganglioside, and lactose. The mutant enzyme is mainly present in a polymeric form, whereas the monomeric form prevails in control fibroblasts²³. The Michaelis-Menten constant of the mutant enzyme towards *p*-nitrophenyl β -D-galactoside is increased³ more than 10-fold. By the use of the oligosaccharides described here, which possess galactose residues at various non-reducing positions, as substrates for the residual β -D-galactosidase activity in Morquio syndrome type B, further information on the pathogenesis of the impaired catabolism of glycoconjugates may be obtainable.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. E. Paschke (Münster, West Germany) for the generous gift of urine samples from a patient with Morquio syndrome type B, Professor K. von Figura (Münster) for his keen interest, Dr. W. E. Hull (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, West Germany) for recording the 500-MHz, ¹H-n.m.r. spectra, and Mr. Y. Leroy, C.N.R.S. technician, for recording the mass spectra and for his expert

URINARY OLIGOSACCHARIDES IN MORQUIO SYNDROME TYPE B

technical assistance with g.l.c. This investigation was supported by C.N.R.S. (Laboratoire Associé No. 217; Director: Professor J. Montreuil) I.N.S.E.R.M. (Contract No. 78.1.0523), the Netherlands Foundation for Chemical Research (S.O.N.) with financial aid from the Netherlands Organisation for the Advancement of Pure Research (Z.W.O.), and by grant UUKC.OC 79.13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (K.W.F.).

REFERENCES

- 1 J. S. O'BRIEN, E. GÖGLER, A. GIEDON, U. WEISSMANN, N. HERSCHKOWITZ, C. MIER, AND J. LEROY, *Clin. Genet.*, 9 (1976) 495-504.
- 2 A. I. ARBISSER, K. A. DONNELLY, C. I. SCOTT, N. DI FERRANTE, J. SINGH, R. E. STEVENSON, A. S. AYLSWORTH, AND R. R. HOWELL, *Am. J. Med. Genet.*, 1 (1977) 195-205.
- 3 H. GROEBE, M. KRINS, H. SCHMIDBERGER, K. VON FIGURA, K. HARZER, H. KRESSE, E. PASCHKE, A. SEWELL, AND K. ULLRICH, *Am. J. Hum. Genet.*, 32 (1980) 258-272.
- 4 R. MATALON, B. ARGOBAST, AND A. DORFMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61 (1974) 759-765.
- 5 J. SINGH, N. DI FERRANTE, P. NIEBES, AND D. TAVELLA, *J. Clin. Invest.*, 57 (1976) 1036-1040.
- 6 A. L. HORWITZ AND A. DORFMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80 (1978) 819-825.
- 7 S. OKADA AND J. S. O'BRIEN, *Science*, 160 (1968) 1002-1004.
- 8 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. Soc. Symp.*, 3 (1950) 52-61.
- 9 J. P. ZANETTA, W. C. BRECKENRIDGE, AND G. VINCENDON, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291-301.
- 10 S. HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205-208.
- 11 B. FOURNET, G. STRECKER, Y. LEROY, AND J. MONTREUIL, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502.
- 12 R. R. ERNST, *Adv. Magn. Reson.*, 2 (1966) 1-135.
- 13 G. STRECKER, C. TRENTESAUX-CHAUVET, A. POITAU, AND J. MONTREUIL, *Biochimie*, 58 (1976) 805-814.
- 14 J. F. G. Vliegenthart, H. van Halbeek, AND L. Dorland, *Pure Appl. Chem.*, 53 (1981) 45-77.
- 15 J. MONTREUIL, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 16 H. van Halbeek, L. Dorland, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegenthart, G. Strecker, J.-C. Michalski, J. Montreuil, AND W. E. Hull, *FEBS Lett.*, 121 (1980) 71-77.
- 17 H. van Halbeek, L. Dorland, J. F. G. Vliegenthart, K. Schmid, J. Montreuil, B. Fournet, AND W. E. Hull, *FEBS Lett.*, 114 (1980) 11-16.
- 18 G. STRECKER, B. FOURNET, J. MONTREUIL, L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J. F. G. Vliegenthart, AND D. DUBESSET, *Biochimie*, 60 (1978) 725-734.
- 19 M. C. Herlant-Peers, J. Montreuil, G. Strecker, L. Dorland, H. van Halbeek, G. A. Veldink, AND J. F. G. Vliegenthart, *Eur. J. Biochem.*, 117 (1981) 291-300.
- 20 H. van Halbeek, L. Dorland, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegenthart, J. C. Michalski, J. Montreuil, G. Strecker, AND W. E. Hull, *FEBS Lett.*, 121 (1980) 65-70.
- 21 G. STRECKER, M. C. HERLANT-PEERS, B. FOURNET, J. MONTREUIL, L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J. F. G. Vliegenthart, AND J. P. FARRIAUX, *Eur. J. Biochem.*, 81 (1977) 165-171.
- 22 L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J. F. G. Vliegenthart, G. Spik, B. Fournet, AND J. MONTREUIL, *Eur. J. Biochem.*, 100 (1979) 569-574.
- 23 E. PASCHKE, K. ULLRICH, K. VON FIGURA, AND H. KRESSE, in R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M. F. Kramer, J. F. G. Vliegenthart, AND H. Wiegandt (Eds.), *Proc. Int. Symp. Glycoconjugates, 5th, Kiel*, Thieme, Stuttgart, 1979, pp. 404-405.

IV - ÉTUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT LA GANGLIOSIDOSE DE TYPE I (MALADIE DE LANDING)

A - FRACTIONNEMENT DE L'URINE

L'urine (190 ml) est déminéralisée par passage sur deux colonnes couplées (2 x 10 cm) de DOWEX 50 x 8 (25-50 mesh, H⁺) et DOWEX 1 x 2 (200-400 mesh ; HCOO⁻). L'effluent est concentré sous vide à un volume de 20 ml, et la solution ainsi obtenue est soumise à une chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-célite. Les oligosaccharides sont désorbés par un gradient discontinu d'éthanol dans l'eau : 5 ; 7,5 ; 10 ; 12 ; 15 ; 18 ; 20 et 25 % respectivement. Après concentration, chaque fraction est analysée par chromatographie descendante sur papier (Fig. 25). Les oligosaccharides sont ensuite purifiés par chromatographie préparative, les durées de chromatographie étant de 6 jours pour les oligosaccharides I à V, 15 jours pour les oligosaccharides VI à VIII, 1 mois pour les oligosaccharides IX à XI et 2 mois pour les oligosaccharides XII et XIII.

B - METHODES STRUCTURALES

Les méthodes conduisant à la détermination des rapports molaires des différents monosaccharides ainsi que l'analyse par méthylation sont décrites dans l'article précédent.

Les méthyl-glycosides acétates ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonnes de verre (300 x 0,2 cm) contenant 3 % de Carbowax 6000 sur un support chromosorb W-HMDS (100-200 mesh) ou sur colonnes capillaires (60 m x 0,4 mm) de Carbowax 20 M. La température a été programmée de 130 à 200°C à 22/min. L'identification des glycosides acétates a été effectuée par comparaison de leur temps de rétention par rapport à des standards.

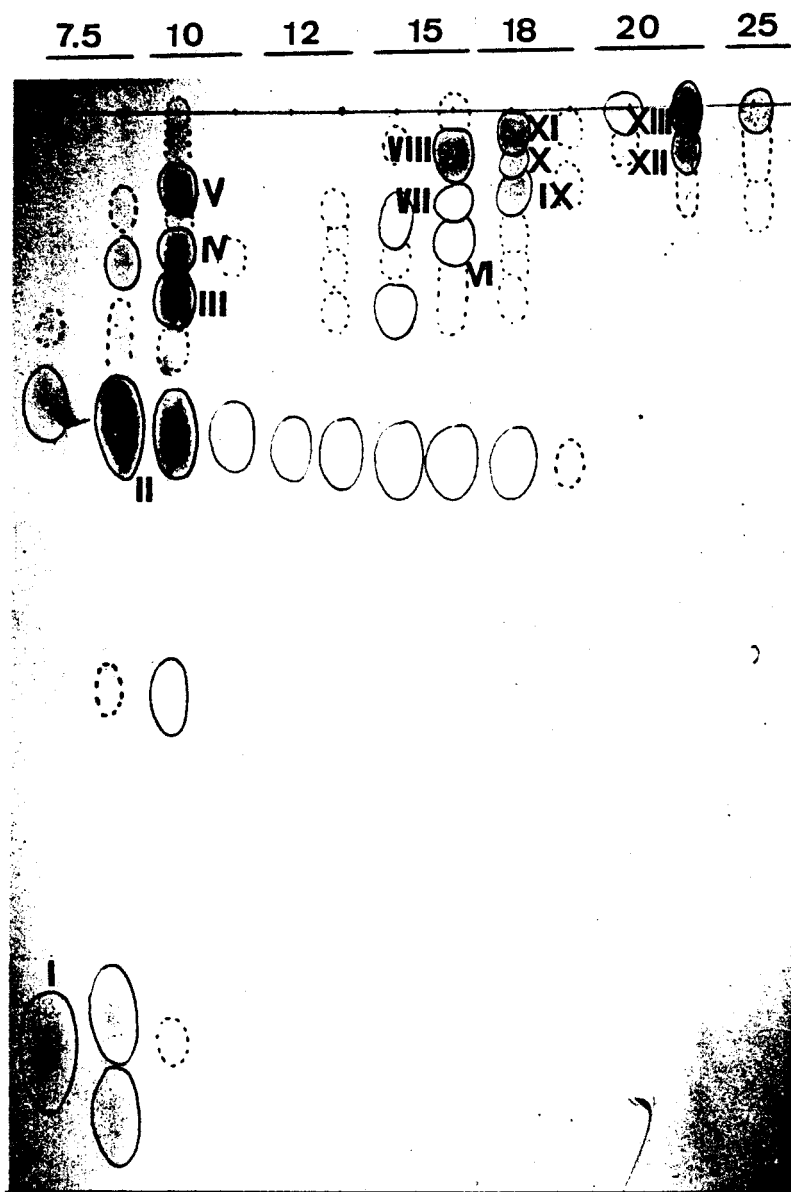


FIGURE 25

Chromatographie papier des oligosaccharides élués de la colonne de charbon-célite par la solution d'éthanol.
Solvant : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Durée de migration : 6 jours.

C - RESULTATS

1°) FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

L'emploi combiné de la chromatographie sur charbon-célite et chromatographie préparative sur papier, a permis l'isolement de 13 oligosaccharides majeurs. Six autres composés mineurs ont pu être caractérisés sans que leur isolement à l'état pur n'aie pu être obtenu.

2°) COMPOSITION MONOSACCHARIDIQUE

Tous les oligosaccharides contiennent 3 résidus de mannoses, à l'exception du composé I (voir Tableau XV).

Pour les oligosaccharides II à IV, le rapport Gal/GlcNAC est en faveur de structures respectivement bi, tri ou tétra-antennées. Les oligosaccharides VI à XIII possèdent 1 à 3 résidus de lactosamine additionnels. Tous les oligosaccharides possèdent un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice.

3°) ANALYSE PAR METHYLATION ET RMN A 360 MHz

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des oligosaccharides méthylés est représentée dans la figure 26. L'identification des éthers méthyliques est donnée dans le tableau XVI ainsi que dans les figures 27a et 27b. Les spectres de masse des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés ont été interprétés suivant les indications de FOURNET et al. 1981 (500).

Le fragment A₁ (M⁺ moins 31) indique le poids moléculaire de l'éther méthylique et de la même façon le nombre de groupements acétyls. Le fragment E₁ (M⁺ moins 45 ou 73) précise la substitution du carbone C-6. Le fragment B₁ (m/e 204 ou 232) donne une indication du nombre de groupement acétyls portés par les carbones C-2, C-3 ou C-4. Union J₁ (m/e 75) de faible intensité est en faveur d'une substitution par un groupement acétyl du carbone C-3. Un ion m/e 101 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-\overset{+}{\text{C}}\text{H}_3$) est caractéristique d'une substitution par un groupement O-méthyl des carbones C-2 et C-4.

TABLEAU XV : COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DES DIFFERENTS OLIGOSACCHARIDES (Les rapports molaires sont calculés sur la base de 2 ou 3 résidus de mannose en accord avec les résultats de méthylation et d'analyse RMN)

| | | OLIGOSACCHARIDES | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII |
| Taux d'excrétion | | 34 | 350 | 120 | 39 | 81 | 2.4 | 6 | 18 | 4.5 | 6 | 18 | 6 | 35 |
| | mg/l | | | | | | | | | | | | | |
| | Gal | 0.95 | 2.12 | 3.16 | 3.18 | 4.15 | 2.78 | 3.88 | 4.78 | 3.64 | 4.83 | 5.02 | 5.60 | 7.04 |
| Rapports | Man | 2.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| molaires | GlcNAc | 1.96 | 3.04 | 3.95 | 3.98 | 4.88 | 3.90 | 4.61 | 5.89 | 4.96 | 5.71 | 5.83 | 6.66 | 7.61 |

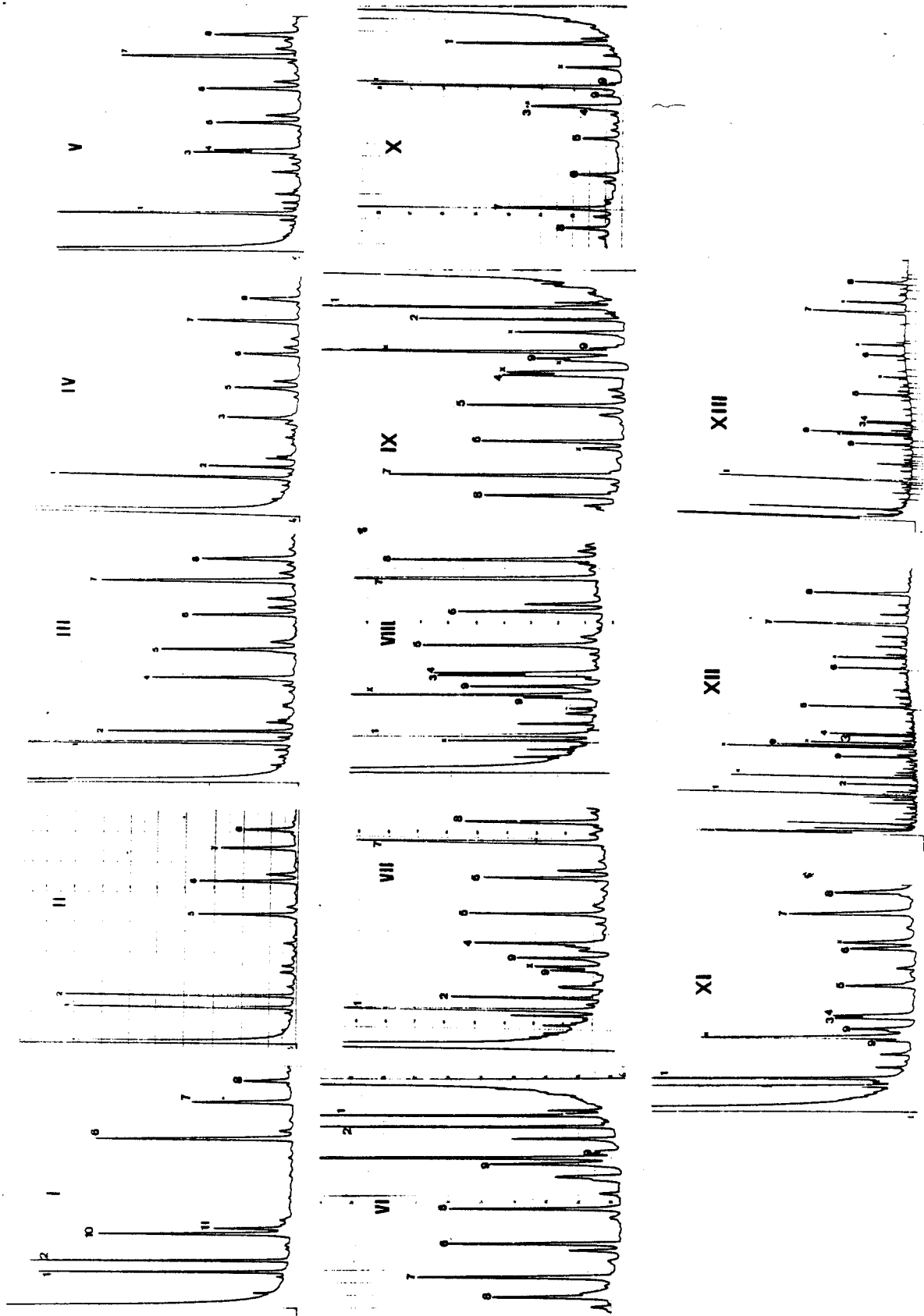


FIGURE 26 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides partiellement méthylés présents dans les méthanolysats des oligosaccharides I à XIII réduits.

(Pour les oligosaccharides I à XI, colonne de verre (300 x 0,2 cm) remplie avec 3 % Carbowax 6000 sur support chromosorb W-HMDS (100-200 mesh). Pour les oligosaccharides XII et XIII, colonne capillaire (60 m x 0,4 mm) Carbowax 20 M. Programme de température 130-200°C à 2°C/min).

1 - 2,3,4,6-tétra-OMe-Gal

2 - 3,4,6-tri-OMe-Man

3 - 3,4-di-OMe-Man

4 - 3,6-di-OMe-Man

5 - 2,4-di-OMe-Man

6 - 1,3,5,6-tétra-OMe-GlcN(Me)Ac-ol

7-8 - 3,6-di-OMe-GlcN(Me)Ac

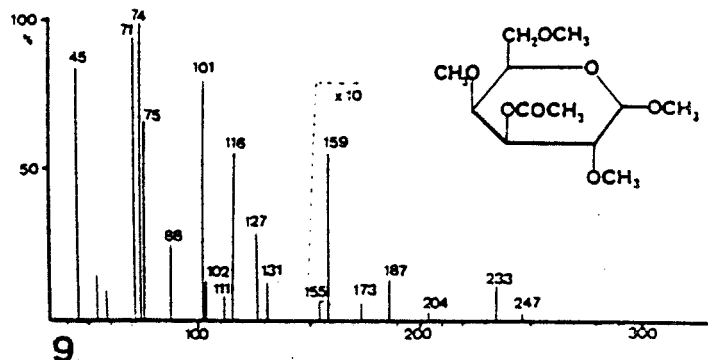
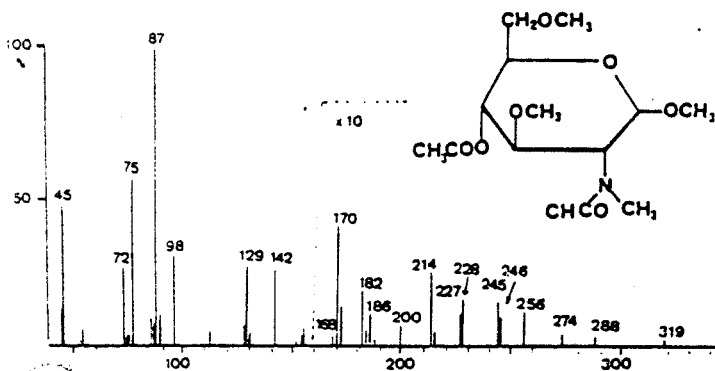
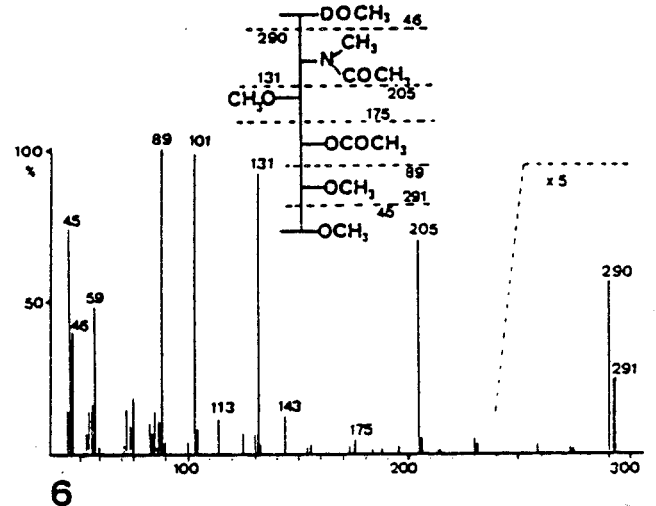
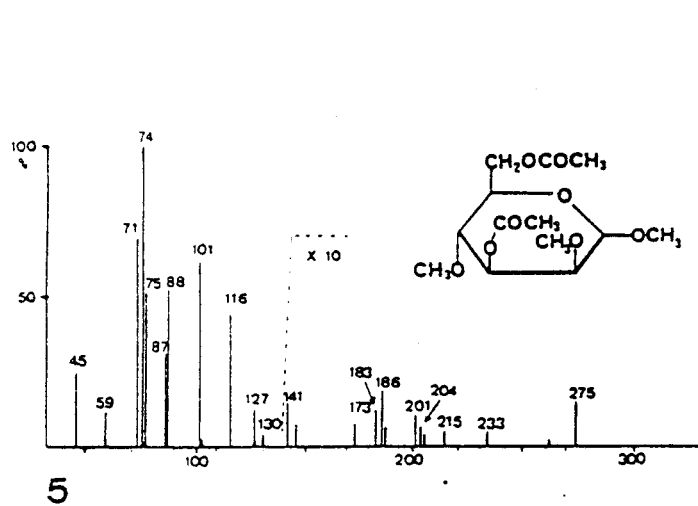
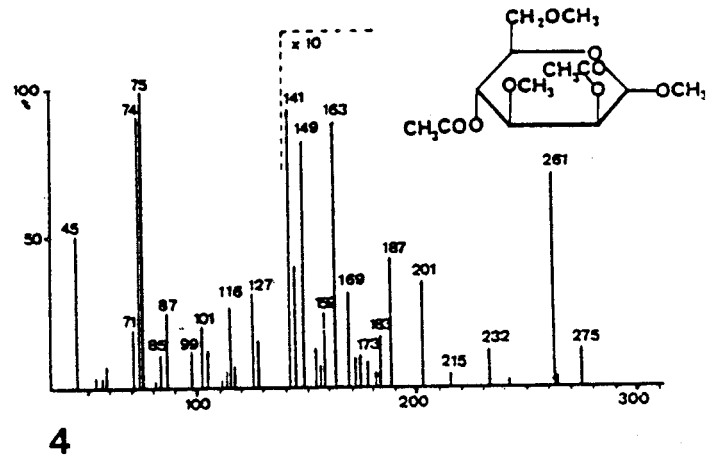
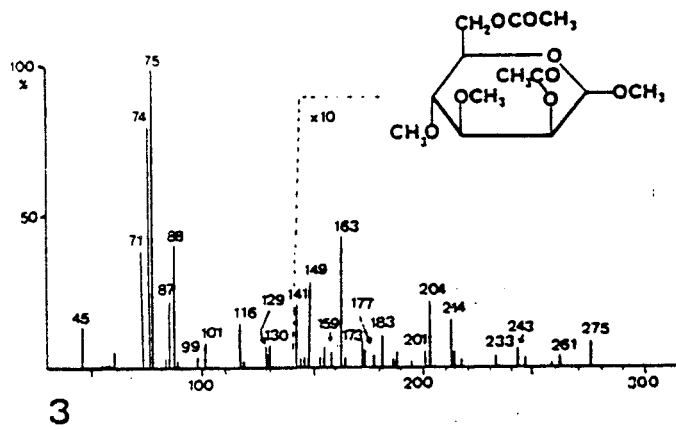
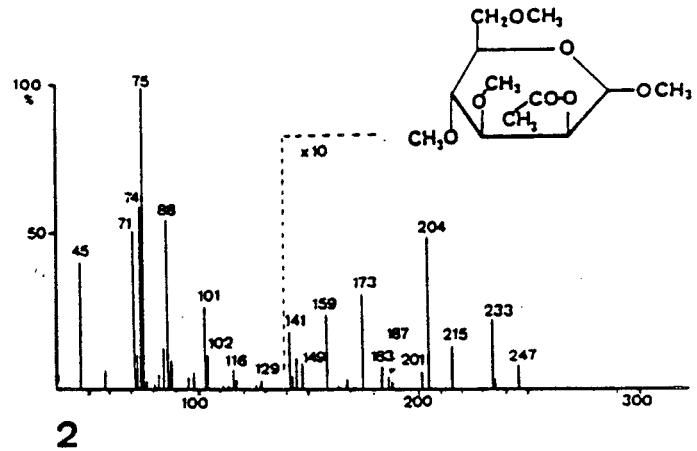
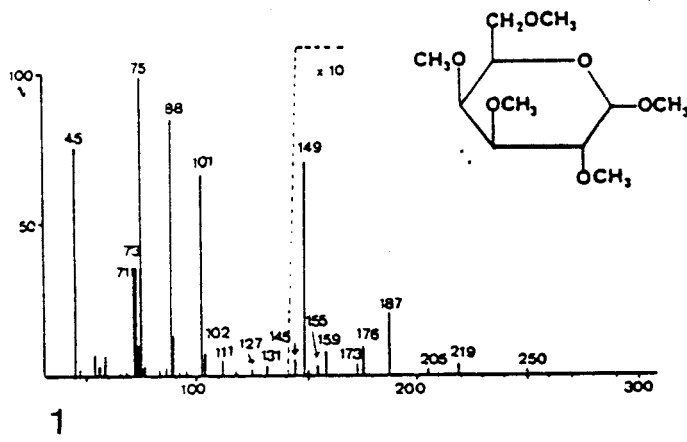
9 - 2,4,6-tri-OMe-Gal

10 - 2,3,4-tri-OMe-Man

11 - 2,3,4,6-tétra-OMe-Man

TABLEAU XVI : RAPPORTS MOLAIRES DES DIFFERENTS ETHERS METHYLIQUES PRESENTS DANS LES METHANOLYSATS DES OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES ET REDUITS

| MONOSACCHARIDES PARTIELLEMENT METHYLES | | OLIGOSACCHARIDES | | | | | | | | | | | | |
|--|------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII |
| 2,3,4,6-tétra-O-Me-Gal | (1) | 1.00 | 2.04 | 3.12 | 2.79 | 4.12 | 2.15 | 2.51 | 4.00 | 2.87 | 4.37 | 3.75 | 4.43 | 4.40 |
| 2,4,6-tri-O-Me-Gal | (9) | - | - | - | - | - | 1.00 | 1.00 | 1.28 | 0.98 | 0.85 | 1.55 | 2.41 | 4.22 |
| 3,4,6-tri-O-Me-Man | (2) | 1.04 | 2.20 | 1.08 | 1.03 | - | 2.16 | 0.76 | - | 1.16 | - | - | 0.46 | - |
| 2,4,6-tri-O-Me-Man | (10) | 0.66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2,3,4-tri-O-Me-Man | (11) | 0.42 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3,6-di-O-Me-Man | (4) | - | - | 1.04 | - | 0.98 | - | 0.80 | 0.86 | 0.85 | 0.83 | 1.06 | 0.75 | 1.03 |
| 3,4-di-O-Me-Man | (3) | - | - | - | 0.90 | 0.81 | - | - | 0.89 | - | - | 1.02 | 0.60 | 1.03 |
| 2,4-di-O-Me-Man | (5) | - | 1.05 | 1.06 | 0.98 | 0.82 | 1.00 | 0.86 | 1.16 | 1.02 | 0.85 | 0.95 | 0.86 | 1.20 |
| 3,6-di-O-Me-GlcNAc(Me)Ac | | 1.16 | 1.91 | 3.13 | 2.84 | 3.62 | 2.44 | 3.86 | 4.77 | 3.63 | 4.86 | 3.85 | 4.63 | 5.52 |
| 1,3,5,6-tétra-O-Me-GlcNAc(Me)Ac-itol | | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Rapport GlcNAc/GlcNAcitol établi par RMN | | 1.00 | 2.00 | 3.00 | 3.00 | 4.00 | 3.00 | 4.00 | 5.00 | 4.00 | 5.00 | 5.00 | 6.00 | 7.00 |



7.8

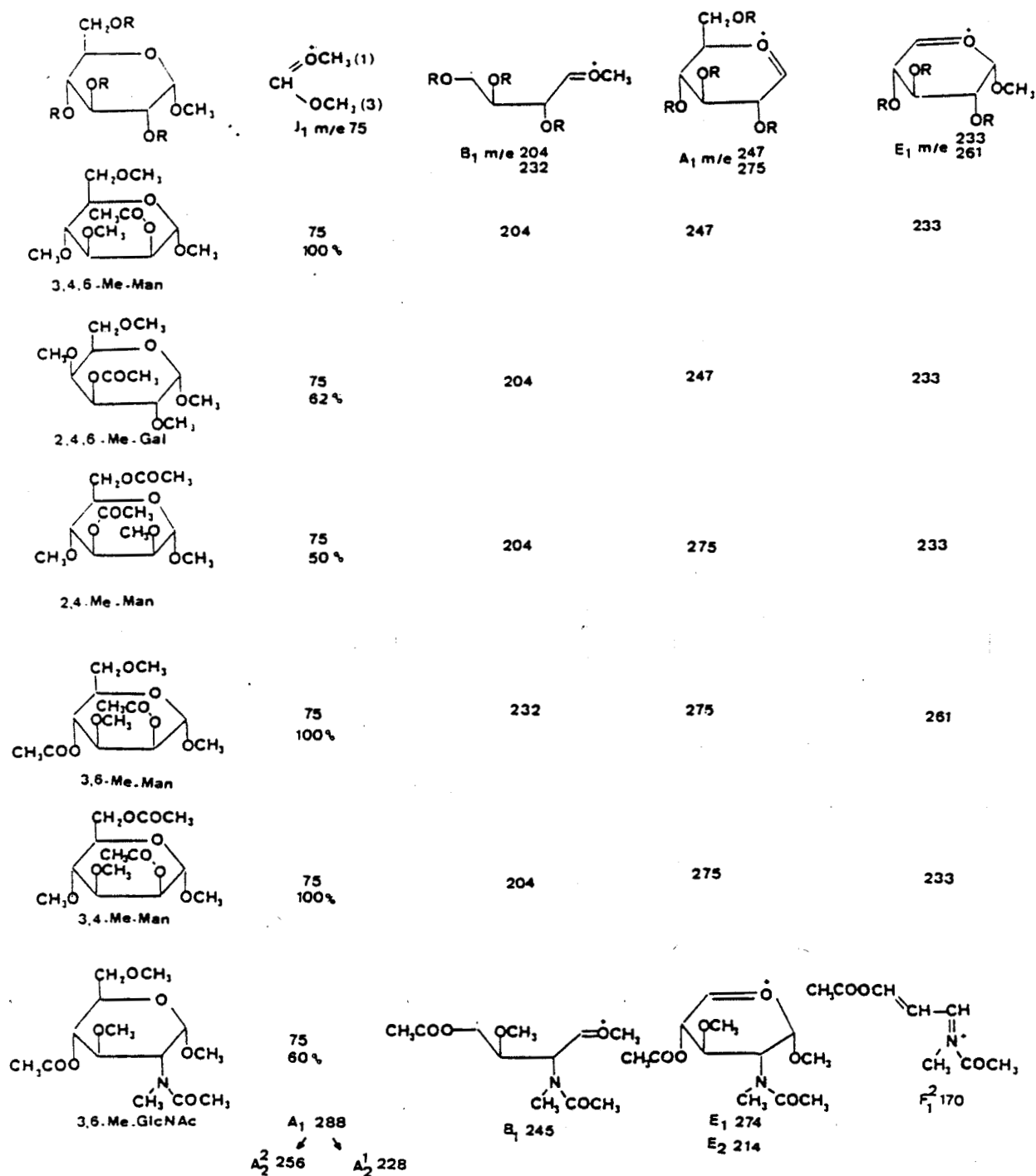


FIGURE 27a et 27b: a. Analyse par spectrométrie de masse des principaux éthers méthyliques présents dans les méthanolysats des oligosaccharides I à XIII. (Pour la terminologie 1 à 9 se reporter à la figure précédente).

b. Interprétation des principaux ions obtenus après fragmentation des différents éthers méthyliques selon FOURNET et al. 1981 (500).



L'ion K_1 ($R-O-CH_2-\underset{(6)}{CH}-\underset{(5)}{CH}=\overset{(4)}{OCH_3}$) n'est présent que si le

carbone C-4 est O-méthylé et peut avoir deux valeurs 102 ($R = CH_3$) et 130 ($R = CH_3CO$).

Des résultats obtenus par méthylation et méthanolyse, et se basant sur l'hypothèse d'un noyau trimannosidique commun, il est possible de proposer les structures rassemblées dans la figure 29 pour les oligosaccharides I à X. Cette hypothèse s'est vue vérifiée par les résultats de l'analyse RMN à 360 MHz. Cette dernière méthode a, en outre, permis de montrer que l'oligosaccharide I était constitué d'un mélange de deux isomères numérotés Ia et Ib dans les proportions de 3 : 2, confirmant ainsi les résultats de la méthylation qui avait démontré un mélange de deux éthers méthyliques 2,4,6-tri-O-Me-mannose et 2,3,4-tri-O-Me-mannose. La présence d'un noyau mannotrioside-N-acétylglucosamine peut en outre être déduit de l'interprétation des glissements chimiques des différents monosaccharides (Figure 28), par rapport à ceux obtenus préalablement pour des substances de référence (DORLAND *et al.* 1977 (501) ; DORLAND *et al.* 1978 (502)).

Les oligosaccharides VI à XIII donnent des spectres identiques avec des signaux additionnels correspondant à des séquences Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)— supplémentaires. Comme la présence de ces résidus n'influence pas les valeurs des glissements chimiques (δ ppm) des protons H-1 et H-2 des monosaccharides intrinsèques (notamment des mannoses), la position exacte de ces résidus n'a pu être déterminée. Il est à noter que l'existence de séquences supplémentaires de N-acétyllactosamine n'a pu être démontrée que par détermination du rapport $\frac{GlcNAc}{GlcNAcitol}$ par analyse RMN.

En effet, pour des raisons inconnues, probablement liées à une susceptibilité différente des liaisons de la N-acétylglucosamine à l'hydrolyse acide, un défaut en 3,6-di-O-Me-GlcNAcN(Me)Ac est observé en méthylation notamment pour les oligosaccharides supérieurs XII et XIII (Tableau XVI). Ce déficit a d'ailleurs conduit à une première interprétation erronée des résultats (STRECKER 1981 (503)).

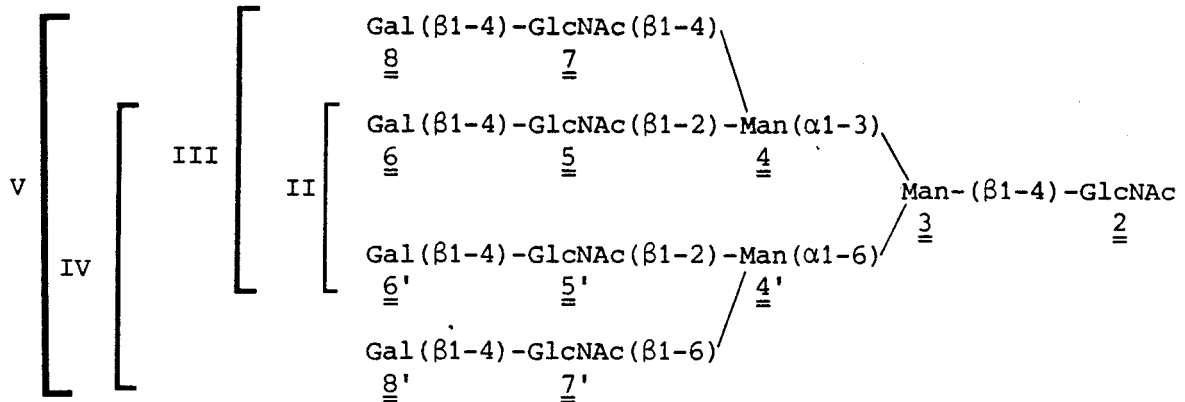
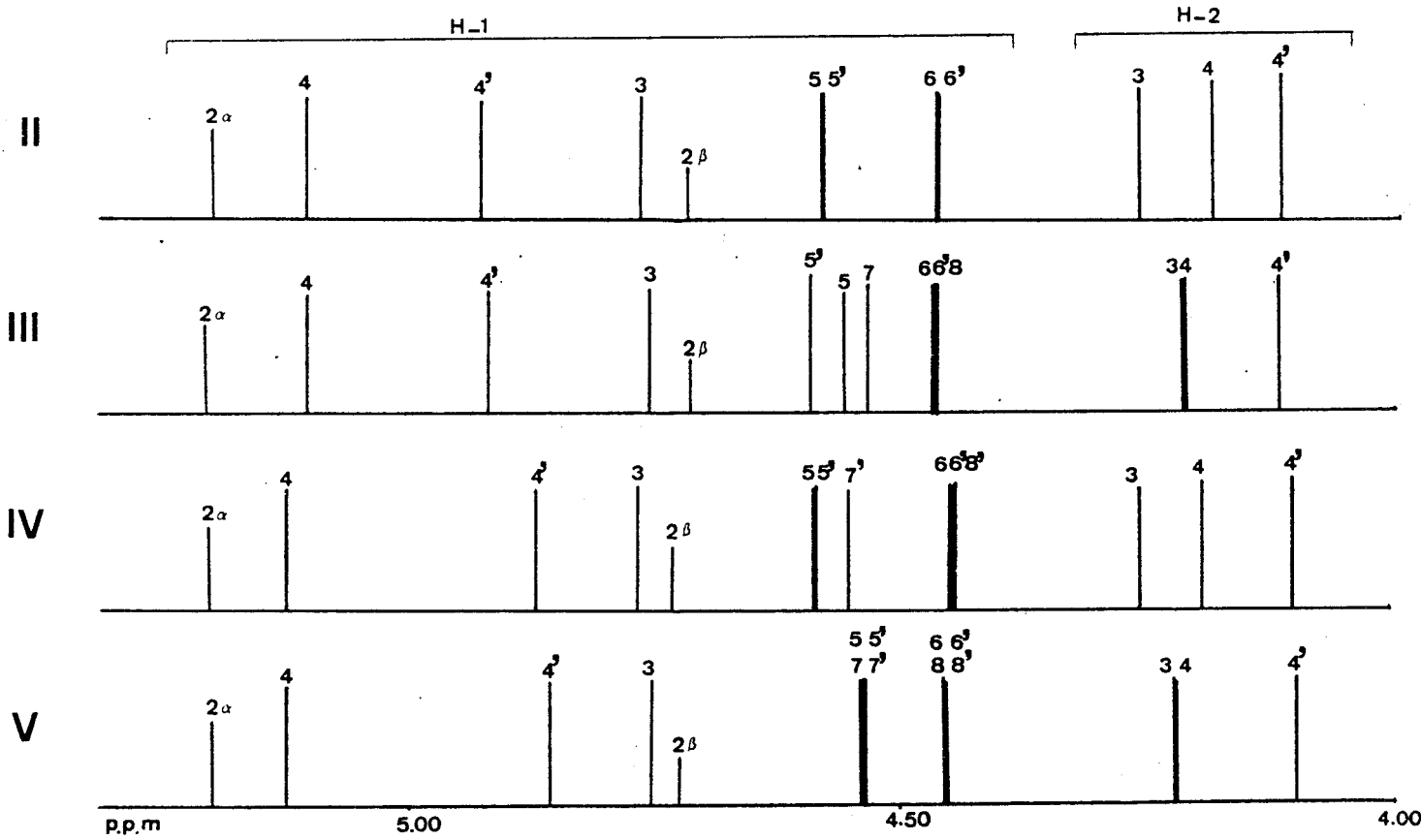


FIGURE 28

Représentation schématique des différents glissements chimiques caractéristiques des oligosaccharides II à V (structures di-, tri- et tétra-antennées).

La constante de couplage $J_{1,2}$ indique en outre une anomérie " β " pour tous les monosaccharides à l'exception des résidus de mannose 4 et 4'.

L'ensemble des structures oligosaccharidiques déterminées par méthylation et analyse RMN sont rassemblées dans la Figure 29.

V - CONCLUSION

L'analyse des oligosaccharides isolés de l'urine de maladie de Morquio type B et de GM_1 gangliosidose, montre que tous possèdent un ou plusieurs résidus de galactose en position terminale non-réductrice, témoin du déficit en β -galactosidase enregistré au cours de ces deux maladies. Un rapport de 1 à 10 est néanmoins à noter dans le taux d'excrétion urinaire de ces oligosaccharides dans l'urine relatif aux deux maladies (0.2 g/litre pour la maladie de Morquio type B, 1,5 à 2g/litre pour la GM_1 gangliosidose).

Si des profils oligosaccharides pratiquement analogues sont observés par analyse directe de l'urine par chromatographie couche mince (Figure 30), l'étude structurale comparative de la surcharge permet néanmoins de dégager certaines différences notables, en particulier en ce qui concerne les isomères oligosaccharidiques supérieurs. Il est en effet, à noter l'absence totale de structures "tétraantennées" dans l'urine des malades Morquio. Ce fait peut être corréllé à l'absence de structures triantennées, résultant de la substitution du mannose ($\alpha 1-3$) par la branche N-acétyllactosaminique liée en ($\beta 1-4$) (Oligosaccharide III).

Un autre fait notable dans la maladie de Morquio type B est l'absence de structures oligosaccharidiques supérieures possédant des séquences N-acétyl-lactosaminiques supplémentaires $Gal(\beta 1-4)-GlcNAc(\beta 1-3)-$ telles qu'elles ont été démontrées dans la GM_1 gangliosidose. Ces différences structurales sont résumées dans la Figure 31. Il semble donc que l'activité β -galactosidasique résiduelle enregistrée chez les patients atteints de maladie de Morquio type B s'exprime par une dégradation spécifique des résidus de N-acétyl-lactosamine périphériques, ainsi que de celui porté par le mannose ($\alpha 1-3$).

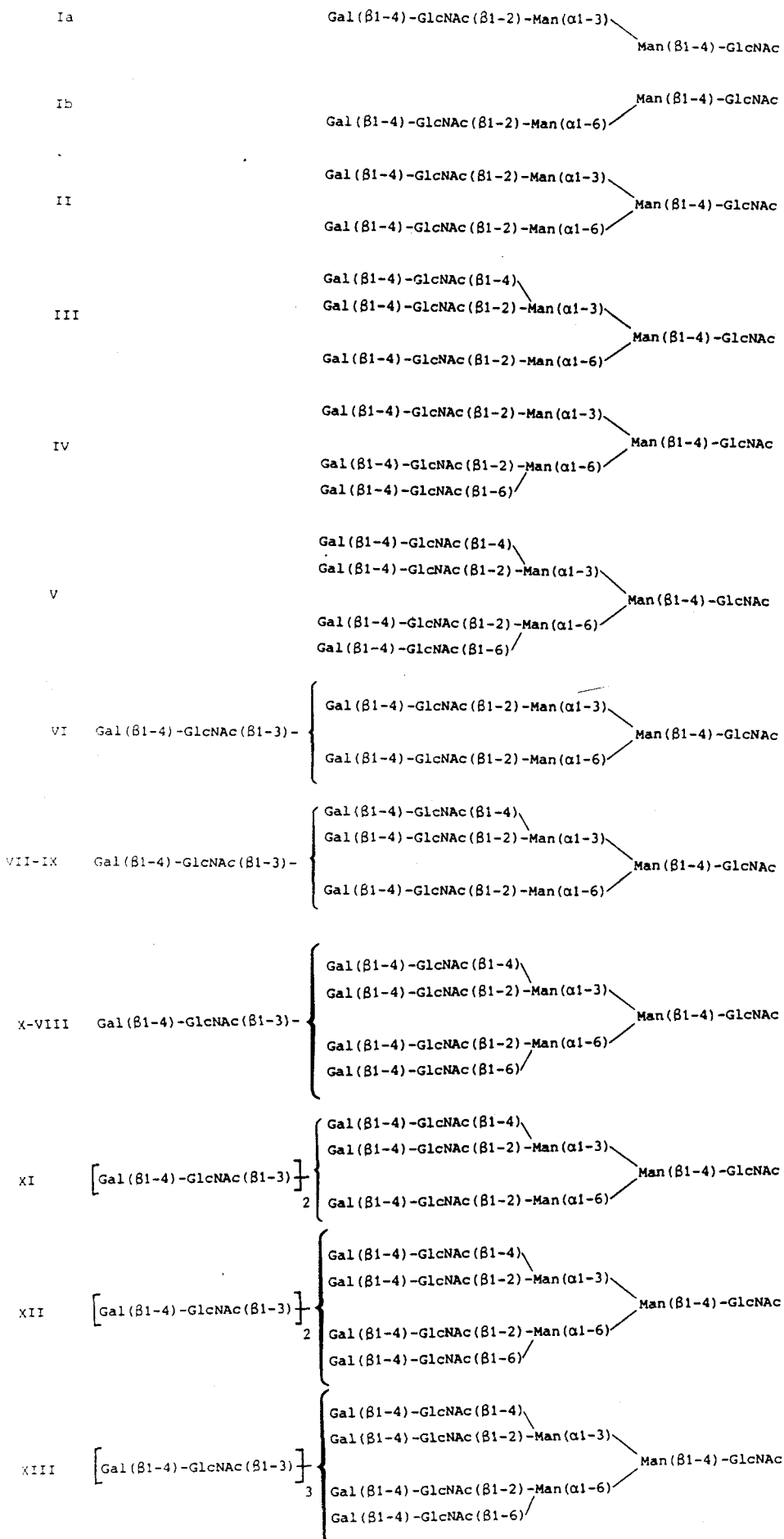


FIGURE 29

Structure de 13 principaux oligosaccharides isolés de l'urine de GM₁ Gangliosidose type I

Il nous est néanmoins impossible de trancher entre le fait de savoir si ces différences structurales sont le reflet d'une spécificité étroite de l'activité β -galactosidasique résiduelle dans la maladie de Morquio type B, ou simplement la conséquence d'un catabolisme "limite" par le faible taux d'enzyme présent. Si ce dernier point se vérifiait, il faudrait alors admettre une séquence dans les étapes de catabolisme ("antenne après antenne") tout comme cela est observé dans le processus biosynthétiques des N-glycannes. Nous mentionnerons que des différences structurales similaires ont été décrites entre patients atteints de GM₁ gangliosidose de type I et de type II (YAMASHITA et al. 1981 (504) ; OKURA et al. 1981 (505)) rapprochant ainsi la maladie de morquio type B de la GM₁ gangliosidose de type II.

D'autre part, les lois structurales "d'antennari- sation" précédemment énoncées lors des sialosides urinaires (antenne liée en β 1-4 sur le mannose 4 (α 1-3) et en β 1-6 sur le mannose 4' (α 1-6)) se vérifient ici, attestant ainsi leur universalité en ce qui concerne les séquences glycaniques de type N-acétyl-lactosaminique.

Il est à noter que les séquences des oligosaccharides Morquio 2a et 2b, possédant un mannose (α 1-6) libre ont été précédemment démontrées dans l'urine de sialidose (sialoside IV). Ces structures peuvent être dues à une inefficience de la mannosidase α 1-6, résultat d'un encombrement stérique engendré par la séquence Gal(β 1-4)-GlcNAc avoisinante une spécificité similaire ayant été démontrée pour l' α -mannosidase isolée de Jack-bean (YAMASHITA et al. 1980 (506)). Il est toutefois plus probable que ces structures préexistent à l'état natif dans certaines glycoprotéines comme cela a récemment été démontré pour la gonadotropine chorionique humaine (MIZUOCHI et al. 1983 (507)).

De même des glycannes possédant des séquences N-acétyl-lactosaminique additives comme celles des oligosaccharides supérieurs de l'urine de GM₁ gangliosidose ont été caractérisées dans certaines glycoprotéines, nous citerons le cas de certains glycannes des sIgA du lait humain (PIERCE-CRETEL et al. 1984 (508)) ou celui d'un glycopeptide isolé de cellules ovariennes de Hamster Chinois (LI et al. 1980 (509)).

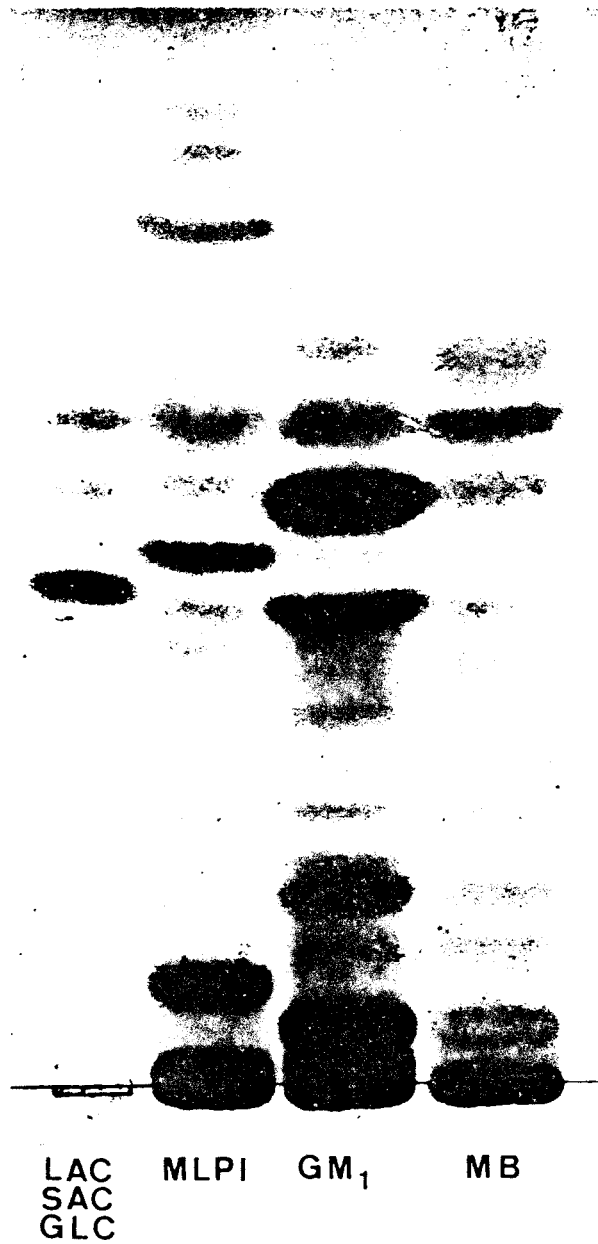


FIGURE 30

Analyse par chromatographie couche mince de l'urine de GM₁
gangliosidose et de Morquio type B
Solvant (butanol/acide acétique/eau 2 : 1 : 1) ; migration 8 h
Révélation orcinol sulfurique

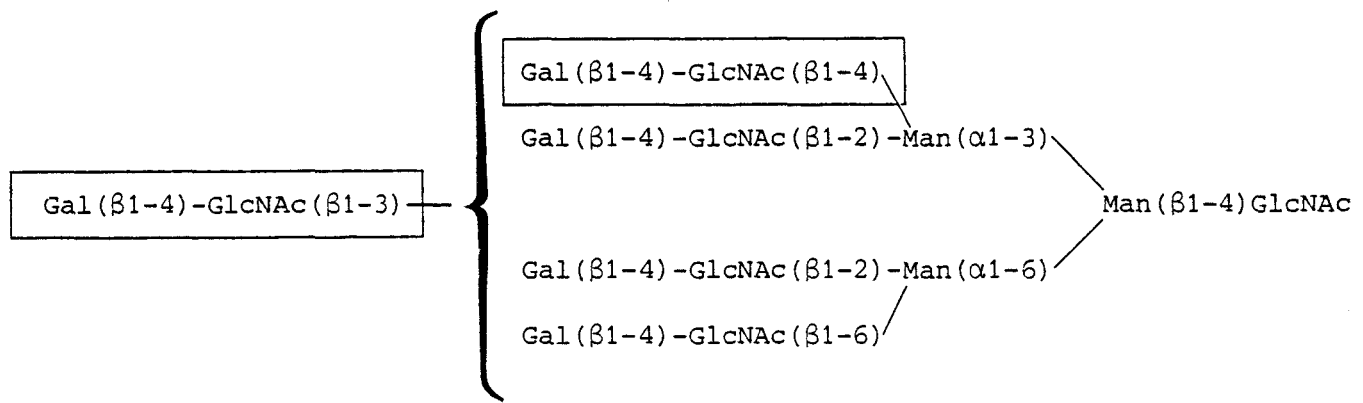


FIGURE 31

Structure comparée des oligosaccharides trouvés dans la GM₁ gangliosidose type I et de la maladie de Morquio type B.

Les éléments structuraux encadrés ne se retrouvent que dans la seule GM₁ gangliosidose et sont absents dans la maladie de Morquio type B.

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES SUPERIEURS EXCRETES LORS DE LA MANNOSIDOSE

En 1967, ÖCKERMAN (510) décrit une nouvelle maladie de surcharge lysosomale, présentant de nombreux caractères cliniques communs avec le syndrome de HURLER, caractérisée par la présence de composés riches en mannose au niveau du foie et du cerveau (ÖCKERMAN 1969 (511)), résultat d'une déficience profonde en α -mannosidase acide, d'où la désignation de "mannosidose" attribuée à la maladie.

I - ÉTUDE CLINIQUE

Les études réalisées sur les 60 patients atteints de mannosidose actuellement décrits (AUTIO et al. 1982 (512)), ont fait ressortir une considérable hétérogénéité en ce qui concerne les traits cliniques des malades. Les patients apparaissent généralement normaux jusqu'à l'âge de 2 ans, où se développe un phénotype tout à fait particulier. Les caractères systématiquement recensés sont alors le retard mental profond (débilité, langage et marche non acquis), dysmorphie faciale (grosse tête, front saillant, nez aplati, lèvres épaisses), anomalies osseuses (en particulier vertébrales), surdité et infections respiratoires (FARRIAUX et al. 1975 (513)).

L'examen histologique fait apparaître dans tous les cas étudiés, la présence de lymphocytes vacuolés dans le sang périphérique. Ces mêmes vacuoles se retrouvent au niveau des fibroblastes de la biopsie hépatique (MONUS et al. 1977 (514)). Bien que la génétique de la maladie soit mal étudiée, il semble que cette dernière soit transmise suivant un mode autosomal récessif. La mutation responsable de la maladie a pu être localisée sur le chromosome 19 chez l'Homme (CHAMPION et SHOWS 1977b(515)).

La maladie présente d'ailleurs une certaine variabilité génétique et est classiquement divisée en Mannosidose I ou forme grave et Mannosidose de type II (forme atténuée) (BOOTH et al. 1976 (516) ;

BACH et al. 1978 (517) ; MITCHELL et al. 1981 (518)). Dans ce dernier cas, les patients atteignent généralement l'âge adulte (MONTGOMERY et al. 1982 (519) ; AUTIO et al. 1982 (520) ; YUNIS et al. 1976 (521)).

II - ENZYMOLOGIE

Plusieurs formes d' α -mannosidases tissulaires (E.C. 3.2.1.24) peuvent être distinguées, deux formes lysosomales actives à pH acide (mannosidases A et B) (CAROLL et al. 1972 (522) ; OPHEIM et TOUSTER 1977 (523)), une forme active à pH neutre localisée dans le cytosol (MARSH et GOULAY G.C. 1971 (524)) mais provenant vraisemblablement du réticulum endoplasmique (BISCHOFF et KORNFELD 1983 (525)) et enfin 3 formes d' α -mannosidases golgiennes jouant un rôle régulateur dans la biosynthèse des N-glycosylprotéines (mannosidases I_A, I_B et II) (TULSIANI et al. 1977 (526) ; TABAS et KORNFELD 1979 (527) ; TULSIANI et al. 1982a(528)). Les mannosidases acides A et B représentent des formes moléculaires voisines présentant des caractéristiques biochimiques et immunochimiques similaires, ne différant que par leur charge (GRABOWSKI et al. 1980 (529) ; PHILIPS et al. 1975 (530)) A l'inverse de la mannosidase neutre cytosolique, l'activité des mannosidases acides est augmentée par les ions Zn²⁺ et au contraire inhibée en présence d'ions Co²⁺ (PHILIPS et al. 1974 (531)). La seule déficience des formes acides a été démontrée dans le foie, les leucocytes, le plasma et les fibroblastes des malades (POENARU et al. 1980 (532) ; TAYLOR et al. 1975 (533).

Une activité résiduelle en α -mannosidase acide subsiste néanmoins chez les malades ; les deux isoenzymes mutants présentent un Km supérieur pour les substrats artificiels (chromogéniques ou fluorogéniques), une moins grande thermostabilité que les enzymes normales et une capacité de fixation des ions divalents altérée suggérant une mutation du gène structural de l'enzyme (BEAUDET et NICHOLS 1976 (534) ; BURTON et NADLER 1978 (535) ; HULTBERG et MASSON 1975 (536)).

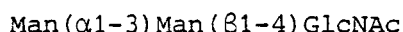
Par ailleurs, il est intéressant de noter que contrastant avec le déficit intracellulaire en α -mannosidase, il a été observé que les fibroblastes des patients sécrétaient dans le milieu de culture un enzyme catalytiquement normale et un déficit touchant le signal de reconnaissance

de l' α -mannosidase similaire à celui décrit dans la I-Cell disease a été avancé (HULTBERG et MASSON 1977 (537) ; HALLEY et al. 1980 (538)).

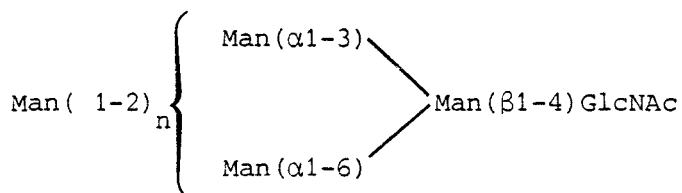
Une étude plus récente effectuée par BEN YOSEPH et al. 1982b (539) montre que le taux d'enzyme intracellulaire des cellules mutantes, mesurée par immunotitration est similaire à celui des cellules normales, excluant ainsi l'hypothèse d'une localisation subcellulaire anormale. Le "processing" de l' α -mannosidase semble donc être normal et la mutation structurale ne s'exprimerait qu'après délivrance de l'enzyme aux lysosomes.

III - ÉTUDE CHIMIQUE DU MATÉRIEL ACCUMULÉ

Dès 1969, ÖCKERMAN (540) met en évidence la présence de composés riches en mannose dans le cerveau de patients atteints de mannosidose. En 1973, NORDEN et al. (541) isolent l'oligosaccharide majeur de l'urine des patients et établissent sa structure comme étant le trisaccharide :



Par la suite, ce trisaccharide a été caractérisé dans différents tissus et les fibroblastes des malades (TSAY et al. 1975b(542) ; MERSMANN et al. 1976 (543)). Des oligosaccharides plus complexes furent caractérisés dans l'urine (NORDEN et al. 1974 (544) ; TSAY et al. 1974 (545)), résultant de la substitution du trisaccharide préalablement isolé par des résidus de mannose liés en α 1-2. En 1976, STRECKER et al. (546) isolent les 8 oligosaccharides majeurs de l'urine et proposent la base de méthodes chimiques (méthylation, oxydation périodique, acétolyse) la structure suivante pour les isomères supérieurs :



Ces composés dériveraient donc de la substitution du noyau trimannosidique, commun à toutes les glycoprotéines par un nombre variable de résidus de mannose en α 1-2. Cependant nos connaissances sur la structure des chaînes glycaniques progressant et en particulier avec l'élucidation structurale des chaînes de type polymannosidique impliquées dans ces voies biosynthétiques des N-glycosylprotéines (KORNFELD et al. 1978 (547)), les structures des oligosaccharides supérieurs de l'urine de mannosidose apparaissaient comme "hétérodoxes" et n'étaient plus en accord avec les schémas généraux de structure proposés pour les chaînes glycaniques de type "polymannosidique" (MONTREUIL 1982 (548)). Ce désaccord pouvant provenir d'une mauvaise interprétation des résultats de l'analyse chimique, il nous est apparu nécessaire de reconsidérer les structures des oligosaccharide supérieurs par le biais de méthodes spectroscopiques en particulier par une étude en résonance magnétique nucléaire (réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur VLIEGENTHART (Utrecht) (ARTICLE n° 9) ainsi que par une étude en spectrométrie de masse réalisée en collaboration avec le Professeur EGGE (Bonn) (ARTICLE n° 10).

A 500 MHz ^1H NMR STUDY OF URINARY OLIGOSACCHARIDES FROM PATIENTS WITH MANNOSIDOSIS

H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, G. A. VELDINK, J. F. G. Vliegenthart, G. STRECKER⁺,
J.-C. MICHALSKI⁺, J. MONTREUIL⁺ and W. E. HULL*

Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, 3522 AD Utrecht, The Netherlands, ⁺Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France and

*Bruker Analytische Messtechnik, GmbH, D-7512 Rheinstetten-Fo., FRG

Received 22 September 1980

1. Introduction

Mannosidosis is an autosomal, recessively heritable, inborn error of glycoprotein metabolism characterized by a lysosomal deficiency of acidic α -mannosidase leading to the accumulation of mannose-rich oligosaccharides in tissues, fibroblasts and urine [1-7]. The structure elucidation of these oligosaccharides, produced by endo- β -*N*-acetylglucosaminidase digestion of the sugar chains, is of great interest, since they represent possible intermediates in the processing of the biosynthesis of asparagine-linked carbohydrate chains [7-9].

Here, the investigation of several of these oligosaccharides by 500 MHz ^1H NMR spectroscopy is described. Some smaller compounds were already chemically identified [3,5]. The NMR parameters of these smaller oligosaccharides in combination with those of three oligomannoside-type glycopeptides isolated from the urine of a patient with Gaucher's disease [10], enable the interpretation of the structural reporter group regions of the 500 MHz ^1H NMR spectrum of an oligosaccharide containing 9 mannose residues, in terms of structural assignments.

2. Materials and methods

The isolation of mannose-rich oligosaccharides from urine of patients with mannosidosis has been described [3,5]. The structures of compounds $\text{Man}_2 \cdot \text{GlcNAc}$ (M_2G), $\text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}$ (M_3G) and $\text{Man}_4 \cdot \text{GlcNAc}$ (M_4G), as determined by chemical methods [3,5], are presented in fig.1.

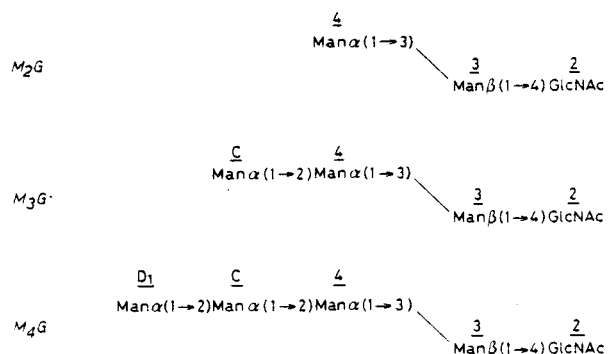


Fig.1. Structures of the urinary mannosidosis oligosaccharides, used as reference compounds.

Solutions of the oligosaccharides were exchanged several times in D_2O with intermediate lyophilization. NMR spectral analysis of ~ 0.02 M solutions of the compounds in D_2O (99.96 atom % D, Aldrich) was carried out on a Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at probe temperatures of 300 K or 330 K. Compound M_4G^* was analysed by 360 MHz ^1H NMR spectroscopy on a Bruker HX-360 spectrometer, operating under the same conditions. Chemical shifts at 300 K are given relative to sodium-2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate (indirectly to acetone in D_2O : $\delta = 2.225$ ppm). Resolution enhancement of the ^1H NMR spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation according to [11].

3. Results and discussion

Besides the 3 oligosaccharides listed in fig.1, another



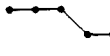

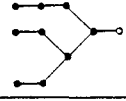
series of mannose-rich oligosaccharides was isolated from the urine of mannosidosis patients, varying in mannose-content from 4-9 residues. Compounds M₄G* and M₉G were obtained in a pure state. Purification of the other oligosaccharide fractions is still in progress.

From the compounds M₂G, M₃G, M₄G as well as

from M₄G* and M₉G, high-resolution ¹H NMR spectra were recorded at 300 K and 330 K.

The 360 MHz ¹H NMR spectral features of the trisaccharide M₂G have appeared [12]. The NMR data of this oligosaccharide, refined by 500 MHz ¹H NMR spectroscopy are compiled in table 1. The NMR spectrum of this oligosaccharide ending on GlcNAc 2 is a

Table 1
¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for some mannosidosis oligosaccharides^a

| Reporter group | Residue ^b | Compound anomer | Compound and schematic structure ^c | | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------|---|---|--|---|---|
| | | | M ₂ G | M ₃ G | M ₄ G | M ₄ G* ^d | M ₉ G |
| | | |  |  |  |  |  |
| H-1 of | <u>2</u> | α | 5.209 | 5.206 | 5.207 | 5.250 | 5.231 |
| | | β | 4.720 | 4.718 | 4.719 | 4.716 | 4.714 |
| NAc of | <u>2</u> | α | 2.043 | 2.041 | 2.043 | 2.044 | 2.050 |
| | | β | 2.041 | 2.041 | 2.041 | 2.044 | 2.046 |
| H-1 of | <u>3</u> | α | 4.787 | 4.776 | 4.774 | 4.776 | 4.776 |
| | | β | 4.783 | 4.772 | 4.771 | — | 4.772 |
| | <u>4</u> | α,β | 5.111 | 5.356 | 5.343 | 5.348 | 5.337 |
| | | α | — | — | — | 4.899 | 4.872 |
| | <u>4'</u> | β | — | — | — | — | 4.869 |
| | | α | — | — | — | — | 5.398 |
| | <u>A</u> | β | — | — | — | — | 5.407 |
| | | α,β | — | — | — | — | 5.142 |
| | <u>B</u> | α,β | — | 5.050 | 5.296 | 5.056 | 5.308 |
| | | α,β | — | — | 5.046 | — | 5.048 |
| | <u>C</u> | α,β | — | — | — | — | 5.048 |
| | | α | — | — | — | — | 5.058 |
| <u>D₁</u> | β | — | — | — | — | 5.063 | |
| | α,β | — | — | — | — | 5.040 | |
| H-2 of | <u>3</u> | α | 4.244 | 4.224 | 4.220 | 4.238 | 4.239 |
| | | β | 4.233 | 4.213 | 4.209 | 4.227 | 4.229 |
| | <u>4</u> | α | 4.075 | 4.108 | 4.087 | 4.109 | 4.089 |
| | | β | 4.071 | 4.105 | 4.082 | — | — |
| | <u>4'</u> | α | — | — | — | <4.0 | 4.158 |
| | | β | — | — | — | — | 4.155 |
| | <u>A</u> | α | — | — | — | — | 4.106 |
| | | β | — | — | — | — | 4.103 |
| | <u>B</u> | α,β | — | — | — | — | 4.025 |
| | | α,β | — | 4.069 | 4.105 | 4.068 | 4.109 |
| | <u>C</u> | α,β | — | — | 4.066 | — | 4.069 ^e |
| | | α | — | — | — | — | 4.073 ^e |
| <u>D₁</u> | β | — | — | — | — | 4.073 ^e | |
| | α,β | — | — | — | — | 4.066 ^e | |

^a Chemical shifts are given at 300 K; from the spectra recorded at 330 K, no dramatic temperature dependency of the chemical shift of any structural reporter groups has been observed, in contrast to [16]

^b For coding of monosaccharide residues and complete structures see fig.1-3

^c (●—) Mannose; (○—) N-acetylglucosamine; ^d Measured at 360 MHz; ^e Assignments may be interchanged

superposition of the subspectra of its two anomers containing GlcNAc 2 in the α - and β -pyranose form in a ratio $\alpha:\beta = 2:1$, respectively. The effect of anomerization is recognizable in the structural reporter group signals of the reducing end monosaccharide, as well as in those of the other two residues. Obviously, this effect is more pronounced at 500 MHz than at 360 MHz [12]. The relatively large coupling constant $J_{1,2}$ of the β -linked Man 3 (0.95 Hz) is reflected in the presence of a well-resolved doublet for its H-1 in both α - and β -form of M_2G (cf. [10,13]). The α - and the β -linked mannose residues in M_2G can still be recognized on the basis of their H-1 and H-2 resonance patterns [13].

The tetrasaccharide M_3G (see fig.1) can be conceived as an extension of M_2G with an $\alpha(1\rightarrow2)$ linked mannose residue at the non-reducing end. The 500 MHz 1H NMR spectral parameters of M_3G are summarized in table 1. By selective homonuclear decoupling the relatively sharp lined signals at $\delta = 5.050$ ppm and $\delta = 4.069$ ppm were proved to belong to neighbouring protons; they are assigned to H-1 and H-2 of the $\alpha(1\rightarrow2)$ linked Man C, respectively. The above set of chemical shift values are characteristic for a terminal $\alpha(1\rightarrow2)$ linked mannose residue. Upon attachment

of Man C to Man 4 at C-2, the H-1 and H-2 signals of Man 4 undergo downfield shifts ($\Delta\delta = 0.245$ ppm and 0.034 ppm, respectively) and are slightly broadened.

Extension of M_3G with Man D₁, $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked to Man C, leads to the pentasaccharide M_4G (see fig.1). The relevant parts of the 500 MHz 1H NMR spectrum of M_4G are given in fig.2, and its NMR features in table 1. The chemical shifts (see table 1), coupling constants and linewidths of the H-1 and H-2 signals of the terminal Man D₁ closely resemble those of Man C in M_3G .

The doublet at $\delta = 5.296$ ppm is ascribed to H-1 of Man C. Again $\alpha(1\rightarrow2)$ substitution of a mannose residue (C) by another mannose (D₁), leads to a shift increment of the H-1 of the substituted residue: $\Delta\delta = 0.246$ ppm, that is comparable with the effect on $\delta H-1$ of Man 4 due to attachment of Man C to Man 4 (vide supra). Analogously, H-2 of Man C undergoes a shift increment ($\Delta\delta = 0.035$ ppm), going from M_3G to M_4G (cf. $\Delta\delta$ for H-2 of Man 4 in the step from M_2G to M_3G). Attachment of the $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked Man D₁ influences also the chemical shifts of H-1 and H-2 of the remote residue Man 4 ($\Delta\delta = -0.013$ ppm and -0.020 ppm, respectively).

The assignment of all α -mannose H-2 signals was

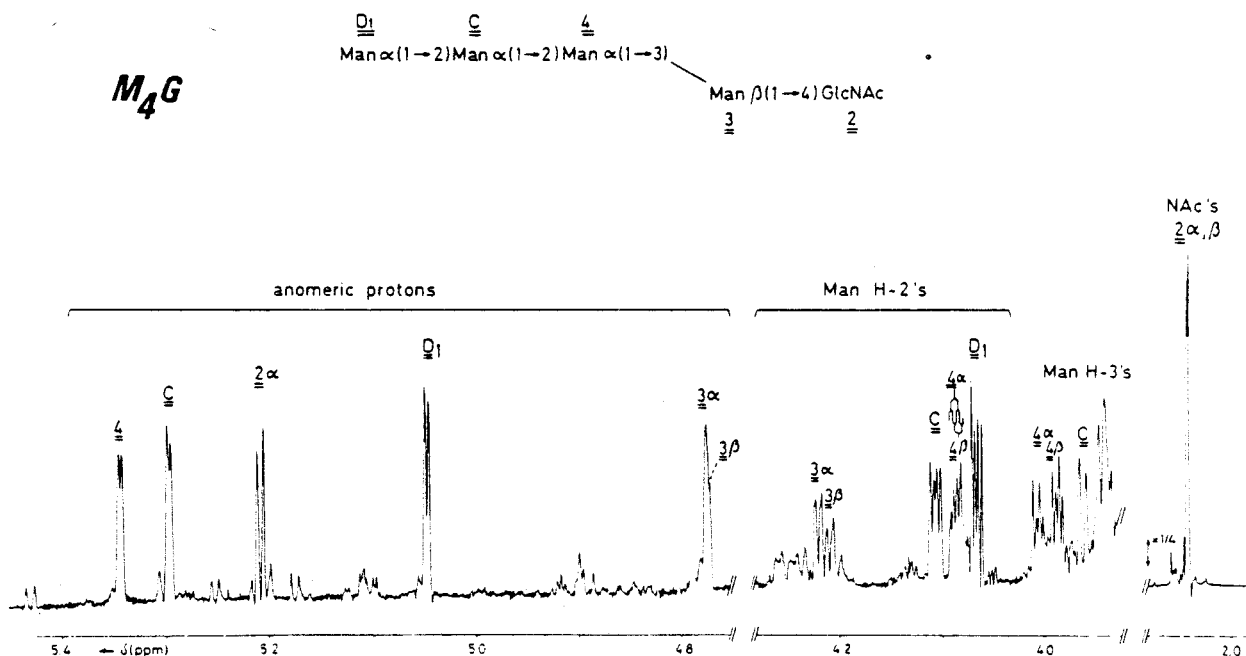
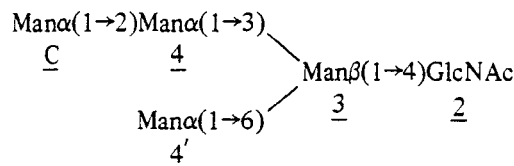


Fig.2. Structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz 1H NMR spectrum of oligosaccharide M_4G in D_2O at 300 K. The numbers and letters in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure.

proved by selective irradiations of the α -mannose H-1 resonances. From the spectrum of M_4G (fig.2) it is clear that the linewidths of the α -linked mannoses H-1 doublets decrease going from the internal Man 4 via Man C to the terminal Man D₁. Doubling of signals due to anomerization of M_4G manifests itself only in the signals of GlcNAc 2 and Man 3. The more remote the residue is from the reducing end, the less the effect of the anomeric configuration of GlcNAc 2.

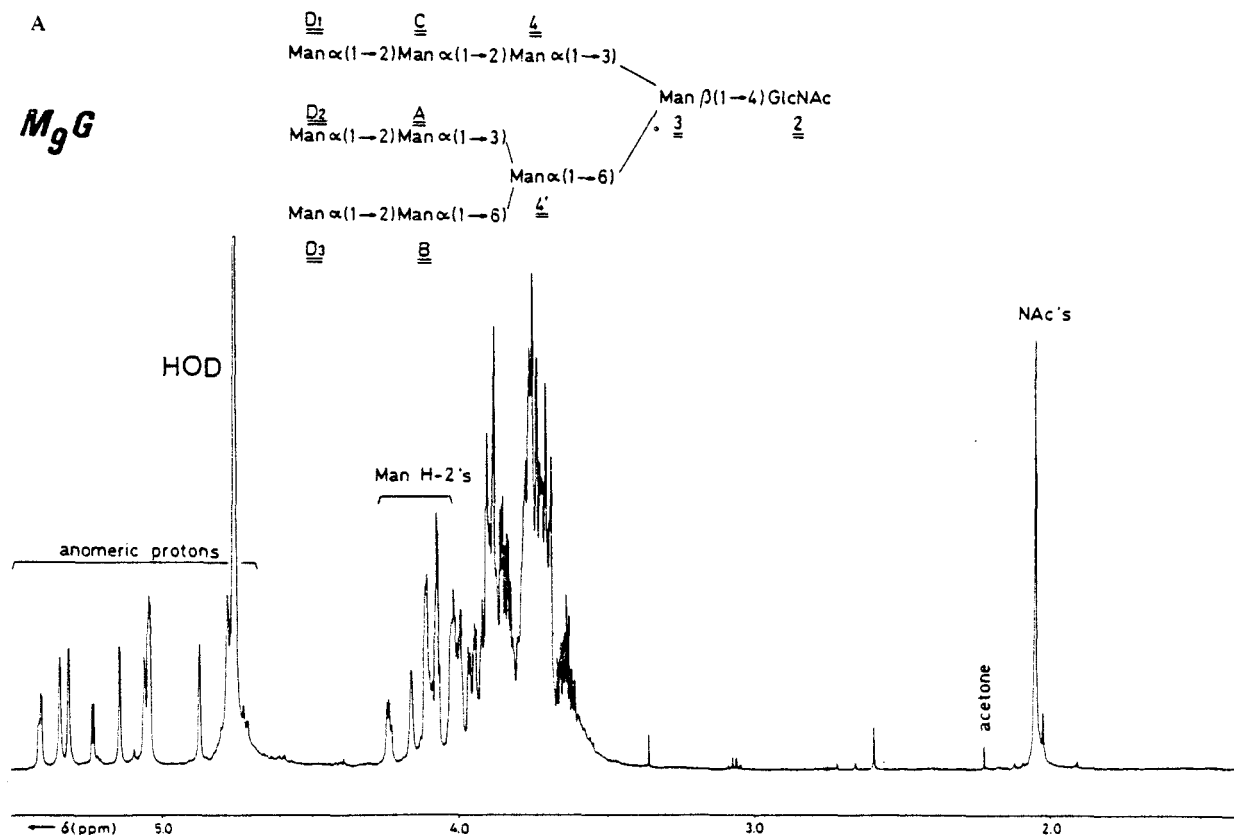
The structure of another pentasaccharide containing 4 mannoses, M_4G^* , could be elucidated with 360 MHz 1H NMR spectroscopy. The spectral parameters of M_4G^* are listed in table 1. Based on the presence of signals at $\delta = 4.716$ ppm (H-1 of 2 β), $\delta = 2.044$ ppm (*N*-acetyl- CH_3 of 2), $\delta = 4.776$ ppm (H-1 of 3) and $\delta \approx 4.23$ ppm (H-2 of 3), M_4G^* contains the Man β -(1 \rightarrow 4)GlcNAc moiety. The identity of the chemical shift values for H-2 of Man 4 in M_3G and M_4G^* ($\delta = 4.109$ ppm) implicates that Man 4 in M_4G^* bears a terminal α (1 \rightarrow 2)-linked Man C ($\delta H-1 = 5.056$ ppm, $\delta H-2 = 4.068$ ppm). The occurrence of an H-1 doublet at $\delta = 4.899$ ppm indicates that the fourth mannose is α (1 \rightarrow 6)-linked [10]. The signal of H-2 of this residue

is hidden in the bulk of the skeleton protons ($3.5 < \delta < 4.0$ ppm), which points to the terminal position of this α (1 \rightarrow 6)-linked mannose. The occurrence of two terminal residues in M_4G^* identifies this α (1 \rightarrow 6)-linked mannose as Man 4'. This is further evidenced by earlier 360 MHz 1H NMR observations on oligosaccharides containing a terminal Man 4' [14,15]. Therefore, the structure of M_4G^* turns out to be:



The disubstitution of Man 3 is reflected in the small change of the resonance position of its H-2 as compared to M_2G , M_3G and M_4G . The chemical shift of H-1 of GlcNAc 2 in the α -anomer of M_4G^* is significantly different from that of this proton in M_2G , M_3G and M_4G .

The occurrence of oligosaccharide M_4G^* in mannosidosis urine might have been traced before (e.g.



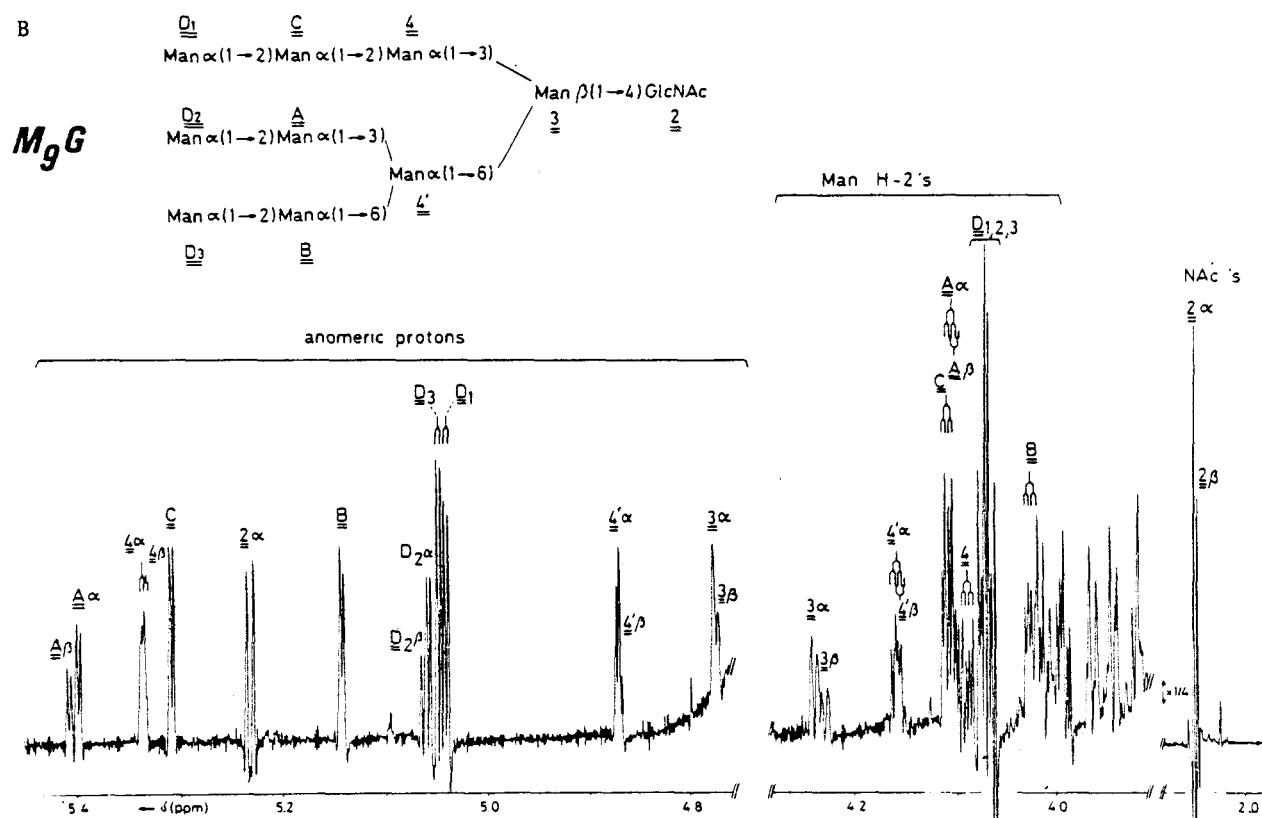


Fig.3 (A) Overall 500 MHz ¹H NMR spectrum of oligosaccharide M₉G in D₂O at 300 K, together with its structure. (B) Structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz ¹H NMR spectrum of oligosaccharide M₉G in D₂O at 300 K. The numbers and letters in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure.

[4]), but was not described for the urine investigated in [7].

The 500 MHz ¹H NMR spectrum of the largest mannose-containing oligosaccharide isolated from this mannosidosis urine, M₉G, is depicted in fig.3A. The expanded structural reporter group regions are shown in fig.3B and the NMR spectral features of M₉G are included in table 1. Integration of the anomeric region of the spectrum is consistent with the occurrence of 9 mannose residues and one N-acetyl-glucosamine. GlcNAc 2 is the reducing end sugar as is evident from its δH-1 values in the α- and β-anomer of M₉G (|Δδ_{α-β}| > 0.5 ppm). Man 3 is β(1→4)-linked to GlcNAc 2 (δH-1 ≈ 4.77 ppm). Based upon the presence of 3 anomeric proton signals at δ ≈ 5.05 ppm it can be concluded that M₉G contains 3 terminal α(1→2)-linked mannose residues, pointing to 3 branches in the structure.

Analogously to the data of M₄G (see table 1), the H-1 signals at δ = 5.337 ppm, δ = 5.308 ppm and

δ = 5.048 ppm are ascribed to the upper branch mannose residues 4, C and D₁, respectively. The H-2 resonances of these mannoses are found at δ = 4.089 ppm, δ = 4.109 ppm and δ ≈ 4.07 ppm, respectively.

The disubstitution of Man 3 by an α(1→3)- and an α(1→6)-linked mannose is evident from the chemical shifts of its H-2 resonances (δ = 4.239 ppm (α-) and δ = 4.229 ppm (β-anomer of M₉G)) (cf. M₄G*). The H-1 signals of Man 4' are observed at δ ≈ 4.87 ppm. This assignment is in accordance with that for 2 glyco-asparagines of the oligomannoside type isolated from urine of a patient with Gaucher's disease (M₄GP and M₅GP, [10]). The H-2 signals of Man 4' were identified by selective irradiation of the signals at δ ≈ 4.87 ppm; they are found at δ ≈ 4.16 ppm. The doubling of both the H-1 and H-2 resonances of Man 4' with relative intensities in the anomeric ratio is more pronounced than for the corresponding signals of the α(1→3)-linked Man 4.

As derived [10], α(1→3) substitution of Man 4' by

Man A influences mainly the δ -value of H-2 of Man 4' ($\Delta\delta \approx 0.18$ ppm); $\alpha(1\rightarrow6)$ substitution of Man 4' by Man B has a typical effect on the H-1 chemical shift of Man 4' ($\Delta\delta \approx -0.03$ ppm). The effect upon δ H-1 of Man 4' due to attachment of Man A, is negligibly small; the same holds for the influence of Man B on δ H-2 of Man 4', both compared to the above-mentioned $|\Delta\delta|$ -values. Therefore, from the chemical shift values of H-1 and H-2 of Man 4' in M_9G , it is evident that this residue is substituted at C-3 and C-6 by Man A and Man B, respectively. Owing to the presence of the latter two residues, H-1 of GlcNAc 2 (α) undergoes a small upfield shift ($\Delta\delta \approx -0.02$ ppm) (cf. [10]), as compared to M_4G^* .

As discussed before, all chains are terminated with an $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked mannose residue. Combination with the occurrence of 9 mannose residues in compound M_9G leads to the conclusion that Man A and Man B bear directly a terminal $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked mannose. This deduction affords already the primary structure of M_9G , given in fig.3.

The NMR parameters of Man A and B are in accordance with this interpretation. The H-1 doublet at $\delta = 5.142$ ppm and the H-2 signal at $\delta = 4.025$ ppm are assigned to Man B. Compared to the chemical shift values of the structural reporter groups of a terminal Man B (δ H-1 = 4.908 ppm, δ H-2 = 3.985 ppm, M_5GP [10]), both H-1 and H-2 are shifted downfield ($\Delta\delta$ H-1 = 0.234 ppm; $\Delta\delta$ H-2 = 0.040 ppm). These shift increments are indicative of an $\alpha(1\rightarrow2)$ substitution of Man B by Man D₃ (vide supra).

Based on the same reasoning, Man A must be substituted by Man D₂ at C-2. Its H-1 and H-2 signals are observed at $\delta \approx 5.40$ ppm and $\delta \approx 4.105$ ppm, respectively. The corresponding values for a terminal Man A are: δ H-1 = 5.093 ppm and δ H-2 = 4.066 ppm (M_5GP , [10]). The shift increment, observed for H-1 of Man A in the step from M_5GP to M_9G is 0.05 ppm larger than that described above as typical for attachment of an $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked mannose.

The doubling of the structural reporter group signals of Man A in the spectrum of M_9G due to anomerization is clearly observable; $|\Delta\delta_{\alpha-\beta}|$ for its H-1 is even larger than that for the corresponding proton of Man 4'. Apparently, anomerization effects upon the H-1 and H-2 signals of Man B are absent. In view of these observations the single H-1 doublet at $\delta = 5.040$ ppm is ascribed to Man D₃, whereas the set of doublets at $\delta = 5.058$ ppm and $\delta = 5.063$ ppm (relative intensity 2:1) are attributed to H-1 of Man D₂ in α - and

β -anomer of M_9G , respectively. The H-2 signals of Man D₂ and Man D₃ are found at $\delta \approx 4.07$ ppm. A tentative assignment is given in table 1.

Comparison of the NMR parameters of the 3 branches of M_9G reveals that the anomeric configuration of GlcNAc 2 exerts its influence far more pronounced on the A-D₂ branch than on the other two, suggesting that this branch occurs in the sphere of influence of the anomeric center of GlcNAc 2, in contrast to the other two. An argument in favour of this proposal is the unexpectedly large downfield shift of H-1 of Man A due to attachment of Man D₂.

The structure of M_9G given in fig.3 is in accordance with that elucidated along chemical routes [7]. It fits the scheme of the biosynthetic pathway for *N*-glycosidically linked carbohydrate chains of glycoproteins [8,9].

4. Concluding remarks

In this study the NMR parameters of Man₂ · GlcNAc, Man₃ · GlcNAc, Man₄ · GlcNAc and Man₄ · GlcNAc*, isolated from the urine of mannosidosis patients, were established. The NMR characteristics of terminal and non-terminal $\alpha(1\rightarrow2)$ -linked mannose residues, as well as the shift effects induced by such linked residues, are now well-defined. Since also the NMR data of the second branching point were available [10], the primary structure of Man₉ · GlcNAc could completely be derived from the 500 MHz ¹H NMR spectrum.

In principal, the NMR analysis of reducing oligosaccharides seems to be more complex than that of non-reducing compounds (glycopeptides, oligosaccharide-alditols), because they consist of a mixture of compounds. In fact, the anomerization effect on the chemical shifts of structural reporter groups can be used as an additional tool for interpretation.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF, grant UUKC · OC 79-13), the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé no. 217:

Biologie physicochimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contract no. 78.1.0523). J.-C. M. is Attaché de Recherche de l'INSERM; G. S. is Maître de Recherche de CNRS.

References

- [1] Nordén, N. E., Lundblad, A., Svensson, S., Öckerman, P.-A. and Autio, S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6210-6215.
- [2] Nordén, N. E., Lundblad, A., Svensson, S. and Autio, S. (1974) *Biochemistry* 13, 871-874.
- [3] Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. and Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie* 58, 579-586.
- [4] Tsay, G. C., Dawson, G. and Matalon, R. (1974) *J. Pediat.* 84, 865-868.
- [5] Strecker, G. and Montreuil, J. (1979) *Biochimie* 61, 1199-1246.
- [6] Chester, M. A., Hultberg, B., Nordén, N. E. and Szabó, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 627, 244-249.
- [7] Yamashita, K., Tachibana, Y., Mihara, K., Okada, S., Yabuuchi, H. and Kobata, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5126-5133.
- [8] Turco, S. T., Stetron, B. and Robbins, P. W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4411-4414.
- [9] Tabas, I., Schlesinger, S. and Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 716-722.
- [10] Van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Michalski, J.-C., Montreuil, J., Strecker, G. and Hull, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 121, 121, 65-70.
- [11] Ernst, R. R. (1966) in: *Advances in Magnetic Resonance* (Waugh, J. S. ed) vol. 2, pp. 1-135, Academic Press, London, New York.
- [12] Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. and Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* 77, 15-22.
- [13] Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Schmid, K., Montreuil, J., Fournet, B. and Hull, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 114, 11-16.
- [14] Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Strecker, G., Michalski, J.-C., Fournet, B., Spik, G. and Montreuil, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 323-329.
- [15] Herlant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G. A. and Vliegthart, J. F. G. (1980) *Eur. J. Biochem.* in press.
- [16] Grey, A. A., Atkinson, P. H., Ceccarini, C. and Carver, J. P. (1979) *abst. Ann. Meet. Soc. Complex Carbohydrates*, 15, Toronto, Canada.

Heterogeneity of Urinary Oligosaccharides from Mannosidosis: Mass Spectrometric Analysis of Permethylated Man₉, Man₈, and Man₇ Derivatives

HEINZ EGGE,*¹ JEAN CLAUDE MICHALSKI,† AND GERARD STRECKER†

* *Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn, Nussallee 11, 5300 Bonn, German Federal Republic*, and † *Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve D'Ascq, France*

Received June 15, 1981, and in revised form July 20, 1981

Three oligosaccharides isolated from the urine of a patient suffering from mannosidosis, a Man₉GlcNAc, a Man₈GlcNAc, and a Man₇GlcNAc, were analyzed by electron impact mass spectrometry at 20 eV after reduction with NaB²H₄ and permethylation. Molecular ions were observed at *m/e* 2144, 1940, and 1736, respectively. In the high-mass range very intense ions were found at M-45. The mass spectrum of the homogenous deca-saccharide Man₉GlcNAc_{1D} contains ions that could be attributed to specific parts of each of the three antennae of the molecule. Thus characteristic key ions were recognized. With the aid of these key ions the spectra of the nona- and octasaccharide mixtures could be evaluated in a qualitative and a semiquantitative way. In the nonasaccharide all three possible isomers that can be produced by cleavage of one of the three terminal α -mannoses are present, although in differing amounts. However, only five of the six possible isomers of the octasaccharide could be detected.

The urine of patients suffering from glycoproteinoses or glycosphingolipidoses contains a great number of oligosaccharides that are specific for the type of the disease (1). In these cases the number and quantity of the excreted oligosaccharides is significantly increased as compared to normal (2). Mannosidosis first described by Öckerman (3) is characterized biochemically by the accumulation of mannose-containing oligosaccharides in the tissues of patients and by the excretion in the urine (3-5). All patients so far described exhibited a deficiency in α -mannosidase (1, 4-7). The disease is considered to be a lysosomal storage disease. The structure of the major oligosaccharides excreted in the urine have first been characterized by Öckerman (3) and Nordén *et al.* (4, 5). Van Halbeek *et al.* (8) reinvestigated and confirmed the structures of the Man₂-GlcNAc,² Man₃-GlcNAc, Man₉GlcNAc, and

two Man₄GlcNAc by 500 MHz ¹H-NMR measurements. Mannose-containing oligosaccharides have also been isolated from brain and urine of Angus cattle afflicted by mannosidosis (4, 9, 10). Yamashita *et al.* (11) demonstrated the presence of several isomers in the Man₅-GlcNAc, Man₆-GlcNAc, Man₇GlcNAc, and Man₈GlcNAc fractions isolated from the urine of two mannosidosis patients. On the basis of methylation analysis, acetolysis and periodate oxidation several isomeric structures were proposed together with a semiquantitative estimation of their relative abundance. In this paper we present a method using electron impact mass spectrometry of the reduced and permethylated Man₇GlcNAc to Man₉GlcNAc oligosaccharides which allows a more

² Abbreviations used: E.I., electron impact; GlcNAc_{1D}, *N* [1-³H]N-acetylglucosaminitol; HPTLC, high-performance thin-layer chromatography; MIKES, mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry, MS, mass spectrometry.

¹ Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

MASS SPECTROMETRY OF URINARY OLIGOMANNOSIDES

straightforward qualitative and quantitative analysis of the isomers present.

MATERIALS AND METHODS

The isolation of the oligomannosides from the urine of patients suffering from mannosidosis has been described before (1).

Methylation (12). Two milligrams of homogenous fractions was reduced with NaB^2H_4 prior to permethylation. The permethylation was performed essentially according to Sandford and Cornrad (12). The permethylated oligosaccharides were purified by chromatography on a column of Sephadex LH 20, 1 \times 20 cm, with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1/1, as eluent in order to remove excess of dimethyl sulfoxide and over a small column, 0.5 \times 2 cm, of silica gel 60 (E. Merck,

Darmstadt) with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 75/25/4, as eluent in order to remove colored side products. Thus permethylated oligosaccharides homogenous by criteria of HPTLC were obtained. Thin-layer chromatography was performed using silica gel HPTLC plates (E. Merck) with benzene/EtOH, 8/2, as developing solvent. Bands were visualized by charring with 10% H_2SO_4 at 110–120°C.

Mass spectrometry (13). Samples of 20–100 μg were analyzed by mass spectrometry on a LKB 9000, a Micromass ZAB, and a Kratos 50 S instrument. Because of the lower sensitivity, larger quantities of the samples ($\sim 100 \mu\text{g}$) were used with the LKB 9000. The samples were dissolved in dichloromethane and applied to quartz tubes of the direct inlet system with the aid of a microliter syringe. After evaporation of the dichloromethane the samples were dried in the lock of the direct inlet system. The conditions of the analysis were the following.

| | LKB 9000 | ZAB | 50 S |
|---------------------------|----------|---------|---------|
| Acceleration voltage (kV) | 1.75 | 6 | 3.5; 4 |
| Ionization energy (eV) | 20 | 20 | 20 |
| Probe temperature (°C) | 170–210 | 170–240 | 120–220 |

The samples were heated stepwise by 10°C intervals under continuous monitoring of the total ion current until relevant spectra were obtained. The probe temperature was adjusted such as to maintain constant total ion current during the recording of the spectra. Ion source temperatures were set ca. 100°C above the probe temperatures. The vacuum was $\leq 10^{-7}$ Torr.

RESULTS AND DISCUSSION

The fragmentation behavior of the reduced and permethylated oligomannosides was first studied with the aid of the homogenous $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_{1D}$ (8) identical with the structure proposed for the Man_9 residue present in glycopeptide A from thyroglobuline (14). Its mass spectrum is shown in Fig. 1 and the major pathways of fragmentation are depicted in Scheme 1.

A molecular ion, although of low intensity, is clearly discernible at m/e 2144. The even number in a compound containing one nitrogen is due to the presence of the deuterium at c_1 of the reduced *N*-acetylglucosamine. Very intense ions are produced by the elimination of a terminal CH_2OCH_3 group leading to m/e 2099 or m/e 2098. The high intensity of m/e 2098 clearly indicates that the elimination of

C_1 of the *N*-acetylglucosaminitol is favored. The distribution of the ions centered about m/e 2057 (M-87) and m/e 1970 (M-174) also indicates the preferred loss of C_1 of the *N*-acetylhexosaminitol. Other fragments derived from the molecular ion are produced by the elimination of one, two, or three mannose residues. These fragment ions are accompanied by daughter ions which arise from loss of either CH_3 - or one or two HOCH_3 units leading to m/e 1909, 1894, 1877, 1845; m/e 1705, 1690, 1673, 1641; and m/e 1501, 1486, 1469, 1437, respectively. The mannose residues of the nonreducing end of the molecule are represented by m/e 219, 204, 187, 155, while m/e 277 and m/e 295 are derived from the *N*-acetylglucosaminitol. Although the molecular composition of the ion m/e 295 is still unclear, its attribution to the hexosaminitol residue is corroborated by the fact that after reduction with NaBH_4 m/e 294 is found instead.

Other ions of diagnostic value are formed predominantly by the cleavage of one of the glycosidic bonds by which the mannose side chains are linked to the mannotriose core. Fortunately these elimination pro-

EGGE, MICHALSKI, AND STRECKER

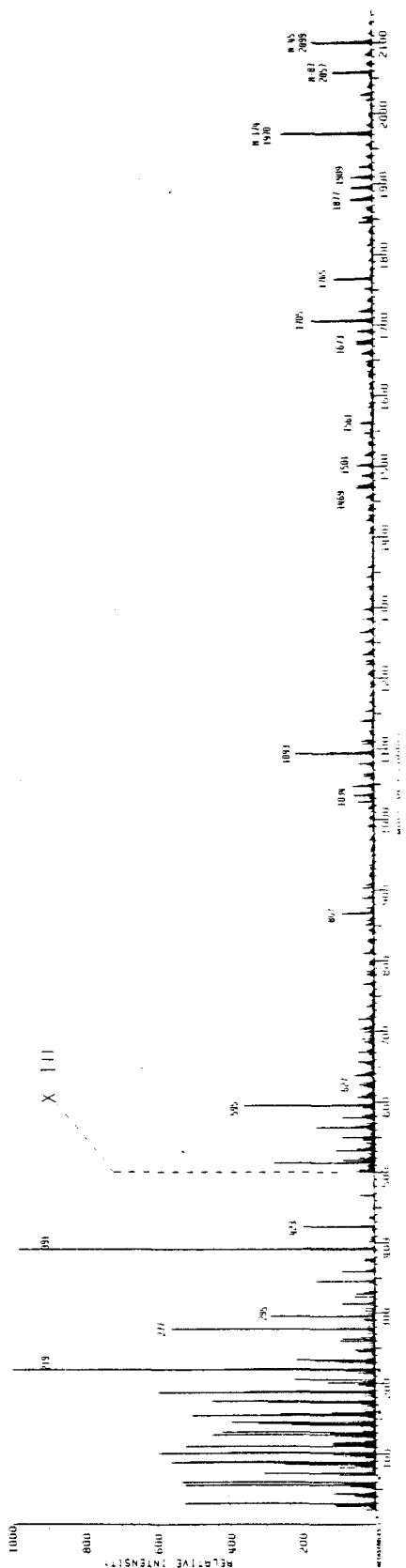


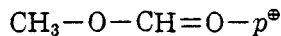
FIG. 1. Mass spectrum of the reduced and permethylated $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_{10}$ deca-saccharide obtained at an ionization energy of 20 eV and a probe temperature of 220°C .

cesses exhibit some peculiarities that can be attributed specifically to one of the three side chains, thus producing a group of key ions that can be used favorably for the structural elucidation of lower homologues.

(1) In contrast to the very intense disaccharide ion m/e 423 and its daughter ion m/e 391, hardly any trisaccharide ion m/e 627 is visible. However an intense daughter ion m/e 595 is present. This ion is attributed to the Man_3 chain-linked $\alpha(1-3)$ to the mannotriose core. This attribution is supported by MIKES measurements showing, that this ion is not derived from m/e 1034.

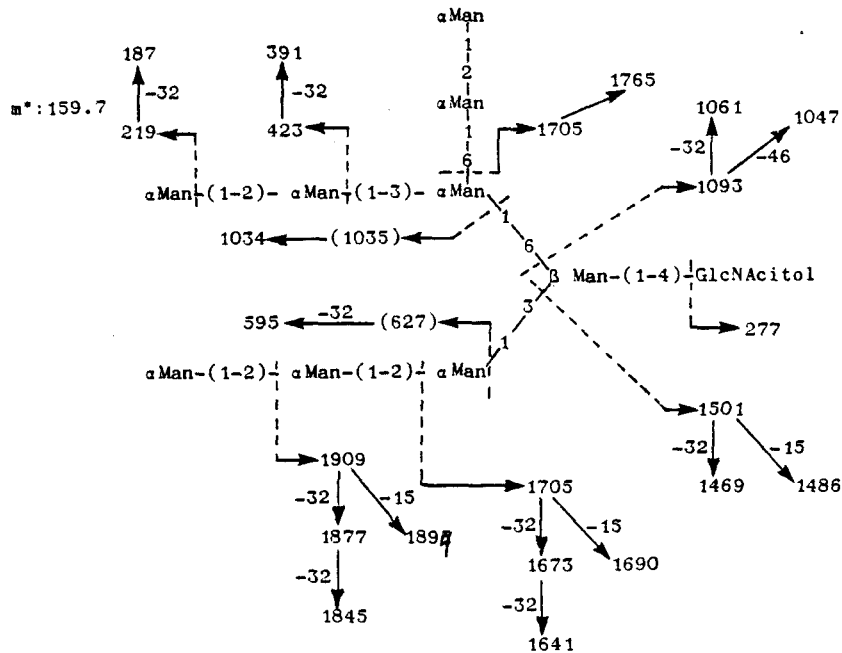
(2) The spectrum does not contain ions attributable to a tetrasaccharide unit. However, instead of an expected pentahexosyl ion at m/e 1035 usually present in linear permethylated oligosaccharides (15) m/e 1034 is observed. This peculiarity is only found so far for the branched Man_5 residue-linked $\alpha(1-6)$ to the central mannose as indicated in Scheme 1. The complementary ion to m/e 1034 is m/e 1093 with daughter ions m/e 1061 and 1047. This latter ion is produced by loss of the deuterated C_1 of the *N*-acetylglucosaminitol.

(3) The ion m/e 1705 is produced by the elimination of two mannose residues from the molecule. This elimination can take place at one of the three antennae of the molecule leading also to the normal set of daughter ions like m/e 1690, 1673, etc. Besides its high intensity, which is extremely remarkable in E.I. mass spectra of permethylated oligosaccharides, m/e 1705 is accompanied by another intense ion at m/e 1765. The formation of a $p+60$ ion always containing the reduced end of the molecule with the general structure



is especially favored in those cases, where p^\oplus arises from the cleavage of a (1-6)-glycosidic bond. Therefore it seems to be appropriate, to assign this ion m/e 1765 preferably to the octasaccharide ion that is formed after elimination of the Man_2 branch-linked $\alpha(1-6)$ as indicated in

MASS SPECTROMETRY OF URINARY OLIGOMANNOSIDES



SCHEME 1. Fragmentation pattern of reduced and permethylated urinary $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$.

Scheme 1. Thus, each of the three antennae is represented by characteristic ions or sets of ions, that can in consequence be used for the evaluation of the mass spectra of the lower homologs of this molecule.

The mass spectrum of the reduced and permethylated $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ (Fig. 2) can be explained with the aid of three possible structures that are shown in Schemes 2a, b, and c. In the high-mass range a molecular ion at m/e 1940 and $M-45$ (m/e 1895) are present together with m/e 1852, 1853. Key ions for the interpretation of the spectrum are m/e 1034 and m/e 830, which show that the bifurcated carbohydrate moiety-linked α -(1-6) to the central mannose may be composed of four or five mannose residues, respectively. The analysis of m/e 830 by MIKES reveals m/e 799 ($p^{\oplus}-31$), m/e 767 ($p^{\oplus}-31-32$), m/e 643 ($p^{\oplus}-187$), m/e 627, m/e 423, and m/e 391 as daughter ions, but no m/e 595. This again proves, that the ion m/e 595 is solely derived from the Man_3 chain-linked α (1-3) to the central mannose. The occurrence of a Man_3 chain in this linkage point is corroborated by the complementary m/e 1093 (Schemes 2a and b). The presence of

ion m/e 889 shows, however, that also a Man_2 chain is present in this type of linkage (Scheme 2c). From the intensity of both ions it can be concluded that two-thirds of the mixture is composed of the two species with Man_3 chain-linked α (1-3) to the central mannose (Schemes 2a and b) in accordance with the findings of Yamashita *et al.* (11).

The ions complementary to m/e 889 and m/e 1093 produced by fission of the α (1-3) bond to the central mannose with retention of the positive charge on the hexosamine bearing moiety furnish m/e 1297 for 2a, 2b and m/e 1501 for 2c. This ion can, however, be formed by still two other types of cleavages as indicated in Schemes 2a and c. In both these types of cleavages m/e 1501 should be accompanied by a $p^{\oplus} + 60$ ion m/e 1561. By comparison of the intensities of m/e 1561 and m/e 1765 and taking into account, that 2c constitutes about one-third of the whole mixture, the contribution of 2a for m/e 1561 should be very low indeed. Thus an intensity ratio of 1:3:2 can be postulated for the structures 2a, 2b, and 2c.

The same type of analysis can be applied

EGGE, MICHALSKI, AND STRECKER

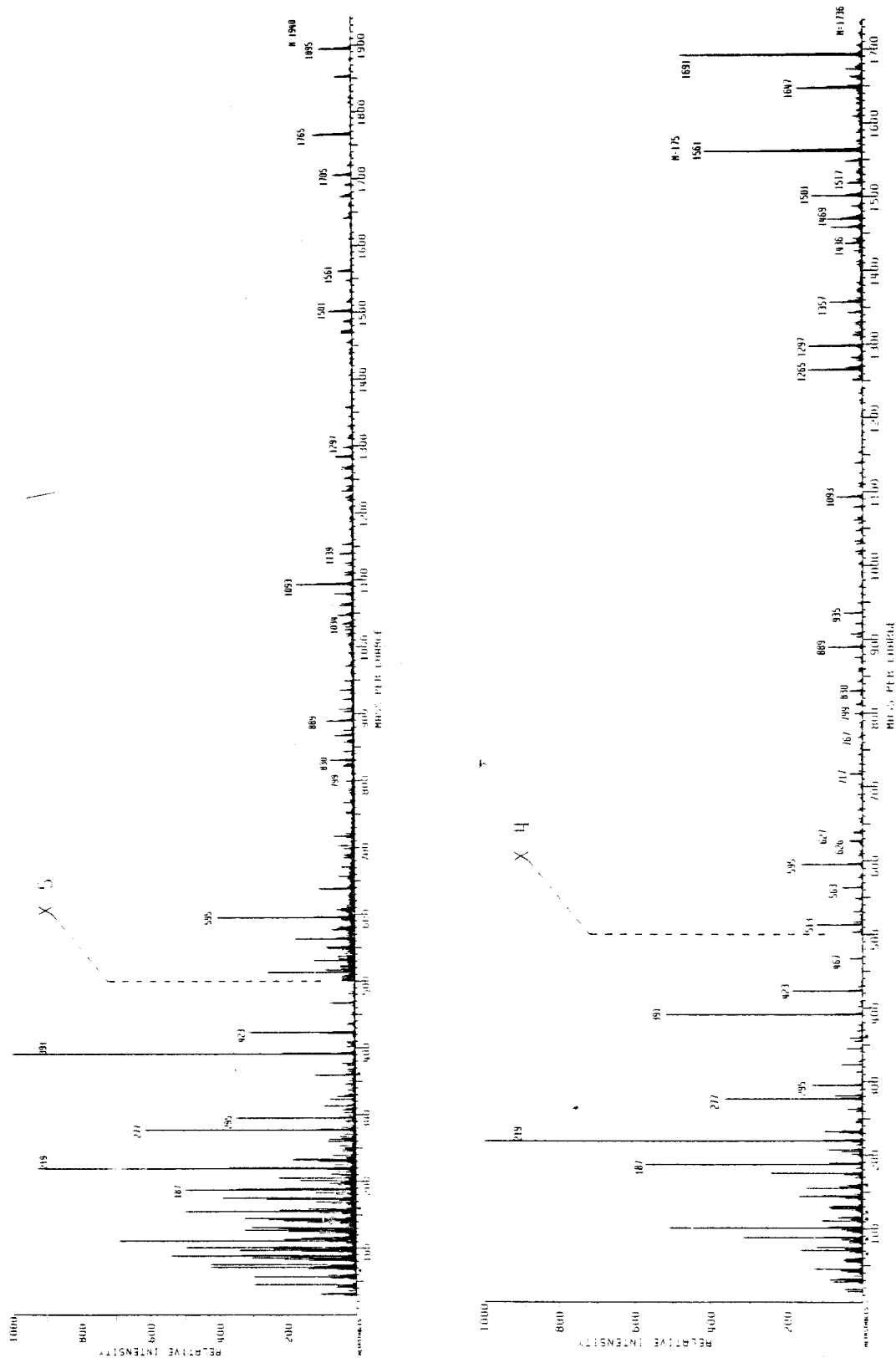
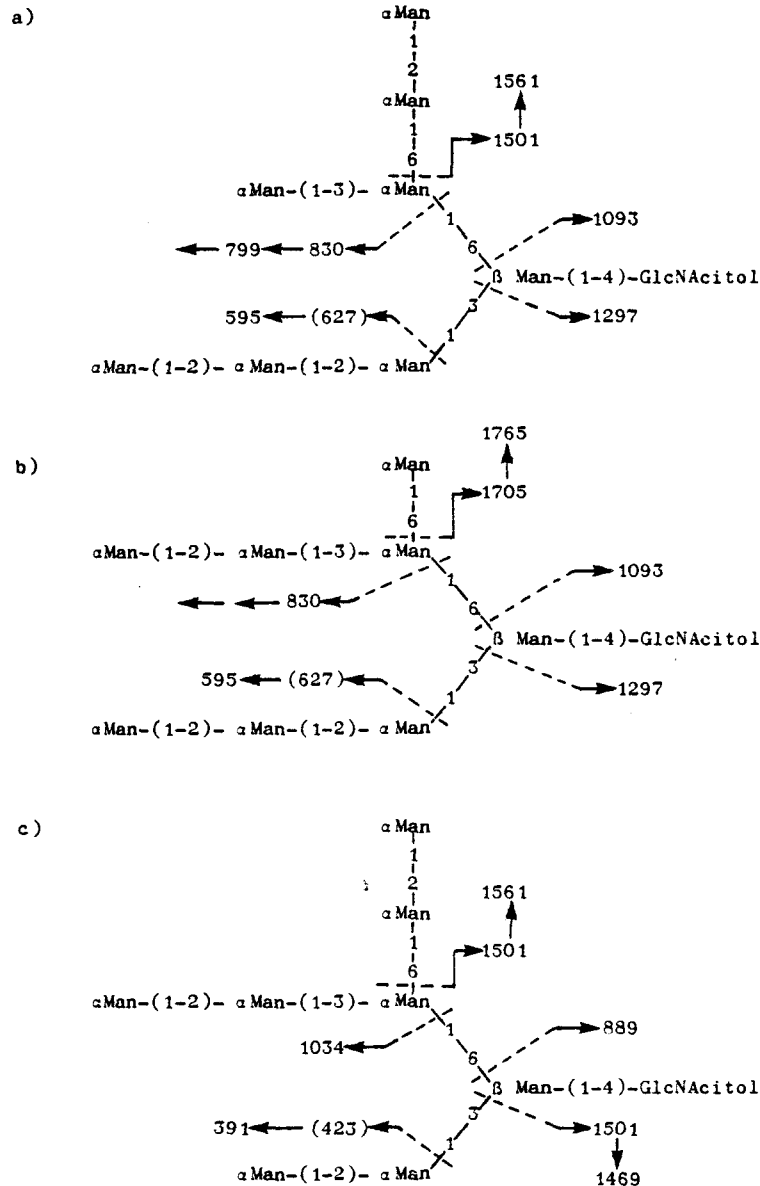


FIG. 3. Mass spectrum of the reduced and permethylated Man₇GlcNAc₆p octasaccharide obtained at an ionization energy of 20 eV and a probe temperature of 190°C.

MASS SPECTROMETRY OF URINARY OLIGOMANNOSIDES

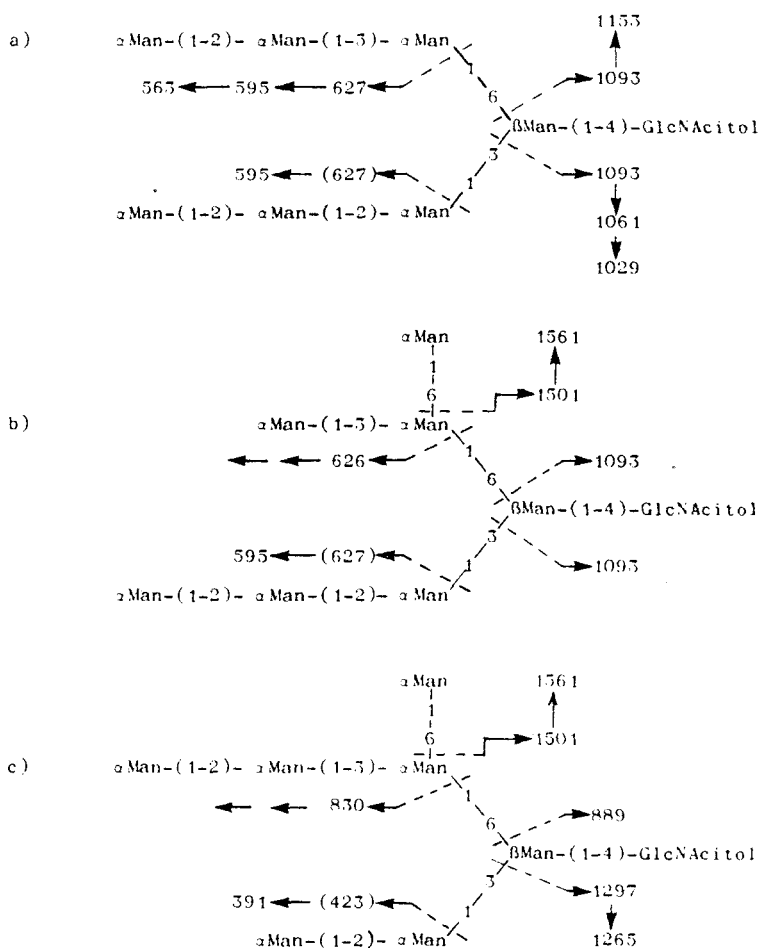


SCHEME 2. Mass spectrometric fragmentation pattern of the mixture of reduced and permethylated $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$. Only the key ions important for the interpretation are shown.

to the mass spectrum of the permethylated and reduced $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (Fig. 3) Theoretically six different structures 3 a-f are possible as exemplified in Scheme 2. The analysis of the mass spectrum of the reduced and permethylated $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fraction shown in Fig. 3 follows the same line of arguments as that of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ derivative. Assuming that the $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fraction is derived from

the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ molecule or its protein-linked precursors by partial degradation, theoretically six different structures can be expected. These are depicted in Schemes 3a-f together with their respective key ions. Because of the complexity of this mixture, a qualitative and quantitative evaluation is rather difficult especially without the knowledge of the individual mass spectra. The fragments derived from

EGGE, MICHALSKI, AND STRECKER



SCHEME 3. Possible structures $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ isomers together with their expected key ions.

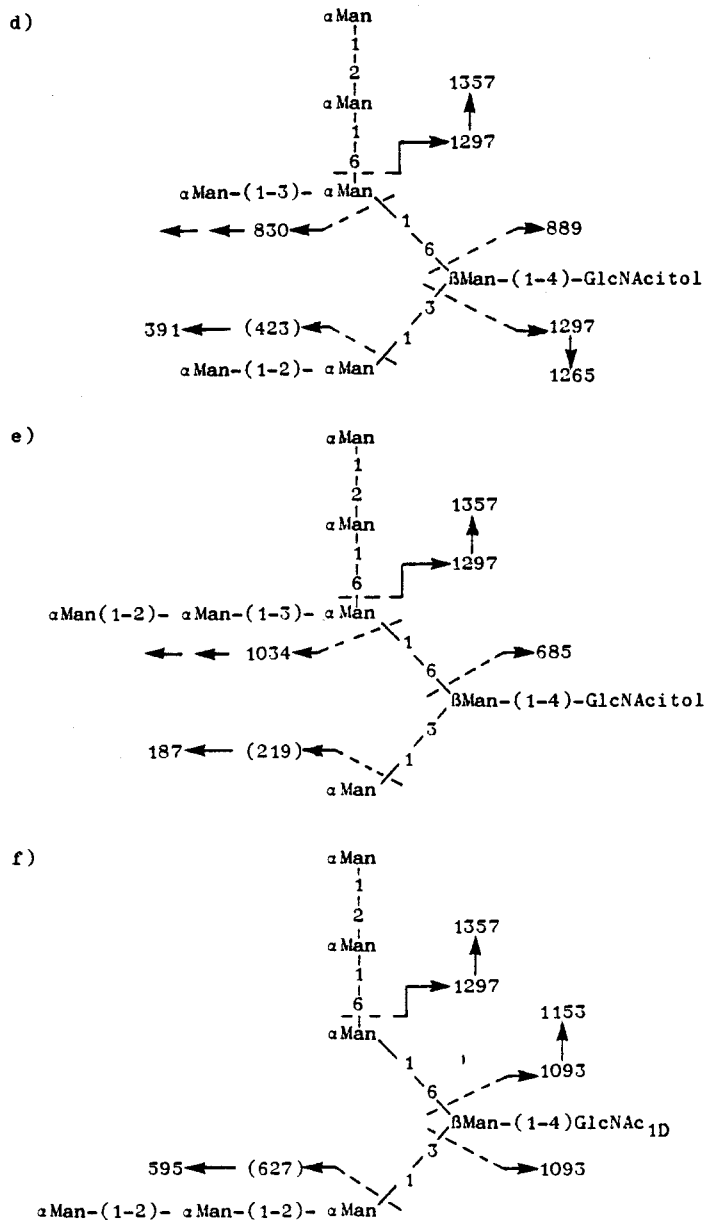
the molecular ion m/e 1736 are M-45, m/e 1691 and M-89, m/e 1647.

For the oligomannose branch-linked $\alpha(1-6)$ to the central $\beta\text{-Man}$, only two ions at m/e 626 and m/e 830 are present. The ion m/e 1034 (Scheme 3c) is present only as an isotope peak and the complementary ion m/e 685 is also of negligible intensity. Thus the occurrence of structure 3e can be ruled out with great certainty.

A Man_3 moiety-linked $\alpha(1-3)$ to the central $\beta\text{-mannose}$ is represented by m/e 595 as in the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ derivative (3a, 3b, 3f) with m/e 1093 as complementary ion. For the Man_3 moiety-linked $\alpha(1-6)$ to the $\beta\text{-mannose}$ three sets of ions indicate the presence of the structures 3a, 3b, and 3f. These ions are m/e 627 and m/e 1153 (3a),

m/e 626 and m/e 1561 (3b), m/e 627 and m/e 1357 (3f). The ion m/e 1561 can be expected only for the structures 3b and 3c. Its extremely high intensity allows the conclusion, that these two structures represent the main components of the $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fraction. The ion m/e 1357 attributable to the structures 3d and 3f has only one-fourth of the intensity of m/e 1561. Therefore, these structures seem to be present only in minor amounts. The quantitative evaluation of this $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fraction is essentially in accordance with the findings of Yamashita *et al.* (11) as far as components 3b, 3c, and 3d are concerned. At present it cannot be decided whether the differences concerning the occurrence of structures 3a and 3f

MASS SPECTROMETRY OF URINARY OLIGOMANNOSIDES



SCHEME 3—Continued

are due to differences of the material analyzed or to the methods used for analysis.

It is a widely accepted principle that the nature of a metabolic defect is reflected in the structures of the substances that are excreted in the urine. In view of the numerous structures found in the urine of cases of mannosidosis, however, it seems at first sight to be a difficult task to cor-

relate these with a single enzymatic defect. The presence of a terminal β Man (1-4)-GlcNAc in all structures isolated so far by the groups dealing with this disease makes it rather plausible that the oligosaccharides are released by the action of an endoglucosaminidase. Several hypothesis have been put forward for the explanation of the genetic defect (1, 5, 11) but

EGGE, MICHALSKI, AND STRECKER

none of them is completely satisfactory. Theoretically, two different types of compounds can serve as precursors for the oligomannosides found: either they are derived predominantly from the degradation of asparagine-linked oligosaccharides of the "high mannose type," or they are due to a defect in the processing pathway, recently reviewed by Schachter (16), that leads to the biosynthesis of the complex type of glycoproteins. Every plausible hypothesis, however, has to cover the fact that the core tetrasaccharide Man α (1-3) [Man α (1-6)] Man β (1-4)-GlcNAc, present in all asparagine-linked carbohydrate side chains of glycoproteins does not occur in the urine. This finding cannot be reconciled with the "high mannose theory" without introduction of additional assumptions. Carroll *et al.* (17) demonstrated the presence of three α -mannosidases in normal human liver. Two of them with a pH optimum of 4.4 were missing in two cases of mannosidosis. Hultberg *et al.* (18) could not find any significant differences in the activity of the three purified mannosidases toward different substrates. A mannosidase specific for α (1-2)-linked mannose was found in rat liver Golgi (19). These findings do not explain, why in the more complex structures terminal α (1-6)-linked mannose residues occur whereas the tetrasaccharide with one terminal Man α (1-6) is completely absent. Further work will be necessary to clarify this point. A solution to the unsolved question could be hidden in the action of the GlcNAc transferase II described recently by the group of H. Schachter (20). It can be expected that a lack or reduced activity of this enzyme, that transfers one GlcNAc to the Man α (1-6) branch of the mannotriose core will lead to severe disturbance of the metabolic pathways leading from the high-mannose precursors of the rough endoplasmic reticulum to the complex type glycoproteins secreted by the Golgi.

ACKNOWLEDGMENTS

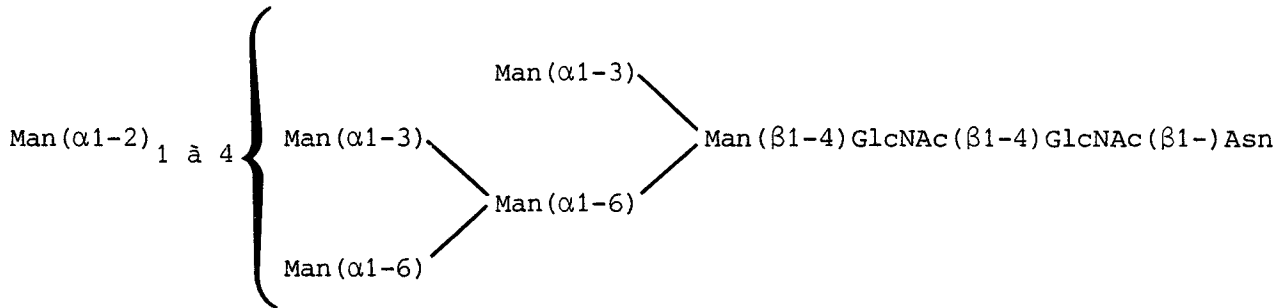
The authors are indebted to Dr. G. Eckhardt, Institut für Organische Chemie and Biochemie, Bonn, and to V. Parr, Vacuum Generators LTD, for MS measurements.

REFERENCES

1. STRECKER, G., AND MONTREUIL, J. (1979) *Biochimie* 61, 1199-1246.
2. LUNDBLAD, A. (1977) in *The Glycoconjugates* (Horowitz, M. I., and Pigman, W., eds.), pp. 441-454, Academic Press, New York.
3. ÖCKERMAN, P. A. (1967) *Lancet* 2, 239-241.
4. NORDÉN, N. E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., ÖCKERMAN, P. A., AND AUTIO, S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6210-6215.
5. CHESTER, M. A., HULTBERG, B., NORDÉN, N. E., AND SZABO, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 627, 244-249.
6. VAN HOOF, F., AND HERS, H. G. (1968) *Eur. J. Biochem.* 7, 34-44.
7. KISTLER, J. P., LOTT, I. T., KOLODNY, E. H., FRIEDMAN, R. B., NERSASIAN, R., SCHNUR, J., MIHM, M. C., DVORAK, A. M., AND DICKERSIN, R. (1977) *Arch. Neurol.* 34, 45-51.
8. VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VELDINK, G. A., Vliegenthart, J. F. G., STRECKER, G., MICHALSKI, J.-C., MONTREUIL, J., AND HULL, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 121, 71-77.
9. HOCKING, J. D., JOLLY, R. D., AND BATT, R. D. (1972) *Biochemistry* 128, 69-78.
10. LUNDBLAD, A., NILSON, N. F., NORDÉN, N. E., SVENSSON, S., ÖCKERMAN, P. A., AND JOLLY, R. D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 601-605.
11. YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., MIHARA, K., OKADA, S., YABUNCHI, H., AND KOBATA, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5126-5133.
12. SANDFORD, P. A., AND CORNRAD, H. E. (1966) *Biochemistry* 5, 1508-1511.
13. EGGE, H., AND HANFLAND, P. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 396-404.
14. ITO, S., YAMASHITA, K., SPIRO, R. G., AND KOBATA, (1977) *J. Biochem. Tokyo* 81, 1621-1631.
15. EGGE, H., HANFLAND, P., PFLÜGER, M., AND SEGGER, H. (1977) in *Mass Spectrometry and Combined Techniques in Medicine, Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* (Eggstein, M., and Liebich, H. M., eds.) pp. 203-219, Tübingen.
16. SCHACHTER, H. (1981) in *Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases* pp. 73-93, (Callahan, J. W., and Lowden, J. A., eds.), Raven Press, New York.
17. CARROLL, M., DANCE, N., MASSON, P., ROBINSON, D., AND WINCHESTER, B. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 579-583.
18. HULTBERG, B., LUNDBLAD, A., MASSON, P. K., AND ÖCKERMAN, P. A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 410, 156-163.
19. TABAS I., AND KORNFIELD, S. (1979) *Fed. Proc.* 38, 291.
20. NARASIMHAN, S., STANLEY, P., AND SCHACHTER, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3920-3933.

IV - DISCUSSION

L'ensemble des données de la RMN et de l'analyse en masse spectrométrie a permis de vérifier que les oligosaccharides supérieurs de l'urine de mannosidose répondaient au schéma de structure généralement admis pour les glycoprotéines de type polymannosidique :



L'oligosaccharide supérieur est représenté par une structure unique "limite" à neuf mannoses, la spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité en ce qui concerne les autres oligosaccharides. Cette hétérogénéité a d'ailleurs été confirmée par YAMASHITA et al. 1980b(549) et MATSUURA et al. 1981b(550), qui ont porté à 17 le nombre d'oligosaccharides différents dans l'urine (Figure 32).

Seule une origine biosynthétique peut expliquer la grande hétérogénéité structurale observée, les oligosaccharides urinaires correspondent aux différentes étapes dégradatives des précurseurs polymannosylés schématisées sur la figure 33.

Puisque il a été démontré que le déficit enzymatique ne touchait que les seules α -mannosidases acides lysosomales, il faut donc imaginer une perturbation des voies dégradatives régulatrices de la biosynthèse (qui ne se font qu'au niveau du réticulum endoplasmique et du Golgi) par l'accumulation intracellulaire de composés riches en mannose. La nature des oligosaccharides trouvés soulève par ailleurs d'autres problèmes concernant le catabolisme des glycanes de type polymannosidique. En effet, l'oligosaccharide majeur attendu en cas de déficit en α -mannosidase, aurait dû logiquement être un tétrasaccharide possédant le noyau trimannosidique commun à toutes les N-glycosylprotéines. Or ce tétrasaccharide est pratiquement inexistant dans l'urine. Plus de

| Saccharide | Structure | Saccharide | Structure |
|-------------------------------|--|----------------|--|
| Trisaccharide ^{a)} | | Octasaccharide | |
| A | Man α 1-3 Man β 1-4 GlcNAc | F ₁ | Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc |
| Tetrasaccharide ^{a)} | | Nonasaccharide | |
| B ₁ | Man α 1-2 Man α 1-3 Man β 1-4 GlcNAc | G ₁ | Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc |
| B ₂ | Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-3 | G ₂ | Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man α 1-2 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc |
| Pentasaccharide ^{a)} | | Decasaccharide | |
| C ₁ | Man α 1-2 Man α 1-2 Man α 1-3 Man β 1-4 GlcNAc | H ₁ | Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc |
| C ₂ | Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-3 | | |
| Hexasaccharide ^{a)} | | | |
| D ₁ | Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-3 | | |
| D ₂ | Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-2 Man α 1-3 | | |
| Heptasaccharide ^{a)} | | | |
| E ₁ | Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-3 | | |
| E ₂ | Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-2 Man α 1-3 | | |
| E ₃ | Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc Man α 1-2 Man α 1-3 | | |

FIGURE 32

STRUCTURE DES DIFFERENTS OLIGOSACCHARIDES CARACTERISES DANS L'URINE DE MANNOSIDOSE d'après MATSUURA *et al.* 1981b (550)

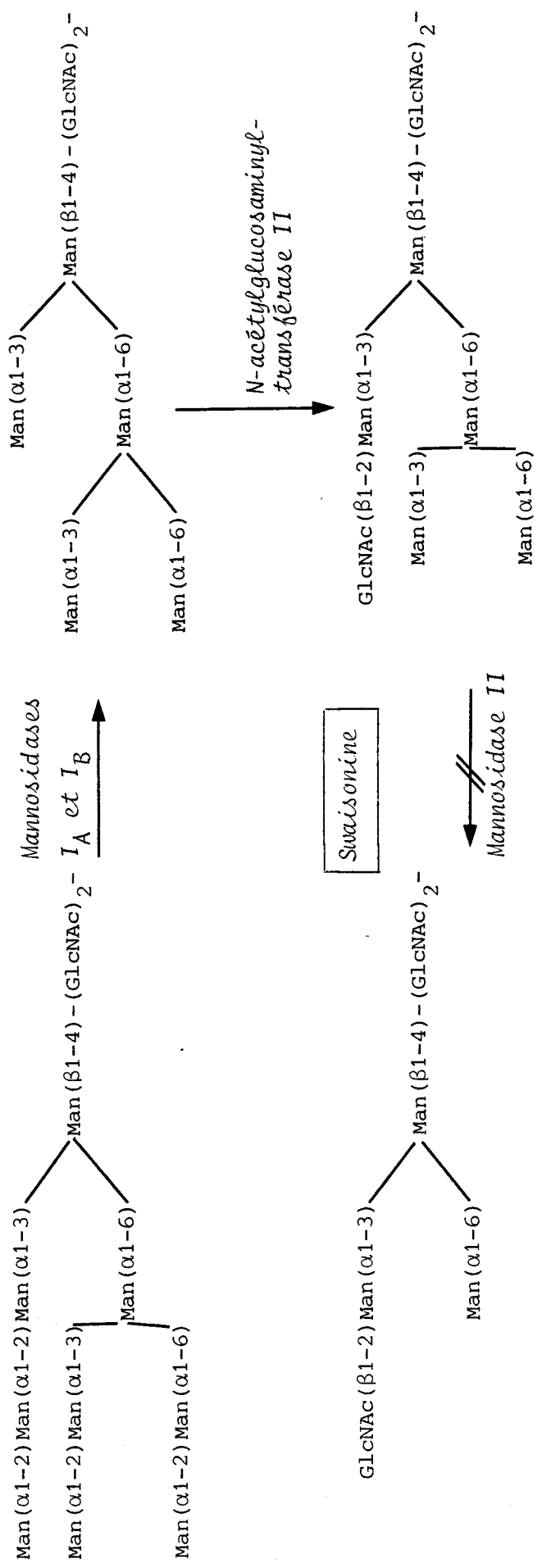
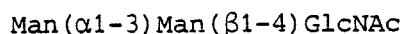


FIGURE 33

ROLE DES MANNOSIDASES AU COURS DE LA "MATURATION" DES CHAINES GLYCANNIQUES DES N-GLYCOSYLPROTEINES d'après SCHACHTER et al. 1982 (551)

2/3 en poids des oligosaccharides excrétés sont représentés par le trisaccharide :



et par des structures en dérivant par addition de résidus de mannose en $\alpha 1-2$.

Il est à noter que les isomères correspondants, possédant un résidu de mannose en $\alpha 1-6$ sont totalement inexistantes. Puisque de tels composés linéaires n'ont jamais été caractérisés en tant que chaînes glycaniques de glycoprotéines, leur existence pourrait s'expliquer soit par l'action d'une mannosidase $\alpha 1-6$ résiduelle comme il l'a été proposé par STRECKER et al. 1976b(552), soit par l'existence d'endo-mannosidases spécifiques des liaisons $\alpha 1-6$ agissant sur les structures polymannosidiques (YAMASHITA et al. 1980b(553)). Comme dans beaucoup d'autres maladies lysosomales, les oligosaccharides excrétés ne possèdent qu'une seule N-acétylglucosamine terminale, suggérant l'action d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase sur les structures polymannosidiques, et pouvant d'ailleurs jouer un rôle régulateur dans la biosynthèse des N-glycosylprotéines (MONTREUIL 1981 (554)). Il est à noter que des formes de mannosidoses animales ont été décrites chez le boeuf (JOLLY 1971 (555)) et chez le chat (BURDITT et al. 1980 (556)). Dans ce cas, les oligosaccharides excrétés dans l'urine sont normalement terminés par un chaînon di-N-acétylchitobiose et sont vraisemblablement libérés par action préférentielle de l'aspartamido-hydrolase, ABRAHAM et al. 1983a(557). Ce dernier point sera discuté plus amplement dans les pages de conclusion de ce mémoire.

Parallèlement à la mannosidose bovine génétiquement induite, a récemment été décrite aux Etats Unis et en Australie, une forme de la maladie touchant le cheptel bovin et ovin, après ingestion de plantes telle la swainsona canescens et l'astragale, DORLING et al. 1978 (558) ; JAMES et al. 1981 (559).

Cette phénocopie de la mannosidose serait chimiquement induite par ingestion d'une alcaloïde spécifique des plantes précitées, la swainsonine ou 1,2,8 indolizidinetriol, agissant comme inhibiteur puissant de la mannosidase II golgienne (TULSIANI et al. 1982b (560) ; ABRAHAM et al. 1983b(561)).

L'effet de la swainsonine *in vivo* se manifeste par un arrêt de la maturation des chaînes glycaniques, et par l'apparition de structures glycaniques hybrides, venant s'accumuler au sein du lysosome et créant ainsi les caractères de maladie de surcharge observés chez les animaux (ELBEIN et al. 1981 (562) ; ELBEIN et al. 1983 (563) ; TULSIANI et TOUSTER 1983 (564)). Chez les animaux atteints de "locoïsme", on note l'apparition dans l'urine d'oligosaccharides identiques à ceux rencontrés dans la mannosidose bovine d'origine génétique, avec prédominance toutefois de la structure intermédiaire à 5 mannoses reflet du dysfonctionnement biosynthétique (CENCI DI BELLO et al. 1983 (565) ; SADEH et al. 1983 (566)).

Une réversion des signes chimiques et biochimiques est enregistrée chez les animaux intoxiqués quelques jours après arrêt de la consommation des plantes responsables (DORLING et al. 1983 (567)).

Nous ferons également mention d'un autre type de mannosidose animale qui est la β -mannosidose caprine (JONES et al. 1983 (568)). Cette maladie causée par le déficit d'une β -mannosidase responsable de l'hydrolyse de la liaison Man(β 1-4)GlcNAc (JONES et DAWSON 1981 (569)) se traduit par l'apparition dans les tissus et l'urine du trisaccharide :
Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc (MATSUURA et al. 1981 (570) ; MATSUURA et al. 1983 (571)).

Bien que plusieurs formes de β -mannosidases soient présentes chez l'Homme (DAWSON 1982 (572)), aucune forme humaine de la maladie n'a à ce jour été caractérisée.

ETUDE DES GLYCOASPARAGINES ACIDES DE L'URINE D'ASPARTYLGLYCOSAMINURIE

Les premiers cas d'aspartylglycosaminurie (AGU) furent décrits en Angleterre en 1968 par POLLITT (573) chez une fratrie présentant un sévère retard mental. Des quantités anormales de 2 acétamido-1-(β -L-aspartamido)-1-2 dideoxyglucose (GlcNAc-Asn) furent détectées dans l'urine, associées à un déficit tissulaire en aspartylglucosaminidase (1-aspartamido- β -N-aminohydrolase E.C. 3.5.1). De nouveaux cas furent alors rapidement trouvés en Finlande (AUTIO 1972 (574)), et à l'heure actuelle plus de 138 patients ont été diagnostiqués. Si le déficit génétique reste en majorité géographiquement limité au pays finlandais, il est à noter que d'autres cas ont été récemment décrits en Sicile (GEHLER et al. 1981 (575) ; GATTI et al. 1982 (576)), aux Etats Unis (HREIDARSSON et al. 1983 (577)) et en France (MAROTEAUX, non publié).

I - ÉTUDE CLINIQUE

Les signes cliniques de la maladie, comme pour beaucoup d'autres maladies de surcharge ne sont pas spécifiques. Cliniquement la maladie ressemble à une forme atténuée de mucopolysaccharidose, les signes principaux étant le retard mental, le faciès grossier, les dysmorphies osseuses (anomalies vertébrales, os longs au cortex peu épais), présence d'opacités cornéennes. Les enfants présentent en outre une sensibilité accrue aux infections. Des hernies ombilicales ou inguinales sont fréquemment recensées (AULA et al. 1982 (578)). Les premiers signes, témoins de l'atteinte neurologique, apparaissent généralement entre 1 et 4 ans et se manifestent par un arrêt de l'acquisition de langage et un retard dans les fonctions motrices.

La maladie évolue vers une forme adulte, avec accentuation des troubles neurologiques. La mort survient dans la plupart des cas par suite d'infections d'origine pulmonaire.

Comme dans les autres maladies lysosomales, l'examen histologique révèle la présence de larges vacuoles dans de nombreux tissus et notamment la présence de lymphocytes vacuolés dans le sang périphérique.

II - ENZYMOLOGIE

Le déficit métabolique dans l'AGU a été démontré comme étant une déficience en amidase (1-aspartamido- β -N-acétylglucosamine amidohydrolase (EC 3.5.1.26)) (POLLITT et JENNER 1969 (579)). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons N-acétylglucosamine-asparagine (GlcNAc-Asn) rencontrées dans les N-glycosyl glycoprotéines, selon un processus en deux étapes schématisé sur la Figure 34 (MAKINO et al. 1966 (580)). Cette enzyme a été caractérisée dans bon nombre de tissus animaux où elle est spécifiquement associée à la fraction lysosomale (pour une revue, voir MAURY 1982 (581)). L'enzyme du foie humain, présente un pH optimum de 7.7-9.0 (DUGAL et STRØMME 1977 (582) ; MC GOVERN et al. 1983 (583)).

Dans l'AGU l'activité de l'enzyme est réduite à 10 % de la normale, sans qu'il y ait toutefois altération de ces propriétés physico-chimiques (SAVOLAINEN 1976 (584)).

III - NATURE DU MATÉRIEL ACCUMULÉ

La caractérisation du glycopeptide GlcNAc-Asn dans les tissus ou dans l'urine des patients, par le biais de différentes méthodes chromatographiques, demeure l'élément majeur de diagnostic (MAURY et PALO 1980 (585)). Le taux d'excrétion dans l'urine de ce glycoasparagine est d'environ d'une mmole/24 h, sans qu'il y ait corrélation entre le taux urinaire du glycopeptide et la gravité des symptômes cliniques enregistrés. D'autres glycoasparagines plus complexes ont été caractérisés dans l'urine et les tissus des malades, leurs structures sont rassemblées dans la Figure 35.

Bien que l'aspartamidase ait été caractérisée ou isolée de différents tissus, peu d'information sont connues quant à son exacte

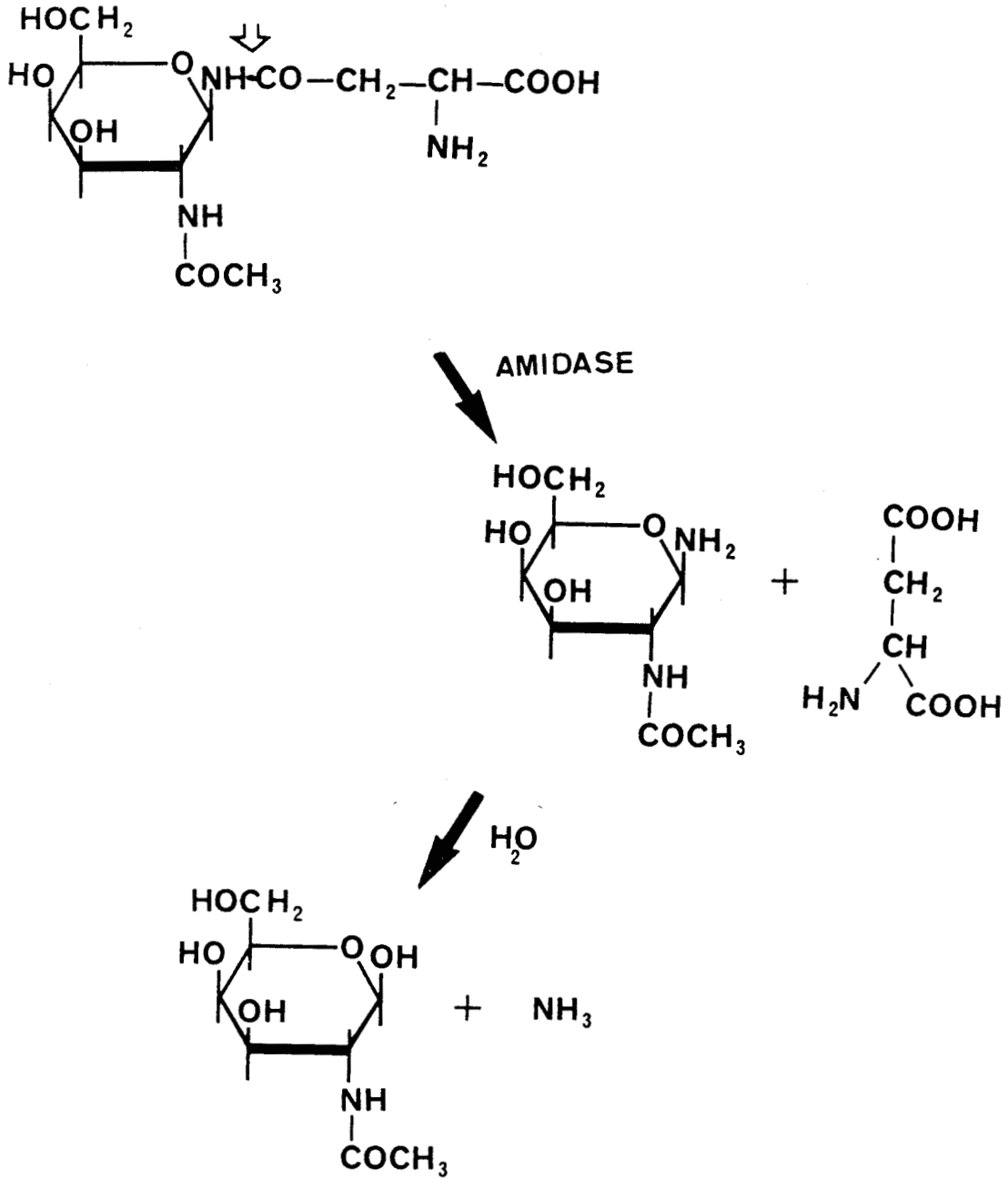


FIGURE 3

MECANISME D'ACTION DE L'ASPARTAMIDASE D'APRES DUGAL 1977 (586)

| | | |
|--|--|-----------------------------------|
| | GlcNAc (β1-N) -Asn | POLLITT et PRETTY 1974 (587) |
| | Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | LUNDBLAD <u>et al.</u> 1976 (588) |
| | Man (α1-6) -Man (β1-4) -GlcNAc (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | AKASAKI <u>et al.</u> 1976 (589) |
| | Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | SUGAHARA <u>et al.</u> 1976 (590) |
| | NeuAc (α2-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | |
| | NeuAc (α2-6) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | SUGAHARA <u>et al.</u> 1977 (591) |
| | NeuAc (α2-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | |
| | NeuAc (α2-6) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-) -Asn | |

FIGURE 35

STRUCTURE DES PRINCIPAUX GLYCOASPARAGINES CARACTERISES DANS L'URINE D'AGU

spécificité, notamment en ce qui concerne les glycopeptides complexes de type N-acétyllactosaminique ou oligomannosidique. L'étude du matériel accumulé chez les malades est susceptible de nous donner ce type d'informations, notamment la présence de glycopeptides à mannose suggère que l'enzyme est capable d'hydrolyser des glycopeptides beaucoup plus complexes que le GlcNAc-Asn.

Nous nous sommes quant à nous plus particulièrement intéressés à l'isolement et l'étude des glycoasparagines acides de l'urine. Ce travail est rapporté dans l'ARTICLE 11.

STRUCTURAL STUDY OF "POLYLACTOSAMINIC"
TYPE ACIDIC GLYCOASPARAGINES FROM URINE
OF PATIENTS WITH ASPARTYLGLYCOSAMINURIA

Jean-Claude MICHALSKI, Jean MONTREUIL and Gérard STRECKER^{*}
Laboratoire de Chimie Biologique, L.A. CNRS n° 217, Université des
Sciences et Techniques de Lille I, F - 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex
(France)

Hermann VAN HALBEEK and Johannes F.G. Vliegenthart
Department of Bioorganic Chemistry, University of Utrecht,
Croesestraat 79, NL - 3522 AD UTRECHT, The Netherlands

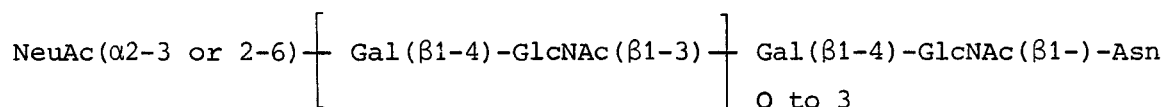
Pierre MAROTEAUX
Hôpital des Enfants Malades, 149, rue de Sèvres
F - 75730 PARIS Cédex 15 (France)

Rodney J. POLLITT
Medical Research Council, Unit for Metabolic Studies in Psychiatry,
Middlewood Hospital, P.O. Box 134, SHEFFIELD S6 1TP, U.K.

* To whom all correspondence should be sent

SUMMARY

Acidic glycoasparagines were isolated from the urine of a patient with aspartylglycosaminuria and their structures completely elucidated by a combination of 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and methylation analysis. These glycoasparagines possess a common carbohydrate backbone made of repetitive N-acetyllactosaminic units (2 to 3 residues), with a terminal sialic acid residue according to the scheme :



The origine of such carbohydrate sequences which have not yet been described in glycoprotein is discussed.

INTRODUCTION

Aspartylglycosaminuria (AGU) is a hereditary lysosomal disorder affecting the catabolism of glycoproteins (1, 2). As a consequence of the primary enzymatic defect in 1-aspartamido- β -N-acetylglucosamine-aminohydrolase, large quantities of N-acetyl- β -aspartylglucosamine (1-L- β -aspartamido-2-acetamido-1,2 dideoxy- β -D-glucose) accumulated inside the tissues (3) and are excreted in the urine of the patients (4). In addition to this compound, larger neutral and acidic glycoasparagines, have also been characterized in the urine (4, 8). In this paper we describe the isolation and structural determination based on methylation and 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy analysis, of the different acidic glycoasparagines present in urine of the patients. Four of these compounds have been previously described (9), but the higher isomers are different from any of the glycoasparagines isolated before.

MATERIAL AND METHODS

Urine was collected from two patients diagnosed as AGU on the basis of clinical symptoms, and the demonstration of β -D-GlcNAc-1-L-Asn in the urine (one of the patients was the first case of AGU described in France, MAROTEAUX unpublished). Fractionation of urine was realized by previously described methods (10). Acidic glycoasparagines were selectively eluted from the anionic exchanger Dowex 1 x 2 (200 to 400 mesh ; CH_3COO^- form) by a discontinuous gradient of pyridine acetate (pH 5.4) (1, 10, 20, 50 and 100 mM). Descending paper chromatography was carried out on WHATMAN N° 3 paper using ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5 : 5 : 1 : 3 by vol.) as a solvent.

Analysis of glycoasparagines by thin layer chromatography was made as previously described (10). Qualitative and quantitative sugar analyses were carried out after methanolysis (MeOH/HCl 0.5 M, 24 h, 80°C) by gas-liquid chromatography of the trifluoroacetylated derivatives (11).

Permethylation was performed according to FINNE *et al.* (12). Partially methylated monosaccharides obtained by methanolysis of permethylated glycopeptides were analysed and identified according to FOURNET *et al.* (13). The amino acid and hexosamine composition of the glycopeptide was determined after acid hydrolysis (5.6 N HCl, 24 h, 100°C, under vacuum) on a Beckman amino-acid analyser. For NMR spectroscopy the glycopeptides were repeatedly exchanged in D_2O (99.96 atom % D, Aldrich) with intermediate lyophilization.

The 500 MHz ^1H -NMR spectra of neutral solution of the compounds were recorded on a Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts are given relative to sodium-2,2-dimethyl-2 silapentane-5 sulphonate (indirectly to acetone in D_2O : $\delta = 2.225$ ppm). Resolution enhancement of the 500-MHz spectra was achieved by LORENTZIAN to Gaussian transformation according to (14). Spectra of glycoasparagines were interpreted as previously described (15).

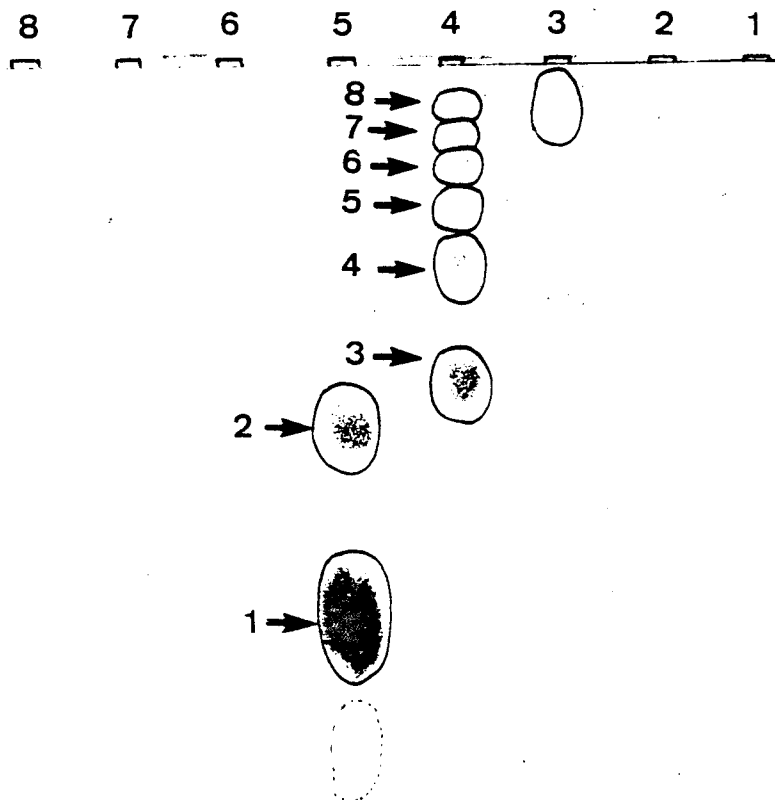


FIGURE 1

Paper chromatogram of urinary acidic glycoasparagines from patients with AGU. The glycoasparagines were eluted from a Dowex 1 x 2 column (200-400 mesh, CH_3COO^- form) with a discontinuous gradient of pyridine/acetic acid buffer (pH 5.5) from 1 mM to 20 mM (1 : 1 mM ; 2 : 2 mM ; 3 : 5 mM ; 4 : 10 mM ; 5 : 20 mM ; 6 : 50 mM ; 7 : 100 mM ; 8 : 200 mM). Solvent : ethylacetate/pyridine/acetic acid/water (5 : 5 : 1 : 3). Time of migration : 4 days.

RESULTS

ISOLATION OF ACIDIC GLYCOASPARAGINES

As shown in figure 1, acidic glycoasparagines were eluted from the Dowex 1 x 2 (200-400 mesh, CH_3COO^-) column with pyridine acetate concentrations of 10 and 20 mM.

Two main glycopeptides (GPA_1 and GPA_2) were characterized by paper chromatography in fraction 20 mM. Fraction 10 mM contains six higher glycoasparagines (GPA_3 to GPA_8). Each glycoasparagine was isolated in pure form by preparative paper chromatography during 3 days for fraction 20 mM and 6 days for fraction 10 mM. Purification of higher isomers GPA_7 and GPA_8 which were contaminated by minor "mannose containing material" was achieved by passing through a ConA affinity column. Purity of isolated compounds was checked by thin layer chromatography.

COMPOSITION OF PURIFIED GLYCOASPARAGINES GPA_1 TO GPA_7

Sugar and amino-acid analysis (Table I) revealed that all glycopeptides contain sialic acid, galactose, N-acetyl-glucosamine and asparagine. In all case the ration NeuAc : Asn was 1 : 1 indicating that all compound were monosialylated. The ratio Gal : GlcNAc was 1 : 1 in all glycopeptides, and the number of galactose and N-acetylglucosamine increased from 1 for GPA_1 and GPA_2 , to 4 for GPA_7 and GPA_8 . This fact suggest the possibility of repetitive N-acetyllactosaminic sequences.

SUGAR LINKAGES AND SEQUENCES

The molar compositions of the partially methylated methylglycosides present in the methanolysates of the permethylated glycopeptides GPA_1 to GPA_8 are given in Table 1.

The main observation is that all the constituent monosaccharides are monosubstituted indicating a linear sequence for all glycopeptides. In all cases a terminal sialic acid residue was observed. The presence of 2,4,6-tri-O-Me-3-mono-O-Ac-Gal in GPA_1 and 2,3,4-tri-O-Me-6-mono-O-Ac-Gal in GPA_2

TABLE 1

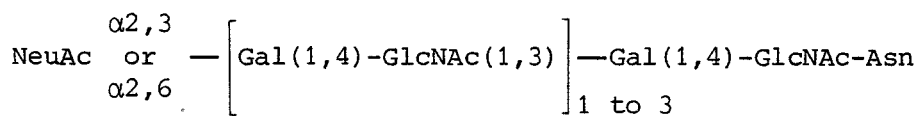
Molar ratios of constituent monosaccharides and of partially methylated methylglycosides, after methylation analysis, of the major glycoasparagines from the urine of two patients with aspartylglycosaminuria

| Glyco- Asparagine | Amount mg/l | Carbohydrate and amino-acid composition | | | | Methylation analysis data | | | |
|----------------------|----------------|--|------|----------|------|------------------------------------|------------------------------------|--|----------------------------------|
| | | NeuAc | Gal | GlcNAc | Asp | 2,3,4-tri-O-Me- 6-mono-O-Ac-Gal | 2,4,6-tri-O-Me- 3-mono-O-Ac-Gal | 3,6-di- O-Me-4-mono-Ac- GlcN(Me)Ac | 4,7,8,9-tetra- O-Me-Neu(Me)Ac |
| GPA ₁ | 52 | 0.90 | 1.00 | 0.48(1)* | 1.00 | - | 1.09 | 0.45 | 0.70 |
| GPA ₂ | 27 | 0.92 | 1.02 | 0.46(1) | 1.00 | 1.04 | - | 0.32 | 0.76 |
| GPA ₃ | 18 | 0.94 | 2.00 | 1.45(2) | 1.00 | - | 1.94 | 1.40 | 0.80 |
| GPA ₄ | 10 | 0.92 | 2.00 | 1.46(2) | 1.00 | 1.09 | 1.03 | 1.36 | 0.75 |
| GPA ₅ | 7 | 0.95 | 2.84 | 2.56(3) | 1.00 | - | 2.80 | 2.30 | 0.82 |
| GPA ₆ | 4 | 0.96 | 2.92 | 2.45(3) | 1.00 | 0.94 | 1.86 | 2.44 | 0.72 |
| GPA ₇ | 5 | 0.92 | 3.80 | 3.20(4) | 1.00 | - | 3.76 | 3.24 | 0.76 |
| GPA ₈ | 3 | 0.87 | 3.94 | 3.45(4) | 1.00 | 1.03 | 2.86 | 3.36 | 0.74 |

(*) theoretical values

is in favour of the substitution the galactose residue by sialic acid either in a 2,3 or a 2,6 linkage. This observation is confirmed by NMR analysis and can be extended to higher isomers. So GPA₁, GPA₃, GPA₅ and GPA₇ possess a α-2,3 sialyl linkage and GPA₂, GPA₄, GPA₆ and GPA₈ a α-2,6 sialyl linkage.

All N-acetylglucosamine residues are substituted on carbon 4. The increased number of N-acetylglucosamine derivatives, together with the presence of the 2,4,6-tri-O-Me-3-mono-O-Ac galactose derivative is again in favour of repetitive N-acetyl lactosaminic sequence enchainned with a 1,3 linkage, according to the scheme :



These results were confirmed by NMR analysis which precise the anomeric configuration of the different linkages. The 500 MHz H-1 NMR spectrum obtained with GPA₅ is shown on figure 2.

DISCUSSION

The data obtained by sugar composition, methylation and NMR analysis, allow to propose the structures summarize in Fig. 3 for glycopeptides GPA₁ to GPA₈.

If compounds GPA₁ to GPA₄ have been previously described (9), compounds GPA₅ to GPA₈ have new structures never described before in any biological fluids. The fact that all are glycoasparagines, can be related to the primary enzymatic defect in AGU. All these glycoasparagines possess in common the core Gal(β1,4)-GlcNAc-Asn. As to now this type of carbohydrate structure has never been described in glycoproteins and their origin can be discussed. We can first assume that like other oligosaccharides or glycopeptides found in the urine of patients with glycoproteinosis (16), they originate from a disturbed catabolism of the carbohydrate chains of

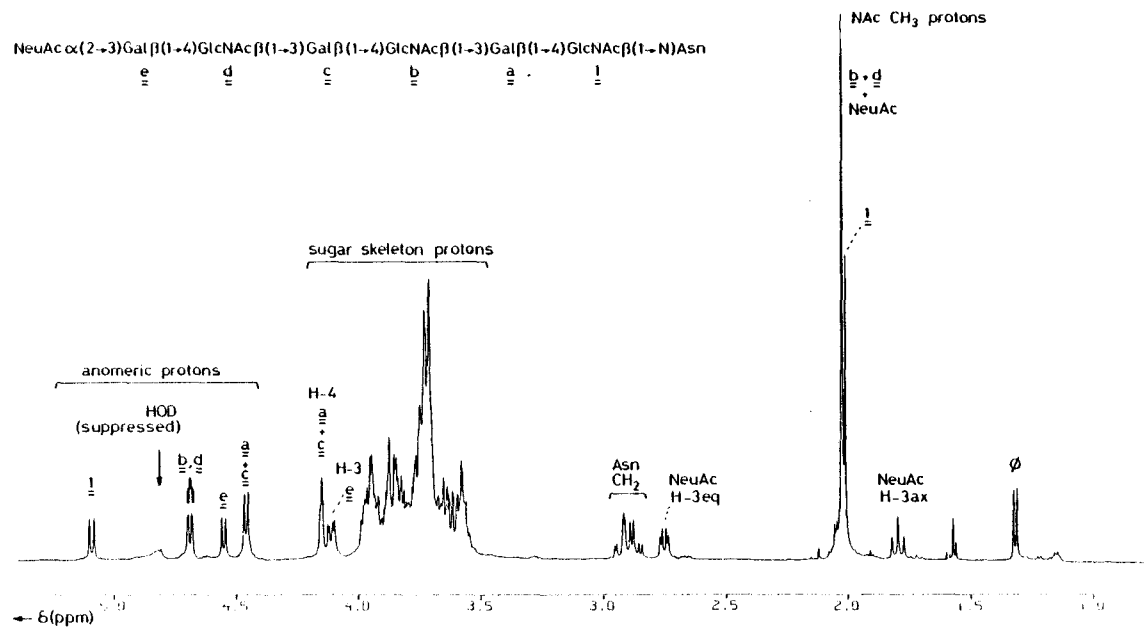


FIGURE 2

The overall 500 MHz ^1H -NMR spectrum of GPA_5 , a "polylactosaminic" type glycoasparagine with three repetitive N-acetylglucosamine sequences, in D_2O at 300 K. The doublet at $5 \approx 1.32$ ppm, indicated by ϕ , stem from a non carbohydrate non protein contaminant.

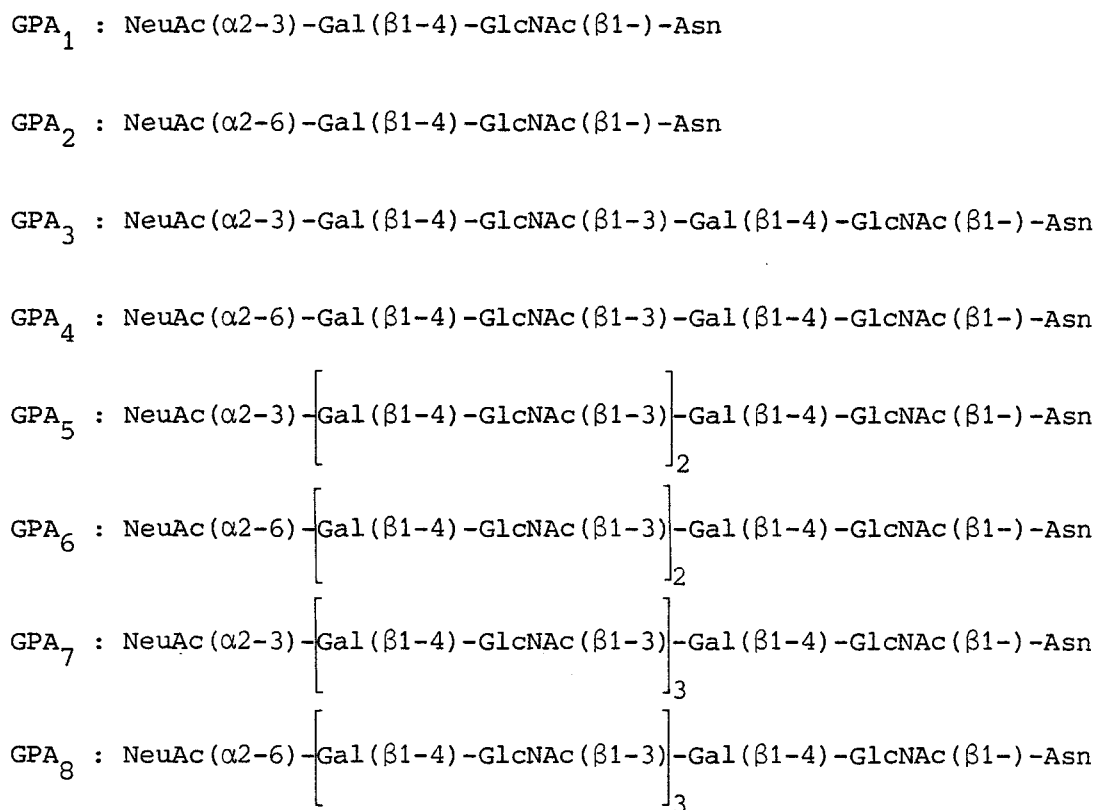


FIGURE 3

Structures of the acidic glycoasparagines isolated from the urine of patients with aspartylglycosaminuria

glycoproteins normally present in tissues or biological fluids. A second hypothesis is that they are built by a repetitive glycosidic transfer on the glycoasparagine GlcNAc-Asn which represent the major metabolite in urine. Since we observed that no one of the neutral glycoasparagines of the urine possess a N-acetylglucosamine in non reductive terminal position (unpublished results), we can suppose that the compounds are biosynthesized by the action of a galactose : N-acetyl-glucosamine galactosyltransferase and achieved by addition of a terminal sialic acid residue. It can be noted, that this type of biosynthetic process has never been described in other glycoproteinosis and must be in this case directly related to the nature of the acceptor GlcNAc-Asn. It can also be observed that in fucosidosis where the major urinary metabolite is the glycoasparagine Fuc(α 1,6)-GlcNAc-Asn this process doesn't occurs.

Investigations on the possibility of such biosynthetic pathways using model acceptors, will certainly give an answer to the origin of this new type of carbohydrate chains.

REFERENCES

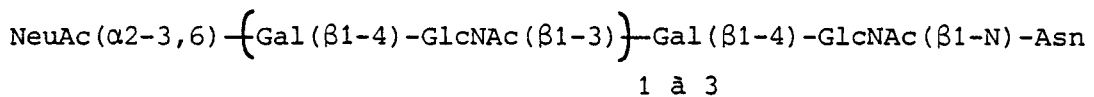
1. POLLITT, R.J., JENNER, F.A. & MERSKY, H. (1968) *Lancet* ii, 253-256
2. MAURY, C.P.J. (1982) *J. Inher. Metab. Dis.* 5, 192-196
3. MAURY, C.P.J. (1980) *J. Lab. Clin. Med.* 96, 838-844
4. POLLITT, R.J. & PRETTY, K.M. (1974) *Biochem. J.* 141, 141-146
5. LUNDBLAD, A., MASSON, P.K., NURDEN, N.E., SVENSSON, S., ÖCKERMAN, P.A. & PALO, J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 209-214
6. SUGAHARA, K., FUNAKOSHI, S., FUNAKOSHI, I., AULA, P. and YAMASHINA, I. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)* 78, 675-678
7. AKASAKI, M., SUGAHARA, K., FUNAKOSHI, I., AULA, P. and YAMASHINA, I. (1976) *FEBS-Lett.* 69, 191-194

8. SUGAHARA, K., FUNAKOSHI, S., FUNAKOSHI, I., AULA, P. and YAMASHITA, I. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)* 80, 195-201
9. SUGAHARA, K., AKASAKI, M., FUNAKOSHI, I., AULA, P. and YAMASHITA, I. (1977) *FEBS-Lett.* 78, 284-286
10. MICHALSKI, J.C., MONTREUIL, J., STRECKER, G., Van HALBEEK, H., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., CARTIGNY, B. and FARRIAUX, J.P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 375-387
11. ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C. and VINCENDON, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304
12. FINNE, J., KRUSIUS, T. and RAUVALA, H. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304
13. FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. and MONTREUIL, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502
14. ERNST, R.R. (1966) in *Advances in Magnetic Resonance* (Waugh, J.S. ed) Vol. 2, pp. 1-135, Academic Press, London, New York
15. Vliegenthart, J.F.G., DORLAND, L. and Van HALBEEK, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, pp. 209-374
16. STRECKER, G. and MONTREUIL, J. (1979) *Biochimie* 61, 1199-1246

IV - DISCUSSION

Le déficit en aspartamidase dans l'AGU se traduit par une excrétion massive dans l'urine du glycoasparagine GlcNAC-Asn, motif structural correspondant au point d'attache des chaînes glycaniques sur la protéine dans les N-glycosylprotéines.

D'autres glycoasparagines plus complexes se retrouvent également dans l'urine. L'analyse structurale que nous avons réalisée sur les composés acides, montre qu'ils sont constitués d'un enchaînement linéaire de type "polylactosaminique" :



Bien que des séquences polylactosaminiques aient été caractérisées par un certain nombre de N-glycosylprotéines (glycoprotéine de la bande 3 de la membrane érythrocytaire TSUJI et al. 1981 (592) ; kératane sulfate HIRANO et al. 1961 (593)), dans tous les cas ces enchaînements substituaient le noyau trimannosidique commun aux N-glycosylprotéines.

L'origine des glycoasparagines de l'urine d'AGU est dans ce sens problématique et soulève deux hypothèses.

L'hypothèse première serait que ces séquences résultent d'un processus de transfert sur le chaînon GlcNAC-Asn présent en grande quantité dans les différents tissus ou l'urine, au quel cas plusieurs constatations peuvent être faites. Il faudrait en effet dans ce dernier cas, imaginer un transfert successif de résidus de lactosamine plutôt qu'une addition ordonnée de résidus de galactose puis de N-acétylglucosamine. En effet, il est à noter qu'aucun des glycoasparagines neutres isolés de l'urine ne possède une séquence intermédiaire à N-acétylglucosamine terminale. Le processus de transfert sur le GlcNAC-Asn nécessitait donc comme accepteur un nucléoside du type UDP-Gal(β1-4)-GlcNAC. Il est cependant surprenant qu'un tel processus de transfert n'ait jamais été observé pour les autres maladies de surcharge, au quel cas il faudrait admettre que ce phénomène soit spécifiquement associé à la nature du produit majeur accumulé à savoir le glycoasparagine GlcNAC-Asn.

La seconde hypothèse, qui d'ailleurs a été adoptée comme concept (STRECKER et MONTREUIL 1978 (594)) est que tous les motifs glycaniques retrouvés dans l'urine, soient un reflet exact de ceux existant naturellement dans les glycoprotéines. Il faut alors admettre que ce type de séquence linéaire existe dans certaines glycoprotéines et reste à découvrir.

EXEMPLE DE SURCHARGE LYSOSOMALE SECONDAIRE. ETUDE DU MATERIEL URINAIRE EXCRETE LORS DE LA MALADIE DE GAUCHER.

Sous le terme de "Maladie de Gaucher" sont regroupés un certain nombre de syndromes, transmis suivant un mode autosomal récessif, et qui se manifestent sous un grand nombre de formes cliniques (Tableau XVII). Toutes les formes de la maladie semblent être dues à la déficience d'une enzyme lysosomale, la "glucosylcéramide- β -glucosidase" (BRADY et al. 1965 (595) ; PATRICK 1965 (596)), catalysant l'hydrolyse du glucocérébroside en céramide et glucose, et entraînant l'accumulation de glucosylcéramide dans différents organes, et en particulier dans les cellules du système réticulo-endothélial (GAL et al. 1979 (597)). Cette surcharge confère aux cellules de Gaucher un aspect caractéristique, les cellules prennent généralement une forme ovoïde ou polygonale et renferment de très nombreuses inclusions cytoplasmiques d'aspect strié. Observées en microscopie électronique, ces inclusions ont l'apparence de structures tubulaires (TAKAHASHI et al. 1978 (598) ; EBATO et al. 1980 (599)).

La glucosylcéramide provient de la dégradation de différents glycosphingolipides tels les gangliosides dans le cerveau et les viscères, le lactosylcéramide dans les cellules de la lignée blanche et enfin du gabotétraosylcéramide dans les hématies (FIGURE 36).

La β -glucosidase spécifique de l'hydrolyse de la liaison β -glucosidique du glucocérébroside est une glycoprotéine oligomérique fortement ancrée dans la membrane lysosomale (PENCHEV et al. 1973 (600)). L'activité enzymatique est fortement stimulée par un facteur glycoprotéinique de faible poids moléculaire et thermostable, particulièrement abondant dans la rate de patients atteints de maladie de Gaucher (PETERS et al. 1977 (601)). D'après HO 1975 (602), l'hydrolyse du glucocérébroside s'effectuerait par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique constitué par la glucocérébrosidase (facteur C),

TABLEAU XVII

DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DE LA MALADIE DE GAUCHER

Type 1 : Forme chronique ou adulte (maladie d'Ashkenazi) non neuronopathique : symptômes variables incluant l'hépatosplénomégalie, l'anémie, la thrombocytopénie, des difficultés orthopédiques, une pigmentation anormale de la face, du cou et des mains (Juifs).

Type 2 : Forme infantile, neuronopathique : hépatosplénomégalie, dysfonctionnement nerveux, retard mental dès le premier mois de la vie. Mort généralement dans la 2ème année.

Type 3 : Forme juvénile : hépatosplénomégalie ménagée, crises, troubles cérébelleux apparaissant vers l'enfance (répandue dans certaines régions de Suède).

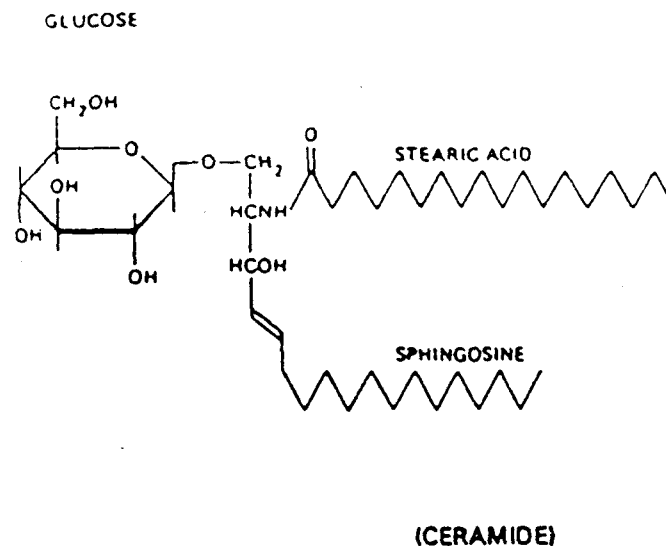


FIGURE 36

STRUCTURE DU GLUCOSYLCERAMIDE ACCUMULE LORS DE LA MALADIE DE GAUCHER

de l'activateur glycoprotéinique (facteur P) associés à un phospholipide acide. Une forme soluble de la β -glucosidase a également été caractérisée (DANIELS et al. 1981 (603)), cette enzyme de spécificité beaucoup plus large est également déficiente dans certaines formes de la maladie de Gaucher.

Tout récemment, des formes multiples de la β -glucocérébrosidase ont été caractérisées par des techniques d'électrofocalisation aussi bien dans les tissus normaux que chez les malades, CHOY et DAVIDSON 1978 (604) ; GINNS et al. 1980 (605) ; MARET et al. 1981 (606). Ces méthodes ont permis de caractériser des formes enzymatiques altérées chez les malades, en particulier GINNS et al. 1982 (607), montrent que l'enzyme existe sous 2 formes, une forme précurseur A et une forme mature B, en quantité variable suivant les types cellulaires étudiés. La mutation responsable de la forme adulte de la maladie atteindrait le site catalytique de l'enzyme qui évoluerait toutefois vers la forme mature, alors que dans les types 2 et 3 l'enzyme demeurerait sous forme précurseur.

Cependant de ces différentes études, il apparaît qu'il est possible de corrélérer la gravité de la maladie avec l'activité résiduelle en β -glucocérébrosidase. Parallèlement au déficit en β -glucosidases d'autres enzymes semblent être perturbés dans la maladie. En particulier, MOFFITT et al. 1978 (608), mettent en évidence l'élévation de l'activité de nombreuses glycosidases dans le plasma et la rate des patients. Ces perturbations enzymatiques peuvent être mises en parallèle, avec des accumulations aspécifiques en GM₃ ganglioside et en galactocérébroside chez certains malades, PHILIPPART et MENKES 1967 (609). Plus récemment, DE GASPIERI et al. 1981 (610), ont mis en évidence une accumulation de glycopeptides de nature N-acétyl-lactosaminique dans la rate des malades.

Ces derniers résultats nous ont incité à rechercher l'influence des variations de l'activité des hydrolases acides, consécutives à la surcharge lysosomale en glucocérébroside sur le catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines, et à rechercher une éventuelle oligosaccharidurie associée à la maladie. Ces travaux sont résumés dans les ARTICLES 12 et 13.

Primary Structure of Three Mannosyl-glycoasparagines and Nine Sialyl-oligosaccharides Isolated from the Urine of Two Patients with Gaucher's Disease (Infantile Form)

Jean-Claude MICHALSKI, Jean MONTREUIL, Gérard STRECKER, Herman VAN HALBEEK, Lambertus DORLAND, Johannes F. G. Vliegenthart, Bernard CARTIGNY, and Jean-Pierre FARRIAUX

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Villeneuve d'Ascq; Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht; and Service de Pédiatrie, Cité Hospitalière, Lille

(Received November 23, 1982/January 19, 1983) – EJB 6246

The urine of two patients with the infantile form of Gaucher's disease were analyzed for their carbohydrate content. Nine sialyl-oligosaccharides were isolated and characterized. Compounds with identical structures occur in the urine of patient with sialidosis. Furthermore, an abnormal excretion of mannosyl-glycoasparagines was observed. Three of these compounds were isolated and identified:

GP-I: α -Man-(1→6)- β -Man-(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)- β -GlcNAc-Asn;

GP-III: α -Man-(1→3)
 α -Man-(1→6)
 α -Man-(1→6)
 β -Man-(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)- β -GlcNAc-Asn;

GP-IV: α -Man-(1→3)
 α -Man-(1→3)
 α -Man-(1→6)
 α -Man-(1→6)
 β -Man-(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)- β -GlcNAc-Asn.

This carbohydrate material, which is found also in the spleen of the patients, probably originates from obstruction of lysosomal functioning by the accumulation of an excessive amount of glucocerebroside.

Gaucher's disease is an autosomal, recessively heritable infant error of metabolism characterized by a deficiency in glucocerebrosidase [1], resulting in the accumulation of glucocerebroside in the spleen [2]. Three forms of the disease (infantile, juvenile and adult) can be distinguished on the basis of clinical parameters and age of the patients [3]. The infantile form is characterized by hepatosplenomegaly and neurological abnormalities during the first years of life.

Little is known about the biochemical or genetic basis of the variation observed among Gaucher's disease patients. There is no correlation between the clinical course of the disease and the levels of residual glucocerebrosidase activity, so it is quite possible that the clinical expression of Gaucher's disease depends upon factors different from the glucocerebrosidase deficiency. Several authors have reported an increase of lysosomal hydrolase activities, such as β -glucuronidase, acid phosphatase, both hexosaminidases A and B and β -galactosidase in spleen, liver or plasma of the patients [4, 5]. The origin of this phenomenon is not known, but Moffitt et al. [5]

suggested that it may be due to an interaction of accumulated metabolites inside the lysosomes with cellular hydrolases. Some of these secondary changes in lysosomal enzyme activities might account for changes in the glycolipid or glycoprotein content of the tissue. Recently, De Gasperi et al. [6] described an increased amount of glycopeptide material in spleen of patients with Gaucher's disease.

These reports prompted us to investigate the urine of two patients with Gaucher's disease (infantile form), with regard to the content and the nature of carbohydrates related to glycoproteins. A preliminary report of the $^1\text{H-NMR}$ investigations of the urinary glycoasparagines has been published previously [7].

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Carbohydrate Material

Urine of two siblings with the infantile form of Gaucher's disease was fractionated as described previously [8]: 10 l of urine were first demineralized in batches using Dowex 50 \times 8 (25–50 mesh, H^+ form) and Dowex 1 \times 8 (25–50 mesh, HCOO^- form). The filtrate was concentrated to 1 l under reduced pressure and then applied to a column (5 \times 40 cm) of

Abbreviations. Man, D-mannose; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Gal, D-galactose; NeuAc, N-acetyl-D-neuraminic acid; Asn, L-asparagine; Asp, L-aspartic acid; TLC, thin-layer chromatography; GLC, gas-liquid chromatography; GC-MS, gas-liquid chromatography coupled with mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance.

charcoal/celite. After washing with 2 l of distilled water, the adsorbed material was eluted with 5 l of 50% ethanol. The volume of the ethanol solution was reduced to about 100 ml by evaporation. Subsequently, the solution was applied to columns (2 × 30 cm) of Dowex 50 × 2 (200–400 mesh, H⁺ form) and Dowex 1 × 2 (200–400 mesh, CH₃COO⁻ form) connected in series. After washing with 500 ml of distilled water, the columns were eluted separately by a discontinuous gradient of 1–500 mM pyridine/acetic acid buffer (pH 5.5). Each fraction was then concentrated to 1 ml and analyzed by paper chromatography.

Chromatographic Procedures

Further separation and purification of oligosaccharides and glycopeptides was achieved by descending paper chromatography for 1–12 days on Whatman no. 3 paper, with ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5:5:1:3, v/v) as solvent. Carbohydrate material was stained with the aniline oxalate reagent [9] or with a 1% ninhydrin solution in acetic acid/acetone (5:95, v/v).

Homogeneity of purified glycans was verified by thin-layer chromatography on Silicagel-60, precoated plates (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) with ethanol/*n*-butanol/pyridine/acetic acid/water (100:10:10:3:30, v/v) as solvent [10]. Sugar material was stained with a 0.2% orcinol solution (w/v) in sulfuric acid/water (20:80, v/v), followed by heating to 105 °C for 10 min.

Analytical Methods

The molar carbohydrate composition of the isolated compounds was determined according to Zanetta et al. [11], after methanolysis with 0.5 M HCl in methanol for 24 h at 80 °C. Molar ratios of glucosamine and aspartic acid were determined using a Beckman amino-acid analyser, after hydrolysis of the glycoasparagines in 4 M HCl for 4 h.

Permethylation was carried out according to Hakomori [12], as modified by Björndal et al. [13]. After extraction with chloroform, the permethylated compounds were purified by passing through a Silicagel column (0.5 × 5 cm) (Kieselgel, 70–325 mesh, Merck, Darmstadt). The column was washed with 5 ml chloroform and eluted with 20 ml methanol/chloroform (5:95, v/v) [14]. The partially *O*-methylated monosaccharides

obtained by methanolysis of the permethylated oligosaccharide-alditols (0.5 M HCl in methanol for 24 h at 80 °C) were analyzed by gas-liquid chromatography/mass spectrometry after acetylation in pyridine/acetic anhydride (1:1, v/v, 500 µl, 100 °C, 30 min) using a Girdell model 30 gas chromatograph (Suresnes, France) equipped with a capillary glass column (0.3 mm × 60 m) coated with Carbowax 20 M (column temperature: 130–225 °C with a temperature gradient of 2 °C/min; flow rate of carrier gas N₂: 20 ml/min) and subsequently identified by mass spectrometry (Riber-Mag 10-10 mass spectrometer, Rueil-Malmaison, France).

Prior to NMR spectroscopy, the glycoasparagines were repeatedly exchanged in D₂O (99.96 atom% D, Aldrich, Milwaukee), with intermediate lyophilization. For NMR spectral analyses approximately 2 mM solutions of the compounds in 0.4 ml D₂O were used. The 500-MHz ¹H-NMR spectra of the glycoasparagines were recorded on a Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 300 K [7]. Chemical shifts are given relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (indirectly to acetone in D₂O: δ = 2.225 ppm).

Table 1. Molar carbohydrate composition of sialyl-oligosaccharides isolated from the urine of two patients with Gaucher's disease (infantile form). The molar ratios are based upon 2 or 3 mol of mannose/mol of oligosaccharide

| Sialyl-oligosaccharide | Amount in | | Molar ratios | | | |
|------------------------|--------------|-------------------|--------------|-----|--------|-------|
| | normal urine | Gaucher's disease | Gal | Man | GlcNAc | NeuAc |
| | mg/ml | | | | | |
| 1 | 0.1–0.3 | 5 | 1.05 | 2.0 | 1.94 | 0.87 |
| 2 | 0.2–0.3 | 16 | 0.95 | 2.0 | 2.04 | 0.94 |
| 3 | <0.1 | 14 | 0.87 | 3.0 | 2.05 | 0.88 |
| 4 | 0.1–0.5 | 8 | 1.84 | 3.0 | 3.16 | 1.04 |
| 5 | <0.1 | 16 | 1.74 | 3.0 | 3.05 | 1.07 |
| 6 | <0.1 | 4 | 1.88 | 2.0 | 2.87 | 2.05 |
| 7 | <0.1 | 5 | 1.94 | 3.0 | 3.07 | 2.08 |
| 8 | 0.1–1.0 | 8 | 1.87 | 3.0 | 2.94 | 1.72 |
| 9 | – | 22 | 2.01 | 3.0 | 2.94 | 1.92 |

Table 2. Molar ratios of partially methylated methylglycosides derived from the methanolysates of the permethylated, reduced sialyl-oligosaccharides from the urine of patients with Gaucher's disease (infantile form)

The molar ratios were determined on the basis of one residue of 1,3,5,6-tetra-*O*-Me-4-mono-*O*-Ac-GlcN(Me)Ac-itol; Me = methyl, Ac = acetyl

| Partially methylated methylglycoside | Molar ratio in sialyl-oligosaccharide | | | | | | | | |
|--|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Man | – | – | 0.92 | – | – | – | – | – | – |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Gal | – | – | – | 0.88 | 0.91 | – | – | – | – |
| 2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-3-mono- <i>O</i> -Ac-Man | 1.04 | 1.09 | – | – | – | 0.88 | – | – | – |
| 3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-2-mono- <i>O</i> -Ac-Man | 0.96 | 1.11 | 0.88 | 1.88 | 1.95 | – | 1.84 | 1.90 | 1.94 |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-6-mono- <i>O</i> -Ac-Gal | – | 1.11 | 0.94 | – | 1.04 | 1.04 | – | 0.87 | 1.82 |
| 2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-3-mono- <i>O</i> -Ac-Gal | 1.03 | – | – | 0.91 | – | 0.92 | 1.92 | 0.94 | – |
| 2,4-Di- <i>O</i> -Me-3,6-di- <i>O</i> -Ac-Man | – | – | 0.88 | 0.94 | 1.11 | – | 1.12 | 1.03 | 1.00 |
| 3,6-Di- <i>O</i> -Me-2,4-di- <i>O</i> -Ac-Man | – | – | – | – | – | 0.80 | – | – | – |
| 3,6-Di- <i>O</i> -Me-4-mono- <i>O</i> -Ac-GlcN(Me)Ac | 0.84 | 0.92 | 0.90 | 1.94 | 1.90 | 1.84 | 1.80 | 1.70 | 1.96 |
| 1,3,5,6-Tetra- <i>O</i> -Me-4-mono- <i>O</i> -Ac-GlcN(Me)Ac-itol | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 4,7,8,9-Tetra- <i>O</i> -Me-Neu(Me)Ac | 0.70 | 0.76 | 0.80 | 0.75 | 0.80 | 1.55 | 1.60 | 1.54 | 1.80 |

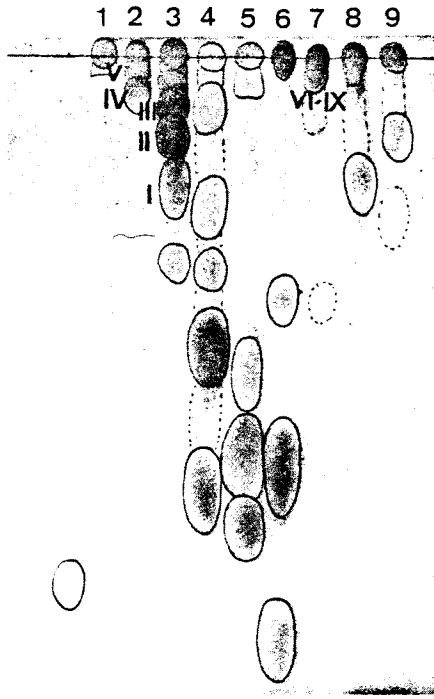


Fig. 1. Paper chromatogram of urinary sialyl-oligosaccharides from a patient with Gaucher's disease (infantile form). The sialyl-oligosaccharides were eluted from a Dowex 1 x 2 column (200 - 400 mesh, CH₃COO⁻ form) with a discontinuous gradient of pyridine/acetic acid buffer (pH 5.5) from 1 mM to 500 mM (1: 1 mM, 2: 2 mM, 3: 5 mM, 4: 10 mM, 6: 50 mM, 7: 100 mM, 8: 200 mM, 9: 500 mM). Solvent: ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5:5:1:3). Time of migration: over night

Resolution enhancement of the spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation according to Ernst [15].

RESULTS

Characterization of Sialyl-oligosaccharides

The sialyl-oligosaccharides eluted from the Dowex 1 x 2 column were qualitatively analyzed by paper chromatography. The chromatographic pattern (Fig. 1) was identical to that obtained for sialidosis urine [16]. The levels of these oligosaccharides are significantly increased as compared to normal urine (see Table 1); however, they are considerably lower than those in the urine of sialidosis patients [16].

The nine major sialyl-oligosaccharides were isolated by preparative paper chromatography and characterized by methylation analysis. The carbohydrate compositions (Table 1) and the molar ratios of the partially methylated methylglycosides derived from the permethylated reduced oligosaccharides (Table 2) indicate that the oligosaccharide structures are most probably identical to those described to occur in urine of sialidosis patients. The structures of the nine major sialyl-oligosaccharides present in Gaucher's disease urine, are listed in Fig. 2.

Characterization of Glycoasparagines

Paper chromatography of the fractions eluted from the Dowex 50 x 2 column (Fig. 3) showed the occurrence of

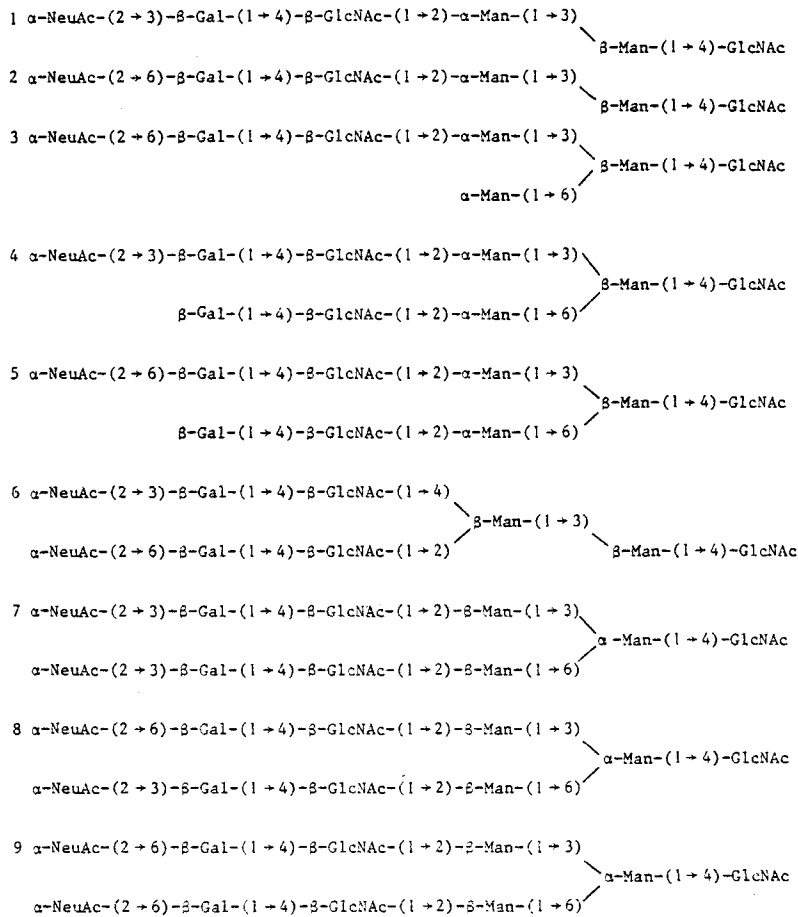


Fig. 2. Structures of the nine major sialyl-oligosaccharides isolated from the urine of a patient with Gaucher's disease (infantile form)

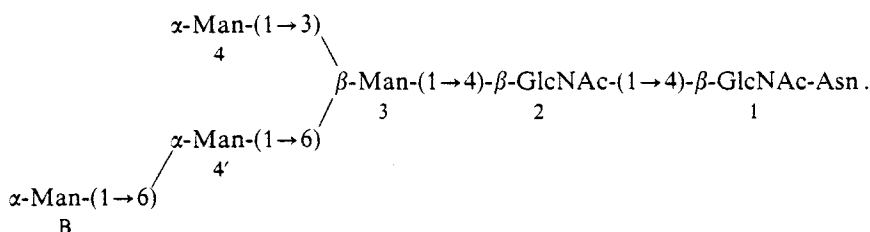
Table 3. Molar ratios of constituent monosaccharides, and of partially methylated methylglycosides, after methylation analysis, of the major glycoasparagines from the urine of two patients with Gaucher's disease (infantile form)

The carbohydrate and amino acid compositions are based upon 1 mol of aspartic acid/mol of glycoasparagine, after hydrolysis. The methylation analysis data are based upon 1, 2 or 3 mol of 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-mannoside/mol of glycoasparagine

| Glycoasparagine | Amount mg/l | Carbohydrate and amino acid composition | | | Methylation analysis data | | | | |
|-----------------|----------------|---|--------|------|---------------------------------|--|--|---|--|
| | | Man | GlcNAc | Asp | 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -Me-Man | 2,3,4-tri- <i>O</i> -Me-6-mono- <i>O</i> -Ac-Man | 3,4,6-tri- <i>O</i> -Me-2-mono- <i>O</i> -Ac-Man | 2,4-di- <i>O</i> -Me-3,6-di- <i>O</i> -Ac-Man | 3,6-di- <i>O</i> -Me-4-mono- <i>O</i> -Ac-GlcN(Me)Ac |
| GP-I | 1.2 | 2.00 | 1.94 | 1.00 | 1.00 | 1.25 | 0.12 ^a | 0.11 ^a | 1.45 |
| GP-III | 1.7 | 3.80 | 1.88 | 1.00 | 2.00 | — | — | 1.05 | 1.48 |
| GP-IV | 2.5 | 4.75 | 1.92 | 1.00 | 3.00 | 0.15 ^a | 0.17 ^a | 1.90 | 1.50 |

^a Attributed to contaminants

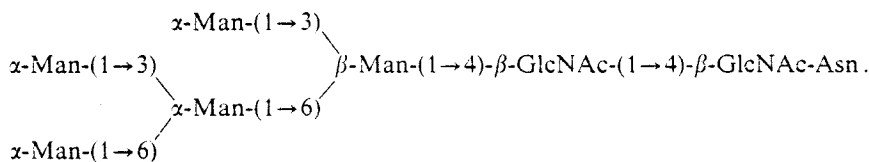
and



Comparison of the 500-MHz ¹H-NMR spectrum of GP-III with that of GP-I (see [7]) confirms the common presence of the

Man → GlcNAc → GlcNAc unit. Furthermore, the characteristically shaped H-2 resonance of the β-linked mannose-3 is found again at δ = 4.076 ppm; as for GP-I, this means that mannose-3 bears no substituent at C-3 [17, 22, 23]. In this way, structure (a) can be selected to be the correct one for GP-III. The branching mannose-4' residue is characterized by δ H-1 = 4.870 ppm and δ H-2 = 4.140 ppm. The terminal α-(1→3) and α-(1→6)-linked mannose residues, designated A and B, respectively, show the chemical shift values which are typical for terminal mannose residues linked in this way (for Man-A, δ H-1 = 5.076 ppm and δ H-2 = 4.064 ppm; for Man-B, δ H-1 = 4.909 ppm and δ H-2 = 3.988 ppm).

GP-IV. Sugar analysis of GP-IV (Table 3) shows that this compound contains an additional Man residue as compared to GP-III. From the methylation analysis data (Table 3, Fig. 5) it is evident that this additional mannose occupies a terminal position. Moreover, the mono-6-substituted Man residue in GP-III is no longer found in GP-IV. It is replaced by a second di-3,6-substituted mannose. Therefore, the following structure can be proposed for GP-IV:



This structure is confirmed by the 500-MHz ¹H-NMR spectral data of GP-IV [7]. In particular, the change in chemical shift of H-2 of mannose-3 from δ = 4.076 ppm to 4.251 ppm, in conjunction with the presence of an additional set of H-1 and H-2 signals for a terminal α-(1→3)-linked mannose residue (for

Man-4, δ H-1 = 5.099 ppm; δ H-2 = 4.077 ppm; for Man-A, δ H-1 = 5.093 ppm; δ H-2 = 4.066 ppm), are decisive in this respect for the attachment of mannose-4 in α-(1→3)-linkage to mannose-3 in the structure of GP-III.

Glycoasparagines GP-I and GP-IV are contaminated with one or more minor components as is evident from the results of methylation analysis (see Fig. 5 and Table 3). The structure of one of the contaminants of GP-IV, which represent about 10% of the mixture, was established by methylation analysis and NMR spectroscopy [7] to be the same as that of the major component of GP-I.

The structures of the major glycoasparagines that were found to occur in the urine of patients with the infantile form of Gaucher's disease, are compiled in Fig. 6.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The structures of major sialyl-oligosaccharides and glycoasparagines accumulated in the urine of the two patients with Gaucher's disease are given in Fig. 2 and 6. From a quantitative point of view, their excretion is not comparable with that observed in other lysosomal storage diseases such as

sialidosis, GM₁-gangliosidosis or mannosidosis [16, 24, 25]. The quantities of glycoasparagines are very low and cannot be detected by direct TLC of urine. Nevertheless, their excretion is significant, because these glycopeptides have never previously been described in either normal urine or urine from other types

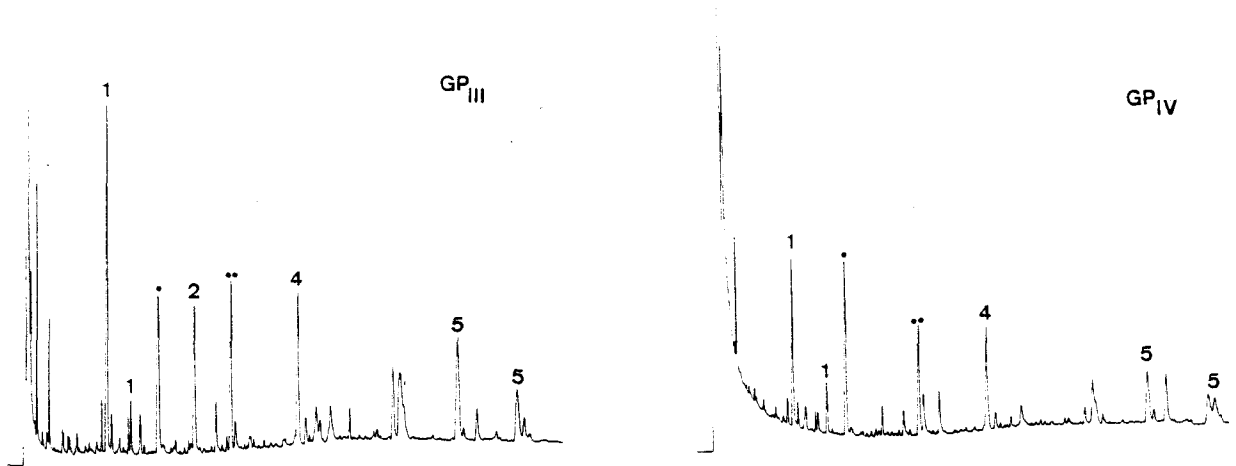


Fig. 5. GLC analysis of partially methylated monosaccharide derivatives present in the methylolysates of the permethylated glycoasparagines (III and IV). (1) 2,3,4,6-Tetra-*O*-Me-Man; (2) 2,3,4-tri-*O*-Me-Man; (3) 3,4,6-tri-*O*-Me-Man; (4) 2,4-di-*O*-Me-Man; (5) 3,6-di-*O*-Me-Glc(Me)Ac; ** fatty acids. The retention time is plotted horizontally against the detector response

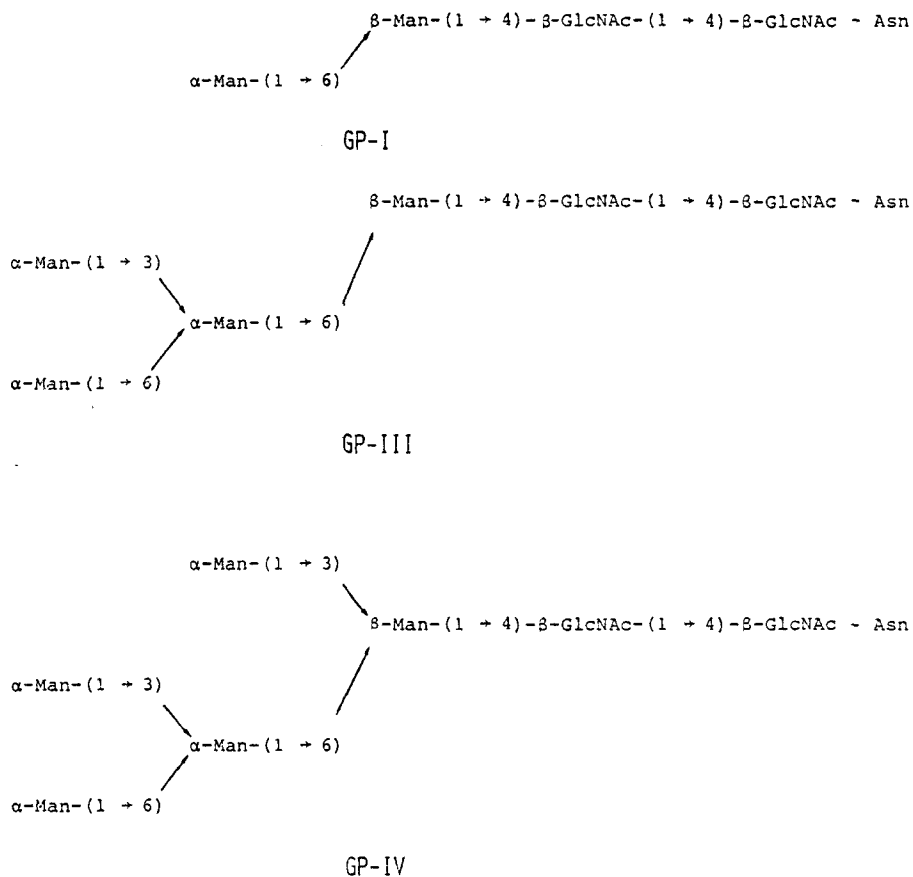


Fig. 6. Structures of the major glycoasparagines present in the urine of a patient with Gaucher's disease (infantile form)

of lysosomal diseases. The same glycopeptides have been found to accumulate in the spleen of a third patient (Michalski and Strecker, unpublished results). These findings are in line with the observation of de Gasperi et al. [6].

The structure of the oligosaccharides and glycopeptides strongly suggest that they are related to incomplete catabolism of *N*-acetylglucosaminic and high-mannose types of carbohydrate chains of glycoproteins. As the α -neuraminidase activity was found to be normal, and the α -mannosidase activity only slightly increased in the serum and fibroblasts of the two siblings, the occurrence of this accumulated material is not due

to a primary enzymatic defect of lysosomal hydrolases, but must be considered to originate from obstruction of lysosomal functioning, probably due to the accumulation of glucocerebroside, which may reach 1% in weight in the spleen, or an interaction of this lipidic material with lysosomal hydrolases inside the lysosome.

The investigation was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (Laboratoire Associé 217: *Biologie physicochimique et moléculaire des glucides libres et conjugués*), the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (contract 78.1.0523), The Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from The Netherlands

Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and The Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF, grant UUKC-OC 79-13).

REFERENCES

1. Brady, R. O., Kanfer, J. N. & Shapiro, D. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 221-225.
2. Patrick, A. D. (1965) *Biochem. J.* 97, 17c.
3. Brady, R. O. (1978) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. & Fredrickson, D. S., eds) pp. 73-76, McGraw Hill Book Company, New York.
4. Ockerman, P. A. & Kohlin, P. (1969) *Clin. Chem.* 15, 61-64.
5. Moffitt, K. D., Chambers, J. P., Diven, W. F., Glew, R. H., Wenger, D. A. & Farrell, D. F. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 247-260.
6. De Gasperi, R., Rapelli, S., Li, Y.-T. & Berra, B. (1981) *Abstracts of the Third E.S.G.L.D. Workshop*, Woudschoten, Zeist.
7. Van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Michalski, J.-C., Montreuil, J., Strecker, G. & Hull, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 121, 65-70.
8. Strecker, G. & Lemaire-Poitau, A. (1977) *J. Chromatogr.* 143, 553-569.
9. Partridge, S. M. (1950) *Biochem. Soc. Symp.* 3, 52-61.
10. Bayard, B., Kerckaert, J. P., Roux, D. & Strecker, G. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.* 27, 153-156.
11. Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304.
12. Hakomori, S. I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205-208.
13. Björndal, H., Hellerquist, C. G., Lindberg, B. & Svensson, S. (1970) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9, 610-619.
14. Yamashita, K., Tachibana, Y. & Kobata, A. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 582-591.
15. Ernst, R. R. (1966) in *Advances in Magnetic Resonance* (Waugh, J. S., ed.) vol. 2, pp. 1-135, Academic Press, London, New York.
16. Strecker, G., Peers, M.-C., Michalski, J.-C., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Farriaux, J. P., Maroteaux, P. & Durand, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 391-403.
17. Vliegthart, J. F. G., Van Halbeek, H. & Dorland, L. (1981) *Pure Appl. Chem.* 53, 45-77.
18. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206-5214.
19. Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Schmid, K., Montreuil, J., Fournet, B. & Hull, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 114, 11-16.
20. Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Montreuil, J., Fournet, B. & Schmid, K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5588-5590.
21. Dorland, L., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. G., Lis, H. & Sharon, N. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7708-7711.
22. Strecker, G., Fournet, B., Montreuil, J., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G. & Dubesset, D. (1978) *Biochimie (Paris)* 60, 725-734.
23. Herlant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G. A. & Vliegthart, J. F. G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300.
24. Yamashita, K., Ohkura, K., Okada, S., Yabuuchi, K. & Kobata, A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4789-4798.
25. Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie (Paris)* 58, 579-586.

J.-C. Michalski, J. Montreuil, and G. Strecker.
Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille,
Boîte postale 36, F-59650 Villeneuve-d'Ascq, Nord, France

B. Cartigny and J.-P. Farriaux, Clinique Pédiatrique, Cité Hospitalière,
2 Place de Verdun, F-59033 Lille-Cedex, Nord, France

H. van Halbeek, L. Dorland, and J. F. G. Vliegthart, Organisch-Chemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit te Utrecht,
Croesestraat 79, NL-3522-AD Utrecht, The Netherlands

STRUCTURE ELUCIDATION OF OLIGOMANNOSIDE-TYPE ASPARAGINE-BOUND CARBOHYDRATE CHAINS OF GLYCOPROTEINS BY 500 MHz ^1H NMR SPECTROSCOPY

H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, G. A. VELDINK, J. F. G. VLIEGENTHART, J.-C. MICHALSKI[†], J. MONTREUIL[†], G. STRECKER[†] and W. E. HULL*

Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, 3522 AD Utrecht, The Netherlands,

[†]Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France and

**Bruker Analytische Messtechnik, GmbH, D-7512 Rheinstetten-Fo., FRG*

Received 15 September 1980

1. Introduction

High-resolution ^1H NMR spectroscopy is an efficient and powerful technique for the structure determination of a wide variety of carbohydrate chains derived from *N*- and *O*-type glycoproteins [1–6]. However, for oligomannoside-type [7] glycopeptides and oligosaccharides from *N*-type glycoproteins the fully discriminative deduction of the primary structure from the ^1H NMR spectrum remained difficult due to the similarity of the constituting units.

The availability of a 500 MHz ^1H NMR spectrometer in conjunction with a more sophisticated computer resolution enhancement routine afforded a significant refinement of the spectral data of *N*-acetyl-lactosamine-type carbohydrate chains of glycoproteins, and the linewidth of the signals in the spectrum was made a useful parameter for structural assignments [5].

This new development opened the possibility to derive the structures of oligomannoside-type carbohydrate chains from their ^1H NMR spectra. This will be illustrated for 3 glycoasparagines isolated from the urine of a patient with Gaucher's disease, a glucocerebrosidase deficiency [8].

2. Materials and methods

The glycopeptides dealt with here were isolated from the urine of a patient suffering from Gaucher's disease, and fractionated in the usual way [7]. Details will be described elsewhere.

The molar ratios of neutral monosaccharides and hexosamines were determined after methanolysis [9]. Molar ratios of glucosamine and aspartic acid were determined on a Beckman amino acid analyzer, after hydrolysis in 4 N CF_3COOH for 4 h at 100°C.

For NMR spectroscopy the glycopeptides were repeatedly exchanged in D_2O (99.96 atom% D, Aldrich) with intermediate lyophilization.

The 500 MHz ^1H NMR spectra of neutral solutions of the compounds were recorded on a Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts are given relative to sodium-2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate (indirectly to acetone in D_2O : $\delta = 2.225$ ppm). Resolution enhancement of the 500 MHz spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation according to [10].

3. Results and discussion

From the urine of a patient with Gaucher's disease 3 major glycopeptides were isolated. Sugar and amino acid analyses revealed that only mannose, *N*-acetylglucosamine and asparagine were present in these compounds.

To elucidate the primary structures of the glycoasparagines, 500 MHz ^1H NMR spectra of the compounds in D_2O were recorded. The structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz ^1H NMR spectra of the 3 glycopeptides, viz. the signals of the anomeric protons, the mannose H-2 resonances and the *N*-acetyl proton singlets are given in fig. 1–3. In view of their molar carbohydrate com-

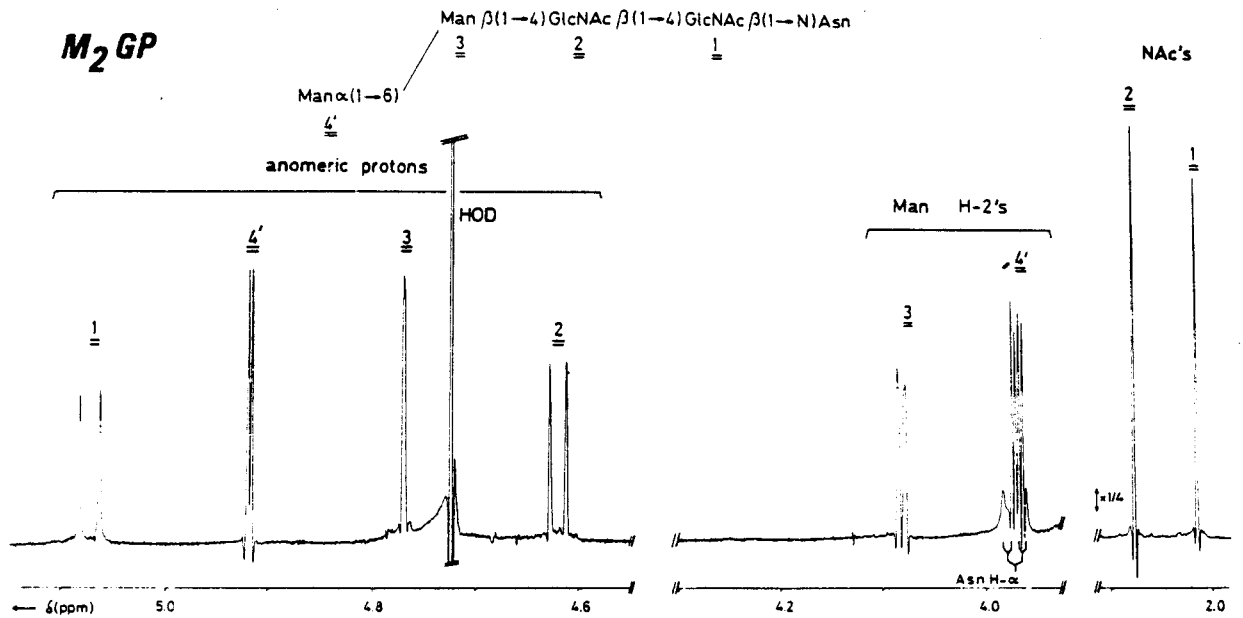


Fig.1. Structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz ¹H NMR spectrum of M₂GP, a glycoasparagine containing 2 mannoses, in D₂O at 300 K. The numbers in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative intensity scale of the *N*-acetyl proton region differs from that of the other parts of the spectrum as indicated.

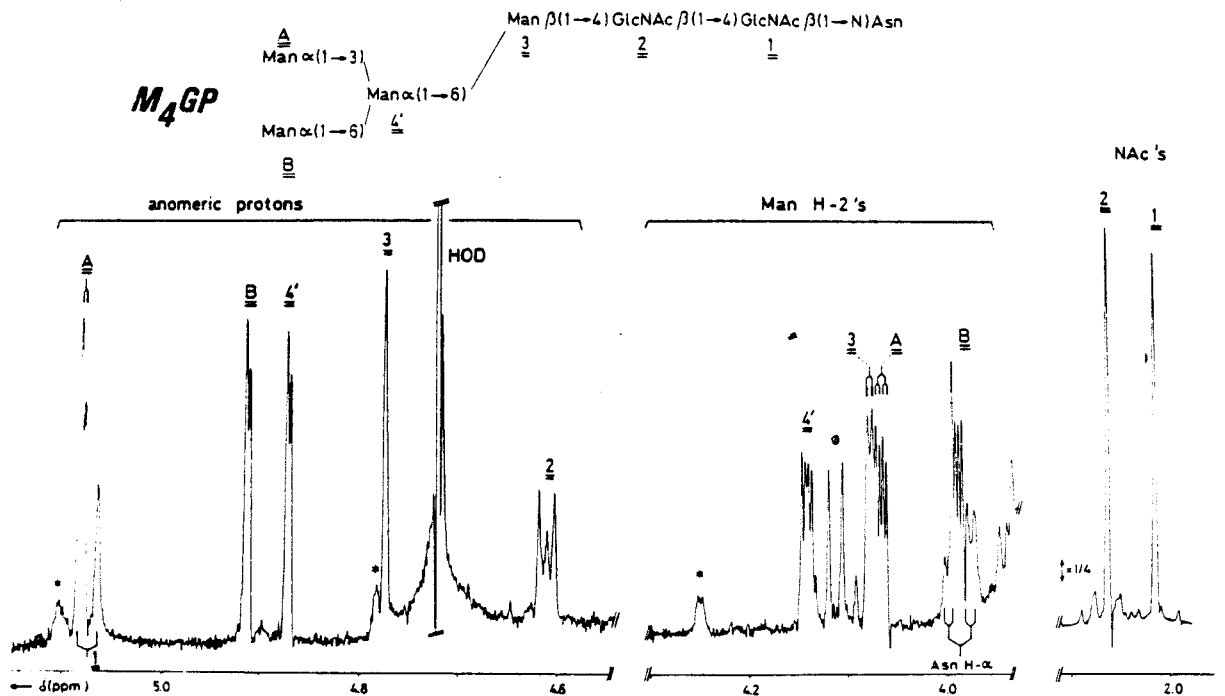


Fig.2. Structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz ¹H NMR spectrum of M₄GP, a glycoasparagine of the oligomannoside type containing 4 mannoses, in D₂O at 300 K. The numbers and letters in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative intensity scale of the *N*-acetyl proton region differs from that of the other parts of the spectrum as indicated. The spectrum shows signals of low intensity stemming from contaminants with related carbohydrate structures; those marked by asterisks belong to M₂GP. The quartet at $\delta \approx 4.11$ ppm, indicated by ϕ , stems from a non-carbohydrate non-protein contaminant (see also fig.4).

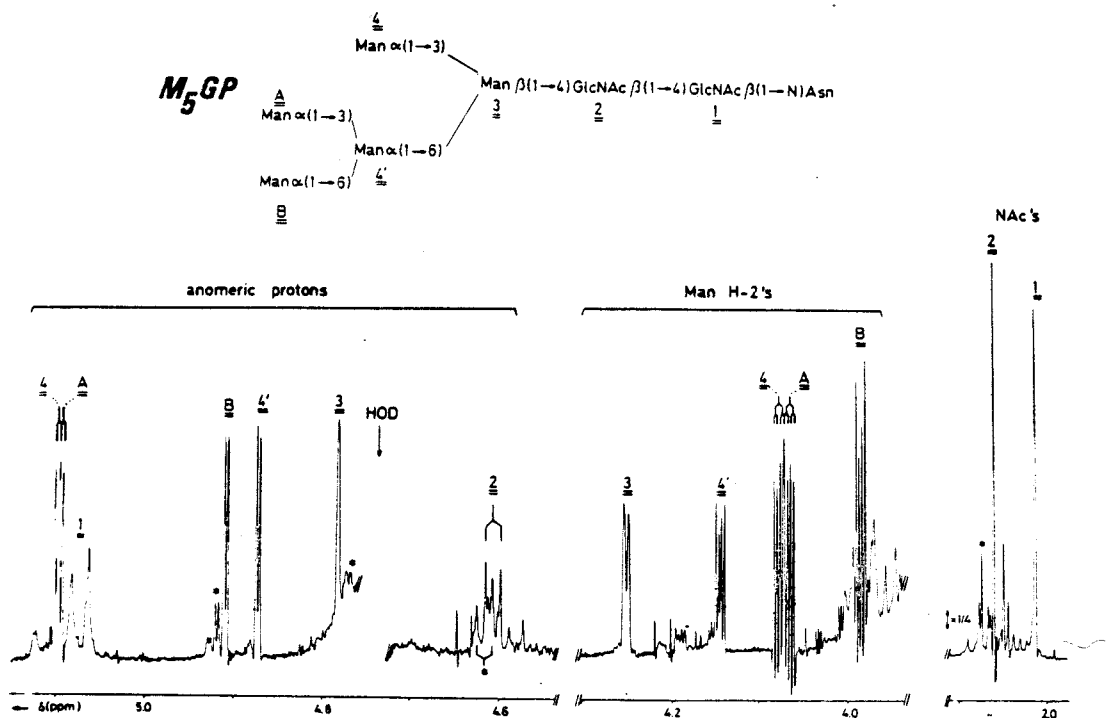


Fig.3. Structural reporter group regions of the resolution-enhanced 500 MHz ¹H NMR spectrum of M₅GP, a glycoasparagine of the oligomannoside type containing 5 mannoses, in D₂O at 300 K. The numbers and letters in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative intensity scale of the *N*-acetyl proton region differs from that of the other parts of the spectrum as indicated. The HOD-resonance is left out from the spectrum; its position is indicated by an arrow. Compound M₂GP is present in small amount in the sample (see signals marked by asterisks), which contains a few other low amount carbohydrate contaminants.

positions, estimated by integration of the anomeric proton regions of their ¹H NMR spectra (see table 1), the glycopeptides are designated with subscripts after their mannose content M₂GP, M₄GP and M₅GP. As an example for the 3 compounds, the overall spectrum of M₄GP is depicted in fig.4. Relevant NMR parameters for the 3 glycopeptides are listed in table 2.

Comparison of the 500 MHz ¹H NMR spectra of M₂GP, M₄GP and M₅GP reveals that the resonance positions as well as the patterns of the signals belonging to corresponding anomeric protons (at δ ≈ 5.07 ppm; J_{1,2} = 9.8 Hz and at δ ≈ 4.61 ppm; J_{1,2} = 8.2 Hz) and to corresponding *N*-acetyl methyl proton (at δ ≈ 2.01 and ≈ 2.06 ppm) of the GlcNAc residues 1 and 2, respectively, are identical. The same holds for the asparagine proton signals (δH-α ≈ 3.98 ppm; δH-β ≈ 2.86 ppm and δH-β' ≈ 2.93 ppm). These similarities in the spectra indicate that the glycopeptides have in common the (●→4)GlcNAcβ(1→4)-

GlcNAcβ(1→N)Asn moiety, as usual for *N*-glycosidic carbohydrate structures [5].

The two additional mannose residues of M₂GP can be characterized as follows. The anomeric proton resonating at δ = 4.767 ppm belongs to the β-linked

Table 1
Carbohydrate and amino acid compositions of three oligomannoside-type glycopeptides isolated from Gaucher's disease urine^a

| Constituent | Glycopeptides | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | M ₂ GP | M ₄ GP | M ₅ GP |
| Mannose | 2 | 4 | 5 |
| <i>N</i> -Acetylglucosamine | 2 | 2 | 2 |
| Asparagine | 1 | 1 | 1 |

^a The molar compositions were estimated by means of NMR spectral integration, on the basis of one residue of asparagine

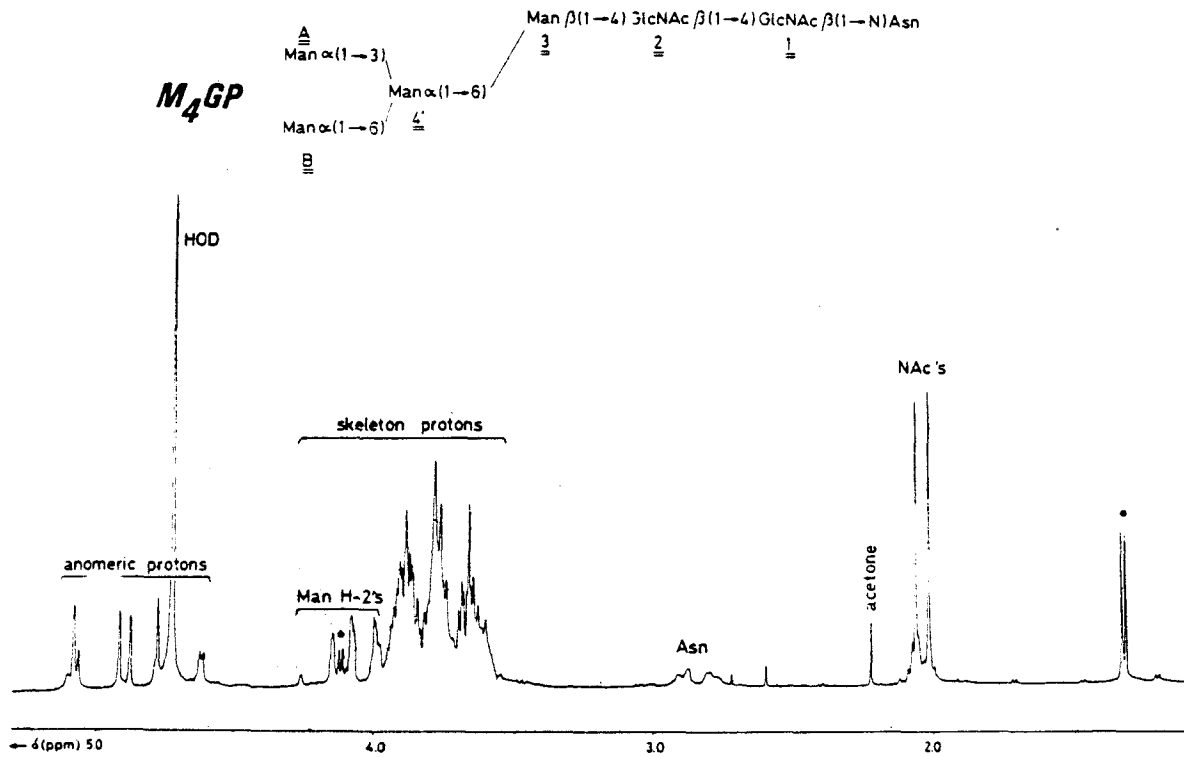


Fig.4. The overall 500 MHz ¹H NMR spectrum of M₄GP, a glycoasparagine of the oligomannoside type containing 4 mannoses, in D₂O at 300 K. The quartet at δ ≈ 4.11 ppm, together with the doublet at δ ≈ 1.32 ppm, indicated by φ, stem from a non-carbohydrate non-protein contaminant.

Man 3 (cf. [11]). Its coupling constant $J_{1,2}$ (≈ 0.6 Hz) is indicative of the β -type of linkage between Man 3 and GlcNAc 2. The relatively small value of $J_{1,2}$ gives rise to an apparent broad lined singlet for H-1, which can easily be distinguished from the well-resolved doublet of H-1 of an α -linked mannose residue [5].

The chemical shift of H-2 of Man 3 for compound M₂GP ($\delta = 4.080$ ppm) reflects a mono- $\alpha(1\rightarrow6)$ -substitution of Man 3 by another mannose, which is usually numbered Man 4'. Type and configuration of the Man→Man linkage in M₂GP are proved to be $\alpha(1\rightarrow6)$ by the chemical shift of the H-1 of Man 4' ($\delta = 4.915$ ppm) [11,12] and its $J_{1,2}$ (1.8 Hz) [5]. In accordance with the terminal position of Man 4' the chemical shift of its H-2 is $\delta = 3.968$ ppm. It should be noted that in more complex structures possessing this element this H-2 signal is buried in the bulk of non-anomeric sugar skeleton protons, as in [11,12]. The signals of the (structural reporter group) protons of Man 4' are marked by relatively narrow linewidths, corresponding with the expected mobility


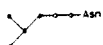
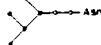
of the residue. The structure of M₂GP as given in fig.1 is the afuco-analogue of a glycoasparagine isolated from the urine of a patient with fucosidosis [11].

In the spectrum of M₄GP (fig.2) the signals at $\delta = 4.770$ ppm (H-1) and at $\delta = 4.076$ ppm (H-2) point again to a mono- $\alpha(1\rightarrow6)$ -substitution of Man 3. Therefore M₄GP contains Man 4'. The well-resolved doublet at $\delta = 4.909$ ppm ($J_{1,2} = 1.8$ Hz) and the narrow doublet of doublets at $\delta = 3.988$ ppm closely resemble the Man 4' structural reporter group signals in the spectrum of M₂GP, also with respect to their linewidths. Therefore, a terminal $\alpha(1\rightarrow6)$ -linked mannose residue is present in M₄GP, designated Man B.

The H-1 doublet at $\delta = 5.076$ ppm ($J_{1,2} = 1.8$ Hz), in conjunction with the H-2 resonance at $\delta = 4.064$ ppm, are characteristic for a terminal mannose, $\alpha(1\rightarrow3)$ -linked to another mannose residue, as can be derived from earlier observations, for example, Man 4 in the monosialo-oligosaccharide NeuAc $\alpha(2\rightarrow6)$ -Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow2)$ Man $\alpha(1\rightarrow6)$ [Man $\alpha(1\rightarrow3)$]-

Table 2

¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for three oligomannoside-type glycopeptides isolated from Gaucher's disease urine

| Reporter group | Residue ^a | Compound and schematic structure ^b | | |
|----------------|--|---|---|---|
| | | M ₂ GP | M ₄ GP | M ₅ GP |
| | |  |  |  |
| H-1 of | $\begin{cases} \underline{1} \\ \underline{2} \end{cases}$ | 5.071 4.618 | 5.069 4.608 | 5.071 4.606 |
| NAc of | $\begin{cases} \underline{1} \\ \underline{2} \end{cases}$ | 2.014 2.076 | 2.013 2.061 | 2.012 2.060 |
| H-1 of | $\begin{cases} \underline{3} \\ \underline{4} \end{cases}$ | 4.767 — | 4.770 — | 4.781 5.099 |
| | $\begin{cases} \underline{4}' \\ \underline{A} \\ \underline{B} \end{cases}$ | 4.915 — — | 4.870 5.076 4.909 | 4.872 5.093 4.908 |
| | $\begin{cases} \underline{3} \\ \underline{4} \end{cases}$ | 4.080 — | 4.076 — | 4.251 4.077 |
| | $\begin{cases} \underline{4}' \\ \underline{A} \\ \underline{B} \end{cases}$ | 3.968 — — | 4.140 4.064 3.988 | 4.144 4.066 3.985 |

^a For coding of monosaccharide residues and complete structures see fig.1-3

^b (●—) Mannose; (○—) *N*-acetylglucosamine

Man β (1→4)GlcNAc, isolated from human meconium [12] and Man 4 in the trisaccharide Mana(1→3)-Man β (1→4)GlcNAc [13]. The α (1→3)-linked mannose residue in M₄GP cannot be attached to Man 3, since the latter is mono- α (1→6)-substituted, nor to Man B which is a terminal residue. The fourth mannose in M₄GP, designated Man A, must therefore be attached to C-3 of Man 4'.

The H-1 signal of Man 4' is found at $\delta = 4.870$ ppm ($J_{1,2} = 1.8$ Hz). The presence of an α (1→3)-linked mannose residue hardly influences the resonance position of the H-1 of the residue to which it is attached (cf. [5] vs. [11]). The observed shift decrement for H-1 of Man 4', as compared to M₂GP, $\Delta\delta = -0.045$ ppm, must therefore be ascribed to the substitution of this residue at C-6. A similar shift decrement is observed for H-1 of Man 4' in the step from tri- to tetra-antennary glycopeptide of the *N*-acetyl-lactosamine type [5], involving extension with a

Gal β (1→4)GlcNAc moiety, β (1→6)-linked to Man 4'. In contrast, the shift increment for H-2 of Man 4' as compared to M₂GP, can be attributed to the attachment of Man A. A similar shift increment is observed for H-2 of Man 3 extending M₂GP to the meconium oligosaccharide described above [12]. An α (1→6) substitution of one mannose by another hardly affects the former's H-2 chemical shift [2]. The above findings lead to the structure for M₄GP shown in fig.2.

The 500 MHz ¹H NMR spectrum of M₅GP (fig.3) differs in the region of the anomeric proton signals from that of M₄GP (fig.2) only by the occurrence of an additional doublet at $\delta = 5.099$ ppm ($J_{1,2} = 1.9$ Hz). This suggests that M₅GP is an extension of M₄GP with another terminal α (1→3)-linked mannose residue. The residue to which this fifth mannose is attached, can be inferred from the chemical shifts of the mannose H-2s. The characteristically-shaped H-2 signal of the β -Man 3 is shifted from $\delta = 4.076$ ppm to $\delta = 4.251$ ppm going from the spectrum of M₄GP to M₅GP, indicating a further substitution of Man 3 at C-3. The other H-2 signals remain at essentially the same positions and an additional H-2 resonance is found at $\delta = 4.077$ ppm. By consequence, the fifth mannose residue in M₅GP is identified as Man 4, α (1→3)-linked to Man 3. The chemical shifts of H-1 and H-2 of this Man 4 are essentially the same as those described for the terminal Man 4 in the trisaccharide Mana(1→3)Man β (1→4)GlcNAc [13]. The set of chemical shifts of H-1 and H-2 of Man 3 in M₅GP reflect the completeness of the trimannosyl (3, 4, 4')-*N,N'*-di-acetylchitobiose-Asn core (cf. [5]). The observed change of the chemical shift of H-1 of Man A, going from M₄GP to M₅GP, is remarkable; it may reflect a spatial effect. The δ -values of the anomeric protons and the H-2s of the 2 terminal α (1→3)-linked mannose residues are very similar (cf. [14]). The most likely assignment has been given in table 2.

The structure of M₅GP proposed on the basis of its NMR data, is given in fig.3.

4. Concluding remarks

The resolution-enhanced 500 MHz ¹H NMR spectra of 3 glycoasparagines isolated from the urine of a patient with Gaucher's disease, could be interpreted in terms of complete primary structures of these

compounds. In fact, the proposed structures are mainly based upon interpretation of the sets of chemical shift values of H-1s and H-2s of constituting mannose residues. Such data are in fact sensitive to the type and configuration of the glycosidic linkage of the mannose residue and to the position of mannose in the chain.

This study provided us with the NMR characteristics of the second branching point (A-4'-B), also occurring in more complex oligomannoside-type structures; it thereby disclosed this type of carbohydrate chains for high-resolution ¹H NMR structural analysis.

For biosynthetic studies the non-destructive identification of partial structures, as shown in [15], is quite helpful. Now this seems also to be possible for oligomannoside-type carbohydrate structures.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF, grant UUKC-OC 79-13), the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé no. 217: Biologie physicochimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contract no. 78.1.0523). J.-C. M. is Attaché de Recherche de l'INSERM; G. S. is Maître de Recherche de CNRS.

References

- [1] Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. and Schmid, K. (1978) *Biochemistry* 17, 5206-5214.
- [2] Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Strecker, G., Michalski, J.-C., Fournet, B., Spik, G. and Montreuil, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 323-329.
- [3] Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Fiat, A.-M. and Jollès, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 623, 295-300.
- [4] Vliegthart, J. F. G., Van Halbeek, H. and Dorland, L. (1980) in: *IUPAC 27th Int. Congr. Pure and Applied Chemistry, Helsinki 1979* (Varmavuori, A. ed) pp. 253-262, Pergamon, Oxford.
- [5] Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Schmid, K., Montreuil, J., Fournet, B. and Hull, W. E. (1980) *FEBS Lett.* 114, 11-16.
- [6] Van Halbeek, H., Dorland, L., Haverkamp, J., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Fournet, B., Ricart, G., Montreuil, J. and Aminoff, D. (1980) submitted.
- [7] Strecker, G. and Montreuil, J. (1979) *Biochimie* 61, 1199-1246.
- [8] Brunngraber, E. G. (1979) in: *Glycoproteins and glycolipids in disease processes* (Walborg, E. F. jr, ed) p. 143, Am. Chem. Soc., Washington.
- [9] Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatog.* 69, 291-301.
- [10] Ernst, R. R. (1966) in: *Advances in Magnetic Resonance* (Waugh, J. S. ed) vol. 2, pp. 1-135, Academic Press, London, New York.
- [11] Strecker, G., Fournet, B., Montreuil, J., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G. and Dubesset, D. (1978) *Biochimie* 60, 725-734.
- [12] Herlant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G. A. and Vliegthart, J. F. G. (1980) *Eur. J. Biochem.* in press.
- [13] Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. and Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* 77, 15-20.
- [14] Narasimhan, S., Harpaz, N., Longmore, G., Carver, J. P., Grey, A. A. and Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4876-4884.
- [15] Van den Eijnden, D. H., Joziase, D. H., Dorland, L., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. G. and Schmid, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 839-845.

CONCLUSION

L'analyse de l'urine de différents malades atteints de maladie de Gaucher, nous a donc permis de mettre en évidence une excrétion anormale d'oligosaccharides et de glycopeptides pouvant être directement rattachés aux structures glycaniques présentent dans les glycoprotéines sériques ou tissulaires.

Le taux d'excrétion de ces composés n'est toutefois en rien comparable à celui enregistré dans les autres maladies de surcharge lysosomale (environ 10 fois moins élevé). Il est vraisemblable que cette excrétion ait pour origine une perturbation des activités glycosidiques suite à un encombrement des lysosomes par le glucosylcéramide. L'excrétion de sialyloligosaccharides, en tout point identique à celle enregistrée dans les sialidoses, est vraisemblablement due à une inhibition de l'activité neuraminidase par le glycosphingolipide accumulé. Il est à noter que comme dans la plupart des glycoprotéinoses, l'abolition de l'activité exoglycosidase est palliée par l'action d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase, capable ici de libérer des oligosaccharides sialylés.

L'excrétion de glycopeptides mannosylés est quant à elle plus énigmatique. En effet, cette excrétion est à ce jour spécifique de la maladie de Gaucher et n'est pas enregistrée dans d'autres maladies de surcharge, comme la mannosidose en particulier. Cette excrétion pourrait s'expliquer par une inhibition spécifique de la N-acétylglucosaminyltransférase I, dont l'action est nécessaire à l'élongation des chaînes glycaniques et à leur évolution vers le type mannosidique (HARPAZ et SCHACHTER 1980 (611)). Le fait que la structure mannosidique limite est constituée par le glycopeptide à 5 mannosés servant de substrat à l'enzyme, serait en faveur de cette hypothèse. Une autre explication pourrait venir de l'hyperactivité hexosaminidase telle qu'elle est enregistrée chez certains malades (MOFFITT et al. 1978 (612)). Comme dans le cas de la mannosidose, ces deux hypothèses sont en faveur d'une origine biosynthétique pour ces composés.

Du point de vue structural, il est à noter que ces glycopeptides ont permis d'étalonner l'appareil de RMN à 500 MHz, en vue de l'établissement des premières structures glycaniques de type oligomannosidique.

En conclusion, il est vraisemblable que de tels types de dérèglements secondaires de la machinerie enzymatique du lysosome existent dans d'autres glycosphingolipidoses ou mucopolysaccharidoses. L'analyse des catabolites urinaires est une fois de plus, l'un des meilleurs moyens pour les détecter.

MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDURIE ACCOMPAGNANT DIFFERENTS TYPES D'EPILEPSIE MYOCLONIQUE

Des lésions du système nerveux central (CNS) sont enregistrées dans plus de 1/4 des maladies de surcharge lysosomale (BIRD et HALL 1977 (613) ; ELRIDGE 1980 (614)) ; les neurologues sont de ce fait en position favorable pour faire progresser notre savoir dans le domaine des maladies héréditaires, et en particulier pour décrire de nouvelles formes de maladies métaboliques de surcharge. Les maladies atteignant le métabolisme des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines structurales, et plus encore des gangliosides, interfèrent fortement avec le développement normal du cerveau et entraînent de ce fait un retard mental et psychomoteur. L'ataxie, les crises épileptiques, l'atteinte du système nerveux périphérique et du tractus pyramidal seront généralement de règle chez les malades. Cependant, il est généralement difficile de corrélér une maladie neurologique avec une hypothétique déficit génétique. Un certain nombre de tests simples de laboratoire permettent cependant d'orienter le diagnostic ; nous avons en particulier appliqué la méthode de dépistage des oligosacchariduries par chromatographie couche mince à différents malades atteints de troubles neurologiques pouvant évoquer une maladie métabolique. Ce type de recherches nous a permis de mettre en évidence une excrétion urinaire anormale de glycopeptides ou d'oligosaccharides dans deux cas différents d'épilepsie myoclonique.

I - MISE EN ÉVIDENCE D'UNE N-GLYCOPEPTIDURIE DANS UN CAS
D'ÉPILEPSIE MYOCLONIQUE JUVÉNILE

Dans un premier cas les signes neurologiques associés à des caractères histologiques évocateurs, tels les lymphocytes vacuolés, la surcharge intralysosomale, laissaient fortement présumer une maladie métabolique de surcharge. L'analyse urinaire met en évidence une excrétion anormale de composés glucidiques de poids moléculaire relativement élevé totalement absents dans l'urine normale et pouvant être partiellement purifiés par gel filtration, (ARTICLE 14).

Work in Progress

Glycopeptidosis: A New Inherited Disorder of Glycoconjugate Metabolism Affecting the Central Nervous System

A. FEDERICO, G. GUAZZI and C. FRUSCHELLI

Institutes of Neurological Sciences and Histology, Medical School, University of Siena, Piazza Duomo 2, 53100 Siena, Italy

G. PALLADINI and L. MEDOLOAGO-ALBANI

Institute of Biology, Medical School, University of Rome, Italy

J. C. MICHALSKI and G. STRECKER

Institut de Chimie Biologique, Faculté des Sciences et Techniques, Villeneuve d'Asq, France

A patient with progressive neurological deterioration and myoclonus epilepsy showed an increased excretion of glycoprotein in the urine and storage material in lymphocytes and fibroblasts. This is probably a new disorder of glycoprotein metabolism.

The association of progressive myoclonus epilepsy and disorders of glycoprotein metabolism has been recently reported in several articles (Durand *et al.*, 1977; Federico *et al.*, 1977, 1980; Thomas *et al.*, 1978; Rapin *et al.*, 1978). The clinical heterogeneity of such syndromes has been emphasized (Lowden and O'Brien, 1979). We report a clinical, microscopical and biochemical study of a patient of 18 years of age affected by progressive myoclonus epilepsy and with an abnormal urinary glycopeptide excretion.

CASE REPORT

Fal. Raffaella, female, born after a consanguineous marriage, showed a normal psychomotor development until 10 years, when epileptic seizures and attention troubles appeared. At 14 years she developed action myoclonus and at 16 years status epilepticus. At 18 years of age neurological examination showed nystagmus, hypotonus, ataxia, oculomotor apraxia, action myoclonus, hyperactive deep tendon reflexes with bilateral

Babinski sign and moderately severe mental deterioration. Fundus oculi and ERG were normal. The EEG showed slow diffuse disregulation of cerebral electric activity with subcontinuous explosion of spike-wave



Figure 1 Bone marrow lymphocyte with intracellular vacuoles ($\times 2500$)



Figure 2 Fibrocyte from skin biopsy showing, by electron microscopy, cytoplasmic vacuoles containing microgranular material ($\times 23000$)

complexes. Computerized axial tomography and routine laboratory examinations, including amino acids and mucopolysaccharides, revealed no abnormality.

RESULTS AND DISCUSSION

Microscopic examination of bone marrow cells showed the presence of intracellular vacuoles in lymphocytes (Figure 1). The electron microscopic appearance of muscle biopsy was normal. Skin biopsy, on electron microscopy, showed numerous vacuoles containing granular material in the fibrocytes (Figure 2). Ultra-structural observation of *erector pili* muscle showed fibrillar disorganization and storage of microgranular material (Figure 3).



Figure 3 *Erector pili* muscle, by electron microscopy, showing fibrillar disorganization and storage of granular electron dense material ($\times 19000$)

Thin layer chromatography for urinary oligosaccharides revealed an increase of low molecular weight material. After sequential gel filtration on Biogel P2 and Biogel P30 (Figure 4) of patient's urine, five glycopeptidic fractions, never found in normal urine, have been isolated. In normal subjects urinary glycopeptide amounts to 80–120 mg/l. In our case 350 mg/l of glycopeptides were excreted in the urine. Sugar analysis of the five isolated fractions are reported in Table 1. Amino acids present were aspartic acid, serine, threonine, glycine and alanine.

The histological and electron microscopic findings of bone marrow cells, skin fibrocytes and *erector pili* muscle and the abnormal urinary glycopeptide excretion suggest that this case is affected by a disorder of glycoprotein metabolism never reported in the literature. Neuraminidase and other lysosomal enzyme activities did not show any significant change.

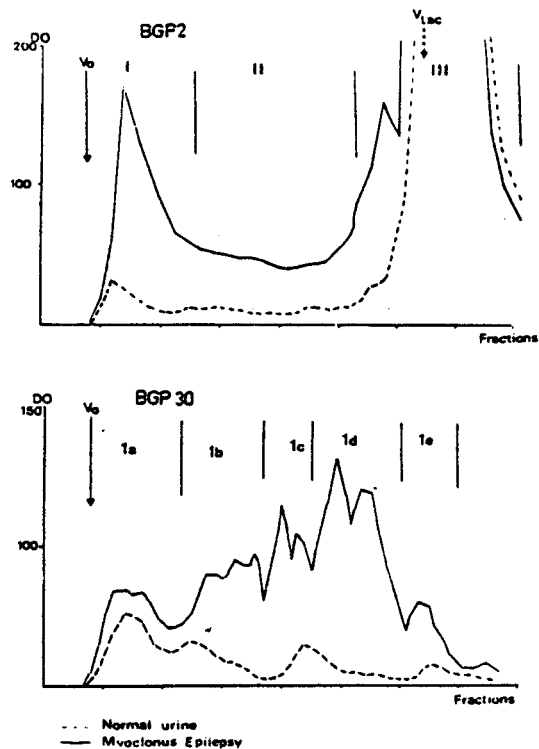


Figure 4 Purification of urinary glycopeptides by gel filtration on Biogel P2 (2.5×100 cm) 200–400 mesh and Biogel P30 (1×100 cm). Peak 1 in normal urine. 80–120 mg/l; in the patient's urine 350 mg/l

References

Durand, P., Gatti, R., Cavaliere, S., Borrone, C., Tondeur, M., Michalski, J. M. and Strecker, G. Sialidosis (Mucopolipidosis I). *Helv. Paediatr. Acta* 32 (1977) 391–400
 Federico, A., Guazzi, G. C. and Strecker, G. Cherry-red spot and abnormal urinary excretion of sialyl-oligosaccharides. *Hum. Hered.* 27 (1977) 174
 Federico, A., Cecio, A., Apponi-Battini, G., Michalski, J. C., Strecker, G. and Guazzi, G. C. Macular cherry-red spot and myoclonus syndrome (juvenile form of sialidosis). *J. Neurol. Sci.* 48 (1980) 157–169
 Lowden, J. A. and O'Brien, J. S. Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 31 (1979) 1–18
 Rapin, I., Goldfisher, S., Katzman, R., Engel, J. and O'Brien, J. S. The cherry-red spot myoclonus syndrome. *Ann. Neurol.* 3 (1978) 234–242
 Thomas, G. H., Tipton, R. E., Chien, L. T., Reynolds, L. W. and Miller, C. S. Sialidase deficiency. *Clin. Genet.* 13 (1978) 369–379

Table 1 Sugar analysis of glycopeptides purified from the urine of Fal. Raffaella by gel filtration on Biogel P2 and Biogel P30 (see Figure 4 for definition of the fractions)

| Peak | mg/l | Molar ratio on the basis of 3-mannose residues/molecule | | | | | | % by weight of sugars |
|------|------|---|------|-----|--------|--------|-------|-----------------------|
| | | Fuc | Gai | Man | GlcNAc | GalNAc | NeuAc | |
| 1a | 87 | 1.7 | 7.38 | 3 | 5.83 | 3.6 | 5.28 | 31 |
| 1b | 47 | 1.4 | 3.47 | 3 | 5.65 | 0.87 | 2.84 | 91 |
| 1c | 26 | 1.56 | 3.86 | 3 | 6.1 | 1.1 | 3.36 | 93 |
| 1d | 54 | 1.40 | 3.47 | 3 | 5.6 | 0.86 | 2.84 | 88 |
| 1e | 77 | 1.76 | 6.80 | 3 | 5.14 | 2.60 | 7.90 | 37.5 |

La composition molaire des différentes fractions isolées, fait tout d'abord apparaître une certaine hétérogénéité ; la présence simultanée de mannose et de N-acétylgalactosamine en particulier, vaut en faveur d'un mélange de glycopeptides respectivement de type N- et O-glycosidiques. Le fait notable est toutefois la forte proportion en sucre des composés 1b, 1c et 1d. L'analyse en acides aminés réalisée ultérieurement fait apparaître la présence presque exclusive de la seule asparagine dans ces fractions.

Nous sommes donc vraisemblablement en présence de glycoasparagines souillés de O-glycopeptides également présents dans l'urine normale.

Il est difficile de corrélérer cette excrétion normale avec un possible déficit en exoglycosidase intervenant dans le catabolisme des chaînes oligosaccharidiques des N-glycoprotéines, d'autant que l'activité α -neuraminidase s'est avérée normale. Si toutefois, on admet que le catabolisme des chaînes osidiques des N-glycoprotéines débute par l'action de protéases suivi de l'action d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase spécifique, il est possible de considérer un dysfonctionnement de cette dernière enzyme comme responsable de l'accumulation anormale de N-glycopeptides enregistrée au cours de cette maladie.

II - MISE EN ÉVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDURIE ASSOCIÉE À UN CAS D'ENCÉPHALOPATHIE MYOCLONIQUE PRÉCOCE AVEC ÉPILEPSIE

Les encéphalopathies épileptiques du nouveau-né sont très polymorphes du point de vue clinique. Toutefois, DALLA-BERDINA et al. 1982 (615) rapportent plusieurs observations de nouveaux-nés présentant les tableaux chimiques d'encéphalopathie épileptique avec des caractères cliniques identiques et un même profil encéphalographique. Dans tous les cas l'évolution de la maladie se traduit par une détérioration neurologique progressive conduisant à la mort au bout de quelques mois. Aucune malformation cérébrale n'étant à noter chez les parents, l'hypothèse d'une maladie métabolique fut nuancée.

A - OBSERVATION CLINIQUE

A.T... était le premier enfant de parents non consanguins. Une tante paternelle aurait souffert d'une encéphalopathie congénitale non identifiée. Après une grossesse et un accouchement normal, l'enfant apparaît normal à la naissance. A 4 jours, il développe de fréquentes myoclonies des membres et une hypothermie axiale. A 10 jours, l'enfant entre dans un état comateux et présente de brèves et fréquentes convulsions. L'E.E.G. est tout à fait anormal et caractérisé par une désorganisation complète de l'activité de fond et par la présence d'une part de très nombreuses anomalies multifocales ayant une tendance nette à la diffusion.

Aucune dysmorphie n'est à noter. L'examen en microscopie électronique du tissu hépatique montre la présence de très nombreuses inclusions osmiophiles dans le cytoplasme. Ces inclusions sont en nombre variable suivant les cellules, d'aspect circulaire d'environ 1 μ m de diamètre. L'examen à plus fort grossissement montre que ces inclusions sont limitées par une membrane, suggérant leur origine lysosomale. Le contenu opaque des inclusions donne d'autre part une réaction positive au P.A.S., en faveur d'une constitution de nature glucidique. L'état de détérioration neurologique évolue vers une issue fatale à l'âge de 40 jours.

L'examen après autopsie met en évidence une hépatomégalie. Le cerveau est d'aspect normal avec toutefois des modifications morphologiques de certaines cellules. Aucune surcharge cellulaire n'est décelée au niveau du cerveau. Ce dernier point contraste curieusement avec la symptomatologie neurologique enregistrée.

En conclusion, il semble que l'atteinte prédominante soit d'origine hépatique.

B - ETUDE DE L'OLIGOSACCHARIDURIE

Les données cliniques et histologiques donnaient de fortes présomptions en faveur d'une maladie métabolique.

Le test de dépistage des oligosacchariduries par chromatographie couche mince appliquée à l'urine des patients, met en évidence une nette surcharge oligosaccharidique. Trois composés majeurs peuvent en particulier être mis en évidence dans l'urine du malade. L'isolement et l'étude structurale de ces oligosaccharides est rapportée dans l'ARTICLE 15.

Clinica Chimica Acta, 137 (1984) 43-51
Elsevier

CCA 02757

Abnormal galactoside excretion in urine of a patient with early myoclonic epileptic encephalopathy

Jean-Claude Michalski^a, Stéphane Bouquelet^a, Jean Montreuil^a, Gérard Strecker^{a,*}, Olivier Dulac^b and Arnold Munnich^b

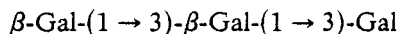
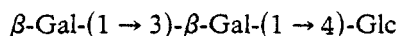
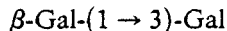
^a *Laboratoire de Chimie Biologique, L.A. CNRS No. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq (France)* and ^b *Hôpital Saint Vincent de Paul, Service de Neuropédiatrie, 75674 F-Paris Cedex 14 (France)*

(Received June 17th; revision September 27th, 1983)

Key words: Urinary oligosaccharide; Galactoside; Encephalopathy; Lysosomal storage disease

Summary

An abnormal carbohydrate pattern was found in urine of a patient with early myoclonic epileptic encephalopathy. Three major oligosaccharides have been isolated from the urine; structural studies including sugar analyses, methylation procedure and enzymatic hydrolysis allow us to propose the following structures:



Such oligosaccharide structures have not previously been described in any biological fluid. The origin of these compounds, and the possibility of a specific metabolic defect are discussed.

Introduction

Normal urine contains a large number of glycopeptides and oligosaccharides. These compounds represent products of biosynthesis and degradation, and most of them can be related to the ABO and secretor status of individuals [1,2]. In the last few years, a number of different genetic defects of lysosomal glycosidases have been

* To whom correspondence should be sent.

Abbreviations: Glc, D-glucose; Gal, D-galactose; Me, methyl group; [²H]₄NaB, sodium borodeuteride; TLC, thin layer chromatography; GC-MS, gas liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

found in man, and it is known that the urinary carbohydrate material is increased in such pathological conditions [3]. Most of these diseases are characterised by severe neurological symptoms [4]. Recently, various cases of 'early myoclonic epileptic encephalopathy' with a lethal outcome after the first few months have been described [5-7]. The possibility of a metabolic defect in these syndromes has been advanced [7]. In the present report, we have investigated the urinary material from a 2-week old patient suffering from this type of myoclonic and convulsive syndrome. No skeletal dysmorphism nor storage vesicles in tissues were noted (the clinical aspect will be described elsewhere). The direct analysis of urine by a thin layer chromatographic method showed an abnormal excretion of carbohydrate material. We report here detailed structural analysis of the major accumulated urinary oligosaccharides which have not previously been described; the possibility of a specific enzymatic defect in the disease is advanced.

Experimental procedure

Urine fractionation

A sample of urine (100 ml) was filtered on glass wool and applied directly to a charcoal/celite column (3 × 20 cm). The column was washed with water and then eluted with 2 l of 50% ethanol. The ethanolic solution was reduced to about 20 ml by rotatory evaporation and directly applied to a Dowex 50-X2 (200-400 mesh, H⁺ form) column (2 × 30 cm) connected in series to a Dowex 1 × 2 (200-400 mesh, CH₃COO⁻ form) column (2 × 30 cm). The columns were washed with 1 l of distilled water. The eluent (neutral fraction), was concentrated to about 2 ml and applied to a Biogel P₂ (200-400 mesh) column (1.5 × 100 cm, eluent distilled water, flow rate 0.30 ml/min). Fractions obtained after gel chromatography were analysed by descending paper chromatography in ethyl acetate/pyridine/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.) (solvent 1) or *n*-butanol/acetic acid/water (4:1:5, by vol.) (solvent 2). Papers were stained with aniline oxalate reagent [8]. Pure oligosaccharides were obtained by preparative paper chromatography in the same solvent systems.

Structural methods

The molar carbohydrate composition of isolated compounds was determined [9] after methanolysis with 0.5 mol/l HCl in methanol, for 24 h at 80°C. The oligosaccharides were reduced with [2H]₄NaB and permethylated [10]. After extraction with chloroform, the permethylated compounds were purified by passing through a Silica gel column (0.5 × 5 cm) (Kieselgel, 70-325 mesh, Merck, Darmstadt, FRG). The column was washed with 5 ml of chloroform and eluted with 5 ml of methanol/chloroform (5:45, v/v) [11]. The partially O-methylated monosaccharides and alditols obtained by methanolysis of the permethylated oligosaccharide-alditols were acetylated (pyridine:acetic anhydride, 1:1, v/v, at 100°C for 45 min) and then analysed by GC-MS using a Girdell Model 30 gas chromatograph (Suresnes, France) equipped with a fused capillary glass column (0.3 mm × 30 m) coated with OV 101 (column temperature 130-225°C, 5°C/min) [12]. Mass spectra were recorded on a Ribier-Mag 10-10 mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France),

at an ionisation potential of 70 eV. The analysis of di- and trisaccharides was performed at a temperature of 230°C.

Enzymic hydrolysis

β -D-Galactosidase (EC 3.2.1.23) was purified from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) [13]. The enzyme preparation was free of other exoglycosidase activities when checked with methylumbelliferyl glycosides or oligosaccharides as substrate. The reaction mixture contained the following components in a final volume of 30 μ l: 0.03 U of enzyme, 0.2 mol/l sodium phosphate, 0.1 mol/l acetic acid buffer (pH 3.5), 20 μ g of oligosaccharide. After a 12-h incubation at 37°C the reaction was stopped by heating at 70°C for 2 min. Hydrolysis products were analysed by TLC.

Thin layer chromatography

Silicagel 60, precoated plates (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, FRG) were run in *n*-butanol/acetic acid/water (2:1:1, v/v/v) [14]. Sugars were stained with a solution of orcinol (2 g/l) in sulphuric acid/water 20:80 (v/v) followed by heating at 105°C for 10 min.

Results

Isolation of oligosaccharides

TLC of urine (Fig. 1) showed the presence of abnormal carbohydrate-containing material migrating more slowly than lactose. Most of this material was recovered in the neutral fraction eluted from the Dowex columns. This neutral fraction was further fractionated by gel chromatography on a Biogel P₂ (200–400 mesh) column as illustrated in Fig. 2. For comparison, fractionation of a normal urine is also shown. The eluted material was pooled as indicated. Fraction C which contained the

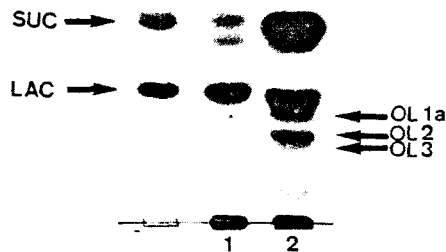


Fig. 1. Thin layer chromatography of urine (for details see 'Experimental procedure'). Lane 1, normal urine; lane 2, patient's urine; LAC, lactose; SUC, sucrose; OL 1a, 2, 3: oligosaccharides 1a, 2, 3.

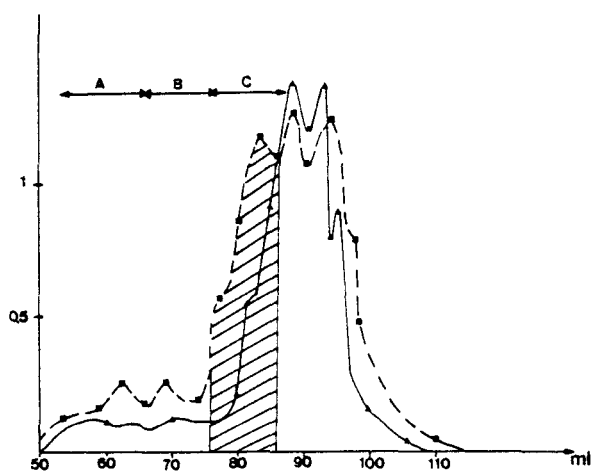


Fig. 2. Gel chromatography on a Biogel P₂ column of neutral urinary fraction. ■-----■, patient with myoclonic encephalopathy; ▲——▲, normal urine. Fractions were assayed for total hexose and the material was pooled and concentrated as indicated.

main urinary oligosaccharides was subjected to further purification by paper chromatography in solvent 1. Three major components were observed. Component 1 was further separated into 1a and 1b by repeated preparative paper chromatography in solvent 2.

Characterisation of the oligosaccharides

Compound 1b was identified as lactose by sugar composition and migration in different solvent systems. The sugar compositions of oligosaccharides 1a, 2 and 3 are given in Table I, which shows that galactose constitutes the major component of oligosaccharides. Methylation analysis of the reduced ([²H]₄NaB) oligosaccharides gave the results shown in Table II.

Structure of isolated oligosaccharides

Component 1a. Sugar analysis, enzymic hydrolysis, and permethylation demonstrated that component 1a could be identified as the oligosaccharide β-Gal-(1 → 3)-

TABLE I
Occurrence and composition of oligosaccharides isolated from urine

| Oligosaccharides | Amount (mg/l) | Molar ratios | |
|------------------|---------------|--------------|------|
| | | Gal | Glc |
| <u>1a</u> | 180 | + | 0 |
| <u>1b</u> | | 1 | 1 |
| <u>2</u> | 260 | 1.96 | 1.00 |
| <u>3</u> | 80 | + | 0 |

TABLE II

Molar ratios of methylated methylglycosides derived from the methanolysate of permethylated reduced oligosaccharides

| | Oligosaccharides | | |
|--|------------------|----------|----------|
| | <u>1a</u> | <u>2</u> | <u>3</u> |
| 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galactose | 0.72 | 0.74 | 0.78 |
| 2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-galactose | - | 0.86 | 0.94 |
| 1,2,3,5,6 penta- <i>O</i> -methyl-glucitol | - | 1 | - |
| 1,2,4,5,6-penta- <i>O</i> -methyl-galactitol | 1 | - | 1 |

Gal. The 1,3-nature of the linkage between the two galactose residues was confirmed by the mass spectrometric fragmentation pattern of reduced [²H]₄NaB and permethylated oligosaccharide 1a (Fig. 4a). The fragments *m/e* 133 and *m/e* 382 obtained by cleavage of the alditol chain were characteristic of the 1,3-linkage.

Component 2. Sugar analysis of oligosaccharide 2 demonstrated that it was composed of two galactose and one glucose residues. β -Galactosidase completely hydrolysed the oligosaccharide into galactose and glucose (Fig. 3) indicating the β -galactosidic nature of the linkages and that galactose residues occupy an external

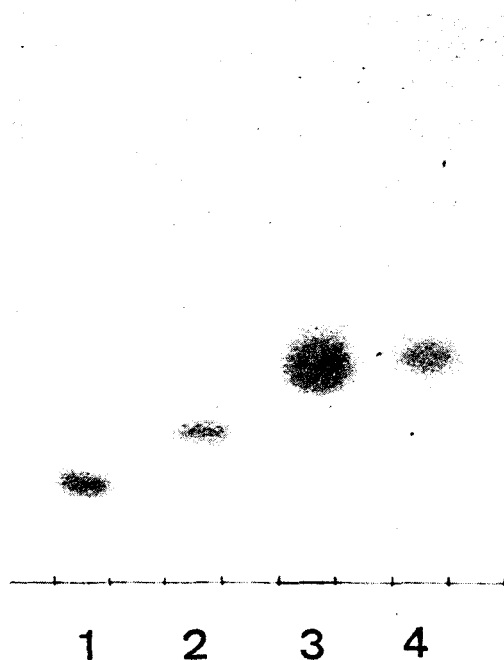
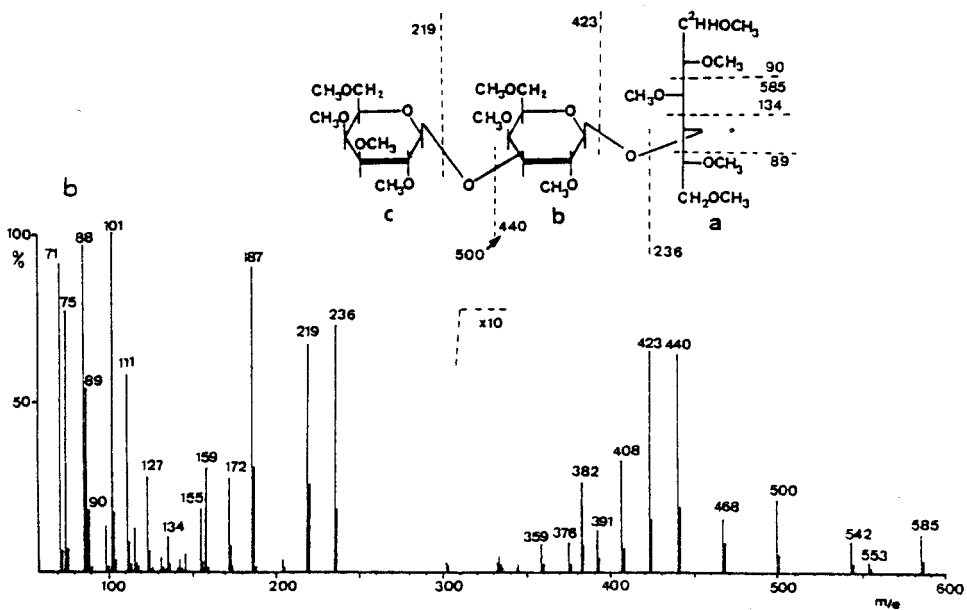
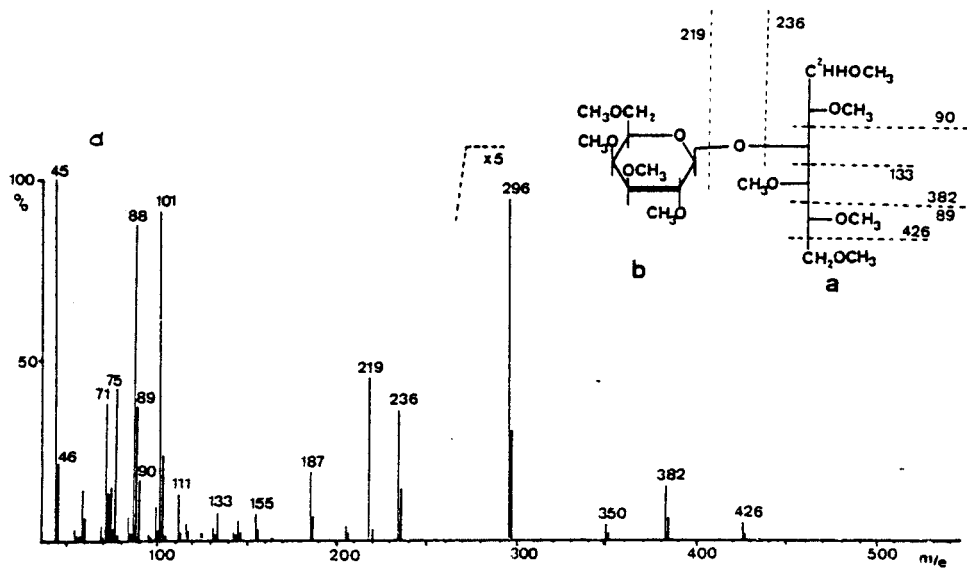


Fig. 3. TLC pattern after β -galactosidase hydrolysis. Lane 1, oligosaccharide 2; lane 2, standard lactose; lane 3, β -galactosidase digest; lane 4, standard galactose.

non-reducing position in the oligosaccharide, and glucose the reducing terminal position.

The fragmentation pattern of reduced and permethylated oligosaccharide 2 is given in Fig. 4b. The A series of fragments—cbA₁ (m/e 423), cA₁ (m/e 219)—together with the J series of fragments—aJ₂ (m/e 236), baJ₂ (m/e 440) and baJ₁ (m/e 500)—showed the linear chain of three hexose units. That hexose b is linked to the 4 position of hexose unit a is evident from the fragments obtained by cleavage of the



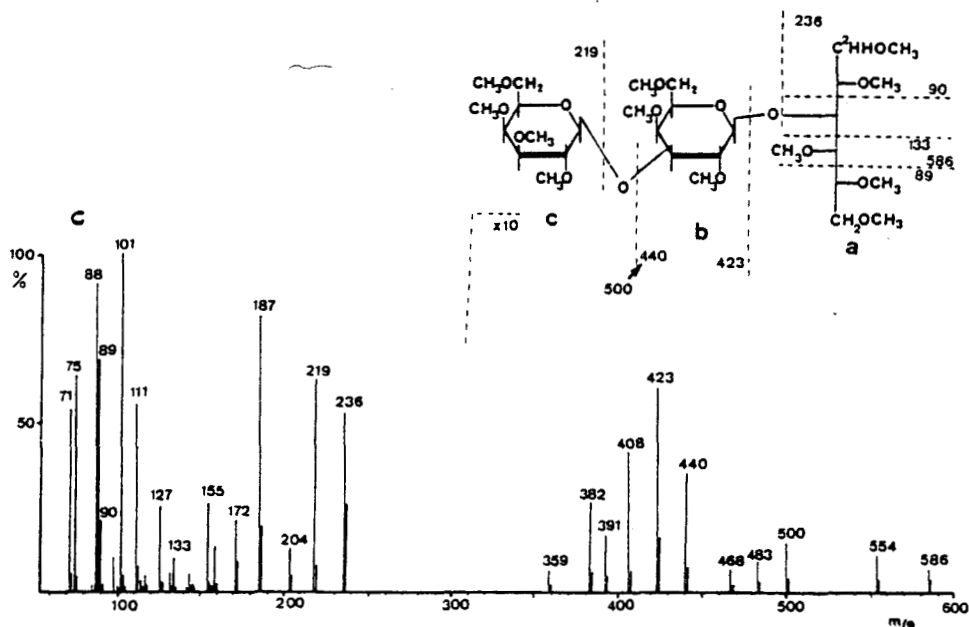
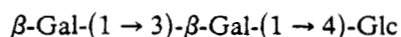


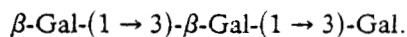
Fig. 4 (a-c). Mass spectrometric fragmentation pattern of reduced and permethylated oligosaccharides; (a) oligosaccharide 1a; (b) oligosaccharide 2; (c) oligosaccharide 3.

alditol chain (m/e 134, m/e 585, m/e 553). The methylation analysis (Table II) gave a mixture of 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl galactose, 2,4,6-tri-*O*-methyl galactose and 1,2,3,5,6-penta-*O*-methyl glucitol in equal proportions. All these results pointed to the conclusion that compound 2 was the trisaccharide:



Oligosaccharide 3. Sugar analysis and enzymatic hydrolysis of oligosaccharide 3 demonstrated that it was composed of two β -linked galactose residues.

A similar fragmentation pattern as for oligosaccharide 2 was obtained for the reduced and permethylated oligosaccharide 3 (Fig. 4c), indicating a linear chain of three hexose units. The fragments obtained by cleavage of the alditol chain (m/e 133, m/e 586 and m/e 554) proved that hexose unit b was, in this case, linked to the C-3 position of hexose unit a. Methylation analysis gave an equal mixture of 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl galactose, 2,4,6-tri-*O*-methyl galactose and 1,2,4,5,6-penta-*O*-methyl galactitol. All these results point to the conclusion that compound 3 is the trisaccharide:



Discussion

A larger number of urinary oligosaccharides and glycoconjugates have been described in human disorders which result from deficiencies of lysosomal exogly-

cosidases [3]. Many of these excreted products are structurally homologous to carbohydrate sequences found in the side chains of N-linked type glycoproteins. The oligosaccharide structures found in this patient are completely unusual and their origin is not known. Their structures cannot be related to the general carbohydrate features found in glycoproteins [15] or glycolipids. At the time of urine collection, the infant received humanised milk. Analysis of the milk for oligosaccharides shows, apart from lactose, the presence of a small amount of sialyl-lactose; the galactosides described in the present study were completely absent. An oligosaccharide similar to compound 2 has been previously described in marsupial milk [17], which is a rich source of galactose-containing oligosaccharides. The structural feature, β -Gal-(1 \rightarrow 3)- β -Gal, has also been described in glycoproteins isolated from thymocyte membrane [18] and in the 'muco' series of glycolipids [16]. The accumulation of these unusual β -(1 \rightarrow 3) galactosides may be due either to the failure of a specific β -galactosidase or to the hyperactivity or abnormal expression of a β -(1 \rightarrow 3)-galactosyltransferase.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé No. 217—Relation structure fonction des constituants membranaires).

JCM is Chargé de Recherches INSERM.

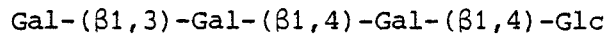
References

- 1 Lundblad A. Urinary glycoproteins, glycopeptides and oligosaccharides. In: Horowitz MI, Pigman W, eds. The glycoconjugates. Vol. 1. New York: Academic Press, 1977; 441-454.
- 2 Strecker G, Lemaire-Poitau A. Fractionation and characterization of acidic oligosaccharides and glycopeptides from normal and pathological urines. *J Chromatogr* 1977; 143: 553-569.
- 3 Strecker G, Montreuil J. Glycoprotéines et glycoprotéinoses. *Biochimie* 1979; 61: 1199-1246.
- 4 Kolodny EH, Cable WJL. Inborn errors of metabolism. *Ann Neurol* 1982; 11: 221-232.
- 5 Aicardi J, Gouttieres F. Encéphalopathie myoclonique néonatale. *Rev EEG Neurophysiol* 1978; 8: 99-101.
- 6 Cavazutti GB, Nacin A, Ferrari F, Grandoril, Beghini G. Encephalopatia epiettica ad in sovgenza neonatale. *La Clin Pediatr* 1978; 5: 239-246.
- 7 Dalla Bernardina B, Dulac O, Bureau M, Dravet C, Del Zotti F, Roger J. Encéphalopathie myoclonique précoce avec épilepsie. *Rev EEG Neurophysiol* 1982; 12: 8-14.
- 8 Partridge SM. Partition chromatography and its applications to carbohydrate studies. *Biochem J Symp* 1950; 3: 52-61.
- 9 Zanetta JP, Breckenridge WC, Vincendon G. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives: application to glycoproteins and glycolipids. *J Chromatogr* 1972; 69: 291-304.
- 10 Finne J, Krusius T, Rauvala H. Use of potassium *tert*-butoxide in the methylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 1980; 80: 336-339.
- 11 Yamashita K, Tachibana Y, Kobata A. Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization of three new disialylfucosylhexasaccharides. *Arch Biochem Biophys* 1977; 174: 582-591.
- 12 Fourmet B, Strecker G, Leroy Y, Montreuil J. Gas liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methylglycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal Biochem* 1981; 116: 489-502.

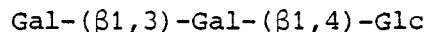
- 13 Li YT, Li SC. α -Galactosidase from figs. In: Ginsburg V, ed. *Methods in enzymology*, Vol. 28-B. New York: Academic Press, 1973: 714-720.
- 14 Humbel R, Collart M. Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases. 1. Rapid detection by thin layer chromatography. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 143-145.
- 15 Montreuil J. Glycoproteins. In Neuberger A, Van Deenen LLM, eds. *Comprehensive biochemistry*, Vol. 19-B, Part II. Amsterdam: Elsevier, 1982: 1-188.
- 16 Sweeley CC, Siddiqui B. Chemistry of mammalian glycolipids. In: Horowitz MI, Pigman W, eds. *The glycoconjugates*, Vol. 1. New York: Academic Press, 1977: 459-540.
- 17 Messer M, Trifonoff E. Structure of a marsupial milk trisaccharide. *Carbohydr Res* 1980; 83: 327-334.
- 18 Kornfeld R. Structure of the oligosaccharides of three glycopeptides from calf thymocyte plasma membranes. *Biochemistry* 1978; 17: 1415-1423.

C - CONCLUSION

L'ensemble des données cliniques, histologiques et biochimiques observées dans le cas d'encéphalopathie myoclonique que nous venons de décrire sont nettement en faveur d'une maladie de surcharge lysosomiale. Le taux élevé de métabolites urinaires excrétés (environ 300 mg/litre pour le composé majeur) correspond au taux habituellement enregistré dans d'autres maladies de surcharge. L'origine des oligosaccharides excrétés demeure cependant inconnue. De tels types de galactosides n'ont en effet jamais été décrits à ce jour dans les milieux biologiques. Leur structure ne peut de plus être directement reliée aux caractères structuraux trouvés dans les chaînes glycaniques des glycoprotéines ou des glycolipides. Il est cependant à noter que des enchaînements répétitifs du galactose se retrouvent dans des gangliosides de la série "muco" :



Seule l'anométrie des liaisons diffère. Il est possible que les galactosides urinaires aient pour origine ce type de composés. Il est également à noter que l'oligosaccharide n° 2 :



est présent dans le lait humain (MICHALSKI et al., résultats non publiés), ainsi que dans le lait de marsupiaux, MESSER et al. 1980 (616).

A l'époque où l'urine a été collectée, l'enfant recevait un lait "humanisé" (Lacmil, Jacquemaire) dans lequel la recherche des galactosides préalablement décrits s'est avérée négative. L'hypothèse d'une origine nutritionnelle pour ces composés peut donc être écartée.

L'accumulation de ces composés peut s'expliquer soit par un trouble du catabolisme, dû à un déficit en une isoenzyme de la β -galactosidase spécifique des liaisons 1 \rightarrow 3, soit à un trouble anabolique dû à l'expression anormale d'une galactosyltransférase spécifique.

Des études seront réalisées dans ce sens sur une culture de fibroblastes, établie à partir d'une biopsie cutanée du malade.

CONCLUSION GENERALE ET RESUME

Les études structurales menées sur les oligosaccharides et glycopeptides accumulés lors de maladies de surcharge lysosomiales initialement classifiées comme "mucopolidoses" ont contribué à définir un nouveau groupe d'affection : "les glycoprotéinoses". Ces maladies trouvent leur origine dans le déficit génétique de différentes exoglycosidases intervenant dans le catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines.

L'analyse de l'oligosaccharidurie accompagnant ces maladies a fait ressortir un triple intérêt :

I - INTERET DIAGNOSTIQUE TOUT D'ABORD

Des méthodes simples telle la chromatographie couche mince des oligosaccharides urinaires permet d'orienter le diagnostic de glycoprotéinose. Des méthodes chromatographiques plus complexes telle la gel-filtration, la chromatographie d'échange d'ions ou la chromatographie liquide de haute performance (hplc) nous ont permis de séparer les composés glucidiques accumulés chez les différents malades. Dans tous les cas, l'identification du monosaccharide en position terminale non-réductrice nous renseigne sur la nature du déficit enzymatique responsable de la surcharge.

Cette stratégie nous a permis de définir cette nouvelle classe de glycoprotéinose que sont les sialidoses caractérisées par une excrétion urinaire massive de "sialyl"-oligosaccharides. Cette dernière étude permet en outre de mettre en valeur une application particulière de notre travail, consistant en l'emploi d'oligosaccharides urinaires en tant que substrats enzymatiques naturels, démarche qui a conduit à l'élucidation du déficit en hydrolase acide, responsables des sialidoses.

Lors de situations pathologiques où des mutations affectant la même enzyme ou deux formes isoenzymatiques différentes, comme c'est le cas pour la GM₁ gangliosidose et la maladie de Morquio type B, une analyse détaillée du matériel de surcharge permet de faire une discrimination entre les deux formes de la maladie. Une situation analogue est observée entre mucopolysaccharidoses et sialidoses, où le taux relatif des différents composés accumulés permet de distinguer ces deux groupes d'affections.

L'introduction de méthodes analytiques très sensibles et nécessitant peu de matériel telle la chromatographie liquide de haute performance (h.p.l.c.) laisse en outre présager l'application des méthodes de fractionnement décrites dans ce mémoire aux cultures cellulaires, amniotiques en particulier aux fins de diagnostic anté-natal.

II - COMPREHENSION DU CATABOLISME DES CHAINES GLYCANNIQUES DES GLYCOPROTEINES

Les composés oligosaccharidiques excrétés lors des maladies de surcharge correspondent à toutes les étapes dégradatives des chaînes glycaniques des glycoconjugués. Le profil oligosaccharidique rencontré pour un déficit en exoglycosidase déterminé, correspond en fait à une image figée du catabolisme en un point déterminé. Les analyses comparatives montrant que le monosaccharide en position terminale non-réductrice est spécifique de l'enzyme manquant, confortent l'hypothèse d'une dégradation récurrente et séquentielle des polymères osidiques par les différentes exo-glycosidases. L'une des observations majeures se dégageant de l'étude des glycoprotéinoses est le fait que tous les oligosaccharides isolés de l'urine des malades ne possèdent qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. Cette observation serait donc en faveur d'une initiation du catabolisme des chaînes glycaniques des N-glycosylprotéines par l'action d'endo-N-acétylglucosaminidases (endonases) qui couperaient la liaison GlcNAc-GlcNAc de la séquence terminale GlcNAc-GlcNAc-Asn et libèreraient le glycanne amputé d'un résidu de GlcNAc.

Comme nous le rappelions dans le chapitre "Généralités" de ce mémoire, les "endonases" connues à ce jour sont de deux types, les unes agissant sur des structures "oligomannosidiques" ou "manno"-endonases, les

autres sur les structures N-acétyl-lactosaminiques ou "galacto"-endonases (PIERCE et al. 1979 (617)). D'abord décrites au niveau du foie de rat, l'existence de telles enzymes a été démontrée au niveau des tissus humains et plus spécifiquement dans le cytosol (PIERCE et al. 1980 (618) ; OVERDIJK et al. 1981 (619)). Jusqu'à présent seules des "galacto"-endonases agissant sur des structures glycaniques désialylées ont été caractérisées dans les cellules normales. Ces enzymes sont en particulier inactives sur les "sialo"-glycannes, ce dernier point étant notamment en contradiction avec la découverte de sialyl-oligosaccharides à un seul résidu de GlcNAc terminal dans les urines de sialidose.

Cette constatation soulève le problème de l'existence d'une "sialo"-endonase spécifique de structures oligosaccharidiques sialylées. Le fait que cette enzyme ne soit pas rencontrée dans les tissus normaux, pourrait être en faveur d'une enzyme de type "adaptatif", ne régulant le catabolisme qu'en cas de blocage de la voie récurrente des exoglycosidases. Il est à noter que la voie d'initiation du catabolisme des chaînes glycaniques semble varier d'une espèce animale à l'autre. Notamment dans certains cas de glycoprotéinoses animales telle la β -mannosidose caprine (JONES et LAINE 1981 (620)), la GM₁-gangliosidose canine (WARNER et O'BRIEN 1982 (621)), ou la mannosidose bovine (WARREN et al. 1983 (622)), les oligosaccharides excrétés possèdent le résidu de di-N-acétylchitobiose servant normalement d'ancrage à la chaîne oligosaccharidique sur la protéine.

Cette dernière constatation est en faveur chez ces animaux de l'action préférentielle d'une autre enzyme, l'aspartylglucosaminidase ou aspartamidase, hydrolysant la liaison asparaginy-N-acétylglucosamine (GlcNAc-Asn). Des études récentes effectuées au Laboratoire montrent que cette enzyme spécifiquement lysosomiale, est capable de libérer les oligosaccharides sialylés à partir des glycoasparagines correspondants. Au vue de ces observations, une autre origine possible pour les oligosaccharides trouvés dans la sialidose humaine, serait l'action synergique de deux enzymes, aspartamidase d'une part suivie de l'action d'une di-N,N'-acétylchitobiase d'autre part.

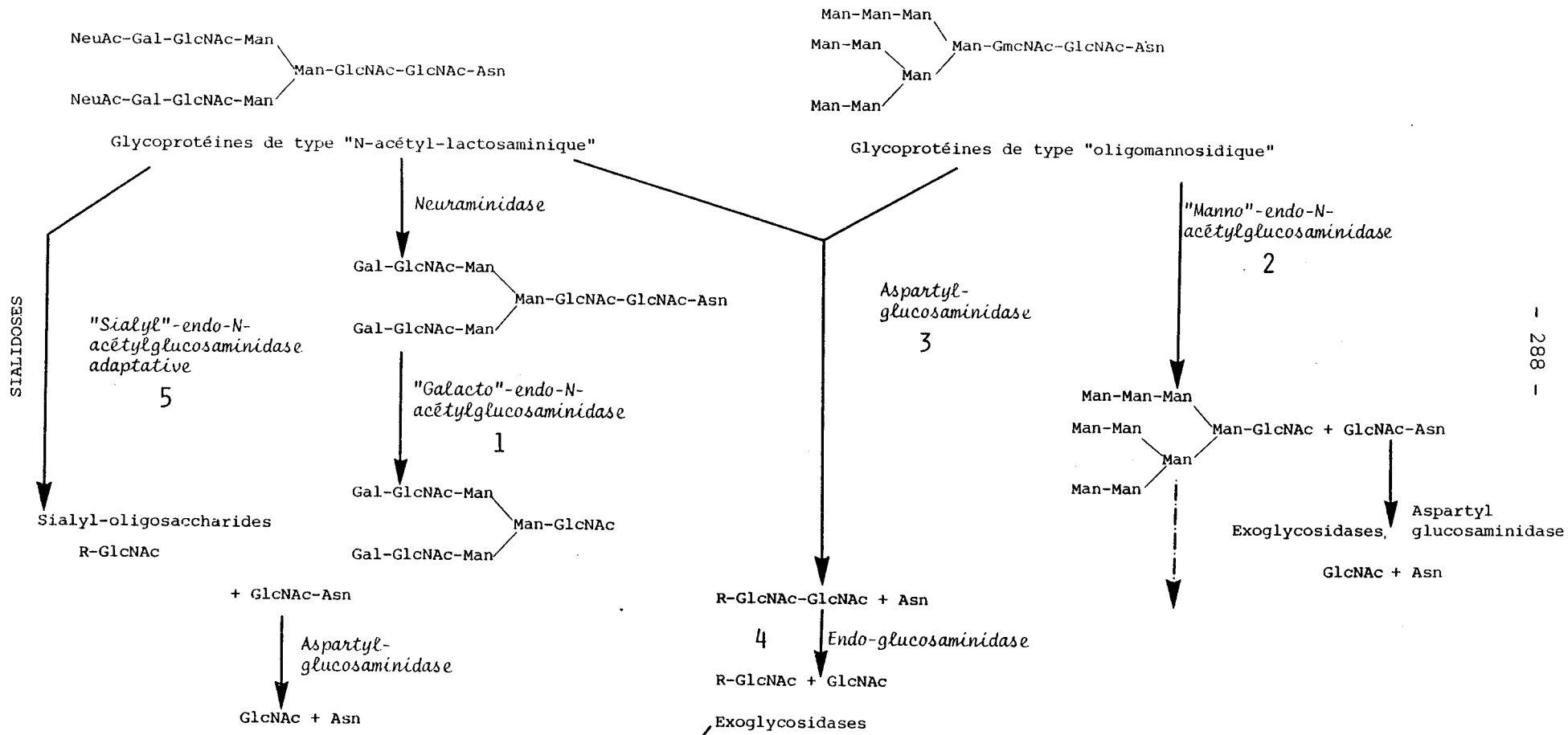


FIGURE 37

Hypothèses concernant l'initiation du catabolisme des chaînes N-glycanniques par les "endonases"

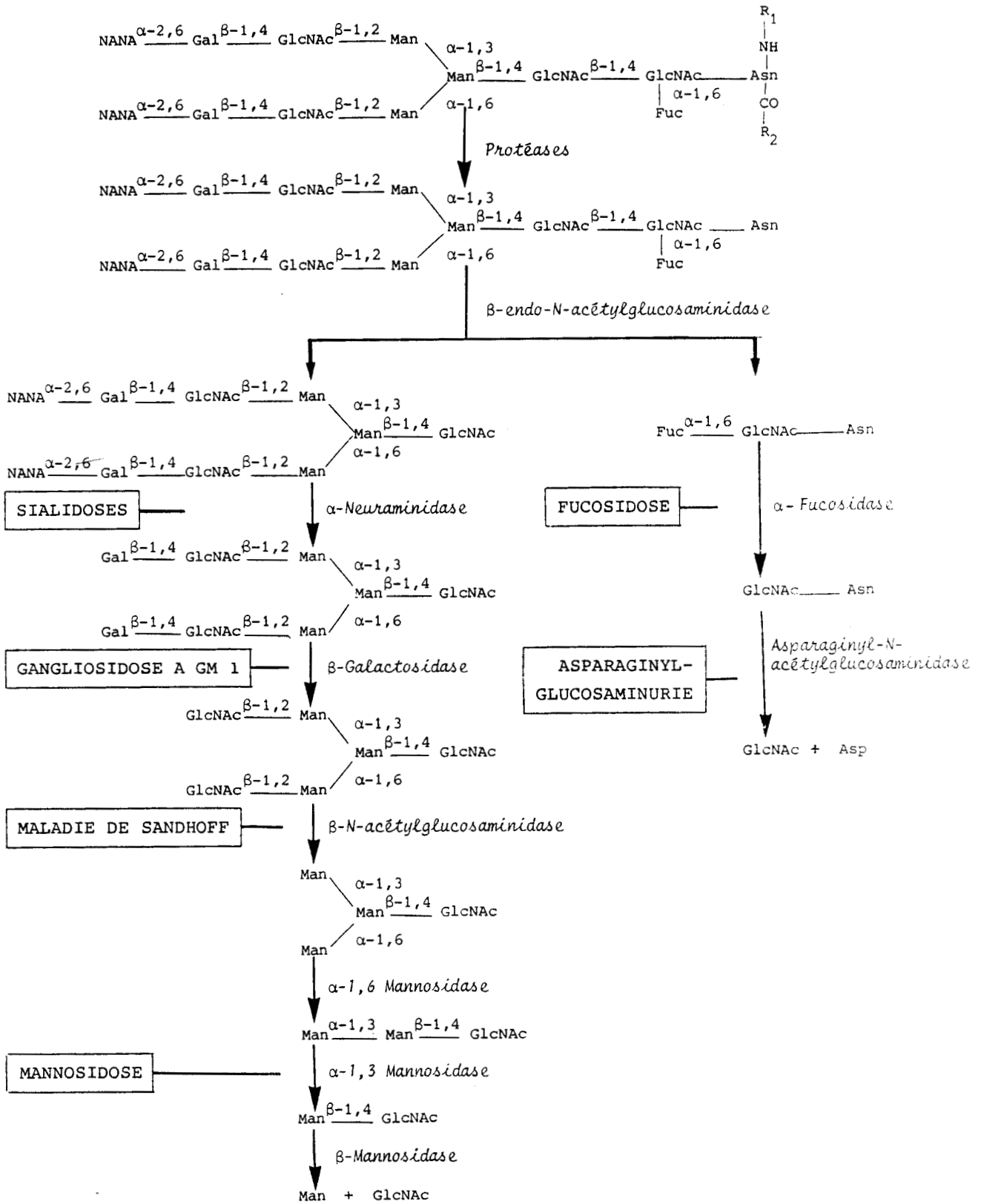


FIGURE 38

Schéma du catabolisme des glycoprotéines

D'autre part, les lois structurales précédemment énoncées pour les oligosaccharides ou glycopeptides urinaires notamment celles de la polyantennarisation (sialosides), assemblage des structures mannosidiques (mannosidose) peuvent être élargies à l'ensemble des N-glycannes de glycoprotéines. Dans ce contexte, l'étude des structures oligosaccharidiques mineures de l'urine s'avère hautement intéressante, car il est probable qu'elles préexistent dans certaines glycoprotéines et restent à découvrir. De ce point de vue les structures polylectosaminiques sialylées trouvées dans l'aspartylglucosaminurie, ne répondent à aucun schéma structural trouvé à ce jour, mais préexistent peut-être dans un tissu déterminé.

Il est enfin à noter que l'isolement de l'ordre de quelques milligrammes de structures oligosaccharidiques ou glycopeptidiques trouvés dans l'urine, nécessiterait des quantités élevées de matériel cellulaires, membranes ou autre, alors que plusieurs centaines de mg de composés s'accumulent par litre d'urine. Les quantités d'oligosaccharides ainsi isolées peuvent servir de modèles pour des études physiques telle la RMN à haut champ dont il a été fait mention dans ce mémoire, mais aussi études cristallographiques (WARIN et al. 1979 (625)), ou spécificités des lectines (DEBRAY et al. 1981 (626)). Ces structures glycanniques peuvent également servir à la synthèse de néoglycoprotéines par couplage à une protéine porteuse (PERTSOUNIS 1983 (627)).

En résumé, nos études menées sur l'oligosaccharidurie accompagnant différentes maladies de surcharges lysosomiales, nous ont permis de poser les bases de classification d'un nouveau groupe de maladies héréditaires du catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines : les "glycoprotéinoses".

- la caractérisation de l'excrétion massive de sialyl-oligosaccharides dans l'urine de certains malades associé à une mise en évidence d'un déficit en α -neuraminidase à l'aide d'un procédé original de dosage, nous a permis de définir un nouveau groupe d'affections : les "sialidoses".

Dans le but de mieux comprendre la pathologie de cette maladie, le travail enzymatique s'est poursuivi par une analyse détaillée de l'activité neuraminidasique du foie humain et a débouché sur l'isolement d'une sialidase spécifique de l'hydrolyse des gangliosides.

- les structures exactes de plus de 50 oligosaccharides ou glycopeptides ont été établies. Ces composés ont en outre servi à la mise au point de méthodes physiques d'analyse structurale telle la RMN à haut champ ou la spectrométrie de masse.

- la mise au point de ces différentes méthodes d'analyses, nous a en outre permis de donner des bases métaboliques à un syndrome neurologique d'éthiologie inconnue, et devrait dans l'avenir permettre d'accroître le champ d'étude des maladies de surcharge lysosomale.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAHAM, D., BLAKEMORE, W.F., JOLLY, R.D., SIDEBOTHAM, R. & WINCHESTER, B.G. (1983a) Biochem. J. 215, 573-579 (557)
- ABRAHAM, D.J., SIDEBOTHAM, R., WINCHESTER, B.G., DORLING, P.R. & DELL, A. (1983b) FEBS Lett. 163, 110-113 (561)
- ACHORD, D.T., BROT, F., BELL, E. & SLY, W. (1978) Cell 15, 269-278 (115)
- ACHORD, D.T., BROT, F., GONZALES-NORIEGA, A., SLY, W.S. & STAHL, P. (1977) Pediat. Res. 11, 816-822 (271)
- ACHORD, D.T., BROT, F.E. & SLY, W.S. (1977b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 409-415 (274)
- AKASAKI, M., SUGAHARA, K., FUNAKOSHI, I., AULA, P. & YAMASHINA, I. (1976) FEBS Lett. 69, 191-194 (589)
- ALHADEFF, J.A. & FREEZE, H. (1977) Mol. Cell. Biochem. 18, 33-37 (48)
- ARBISSER, A.I., DONNELLY, K.A., SCOTT, C.I., DIFERRANTE, N., SINGH, J., STEVENSON, R.E., AYLSWORTH, A.S. & HOWELL, R.R. (1977) Amer. J. Med. Genet. 1, 195-205 (495)
- ARONSON, S.M., VALSAMIS, M.P. & VOLK, B.W. (1960) Pediatrics 26, 229-242 (465)
- ASHFORD, D., DESAI, N.N., ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A. (1982) Biochem. J. 101, 199-208 (224)
- ASHWELL, G. & HARFORD, J. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 531-554 (245)
- ASHWELL, G. & MORELL, A.G. (1974) Adv. Enzymol. 41, 99-128 (242)
- ASKENASI, R. (1975) Clin. Chim. Acta 59, 87-92 (320)
- AULA, P., AUTIO, S., RAIVIO, K.O. & RAPOLA, J. (1982) in "Genetic errors of glycoprotein metabolism" (DURAND, P. and O'BRIEN, J.J. eds) pp. 123-152 Ermes ed., Milano (578)
- AUTIO, S. (1972) J. Ment. Defic. Res. Monograph Series I, 1-39 (574)
- AUTIO, S., LOUHIMO, T. & HELENIUS, M. (1982) Ann. Clin. Res. 14, 93-97 (512,520)
- AYLSWORTH, A.S., THOMAS, G.H., HOOD, J.L., MALOUF, N. & LIBERT, J. (1980) J. Pediat. 96, 662-668 (370)
- BACH, G., BARGAL, R. & CANTZ, M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 976-981 (76,442)
- BACH, G., COHEN, M.M. & KOHN, G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1483-1490 (412)
- BACH, G., EISENBERG, F., CANTZ, M. & NEUFELD, E.F. (1972b) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 2134-2138 (160)

- BACH, G., FRIEDMAN, R., WEISMANN, B. & NEUFELD, E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2048-2051 (159,449)
- BACH, G., KOHN, G., LASCH, E.E., EL MASSRI, M., ORNOY, A., SEKELES, E., LEGUM, C. & COHEN, M.M. (1978) Pediat. Res. 12, 1010-1015 (517)
- BACH, G., ZIEGLER, M., KOHN, G. & COHEN, M.M. (1977) Am. J. Hum. Genet. 29, 610-618 (413)
- BAENZIGER, J.U. & FIETE, D. (1980) Cell 22, 611-620 (257)
- BAENZIGER, J.U. & KORNFELD, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7260-7269 (237)
- BAENZIGER, J.U. & MAYNARD, Y. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4607-4613 (269)
- BALAZS, E.A. (1970) in "Chemistry and molecular biology of the intracellular matrix" (BALAZS, E.A. ed) Vol. 2, Academic Press, N.Y. (143)
- BALLOU, L., COHEN, R.E. & BALLOU, C.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5986-5991 (217)
- BARRET, A.J. & HEATH, M.F. (1977) in "Lysosomes" a laboratory handbook (J.T. DINGLE ed) pp. 19-145, North Holland Pub. Co. (33)
- BARTON, R.W. & NEUFELD, E.F. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7773-7779 (39)
- BASU, S. (1969) Biochem. J. 112, 379-381 (318)
- BAUDHUIN, P., HERS, H.G. & LOEB, H. (1964) Lab. Invest. 13, 1139-1152 (191)
- BEAUDET, A.L. & NICHOLS, B.L. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 292-298 (534)
- BEN YOSEPH, Y., DE FRANCO, C.L., CHARROW, J., HAHN, L.C. & NADLER, H.L. (1982b) Am. J. Hum. Genet. 34, 100-111 (539)
- BEN YOSEPH, Y., MOMOI, T., HAHN, L.C. & NADLER, H.L. (1982) Clin. Genet. 21, 374-381 (463)
- BERGER, E.G., BUDDECKE, E., KAMERLING, J.P., KOBATA, A., PAULSON, J.C. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) Experientia 38, 1129-1161 (205)
- BERGGÅRD, I. (1963) Nature 199, 174-175 (313)
- BERGGÅRD, I. (1970) in "Proteins in normal and pathological urine" (MANUEL, Y., REVILLARD, J.P. and BETUEL, H. eds) pp. 7-19, S. KARGER, Basel (298)
- BERMAN, E.R., KOHN, G., YATZIY, S. & STEIN, H. (1974a) Clin. Chim. Acta 52, 115-124 (470)
- BERMAN, E.R., LIVNI, N., SHAPIRA, E., MERIN, S. & LEVIJ, J.S. (1974b) J. Pediat. 84, 519-526 (388)
- BESTERMAN, J.M., AIRHART, J.A. & LOW, R.B. (1982) Am. J. Physiol. 242, C339-C344 (2)
- BIRD, T.D. & HALL, J.G. (1977) Neurology 27, 1057-1060 (613)

- BISCHOFF, J. & KORNFIELD, R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7907-7910 (525)
- BJÖRNDAL, H. & LUNDBLAD, A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 201, 434-437 (341)
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. (1975) J. Cell Biol. 67, 835-851 (110)
- BOOTH, C.W., CHEN, K.K. & NADLER, H.L. (1976) J. Pediat. 88, 821-824 (516)
- BOURRILLON, R. (1972) in "Glycoproteins" (GOTTSCHALK, A. ed) 2nd ed., Vol. 5, Part B., pp 909-925, Elsevier, Amsterdam (308)
- BOURRILLON, R., CORNILLOT, P. & GOT, R. (1962) Clin. Chim. Acta 7, 505-508 (311)
- BOURRILLON, R., GOT, R. & CORNILLOT, P. (1961) Clin. Chim. Acta 6, 730-736 (310)
- BRADY, R.O. (1978) Ann. Biol. Clin. 36, 113-119 (30)
- BRADY, R.O., KANFER, J.N. & SHAPIRO, D. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 221-225 (595)
- BRANDT, E.J., ELLIOT, R.W. & SWANK, R.T. (1975) J. Cell. Biol. 67, 774-788 (132)
- BRANTE, G. (1952) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 43-46 (137)
- BROWN, J.A., JAHREIS, G.P. & SWANK, R.T. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 691-699 (116)
- BURDITT, L.J., CHOTAI, K., HIRANI, S., NUGENT, P.G., WINCHESTER, B.G. & BLAKEMORE, W.F. (1980) Biochem. J. 189, 467-473 (556)
- BURNSIDE, J. & SCHNEIDER, D.L. (1982) Biochem. J. 204, 525-534 (15)
- BURTON, B.K. & NADLER, H.L. (1978) Enzyme 23, 29-35 (535)
- BUTLER, W.T. (1978) Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 80, pp. 213-226, Washington (223)
- CAIMI, L., TETTAMANTI, G., BERRA, B., SALE, O., BORRONE, C., GATTI, R., DURAND, P. & MARTIN, J.J. (1982) J. Inher. Met. Dis. 5, 218-224 (464)
- CANTZ, M. & MESSER, H. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 113-118 (423,425)
- CARRION, A., BOURRILLON, R. & CABEZAS, J.A. (1969) Clin. Chim. Acta 26, 481-484 (314)
- CARROLL, M., DANCE, N., MASSON, P.K., ROBINSON, D. & WINCHESTER, B.G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 579-583 (522)
- CENCI DIBELLO, I., DORLING, P. & WINCHESTER, B. (1983) Biochem. J. 215, 693-696 (565)
- CHAMPION, M.J. & SHOWS, T.B. (1977) Am. J. Hum. Genet. 29, 149-163 (393)
- CHAMPION, M.J. & SHOWS, T.B. (1977b) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 2968-2972 (515)
- CHESTER, A., HALLGREN, P., LUNDBLAD, A. & MESSETER, L. (1979) Eur. J. Biochem. 100, 385-399 (352)

- CHOY, F.Y.M. & DAVIDSON, R.G. (1978) Pediat. Res. 12, 1115-1120 (604)
- CHU, F.K. & MALEY, F. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 134-139 (37)
- CODINGTON, J.F., LINSLEY, K.B., JEANLOZ, R.W., IRIMURA, T. & OSAWA, T. (1975) Carbohydr. Res. 40, 171-182 (210)
- COFFEY, J.W. & DE DUVE, C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3255-3263 (12)
- COHAN, D., MOURAO, P.H.S. & DIETRICH, C.P. (1977) Clin. Chim. Acta 80, 555-562 (153)
- COHN, Z.A. & EHRENREICH, B.A. (1969) J. Exp. Med. 129, 201-225 (28)
- CONZELMAN, E. & SANDHOFF, K. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 3979-3983 (123,184)
- CONZELMAN, E. & SANDHOFF, K. (1979) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1837-1849 (180)
- CORFIELD, A.P., MICHALSKI, J.C. & SCHAUER, R. (1981) Perspectives in Inherited metabolic diseases 4, 3-70 (55)
- CREEK, K.E. & SLY, W.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9931-9937 (82)
- CUNNINGHAM, L.W., FORD, J.D. & SEGREST, J.P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2570-2571 (321,330,331)
- DALLA BERDINA, B., DULAC, O., BUREAU, M., DRAVET, C., DEL ZOTTI, F. & ROGER, J. (1982) Rev. EEG Neurophysiol. 12, 8-14 (615)
- DANIELS, L.B., COYLE, P.J., CHIAO, Y.B., GLEW, R.H. & LABOW, R.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 13004-13013 (603)
- DATE, J.W. (1964) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 604-613 (344)
- DAWSON, G. (1978) in "The Glycoconjugates" (HOROWITZ, M.I. and PIGMAN, W. eds) Vol. II, pp. 287-336, Acad. Press, N.Y. (173)
- DAWSON, G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3369-3371 (296,572)
- DAWSON, G., MATALON, R. & DORFMAN, A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5951-5958 (384)
- D'AZZO, A., HOOGEVEEN, A., REUSER, A.J.J., ROBINSON, D. & GALJAARD, H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 4535-4539 (125,461)
- DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 41-55 (626)
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. (1955) Biochem. J. 60, 604-617 (1)
- DE DUVE, C. (1974) La Recherche 49, 815-826 (27)
- DE GASPIERI, R., RAPELLI, S., LI, Y.T. & BERRA, B. (1981) Abstracts of the third E.S.G.L.D. workshop Wondschooten, Zeist (610)

- DERAPPE, C., LUNDBLAD, A., MESSETER, L. & SVENSSON, S. (1980) FEBS Lett. 119, 117-180 (342)
- DE VRIES, A.L., VAN DEN HEEDE, J. & FEENEY, R.E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 305-308 (209)
- DI DONATO, S., WEISMANN, U.N., ROSSI, E. & HERSCHKOWITZ, N. (1977) Pediat. Res. 11, 1094-1096 (401)
- DI NATALE, P. (1982) in "Glycosaminoglycans in physiological and pathological processes of body systems" (VARMA, R.A. and VARMA, R. eds) pp. 316-329, Karger ed., Basel (155)
- DINGLE, J.T. (1977) in "Lysosomes" a laboratory handbook, pp. 1-16, North-Holland Publishing Co, N.Y. (6)
- DISTLER, J., HIEBER, V., SAHAGIAN, G., SMICKEL, R. & JOURDIAN, G.W. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 4235-4239 (72)
- DORFMAN, A. & MATALON, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 630-637 (141)
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B.L., Vliegenthart, J.F.G., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B. & MONTREUIL, J. (1977) FEBS Lett. 77, 15-20 (501)
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., FOURNET, B., STRECKER, G., SPIK, G., MONTREUIL, J., SCHMID, K. & BINETTE, J.P. (1978) FEBS Lett. 89, 149-152 (502)
- DORLING, P., HUXTABLE, C., CENCI DI BELLO, I. & WINCHESTER, B. (1983) Biochem. Soc. Trans. 11, 717-718 (567)
- DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R. & VOGEL, P. (1978) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 4, 285-295 (558)
- DREYFUS, J.C. (1972) Biochimie 54, 559-571 (119)
- DUGAL, B. (1977) Biochem. J. 163, 9-14 (586)
- DUGAL, B. & STRØMME, J. (1977) Biochem. J. 165, 497-502 (34,582)
- DUNCAN, C.J. (1966) Nature 210, 1229-1230 (13)
- DURAND, P., GATTI, R., CAVALIERI, S., BORRONE, C., TONDEUR, M., MICHALSKI, J.C. & STRECKER, G. (1977) Helv. Paediat. Acta 32, 391-400 (372)
- EBATO, H., ABE, T., YAMAKAWA, T. & NAGASHIMA, K. (1980) J. Biochem. (Tokyo) 88, 1765-1772 (599)
- EHRENREICH, B.A. & COHN, Z.A. (1969) J. Exp. Med. 129, 227-243 (9)
- ELBEIN, A.D., PAN, Y.T., SOLF, R. & VOSBECK, K. (1983) I. Cell. Physiol. 115, 265-275 (563)

- ELBEIN, A.D., SOLF, R., DORLING, P.R. & VOSBECK, K. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 7393-7398 (562)
- ELLIS, R.W.D., SHELDON, W. & CAPON, N.B. (1936) Q. J. Med. 5, 119-135 (136)
- ELLIS, R.B., WILLCOX, P. & PATRICK, A.D. (1975) Clin. Sci. Mol. Med. 49, 543-550 (395)
- ELDRIDGE, R. (1980) Neurology 30, 860-863 (614)
- ERICKSON, A.H., CONNER, G.E. & BLOBEL, G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11224-11231 (112)
- ERICSSON, J.L.E. (1969) in "Lysosomes" in Biology and pathology (DINGLE, J.T. and H.B. FELL eds) Vol. 2, pp. 345-394, North Holland Pub., Amsterdam (26)
- FARRIAUX, J.P. (1976) "Les Oligosaccharidoses", Crouan et Roques ed., Lille (196)
- FARRIAUX, J.P., LEGOUIS, I., HUMBEL, R., DHONDT, J.L., RICHARD, P., STRECKER, G., FOURMAINTRAUX, A., RINGEL, J. & FONTAINE, G. (1975) Nouv. Press. Med. 4, 1867-1870 (513)
- FARRIAUX, J.P., WALBAUM, R., HONGRE, J.F., DUBOIS, O., LOUIS, J., BLANCKAERT, D., DHONDT, J.L., RICHARD, P. & FONTAINE, G. (1976) Lille Med. 21, 51-70 (381)
- FEDERICO, A., CECIO, A., APPONI-BATTINI, G., MICHALSKI, J.C., STRECKER, G. & GUAZZI, G.C. (1980) J. Neurol. Sci. 48, 157-169 (375)
- FINNE, J., KRUSIUS, T., MARGOLIS, R.K. & MARGOLIS, R.U. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10295-10300 (219)
- FISCHER, H.D., CREEK, H.E. & SLY, W.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9938-9943 (83,99)
- FISCHER, H.D., GONZALEZ-NORIEGA, A., SLY, W.S. & MORRE, D.J. (1980b) J. Biol. Chem. 255, 9608-9615 (92)
- FISCHER, G. & JATZKEWITZ, H. (1978) Biochim. Biophys. Acta 528, 69-76 (124,181)
- FISCHER, H.D., NATOWICZ, M., SLY, W.S. & BRETTHAUER, R.K. (1980a) J. Cell. Biol. 84, 77-86 (78)
- FISHMAN, P.J. (1982) J. Membrane Biol. 69, 85-97 (170)
- FISHMAN, P.H., MAX, S.R., TALMANN, J.F., BRADY, R.O., McLAREN, N.K. & LORNBLATH, M. (1975) Science 187, 68-70 (186)
- FLUHARTY, A.L. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 249-261, Raven Press, N.Y. (147)
- FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIAGENTHART, J.F.G., BINETTE, J.P. & SCHMID, K. (1978) Biochemistry 17, 5206-5214 (239)
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. & MONTREUIL, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489-502 (500)

- FRANCOIS-GERARD, C., BROCTEUR, J., ANDRE, A., GERDAY, C., PIERCE-CRETEL, A. & SPIK, G. (1980) Blood Transf. Immunohaemat. 23, 579-587 (231)
- FRARANTONI, J.C., HALL, C.W. & NEUFELD, E.F. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 60, 699-706 (156)
- FREEZE, H., GEIGER, B. & MILLER, A.L. (1979) Biochem. J. 177, 749-752 (49,52)
- FRISCH, A. & NEUFELD, E.F. (1979) Anal. Biochem. 95, 222-227 (427)
- FROST, R.G., HOLMES, E.W., NORDEN, A.G.W. & O'BRIEN, J.S. (1978) Biochem. J. 175, 181-188 (487)
- FURBISH, F.S., KRETT, N.L., BARRANGER, J.A. & BRADY, R.O. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1768-1774 (284)
- GAHL, W.A., TIETZE, F., BASHAN, N., BERNARDINI, I., RAIFORD, D. & SCHULMAN, J.D. (1983) Biochem. J. 216, 393-400 (133)
- GAL, A.E., PENTCHEV, P.G., BARRANGER, J.A., DAMBROSIA, J.M. & BRADY, R.O. (1979) Anal. Biochem. 95, 127-132 (597)
- GALJAARD, H., HOOGEVEEN, A., REUSER, W., WIT-VERBEEK, H.A., REUSER, A.J.J., HO, M.W. & ROBINSON, D. (1975) Nature 257, 60-62 (377,470)
- GATHMAN, W.D. & AMINOFF, D. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 68-76 (285)
- GATT, S. (1970) Chem. Phys. Lipids 5, 270-274 (174)
- GATTI, R., BUTTINA, P., MICHALSKI, J.C., STRECKER, G., BORRONE, C. & SALEMI, D. (1982) Riv. Ital. Ped. 8, 87-91 (576)
- GEHLER, J., SEWELL, A.C., BECHER, C., SPRANGER, J. & HARTMANN, J. (1981) J. Inher. Metabol. Dis. 4, 229-230 (575)
- GINNS, E.S., BRADY, R.O., PIRRUCCELLO, S., MOORE, C., SORRELL, S., FURBISH, F.S., MURRAY, G.S., TAGER, J. & BARRANGER, J.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 5607-5610 (185,607)
- GINNS, E.I., BRADY, R.O., STOWENS, D.W., FURBISH, F.S. & BARRANGER, J.A. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1103-1107 (605)
- GOLDBERG, M.F., COTLIER, E., FICHENSCHER, L.G., KENYION, K., ENAT, R. & BOROWSKY, S.A. (1971) Arch. Int. Med. 128, 387-398 (376)
- GOLDBERG, A.L. & ST JOHN, A.C. (1976) Annu. Rev. Biochem. 45, 747-803 (36)
- GOLDSTONE, A. & KOENIG, H. (1973) Biochem. J. 132, 267-282 (63)
- GONATAS, N.K. & GONATAS, J. (1965) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 24, 318-336 (473)
- GONZALEZ-NORIEGA, A., GRUBB, J.M., TALKAD, V. & SLY, W.S. (1980) J. Cell. Biol. 85, 839-852 (96)

- GOTTSCHALK, A. (1972) Glycoproteins, their structure and function. Elsevier, Amsterdam (208)
- GOUSSAULT, Y. & BOURRILLON, R. (1970) Biochim. Biophys. Res. Commun. 40, 1404-1408 (315)
- GRABOWSKI, G.A., IKONNE, J.U. & DESNICK, R.J. (1980) Enzyme 25, 13-25 (529)
- GREGORIADIS, G., MORELL, A.G., STERNLIEB, I. & SCHEINBERG, I.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5833-5837 (247)
- GROEBE, A., KRINS, M., SCHMIDBERGER, H., VON FIGURA, K., HARZER, K., KRESSE, H., PASCHKE, E., SEWELL, A. & ULLRICH, K. (1980) Amer. J. Hum. Genet. 32, 258-272 (496)
- GUDEWICZ, P.W., MOLNAR, J., LAI, M.Z., BEEZHOLD, D.W., SIEFRING, G.E., CREDO, R.B. & LORAND, L. (1980) J. Cell Biol. 87, 427-433 (18)
- HAKOMORI, S.I. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 733-764 (163,169)
- HAKOMORI, S.I. (1981b) Sem. Hematol. 18, 39-62 (171)
- HALLEY, D.J.J., WINCHESTER, B.G., BURDITT, L.J., D'AZZO, A., ROBINSON, D. & GALJAARD, H. (1980) Biochem. J. 187, 541-543 (538)
- HALLGREN, P., HANSSON, G., HENRIKSSON, K.G., HÄGER, A., LUNDBLAD, A. & SVENSSON, S. (1974) Eur. J. Clin. Invest. 4, 429-433 (357)
- HALLGREN, P. & LUNDBLAD, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1014-1022 (345)
- HALLGREN, P. & LUNDBLAD, A. (1977b) J. Biol. Chem. 252, 1023-1033 (346)
- HALLGREN, P., LUNDBLAD, A. & SVENSSON, S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5312-5314 (325,333)
- HARDINGHAM, T. (1981) Biochem. Soc. Trans. 9, 489-497 (142)
- HARFORD, J. & ASHWELL, G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 1557-1561(260)
- HARPAZ, N. & SCHACHTER, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4894-4902 (611)
- HASILIK, A., KLEIN, U., WAHEED, A., STRECKER, G. & VON FIGURA, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 7074-7078 (85)
- HASILIK, A. & NEUFELD, E.F. (1980a) J. Biol. Chem. 255, 4946-4950 (75,441,448)
- HASILIK, A. & NEUFELD, E.F. (1980b) J. Biol. Chem. 255, 4937-4945 (109)
- HASILIK, A., WAHEED, A., CANTZ, M. & VON FIGURA, K. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 119-123 (128)
- HASILIK, A., WAHEED, A. & VON FIGURA, K. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 761-767 (102,127,294,444)

- HERD, J.K., DVORAK, A.D., WILTSE, H.E., EISEN, J.D., KRESS, B.C. & MILLER, A.L. (1978) Amer. J. Dis. Child. 132, 1181-1186 (390)
- HERS, H.G. (1963) Biochem. J. 86, 11-16 (189)
- HERS, H.G. (1965) Gastroenterology, 48, 625-633 (29)
- HEYWORTH, C.M., NEUMANN, E.F. & WYNN, C.H. (1981) Biochem. J. 193, 773-779 (62)
- HICKMAN, S. & NEUFELD, E.F. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 992-999 (69,402)
- HICKMAN, S., SHAPIRO, L.J. & NEUFELD, E.F. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 55-61 (406)
- HIRANI, S., LITTLE, L. & MILLER, A.L. (1982) Biochem. J. 204, 557-563 (396,409)
- HIRANO, S., HOFFMAN, P. & MEYER, K. (1961) J. Org. Chem. 26, 5064-5069 (593)
- HO, M.W. (1975) FEBS Lett. 53, 243-247 (602)
- HO, M.W., NORDEN, A.G.W., ALHADEFF, J.A. & O'BRIEN, J.S. (1977) Mol. Cell. Biochem. 17, 125-140 (486)
- HOEKSEMA, H.L., DE WIT, J. & WESTERVELD, A. (1980) Hum. Genet. 53, 241-247 (491)
- HOFLACK, B. (1982) Thèse de Doctorat d'Etat, Lille (230)
- HONEY, N.K., MUELLER, O.T., LITTLE, L.E., MILLER, A.L. & SHOWS, T.B. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 7420-7424 (451)
- HOOGEVEEN, A.T., D'AZZO, A., BROSSMER, R. & GALJAARD, H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 292-300 (460)
- HOOGEVEEN, A.T., GRAHAM-KAWASHIMA, H., D'AZZO, A. & GALJAARD, H. (1984) J. Biol. Chem. 259, 1974-1977 (499)
- HOOGEVEEN, A.T., VERHEIJEN, F.W., D'AZZO, A. & GALJAARD, H. (1980) Nature 285, 500-502 (457)
- HOOGEVEEN, A.T., VERHEIJEN, F.W. & GALJAARD, H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 12143-12146 (462)
- HOOGHWINKEL, G.J.M. (1982) in "Glycosaminoglycans in physiological and pathological processes of body system" (VARMA, R.S. and VARMA, R. eds), pp. 330-353, KARGER ed., Basel (139)
- HÖÖK, M., WASTESON, Å & OLDBERG, Å (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1422-1428 (149)
- HOPKINSON, D.A. & HARRIS, H. (1971) Ann. Rev. Genetics 5, 5-28 (64)
- HOROWITZ, M.I. & PIGMAN, W. (1977) The Glycoconjugates, Vol. I, pp. 131-257 Academic Press, New York (207)

- HOWARD, D.R., NATOWICZ, M. & BAENZIGER, J.V. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10861-10868 (88)
- HREIDARSSON, S., THOMAS, G.H., VALLE, D.L., STEVENSON, R.E., TAYLOR, H., MCCARTY, J., COKER, S.B. & GREEN, W.R. (1983) Clin. Genet. 23, 427-435 (577)
- HUBBARD, S.C. & IVATT, R.J. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 555-583 (227)
- HUBBARD, A.L., WILSON, G., ASHWELL, G. & STUKENBROK, H. (1979) J. Cell. Biol. 83, 47-64 (277)
- HUDGIN, R.L., PRICER, W.E., ASHWELL, G., STOCKERT, R.J. & MORELL, A.G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5536-5543 (267)
- HUIJING, F. (1975) Physiol. Rev. 55, 609-658 (188,193)
- HULTBERG, B. & MASSON, P.K. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1473-1479 (536)
- HULTBERG, B. & MASSON, P.K. (1977) Biochim. Biophys. Acta 481, 573-577 (120,537)
- HÜRLER, G. (1919) Z. Kinderheilkol 24, 220-234 (135)
- HUTTUNEN, J.K. (1966) Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 44, Supp. 12, 1-60 (361)
- JAKOI, E.R., KEMPE, K. & GASTON, S.M. (1981) J. Supramol. Struct. & Cell Biochem. 16, 139-153 (101)
- JAKOI, E.R., ZAMPIGHI, G. & ROBERTSON, J.D. (1976) J. Cell Biol. 70, 97-102 (100)
- JAMES, L.F., HARTLEY, W.J. & VAN KAMPEN, K.R. (1981) J. Am. Vet. Med. Assn. 178, 146-150 (559)
- JATZKEWITZ, H. & SANDHOFF, K. (1963) Biochim. Biophys. Acta 70, 354-356 (474)
- JEFFREY, P.L., BROWN, D.H. & BROWN, B.I. (1970) Biochemistry 9, 1403-1415 (190)
- JOLLY, R.D. (1971) J. Pathol. 103, 113-121 (555)
- JONES, M.Z., CUNNINGHAM, J.G., DADE, A.W., ALESSI, D.M., MOSTOSKY, U.V., VORRO, J.R., BENITEZ, J.T. & LOVELL, K.L. (1983) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 42, 268-285 (568)
- JONES, M.Z. & DAWSON, G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5185-5188 (295,569,623)
- JONES, M.Z. & LAINE, R.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5181-5984 (620)
- JOZIASSE, D.H., VAN DEN EIJNDEN, D.H., LISMAN, J.J.W. & HOOGHWINKEL, G.J.M. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660, 174-185 (50,53)
- KABAT, E.A. (1978) J. Supramol. Struct. 8, 79-88 (215)
- KANNAGI, R., NUDELMAN, E. & HAKOMORI, S.I. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 3470-3474 (164)

- KAPLAN, A., ACHORD, D.T. & SLY, W.S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 2026-2030 (70)
- KARSON, E.M., NEUFELD, E.F. & SANDO, G.N. (1980) Biochemistry 19, 3856-3860 (80)
- KATO, T., OKADA, S., OHSHIMA, T., INUI, K., YUTAKA, T. & YABUUCHI, H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7814-7819 (452)
- KAWASAKI, T. & ASHWELL, G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1296-1302 (268)
- KAWASAKI, T., ETOH, R. & YAMASHINA, I. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1018-1024 (275)
- KELLY, T.E., BARTOSHESKY, L., HARRIS, D.J., McGAULEY, R.G.K., FEINGOLD, M. & SCHOTT, G. (1981) Am. J. Dis. Child. 135, 703-708 (366)
- KELLY, T.E. & GRAETZ, G. (1977) Amer. J. Med. Genet. 1, 31-46 (367)
- KELLY, T.E., THOMAS, G.H., TAYLOR, H.A., MCKUSICK, V.A., SLY, W.S., GLASER, J.H., ROBINOW, M., LUZZATTI, L., ESPIRITU, C., FEINGOLD, M., BULL, M.J., ASHENHURST, E.M. & IVES, E.J. (1975) Johns Hopkins Med. J. 137, 156-175 (383)
- KING, J.S., FIELDEN, M.L., GOODMAN, H.O. & BOYCE, W.H. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 310-315 (309)
- KINT, J.A. (1973) FEBS Lett. 36, 53-56 (66)
- KLEIN, U., KRESSE, H. & VON FIGURA, K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 158-166 (151)
- KLEIN, U. & VON FIGURA, K. (1976) FEBS Lett. 71, 266-268 (152)
- KLEIN, U. & VON FIGURA, K. (1979) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1465-1471 (150)
- KLENK, E. (1939) Hoppe Seylers's Z. Physiol. Chem. 262, 128-133 (166)
- KLINGER, M.M., LAINE, R.A. & STEINER, J.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7932-7935 (326)
- KOBATA, A. (1972) Methods Enzymology 28, 262-271 (347)
- KOLB-BACHOFEN, V. (1981) Biochim. Biophys. Acta 645, 293-299 (259)
- KOLODNY, E.H. & CABLE, W.J.L. (1982) Ann. Neurol. 11, 221-232 (31)
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. (1980) in "Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (LENNARZ, W.J. ed.), pp. 1-34, Academic Press, N.Y. (201)
- KORNFELD, S., LI, E. & TABAS, I. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7771-7778 (547)
- KOSEKI, K. & TSURUMI, K. (1977) J. Biochem. (Tokyo) 82, 1785-1788 (360)
- KRAG, S. & ROBBINS, A.R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8424-8431 (108)

- KRESS, B.C., FREEZE, H.H., HERD, K.J., ALHADEFF, J.A. & MILLER, A.L. (1980) J. Biol. Chem. 255, 955-961 (408)
- KRESSE, H., FUCHS, W., GLÖSSL, J., HOLTFRICH, D. & GILBERG, W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12926-12932 (148)
- KURIJAMA, M., ARIGA, T., ANDO, S., SUZUKI, M., YAMADA, T. & MIYATAKE, T. (1981a) J. Biol. Chem. 256, 12316-12321 (416)
- KURIYAMA, M., OKADA, S., TANAKA, Y. & UMEZAKI, H. (1980) J. Neurol. Sci. 46, 245-254 (379)
- KURIYAMA, M., SOMEYA, F., MIYATAKE, T. & KOSEKI, M. (1981b) Biochim. Biophys. Acta 117, 220-225 (428)
- LAGUNOFF, D., NICOL, D.M. & PRITZEL, P. (1973) Lab. Invest. 29, 449-453 (68)
- LARRIBA, G. (1978) FEBS-Lett. 95, 190-193 (221)
- LECAT, D., LEMONNIER, M., DERAPPE, C., LHERMITTE, M., VAN HALBEEK, H., DORLAND, L. & VLIEGENTHART, J.F.G. (1984) Eur. J. Biochem. 140, 415-420 (417,624)
- LEDEEN, R.W. (1978) J. Supramol. Struct. 8, 1-17 (167)
- LEDEEN, R., SALSAMAN, K., GONATAS, J. & TAGHAVY, A. (1965) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 24, 341-351 (476)
- LEMONNIER, M. & BOURRILLON, R. (1975) Biochim. Biophys. Res. Commun. 15, 453-454 (317,327)
- LEMONNIER, M. & BOURRILLON, R. (1976) Carbohydr. Res. 51, 99-106 (349,353)
- LEMONNIER, M., DERAPPE, C., POENARU, L., CHESTER, M.A., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S. & ÖCKERMAN, P.A. (1982) FEBS Lett. 141, 263-266 (362)
- LEMONNIER, M., GOUSSAULT, Y. & BOURRILLON, R. (1972) Carbohydr. Res. 24, 323-331 (316)
- LENNARTSON, G., LUNDBLAD, A., LINDBERG, B. & LÖNNGREN, J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 920-926 (356)
- LENNARTSON, G., LUNDBLAD, A., LUNDSTEN, J., SVENSSON, S. & HÄGER, A. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 325-334 (192)
- LENNARZ, W.J. (1980) The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans, Plenum Press ed. New York, USA (204)
- LEROY, J.G. (1982) in "Birth defects : original article series", Vol. 18, Part 3B, pp. 3-12 (198)
- LEROY, J.G. & DE MARS, R.I. (1967) Science 157, 804-806 (380)
- LI, E., GIBSON, R. & KORNFELD, S. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 199, 393-399 (241,509)
- LI, S.C. & LI, Y.T. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1159-1163 (179)

- LI, Y.T. & LI, S.C. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 173-180 (65)
- LI, S.C., WAN, C.C., MAZZOTTA, M.Y. & LI, Y.T. (1974) Carbohydr. Res. 34, 189-193 (488)
- LIE, K.K., THOMAS, G.H., TAYLOR, H.A. & SENSENBRENNER, J.A. (1973) Clin. Chim. Acta 45, 243-248 (391)
- LIVNI, N. & MERIN, S. (1978) Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 600-604 (411)
- LLOYD, J.B. (1977) Biochem. J. 164, 281-282 (404)
- LORINCZ, A.E., HURST, R.E. & KOLODNY, E.H. (1982) Ann. Clin. Lab. Sci. 12, 258-266 (154)
- LOTE, C.J. & WEISS, J.B. (1971) FEBS Lett. 16, 81-85 (323,328)
- LOWDEN, J.A., MAHURAN, D., NOVAK, A., LEE, C. & SKOMOROWSKI, M.A. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 181-194 (60)
- LOWDEN, J.A. & O'BRIEN, J.S. (1979) Amer. J. Hum. Genet. 31, 1-18 (422,456)
- LOWE, M. & NILSSON, B. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1885-1887 (270)
- LUNDBLAD, A. (1965) Biochim. Biophys. Acta 101, 177-182 (312)
- LUNDBLAD, A. (1966) Biochim. Biophys. Acta 130, 130-142 (301,335)
- LUNDBLAD, A. (1978) Methods in Enzymology, Vol. 50, Part C, pp. 226-235 (302)
- LUNDBLAD, A. (1978b) in "The Glycoconjugates" (HOROWITZ, M.I. and PIGMAN, W. eds) Vol. 1, pp. 441-458, Academic Press, N.Y. (307)
- LUNDBLAD, A., HALLGREN, P., RUDMARK, A. & SVENSSON, S. (1973) Biochemistry 12, 3341-3345 (339,351)
- LUNDBLAD, A., MASSON, P.K., NORDEN, N.E., SVENSSON, S., ÖCKERMAN, P.A. & PALO, J. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 209-214 (588)
- LUNDBLAD, A., SJÖBLAD, S. & SVENSSON, S. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 130-136 (483)
- LUNDBLAD, A. & SVENSSON, S. (1973) Carbohydr. Res. 30, 187-189 (340)
- LUNDBLAD, A. & SVENSSON, S. (1973b) Carbohydr. Res. 13, 306-309 (354,355)
- LUNNEY, J.K. & ASHWELL, G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 341-343 (282)
- LUSIS, A.J. & PAIGEN, K. (1977) J. Cell Biol. 73, 728-735 (130)
- LUSIS, A.J., TOMINO, S. & PAIGEN, K. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7753-7760 (129)

- MAHURAN, D.J., TSUI, F., GRAVEL, R.A. & LOWDEN, J.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 1602-1605 (61)
- MAKINO, M., KOJIMA, T. & YAMASHINA, I. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 961-966 (580)
- MALLEVAIS-GOUBET, B. (1969) DEA Biochimie, Lille (300)
- MARCUS, D.M., KUNDU S.K. & SUZUKI, A. (1981) Sem. Hematol. 18, 63-71 (172)
- MARET, A., SALVAYRE, R., NEGRE, A. & DOUSTE-BLAZI, L. (1981) Eur. J. Biochem. 115, 455-461 (606)
- MARKERT, C.L. & MÖLLER, F. (1959) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 45, 753-757 (43)
- MAROTEAUX, P. & HUMBEL, R. (1976) Arch. Franç. Ped. 33, 641-643 (194,197)
- MAROTEAUX, P., HUMBEL, R., STRECKER, G., MICHALSKI, J.C. & MANDE, R. (1978) Arch. Franç. Ped. 35, 819-829 (369)
- MAROTEAUX, P. & LAMY, M. (1965) J. Pediat. 67, 313-323 (492)
- MAROTEAUX, P. & LAMY, M. (1966) Presse Med. 74, 2889-2892 (382)
- MAROTEAUX, P., POISSONNIER, M., TONDEUR, M., STRECKER, G. & LEMONNIER, M. (1978b) Arch. Franç. Ped. 35, 280-291 (371)
- MARSCH, C.A. & GOULAY, G.C. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 142-148 (524)
- MATALON, R., ARBOGAST, B., JUSTICE, P., BRANDT, I.K. & DORFFMAN, A. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 759-765 (493)
- MATSUURA, F. & JONES, M.Z. (1983) Biochim. Biophys. Acta 759, 67-73 (571)
- MATSUURA, F., LAINE, R. & JONES, M.Z. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 211, 485-493 (570)
- MATSUURA, F., NUNEZ, H.A., GRABOWSKI, G.A. & SWEELEY, C.C. (1981b) Arch. Biochem. Biophys. 207, 337-352 (550)
- MAURY, P. (1976) Clin. Chim. Acta 71, 335-338 (348)
- MAURY, C.P.J. (1982) J. Inher. Metabol. Dis. 5, 192-196 (581)
- MAURY, C.P.J. & PALO, J. (1980) Clin. Chem. Acta 108, 293-299 (585)
- MAYNARD, Y. & BAENZIGER, J.U. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3788-3794 (251,281)
- McGOVERN, M.M., AULA, P. & DESNICK, R.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10743-10747 (583)
- McKUSICK, V.A., KAPLAN, D., WISE, D., HANLEY, W.B., SUDDARTH, S.B., SEVICK, M.E. & MAUMANEE, A.E. (1965) Medicine 44, 445-483 (138)

- MENDLA, K. & CANTZ, M. (1984) Biochem. J. 218, 625-628 (431)
- MERSSMANN, G., VON FIGURA, K. & BUDECKE, E. (1976) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 641-648 (543)
- MESSER, M. & TRIFONOFF, E. (1980) Carbohydr. Res. 83, 327-334 (616)
- MEYER, D.I. (1982) Trends Biochem. Sci. 7, 320-321 (111)
- MEYER, K.H. & BERNFELD, P. (1940) Helv. Chim. Acta 23, 875-885 (187)
- MEYER, D.M., LEMONNIER, M. & BOURRILLON, R. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1302-1309 (421)
- MILLER, A.L., KRESS, B.C., STEIN, R., KINNON, C., KERN, H., SCHNEIDER, A. & HARMS, E. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9352-9362 (407)
- MITCHELL, M.L., ERICKSON, R.P., SCHMID, D., HIEBER, V., POZNANSKI, A.K. & HICKS, S.P. (1981) Clin. Genet. 20, 191-202 (518)
- MIYAGI, T. & TSUIKI, S. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 75-81 (432)
- MIYATAKE, T., YAMADA, T., SUZUKI, M., PALMANN, B., SANDHOFF, K., ARIGA, T. & ATSUMI, T. (1979) FEBS Lett. 97, 257-259 (378)
- MIZUNO, Y., KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, T. & YAMASHINA, I. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4247-4252 (280)
- MIZUOCHI, T., NISHIMURA, R., DERAPPE, C., TANIGUCHI, T., HAMAMOTO, T., MOCHIZUKI, M. & KOBATA, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 14126-14129 (507)
- MIZUOCHI, T., NISHIMURA, Y., KATO, K. & KOBATA, A. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 209, 298-303 (90)
- MOFFITT, K.D., CHAMBERS, J.P., DIVEN, W.F., GLEW, R.H., WENGER, D. & FARRELL, D.F. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 247-260 (608,612)
- MONTGOMERY, T.R., THOMAS, G.H. & VALLE, D.L. (1982) Johns Hopkins Med. J. 151, 113-121 (519)
- MONTREUIL, J. (1975) Pure Appl. Chem. 42, 431-477 (225,415)
- MONTREUIL, J. (1980) Adv. Carb. Chem. Biochem. 37, 157-223 (203)
- MONTREUIL, J. (1981) Compt. Rend. Soc. Chim. Biol. 175, 694-708 (244,554)
- MONTREUIL, J. (1982) in "Comprehensive Biochemistry" (NEUBERGER, A., VAN DEENEN, L.L.M. eds) Vol. 19B, pp. 1-188, Elsevier Pub., Amsterdam (206,229, 293,548)
- MONTREUIL, J. & BOULANGER, P. (1953) C.R. Acad. Sci. 236, 337 (306)
- MONUS, Z., KONYAR, E. & SZABO, L. (1977) Virchows Arch. B Cell Pathol. 26, 159-173 (514)

- MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H. & ASHWELL, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 155-159 (246,248)
- MÖRNER, K.A.H. (1895) Skand. Arch. Physiol. 6, 332 (305)
- MUELLER, O.T., HONEY, N.K., LITTLE, L.E., MILLER, A.L. & SHOWS, T.B. (1983) J. Clin. Invest. 72, 1016-1023 (455)
- MUELLER, O.T. & SHOWS, T.B. (1982) Hum. Genet. 60, 158-162 (458)
- MUIR, L. & LEE, Y.C. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2343-2349 (220)
- MURRAY, G.I. & NEVILLE, D.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 11942-11948 (79)
- NAGAI, Y. & IWAMORI, M. (1980) Mol. Cell Biochem. 29, 81-90 (168)
- NATOWICZ, M., BAENZIGER, J.V. & SLY, W.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 4412-4420 (87)
- NATOWICZ, M., CHI, M.M.Y., LOWRY, O.H. & SLY, W.S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 4322-4326 (74)
- NEUFELD, E.F. & ASHWELL, G. (1980) in "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (LENNARZ, W.J., ed) pp. 241-266, Plenum Press, New York (243)
- NEUFELD, E.F. & CANTZ, M.J. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci. 179, 580-587 (67,157)
- NEUFELD, E.F., LIM, T.W. & SHAPIRO, L.J. (1975) Annu. Rev. Biochem. 44, 357-376 (158)
- NEUFELD, E.F., SANDO, G.N., GARVIN, A.J. & ROME, L.H. (1977) J. Supramol. Struct. 6, 95-101 (162,405)
- NGUYEN-HONG, V., BEAUREGARD, G., POTIER, M., BELISLE, M., MAMELI, L., GATTI, R. & DURAND, P. (1980) Biochim. Biophys. Acta 616, 259-270 (436)
- NG YING KIN, M.N.K. & WOLFE, L.S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 123-130 (481)
- NILSSON, B., NORDEN, N.E. & SVENSSON, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4545-4553 (238)
- NISHIGAKI, M., MURAMATSU, T. & KOBATA, A. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 638-645 (286)
- NORDEN, N.E., LUNDBLAD, A. & SVENSSON, S. (1974) Biochemistry 13, 871-874 (544)
- NORDEN, N.E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., OCKERMAN, P.A. & AUTIO, S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6210-6215 (541)
- NOVIKOFF, A.B. (1973) in "Lysosomes and storage diseases" (H.G. HERS and F. VAN HOOFF eds) Acad. Press, London, pp. 1-41 (2)
- NOVIKOFF, A.B. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 3327-3331 (4)
- NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N. & HAUW, J.J. (1971) J. Cell Biol. 50, 859-886 (7)

- O'BRIEN, J.S. (1975) Clin. Genet. 3, 303-313 (434)
- O'BRIEN, J.S. (1978) in "The metabolic basis of inherited diseases", (J.B. STANBURY, J. WYNGAARDEN, D.S. FREDICKSON, eds) pp. 841-865, McGrawhill, N.Y. (471)
- O'BRIEN, J.S. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 263-269, Raven Press, New York (433)
- O'BRIEN, J.S., HO, M.W., VEATH, M.L., WILSON, J.F., MYERS, G., OPITZ, J.M., ZURHEIN, M., SPRANGER, J.W, HARTMANN, H.A., HANEBERG, B. & GROSSE, F.R. (1972) Clin. Genet. 3, 411-434 (475)
- O'BRIEN, J.S., GUGLER, E., GIEDION, A., WIESSMANN, U., HERSCHKOWITZ, N., MEIER, C. & LEROY, J. (1976) Clin. Genet. 9, 495-504 (494)
- O'BRIEN, J.S., STERN, M.B., LANDING, B.H., O'BRIEN, J.K. & DONNELL, G.N. (1965) Amer. J. Dis. Child. 109, 338-346 (484)
- ÖCKERMAN, P.A. (1967) LANCET 2, 239-241 (510)
- ÖCKERMAN, P.A. (1969) J. Pediat. 75, 360-365 (511,540)
- OHKURA, T., YAMASHITA, K. & KOBATA, A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8485-8490 (505)
- OKADA, S., KATO, T., OSHIMA, T., YUTAKA, T. & YABUUCHI, H. (1983) Clin. Genet. 23, 155-159 (453)
- OKADA, S. & O'BRIEN, J.S. (1968) Science 160, 1002-1004 (485)
- OPHEIM, D.J. & TOUSTER, O. (1977) J. Biol. Chem. 252, 739-743 (47,523)
- OPHEIM, D.J. & TOUSTER, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1017-1023 (57)
- ORRIL, T., CHIBA, T., MINAMI, R., SUKEGAWA, K. & NAKAO, T. (1972) Tohoku J. Exp. Med. 112, 373-380 (387)
- OVERDIJK, B., VAN DER KROEFF, W.H., LISMAN, J.W., PIERCE, R.J., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1981) FEBS Lett. 128, 364-366 (289,619)
- OVERDIJK, B., VANSTEIN, G., WOLF, J.H. & LISMAN, J.J.W. (1982) Int. J. Biochem. 14, 25-31 (51,54)
- PAIGEN, K. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 1-15, Raven Press, N.Y. (118)
- PALADE, G.E. (1975) Science 189, 347-358 (3)
- PARKER, W.C. & BEARN, A.G. (1963) Amer. J. Med. 34, 680-683 (117)
- PARKKINEN, J. & FINNE, J. (1983) Eur. J. Biochem. 136, 355-361 (334,363,418)
- PARKKINEN, J. & FINNE, J. (1984) Eur. J. Biochem. 140, 427-431 (364)

- PASCHKE, E., NIEMANN, R., STRECKER, G. & KRESSE, H. (1982) Biochim. Biophys. Acta 704, 134-143 (498)
- PASCHKE, E., ULLRICH, K., VON FIGURA, K. & KRESSE, H. (1979) in "Glycoconjugates Proc. 5th Int. Symp." (SCHAUER, R., BOER, P., BUDECKE, E., KRAMER, M.F., VLIEGENTHART, J.F.G. and WIEGANDT, M. eds), pp. 404-405, Georg Thieme Pub. Stuttgart (497)
- PASTAN, I.H. & WILLINGHAM, M.C. (1981) Annu. Rev. Physiol. 43, 239-250 (23)
- PATRICK, A.D. (1965) Biochem. J. 97, 17c (596)
- PATTERSON, D.F., HASKINS, M.E. & JEZYK, P.F. (1982) in "Advances in human genetics" (HARRIS and HIRSCHHORN eds), vol. 12, pp. 263-339, Plenum Pub. Co. (32)
- PAZ-PARENTE, J., WIERUSZESKI, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & FOURNET, B. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13173-13176 (232,240)
- PAZUR, J.H., TOMINAGA, Y., FORSBERG, L.S. & SIMPSON, D.L. (1980) Carbohydr. Res. 84, 103-114 (218)
- PEARSE, B.M.F. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 1255-1259 (21)
- PEDRINI, V., LENZI, L. & ZAMBOTTI, V. (1962) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 847-849 (140)
- PENTCHEV, P.G., BRADY, R.O., HIBBERT, S.R., GAL, A.E. & SHAPIRO, D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5256-5261 (600)
- PERTSOUNIS, D. (1983) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Lille (627)
- PETERS, S.P., COYLE, P., COFFEE, C.J., GLEW, R.H., KUHLenschmidt, M.S., ROSENFELD, L. & LEE, Y.C. (1977) J. Biol. Chem. 252, 563-573 (601)
- PHILIPS, N.C., ROBINSON, D., WINCHESTER, B.G. (1974) Clin. Chim. Acta 55, 11-19 (531)
- PHILIPS, N.C., ROBINSON, D., WINCHESTER, B.G. (1975) Biochem. J. 151, 469-475 (530)
- PHILLIPART, M. & MENKES, J.H. (1967) in "Inborn disorders of Sphingolipid metabolism" (ARONSON, S.M. and VOLK, B.W. eds) p. 389-398, Pergamon Press, N.Y. (609)
- PIERCE, R.J., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1979) Biochem. J. 180, 673-676 (288,290,617)
- PIERCE, R.J., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1980) Biochem. J. 185, 261-264 (292,618)
- PIERCE-CRETEL, A., DEBRAY, H., MONTREUIL, J., SPIK, G., VAN HALBEEK, H., MUTSAERS, J.H.G.M. & VLIEGENTHART, J.F.G. (1984) Eur. J. Biochem. 139, 337-349 (508)
- PIERCE-CRETEL, A., PAMBLANCO, M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1981) Eur. J. Biochem. 114, 169-178 (211)

- PINO, R.M., PINO, L.C. & BANKSTON, P.W. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29, 1061-1070 (5)
- PINSKI, L., MILLER, J., SHANFIELD, B., WATTERS, G. & WOLFE, L.S. (1974) Am. J. Hum. Genet. 26, 563-577 (469)
- POENARU, L., MIRANDA, C. & DREYFUS, J.C. (1980) Am. J. Hum. Genet. 32, 354-363 (532)
- POHLMAN, R., KLEIN, U., FROMME, H.G. & VON FIGURA, K. (1981) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1199-1207 (145)
- POHLMAN, R., WAHEED, A., HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5323-5325 (104)
- POLLITT, R.J. & JENNER, F.A. (1969) Clin. Chim. Acta 25, 413-416 (579)
- POLLITT, R.J., JENNER, F.A. & MERSKY, H. (1968) Lancet ii, 253-256 (573)
- POLLITT, R.J. & PRETTY, K.M. (1974) Biochem. J. 141, 141-146 (587)
- POTIER, M., BEAUREGARD, G., BELISLE, M., MAMELI, L., HONG, V.N., MELANCON, S.B. & DALLAIRE, L. (1979) Clin. Chim. Acta 99, 97-105 (426)
- PRICER, W.E. & ASHWELL, G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7539-7544 (261)
- PRIEELS, J.P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L., PAULSON, J.C. & HILL, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 2215-2219 (252,283)
- RAPIN, I., GOLDFISCHER, R.S., KATZMAN, R., ENGEL, J. & O'BRIEN, J.S. (1978) Ann. Neurol. 3, 234-242 (373)
- RAUVALA, H. & FINNE, J. (1979) FEBS Lett. 97, 1-8 (233)
- REARICK, J.I., CHAPMAN, A. & KORNFIELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6255-6261 (226)
- REGOECZI, E., DEBANNE, M.T., HATTON, M.W.C. & KOJ, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 54, 372-384 (265)
- REIJNGOUD, D.J. & TAGER, J.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 472, 419-449 (8,35)
- REITMAN, M.L. & KORNFIELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4275-4281 (103)
- REITMAN, M.L., VARKI, A. & KORNFIELD, S. (1981) J. Clin. Invest. 67, 1574-1579 (443)
- RENLUND, M., CHESTER, M.A., LUNDBLAD, A., AULA, P., RAIVIO, K.O., AUTIO, S. & KOSKELA, S.L. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 245-250 (134)
- RENLUND, M., CHESTER, M.A., LUNDBLAD, A., PARKKINEN, J. & KRUSIUS, T. (1983) Eur. J. Biochem. 130, 39-45 (10)
- RICHES, W.G. & SMUCKLER, E.A. (1983) Arch. Pathol. Lab. Med. 107, 147-152 (368)

- RITTMANN, L.S. & O'BRIEN, J.S. (1981) in "Isozymes : current topics in biological and medical research", Vol. 5, pp. 77-113, Alan Liss ed., N.Y. (182,489)
- ROBBINS, A.A., MYEROWITZ, R., YOULE, R.J., MURRAY, G.J. & NEVILLE, D.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10618-10622 (107)
- ROBINSON, D. (1974) Enzyme 18, 114-135 (40)
- RODEN, L. (1980) in "Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (LENNARZ, W.J. ed.), pp. 267-371, Plenum Press, N.Y. (216)
- ROME, L.H. & CRAIN, L.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10763-10768 (144)
- ROME, L.H., WEISSMANN, B. & NEUFELD, E.F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 2331-2334 (91)
- ROSEMAN, S. (1970) Chem. Phys. Lipids 5, 270-297 (175)
- ROSENFELD, M.G., KREIBICH G., POPOV, D., KATO, K. & SABATINI, D.D. (1982) J. Cell. Biol. 93, 135-143 (113)
- ROWLEY, B.C. & HAMILTON, P.B. (1972) Clin. Chem. 18, 951-954 (322,332)
- SADEH, S., WARREN, C., DANIEL, P.F., BUGGE, B., JAMES, L.F. & JEANLOZ, R.W. (1983) FEBS Lett. 163, 104-109 (566)
- SAHAGIAN, G., DISTLER, J. & JOURDIAN, G.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 4289-4293 (97)
- SANDHOFF, K. (1980) Naturwissenschaften 67, 431-441 (178)
- SANDHOFF, K. & CHRISTOMANOU, H. (1979) Hum. Genet. 50, 107-143 (122,183)
- SANDHOFF, K. & PALLMANN, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 122-126 (176)
- SANDO, G.N. & NEUFELD, E.F. (1977) Cell 12, 619-627 (71)
- SARKAR, M., LIAO, J., KABAT, E.A., TANABE, T. & ASHWELL, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3170-3174 (249,254)
- SAVOLAINEN, S. (1976) Biochem. J. 153, 749-750 (584)
- SAWAMURA, T., NAKADA, H., FUJII-KURIYAMA, Y. & TASHIRO, Y. (1980) Cell Struct. Funct. 5, 133-146 (263)
- SCHACHTER, H., NARASIMHAN, S., GLEESON, P., VELLA, G.J. & BROCKHAUSEN, I. (1982) Phil. Trans. R. Soc. Lond. 300, 145-159 (551)
- SCHACHTER, H. & ROSEMAN, S. (1980) in "The biochemistry of glycoprotein and proteoglycans" (LENNARZ, W.J. ed), pp. 85-160, Plenum Press, N.Y. (228)
- SCHAUER, R., WEMBER, M. & TSCHESCHE, H. (1984) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 419-426 (430)

- SCHEEL, G., ACEVEDO, E., CONZELMANN, E., NEHRKORN, H. & SANDHOFF, K. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 245-253 (177)
- SCHLESINGER, P.H., DOEBBER, T.W., MANDELL, B.F., WHITE, R., DE SCHRYVER, C., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. & STAHL, P. (1978) Biochem. J. 176, 103-109 (276)
- SCHLESINGER, P.H., RODMAN, J.S., FREY, M., LANG, S. & STAHL, P. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 177, 606-614 (273)
- SCHLESINGER, S., SLY, W.S. & SCHULZE, I.T. (1978) Virology 89, 409-417 (399)
- SCHNEIDER, J.A. & SCHULMAN, J.D. (1982) in "The metabolic basis of inherited diseases (STANBURY, J.B. et al. eds), 5th edn, pp. 1844-1866, McGraw Hill, N.Y. (11)
- SHOWS, T.B., MUELLER, O.T., HONEY, N.K., WRIGHT, C.E. & MILLER, A.L. (1982) Amer. J. Med. Genet. 12, 343-353 (450)
- SCHRAM, A.W. & TAGER, J.M. (1981) Trends Biochem. Sci., 6, 328-330 (42)
- SCHULTZE, H.E. (1966) in "Molecular biology of human proteins" (SCHULTZE, H.E. and HEREMANS, J.F. eds) pp. 670-731, Elsevier, Amsterdam (299)
- SHAPIRO, L.J., HALL, C.W., LEDER, I.G. & NEUFELD, E.F. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 156-161 (161)
- SHAW, D.R. & GRIFFIN, F.M. (1981) Nature 289, 409-411 (19)
- SLY, W.S., GONZALEZ-NORIEGA, A., NATOWICZ, M., FISCHER, H.D. & CHAMBERS, J.P. (1979) Fed. Proc. 38, 467 (93)
- SLY, W.S., LAGWINSKA, E. & SCHLESINGER, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 2443-2447 (398)
- SMICKEL, R.D., DISTLER, J.J. & JOURDIAN, G.W. (1975) J. Lab. Clin. Med. 86, 672-682 (385)
- SPIK, G. (1977) in "Les oligosaccharidoses" (J.P. FARRIAUX ed) pp. 31-41, Crouan et Roques ed. (41)
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. & MONTREUIL, J. (1975) FEBS Lett. 50, 296-299 (235)
- SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H. & VLIEGENTHART, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 413-419 (236)
- SPIRO, R.G. & BHOYROO, V.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5704-5717 (212)
- SPRANGER, J. (1975) Birth Defects Orig. Art., Series 11, 279-282 (365)
- SPRANGER, J.W. & WIEDEMAN, H.R. (1970) Humangenetik 9, 113-139 (195,364)
- STAHL, P.D., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. & SCHLESINGER, P.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 1399-1403 (278)
- STAHL, P.D. & SCHLESINGER, P.H. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 194-196 (114)

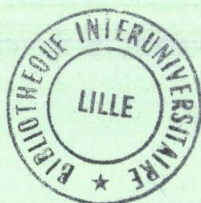
- STAHL, P., SCHLESINGER, P., RODMAN, J.S. & DOEBBER, T. (1976) Nature 264, 86-88 (250,272)
- STECKEL, F., GIESELMANN, V., WAHEED, A., HASILIK, K., VON FIGURA, K., OUDE-ELFERINK, R., KALSBECK, R. & TAGER, J.M. (1982) FEBS Lett. 150, 69-76 (121)
- STEINER, A.W. & ROME, L.H. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 681-687 (98)
- STEINER, S.M., VIA, D., LARRIBA, G., SPRAMEK, S. & LAINE, R.A. (1978) in "Glycoproteins and glycolipids in disease processes" (WALBORG, E.F. ed) Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 80, pp. 378-403, Washington (222)
- STOSSEL, T.P. (1976) J. Reticuloendothel. Soc. 19, 237-245 (16)
- STOWELL, C.P. & LEE, Y.C. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6107-6110 (255)
- STOWELL, C.P., LEE, R.T. & LEE, Y.C. (1980) Biochemistry 19, 4904-4908 (256)
- STRECKER, G. (1972) Thèse de Doctorat d'Etat, Lille (297)
- STRECKER, G. (1977) in "Les oligosaccharidoses" (FARRIAUX, J.P. ed) pp. 13-30 Crouan et Roques éd., Lille (199)
- STRECKER, G. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 95-113, Raven Press, New York (503)
- STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DHONDT, J.L. & FARRIAUX, J.P. (1976b) Biochimie 58, 579-586 (546,552)
- STRECKER, G., HERLANT-PEERS, M.C., FOURNET, B. & MONTREUIL, J. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 165-171 (468)
- STRECKER, G., HONDI-ASSAH, T., FOURNET, B., SPIK, G., MONTREUIL, J., MAROTEAUX, P., DURAND, P. & FARRIAUX, J.P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 444, 349-358 (414)
- STRECKER, G. & LEMAIRE-POITAU, A. (1977) J. Chromatogr. 143, 553-569 (303)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1969) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 14 (336)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1972) Clin. Chim. Acta 33, 395-401 (467)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1973) C.R. Acad. Sci. 277, 1393-1396 (337)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1978) C.R. Acad. Sci. 287, 887-890 (594)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1979) Biochimie 61, 1199-1246 (200,202,304)
- STRECKER, G., TRENTESAUX, C., RIAZI-FARZAD, T., FOURNET, B., BOUQUELET, S. & MONTREUIL, J. (1973) C.R. Acad. Sci. 277, 1569-1572 (338,350)
- SUGAHARA, K., AKASAKI, M., FUNAKOSHI, I., AULA, P. & YAMASHINA, I. (1977) FEBS Lett. 78, 284-286 (591)

- SUGAHARA, K., FUNAKOSHI, S., FUNAKOSHI, I., AULA, P. & YAMASHINA, I. (1976) J. Biochem. (Tokyo) 80, 195-201 (590)
- SUZUKI, K. (1968) Science 159, 1471-1472 (477)
- SUZUKI, Y., SAKUBARA, H., HAYASHI, K., SUZUKI, K. & IMAHORI, K. (1981b) J. Biochem. 90, 271-273 (459)
- SUZUKI, Y., SAKUBARA, H., POTIER, M., AKAGI, M., SAKAI, M. & BEPPU, H. (1981a) Hum. Genet. 58, 387-389 (437)
- SWALLOW, D.M., EVANS, L., STEWART, G., THOMAS, P.K. & ABRAMS, J.D. (1979) Ann. Hum. Genet. 43, 27-35 (429)
- SWALLOW, D.M., STOKES, D.C., GORNEZ, G. & HARRIS, H. (1974) Ann. Hum. Genet. 37, 287-302 (59)
- SWANK, R.T., NOVAK, E., BRANDT, E.J. & SKUDLAREK, M. (1978) in "Protein turnover and lysosomal function" (DOYLE, D. and SEGAL, H. eds) pp. 251-271 Acad. Press, N.Y. (131)
- TABAS, I. & KORNFELD, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11655-11663 (527)
- TABAS, I. & KORNFELD, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6633-6639 (77,86)
- TACHIBANA, Y., YAMASHITA, K. & KOBATA, A. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 199-210 (291)
- TAKAHASHI, K., TERASHIMA, K., HAKOZAKI, H., NAITO, M. & KOJIMA, M. (1978) Acta Histochem. Cytochem. 11, 286-315 (472,598)
- TANABE, T., PRICER, W.E. & ASHWELL, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1038-1043 (262,266)
- TARENTINO, A.L. & MALEY, F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6537-6544 (287)
- TASHIRO, Y. & TREVITHICK, J.R. (1977) Can J. Biochem. 55, 249-256 (38)
- TAYLOR, H.A., THOMAS, G.H., AYLSWORTH, A., STEVENSON, R.E. & REYNOLDS, L.W. (1975) Clin. Chim. Acta 59, 93-99 (533)
- THOMAS, C.H., TILLER, G.E., REYNOLDS, L.W., MILLER, C.S. & BACE, J.W. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 188-195 (386,439)
- THOMAS, C.H., TIPTON, R.E., CH'JEN, L.T., REYNOLDS, L.W. & MILLER, C.S. (1978) Clin. Genet. 13, 369-379 (374)
- TIETZE, C., SCHLESINGER, P. & STAHL, P. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 1-8 (04-
- TIETZE, C., SCHLESINGER, P. & STAHL, P. (1982) J. Cell. Biol. 92, 417-424 (95)
- TOKUNAGA, M., ENDO, M. & YOSIZAWA, Z. (1979) Tohoku J. Exp. Med. 127, 17-24 (359)

- TOLLESHAUG, H., BERG, T., FRÖLICH, L. & NORUM, K.R. (1979) Biochim. Biophys. Acta 585, 71-84 (264)
- TOMINAGA, I., OKA, A. & YOSHIDA, H. (1965) J. Biochem. (Tokyo) 57, 717-721 (319,329)
- TOMINO, S., PAIGEN, K., TULSIANI, D.R.P. & TOUSTER, O. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8503-8509 (44)
- TOWNSEND, R. & STAHL, P. (1981) Biochem. J. 194, 209-214 (279)
- TSAY, G.C., DAWSON, G. & LI, Y.T. (1975) Biochim. Biophys. Acta 385, 305-311 (478)
- TSAY, G.C., DAWSON, G. & MATALON, R. (1974) J. Pediatr. 84, 865-868 (545)
- TSAY, G.C., DAWSON, G. & MATALON, R. (1975b) J. Clin. Invest. 56, 711-718 (542)
- TSUJI, T., IRIMURA, T. & OSAWA, T. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10497-10502 (592)
- TSUJI, S., YAMADA, T., TSUTSUMI, A. & MIYATAKE, T. (1982) Ann. Neurol. 11, 541-543 (438)
- TULSIANI, D.R.P., HARRIS, T.M. & TOUSTER, O. (1982b) J. Biol. Chem. 257, 7936-7939 (560)
- TULSIANI, D.R.P., HUBBARD, S.C., ROBBINS, P.W. & TOUSTER, O. (1982a) J. Biol. Chem. 257, 3660-3668 (58,528)
- TULSIANI, D.R.P., KELLER, R.K. & TOUSTER, O. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4770-4776 (46)
- TULSIANI, D.R.P., OPHEIM, D.J. & TOUSTER, O. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3227-3233 (526)
- TULSIANI, D.R.P., SIX, H. & TOUSTER, O. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 3080-3084 (45)
- TULSIANI, D.R.P. & TOUSTER, O. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7578-7585 (564)
- VAN DEN HAMER, C.J.A., MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.M., HICKMAN, J. & ASHWELL, G. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4397-4402 (253)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., FIAT, A.M. & JOLLES, P. (1980) Biochim. Biophys. Acta 623, 295-300 (214)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., BOERSMA, A. & ROUSSEL, P. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 7-20 (213)
- VAN HOOF, F. (1973) in "Lysosomes and storage diseases" (HERS H.G. and VAN HOOF, F. eds), pp. 305-321, Academic Press, New York (466)
- VARKI, A. & KORNFELD, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10847-10858 (81,84,89)
- VARKI, A. & KORNFELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9937-9943 (106)

- VARKI, A.P., REITMAN, M.L. & KORNFELD, S. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 7773-7777 (454).
- VARKI, A., REITMAN, M.L., VANNIER, A., KORNFELD, S., GRUBB, J.H. & SLY, W.S. (1982) Amer. J. Hum. Genet. 34, 717-729 (446)
- VERHEIJEN, F.W., HANSE, H.C., VAN DIGGELEN, O.P., BAKKER, H.D., LOONEN, M.C.B., DURAND, P. & GALJAARD, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 470-478 (435)
- VLADUTIU, G.D., FIKE, R.M. & AMIGONE, V.T. (1981) In Vitro 17, 588-592 (500)
- VLADUTIU, G.D. & RATAZZI, M.C. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 956-964 (392,403)
- VLADUTIU, G.D. & RATAZZI, M.C. (1978) Biochim. Biophys. Acta 539, 31-36(394,440)
- VLIAGENTHART, J.F.G., DORLAND, L. & VAN HALBEEK, H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, 209-374 (419)
- VON FIGURA, K. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases" (CALLAHAN, J.W. and LOWDEN, J.A. eds) pp. 229-248, Raven Press, N.Y. (146)
- VON FIGURA, K., REY, M., PRINZ, R., VOSS, B. & ULLRICH, K. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 103-109 (73)
- WAHEED, A., HASILIK, A., CANTZ, M. & VON FIGURA, K. (1982b) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 169-178 (447)
- WAHEED, A., HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 317-321 (126)
- WAHEED, A., POHLMANN, R., HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4150-4152 (105)
- WAHEED, A., POHLMANN, R., HASILIK, A., VON FIGURA, K., VAN EISEN, A. & LEROY, J.G. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1052-1058 (445)
- WALL, D.A., WILSON, G. & HUBBARD, A.L. (1980) Cell 21, 79-93 (25,258)
- WARIN, V., BAERT, F., FOURET, R., STRECKER, G., SPIK, G., FOURNET, B. & MONTREUIL, J. (1979) Carbohydr. Res. 76, 11-22 (625)
- WARNER, T.G. & O'BRIEN, J.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 224-232 (621)
- WARREN, L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1971-1975 (420)
- WARREN, C.D., SADEH, S., DANIEL, P.F., BUGGE, B., JAMES, L.F. & JEANLOZ, R.W. (1983) FEBS Lett. 163, 99-109 (622)
- WATKINS, W.M. (1972) in "Glycoproteins" (GOTTSCHALK, A. ed), 2nd ed, Vol. 5 Part B, pp. 830-891, Elsevier, Amsterdam (343)
- WEISMANN, U.N. & HERSCHKOWITZ, N.N. (1974) Pediat. Res. 8, 865-870 (397)

- WEISMANN, U.N., VASSELLA, D. & HERSCHKOWITZ, N.N. (1971) New Engl. J. Med. 285, 1090-1091 (389)
- WEISS, J.B., LOTE, C.J. & BOBINSKI, H. (1971) Nature 234, 25-26 (324)
- WENGER, D.A., TARBY, T.J. & WHARTON, C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 589-595 (424)
- WIEGANDT, H. (1980) in "Structure and function of gangliosides" (SVENNERHOLM, L., MANDEL, P., DREYFUS, H. and URBAN, P.E. eds) pp. 3-10, Plenum Press, N.Y. (165)
- WILKINSON, P.C. (1970) Clin. Exp. Immunol. 25, 355-366 (17)
- WILLINGHAM, M.C., KEEN, J.H. & PASTAN, I.H. (1981) Exp. Cell Res. 132, 329-338 (24)
- WILLINGHAM, M.C. & PASTAN, I. (1980) Cell 21, 67-77 (22)
- WIT-VERBEEK, H.A., HOOGEVEEN, A. & GALJAARD, H. (1978) Exp. Cell. Res. 113, 215-218 (490)
- WOLFE, L.S., CALLAHAN, J., FAWCETT, J.S., ANDERMANN, F. & SCRIVER, C.R. (1970) Neurology 20, 23-44 (479)
- WOLFE, L.S. & NG YING KIN, N.M.K. (1976) in "Current Trends in sphingolipidoses and allied disorders" (VOLK, B.W. and SCHNECK, K.L. eds) pp. 15-29, Plenum Press, New York (482)
- WOLFE, L.S., SENIOR, R.G. & NG YING KIN, N.M.K. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1828-1838 (480)
- YAMAMOTO, K., IKEHARA, Y., KAWAMOTO, S. & KATO, K. (1980) J. Biochem. (Tokyo) 87, 237-248 (14)
- YAMASHITA, K., OHKURA, T., OKADA, S., YABUUCHI, H. & KOBATA, A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4789-4798 (504)
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., MIHARA, K., OKADA, S., YABUUCHI, H. & KOBATA, A. (1980b) J. Biol. Chem. 255, 5126-5133 (549,553)
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., NAKAYAMA, T., KITAMURA, M., ENDO, Y. & KOBATA, A. (1980a) J. Biol. Chem. 255, 5635-5642 (234,506)
- YUNIS, J.J., LEWANDOWSKI, R.C., SANFILIPPO, S.J., TSAI, M.Y., FONI, I. & BRUHL, H.H. (1976) Amer. J. Med. 61, 841-848 (521)
- ZIEGLER, M. & BACH, G. (1981) Biochem. J. 198, 505-508 (56)
- ZOPF, A., LEVINSON, R.E. & LUNDBLAD, A. (1982) J. Immunol. Methods 48, 109-119 (358)



RESUME

Ces dernières années ont vu la caractérisation d'un nouveau groupe de maladies : les glycoprotéinoses. Pour chacune de ces affections le mécanisme pathogénique est essentiellement le même : une exoglycosidase lysosomale intervenant dans le catabolisme des chaînes glycaniques des glycoprotéines fait défaut par suite d'une anomalie héréditaire ; le blocage métabolique en résultant se traduit par une accumulation intralysosomale et une excrétion urinaire massive d'oligosaccharides ou de glycopeptides trouvant leur origine dans les chaînes glycaniques des glycoprotéines de l'ensemble de l'organisme. L'élucidation de la nature du matériel urinaire directement en rapport avec l'enzyme déficient constitue pour ces maladies un élément diagnostique majeur. L'analyse détaillée des oligosaccharides ou glycopeptides permet en outre d'apporter des éléments structuraux précieux relatifs à l'architecture des "glycannes".

Notre étude a porté sur les maladies suivantes : sialidose, gangliosidose à GM₁, maladie de morquio type B, mannosidose, aspartylglycosaminurie et maladie de Gaucher. Plus de 50 oligosaccharides ou glycopeptides différents ont été caractérisés et isolés. Leur étude a été établie par des méthodes chimiques (méthylation) et physiques (spectrométrie de masse d'impact électronique et F.A.B., RMN à 500 MHz).

Les travaux effectués sur le groupe des sialidoses se sont complétés d'études enzymatiques menées sur les neuraminidases leucocytaires et fibroblastiques des malades, ainsi que de l'étude et l'isolement des formes enzymatiques du foie normal.

Dans un dernier temps, nos méthodes d'analyse ont été élargies à certains troubles neurologiques du nourrisson d'étiologie inconnue. L'ensemble de ces travaux permet l'énoncé de lois concernant les schémas structuraux des chaînes glycaniques, ainsi qu'une meilleure compréhension des différentes étapes de leur catabolisme.

MOTS CLES : maladies génétiques, glycoprotéines, catabolisme, oligosaccharides, urine, sialidose, RMN 500 MHz