

CHROM. 12,430

## Note

### Isolément de glycoprotéines végétales hydrosolubles par chromatographie d'affinité sur concanavoline A immobilisée

C. AKIKI, R. BOURBOUZE, C. LUPORSI et F. PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 av. de l'Observatoire, 75006 Paris (France)

(Reçu le 13 juin 1979; manuscrit modifié reçu le 3 octobre 1979)

Les plantes, et notamment les graines, renferment des teneurs non négligeables en glycoprotéines; cependant, les glycoprotéines végétales ont donné lieu à peu d'investigations, et seules quelques-unes d'entre-elles ont été caractérisées<sup>1</sup>. Des données récentes semblent néanmoins indiquer que de nombreuses glycoprotéines végétales possèdent une structure oligomannosidique, et sont donc susceptibles d'interagir spécifiquement avec la concanavoline A (Con A)<sup>2-5</sup>.

Nous décrivons une méthode adaptée à l'isolement et à la caractérisation de glycoprotéines hydrosolubles affines de la concanavoline A, et ceci à partir du broyat d'un matériel végétal (graines de sarrasin, *Fagopyrum esculentum* Polygonacées). Nous avons utilisé la concanavoline A sous forme immobilisée comme support d'affinité; l'étude de l'influence de divers paramètres (essais en cuve et en colonne, concentration en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, température, adjuvants) nous a permis de sélectionner un protocole expérimental assurant un rendement optimal, et de préciser la spécificité de l'interaction glycoprotéines végétales-concanavoline A.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### Méthodes analytiques

La concentration en protéines des éluats chromatographiques est évaluée par mesure de l'absorption différentielle à 260 et 280 nm selon Warburg et Christian<sup>6</sup>. La teneur en oses neutres des glycoprotéines est déterminée selon la méthode de Dubois *et al.*<sup>7</sup>, en utilisant le mannose comme témoin interne.

### Extraction des protéines hydrosolubles

La fraction soluble après dialyse contre de l'eau distillée du broyat de graines sèches de sarrasin (20 g) est adsorbée sur une colonne (25 × 150 mm) d'hydroxylapatite (HA-Ultrogel) équilibrée avec un tampon phosphate 0.001 M pH 6. Après lavage avec le tampon d'équilibrage, les protéines fixées sur le support sont éluées par un tampon phosphate 0.5 M, pH 7. Cette étape chromatographique s'effectue avec un débit de 25 ml/h et des fractions d'environ 10 ml sont recueillies.

### *Isolement des glycoprotéines affines de la concanavaline A*

L'éluat de l'HA-Ultrogel est dialysé et lyophilisé. Le lyophilisat protéique (100 mg) est remis en solution dans du tampon acétate 0.1 M (pH 6)-NaCl M, et chromatographié sur colonne (20 × 170 mm) de Con A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suède) équilibrée avec le même tampon, à 20° et avec un débit de 10 ml/h. Après passage de la fraction protéique non affine de la lectine et lavage de la colonne avec le tampon d'origine, l'éluat des glycoprotéines fixées sur Con A-Sepharose s'effectue par du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside 0.5 M après équilibrage de la colonne à 37°. Après passage d'une quantité de tampon renfermant le compétiteur correspondant à une fois et demi le volume du gel, la chromatographie est interrompue et la colonne portée dans une enceinte thermostatée à 37° pendant 2 h. L'éluat des glycoprotéines affines de la Con A s'effectue ensuite avec un débit de 60 ml/h et recueil de fractions de 5 ml.

La fraction glycoprotéique, dialysée et concentrée par lyophilisation ou ultrafiltration sur membrane Diaflo PM 30 (Amicon, Lexington, Mass., É.U.), est chromatographiée sur colonne (25 × 360 mm) de Sephadex G25 (Pharmacia) avec un débit de 15 ml/h et recueil de fractions de 3 ml (rendement en glycoprotéines 10 mg).

En l'absence de précisions contraires dans le texte, toutes les opérations d'extraction et les étapes chromatographiques sont réalisées à 4°, et les tampons renferment 0.02% d'azoture de sodium.

### *Electrofocalisation*

Les expériences d'électrofocalisation ont été réalisées à l'aide d'un appareillage "Ampholine PAGplate" (LKB, Stockholm, Suède), avec des gels de 5% en acrylamide et pour un gradient d'ampholytes de pH 3.5-9.5. Les protéines sont révélées par le bleu de coomassie. La coloration des glycoprotéines par le réactif de Schiff ne s'est pas montrée assez sensible; individuellement, chaque glycoprotéine au sein d'un échantillon se trouve au-dessous du seuil minimal de sensibilité<sup>8</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les conditions opératoires décrites permettent d'obtenir en un nombre limité d'étapes une quantité appréciable de glycoprotéines (10 mg de glycoprotéines dans le cas d'une préparation type à partir de 100 mg de protéines totales éluées de l'HA-Ultrogel et correspondant à 20 g de graines de sarrasin) dont la teneur globale en oses neutres est de 11%.

L'étape chromatographique sur HA-Ultrogel permet d'isoler la totalité des protéines de l'extrait végétal aqueux, et d'éliminer les oses libres, polysaccharides et pigments du broyat, non adsorbables par l'hydroxylapatite dans ces conditions opératoires<sup>9</sup>.

Sous forme immobilisée, la Con A constitue un outil de choix pour l'isolement d'une population de glycoprotéines. Des tentatives préliminaires d'éluat fractionné sur colonne de Con A-Sepharose à l'aide de gradients de concentration continu ou discontinu en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside se sont révélés de faible rendement. L'éluat globale des glycoprotéines fixées sur le support d'affinité est fonction de la concentration en compétiteur et de la température; en protocole final, nous avons retenu leur éluat par un tampon méthyl- $\alpha$ -D-mannoside 0.5 M après équilibrage de la colonne de Con A-Sepharose à 37°.

L'analyse par électrofocalisation de cette fraction glycoprotéique affine de la Con A révèle une forte hétérogénéité; on identifie une population de bandes protéiques se répartissant dans toute la gamme du gradient (pH 3.5-9.5), avec néanmoins quelques bandes majeures qui focalisent entre pH 4 et 6 (Fig. 1C).

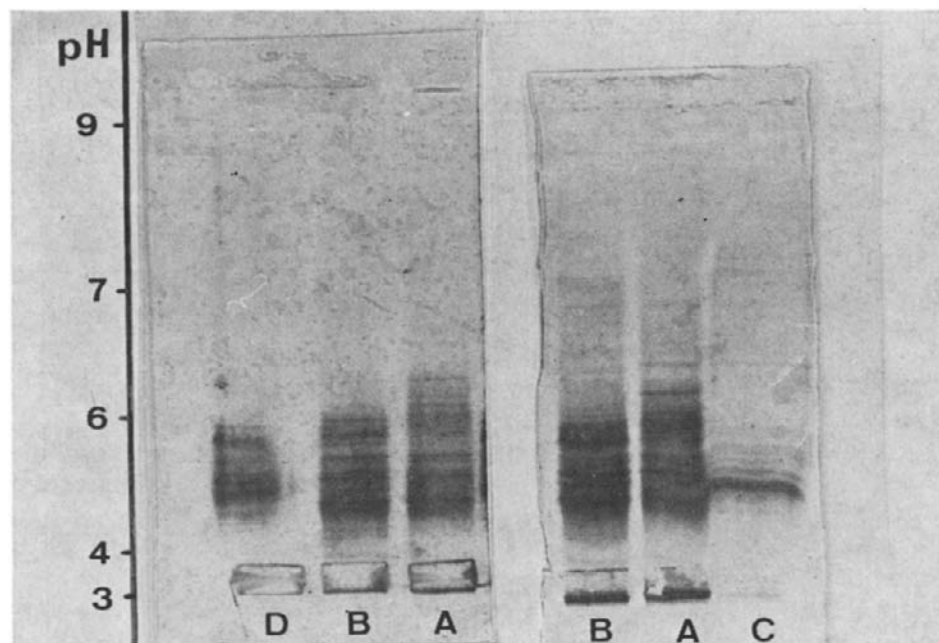


Fig. 1. Electrofocalisation en plaques d'acrylamide à 5% et gradient d'ampholytes pH 3.5-9.5. A = Protéines hydrosolubles: éluat HA-Ultrogel; B = protéines non fixées par la colonne de Con A-Sepharose; C = glycoprotéines affines de la Con A; éluat méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, 0.5 M à 37°; D = glycoprotéines affines de la Con A; éluat méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, 0.02 M à 20°.

Les conditions nécessaires à l'éluion des glycoprotéines de la colonne de Con A-Sepharose sont le reflet d'une forte interaction entre la majorité d'entre-elles et la Con A. Néanmoins, une éluion préférentielle, sinon sélective, de glycoprotéines de faible affinité peut être envisagée pour une concentration de 0.02 M en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 20°; on identifie au niveau de cette fraction une concentration notable des glycoprotéines qui focalisent entre pH 4 et 6 par rapport à la fraction glycoprotéique globale (Fig. 1D).

Nous n'avons pu déceler la présence éventuelle d'interactions non spécifiques ou irréversibles entre certaines protéines et le gel de Con A-Sepharose. La présence de NaCl M dans le tampon de fixation prévient les interactions ioniques<sup>10,11</sup>. Après lavage par le tampon méthyl- $\alpha$ -D-mannoside 0.5 M (cinq fois le volume de la colonne), l'addition à ce tampon d'éthylène glycol (50%), ou le passage d'un tampon borate 0.1 M, pH 6, n'entraînent pas l'éluion d'une fraction protéique, indice respectivement de l'absence d'interactions de type hydrophobe<sup>12</sup> ou polysaccharide-lectine<sup>13</sup>. L'absence d'interactions irréversibles est illustrée par le passage de solutions d'HCl 0.1 M ou de SDS 0.1% sur des gels ayant servi à plusieurs chromatographies successives. Ces adjuvants provoquent la dissociation de la Con A et la perte de son activité

biologique<sup>14</sup>; l'éluat protéique correspondant à ce traitement ne contient pas de matériel glucidique. La fraction protéique non fixée par passage sur colonne de Con A-Sepharose, et la fraction glycoprotéique affine de la lectine sont rechromatographiées selon les mêmes conditions expérimentales. Par recyclage, chacune de ces fractions présente à nouveau le même comportement chromatographique.

La spécificité de l'interaction de la fraction glycoprotéique pour la lectine est également confirmée par ces essais d'agglutination. Seule la fraction glycoprotéique, à une concentration de 0.25 mg/ml inhibe l'agglutination d'hématies de lapin par la Con A. La fraction protéique non affine n'est pas inhibitrice à une concentration de 1 mg/ml.

Dans cette approche, les données concernant le comportement chromatographique de ces glycoprotéines végétales hydrosolubles présentent une correspondance certaine avec les études concernant l'interaction glycoprotéines animales-Con A-Sepharose<sup>15-17</sup>. Sans préjuger de la composition et de l'arrangement spatial de leur partie glycanique, ces glycoprotéines végétales affines de la Con A semblent génératrices, avec cette lectine, d'interactions spécifiques comparables à celles des glycoprotéines d'origine animale.

#### RÉMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mr. H. Debray, du Laboratoire du Professeur J. Montreuil de Lille (France), pour les essais d'inhibition de l'hémagglutination par la concanavaline A.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. Sharon, dans J. B. Pridham (Rédacteur), *Plant Carbohydrate Biochemistry*, Academic Press, New York, London, 1974, p. 236.
- 2 W. T. Forsee, G. Valkovich et A. D. Elbein, *Arch. Biochem. Biophys.*, 174 (1976) 469.
- 3 F. A. Gleeson et M. A. Jermyn, *Aust. J. Plant Physiol.*, 4 (1977) 25.
- 4 S. Bouquet et G. Spick, *Eur. J. Biochem.*, 63 (1978) 331.
- 5 H. Lis et N. Sharon, *J. Biol. Chem.*, 153 (1978) 3468.
- 6 O. Warburg et W. Christian, *Biochem. Z.*, 310 (1941) 384.
- 7 M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers et F. Smith, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350.
- 8 R. A. Kapitany et E. J. Zebrowsky, *Anal. Biochem.*, 56 (1973) 361.
- 9 A. Tiseius, S. J. Hjerten et O. Levin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- 10 R. J. Doyle, E. E. Woodside et C. N. Fishel, *Biochem. J.*, 106 (1968) 35.
- 11 Y. Matsushina et T. Mega, *J. Biochem.*, 81 (1977) 571.
- 12 I. J. Goldstein et C. E. Hayes, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35 (1978) 127.
- 13 K. O. Lloyd, dans H. Bittiger et H. P. Schnebli (Rédacteurs), *Concanavalin A as a Tool*, Wiley, New York, 1976, p. 323.
- 14 R. Lotan, G. Beattie, W. Hubbel et G. L. Nicolson, *Biochemistry*, 15 (1977) 1787.
- 15 M. B. Fiddler, Y. Ben-Yoseph et H. L. Nadler, *Biochem. J.*, 177 (1979) 175.
- 16 G. W. Norden et J. S. O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 56 (1974) 193.
- 17 M. G. Brattain, P. M. Kimball, T. G. Pratlow et M. E. Marks, *Biochem. J.*, 163 (1977) 247.