

ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE ET LA FONCTION DE L' α -AMYLASE PANCREATIQUE DE PORC

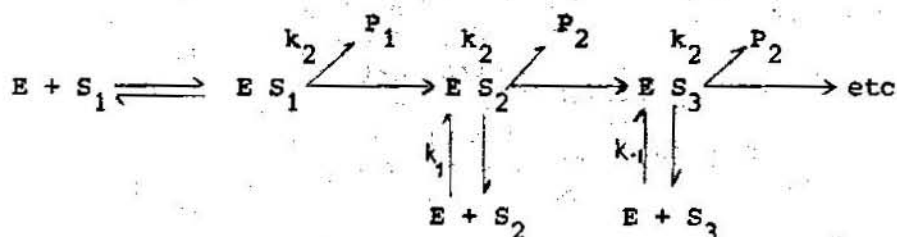
G. MARCHIS-MOUREN, L. PASERO, B. ABADIE et E. PRODANOV^{*}
 Institut de Chimie Biologique, Place V. Hugo,
 13331 MARSEILLE Cédex 3, FRANCE.

1. PROPRIETES ENZYMATIQUES

1.1. Mode d'action

L' α -amylase, α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1.) catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4 des chaînes d'amidon et de glycogène. L'analyse des produits d'hydrolyse indique que la digestion des chaînes polyglucosiques s'effectuerait suivant le schéma de l'attaque multiple (1,2). Dans ce schéma l'enzyme hydrolyserait la chaîne en 2 dextrines et, restant fixé sur la dextrine portant l'extrémité réductrice, assurerait la libération de plusieurs molécules de maltose avant de quitter la chaîne pour une nouvelle série d'attaque sur une autre chaîne.

Le schéma de l'attaque multiple est résumé par la réaction :



où S_1 : est une chaîne polysaccharidique ($S_1 = S_2 + P_1$)

S_2 : la dextrine à extrémité réductrice à n résidus

S_3 : la dextrine à extrémité réductrice à n-2 résidus...

P_1 : la dextrine complémentaire de S_2 , à l'extrémité non réductrice

P_2 : une mole de maltose.

Les travaux de E. Prodanov (en cours de publication) dans notre laboratoire indiquent que l' α -amylase a plus d'affinité pour les substrats intermédiaires (dextrine à extrémité réductrice) que pour les chaînes intactes ou plus longues. Cependant l'enzyme a très peu d'affinité pour les chaînes courtes et tout particulièrement pour les oligosaccharides à $n \leq 4$. Selon Prodanov la réaction d'hydrolyse de l'amidon par l'amylase ne peut être décrite par un mécanisme réversible (Michaelis) mais plutôt par un mécanisme non réversible.

*Boursier CIES pendant son stage dans notre laboratoire, réside actuellement à Montevideo (Uruguay).

1.2. Site d'attachement du substrat, Comparaison avec le lysozyme

Les études de Robyt et French (3) concernant l'hydrolyse par l'amylase d'oligosaccharides de 3 à 8 résidus glucose suggèrent l'existence d'un centre d'attachement, sur l'enzyme, de 5 résidus orientés de l'extrémité non réductrice (n° 1) à l'extrémité réductrice (n° 5), l'hydrolyse étant réalisée entre le 3ème et le 4ème résidu. Le site d'attachement du substrat a été particulièrement bien étudié dans le cas du lysozyme d'oeuf de poule (4,5,6).

Le lysozyme catalyse l'hydrolyse des liaisons β 1-4 entre les résidus N-acétyl-muraminyl et N-acétyl-glucosaminyl (polyglycane de la paroi bactérienne) ainsi que l'hydrolyse des chaînes de poly N-acétyl-glucosamine (chitine). L'attachement d'inhibiteurs, produits de la réaction (N-acétyl-glucosamine, acide N-acétyl-muramique) ou d'analogues de substrats, a été étudié d'une part par diffraction aux RX des complexes cristallins enzyme-inhibiteur et, d'autre part, utilisant des oligosaccharides en solution, par spectroscopie de fluorescence ou par dialyse à l'équilibre. Le lysozyme attache une chaîne de 6 unités monosaccharides, chaque unité étant localisée à un "subsite" déterminé.

Comme dans le cas de l'amylase la présence d'ions Cl^- associés à la molécule a été démontrée (6 atomes/mole).

2. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L' α -AMYLASE PANCREATIQUE DE PORC

L' α -amylase existe sous 2 formes I et II se distinguant par leur point isoélectrique, respectivement 5,95 et 5,25 (7,8). L'enzyme est abondant (6 % des protéines du pancréas) et stable. Il peut être purifié en quantité importante, 100 mg/jour, à partir du lyophilisat de l'extrait aqueux de la glande, par précipitation fractionnée (sulfate d'ammonium et acétone) et par chromatographie d'affinité sur gel de polydextrane. Les 2 formes sont séparées par chromatographie d'échange d'ions. Ces 2 formes sont par ailleurs très semblables :

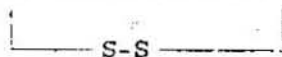
- même poids moléculaire (53.000) (9)
- 1 seule chaîne de 470 amino acides.
- même composition en amino acides.
- 4 ponts disulfures et 2 groupements SH libres.
- même extrémité (l'extrémité N est N-acétylée) (10)
- les 2 formes sont glycosylées (11)
- I : glucosamine (1,2), fucose (0,75), galactose (0,45)
- II : glucosamine (0,8), fucose (0,75), galactose (0,45), mannose (0,53).

3. DETERMINATION DE LA SEQUENCE

La molécule (8 Met) a été clivée par le bromure de cyanogène (BrCN) et les 9 BrCN peptides obtenus ont été purifiés, notamment par tamisage moléculaire, et leur composition en amino acides déterminée (12).

La position de ces peptides dans la chaîne d'amylase a été déterminée par la méthode radioisotopique (13). Les fragments de pancréas ont été incubés pendant un temps court en présence d'acides radioactifs. L'amylase radioactive purifiée est marquée de façon non homogène, la radioactivité incorporée étant d'autant plus élevée que la position considérée dans la chaîne est plus proche du C-terminal. Les peptides BrCN ont donc été classés par ordre de radioactivité croissante du N-au C-terminal.

VIII-II-IV-VII-I-VI-V-IX-III



Actuellement seulement 20 % de la structure primaire de la molécule est connue (14). La détermination de la structure primaire du peptide III (71 résidus) est en voie d'achèvement :

$_2$ HN-Trp-Pro-Gly-Asp-Ile-Lys-Ala-Val-Leu-Asp-Lys-Leu-His-Asn-Leu-Asn-Thr-Asn-Trp-Phe-Pro-Ala-Gly-Ser-Arg-Pro-Phe-Ile-Phe-Gln-Glu-Val-Ile-Asp-Leu-Gly-Gly-Glu-Ala-Ile-

celle du peptide I est connue pour les 20 premiers amino acides :

CMC-Gly-?-Gly-Ala-Ala-?-?-Gly-Thr-?-Trp-CMC-Gly-?-Thr-CMC-Asn-Pro-Gly-

celle des autres est à poursuivre. Il est difficile d'obtenir les peptides assez purs, sans coupure non spécifique et en quantité suffisante pour l'analyse. La séquence des 8 peptides tryptiques contenant de la 1/2 cystine et des 2 peptides à SH a été déterminée récemment (15).

V01 Ser Cys Tyr Arg

Leu Cys Thr Thr Arg (SH libre)

Cys Lys

Cys Asn Asn V01 Gly Arg (SH libre)

Val Gly Asn (Cys, Thr, Ser, Gly) Ile Lys

Cys Asn Val Thr Arg

Cys Asp Val Ile Ser Gly Lys

Asx (Cys, Asx, Thr, Ser, Gly (5), Ala (2), Trp (?)) Tyr Leu Arg

Gly (Cys His Tyr Leu Ile Val Gly Ala Thr Ser Asx (2)) Lys

Ala Asx (Cys Glx Asx).

4. L'AMYLASE EST UN METALLOENZYME

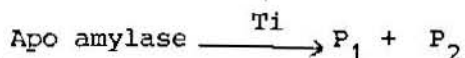
Un atome de Ca^{++} très fortement lié est présent par mole d'enzyme. Cet atome est nécessaire à l'activité de l'enzyme. La constante d'attachement ($8,3 \cdot 10^8 M^{-1}$) est augmentée par la présence d'ions Cl^- ($2 \cdot 10^{11} M^{-1}$) (16). D'autre part, l' α -amylase a son activité fortement stimulée par les ions Cl^- (V_m augmenté, K_m inchangé). L'enlèvement du calcium peut être réalisé par incubation avec un complexant. L'activité n'est que partiellement restaurable par le Barium (88 %), le Manganèse (75%) et le Cadmium (28 %), mais ni le Cobalt, ni le Nickel, ni les Lanthanides ne peuvent remplacer le Calcium dans l' α -amylase de porc (17).

Sur le plan structural l'enlèvement du calcium a pour effet :

- 1. Une légère modification de la structure tridimensionnelle vraisemblablement limitée à la région occupée par les 2 SH libres de la molécule. En l'absence de calcium, ces 2 groupes thiols sont accessibles à des agents de blocage des SH tel l'acide 5-5' dithiobis 2-nitrobenzoïque (18).

- 2. De permettre une protéolyse limitée de l' α -amylase par la trypsine. A l'état natif l' α -amylase est parfaitement résistante à l'attaque tryptique. L'amylase sans calcium est hydrolysée par la trypsine en 2 fragments P_1 et P_2

de poids moléculaire 49.000 et 4.000 respectivement.



Le gros fragment (P_1) garde la propriété de l'enzyme natif d'être retenu par les colonnes de polydextrane, mais il est dépourvu d'activité hydrolytique. Après réduction et carboxyméthylation, P_1 peut être séparé en 2 fragments A et B de poids moléculaire 37.000 et 12.000 respectivement. Le fragment B correspond à l'extrémité N acétylée de la molécule.



5. LES INHIBITEURS DE L' α -amylase

2 types d'inhibiteurs ont été signalés ; d'une part, les inhibiteurs oligosaccharidiques, d'autre part les inhibiteurs protéiques principalement d'origine végétale. L'hydrolyse de la β -cyclodextrine, molécule cyclique des 7 unités D-glucopyranose en liaison α -1-4 par la Taka amylase est inhibée par l' α -cyclodextrine (6 unités) et le maltose (19), de même l'hydrolyse du p-nitrophenyl- α -maltoside est inhibée par le maltose (20). L'hydrolyse de maltodextrine (17 résidus) par la glucoamylase de Rhizopus est inhibée par l'acide gluconique 1 : 5 lactone et le phenyl- α -glucoside (21). La β -cyclodextrine inhibe compétitivement l'hydrolyse de l'amylose par l' α -amylase pancréatique (22). Le complexe enzyme-inhibiteur obtenu contient 3 moles de β -cyclodextrine par mole d'amylase (23). un effet semblable a été observé avec le maltose (24). Les interactions entre l'amylase et le maltose d'une part, et la β -cyclodextrine, d'autre part, sont détectables par spectrophotométrie. Ces résultats indiquent qu'un résidu Tryptophane fait partie du site d'interaction. Dans le cas du lysozyme d'oeuf de poule l'attachement du substrat modifie le spectre de fluorescence du Tryptophane (6) indiquant sa participation au site de fixation du substrat.

4 inhibiteurs protéiques ont été isolés du blé (25). La purification et les propriétés de l'inhibiteur d'un haricot (*Phaseolus Vulgaris*) appelé Phaseoline a récemment été rapportée. Cette protéine d'un poids moléculaire de 43.000 inhibe l' α -amylase de façon non compétitive (26). Le complexe est d'une mole d'inhibiteur par mole d'enzyme.

6. DETERMINATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Les études ont été entreprises sur l'amylase en solution et sur des cristaux. Par la méthode de diffraction aux petits angles le rayon de gyration de l'amylase est 26,9 Å indiquant une forme globulaire. Son volume est de 65.000 Å³. I Simon et al. (23) proposent comme forme de l'amylase un modèle semi-cylindrique avec une cavité interne de 30 Å de diamètre permettant la fixation de 3 moles de β -cyclodextrine ou de 3 tours d'hélice d'Amylose. L'amylase a été cristallisée en cristaux (Tableau I) convenables pour l'analyse par diffraction des RX (27). Dans notre laboratoire 2 formes A et B ont été isolées (28). Plusieurs dérivés lourds mercuriques parfaitement isomorphes ont été obtenus. Les spectres de diffraction aux RX permettent d'espérer une résolution de l'ordre de 2 Å. La détermination de la structure à 6 Å, qui permettra de connaître le repliement spatial de la chaîne peptidique, est en voie d'achèvement.

7. CONCLUSION

Ces quelques lignes résumant des travaux récents et même non publiés permettent de faire le point. L'étude de la structure de l' α -amylase de porc

est en bonne voie. L'établissement de la structure tridimensionnelle de l'enzyme devrait, comme dans le cas du lysozyme, éclairer le mécanisme d'action au niveau moléculaire de l' α -amylase de porc.

De nouvelles données sont apportées par PASERO et al (29).

	McPherson et al (27)	Variété A (Pierrot et al) (28)	Variété B (Pierrot et al) (28)
Groupe spatial	$P2_1^2 2_1^2 1$	$P2_1^2 2_1^2 1$	$P2_1^2 2_1^2 1$
Paramètres : a	70 Å	70.6 Å	56.0 Å
b	110 Å	114.7 Å	88.3 Å
c	117 Å	118.5 Å	104.1 Å
volume	$9.01 \times 10^5 \text{ Å}^3$	$9.6 \times 10^5 \text{ Å}^3$	$5.14 \times 10^5 \text{ Å}^3$
Nb de molécules par unité asymétrique	2	2	1
V_M (volume du cristal par unité de poids moléculaire)	$2.13 \text{ Å}^3/\text{dalton}$	2.26	2.42
% en solvant	42%	45%	49 %
Résolution	3 - 4 Å	3.0 Å	2.5 Å

Tableau 1 : Données cristallographiques de divers cristaux d'amylase pancréatique de porc.

8. REFERENCES

1. HANSEN, K. (1962) *Biochemistry* 1, 723-729
2. ABDULLAH, M., FRENCH, D. et ROBYT, J.F. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 595-603.
3. ROBYT, J.F. et FRENCH, D. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3 917-3927.
4. JOLLES, F., JAUREQUI-ADELL, J., BERNIER, I. et JOLLES, P. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 78, 668-689.

5. PHILLIPS, D.C. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 484-487.
6. CHIPMANN, D.M., GRISARO, V. et SHARON, N. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4388-4394.
7. MARCHIS-MOUREN, G et PASERO, L. (1967) Biochim. Biophys. Acta 140, 366-368.
8. COZZONE, P., PASERO, L. et MARCHIS-MOUREN, G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 200, 590-593.
9. COZZONE, P., PASERO, L., BEAUFOIL-ABADIE, B. et MARCHIS-MOUREN, G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 207, 490-504.
10. COZZONE, P. et MARCHIS-MOUREN, G. (1970) FEBS Letters 9, 341-344.
11. ABADIE, B., RAFFALI, M. COZZONE, P. et MARCHIS-MOUREN, G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 297, 436-440.
12. COZZONE, P., PASERO, L. BEAUFOIL-ABADIE, B. et MARCHIS-MOUREN, G. (1971) Biochimie 53, 957-968.
13. COZZONE, P. et MARCHIS-MOUREN, G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257, 222-229.
14. PASERO, L. et MARCHIS-MOUREN, G. (résultats non publiés).
15. TELEGDI, M. FABIAN, F., SWEDY, S.M. et STRAUB, B.F. (1976) Biochim. Biophys. Acta 429, 860-869.
16. LEVITZKI, A. et STEER, M.L. (1974) Eur. J. Biochem. 41, 171-180.
17. LEVITZKI, A. et REUBEN, J. (1973) Biochemistry 12, 41-44.
18. CRANGER, M., ABADIE, B. et MARCHIS-MOUREN, G. (1975) FEBS Letters 56, 189-193.
19. KONDO, K., NAKATANI, H. et HIRONI, K. (1976) J. Biochem. Japan 79, 393-405.
20. NITTA, K. (1968) J. Biochem. Japan 63. 632-636.
21. OHNISHI, M., YAMASHITA, T. et HIROMI, K. (1976) J. Biochem. Japan 79, 1007-1012.
22. MORA, S. , SIMON, I. et ELODI, P. (1974) Molecular and Cellular Biochemistry 4, 205-209.
23. SIMON, I. MORA, S. et ELODI, P. (1974) Molecular and Cellular Biochemistry 4, 211-216.
24. ELODI, P., MORA, S. et KRISTEVA, K. (1972) Eur. J. Biochem. 24, 577-582.
25. O'DONNELL, M; et McGEENEY, K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 422, 159-169.
26. MARSHALL, J.J. et LANDA, C. (1975) J. Biol. Chem. 252, 8030-8037.
27. McPHERSON, A. et RICH, A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 285, 493-497.
28. PIERROT, M., ASTIER, J.P., ABADIE, B. et MARCHIS-MOUREN, G. (1972) FEBS Letters 79, 105-107.
29. PASERO (L.) ABADIE B., MAZZEI ?, MOINIER D., BIZZOZERO J.P., FOUGEREAU M. et MARCHIS-MOUREN G. 1979, Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19, 4A.