

HYDROLYSE DU TRÉHALOSE PAR LA TRÉHALASE DU REIN DE PORC : CONFIGURATION ANOMÉRIQUE α DU D-GLUCOSE LIBÉRÉ*

JACQUELINE LABAT, FRANÇOIS BAUMANN ET JEAN-ÉMILE COURTOIS

Équipe de Recherches Osides et Osidases du C.N.R.S., Laboratoire de Chimie Biologique, 4, Avenue de l'Observatoire, 75-Paris (6ème) (France)

(Reçu le 28 avril 1972; accepté après modification le 26 septembre 1972)

ABSTRACT

The anomeric configuration of D-glucose released by the action of pig-kidney trehalase on trehalose was studied by polarimetry, gas-liquid chromatography, D-glucose oxidase, and proton magnetic resonance spectroscopy. The results indicate that this trehalase is an α -glycosidase acting with retention of the α -anomeric configuration.

RÉSUMÉ

La configuration anomérique du D-glucose libéré lors de l'hydrolyse du tréhalose par une tréhalase a été étudiée par polarimétrie, chromatographie en phase gazeuse, action de la D-glucose-oxydase et résonance magnétique protonique. L'ensemble des résultats a permis de considérer la tréhalase de rein de porc comme une α -glycosidase agissant avec rétention de la configuration α -anomérique.

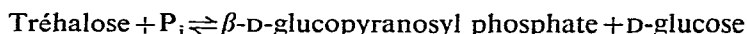
INTRODUCTION

Au cours des dernières années, nous avons étudié les propriétés de diverses tréhalases, α, α' -glucoside 1-glucohydrolase, (EC 3.2.1.28); certaines sont d'origine bactérienne (*Pseudomonas fluorescens*¹), d'autres proviennent d'insectes (hanneton²) ou de mammifères (rein et intestin de porc³⁻⁴, rein, sérum et urine de l'homme⁵⁻⁸). Ces tréhalases se distinguent des autres disaccharidases par le fait qu'elles sont dépourvues d'action transosylante et ne sont pas inhibées par le monosaccharide libéré au cours de l'hydrolyse.

Le tréhalose est le seul disaccharide à liaison (1 \rightarrow 1) dont l'hydrolyse acide ait été suivie par une étude cinétique. Cette hydrolyse est beaucoup plus lente que celle⁹ des isomères α liés en (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) et (1 \rightarrow 6). Pour Edward¹⁰, ce phénomène pourrait être dû à la position de l'atome d'oxygène osidique à l'abri des atomes d'hydrogène axiaux des deux cycles pyraniques, ce qui permettrait d'envisager une inversion de configuration de la molécule avant l'hydrolyse.

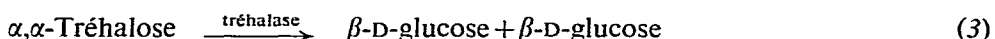
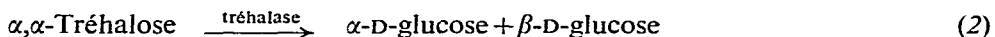
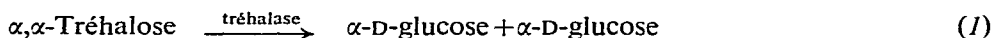
*Dédié au Professeur V. Deulofeu à l'occasion de son 70ème anniversaire.

Par ailleurs, Belocopitow et Maréchal¹¹ ont récemment étudié une tréhalose phosphorylase d'*Euglena gracilis* qui catalyse la réaction suivante avec inversion de configuration d'un des résidus de D-glucose :



Ces raisons nous ont incités à étudier la configuration anomérique du D-glucose libéré par la tréhalase purifiée du rein de porc.

Trois modalités de libération du glucose peuvent être envisagées :



Nous avons conduit cette étude (a) par polarimétrie, procédé le plus anciennement connu; (b) par chromatographie en phase gazeuse¹²⁻¹⁴, méthode plus sensible, qui présente l'avantage d'identifier les anomères dans un mélange complexe d'oses; (c) par voie enzymatique¹⁵⁻¹⁶, en utilisant une enzyme spécifique d'une forme anomérique : la D-glucose-oxydase; (d) par résonance magnétique protonique¹⁷⁻¹⁸, dont les résultats paraissent être, dans l'état actuel de nos connaissances, les plus concluants. Les quatre techniques concordent pour indiquer que la tréhalase a scindé le tréhalose en deux molécules d' α -D-glucose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Enzyme et substrat. — Afin de pouvoir étudier la configuration anomérique de l'ose libéré par une enzyme au cours de l'hydrolyse d'un substrat spécifique, il est nécessaire de disposer d'une enzyme très active et par ailleurs peu fragile; l'on sera, en effet, amené à lyophiliser une à deux fois (r.m.p.) le milieu réactionnel.

Si l'enzyme doit présenter une haute activité, le substrat, lui, doit être hydrolysé le plus rapidement possible pour prévenir ou minimiser au maximum les phénomènes de mutarotation de l'ose libéré.

Nous disposons de trois préparations de tréhalase : une de hanneton, d'activité spécifique* 0,394, une de *Pseudomonas fluorescens* d'activité spécifique 56 et une de rein de porc dont l'activité spécifique était de 15 (protocole de préparation A) ou 32 (protocole B).

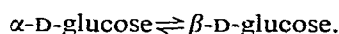
La tréhalase possède une spécificité très étroite; parmi les dérivés du tréhalose que nous avons étudiés, la tréhalase n'a hydrolysé que le mono-6-désoxytréhalose¹⁹⁻²⁰. L'hydrolyse de ce substrat (obtenu par voie chimique²⁰) par les enzymes de *Pseudomonas* et du hanneton est toujours plus lente que celle du tréhalose. Au cours de ce travail, nous avons observé qu'il en était de même pour la tréhalase rénale du porc; à pH 5,7 le K_m est $6,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ pour le tréhalose et $2,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ pour

*Les activités spécifiques sont exprimées en μmoles de tréhalose hydrolysées par min par mg de protéine au pH optimum et à 37°.

le mono-6-désoxytréhalose. Le rapport des vitesses maximales V_{\max} tréhalose: mono-6-désoxytréhalose est de 4,5. Nous avons donc retenu le tréhalose pour nos essais.

L'enzyme de *Pseudomonas* présente la plus faible affinité pour le tréhalose, elle est de plus très labile et elle est pratiquement inactivée après deux lyophilisations. Le choix s'est donc circonscrit entre la tréhalase de hanneton et celle de rein de porc. Si l'affinité de la tréhalase de hanneton pour le substrat est 10 fois supérieure à celle du rein de porc, l'activité spécifique de la préparation est notablement moins élevée. De plus, cette enzyme est moins résistante à la lyophilisation. C'est donc, finalement, l'enzyme de rein de porc qui a été retenue.

Il n'est généralement pas nécessaire d'utiliser au cours d'une telle étude une enzyme très purifiée. Cependant, nous avons cherché à éliminer l'aldose 1-épimérase (EC 5.1.3.3) présente dans le cortex rénal²¹. Cette enzyme catalyse la réaction suivante²² :



La solution tréhalasique obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium dans le protocole décrit antérieurement³ a été passée (a) sur colonne d'hydroxylapatite à pH 6,8 et éluée par un tampon phosphate mM (procédé A), (b) sur colonne de Sépharose 6B (tampon acétate de pH 5,7) suivie d'un contact « en bain » avec C.M. Séphadex (pH 5,7; μ : 0,01) (procédé B).

L'absence de l'aldose 1-épimérase dans ces deux préparations a été vérifiée par étude de la mutarotation d'une solution d' α -D-glucose à 2% (p/v) à pH 5,7 (pH de nos essais) soit par polarimétrie, soit par chromatographie en phase gazeuse, en leur présence ou en leur absence.

Dosage du glucose libéré. — Il a été réalisé par la méthode à l'*o*-toluidine²³.

Chromatographie sur papier. — Nous avons utilisé le papier Whatman n° 1 et le solvant : alcool butylique-pyridine-eau (9:5:4, v/v), avec révélation par le nitrate d'argent en milieu basique²⁴.

Polarimétrie. — Les essais ont été effectués à 25° avec le polarimètre Carl Zeiss Lep 370 282 à 578 nm. Une solution de tréhalose à 7,48% (p/v) dans un tampon acétate M de pH 5,7 a été placée dans un tube polarimétrique de 1 dm et la rotation mesurée. Cette rotation n'évolue pas en fonction du temps; elle diminue de 0,467° après addition d'une goutte de solution d'ammoniaque concentrée (pH résultant 10). La solution enzymatique A présente une rotation de -0,14° qui n'évolue pas non plus en fonction du temps; elle augmente de 0,007° après addition d'ammoniaque.

À 5 ml de la solution de tréhalose, nous avons ajouté 5 ml de solution d'enzyme diluée au demi. Les rotations ont été déterminées à intervalles de 5 min. Après 30 min d'incubation, nous avons ajouté au milieu 1 goutte d'ammoniaque et mesuré la rotation obtenue. Parallèlement aux mesures de pouvoir rotatoire, nous avons dosé le D-glucose libéré sur des parties aliquotes de milieu afin de calculer ultérieurement les pouvoirs rotatoires spécifiques théoriques, et ensuite effectué des chromatographies d'oses sur papier.

Nous avons également suivi la mutarotation propre d'une solution d' α -D-glucose à 2% (p/v) dans la solution tampon de nos essais; la mutarotation dépend en effet du pH et de la force ionique du milieu dans lequel il est dissous²⁵.

Chromatographie en phase gazeuse (c.p.g.). — Nous avons utilisé le chromatographe Girdel 75 à détecteur de flamme d'hydrogène. La colonne employée, longue de 2,40 m, de 3 mm de diamètre, est du type OV-1 3%, Gas Chrom Q, 80–100 mesh. La perte de charge sur la colonne est de 1,5 bar.

L'hydrolyse a été conduite avec l'enzyme B, comme pour les essais qui suivront, à 37°. Les échantillons ont été lyophilisés immédiatement après les temps d'incubation choisis. De la pyridine anhydre (1 ml), de l'hexaméthylchlorosilane (0,2 ml) et du triméthylchlorosilane (0,1 ml) (produits Merck) ont été ajoutés à chaque échantillon avant passage sur la colonne. Les essais ont été conduits à 170° pour le D-glucose¹⁴. Alternativement, un gradient de température a été utilisé pour éliminer le tréhalose non hydrolysé.

Au cours de cette étude, de même que lors de celles qui vont suivre, nous avons étudié le comportement de solutions témoins d' α -D-glucose, β -D-glucose et du mélange des deux anomères à parties égales. La concentration de ces différentes solutions témoins dépend du pourcentage d'hydrolyse du tréhalose dans chaque méthode.

Voie enzymatique — Nous avons opéré avec la D-glucose-oxydase, type 1, β -D-glucose:oxygène oxidoréductase (EC 1.1.3.4) préparée à partir d'*Aspergillus niger* (Böhringer, Mannheim). Les incubations ont été effectuées à la température du laboratoire. La tréhalase (16 unités) a été incubée avec 16 μ moles de tréhalose dans un volume total de 200 μ l. Après 3 min d'incubation, 10 μ l de milieu réactionnel ont été introduits dans 3 ml de solution tampon pH 7,0 contenant la D-glucose-oxydase. À ce pH, la tréhalase est pratiquement inactivée. Ce moment devient le temps zéro du dosage du D-glucose présent dans le milieu. Ce dosage a lieu en présence de peroxydase et de 4:4'-diamino-3:3'-diéthoxybiphényle. Nous avons enregistré les variations des densités optiques à 436 nm au spectrophotomètre Jobin et Yvon, type Maroc, en cuve de 1 cm. Au cours des 3 min d'incubation, le pourcentage d'hydrolyse du tréhalose a été de 25%. Parallèlement, 100 μ l de milieu réactionnel avaient été ajustés à pH 7,0 et chauffés pendant 2 min à 90° selon Semenza *et al.*¹⁶. On obtient ainsi une solution de D-glucose à l'équilibre dont 10 μ l sont mélangés avec le réactif à la D-glucose-oxydase; les absorptions sont mesurées comme il est décrit plus haut.

Résonance magnétique protonique (r.m.p.). — Nous avons utilisé le spectromètre de résonance magnétique nucléaire Varian A 60 pour détecter le signal de la forme anomérique du D-glucose libéré. Les déplacements chimiques sont mesurés à partir de la raie du tétraméthylsilane prise comme zéro de référence. Les réactions ont été conduites à 40°. Les spectres de r.m.p. ont été établis en solution dans l'oxyde de deutérium^{17–18}.

L'enzyme (16 unités) a été lyophilisée, remise en solution dans de l'oxyde de deutérium et lyophilisée à nouveau. 50 mg de tréhalose ont été dissous dans 500 μ l

d'oxyde de deutérium; cette solution a été ajoutée à l'enzyme deutériée lyophilisée. Dans ces conditions, 80 % du tréhalose a été hydrolysé en 15 min.

RÉSULTATS

Polarimétrie. — Nos résultats font l'objet de la Figure 1. La libération du D-glucose ayant été régulière en fonction du temps, la rotation observée lors de nos essais est matérialisée par une droite à pente décroissante (1); ceci est normal, la concentration en tréhalose diminuant au cours de l'hydrolyse et les pouvoirs rotatoires spécifiques des deux formes α et β du D-glucose étant largement inférieurs à celui du tréhalose.

Par chromatographie sur papier, nous n'avons décelé aucune autre tache que celles du tréhalose et du D-glucose : il n'y a donc eu aucune transosylation. Une indication de la forme α sous laquelle le D-glucose est libéré est fournie par l'importante diminution de la rotation après addition d'ammoniaque concentrée car la forme β aurait donné une augmentation de cette rotation. Nous avons alors calculé les pouvoirs rotatoires théoriques correspondants aux différentes lectures²⁶ et en appliquant la formule : $[\alpha]_D$ apparente $- [\alpha]_D$ due à la mutarotation de l'ose libéré $- [\alpha]_D$ due au changement dans la concentration du tréhalose = $[\alpha]_D$ du produit.

Puisque le D-glucose est régulièrement libéré au cours de l'hydrolyse enzymatique, on peut avoir une approximation du changement dû à la mutarotation en prenant la valeur moyenne du changement observé avec une solution de α -D-glucose dans les mêmes conditions²⁶.

La droite (1) obtenue au cours de nos essais et celle (2) tracée à partir des pouvoirs rotatoires spécifiques calculés correspondant à l'obtention théorique de α -D-glucose sont très rapprochées comme le montre la Figure 1. L'écart entre le chiffre obtenu et le chiffre théorique au bout de 30 min est de 1,8 %.

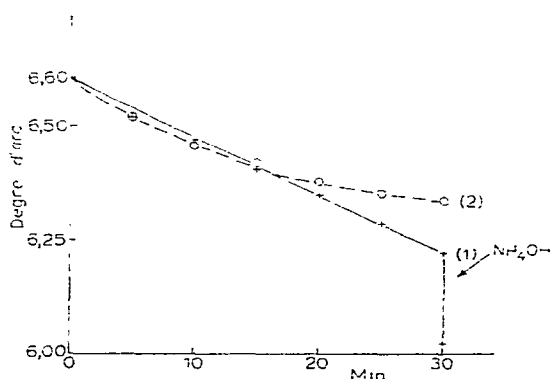


Fig. 1. Rotation optique observée pendant l'hydrolyse enzymatique du tréhalose. (1) Hydrolyse enzymatique du tréhalose (x—x). (2) Courbe théorique correspondant à la libération de deux molécules d' α -D-glucose (O—O).

Chromatographie en phase gazeuse. — Les résultats confirment ceux de la chromatographie sur papier; nous n'avons obtenu que du D-glucose lors de l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase. Aucune transosylation n'a eu lieu. L'analyse de la solution témoin de α -D-glucose nous a donné un rapport α -D-glucose: β -D-glucose de 0,90 en accord avec celui trouvé par Parrish et Reese¹⁴. Celle du mélange à parties égales des deux formes de D-glucose a donné un rapport de 0,98. Dans le cas de l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase en 30 min, nous obtenons un rapport de 1,84 (Fig. 2).

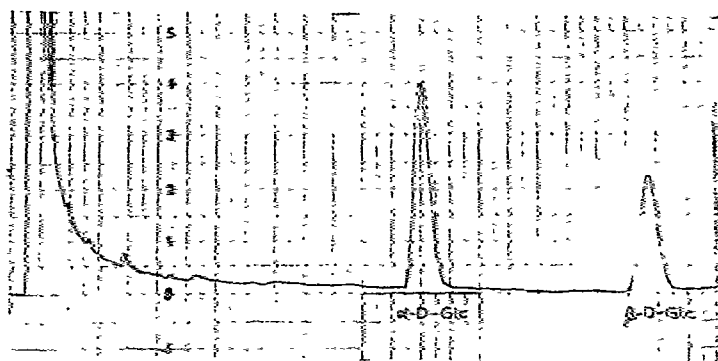


Fig. 2. Analyse chromatographique en phase gazeuse des oses libérés au cours de l'hydrolyse enzymatique du tréhalose; rapport α -D-glucose: β -D-glucose 1,84.

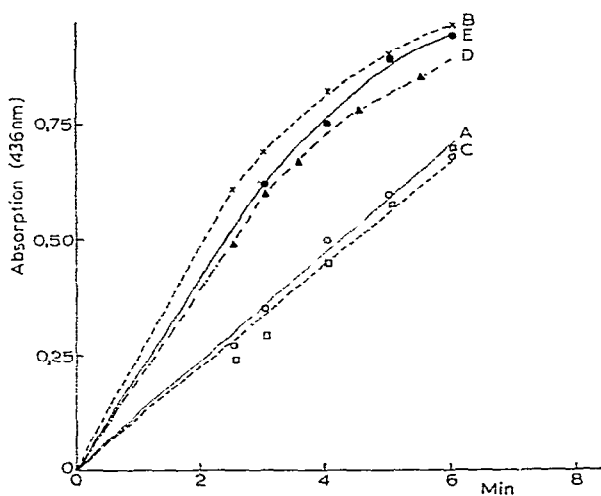


Fig. 3. Détermination par la D-glucose-oxydase de la forme anomérique du D-glucose libéré par hydrolyse enzymatique du tréhalose par la tréhalase de rein de porc pendant 3 min. Le D-glucose a été dosé par la D-glucose-oxydase. (A) D-Glucose présent dans l'hydrolysate enzymatique du tréhalose. (B) D-Glucose présent dans l'hydrolysate enzymatique du tréhalose, après chauffage de 2 min à 90° et pH 7,0. (C) Solution témoin d' α -D-glucose. (D) Solution témoin de β -D-glucose. (E) Mélange à parties égales des deux formes anomériques.

Étude par voie enzymatique. — Après un chauffage de 2 min à 90° à pH 7,0 (Fig. 3, courbe B) le D-glucose se trouve à l'équilibre. L'oxydation du D-glucose, dans cet essai, est beaucoup plus rapide que lors de l'expérience sans chauffage (courbe A). Les courbes A et C d'un côté, B, D et E de l'autre, sont très rapprochées.

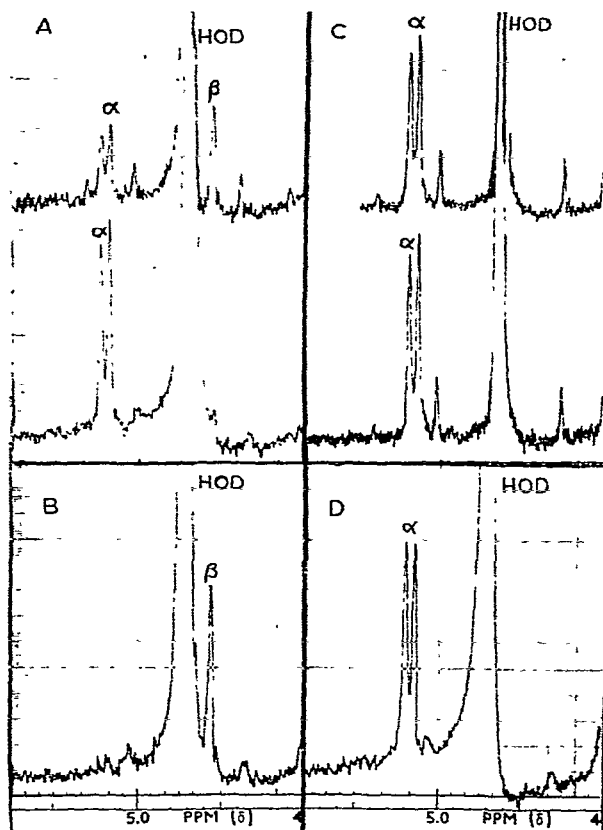


Fig. 4. Analyse par r.m.p. de l'hydrolysat du tréhalose par la tréhalase. (A inférieur) α -D-Glucose. (A supérieur) α -D-Glucose additionné d'ammoniaque jusqu'à pH 10. (B) β -D-Glucose. (C inférieur) Hydrolysat enzymatique après 3 min. (C supérieur) Hydrolysat enzymatique après 15 min. (D) α,α -Tréhalose.

Résonance magnétique protonique. — Les spectres de r.m.p. du tréhalose et de l' α -D-glucose sont superposables (Fig. 4), le tréhalose ayant un axe de symétrie binaire; les deux résidus de D-glucose constituant ne peuvent être différenciés ni par voie chimique, ni par voie physique²⁷. Le signal H-1 du β -D-glucose est en partie confondu avec celui de l'eau résiduelle (δ 4,6); il est néanmoins aisément décelable. Le spectre obtenu à partir du mélange réactionnel est superposable à ceux du tréhalose et de l' α -D-glucose. Un seul signal a pu être décelé à δ 5,2. Aucun signal attribuable au β -D-glucose n'a pu être décelé dans les conditions de nos expériences, à savoir deux spectres réalisés dans un intervalle de temps de 15 min.

DISCUSSION

Les résultats obtenus à l'aide des quatre méthodes auxquelles nous avons eu recours montrent que la libération du D-glucose a lieu sous la forme anomérique α .

En effet, si au cours des expériences conduites par polarimétrie, il y avait eu libération de β -D-glucose, nous aurions observé une augmentation du pouvoir rotatoire lors de l'addition d'ammoniaque après 30 min d'incubation. Toutefois la modalité (2) ne peut être exclue. Cependant, les rapports des deux formes anomériques trouvées lors de la c.p.g. ne sont compatibles qu'avec la libération d' α -D-glucose seul.

De même, la méthode enzymatique à la D-glucose-oxydase confirme la libération du seul α -D-glucose. La pente de la droite obtenue avec le milieu réactionnel, non porté à l'équilibre, se confond pratiquement avec celle d'une solution d' α -D-glucose de même concentration.

Cette méthode semble donner les résultats les plus nets. Le temps d'incubation de 3 min a été le plus court et la mutarotation n'a ainsi pratiquement pas eu le temps d'intervenir.

La r.m.p. confirme les résultats obtenus par les trois protocoles précédents. Cet ensemble nous permet d'éliminer les modalités (2) et (3). Ainsi, l'ensemble de nos essais permet de considérer que la tréhalase de rein de porc se comporte comme une α -glycosidase agissant avec rétention de la configuration.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur Bourdon qui nous a aimablement permis d'utiliser le polarimètre Carl Zeiss et Monsieur le Professeur Plat et Monsieur Lalegerie, pour l'aide bienveillante qu'ils nous ont apportée lors de l'étude par r.m.p.

RÉFÉRENCES

- 1 E. R. GUILLOUX, M. A. ARCILA, J.-E. COURTOIS ET V. MOUMRIKOFF, *Biochimie*, 53 (1971) 853.
- 2 E. GUILLOUX, J.-E. COURTOIS ET F. PERCHERON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1915.
- 3 J.-E. COURTOIS, J. F. DEMELIER, J. LABAT ET F. HARGREAVES, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1291.
- 4 J. LABAT, J. F. DEMELIER ET J.-E. COURTOIS, *Chem. Zvesti*, 23 (1970) 776.
- 5 J. F. DEMELIER ET J.-E. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 2553.
- 6 J. F. DEMELIER, C. BARK, J. LABAT ET J.-E. COURTOIS, *7th Cong. Clin. Chem. Clin. Enzym.*, 2 (1970) 187.
- 7 J. F. DEMELIER, M. MASSARI, J.-E. COURTOIS ET J. LABAT, *Clin. Chim. Acta*, 35 (1971) 335.
- 8 J.-E. COURTOIS, J. F. DEMELIER, J. LABAT ET C. BARK, *C.R. Soc. Biol.*, 163 (1969) 2092.
- 9 B. CAPON, *Chem. Rev.*, 69 (1969) 407.
- 10 J. T. EDWARD, *Chem. Ind. (London)*, (1955) 1102.
- 11 E. BELOCOPITOW ET L. R. MARÉCHAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 198 (1970) 151.
- 12 G. SEMENZA, C. H. CURTIUS, J. KOLINSKA ET M. MÜLLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 196.
- 13 R. BENTLEY ET N. BOTLOCK, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 312.
- 14 F. W. PARRISH ET E. T. REESE, *Carbohydr. Res.*, 3 (1967) 424.
- 15 K. WALLENFELS ET G. KURZ, *Biochem. Z.*, 335 (1962) 559.
- 16 G. SEMENZA, H. C. CURTIUS, O. RAUNHARDT, P. HORE ET M. MÜLLER, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 417.

- 17 D. E. EVELEIGH ET A. S. PERLIN, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 87.
- 18 A. YA. KHORLIN, S. E. ZURABYAN, N. I. DUBROVINA, V. F. BYSTROV, G. V. VIKHA ET E. D. KAVERZNEVA, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 316.
- 19 E. BELOCOPITOW, L. R. MARÉCHAL ET E. G. GROS, *Carbohydr. Res.*, 19 (1971) 268.
- 20 E. R. GUILLOUX, J. DEFAYE, R. H. BELL ET D. HORTON, *Carbohydr. Res.*, 20 (1971) 421.
- 21 A. S. KESTON, *Science*, 120 (1954) 355.
- 22 F. HUCHO ET K. WALLENFELS, *Eur. J. Biochem.*, 23 (1971) 489.
- 23 A. HYVARINEN ET E. A. NIKKILA, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 140.
- 24 W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER ET J. S. HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 444.
- 25 W. PIGMAN ET H. S. ISBELL, *Advan. Carbohydr. Chem.*, 23 (1968) 11.
- 26 T. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 869.
- 27 G. BIRCH ET A. C. RICHARDSON, *Carbohydr. Res.*, 8 (1968) 411.