

ÉTUDES SUR LA STRUCTURE D'UNE α_1 -GLYCOPROTÉINE (PLEUROMUCOÏDE)

I. PRÉPARATION ET OBTENTION DES GLYCOPEPTIDES

R. BOURRILLON, R. GOT ET D. MEYER

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

(Reçu le 10 juillet, 1962)

SUMMARY

Studies on the structure of an α_1 -glycoprotein (pleuromucoid)

I. Preparation and purification of the glycopeptides

After extensive digestion of pleuromucoid with several proteolytic enzymes, a glycopeptidic fraction is isolated from the digest, which conserves carbohydrates of native protein. This fraction contains 31 % hexoses, 3 % fucose, 31.5 % hexosamines, 21.6 % sialic acid and 12 % amino acids.

Only a limited number of amino acids is present in the glycopeptides, with aspartic acid, glutamic acid and threonine occurring most frequently. Sedimentation studies reveal that the glycopeptides have an average mol. wt. of 3000–3500. These results indicate the presence of 5–6 heteropolysaccharide units in pleuromucoid.

Glycopeptides are purified by procedures involving zone electrophoresis and column chromatography; the fractions prepared are isolated in reasonably homogeneous form, but still possess heterogeneity with respect to the amino acid moiety.

INTRODUCTION

L' α_1 -glycoprotéine acide est une des protéines sériques les mieux caractérisées, mais nos connaissances sont très fragmentaires sur le nombre, la taille et la composition des unités polysaccharidiques de cette molécule, ainsi que sur la nature de la liaison glucido-protéique et la séquence des constituants glucidiques. Des travaux préliminaires^{1–3} ont montré la position externe de l'acide sialique et sa liaison avec le galactose dans cette glycoprotéine.

En fait, le premier temps dans l'étude de la structure des glycoprotéines consiste à obtenir une fraction glycopeptidique qui, ne conservant qu'un petit nombre d'amino acides, possède la quasi totalité des glucides de la protéine native. Nous avons précédemment montré⁴, en désaccord avec YAMASHIMA⁵, que l' α_1 -glycoprotéine est facilement hydrolysée par les enzymes protéolytiques, ce qui a été confirmé par WEINFELD ET TUNIS⁶.

Le présent travail décrit la préparation et les caractéristiques d'une fraction

glycopeptidique obtenue par hydrolyse enzymatique d'une α_1 -glycoprotéine isolée du liquide pleural et appelée pleuromucoïde^{7,8}.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation de l' α_1 -glycoprotéine

Cette préparation a été décrite précédemment^{7,8}. La totalité des substances glucidiques représente 40-42 % du poids sec.

Hydrolyse enzymatique

Les enzymes suivants sont utilisés, seuls ou en association : La pepsine cristallisée (Worthington Biochemical Corporation). L'hydrolyse est effectuée à pH 2.8 pendant 7 h. La trypsine et la chymotrypsine cristallisées (Worthington) sont utilisées séparément, à pH 7.7 ; la durée de chaque hydrolyse est de 15 h. La papaïne cristallisée (Worthington). L'hydrolyse est réalisée à pH 6.8 pendant 15 h en présence de cystéine (0.01 M).

Toutes ces opérations sont effectuées à 37° et sous toluène pour éviter une contamination bactérienne. Le rapport enzyme/substrat est de 1/50.

Ultracentrifugation

Les mesures de la constante de sédimentation sont réalisées à la Station Centrale du CNRS, dans l'ultracentrifugeuse Spinco, à 59 000 rev./min à 20°, dans un tampon phosphate NaCl de force ionique 0.1 (pH 7.2) et en frontière synthétique. Six concentrations de glycoprotéine ont été utilisées : 0.2-1 %.

Électrophorèse

L'électrophorèse sur papier est effectuée à pH 3.5 et 6.4 dans un tampon acétate de pyridine, pendant 6 h sous 10 V/cm. Les bandes sont révélées par l'amido-schwartz et par le réactif de Schiff après oxydation périodique.

L'électrophorèse de zone sur chlorure de polyvinyle (Geon 421, Goodrich Co.), en tampon acétate de pyridine, force ionique 0.05 (pH 3.5) utilise la technique préconisée par BOURRILLON ET GOT⁹.

Chromatographie sur DEAE-cellulose

La technique employée est celle de SOBER *et al.*¹⁰, avec un gradient d'élution obtenu en introduisant un tampon phosphate de pH 7.1, 0.005 M, dans la chambre de mélange et un volume égal du même tampon 0.1 M dans le réservoir. Des fractions de 5 ml sont recueillies sur lesquelles on détermine l'acide sialique par la diphénylamine et les peptides par la ninhydrine. Les fractions correspondant à un même pic d'élution sont réunies, dialysées et lyophilisées.

Analyse des substances glucidiques

Les substances glucidiques sont déterminées par des méthodes précédemment décrites⁷.

Une cinétique de la libération enzymatique d'acide sialique est effectuée en présence d'un extrait de *Vibrio Cholerae*. L'acide sialique libre est déterminé selon WARREN¹¹.

L'acide sialique est aussi libéré par hydrolyse acide dans l'acide sulfurique 0.1 N à 80° pendant 1 h.

Analyse des amino acides

Les glycopeptides sont hydrolysés sous vide dans HCl 5.7 N à 100° pendant 24 h avec une concentration en protéine de 1 %. Après hydrolyse, HCl est éliminé sous vide en présence de potasse et d'anhydride phosphorique.

Les solvants suivants sont utilisés pour la séparation des amino acides en chromatographie sur papier: butanol-acide acétique-eau (4:1:5), durée 40 h; phénol saturé d'eau-ammoniaque, durée 30 h; butanol-pyridine-HCl 0.1 N (5:3:2), durée 72 h.

La détermination quantitative est effectuée après révélation des chromatogrammes par une solution de ninhydrine à 5 % dans le butanol saturé d'eau en présence d'acide acétique; la coloration est développée dans une étuve à 60° pendant 15 min et son intensité est déterminée par densitométrie (appareil Photovolt Corporation). Des amino acides témoins sont chromatographiés et révélés dans les mêmes conditions.

Détermination des groupements NH_2 -terminaux

La réaction est effectuée à 37° pendant 5 h et à pH 9. Les glycopeptides dinitrophénylés sont hydrolysés à reflux ou en tube scellé, pendant 16 h dans HCl 5.7 N, ou pendant 4 h dans HCl 12 N. Les DNP-amino acides sont séparés par chromatographie sur colonne d'hyflosupercel équilibré avec un tampon phosphate 0.4 M, pH 7.25^{12,13}. L'élution est effectuée par le chloroforme, puis par des mélanges de chloroforme et de méthyléthylcétone en proportions variables. Chaque bande est recueillie séparément et au besoin rechromatographiée dans les mêmes conditions. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par l'acétone et le dosage est effectué sur une partie aliquote par spectrophotométrie (absorption à 338 m μ). Le reste est soumis à la chromatographie sur papier pour identifier l'amino acide considéré et apprécier sa pureté. Les solvants suivants sont utilisés: phénol-alcool amylique-eau (1:1:1)¹⁴; toluène-pyridine-monochlorhydrine du glycol-ammoniaque (5:3.5:5:3)¹⁴; benzène-acide acétique-eau (1:1:1)¹⁵ pour séparer les diacides; décaline-acide acétique (1:1)¹⁴; cyclohexane-isopropanol-benzoate de sodium 0.1 M (60:36:4)¹⁶ pour séparer glycocolle et thréonine.

Dans les mêmes conditions, on peut doser les amino acides totaux après une nouvelle dinitrophénylation effectuée sur l'hydrolysat du glycopeptide dinitrophénylé.

Action de la carboxypeptidase

La carboxypeptidase (Worthington) est lavée à l'eau distillée, puis traitée par le diisopropylfluorophosphate. 1 μ mol du glycopeptide est incubée avec 0.5 mg d'enzyme dans 3 ml de tampon véronal 0.03 M à pH 8, en présence de chlorure de magnésium. La durée d'incubation est de 24 h à 37°. Après ce temps, le pH est porté à 9 et les amino acides libérés sont identifiés sous forme de dérivés DNP.

RÉSULTATS

Digestion protéolytique

La pepsine à pH 2 élimine 25 % des amino acides et 35 % de l'acide sialique de la glycoprotéine native; l'hydrolysat ainsi obtenu contient 20 % d'hexoses et 50 % de

substances glucidiques totales. Il est montré que la libération de l'acide sialique est due à l'acidité du milieu. En étudiant l'action du pH sur le clivage de l'acide sialique à 37°, on constate qu'à partir de pH 2.7 l'acide sialique n'est pas détaché de la protéine.

La papaïne et la chymotrypsine libèrent peu d'amino acides et la fraction glycopeptidique obtenue après action de l'un ou l'autre de ces enzymes contient tous les glucides de la protéine native, dans une proportion de 45-50 % du poids sec.

L'action de la trypsine est beaucoup plus intense, car le pourcentage en glucides du glycopeptide résultant atteint 60 %; 50 % des amino acides de l' α_1 -glycoprotéine sont ainsi libérés.

L'action successive de plusieurs enzymes est encore plus efficace, notamment les combinaisons trypsine-papaïne et pepsine-trypsine-papaïne, car le pourcentage en glucides du glycopeptide obtenu dépasse 80 %.

Le Tableau I résume les résultats de l'action de ces divers enzymes sur le pleuromucoïde.

TABLEAU I

COMPOSITION EN GLUCIDES DES HYDROLYSATS DU PLEUROMUCOÏDE
PAR LES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

Les compositions sont exprimées en pour cent du poids sec.

Enzymes	Hexoses	6-Désoxyhexoses	Acetylhexosamines	Acide sialique
Pepsine (pH 2)	21.7	2.1	16.5	9.05
Trypsine	24.1	3	20	16
Papaïne	18.2	—	—	11
Chymotrypsine	20.2	—	—	13.4
Pepsine (pH 2) + trypsine	30	2.6	25	8.3
Pepsine (pH 3) + trypsine + papaïne	31	3	31.5	22.6

L'élimination des amino acides et des peptides est obtenue par dialyse et par passage sur colonne d'Amberlite IR-120, 30-50 mesh (forme H⁺): la totalité des glucides reste dans la fraction non dialysable et se retrouve intégralement dans l'effluent. Dans quelques cas une purification supplémentaire est réalisée par chromatographie sur Sephadex G-25.

Dans tous les cas, la quasi totalité des substances glucidiques de la protéine native se retrouve dans le glycopeptide final, avec maintien de leurs rapports initiaux.

Le rôle de la dénaturation préalable de la protéine sur l'hydrolyse enzymatique a été étudié: l'acide performique est sans effet tandis que la dénaturation par la chaleur accroît quelque peu la protéolyse.

Préparation de la fraction glycopeptidique

Les précédents résultats ont conduit à l'établissement de la technique de préparation suivante d'une fraction glycopeptidique.

1 g d' α_1 -glycoprotéine est dissous dans 70 ml d'une solution de NaCl à 0.9%; le pH est porté à 6.8 et la solution est soumise à l'ébullition pendant 30 min.

Après acidification du milieu par HCl jusqu'à pH 3, on ajoute 20 mg de pepsine et

la solution est incubée pendant 7-8 h à 37°. Le pH final est de 3.4; il est amené à 7.3 par de la soude et l'on ajoute 20 mg de trypsine. Après 14 h d'incubation, on ajoute au mélange 0.5 ml de suspension de papaine et 50 mg de cystéine, le pH étant ajusté à 6.8. L'incubation est de 15 h.

L'hydrolysat enzymatique est dialysé contre de l'eau distillée pendant deux jours sous agitation. La fraction non dialysable est passée sur une colonne d'Amberlite IR-120 (H⁺) (20 × 2 cm). L'effluent avec les eaux de lavage sont recueillis et lyophilisés. Une nouvelle protéolyse est effectuée dans les mêmes conditions, suivie d'une dialyse et d'un passage sur résine cationique.

Caractérisation de la fraction glycopeptidique

L'ultracentrifugation révèle la présence d'un pic unique et symétrique dont la constante de sédimentation à dilution infinie $s_{20}^0 = 0.82$ S, ce qui permet d'envisager un poids moléculaire de l'ordre de 3500-4000. La vitesse de sédimentation varie peu avec la concentration.

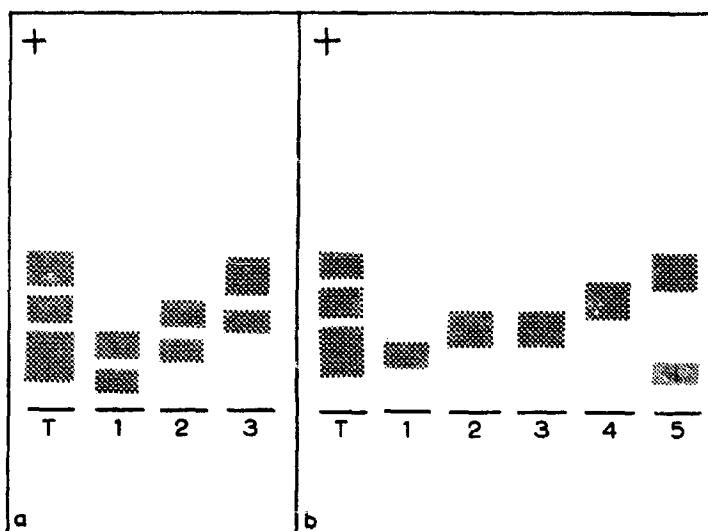


Fig. 1. Electrophorèse sur papier à pH 3.5 (acétate de pyridine), 10 V/cm, 6 h, de la préparation glycopeptidique (T) et des fractions obtenues par électrophorèse de zone (a) et chromatographie sur DEAE-cellulose (b).

L'électrophorèse sur papier à pH 3.5 et 6.4 (Fig. 1) fait apparaître le caractère hétérogène de cette préparation. Trois bandes révélables par le réactif de Schiff-acide périodique sont assez bien individualisées. Elles migrent toutes vers l'anode; la coloration par l'amido-schwartz est très faible.

La composition en glucides est résumée dans le Tableau II. Les glucides totaux dépassent 85 % et leurs rapports entre eux sont identiques à ceux de la protéine native. Le poids moléculaire des constituants glucidiques du pleuromucoïde étant 17000-18000 et celui des glucides du glycopeptide étant voisin de 3000-3500, on doit admettre la présence de 5-6 chaînes polysaccharidiques dans cette α_1 -glycoprotéine.

L'étude de la libération de l'acide sialique permet de constater un clivage total de cet acide par hydrolyse minérale, tandis que seulement 50-60 % sont libérés en présence de neuraminidase.

La partie polypeptidique de cette préparation représente 12 % du poids sec et la

chromatographie sur papier révèle 7 amino acides. Ce sont: les acides aspartique et glutamique, la thréonine, la valine, la leucine, la lysine et la proline. Le Tableau II rapporte les résultats du dosage de ces amino acides; on peut constater la nette prédominance des diacides et de la thréonine. Il faut souligner que la détermination des amino acides par la méthode des DNP dérivés donne des résultats très inférieurs à ceux de la méthode quantitative par la ninhydrine. Il semble que la dinitrophénylation soit incomplète.

TABLEAU II

COMPOSITION EN AMINO ACIDES ET EN GLUCIDES (EN POUR CENT) DE LA PRÉPARATION GLYCOPEPTIDIQUE ET DES FRACTIONNÉES OBTENUES PAR ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE ET PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

Glyco-peptide	Électrophorèse de zone			Chromatographie sur DEAE-cellulose					
	1	2	3	1	2	3	4	5	
Asp	3.5	3.8	3.3	3.8	2.1	3.1	3.1	3.9	3.9
Glu	2.7	2.85	2.2	2.2	1.7	2.1	2.2	3.75	3.1
Thr	2.4	2.85	2.2	2.2	1.7	2.1	2.2	2.1	3.1
Lys	1.3	1.5	1.5	1	1	0.75	0.5	2.1	2.5
Val	0.9	1.5	1.3	1.1	1	1.5	1.3	0.4	néant
Leu	1.5	1.75	1.5	1.3	1.85	3.1	2.9	1	0.6
Pro	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexoses	31	30.7	31.8	30.3	32.6	30.2	30.6	30	29.7
6-Désoxyhexoses	3	3.2	3.3	3.5	3	3	3.1	3.1	3.3
Acetylhexosamines	31.5	28.2	32.3	30.4	23.9	29.5	31.9	31.7	31
Acide sialique	22.6	17.5	19.1	22.5	21.8	21.4	22.1	22.3	23.8

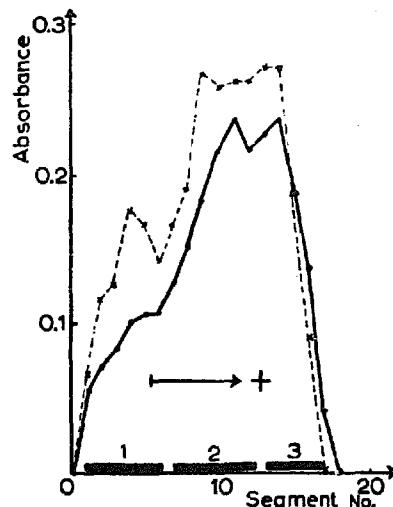


Fig. 2. Diagramme d'électrophorèse de zone sur Geon de la fraction glycopeptidique. Tampon acétate de pyridine pH 3.5; force ionique 0.05; 40 h; 6 mA. ——, protéine; —, acide sialique.

Le glycopeptide présente plusieurs amino acides NH₂-terminaux: valine (0.2 mol), thréonine (0.03 mol), acide glutamique (0.07 mol) et acide aspartique (0.07 mol). La valine étant décelée uniquement en position NH₂-terminale, doit être à l'extrémité NH₂ de la chaîne peptidique.

La présence de plusieurs amino acides NH₂-terminaux indique l'existence de molécules semblables, mais qui diffèrent par la composition de la chaîne peptidique.

La carboxypeptidase libère de petites quantités d'amino acides, notamment la leucine. Il existerait donc des groupements COOH terminaux dans cette préparation.

Fractionnement de la préparation glycopeptidique

Électrophorèse de zone: L'électrophorèse sur papier à pH 6.4 et à pH 3.5 (Fig. 1) ayant révélé le caractère hétérogène de la préparation glycopeptidique, 200 mg de ce produit sont soumis à une électrophorèse préparative à pH 3.5 afin de séparer les différentes zones et d'étudier leur composition. La Fig. 2 permet d'individualiser trois fractions. Le rendement en poids et en glucides de l'opération est de 85 %. Les poids respectifs des trois composants sont: I, 40 mg; II, 85 mg; III, 45 mg.

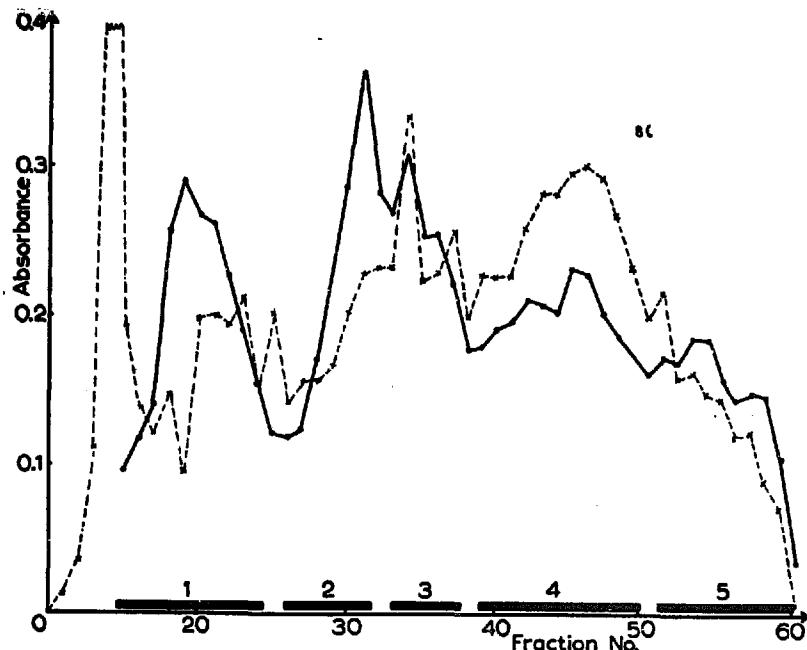


Fig. 3. Chromatographie sur DEAE-cellulose de la préparation glycopeptidique. Elution par gradient à pH 7, de 0.005 M à 0.05 M. ——, protéine; —, acide sialique.

Chromatographie sur DEAE-cellulose: La Fig. 3 représente le diagramme de la chromatographie sur DEAE-cellulose de la préparation glycopeptidique à l'aide d'un gradient d'élution compris entre 0.005 et 0.05 M. On constate qu'une quantité importante de substances réagissant à la ninhydrine n'est pas adsorbée sur la colonne, tandis que la fraction 1 contient relativement peu d'amino acides. Cinq fractions sont ainsi individualisées, dialysées et lyophilisées. L'élution totale sur la base de l'acide sialique et de la réaction à la ninhydrine est obtenue pour la molarité 0.05 M. Le rendement de l'opération est de 70-80 %.

Caractérisation des glycopeptides

Cette étude porte sur les glycopeptides obtenus par électrophorèse préparative et par chromatographie sur DEAE-cellulose:

Ultracentrifugation: Les constantes de sédimentation de ces glycopeptides ne montrent aucune différence significative. Dans tous les cas on observe un pic unique et symétrique. Il est donc vraisemblable que les chaînes polysaccharidiques du pleuro-mucoïde ont le même poids moléculaire.

Électrophorèse sur papier: La Fig. 1 montre les caractères de migration électro-

phorétique à pH 3.5 des fractions glycopeptidiques. Elles migrent toutes vers l'anode avec une vitesse d'autant plus grande qu'elles migrent plus rapidement en électrophorèse préparative, ou qu'elles sont éluées plus tardivement de la colonne de DEAE-cellulose, la fraction 1 étant la plus lente et la fraction 5 la plus rapide.

Composition en glucides: L'analyse des substances glucidiques de chaque glycopeptide est rapportée dans le Tableau II. Leur composition est très semblable, sauf en ce qui concerne l'acide sialique des glycopeptides obtenus par électrophorèse préparative. Au cours de cette opération, une partie de l'acide sialique a été libérée.

Après hydrolyse acide et chromatographie quantitative sur papier, la présence de fucose, d'une seule osamine, la glucosamine, d'un rapport galactose/mannose égal à 1 est démontrée pour chaque fraction. Il semble donc que les chaînes polysaccharidiques composant la glycoprotéine native aient une composition assez semblable ou même identique, avec, peut-être, de petites différences concernant l'acide sialique.

L'étude de la libération d'acide sialique effectuée sur les trois fractions glycopeptidiques provenant de l'électrophorèse préparative, montre que cet acide est libéré en totalité par hydrolyse acide, mais seulement à 50-60 % par hydrolyse enzymatique.

Composition en amino acides: La composition en amino acides des différents glycopeptides est rapportée dans le Tableau II. Des différences significatives apparaissent plus nettes avec les fractions de la chromatographie qu'avec celles de l'électrophorèse. Si dans tous les cas, trois amino acides (acide aspartique et glutamique, et thréonine) sont trouvés dans des rapports assez semblables, les autres amino acides présentent des valeurs très variables selon le glycopeptide. Ainsi, les fractions 2 et 3 de la chromatographie contiennent de faibles proportions de lysine et des taux relativement élevés de leucine, tandis que c'est l'inverse pour les fractions 4 et 5 qui sont, en outre, pratiquement dépourvues de valine. La proline n'a pas été déterminée quantitativement.

Ces résultats sont en accord avec le fait que la chaîne peptidique au voisinage de la partie polysaccharidique n'a pas la même longueur dans toutes les molécules, phénomène traduit par la présence de plusieurs groupements NH₂-terminaux. Il est en outre possible que la composition en amino acides ne soit pas la même pour chaque polysaccharide.

DISCUSSION

L' α_1 -glycoprotéine acide comme l'ovalbumine¹⁷, la γ -globuline¹⁸ et la fetuine¹⁹ est sensible à l'action des enzymes protéolytiques. La trypsine est l'enzyme le plus efficace, la papaïne, la pepsine et la chymotrypsine causant une dégradation moins profonde. En outre, la combinaison de plusieurs enzymes, purs cristallisés, nous paraît préférable à l'usage d'un seul enzyme ou d'une préparation enzymatique brute.

Après élimination des amino acides et des peptides libérés au cours de la protéolyse, on obtient une fraction glycopeptidique ayant conservé la totalité des glucides de la protéine native.

La comparaison des poids moléculaires des parties polysaccharidiques de l' α_1 -glycoprotéine (18000) et du glycopeptide (3000-3500) suggère la présence de 5 ou 6 chaînes polysaccharidiques dans la glycoprotéine native. La séparation de ces différentes chaînes a été tentée par électrophorèse préparative et par chromatographie sur DEAE-cellulose. Les différents glycopeptides obtenus présentent la même

constante de sémentation et la même composition en glucides avec 30 % d'hexoses (Gal/Man:1), 3 % de fucose, 30 % d'acétyl-glucosamine et 21 % d'acide *N*-acétyl-neuraminique. Les taux plus faibles d'acide sialique, observés après électrophorèse, sont dus à une libération partielle de cette substance au cours de la migration. Le fucose pose un problème particulier car il est possible que certaines chaînes en soient dépourvues; en effet le pleuromucoïde contient 4-5 résidus fucose et s'il existe 6 chaînes dans cette protéine, au moins l'une d'entre elles sera dépourvue de fucose.

Dans tous les glycopeptides, l'acide sialique est facilement libéré par l'acide sulfurique 0.1 N pendant 1 h à 80° et il est totalement détruit par l'oxydation périodique; les autres substances glucidiques ne sont pas modifiées. Par action de la neuraminidase, seulement 50-60 % de l'acide sialique sont libérés. Comme on peut admettre la présence de 3 résidus acide sialique par chaîne, et par là même une structure ramifiée pour celle-ci, il est possible qu'un résidu acide sialique soit plus difficilement atteint par la neuraminidase.

Les glycopeptides diffèrent par leur composition en amino acides: ils contiennent tous de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et de la thréonine et l'on peut penser que ces amino acides sont au voisinage de la partie polysaccharidique. Trois autres amino acides: valine, leucine, lysine sont à un plus faible taux et sont parfois absents. La proline n'a pas été déterminée quantitativement.

L'acide aspartique est l' amino acide prépondérant dans tous les glycopeptides, ce qui suggère pour lui une position centrale, directement en liaison avec la chaîne polysaccharidique.

Ce résultat diffère de celui de WINZLER ET INOUYE²⁰ qui proposent une liaison de type peptidique entre le γ -COOH de l'acide glutamique et le groupement NH₂ de la glucosamine. Il est toutefois possible d'envisager, selon les chaînes, deux sortes de liaison l'une avec l'acide aspartique, l'autre avec l'acide glutamique.

Quatre amino acides sont NH₂-terminaux: valine, thréonine, acide glutamique et acide aspartique. La valine se trouvant seulement sous forme d' amino acide NH₂-terminal et pouvant manquer dans certains glycopeptides, doit occuper l'extrémité de cette chaîne. Nous suggérons ainsi la séquence suivante:

Val-(Thr, Glu)-Asp-Glucides

L'action de la carboxypeptidase n'est pas suffisamment nette pour qu'il soit possible de formuler une hypothèse sur la séquence des amino acides du côté COOH-terminal.

Des deux techniques de fractionnement utilisées, électrophorèse de zone et chromatographie sur DEAE-cellulose, seule cette dernière permet d'obtenir des fractions de composition différente en amino acides.

Des études en cours sur l'analyse des glucides et des amino acides d'une fraction glycopéptidique de l'oromucoïde préparée dans les mêmes conditions que le pleuromucoïde, font apparaître une composition semblable, sauf un taux de fucose constamment plus élevé dans le glycopeptide pleural.

RÉSUMÉ

Par action successive de plusieurs enzymes protéolytiques, sur le pleuromucoïde, une fraction glycopéptidique est obtenue qui conserve la quasi totalité des substances

glucidiques de la protéine native. Cette fraction contient 31 % d'hexoses, 3 % de fucose, 31.5 % d'acétylhexosamines, 26.6 % d'acide sialique et 12 % d'amino acides. La partie peptidique est constituée principalement d'acide aspartique, acide glutamique et thréonine, et en quantités plus faibles, de valine, leucine, lysine et proline. La constante de sédimentation est de 0.82 S, soit un poids moléculaire de 3000-3500. Ces résultats indiquent que cette α_1 -glycoprotéine possède 5-6 chaînes polysaccharidiques.

La préparation glycopeptidique est fractionnée par électrophorèse de zone et par chromatographie sur DEAE-cellulose, en glycopeptides de même constante de sédimentation, de composition en glucides voisine, mais différents par le taux et la nature des amino acides.

REMERCIEMENTS

Les auteurs désirent exprimer leurs remerciements au Docteur GALLU, Chef du service du Cholera de l'Institut Pasteur, pour le don de filtrat de *Vibrio Cholerae*.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. A. POPENOET R. M. DREW, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 673.
- ² R. J. WINZLER in G. E. WOLSTENHOLME ET M. O'CONNOR, *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Boston, 1958, p. 245.
- ³ R. W. JEANLOZ ET E. H. EYLAR, Short communication of the *International Symposium Makromol.*, Section V AB, Verlag Chemie, GmbH, Wiesbaden, 1958.
- ⁴ R. BOURRILLON ET J. MICHON, *Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 608.
- ⁵ I. YAMASHIMA, *Acta Med. Scand.*, 10 (1956) 1666.
- ⁶ H. WEINFELD ET M. TUNIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 590.
- ⁷ J. MICHON ET R. BOURRILLON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43 (1961) 34.
- ⁸ R. BOURRILLON, J. MICHON ET R. GOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 243.
- ⁹ R. BOURRILLON ET R. GOT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 643.
- ¹⁰ H. A. SOBER, F. J. GUTTER, N. M. WYCKOFF ET F. A. PETERSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 796.
- ¹¹ L. WARREN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1971.
- ¹² G. L. MILLS, *Biochem. J.*, 50 (1952) 707.
- ¹³ D. M. MEYER, *Thèse Doctorat ès Sciences*, Foulon, Paris, 1957.
- ¹⁴ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 50.
- ¹⁵ S. M. PARTRIDGE ET H. F. DAVIS, cités par G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE ET P. SAUTIERE, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 225.
- ¹⁶ R. MONIER ET L. PENASSE, *Compt. Rend.*, 230 (1950) 1176.
- ¹⁷ A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1435.
- ¹⁸ J. W. ROSEVEAR ET E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 425.
- ¹⁹ R. G. SPIRO, *Federation Proc.*, 20 (1961) 383.
- ²⁰ R. J. WINZLER ET T. INOUYE, *Abstr. 139th Meeting Am. Chem. Soc.*, St. Louis, Mars 1961, p. 4c.

Biochim. Biophys. Acta, 74 (1963) 255-264