

Etudes préliminaires sur la structure d'une α_1 -glycoprotéine acide (pleuromucoïde)

On sait que les parties polypeptidique et glucidique des glycoprotéines sont unies par des liaisons de covalence, mais on ignore la nature de cette union et la séquence des unités glucidiques. POPENOÉ ET DREW¹ ont établi la position terminale de l'acide sialique; WINZLER² a étudié, par chromatographie qualitative sur papier, la libération des glucides au cours de l'hydrolyse acide de l'orosomucoïde. Enfin SCHMID *et al.*³ ont obtenu par clivage de cette protéine avec HCl gazeux à 0°, une fraction qui conserve la partie polypeptidique dans son état naturel, mais contient moins de la moitié du taux initial des glucides.

Le but de ce travail est d'obtenir, à partir d'une α_1 -glycoprotéine, un ou plusieurs glycopeptides riches en glucides. Ce résultat est atteint par l'action d'enzymes protéolytiques, lesquels, contrairement aux assertions de YAMASHIMA⁴, dégradent la glycoprotéine.

Ces enzymes sont utilisés dans la zone de leur pH d'activité maximum, à 37° et pendant un temps d'incubation de 10–16 h. Les hydrolysats enzymatiques sont ensuite additionnés de 10 vol. d'éthanol refroidi; le précipité formé est recueilli et le surnageant est concentré sous vide pour éliminer l'éthanol. Les déterminations des hexoses, hexosamines, 6-désoxyhexoses et acide sialique sont effectuées sur le précipité et sur le surnageant.

L' α_1 -glycoprotéine utilisée est isolée du liquide pleural; son homogénéité est démontrée⁵ et sa concentration en glucides est de 41%; ses propriétés sont voisines de celles de l'orosomucoïde.

La pepsine à pH 2, pendant 16 h, dégrade la glycoprotéine: le précipité éthanolique de l'hydrolysat correspond en poids à 70% de la protéine originelle. Ce précipité contient la totalité des hexoses et des hexosamines, mais seulement 50% des amino-acides et 50–60% de l'acide sialique du produit initial; on retrouve 40–50% d'acide sialique dans le surnageant, sous forme libre. En fait, la libération de cet acide n'est pas due à l'action hydrolysante de la pepsine mais à l'acidité du milieu. Ainsi, la fraction glycopeptide résultant de l'hydrolyse pepsique contient 22% d'hexoses, 16.5% d'acétylhexosamine, 2% de fucose et 9% d'acide sialique, soit un total de 50% de substances glucidiques.

L'action de la papaine et de la chymotrypsine est plus faible, car on retrouve dans le précipité éthanolique, respectivement 90 et 80% du substrat mis en jeu, avec la totalité des glucides de ce dernier. Le surnageant contient seulement des amino-acides et des peptides. La concentration en glucides du précipité éthanolique est de 45%, dont 18% d'hexoses et 11% d'acide sialique dans le cas de la papaine; elle est de 50% dont 20% d'hexoses et 13.4% d'acide sialique dans le cas de la chymotrypsine.

Enfin la trypsine s'est révélée l'enzyme la plus efficace, car elle libère 60% d'aminoacides tandis que la totalité des glucides de l' α_1 -glycoprotéine se retrouve dans le précipité éthanolique de l'hydrolysat trypsique. Le glycopeptide obtenu contient 24% d'hexoses, 20% d'acétylhexosamine, 3% de fucose et 16% d'acide sialique; la partie polysaccharidique de cette fraction représente 63% de la molécule.

L'électrophorèse sur papier à pH 5 des différents précipités éthanoliques, met en évidence plusieurs bandes révélatrices par la ninhydrine; une seule bande est révé-

lable par l'amidoschwarz et par le réactif de Schiff-acide périodique, sauf dans le cas de l'hydrolyse par la chymotrypsine où l'on observe 3 bandes colorées par ce dernier réactif.

Ces résultats nous ont conduit à conjuguer l'action de plusieurs enzymes pour tenter d'accroître encore le taux en glucides.

Après action de la trypsine sur l'hydrolysat pepsique de l' α_1 -glycoprotéine, le précipité éthanolique représente seulement 50-55 % de la protéine mise en jeu et contient la totalité des hexoses et hexosamines initialement présents dans cette dernière. La concentration en glucides de ces glycopeptides représente 66 % de la molécule avec 30 % d'hexoses, 25 % d'acétylhexosamine, 8.3 % d'acide sialique et 2.6 % de fucose.

Enfin après action successive de la trypsine et de la papaine, puis électrophorèse de zone sur amidon de cet hydrolysat, on obtient un glycopeptide dont la concentration en glucides atteint 87 % avec 33.5 % d'hexoses, 28.8 % d'acétylhexosamine, 22 % d'acide sialique et 3.3 % de fucose. Ce glycopeptide contient la quasi-totalité des substances glucidiques de l' α_1 -glycoprotéine originale.

Le Tableau I résume les modifications subies par l' α_1 -glycoprotéine au cours des différentes hydrolyses protéolytiques. Il met l'accent sur le rôle capital de la trypsine dans la formation des glycopeptides.

TABLEAU I

POURCENTAGE EN GLUCIDES, DANS LE PRÉCIPITÉ ÉTHANOLIQUE OBTENU
À PARTIR DES DIFFÉRENTS HYDROLYSATS ENZYMATIQUES

Enzyme	Hexosamines	Acetylhexosamines	6-Desoxyhexoses	Acide sialique	Total en glucides
	%	%	%	%	%
Néant	15.8	13.25	2	10.4	41.5
Pepsine	21.7	16.5	2.1	9.05	50
Papaine	18.2	—	—	10.95	45
Chymotrypsine	20.2	—	—	13.4	50
Trypsine	24.1	20	3	16	63
Pepsine + trypsine	30	25	2.6	8.3	66
Trypsine + papaine + électrophorèse sur amidon	33.5	28.8	3.3	22	87.5

Cette note préliminaire montre que les enzymes protéolytiques dégradent la glycoprotéine α_1 et qu'ils peuvent être utilisés dans l'étude de la structure de cette protéine. L'investigation sur la chimie des glycopeptides ainsi obtenus est en cours.

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine,
Paris (France)*

ROLAND BOURRILLON
JEAN MICHON

¹ E. A. POPENOE ET R. M. DREW, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 673.

² R. J. WINZLER, in *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry of mucopolysaccharides*, 1958, p. 245.

³ K. SCHMID, W. L. BENCZE, T. NUSSBAUMER ET J. O. WEHRMULLER, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 529.

⁴ I. YAMASHIMA, *Acta Chim. Scand.*, 10 (1956) 1066.

⁵ R. BOURRILLON, J. MICHON ET R. GOT, sous presse.

Reçu le 26 août, 1960