

CHROM. 11,696

Note

Comportement chromatographique de l' α -L-fucosidase sérique humaine

M. BERNARD, M. J. FOGLIETTI et F. PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale, Université René Descartes, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris (France)

(Reçu le 28 décembre, 1978)

Une activité α -L-fucosidasique (α -L-fucoside fucohydrolase, E.C. 3.2.1.51) a été mise en évidence chez l'Homme dans divers organes (foie, rein, lymphocytes, placenta) et dans le sang circulant¹⁻³. Les résultats publiés jusqu'alors sont assez disparates, en particulier en ce qui concerne la masse moléculaire de l'enzyme.

Certains auteurs font état, dans le tissu hépatique et le placenta, de deux formes de masses moléculaires 200,000 et 50,000, obtenues par chromatographie sur gel de Sephadex^{2,3}. D'après Robinson et Thorpe⁴, ces deux formes se retrouveraient dans le sérum humain. Des travaux récents postulent l'existence dans différents tissus de plusieurs isoenzymes de même masse moléculaire. L'isolement d'une enzyme de faible masse moléculaire correspondrait alors à une dissociation aisée d'un tétramère thermostable en monomère thermolabile⁵.

Devant cette grande dispersion des résultats, nous avons tenté d'étudier les variations du comportement chromatographique de l' α -L-fucosidase sérique. Il est en effet actuellement reconnu que les glycoprotéines, et en particulier les sialoglycoprotéines, groupe dans lequel se trouve l' α -L-fucosidase sérique, ont un comportement particulier lors de la filtration sur gel^{6,7}.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est déterminée en utilisant comme substrat soit:

(a) Le *para*-nitrophényl- α -L-fucoside (solution 1.5×10^{-3} M dans un tampon citrate-phosphate, 0.1 M, pH 5.4). Le dosage du *para*-nitrophénol libéré est effectué par photométrie à 405 nm.

(b) Le méthyl-4-umbelliféryl- α -L-fucopyranoside (solution 1×10^{-3} M dans un tampon citrate-phosphate, 0.1 M, pH 5.4). Le dosage de la méthyl-4-umbelliférone libérée est effectué par fluorimétrie (excitation à 360 nm et émission à 450 nm).

Chromatographie sur gel de Sephadex G-200

Le sérum (0.5 ml) est chromatographié sur deux colonnes (30×1 cm) de Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala, Suède) montées en série et équilibrées à l'aide d'un tampon acétate (0.05 M, pH 5), additionné d'EDTA (0.001 M). L'élution est réalisée à l'aide de ce même tampon, à raison d'une fraction de 1 ml toutes les 15 min.

Chromatographie sur Ultrogel AcA34

Le sérum (0.6 ml) est chromatographié sur une colonne (120 × 1.5 cm) d'Ultrogel AcA34 (LKB, Stockholm, Suède), équilibrée avec un tampon citrate-phosphate (0.05 M, pH 6.4). L'éluion est réalisée par le même tampon à raison d'une fraction de 2.5 ml toutes les 15 min.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Devant les résultats divergents obtenus par les différents auteurs lors de la purification sur gel de Sephadex de l' α -L-fucosidase de diverses origines, nous nous sommes adressés à une technique chromatographique utilisant un support de nature différente, l'Ultrogel AcA 34 (acrylamide-agarose).

Dans ce cas, l'activité enzymatique sérique est éluée en un pic assez aigu et symétrique, correspondant à une protéine de masse moléculaire $100,000 \pm 10,000$ (Fig. 1). Ce résultat n'étant pas en accord avec ceux de divers auteurs qui suggèrent l'existence dans le sérum² et le foie³ de deux formes de masse moléculaire 200,000 et 50,000, nous avons à notre tour étudié le comportement chromatographique de l'enzyme sur gel de Sephadex G-200. En utilisant des conditions analogues à celles utilisées par Robinson et Thorpe³ pour le fractionnement de l'enzyme hépatique, l'activité enzymatique sérique est éluée en un pic majeur de masse moléculaire d'environ 100,000 et en un pic mineur de masse moléculaire d'environ 50,000 (Fig. 2). Cette divergence des résultats obtenus lors des chromatographies sur Sephadex peut être attribuée aux anomalies de comportement des sialoglycoprotéines lors de la filtration sur gel de Sephadex⁵. Ces anomalies conduisent à leur attribuer, comme l'a

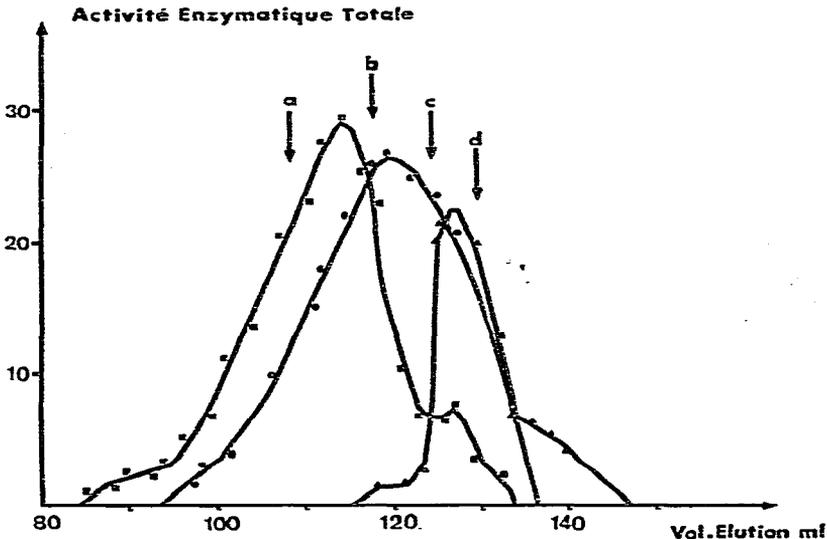


Fig. 1. Chromatographie sur Ultrogel AcA-34: ●, tampon citrate-phosphate (0.05 M, pH 6.4); ▲, tampon additionné de 0.1% de dodécylsulfate de sodium; ■, tampon additionné de mercaptoéthanol (0.01 M). Activité enzymatique exprimée en nmoles de méthylumbelliférone libérée $\times h^{-1}$. Elution des protéines étalons: a = β -glucuronidase; b = aldolase; c = albumine bovine; d = ovalbumine.

montré récemment Alhadeff et Janowsky⁵ lors d'une étude sur l' α -L-fucosidase hépatique, une masse moléculaire supérieure à celle obtenue par la même technique pour la protéine désialylée. Dans ce cas, on pourrait invoquer l'influence de variations de la teneur en acide sialique de l'enzyme.

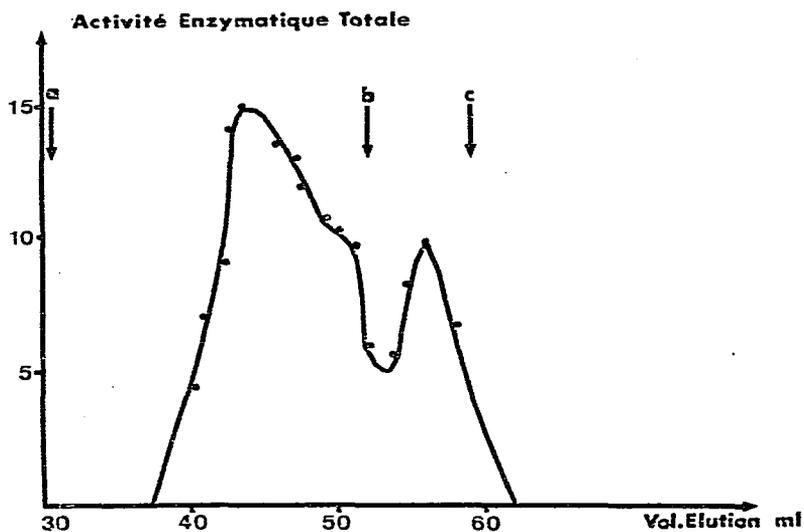


Fig. 2. Chromatographie sur Sephadex G-200. Activité enzymatique exprimée en nmol de paranitrophénol libéré $\times h^{-1}$. Elution des protéines étalons: (a) aldolase; (b) albumine bovine; (c) ovalbumine.

Il semble que nos résultats doivent plutôt être attribués au fait que l' α -L-fucosidase résulte de l'association de quatre monomères dont l'état d'agrégation dépend des conditions physico-chimiques du milieu, conditions conduisant aisément à leur dissociation partielle ou totale en dimères et monomères également actifs. Au cours de la rédaction de ce travail, nous avons en effet pris connaissance des résultats de Thorpe et Robinson⁸ mettant en évidence l'influence du pH et de la concentration en électrolytes du tampon d'élution utilisé lors de la filtration sur gel, sur l'agrégation de l'enzyme hépatique. A partir de la même enzyme, ces auteurs caractérisent, soit une forme de masse moléculaire élevée (200,000) associée à une forme de faible masse moléculaire (50,000), soit une forme de masse moléculaire 100,000 (Tableau I). Nos résultats obtenus par chromatographie sur gel de Sephadex G-200 ne semblent pas en contradiction avec ces récents résultats puisque nous avons adopté des conditions d'élution intermédiaires quant à la molarité du tampon.

Par variation des conditions chromatographiques, il nous a été possible d'obtenir, soit la dissociation totale de l'enzyme en son monomère, soit sa réassociation sous forme d'un oligomère de masse moléculaire d'environ 200,000. En effet, la chromatographie sur Ultrogel AcA 34, réalisée en présence de 0.1% de dodécylsulfate de sodium, conduit à l'élution de l'activité enzymatique en un seul pic correspondant à une masse moléculaire de 50,000 (Fig. 1), identique à la forme de faible masse moléculaire signalée par la plupart des auteurs. Une chromatographie sur le même support mais réalisée en présence de mercaptoéthanol 1 mM a permis d'attribuer à l'enzyme une masse moléculaire de 200,000 (Fig. 1).

TABLEAU I

VARIATIONS DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DES α -L-FUCOSIDASES H₁-PATRIQUE ET SÉRIQUE EN FONCTION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Origine de l'enzyme	Support	Référence	Conditions d'élution	Masse moléculaire
Foie	Sephadex G-200	2 et 3	Tampon acétate (0.05 M, pH 5) + EDTA (0.001 M)	1 forme majeure (200,000) 1 forme mineure (50,000)
		8	Tampon acétate (0.005 M, pH 5)	1 forme majeure (200,000) 1 forme mineure (50,000)
	8	Tampon acétate (0.005 M, pH 5) + NaCl (0.1 M)	1 forme de masse moléculaire intermédiaire	
Sérum	Sephadex 6B	5	Tampon phosphate (0.05 M, pH 5.5)	1 forme de masse moléculaire 296,000 ± 30,000
	Sephadex G-200	Résultats personnels	Tampon acétate (0.05 M, pH 5) + EDTA (0.001 M)	1 forme majeure 100,000 ± 10,000 1 forme mineure 50,000 ± 5,000
		Résultats personnels	Tampon citrate-phosphate (0.05 M, pH 6.4)	1 forme 100,000 ± 10,000
	Ultrogel AcA 34	Résultats personnels	Tampon identique + SDS (0.1%) Tampon identique + mercaptoéthanol (0.01 M)	1 forme 55,000 ± 5,000 1 forme 200,000 ± 10,000

L'ensemble de ces résultats résumé sur le Tableau I est en faveur de la nature oligomérique de l' α -L-fucosidase sérique. En effet, les protéines possédant des groupements thiols existent généralement sous forme d'oligomères constituant la forme biologique normale de la protéine.

La dissociation aisée de cet oligomère expliquerait les divergences dans les résultats obtenus par les différents auteurs lors de la détermination de la masse moléculaire de l'enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. Zielke, S. Okada et J. S. O'Brien, *J. Lab. Clin. Med.*, 79 (1972) 164.
- 2 G. Y. Wiederschain, L. G. Kolibaba et E. L. Rosenfeld, *Clin. Chim. Acta*, 47 (1973) 305.
- 3 D. Robinson et R. Thorpe, *Clin. Chim. Acta*, 47 (1973) 403.
- 4 D. Robinson et R. Thorpe, *Clin. Chim. Acta*, 55 (1974) 65.
- 5 J. A. Alhadef et A. J. Janowsky, *Clin. Chim. Acta*, 82 (1978) 133.
- 6 P. Andrews, *Biochem. J.*, 96 (1965) 595.
- 7 J. A. Alhadef, *Biochem. J.*, 173 (1978) 315.
- 8 R. Thorpe et D. Robinson, *Clin. Chim. Acta*, 86 (1978) 21.