

Mise en évidence d'une nouvelle forme combinée de l'acide glutamique dans le latex d'*Euphorbia characias* L.¹

L'un de nous a étudié la composition en acides aminés libres de plusieurs espèces d'Euphorbes^{2,3} et le latex d'*Euphorbia characias* L.⁴. Reprenant le travail, par l'application de techniques plus précises et plus séparatives, dans le cadre de recherches sur les formes combinées de l'acide glutamique⁵⁻⁷, nous avons isolé un nouveau composé, présent dans la partie de l'extrait hydroalcoolique retenue sur résines échangeuses de cations, où nous avons identifié en outre, par ordre d'importance: acide glutamique, acide aspartique, sérine, α -alanine, leucine, et isoleucine, glycocholate, phénylalanine, arginine, histidine, lysine, proline, tyrosine, thréonine et valine.

Ce composé nouveau a été mis en évidence et caractérisé de la façon suivante: (1) En chromatographie sur papier (Figure 1) les deux substances C et D migrent au voisinage de la valine comme l'indique la Figure 1. (2) En électrophorèse sur papier (Figure 2) (Technique BISERTE et al.⁸) les deux inconnus C et D migrent: C entre l'acide glutamique et les neutres, D entre les neutres et l'acide γ -aminobutyrique. (3) En électrochromatographie (Figure 3) (Technique de BISERTE et al.⁹), C et D viennent se situer de part et d'autre de la «ligne» des acides aminés neutres. (4) Les taches se colorent l'une et l'autre avec la ninhydrine.

La réaction de RYDON¹⁰ n'est positive qu'avec C. D'autre part, si on soumet le mélange à l'hydrolyse totale acide (ClH 5,6 N; 110°C; 24 h) et qu'ensuite l'on procède à une électrochromatographie on observe que C disparaît et que D et la tache correspondant à l'acide glutamique sont renforcés.

Pour isoler ces deux taches nous avons employé le procédé d'électrophorèse sur poudre de cellulose¹¹ qui convient parfaitement étant donné la vitesse de migration des substances considérées en électrophorèse.

Hydrolysées séparément, ces deux taches se sont comportées différemment: C a donné en proportions sensiblement égales de l'acide glutamique et une substance qui migre en électrophorèse et en chromatographie au même endroit que D. D n'a subi aucune modification.

D'autre part le dérivé dinitrophénylé de C obtenu suivant les techniques de SANGER et al.¹² et HAUSMAN et al.¹³ et hydrolysé puis chromatographié dans le système de solvants «toluène» et «phosphate»¹⁴, donne un seul dérivé identifié à l'acide DNP-glutamique.

Nous sommes donc conduits à admettre un enchaînement peptidique où l'acide glutamique représenterait le premier terme: GLU – (Inconnu).

En effet, il ne nous a pas été possible d'identifier le deuxième terme, soit l'inconnu D. On peut supposer, étant donné son comportement chromatographique et électrophorétique qu'il s'agit d'un acide ω -aminé; mais la superposition sur des chromatogrammes d'acides ω -aminés connus n'a fourni aucune indication. Seule une analyse élémentaire à laquelle nous travaillons permettra l'identification.

Néanmoins deux points méritent d'être soulignés d'ores et déjà: a) Nous avons mis en évidence une nouvelle forme combinée de l'acide glutamique. Plusieurs substances analogues ont été décelées ces dernières années^{7,15} par l'emploi des techniques chromatographiques et électrophorétiques – et il est à noter, que les techniques mises au point par l'école lilloise se révèlent à cet égard très efficaces. L'existence fréquente de tels composés chez les végétaux permet de penser qu'il s'agit de substances importantes du point de vue biologique et dont le rôle méta-

bolique reste à définir. b) Le latex des Euphorbiacées peut être caractérisé par la présence de molécules rarement signalées chez les végétaux comme le montre d'une part le travail de LISS¹⁶ et d'autre part les résultats que

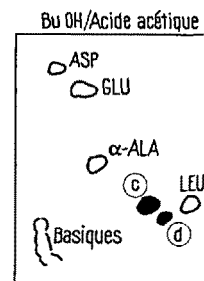


Fig. 1. Electrophorèse bidimensionnelle butanol/acide acétique et phénol/NH₄OH 3%: la position de c et d est indiquée par les taches noires.

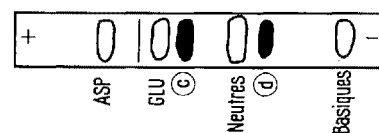


Fig. 2. Electrophorèse pH 3,9 – 250 V – 14 h: les taches inconnues sont indiquées par les lettres c et d.

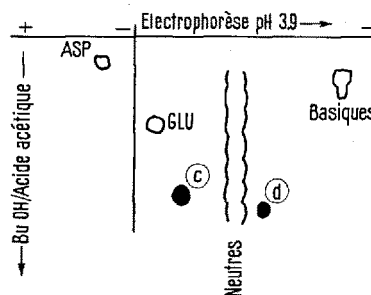


Fig. 3. Reproduction d'un électrochromatogramme montrant la position respective de c et d par rapport aux acides aminés neutres.

¹ Nous exprimons nos remerciements à Mrs. les Professeurs BOULANGER et G. BISERTE pour les conseils reçus au cours de ce travail.

² CH. MONTANT, C. R. Acad. Sci. 245, 1454 (1957).

³ CH. MONTANT, Thèse Sciences Naturelles Toulouse (1959).

⁴ CH. MONTANT, C. R. Soc. Biol. 150, 440 (1956).

⁵ G. BISERTE, *Traité de Biochimie Générale* (Masson, Paris 1959).

⁶ J. M. TOUZE-SOULET et CH. MONTANT, C. R. Acad. Sci. 252, 353 (1961).

⁷ J. M. TOUZE-SOULET et CH. MONTANT, Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 451 (1962).

⁸ G. BISERTE, P. BOULANGER et P. PAYSANT, Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 2067 (1958).

⁹ G. BISERTE, TH. PLAQUET-SCHOONAERT, P. BOULANGER et P. PAYSANT, J. Chromat. 3, 25 (1960).

¹⁰ H. N. RYDON et P. W. G. SMITH, Nature 169, 922 (1952).

¹¹ CH. MONTANT et J. M. TOUZE-SOULET, Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 161 (1960).

¹² I. SANGER et E. O. P. THOMPSON, Biochem. J. 53, 353 (1953).

¹³ W. HAUSMANN, J. R. WEISIGER et L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. 77, 723 (1955).

¹⁴ G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DELOVE et J. SAUTIERES, J. Chromat. 2, 225 (1959).

¹⁵ A. VIRTANEN et E. J. MATTIKALA, Suom. Kem. B 34, 53 (1961).

¹⁶ I. LISS, Flora Dtsch. 151, 351 (1961).

nous venons d'exposer. Ceci laisserait supposer que les cellules à partir desquelles prend naissance le latex sont hautement différenciées et douées d'un 'métabolisme propre.

Summary. The hydro-alcoholic extract of *Euphorbia characias* Latex contains one unknown amino acid and

one new combined form of glutamic acid, isolated by preparative electrophoresis on cellulose powder.

CH. MONTANT et J. M. TOUZE-SOULET

Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences, Toulouse (Haute-Garonne, France), le 16 juillet 1963.

Specificity of *Glycine soja* Agglutinins

The seeds of *Glycine soja* (syn: *Glycine max*, *Soja hispida*, *Dolichos soja*, *Soja angustifolia*) contain an agglutinin specific for rabbit erythrocytes¹, a cold agglutinin for human erythrocytes², and an agglutinin for papainized human erythrocytes³. During studies of the specificity of 'non-specific' seed agglutinins for human erythrocytes, I found that *Glycine soja* (var. Bansei) seed extracts strongly agglutinate neuraminidase (virus receptor destroying enzyme)-treated human red blood cells at room temperature and at 37°C. The seeds may therefore be said to contain the anti-T agglutinin of FRIEDENREICH⁴. Complete absorption of the extract with rabbit erythrocytes significantly reduced activity at 4°C for untreated, and at room temperature for papainized or neuraminidase-treated, human group O erythrocytes. Complete absorption with any one of the following materials abolished all activity for the others, and for rabbit erythrocytes: untreated (4°C), papainized, and RDE-treated human group O erythrocytes.

Inhibition tests with 2% aqueous solutions of various simple sugars showed that the cold agglutinins for human erythrocytes, the agglutinins for papainized and for RDE-treated human red cells, and for rabbit red cells, were all completely neutralized by *d*-galactose, lactose, melibiose and raffinose, and inhibited to the same extent by *l*-arabinose, *D*-arabinose *l*-galactose, *d*-glucose, *d*-fructose, sucrose, maltose, salicin, *l*-sorbitose, *l*-fucose, *d*-digitoxose, *l*-rhamnose, galactosamine, and N-acetylglucosamine did not inhibit. N-acetylgalactosamine (0.2%) inhibited only the agglutination of rabbit erythrocytes. *Glycine soja* seeds seem to contain an agglutinin which reacts with a superficial rabbit erythrocyte receptor, and with a similar, but somewhat deeper and less well-adapted structure, on the human erythrocyte membrane. Combination of the *Glycine soja* agglutinin with the human erythrocyte receptor requires the potentiating action of a low temperature or the removal of steric hindrance by enzyme action. Comment on the structure of the receptor must await further studies, such as those of UHLENBRUCK⁵, on the action of proteolytic enzymes and of neuraminidase on the human erythrocyte surface.

Studies of chicken erythrocytes led BOREL⁶ to state that *Glycine soja* extracts contain anti-T. This does not seem to be strictly correct, because true anti-T agglutinates RDE-treated erythrocytes and not those exposed to proteolytic enzymes. *Glycine soja* extracts seem to contain an agglutinin similar to, but not identical with, anti-T. Its T-activity is only part of a broader specificity. It might be appropriate to mention here that the seeds of some strains of *Glycine soja* (var. Bansei) also contain 'suppressed' anti-A and anti-B agglutinins for human erythrocytes^{7,8}.

Zusammenfassung. Agglutinine aus Samen von *Glycine soja* (var. Bansei) reagieren mit dem T-Antigen von FRIEDENREICH und besitzen eine chemische Struktur, die durch die Einwirkung von Papain aufgeklärt werden konnte.

G. W. G. BIRD

Armed Forces Medical College, Poona (India), May 15, 1963.

Absorption/inhibition characteristics of *Glycine soja* agglutinins

	Agglutination of erythrocytes			
	Rabbit	Human		
		Untreated (4°C)	Papainized	RDE treated
Unabsorbed	+++	++	+++	+++
Absorbed with erythrocytes				
Rabbit	-	w	+	+
Untreated human (4°C)	}	-	-	-
Papainized human				
RDE-treated human				
Inhibition by				
d-Galactose	}	-	-	-
Lactose				
Melibiose				
Raffinose				
l-Arabinose	w	w	w	w
l-Galactose	}	+++	++	+++
d-Glucose				
d-Fructose				
Sucrose				
Maltose				
Salicin				
l-Fucose				
d-Digitoxose				
l-Rhamnose				
N-Acetylglucosamine				
N-Acetylgalactosamine (0.2%)	+	++	+++	+++

¹ M. KRUPPE, Biol. Zbl. 72, 424 (1953).
² G. W. G. BIRD, Curr. Sci. 22, 273 (1953).
³ O. MÄKELÄ, Ann. Med. exp. Biol. fenn. 35, Suppl. 11 (1957).
⁴ V. FRIEDENREICH, *The Thomsen Haemagglutination Phenomenon* (Levin and Munksgaard, Copenhagen 1930), p. 128.
⁵ G. UHLENBRUCK, Hippokrates 14, 537 (1961).
⁶ J.-F. BOREL, Vox sang. 7, 632 (1962).
⁷ G. W. G. BIRD, Brit. J. Haemat. 1, 375 (1955).
⁸ *Acknowledgments.* I am grateful to the Behringwerke AG, Marburg-Lahn, who, through the kind mediation of Mr. G. WINTERNITZ of Hoechst Pharmaceuticals Ltd., provided the RDE. I am also indebted to Mr. K. K. G. PILLAI for technical assistance and to the Director General, Armed Forces Medical Services, India, for permission to publish.