

INTERACTIONS DES PHYTOAGGLUTININES AVEC LES  
GLYCOPEPTIDES URINAIRES  
DESCRIPTION D'UN GLYCOPEPTIDE INHIBITEUR DE LA  
PHYTOAGGLUTININE DE *Robinia pseudo acacia*\*†

M LEMONNIER‡, Y GOUSSAULT ET R BOURRILLON§

Laboratoire de Biochimie Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis, Paris VI<sup>e</sup> (France)

(Reçu le 28 décembre 1971, accepte le 15 février 1972)

ABSTRACT

A sialoglycopeptide was isolated from the urinary constituents, soluble in 50% ethanol, of pregnant woman urine. It was purified by diethylaminoethylcellulose and diethylaminoethyl-Sephadex A-25 chromatography and by Sephadex gel-filtration. It was homogeneous on paper electrophoresis at pH 2.4, 6.4, and 8.5, and it was detected by ninhydrin and by the Schiff reagent after periodate oxidation. It consists of 35% hexoses (ratio Gal/Man 2/1), 28.1% *N*-acetylglucosamine, and 23.2% *N*-acetylneuraminic acid; aspartic acid and threonine are the main amino acids, then serine, glutamic acid, and glycine. The amino-terminal residue was aspartic acid. On the basis of one aspartic acid residue per molecule, the molecular weight of the glycopeptide was estimated to be 4,500. This sialoglycopeptide had potent *R. pseudo acacia* phytoagglutinin-inhibitory activity on erythrocytes, normal hepatocytes, and Zajdela tumor cells. The desialized glycopeptide showed the same activity. It appears that this phytoagglutinin could bind 3 to 4 glycopeptide molecules.

SOMMAIRE

Un sialoglycopeptide a été isolé à partir des constituants solubles dans l'éthanol à 50% de l'urine de femme enceinte. Il a été purifié par chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose et diéthylaminoéthyl-Séphadex A-25, et par gel filtration sur Séphadex. Il est homogène en électrophorèse sur papier aux pH 2,4, 6,4 et 8,5, et il est révélé à la fois par la ninhydrine et le reactif de Schiff après oxydation periodique. Il est constitué de 35% d'hexoses (rapport Gal/Man 2/1), de 28,1% de *N*-acétylglucosamine et de 23,2% d'acide *N*-acétylneuraminique, l'acide aspartique et la threonine sont les amino-acides les plus importants, puis la sérine, l'acide glutamique

\*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65<sup>ème</sup> anniversaire

†Ce travail a été effectué dans le cadre de l'action thématique N° 2 de l'INSERM et grâce à une subvention du C N R S et de la Ligue Française contre le Cancer

‡Attachée de Recherches à l'INSERM

§À qui doivent être adressées les demandes de tirés-à-part. Centre de Recherches sur les Protéines, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis, 45 rue des Saints-Pères, Paris VI<sup>e</sup> (France)

et la glycine. Sur la base d'un résidu d'acide aspartique, un poids moléculaire du glycopeptide de 4 500 a été calculé. Le résidu amino-terminal est l'acide aspartique. Ce sialoglycopeptide inhibe l'érythroagglutination et la stimulation de croissance des hépatocytes et lève l'inhibition de croissance des cellules d'ascite cancéreuse, induites par la phytoagglutinine de *R. pseudo acacia*. Il apparaît que cette phytoagglutinine peut fixer 3 à 4 molécules de glycopeptide. La désialisation ne modifie pas les activités du glycopeptide.

## INTRODUCTION

Certaines agglutinines végétales (PHA) ont la propriété de se fixer à la surface des érythrocytes, des lymphocytes et d'autres cellules normales et transformées en provoquant l'agglutination, la stimulation ou l'inhibition de croissance de ces cellules. Ces manifestations cellulaires résulteraient d'une interaction entre les PHA et des sites récepteurs cellulaires de nature glucidique. En effet, ces activités biologiques des PHA sont souvent inhibées par des monosaccharides<sup>1-5</sup> ou des disaccharides<sup>5, 6</sup> indiquant que ceux-ci constituent une partie des sites récepteurs des PHA sur la surface cellulaire.

Peu d'études ont été réalisées avec des structures glucidiques plus complexes. Hakomori *et al*<sup>7</sup>, Kornfeld et Kornfeld<sup>8</sup>, Walborg *et al*<sup>9</sup> ont isolé et caractérisé à partir des érythrocytes ou des cellules tumorales des glycopeptides qui auraient la propriété des sites récepteurs cellulaires des PHA. D'autres glycopeptides provenant des glycoprotéines plasmatiques<sup>8</sup> et la fraction glycopeptidique de l'urine<sup>10</sup> se comportent comme des inhibiteurs hapténiques vis-à-vis des PHA. Or cette fraction glycopeptidique urinaire contient de nombreux glycopeptides, classés en fucoglycopeptides et sialoglycopeptides<sup>11, 12</sup> dont l'origine est encore imprécise, mais qui paraît être tissulaire, surtout membranaire.

La PHA de *Robinia pseudo acacia*, à la fois érythroagglutinante et mitogénique<sup>13</sup>, n'est pas inhibée par les monosaccharides<sup>14</sup>, mais interagit avec la fraction glycopeptidique de l'urine de femme enceinte et particulièrement avec un sialoglycopeptide dont l'isolement et les caractéristiques sont décrits dans ce travail.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

**Déterminations analytiques** — Hexoses et fucose ont été déterminés par des méthodes décrites par ailleurs<sup>15</sup>. Les hexosamines sont dosées à la fois par la méthode d'Elson et Morgan<sup>16</sup> et par chromatographie sur résines échangeuses de cations, après hydrolyse du glycopeptide pendant 8 h dans l'acide chlorhydrique 6M. L'acide sialique est dosé à la fois par la méthode directe à la diphenylamine<sup>17</sup> et par la méthode de Warren à l'acide thiobarbiturique<sup>18</sup> après libération de l'acide sialique par l'acide chlorhydrique 0,01M, 1 h à 80°.

La détermination quantitative des constituants glucidiques est effectuée sur le glycopeptide hydrolysé par l'acide chlorhydrique M pendant 1,5 h à 100°, selon

(a) Chromatographie sur résines échangeuses d'anions en tampon borate, selon la méthode de Lee *et al.*<sup>20</sup>, avec le ribose comme témoin interne, au moyen d'un auto-analyseur Technicon (b) Chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Sawardeker et Slonecker<sup>21</sup> après transformation des oses libérés en dérivés per(triméthylsilyl)és, avec un appareil Girdell 75 E<sub>1</sub> muni d'un détecteur à ionisation de flamme, sur colonne Carbowax 20M. Le témoin interne est le ribitol. La température de l'injecteur est 245°, celle du détecteur 219°. La programmation linéaire de la température de la colonne s'étend de 120° à 210°, 1,5° par min.

La détermination quantitative des amino-acides est effectuée par chromatographie sur résine échangeuse de cations selon la méthode de Piez et Morris<sup>19</sup> avec un autoanalyseur Beckman (Unichrom) et sur le glycopeptide hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6M pendant 8 h à 105° en tube évacué.

**Électrophorèse** — Les électrophorèses qualitatives sont effectuées avec un appareil Leres (Paris) selon la méthode de Machebœuf *et al.*<sup>22</sup> avec le papier Schleicher et Schull 2043b lavé aux acides et les tampons acide formique pH 2,4, acétate de pyridinium à 5% en pyridine à pH 6,4 et collidine-pyridine-acide acétique-eau (60/39/0,5/900,5, v/v), pH 8,5. La durée de migration est de 120 min sous 400 V. Les révélations sont effectuées par la ninhydrine pour la partie peptidique et par le réactif de Schiff après oxydation périodique pour la partie polysaccharidique.

**Produits** — Le chlorure de 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfonyl est de (« DNS Cl ») est de B D H.; les plaques de micro-polyamide pour la chromatographie en couche mince des DNS-amino-acides proviennent de Schleicher et Schull. La neuraminidase de *Clostridium perfringens* (lot 53B 8080) et les dérivés *N*-acétylé et *N*-glycolylé de l'acide neuraminique sont de Sigma (St Louis, Mo). La PHA des graines de *Robinia pseudo acacia* est préparée au laboratoire dans un état homogène selon une technique déjà décrite<sup>13</sup>.

**Préparation du glycopeptide** — Un extrait aqueux d'urine de femme enceinte (3<sup>ème</sup> trimestre), provenant de 30 l dialysés et lyophilisés, a été additionné d'un vol d'éthanol à -5°. Le précipité est séparé par centrifugation et le surnageant, concentré sous vide, est filtré sur Séphadex G-25 (Pharmacia, Stockholm), puis chromatographié sur une colonne (15,5 × 3,5 cm) de diéthylaminoéthyl (DEAE)-cellulose (Serva, Heidelberg), équilibrée dans un tampon acétate de collidinium et de pyridinium, pH 8,5, 5mM<sup>23</sup>. L'élution est effectuée par des tampons d'acétate de pyridinium de pH décroissants et de molarités croissantes. La fraction élue à pH 5,3 et à la molarité 0,1 est chromatographiée sur une colonne (20 × 2 cm) de DEAE-Séphadex A-25 (Pharmacia, Stockholm), équilibrée dans le tampon acétate de pyridinium, pH 5,3, 0,1M. L'élution est faite de façon discontinue par ce même tampon avec des molarités croissantes, 0,1, 0,2, 0,5M (Fig. 1). La fraction élue à la molarité 0,5M est chromatographiée à nouveau sur une colonne (7,5 × 3 cm) de DEAE-Séphadex A-25 mais avec un gradient linéaire du tampon acétate de pyridinium, pH 5,3, entre les molarités 0,2 et 0,7.

La fraction élue entre les molarités 0,3 et 0,43 semble homogène en électrophorèse à 3 pH différents, mais apparaît étalée. Par filtration sur une colonne

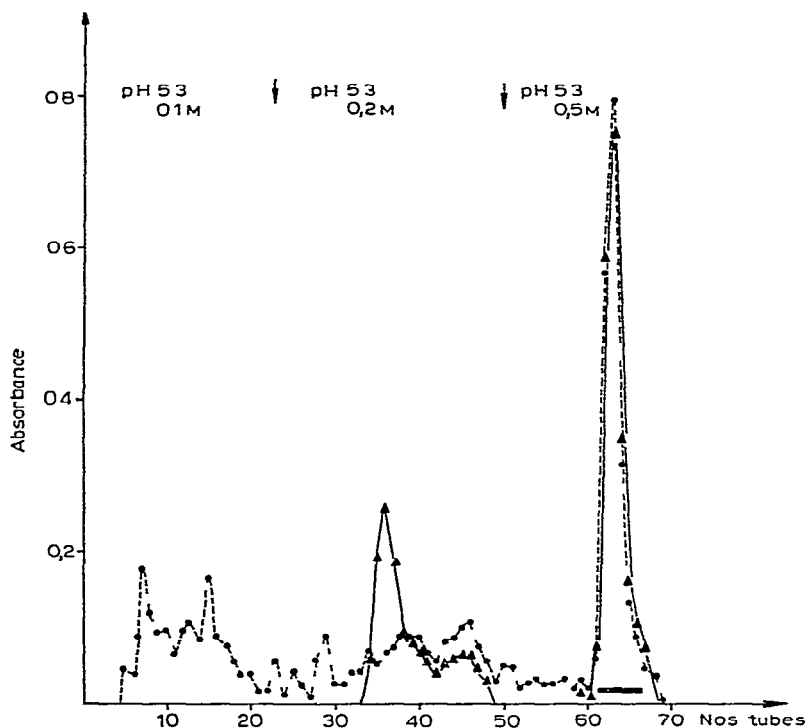


Fig 1 Chromatographie sur DEAE-Séphadex A-25 de la fraction IV du fractionnement sur DEAE-cellulose. Éluion discontinue par des tampons acétate de pyridinium, pH 5,3, 0,1M, 0,2M et 0,5M  
 ▲—▲ acide sialique (Dische) et ●—● hexoses

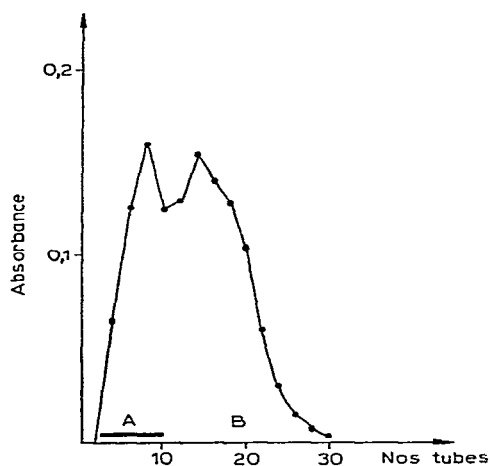


Fig 2 Gel filtration sur Séphadex G-25 (33×3 cm) dans l'eau. Dosage des hexoses sur chaque fraction

(33 × 3 cm) de Séphadex G-25 dans l'eau, cette fraction est résolue en deux pics le pic A de nature glycopeptidique et le pic B de nature oligosaccharidique (Fig 2) La fraction A paraît homogène en électrophorèse sur papier Cependant, une dernière purification est effectuée sur une colonne (33 × 3 cm) de Séphadex G-25 dans l'eau, qui donne un pic unique et symétrique

*Traitement alcalin* — Afin d'élucider le type de liaison entre les parties peptidique et glucidique, le sialoglycopeptide est soumis au traitement alcalin<sup>24</sup> Une solution à 0,2 mg/ml de glycopeptide est incubée pendant 24 h à 20–22° dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,5M en présence de borohydrure de sodium 0,3M Après ce temps, le produit est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6M à 100° et les amino-acides libérés sont dosés

*Détermination des groupements N-terminaux.* — La technique des dansyl-amino-acides est utilisée selon Hartley<sup>25</sup>, avec 10 nmoles de glycopeptide

*Libération et identification de l'acide sialique* — La labilité de la liaison entre l'acide sialique et le reste du glycopeptide est appréciée selon deux méthodes cinétiques (a) Par hydrolyse acide avec l'acide chlorhydrique 0,01M à 80° en fonction du temps de 0 à 120 min (b) Par hydrolyse enzymatique avec la neuraminidase en tampon acétate de sodium 0,1M, pH 5,1, à 37° et à une concentration d'enzyme de 100 unités/mg d'acide sialique lié, le temps d'hydrolyse s'étend sur 24 h Dans les deux cas des prélèvements de 0,2 ml sont effectués, sur lesquels l'acide sialique libéré est déterminé selon la méthode à l'acide thiobarbiturique<sup>18</sup>

L'acide sialique libéré est identifié après sa libération, en passant un hydrolysât acide du glycopeptide sur une colonne de Dowex 1 (X-8) équilibré dans l'acide formique 0,3M, l'acide sialique est élué par l'acide formique M L'identification est effectuée par chromatographie sur papier en même temps que des dérivés (*N*-acétyl et *N*-glycolyl) témoins d'acide sialique La révélation est obtenue par l'acide thiobarbiturique<sup>26</sup> et par l'orcinol-acide trichloracétique<sup>27</sup>

Trois solvants sont utilisés pour la chromatographie descendante sur papier à 23°. (A) Alcool butylique-pyridine-acide chlorhydrique 0,1M (5 3 2, v/v) sur papier Schleicher et Schull<sup>28</sup> pendant 4 jours, (B) alcool butylique-alcool propylique-acide chlorhydrique 0,1M (1 2 1, v/v) sur papier Whatman no 1 pendant 16 h<sup>29</sup>, (C) acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3 1 3, v/v) sur papier Whatman no 3 pendant 16 h<sup>30</sup>

*Techniques biologiques* — Les techniques de croissance cellulaire et d'inhibition de la croissance ou de l'agglutination ont été décrites ailleurs<sup>31</sup> Au cours de ces études, glycopeptides et PHA sont incubés pendant 2 h à 37° en solution chlorure de sodium 0,15M

## RÉSULTATS

La présence d'un pic unique et symétrique en gel filtration et la révélation d'une seule bande en électrophorèse à deux pH (2,4 et 6,4) à la fois par la ninhydrine et par le reactif de Schiff après oxydation périodique affirme l'homogénéité de la substance et sa nature glycopeptidique

La composition en amino-acides et en glucides du glycopeptide est rapportée dans le Tableau I. Il est constitué de 35 % d'hexoses sous forme de galactose et de mannose, de 28 % de *N*-acétylglucosamine et de 23 % d'acide sialique; le fucose est absent de cette structure. Les amino-acides (14 %) sont représentés surtout par l'acide aspartique et la thréonine, puis par la sérine, l'acide glutamique, la glycine et l'alanine.

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES ET EN GLUCIDES DU SIALOGLYCOPEPTIDE URINAIRE

Constituants	% <sup>a</sup>	Proportions molaires <sup>b</sup>
Ac aspartique	2,5	1
Thréonine	2,1	0,94
Sérine	1,25	0,63
Ac glutamique	1,4	0,49
Proline	1,25	0,57
Glycine	0,65	0,46
Alanine	0,65	0,40
Valine	0,7	0,33
Isoleucine	0,4	0,18
Leucine	0,8	0,36
Tyrosine	1,15	0,35
Phénylalanine	0,4	0,12
Lysine	0,65	0,23
<i>N</i> -Acétyl-D-glucosamine	27,9	5,8
Galactose	23,7	6,7
Mannose	10,9	3,14
Fucose	0	0
Acide sialique	23,2	4,03

<sup>a</sup>Par rapport au poids sec <sup>b</sup>Par rapport à une mole d'acide aspartique

La chaîne oligosaccharidique est probablement liée à la chaîne peptidique par une liaison 2-acétamido-*N*-(aspart-4-oyl)-2-deoxy-D-glucopyranosylamine car elle n'est pas libérée par le traitement alcalin et aucune modification des valeurs de sérine et de thréonine n'est observée. Sur la base de 1 résidu d'acide aspartique par molécule de glycopeptide, le poids moléculaire serait de 4 500, en accord avec son comportement sur colonne de Séphadex G-25 (exclusion) et G-50 (retard).

La cinétique de la libération de l'acide sialique est rapportée dans la Fig. 3. Il est observé que l'hydrolyse acide est rapide et complète, tandis que la neuraminidase libère très lentement 20 % en 1 h et 70 % en 24 h des résidus acide sialique. Cette différence cinétique n'est pas due à la présence dans le glycopeptide de deux types d'acide sialique. En effet, dans les trois solvants utilisés et avec deux réactifs de révélation, seul le dérivé *N*-acétylneuraminique a pu être identifié.

Le principal amino-acide *N*-terminal obtenu sous forme de DNS-amino-acide est l'acide aspartique, de petites quantités de glycine, d'acide glutamique et d'alanine sont observées.

Ce sialoglycopeptide inhibe les diverses activités de la PHA de *Robinia pseudo*

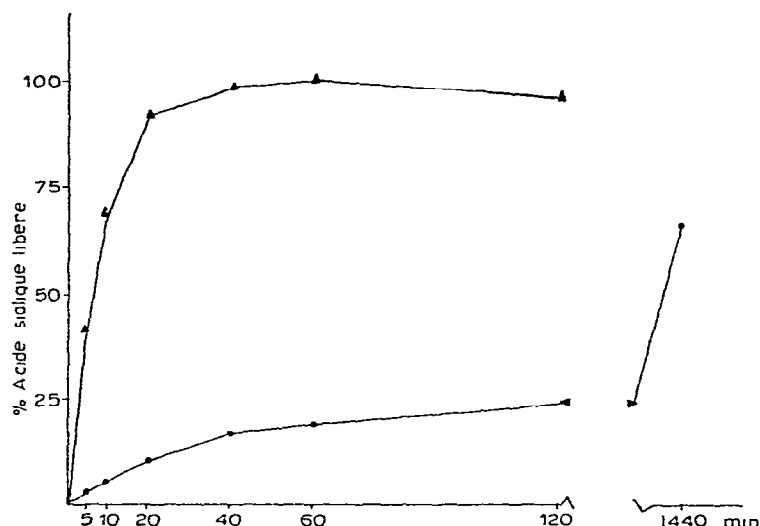


Fig 3 Courbes de libération de l'acide sialique du glycopeptide ▲—▲ hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,01M final à 80°, ●—● hydrolyse par la neuraminidase, dans le tampon acétate de sodium, pH 5,1, 0,1M à 37°. Dosage par l'acide thiobarbiturique

*acacia* À la dose de 0,2 mg dans une solution de PHA à 0,3 mg/ml, il inhibe l'érythro-agglutination et l'activité mitogénique de la PHA sur la croissance des cellules de foie normal de rat; il lève l'inhibition de croissance des cellules d'ascite de l'hépatome de Zajdela induite par la PHA

Sur la base d'un poids moléculaire de 90 000 pour la PHA et 4 500 pour le glycopeptide, il apparaît que 3–4 molécules de glycopeptide sont liées à une molécule de PHA. La désialisation du glycopeptide ne modifie aucune de ses propriétés d'haptène vis-à-vis des activités de la PHA. L'acide sialique n'est donc pas un déterminant des sites récepteurs cellulaires de cette PHA à la surface des cellules normales et transformées étudiées

## DISCUSSION

Les PHA sont utilisées pour élucider les caractéristiques structurales des membranes de surface des cellules normales et transformées. La liaison des PHA sur les sites récepteurs cellulaires représente l'étape initiale des activités de ces agglutinines<sup>32</sup>. Les surfaces cellulaires des mammifères contiennent des complexes glucidiques qui constituent les déterminants antigéniques des agglutinines animales (groupes sanguins) et végétales.

Les activités biologiques des PHA sont généralement inhibées par des mono- ou disaccharides<sup>1–6</sup> mais les sites récepteurs cellulaires apparaissent de structure plus complexe que celle d'un simple déterminant antigénique monosaccharidique. Des glycopeptides de diverses provenances se sont montrés particulièrement actifs, ils

sont obtenus par protéolyse des membranes d'érythrocytes<sup>8</sup>, des membranes des cellules tumorales<sup>7-9</sup> ou des glycoprotéines plasmatiques, IgG et fétuine<sup>8</sup>. Les glycopeptides urinaires paraissent constituer une nouvelle source d'inhibiteurs hapténiques des PHA. Le sialoglycopeptide décrit dans ce travail provient de l'urine de femme enceinte qui est très riche en glycopeptides<sup>3,3</sup>. Sa composition (mannose, galactose, *N*-acétylglucosamine, acide *N*-acétylneuraminique) et le type probable de liaison glucide-peptide (liaison *N*-glycosylamine) l'apparentent au glycopeptide décrit par Kornfeld et Kornfeld<sup>8</sup>. Les monosaccharides libres, en proportions identiques à celles présentes dans le glycopeptide, sont inactifs, tandis que la désialisation du glycopeptide est sans effet sur les activités de la PHA.

Ces glycopeptides ont les propriétés d'un site récepteur cellulaire, la spécificité de liaison résidant dans la partie oligosaccharidique avec parfois un déterminant majeur. Steck et Wallach<sup>3,4</sup> font l'importante observation que différents types cellulaires ont des sites récepteurs communs, ce qui est confirmé par le fait que des glycopeptides de structure semblable peuvent inhiber les activités de diverses PHA sur des surfaces cellulaires différentes. Ainsi, un glycopeptide de membrane d'érythrocytes inhibe l'érythroagglutination de deux PHA, *Phaseolus vulgaris* et *Lens culinaris*<sup>8</sup>, tandis que le sialoglycopeptide urinaire agit comme inhibiteur hapténique sur la PHA de *Robinia pseudo acacia* dans ses activités sur différentes cellules normales et transformées. Cependant, il peut exister une certaine spécificité glycopeptidique puisque certains glycopeptides inhibent l'agglutination des cellules tumorales de Novikoff par la PHA concanavaleine A, et d'autres glycopeptides inhibent la PHA du germe de blé<sup>9</sup>.

Ces résultats traduisent la complexité des sites récepteurs glucidiques présents à la surface cellulaire. Il est certain que les études avec les glycopeptides comme inhibiteurs de la PHA doivent être développées avec un plus grand nombre de PHA et de cellules normales et transformées. La structure des glycopeptides devra être précisée afin de révéler le rôle de chaque constituant glucidique, la séquence et le type de liaison de ces constituants, l'importance de la structure ramifiée et celle de la partie peptidique.

## RÉFÉRENCES

- 1 W T J MORGAN ET W M WATKINS, *Brit J Exp Pathol*, 34 (1953) 94
- 2 M M BURGER ET A R GOLBERG, *Proc. Nat Acad Sci, U. S.*, 57 (1967) 539
- 3 M INBAR ET L SACHS, *Proc Nat Acad Sci, U S*, 63 (1969) 1418
- 4 H LIS, B SELA, L SACHS ET N SHARON, *Biochim Biophys Acta*, 211 (1970) 582
- 5 M E ETZLER ET E A KABAT, *Biochemistry*, 9 (1970) 869
- 6 T OSAWA, *Biochim Biophys Acta*, 115 (1966) 507
- 7 S HAKOMORI, J KOSCIELAK, K J BLOCH ET R W JEANLOZ, *J Immunol*, 98 (1967) 31
- 8 R KORNFELD ET S KORNFELD, *J Biol Chem*, 245 (1970) 2536
- 9 E F WALBORG, R S LANTZ ET V P WRAY, *Cancer Res*, 29 (1969) 2034
- 10 M LEMONNIER, Y GOUSSAULT ET R BOURRILLON, résultats non publiés
- 11 R BOURRILLON ET P CORNILLON, *Protides Biol Fluids, Proc Colloq*, 12 (1964) 300
- 12 R BOURRILLON dans A. GOTTSCHALK (Ed.), *Glycoproteins*, 2<sup>e</sup> édition, Elsevier, Amsterdam, 1972, p 909
- 13 R. BOURRILLON ET J FONT, *Biochim Biophys Acta*, 154 (1968) 28



- 14 J FONT, A M LESENEY ET R. BOURRILLON, résultats non publiés
- 15 R BOURRILLON, R GOT ET D. MEYER, *Biochim. Biophys Acta*, 74 (1963) 225.
- 16 L A ELSON ET W T. J MORGAN, *Biochem J*, 27 (1933) 1824
- 17 I WERNER ET L ODIN, *Acta Soc Med Upsal*, 57 (1952) 230
- 18 L WARREN, *J Biol. Chem*, 234 (1959) 1971
- 19 K PIEZ ET L MORRIS, *Anal Biochem*, 1 (1960) 187.
- 20 Y C LEE, J F MCKELVY ET D LANG, *Anal Biochem*, 27 (1969) 567.
- 21 J S SAWARDEKER ET J H SLONECKER, *Anal Chem*, 37 (1965) 945
- 22 M MACHEBOEUF, P REBEYROTTE, J M DUBERT ET M BRUNERIE, *Bull Soc Chim Biol*, 43 (1961) 34
- 23 R BOURRILLON, P CORNILLOT ET R GOT, *Clin Chim Acta*, 97 (1962) 18.
- 24 K TANAKA, M BERTOLINI ET W. PIGMAN, *Biochem Biophys Res Commun*, 16 (1964) 404
- 25 B S HARTLEY, *Biochem J*, 119 (1970) 805
- 26 L WARREN, *Nature*, 186 (1960) 237
- 27 R. KLEVSTRAND ET A. NORDAL, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 1320.
- 28 R BOURRILLON ET J MICHON, *Bull. Soc Chim Biol*, 41 (1959) 267
- 29 E SVENNERHOLM ET L SVENNERHOLM, *Nature*, 181 (1958) 1154
- 30 A NORDAL ET D OISETH, *Acta Chem Scand*, 5 (1951) 1289
- 31 M AUBERY, J FONT ET R BOURRILLON, *Exp Cell Res*, sous presse
- 32 P C NOWELL, *Cancer Res*, 20 (1960) 462
- 33 G MARCOTTE-BOY ET F LE BRUN, *Ann Biol Clin*, 20 (1962) 997
- 34 T L STECK ET D F H WALLACH, *Biochem Biophys Acta*, 97 (1965) 510