

50376  
1972  
111

N° d'ordre : 336

50376  
1972  
111

## MÉMOIRE PRÉSENTÉ

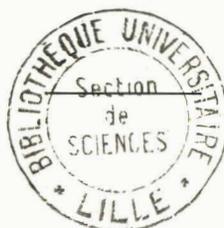
A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I  
POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR EN TROISIÈME-CYCLE

SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

Par

Stéphane BOUQUELET

ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES ET DE LA SPECIFICITE  
D'ACTION DE CINQ  $\beta$ -D-N-ACETYLHEXOSAMINIDASES DE  
DIVERSES ORIGINES (RATE ET FOIE DE BŒUF, FEVE JACK,  
GRAINES DE FENUGREC ET ASPERGILLUS NIGER)



PRÉSENTÉ LE 22 SEPTEMBRE 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Président	M. J. MONTREIUL
Rapporteur	M. G. BISERTE
Examineur	Mlle G. SPIK
Membre invité	M. B. MONTUELLE

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique II de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK, Maître de Conférences.

Nous remercions le Professeur J. MONTREUIL de l'intérêt qu'il a porté à nos recherches et des conseils qu'il nous a prodigués. Ce travail a été effectué dans le cadre de l'Equipe de Recherche Associée n° 320 (Structure et métabolisme des glycoprotéines) du Centre National de la Recherche Scientifique.

T A B L E   D E S   M A T I E R E S

<u>INTRODUCTION</u>	4
 <u>GENERALITES SUR LA SPECIFICITE DES GLYCOSIDASES</u>	 5
I - SPECIFICITE LIEE A L'ORIGINE DE L'ENZYME	5
II - SPECIFICITE LIEE A LA MASSE MOLECULAIRE DU SUBSTRAT	6
III - SPECIFICITE LIEE A LA NATURE DE LA LIAISON	8
IV - SPECIFICITE LIEE A L'ENVIRONNEMENT DE LA LIAISON	8
V - CONCLUSIONS	12
 <u>PROPRIETES GENERALES DES HEXOSAMINIDASES</u>	 13
 1 - <u><math>\beta</math>-N-ACETYLHEXOSAMINIDASES</u>	 14
I - REPARTITION	14
II - PREPARATION DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES	14
III - LES ISOENZYMES	18
IV - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES	20
V - PROPRIETES ENZYMATIQUES DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES	20
A - INFLUENCE DU PH	23
B - NATURE DU SUBTRAT	23
C - LES EFFECTEURS	29
VI - INTERETS BIOLOGIQUES DES HEXOSAMINIDASES	32
VII - CONCLUSIONS	33
 2 - <u><math>\alpha</math>-N-ACETYLHEXOSAMINIDASES</u>	 34
I - REPARTITION	34
II - ISOLEMENT DES ENZYMES	34
III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	34
IV - PROPRIETES ENZYMATIQUES	36
A - INFLUENCE DU PH	36
B - INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT	36

C - INFLUENCE DES EFFECTEURS	36
V - CONCLUSIONS	36
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	37
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	38
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	40
<u>1 - METHODES ANALYTIQUES</u>	40
I - MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE A L'AIDE D'HETEROSIDES DE SYNTHESE	40
II - MESURE DU POUVOIR REDUCTEUR	43
III - METHODE SPECIFIQUE DE DOSAGE DES N-ACETYL-HEXOSAMINES	48
<u>2 - PREPARATION DES ENZYMES</u>	49
I - $\beta$ -N-ACETYL-HEXOSAMINIDASE ISOLEE A PARTIR DE MICRO-ORGANISMES ASPERGILLUS NIGER	52
II - $\beta$ -N-ACETYL-HEXOSAMINIDASE ISOLEE A PARTIR DE VEGETAUX	53
A - $\beta$ -N-ACETYL-HEXOSAMINIDASE A PARTIR DES GRAINES GERMEES DE FENUGREC	53
III - $\beta$ -N-ACETYL-HEXOSAMINIDASES ISOLEES A PARTIR DE TISSUS ANIMAUX	59
A - ISOLEMENT DE $\beta$ -N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE A PARTIR DE RATE DE BOEUF	59
B - $\beta$ -N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE DU FOIE DE BOEUF	61
<u>3 - STRUCTURE DES SUBSTRATS UTILISES AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE</u>	61
<u>4 - L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE</u>	64
I - CINETIQUES DE CONCENTRATION EN ENZYME ET EN SUBSTRAT	64
II - DETERMINATION DU PH OPTIMUM	69
III - ACTION DE LA TEMPERATURE	69
IV - ACTION DES EFFECTEURS	69
V - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS	70

<u>RESULTATS</u>	71
1 - <u>PURIFICATION DES <math>\beta</math>-N-ACETYL-HEXOSAMINIDASES</u>	71
I - PURIFICATION DE LA $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE ISOLEE DE L'ASPERGILLUS NIGER	71
II - PURIFICATION DE LA $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE ISOLEE DES GRAINES GERMEES DE FENUGREC	74
III - PURIFICATION DE LA $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE ISOLEE DE LA FEVE JACK	74
IV - PURIFICATION DE LA $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE ISOLEE DE LA RATE DE BOEUF	79
V - CONCLUSIONS	79
2 - <u>CINETIQUES D'HYDROLYSES ENZYMATIQUES</u>	85
I - DETERMINATION DU PH OPTIMUM	85
II - ACTION DE LA TEMPERATURE	85
III - CINETIQUE DE CONCENTRATION EN ENZYME	90
IV - CINETIQUE DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT	90
V - ACTION DES EFFECTEURS	93
A - ACTION DES CATIONS	93
B - ACTION DES INHIBITEURS	96
3 - <u>SPECIFICITE ENZYMATIQUE</u>	
I - ACTION SUR LES HETEROSIDES DE SYNTHESE	
A - ACTION SUR LE P-NITROPHENYL- $\alpha$ -D-GLUCOSAMINIDE ET SUR LE P-NITROPHENYL- $\alpha$ -D-GALACTOSAMINIDE .	
B - ACTION SUR LE P-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDE ET SUR LE P-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GALACTOSAMINIDE	
II - ACTION SUR LES OSIDES DE STRUCTURE VARIABLE	
A - INFLUENCE DE LA NATURE DE LA LIAISON	
B - INFLUENCE DE LA TAILLE DU SUBSTRAT	
III - ACTION SUR UN GLYCOPEPTIDE ISOLE DE L'OVOMUCOIDE	
IV - CONCLUSIONS CONCERNANT LA SPECIFICITE ENZYMATIQUE	

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

## I N T R O D U C T I O N

Dans une première série de travaux qui ont fait l'objet de notre Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie, nous avons isolé, à partir des graines germées de Fenugrec, une nouvelle N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase.

L'emploi de cette enzyme dans l'étude de la structure du dilactaminyllacto-N-tétraose isolé du lait de Femme par GRIMMONPREZ (1) a révélé qu'elle était sans action sur ce substrat, contrairement à la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase du foie de Boeuf qui libère quantitativement le résidu de N-acétyl-D-glucosamine présent dans l'hexaose.

Cette observation nous a amené à entreprendre d'une manière systématique une seconde série de recherches sur la spécificité de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origines diverses dont les résultats sont rassemblés dans le présent mémoire. Ils portent sur les 5 N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases dont nous avons étudié l'action sur des oligosaccharides dans lesquels la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine était conjuguée par différents types de liaisons : 1,2 - 1,3 - 1,4 et 1,6.

Les résultats que nous avons obtenus à propos des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases, associés à des recherches effectuées parallèlement sur d'autres glycosidases (et  $\beta$ -D-galactosidases,  $\alpha$ -D-mannosidases,  $\alpha$ -L-fucosidase) nous ont permis de participer, dans le cadre d'un travail d'équipe, à la détermination de la structure de 17 oligosaccharides d'origines diverses. Ils ont été rassemblés dans les mémoires suivants :

1 - S. BOUQUELET - Résultats préliminaires sur l'isolement de quelques glycosidases. Application à un hexaose isolé du lait de Femme. D.E.A. de Biochimie, Lille, 1969.

2 - L. GRIMMONPREZ, S. BOUQUELET, B. BAYARD, G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL - Détermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de Femme : le dilactaminyllacto-N-tétraose, Eur. J. Biochem., 1970, 13, 484.

3 - B. BAYARD, B. FOURNET, S. BOUQUELET, G. STRECKER, G. SPIK et J. MONTREUIL - Etude sur les Glycoprotéines XLIX. Isolement et structure des oligosaccharides de la fraction neutre des acétolysats des glycopeptides de l'ovomucofde Carbohydr. Res. (sous presse).

<p>GENERALITES SUR LA SPECIFICITE</p> <p>DES GLYCOSIDASES</p>
---

De nombreux auteurs ont montré que les neuraminidases, les fucosidases, les galactosidases, les mannosidases et les hexosaminidases possédaient une spécificité d'action plus ou moins large liée à différents facteurs que nous allons étudier.

### I - SPECIFICITE LIEE A L'ORIGINE DE L'ENZYME

Des différences d'activité enzymatique entre plusieurs sources d'une même enzyme peuvent se retrouver pour la plupart des glycosidases.

Ainsi MURAMATSU et EGAMI (1a) signalent que la vitesse d'hydrolyse par la  $\beta$ -galactosidase d'Escherichia coli de quatre  $\beta$ -galactosyl-glucose suit l'ordre  $1 \rightarrow 6 \rangle 1 \rightarrow 4 \rangle 1 \rightarrow 3 \rangle 1 \rightarrow 2$ , tandis que l'ordre est inversé avec la  $\beta$ -galactosidase du petit intestin de Veau :  $1 \rightarrow 2 \rangle 1 \rightarrow 3 \rangle 1 \rightarrow 4 \rangle 1 \rightarrow 6$ .

DRZENIEK (2) a montré que la neuraminidase de Vibrio cholerae peut hydrolyser les liaisons  $2 \rightarrow 3$  et  $2 \rightarrow 6$ , tandis que la neuraminidase des myxovirus hydrolyse les liaisons  $2 \rightarrow 6$  beaucoup plus lentement que les liaisons  $2 \rightarrow 3$  sialyl. Ces résultats ont été vérifiés par KHORLIN et al. (3) pour les neuraminidases de V. cholerae et du virus de l'Influenza. Même parmi les neuraminidases des myxovirus des différences apparaissent puisque celle du virus de la maladie de Newcastle coupe les liaisons  $2 \rightarrow 8$  d'un disialylactose, alors que celle du virus de la peste aviaire ne l'hydrolyse que très lentement (DRZENIEK et GAUHE (4)).

A l'intérieur d'un même organe, deux groupes de la même enzyme peuvent avoir des activités différentes WIEDERSCHAIN et ROSENFELD (5) ont isolé du rein de Porc deux formes de  $\alpha$ -L-fucosidase, dont l'une peut libérer 36 p.100 du fucose du lacto-N-fucopentaose III, par exemple, alors que la seconde est sans action sur ce polysaccharide.

## II - SPECIFICITE LIEE A LA MASSE MOLECULAIRE DU SUBSTRAT

On rencontre des glycosidases qui n'agissent pas indifféremment sur des substrats de masse moléculaire différente. Certaines hydrolysent les petites molécules et sont sans action sur les macromolécules, et au contraire, d'autres sont actives sur ces macromolécules sans hydrolyser les substrats les plus simples.

### A - HYDROLYSE DE SUBSTRAT DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE

On peut citer, par exemple, les  $\beta$ -galactosidases du cerveau de Lapin qui hydrolysent les o- et p- nitrophényl- $\beta$ -D-galactosides et le lactose, mais non le galactosylgalactosylglucosylcéramide ni le galactosylglucosyl-céramide (JUNGALWALA et ROBINS) (6).

WIEDERSCHAIN et ROSENFELD (7) à l'aide d'une préparation de  $\alpha$ -L-fucosidase de rein de Porc éliminent le fucose des fragments de substances de groupe sanguin A + H de différentes masses moléculaires, mais cette enzyme n'a aucun effet sur les substances à l'état natif.

L'influence de l'encombrement stérique sur l'hydrolyse enzymatique est encore mise en évidence par JONES et BALLOU (8). L' $\alpha$ -D-mannosidase extracellulaire de Anthrobacter GJM-1 mise en présence de la mannane de Saccharomyces cerevisiae laisse un "core" contenant des liaisons  $\alpha$ 1-6, bien que l'enzyme hydrolyse des oligosaccharides comportant ce type de liaison.

### B - HYDROLYSE DE SUBSTRATS A MASSES MOLECULAIRES ELEVEES

Sans atteindre la taille des macromolécules, des différences de vitesse d'hydrolyse de trois oligomannosides par une mannanase extraite des graines germées de Phoenix sont observées par COURTOIS et LE DIZET (9), la vitesse croissant avec la masse moléculaire (voir Tableau I, p. 7).

WATKINS (10) dans un extrait de Trichomonas foetus et plus récemment AMINOFF et FURUKAWA (11) à partir de Clostridium perfringens ont mis en évidence une fucosidase agissant sur des glycoprotéines à activité de groupe sanguin, mais sans action sur de simples méthyl ou nitrophényl fucosides. Il est important d'avoir ce fait présent à l'esprit car de telles enzymes ne peuvent être mises en évidence par la

T A B L E A U I

Pourcentage d'hydrolyse d'oligomannosides par une préparation enzymatique de graines germées de Phoenix (COURTOIS et Le DIZET)(12)

Substrats	Durée de la réaction à 37°C	
	1 jour	3 jours
Phényl- $\beta$ -D-mannoside	1,3	3,9
$\beta$ -mannobiose (1 — 4)	7,2	8,7
$\beta$ -mannotriose (1 — 4)	10,7	14,1
$\beta$ -mannotétraose (1 — 4)	16,0	25,0



mesure classique de l'activité enzymatique à l'aide d'hétérosides de synthèse.

### III - SPECIFICITE LIEE A LA NATURE DE LA LIAISON

Souvent, les préparations enzymatiques n'hydrolysent pas tous les types de liaisons à la même vitesse.

L' $\alpha$ -L-fucosidase de Clostridium perfringens, purifiée par AMINOFF et FURUKAWA (13) qui hydrolyse préférentiellement les liaisons  $\alpha$  1-2, en est un exemple. Le Tableau II (p. 9) indique les résultats qu'ils ont obtenus.

De même les résultats de DRZENIEK (14) sur les neuraminidases rapportés dans le Tableau III (p.10) illustrent ce fait.

Parfois les glycosidases sont totalement inactives sur certains types de liaisons.

Ainsi SUZUKI, LI et LI (15) ont isolé une  $\alpha$ -galactosidase de Mortierella vinacea qui coupe seulement les liaisons  $\alpha$  1-4 et  $\alpha$  1-6 et non les liaisons  $\alpha$  1-2 et  $\alpha$  1-3.

BAHL (16) a purifié à partir d'Aspergillus niger une 1-2- $\alpha$ -L-fucosidase. Le résumé des études de spécificité qu'il a effectuées est donné dans le tableau IV, (p. 11).

### V - SPECIFICITE LIEE A L'ENVIRONNEMENT DE LA LIAISON

Outre le type de la liaison il faut encore noter que la nature de l'ose engagé dans cette liaison peut influencer sur l'hydrolyse enzymatique. L' $\alpha$ -L-fucosidase d'Aspergillus niger (BAHL)(17) qui hydrolyse le disaccharide Fuc  $\xrightarrow{\alpha 1-2}$  Gal est inactive sur le Fuc  $\xrightarrow{\alpha 1-2}$  Fuc.

La substitution de l'ose engagé dans la liaison peut elle-même jouer un rôle important.

Alors que le 3-N-acétylneuraminyl-lactose (fig. 1) est quantitativement hydrolysé par les neuraminidases, le 3-N-acétylneuraminyl-4-acétyl-galactosaminylgalactose (fig. 2) résiste à leur action.



Figure 1

Figure 2

T A B L E A U    I I

Spécificité de l' $\alpha$ -L-fucosidase de Clostridium  
perfringens (AMINOFF et FURUKAWA)(18)

Substrats	p.100 d'hydrolyse en 5 heures
- Fuc $\xrightarrow{\alpha 1-2}$ Gal $\xrightarrow{\beta 1-4}$ Glc	79
- Gal $\xrightarrow{\alpha 1-4}$ Glc $\uparrow$ $\alpha 1-3$ Fuc	10
- Lacto-N-fucopentaose I Gal $\xrightarrow{\beta 1-3}$ GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1-3}$ Gal $\xrightarrow{\beta 1-4}$ Glc $\uparrow$ $\alpha 1-2$ Fuc	80
- Lacto-N-fucopentaose II Gal $\xrightarrow{\beta 1-3}$ GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1-3}$ Gal $\xrightarrow{\beta 1-4}$ Glc $\uparrow$ $\alpha 1-4$ Fuc	4
- Lacto-N-fucopentaose III Gal $\xrightarrow{\beta 1-4}$ GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1-3}$ Gal $\xrightarrow{\beta 1-4}$ Glc $\uparrow$ $\alpha 1-3$ Fuc	9



T A B L E A U    I I I

Pourcentages d'acide sialique libéré en 24 heures en considérant l'hydrolyse du 3-sialyllactose comme 100 p.100 (DREZNIEK)(19)

Substrats	Source de Neuraminidase		
	<u>V. cholerae</u>	Influenza A <sub>2</sub>	
		Virus	Enzyme
3-sialyllactose	100	100	100
6-sialyllactose	85	2	0



T A B L E A U IV

Spécificité de l'1-2,  $\alpha$ -L-fucosidase d'Aspergillus niger  
(BAHL)(20)

Substrats	p.100 d'hydrolyse
-2-O- $\alpha$ L-fucopyranosyl-D-galactose	100
-2-O- $\alpha$ L-fucopyranosyllactose	100
-Lacto-N-fucopentaose I (liaison $\alpha$ 1-2)	100
-3-O- $\alpha$ L-fucopyranosyllactose	0
-Lacto-N-fucopentaose III (liaison $\alpha$ 1-3)	0
-4-O- $\alpha$ L-fucopyranosyl-D-galactose	0
- Lacto-N-fucopentaose II (liaison $\alpha$ 1-4)	0



Enfin de légères modifications de l'ose hydrolysable amènent des différences dans l'action de l'enzyme.

Les neuraminidases hydrolysent généralement quantitativement les liaisons N-acétylsialyl. Au contraire, les liaisons de l'acide N-glycolyl-neuraminique sont coupées plus lentement (GIBBONS)(21). Quant à celles des acides N-O-acétylneuraminiques, elles résistent totalement à l'action des enzymes (FAILLARD)(22) ; (GIBBONS) (23).

#### V - CONCLUSIONS

Il semble donc que l'activité des glycosidases soit assez strictement liée à la structure d'un nombre restreint de substrats sur lesquels elles sont vraisemblablement appelées à agir in vivo. Il est cependant des cas où la spécificité est beaucoup plus large, puisque la  $\beta$ -D-galactosidase hydrolyse non seulement les liaisons  $\beta$ -D-galactosyl, mais encore celles des  $\beta$ -D-fucosides et celles des  $\alpha$ -L-arabinosides, composés dans lesquels l'hydroxyméthyl en C<sub>5</sub> du galactose est remplacé respectivement par le groupement méthyl et par un atome d'hydrogène.

Lorsqu'on utilise une préparation enzymatique pour étudier la structure d'un groupement polysaccharidique, il est donc important de connaître le domaine d'activité de cette enzyme afin de savoir si elle est adaptée à l'hydrolyse du substrat qu'on lui propose et de pouvoir tirer des conclusions des résultats obtenus avec le minimum de risques d'erreurs.

Les études concernant la spécificité des N-acétylhéxosaminidases sont très fragmentaires. Nous allons les exposer dans le chapitre suivant en même temps que les généralités sur ce groupe de glycosidases.

PROPRIETES GENERALES DES HEXOSAMINIDASES

Comme WALKER (24) l'a montré dans la revue générale sur les hexosaminidases, l'intérêt porté aux enzymes agissant au niveau des liaisons osaminidyles commence en 1929 avec l'étude des chitinasés par KARRER et HOFMANN (25) et GRASSMAN et al. (26), puis prend rapidement un essor avec l'étude de la structure des chondroitinés sulfatés et de l'acide hyaluronique. La dégradation des glycosaminoglycans nécessitait des enzymes à activités oligo et polysaccharidasiques, cependant leur étude a été freinée par l'absence de moyens de caractérisation des enzymes. Il a fallu attendre les travaux de NEUBERGER et PITT-RIVERS (27) pour connaître l'anomérisation des liaisons contractées par les N-acétylsamines dans les mucopolysaccharides.

Les N-acétylhexosamines les plus couramment rencontrées dans la composition des polysaccharides et des glycoprotéides étudiés au Laboratoire sont la N-acétylglucosamine ou 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et la N-acétylgalactosamine ou 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose, sous les formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$ .

Lorsque ces constituants se trouvent en position externe non réductrice dans les glycoprotéides, les exoenzymes capables d'effectuer leur libération sont appelées :

- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminidase (EC : 3.2.1.30)
- $\alpha$ -D-N-acétyl-glucosaminidase (EC : 3.2.1.(\*))
- $\beta$ -D-N-acétyl-galactosaminidase (EC : 3.2.1.(\*))
- $\alpha$ -D-N-acétyl-galactosaminidase (EC : 3.2.1.(\*))

Lorsque ces constituants se trouvent en position interne dans les glycoprotéides, les endo-enzymes qui provoquent la rupture de leur liaison sont appelées :

- Hyaluronidase : hyaluronate glycanohydrolase (EC : 3.2.1.35)
- Chitinase : poly- $\beta$ -1,4(2-acétamido-2-désoxy)-D-glucoside glycanohydrolase (EC : 3.2.1.14).

---

(\*) Le numéro d'ordre de ces enzymes n'a pas encore été défini.

## 1. - $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

### I - REPARTITION

La répartition de la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase est extrêmement large. De nombreux microorganismes ainsi que les tissus de nombreux animaux, invertébrés et vertébrés constituent une source importante de l'enzyme. Dans le Tableau V (p.15), nous avons fait figurer les différents substrats qui ont permis à de nombreux chercheurs d'isoler la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Comme la répartition de l'enzyme dans les tissus animaux dépend de la nature et de la fonction du tissu, nous avons rassemblé dans le tableau VI (p. 16) les activités de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase en fonction de l'origine du tissu. Nous pouvons remarquer que l'épididyme constitue la source enzymatique la plus riche. D'une manière générale on trouve toujours associée à l'activité de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase une activité  $\beta$ -N-acétylgalactosaminidase. Cette activité a été caractérisée par WOOLLEN et al. (28); TROHWEIN et GATT (29), MURAMATSU (30) et dernièrement par LI et LI (31) et WINCHESTER (32). Le tableau VII (p.17) rassemble les différentes sources de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. A ce sujet on ne peut pas encore, à l'heure actuelle, affirmer l'existence de deux enzymes distinctes. Selon LI et LI (33) il n'y aurait qu'une seule protéine chargée des deux activités. Il reste à savoir maintenant si cette protéine porte un ou deux sites actifs. Il est d'ailleurs recommandé, à cet effet, de dénommer les enzymes par l'appellation de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase. Les termes de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase et galactosaminidase ne sont utilisés qu'en présence de substrat bien défini : N-acétylglucosaminide ou galactosaminide.

### II - PREPARATION DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

WATANABE (34) en 1936 décrit une méthode de préparation de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase à partir du foie de Boeuf par précipitation à l'éthanol puis adsorption et élution sur colonne de kaolin. Par la suite, les méthodes de fractionnement des protéines, à savoir le fractionnement au sulfate d'ammonium, a permis à FINDLAY et LEVY (35) d'obtenir à partir de l'épididyme de Porc une enzyme purifiée 70 fois. Ces auteurs terminent la purification par précipitation à l'acétone froid. BAHL et

T A B L E A U V

Répartition de la  $\beta$  -N-acétyl-glucosaminidase

Sources	Références
<p><u>Microorganismes :</u></p> <p>Pneumocoques Type I</p> <p>Pneumocoques Type II</p> <p><u>Streptomyces griseus</u></p> <p><u>Aspergillus niger</u></p> <p><u>Aspergillus oryzae</u></p>	<p>HUGUES et JEANLOZ (36)</p> <p>ROSEMAN et DORFMAN (37)</p> <p>BERGER et REYNOLD (38)</p> <p>BAHL et AGRAWAL (39)</p> <p>MEGA, IKENAKA et MATSUSHIMA (40)</p>
<p><u>Végétaux</u></p> <p>Emulsine d'amande douce</p> <p><u>Phaseolus vulgaris</u></p> <p><u>Lycoperdon perlatum</u></p> <p>Fève Jack</p>	<p>HELPERICH et ILOFF (41)</p> <p>BAHL et AGRAWAL (42)</p> <p>POWNING et IRZYKIEWICZ (43)</p> <p>LI et LI (44)</p>
<p><u>Invertébrés</u></p> <p>Patelle (<u>Patella vulgata</u>)</p> <p><u>Turbo cornutus</u></p> <p><u>Charonia lampas</u></p>	<p>CONCHIE, LEVY et MARSH (45)</p> <p>MURAMATSU (46)</p> <p>MURAMATSU et EGAMI (47)</p>
<p><u>Vertébrés</u></p> <p>Tissus de Rat, Porc, Veau et Boeuf</p> <p>Venin de serpent (<u>Crotalus atrox</u>)</p>	<p>VIKHA et al. (48)</p> <p>WATANABE (49)</p> <p>CONCHIE, FINDLAY et LEVY (50)</p> <p>WEISSMANN, HADJIIOANNOU et TORNHEIM (51)</p> <p>FROHWEIN et GATT (52)</p> <p>LEABACK et WALKER (53)</p> <p>EAST, MADINAVEITIA et TODD (54)</p>

T A B L E A U VI

Répartition de la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase dans les  
tissus de mammifères

Organes	Activité (a)	Références
Epididyme de Porc	23.10 <sup>5</sup>	WOOLEN-WALKER et HEYWORTH (55)
Epididyme de Rat	291	CONCHIE, FINDLAY et LEVY (56)
Glande sous-maxillaire de Rat	41 (b)	
Rein. de Rat	126	
Thyroïde de Rat	25 (b)	
Foie de Rat	45	
Rate de Rat	8 (b)	
Testicules de Rat	18	
Ovaires de Rat	26	

(a) L'activité est exprimée en  $\mu$ g d'aglycone libéré par milligramme de tissu frais en une heure.



(b) Le substrat utilisé est le phényl-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucoside au lieu du p-nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucoside.

T A B L E A U VII

Répartition de la  $\beta$ -N-acétyl-galactosaminidase dans différents  
tissus (WOOLEN, WALKER et HEYWORTH) (57)

Préparations enzymatiques	Activité spécifique de la $\beta$ -N-acétyl- glucosaminidase	Activité spécifique de la $\beta$ -N-acétyl- galactosaminidase
<u>Sérum de Femme</u>		
enceinte 6 semaines	47	6
enceinte 24 semaines	159	18
Epididyme de Porc	$23 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
Testicule de Bélier	314	68
<u>Tissus de Rat</u>		
Rein	16	1,9
Foie	5,3	0,8
Rate	4,8	0,8
Epididyme	103	10,8
<u>Helix pomatia</u>	72,7	33,1
<u>Patella vulgata</u>	13,4	5,4
<u>Lycoperdon pyriforma</u>	460	320
Pneumocoque Type III	348	45

L'activité est exprimée en  $\mu$ g de p-nitrophénol libéré par unité  
enzymatique de la source indiquée.



AGRAWAL (58) continuent le fractionnement au sulfate d'ammonium et la chromatographie sur D.E.A.E. Sephadex. Ils obtiennent une enzyme purifié 600 fois après une nouvelle chromatographie sur gel de dextran. HUGHES et JEANLOZ (59) emploient le procédé inverse, ils passent d'abord sur gel de dextran puis ensuite sur D.E.A.E.-cellulose. L'ensemble de ces méthodes a permis à SANDHOFF et WASSLE (60) de purifier l'enzyme du Foie humain 2 à 4000 fois. A ces méthodes LI et LI (61) ont associé une précipitation de l'enzyme de la Fève Jack à son point isoélectrique. Le pHi de la protéine avait été déterminé au préalable par électrofocalisation (LI et LI)(62). Ces auteurs, de cette manière, ont réussi, pour la première fois, à cristalliser la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase.

A côté de ces méthodes traditionnelles, les auteurs emploient de plus en plus les méthodes du fractionnement cellulaire. Cette méthode a permis à FROHWEIN et GATT (63) de préparer les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases du cerveau de Veau par centrifugation différentielle sur gradient de sucrose. Cette méthode est utilisée surtout pour la préparation des enzymes de lysosomes (DE DUVE et al.)(64), (BACCINO et ZURETTI)(65). C'est grâce à cette méthode que l'on a pu caractériser les isoenzymes.

Signalons enfin que dans un avenir proche, il sera possible de purifier les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases par chromatographie d'affinité. Des méthodes ont déjà été proposées pour la purification de la neuraminidase de Vibrio cholerae, de Clostridium perfringens et du virus de l'influenza par CUATRECASAS et ILLIANO (66). De même STEERS, CUATRECASAS et POLLARD (67) ont proposé une méthode similaire pour la purification de la  $\beta$ -D-galactosidase d'Escherichia coli.

### III - LES ISOENZYMES

La structure d'une enzyme varie selon son origine. Mais une diversité de structure peut également apparaître pour certaines enzymes chez différents individus de la même espèce ou suivant les organes d'un même individu. On les désigne par le terme "isoenzymes" ou "isozymes". Leurs molécules ne présentent que de légères différences structurales, elles possèdent souvent (mais pas toujours), la même activité et la même spécificité. On peut les différencier par leur migration électrophorétique, leur pH optimal, leur comportement vis-à-vis des inhibiteurs et activateurs. Elles peuvent être

également identifiées par les méthodes immunologiques.

L'existence d'isoenzyme de la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase a été mis en évidence dans différents tissus. CAYGILL et al. (68) ont montré pour la première fois que la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée du testicule de Bélier était séparée en deux pics après chromatographie sur CM-cellulose. Ces résultats ont été plus récemment confirmés par WINCHESTER (69) qui, grâce à l'électrofocalisation, a mis en évidence 3 à 4 formes différentes de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Par électrophorèse sur gel d'amidon, ROBINSON et STIRLING (70) caractérisent, à partir de la rate humaine deux formes A et B distinctes de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Ces deux formes possèdent des caractéristiques enzymatiques identiques, mais la forme A est la plus sensible aux variations du pH et de la température. En outre, la forme A est une glycoprotéine renfermant de nombreux acides sialiques. L'élimination de 12 molécules d'acides sialiques permet de passer de la forme A à la forme B de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. On peut supposer que la forme A est une glycoprotéine renfermant jusqu'à douze chaînes polysaccharidiques terminées chacune par un acide sialique. D'autre part, la localisation des deux enzymes est différente, la forme B n'est présente que dans les lysosomes. La forme A se retrouve dans les lysosomes et dans la solution cytoplasmique. Selon EYLAR (71) la glycosylation de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase s'effectue lors du passage de l'enzyme à travers la membrane lysosomale. Cette même forme A présente au niveau des membranes pourrait servir de site de reconnaissance pour le transport des composés renfermant de la N-acétylosamine. Ces hypothèses ont déjà été exprimées par FISHMAN et al. (72) pour les  $\beta$ -glucuronidases.

Ces deux formes A et B ont été retrouvées dans le rein humain par DANCE et al. (73) qui ont réussi à préparer les isoenzymes par chromatographie sur DEAE-cellulose et a montré que la forme A représente 74 p.100 de l'activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminidasique totale et que la forme B ne représente que 26 p.100.

L'intérêt des deux formes A et B des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidasés ne fait qu'augmenter depuis que les travaux de SANDHOFF (74), SANDHOFF et WASSLE (75) ont montrés que la forme A était absente dans la maladie du Tay-Sachs. L'absence de cette forme A de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase serait responsable de l'accumulation du ganglioside GM<sub>2</sub> que la forme B ne peut dégrader. On est amené à penser que la forme A serait porteuse de deux activités  $\beta$ -N-acétylhexosaminidasiques puisque le ganglioside

GM<sub>2</sub> possède une N-acétylgalactosamine en position terminale non réductrice. La forme B ne porterait que la seule activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase.

D'autre part, DANCE et al. (76) ont caractérisé dans l'urine la seule forme A, ils ont montré que dans le cas de maladie rénale la forme B faisait son apparition dans l'urine. DANCE, PRICE et ROBINSON (77) ont mis au point une technique permettant le dosage de ces deux formes.

Enfin, une troisième forme de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase a été mise en évidence par STIRLING (78) dans le sérum de Femme enceinte. Cette forme appelée P présente une mobilité électrophorétique très faible, nettement différente des deux autres formes A et B. Nous avons dans le tableau VIII (p. 21) rassemblé quelques propriétés des "isoenzymes".

L'activité de ces isoenzymes sur des substrats naturels n'a pas été étudiée. Seuls jusqu'à présent, TARENTINO et MALEY (79) ont analysé le comportement des isoenzymes de l'oviducte de Poule et ont mis en évidence des propriétés enzymatiques différentes lors de l'hydrolyse d'un N-acétylchitotétraose.

#### IV - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

La nature glycoprotéidique des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases a été démontrée par ROBINSON et STIRLING (80) pour l'enzyme de la rate humaine et par MEGA, IKENAKA et MATSUSHINA (81) pour l'enzyme d'Aspergillus oryzae. Par ailleurs, nos connaissances concernant les propriétés physico-chimiques des N-acétylhexosaminidases sont très fragmentaires et disparates ; ainsi les valeurs de masse moléculaire proposées par les auteurs sont comprises entre 50.000 et 160.000.

Nous avons rassemblé dans le tableau IX (p. 22) quelques résultats obtenus.

#### V - PROPRIETES ENZYMATIQUES DES $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

L'action des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases dépend de nombreux facteurs, en particulier :

- du pH de la réaction,
- de la nature du substrat,
- des effecteurs.

T A B L E A U VIII

Propriétés de quelques isozymes de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase  
d'origines diverses

Origine de l'enzyme	pH optimum d'activité	Point isoélectrique	masse moléculaire	Auteurs
Epididyme de Bélier	5,2	7,0 6,3 5,8 5,4 3,4		WINCHESTER (82)
Foie humain A B	4,7 - 4,8 4,0	5 7,3	130.000 130.000	SANDHOFF et WASSLE (83)
Rate humaine A B	4,5 - 5,0 4,5 - 5,0	Acide Basique		ROBINSON et STIRLING (84)
Cerveau humain A B		5 7,3		SANDHOFF (85)
Testicule de Mouton A B		6,0 6,3		WINCHESTER, CAFFREY et ROBINSON (86)
Oviducte de Poule I II	4,2 - 4,5	7,05 6,86 - 6,45	118.000 158.000	TARENTINO et MALEY (87)



T A B L E A U IX

Valeurs des masses moléculaires des  $\beta$ -N-acétyl-  
glucosaminidases données par différents auteurs.

Sources	Masses moléculaires	Références
Foie humain A	130.000	SANDHOFF et WASSLE (88)
B	130.000	
Foie de Boeuf	50.000	WEISSMANN <u>et al.</u> (89)
Oviducte de Poule I	113.000	TARENTINO et MALEY (90)
II	152.000	
Fève Jack	100.000	LI et LI (91)
<u>Aspergillus oryzae</u>	140.000	MEGA <u>et al.</u> (92)



## A - INFLUENCE DU PH

Le PH optimum d'hydrolyse des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases varie entre pH 4,2 et 7,2. Dans le tableau X (p. 24), nous avons rassemblé les variations du pH optimum en fonction de l'origine de l'enzyme. La stabilité des hexosaminidases est aussi fonction du pH de la solution. Ainsi la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée de Phaseolus vulgaris perd 50 p.100 de son activité en une heure dans une solution dont le pH est de 3,5. L'enzyme isolée à partir de l'épididyme est stable 1 heure à 37°C en tampon citrate de pH 3,5 à 7,5 mais est complètement inactivée en dehors de ces limites. D'une manière générale la solution de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase sera ajustée à un pH supérieur à 4. Signalons cependant qu'il ne faut jamais conserver une solution enzymatique à un pH voisin de son pH optimum d'action à cause de l'autodégradation de l'enzyme dans ces conditions.

## B - NATURE DU SUBSTRAT

Les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases possèdent une activité spécifique vis-à-vis de l'aglycone pour des substrats synthétiques et vis-à-vis des substrats naturels.

### 1 - SPECIFICITE ENVERS L'AGLYCONE

Les informations concernant la spécificité des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases sont fragmentaires. Elles peuvent être résumées de la manière suivante :

a - La spécificité est absolue pour les liaisons  $\beta$ -glycosidiques.

b - Les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases hydrolysent aussi bien les alkyles que les aryyles  $\beta$ -N-acétylglucosaminides. Pour ces derniers, la vitesse d'hydrolyse est fonction du degré de substitution du noyau benzénique (BOROOAH, LEABACK et WALKER)(92).

Le groupement N-acétyl est toutefois indispensable ; en effet, les  $\beta$ -N-propionyl,  $\beta$ -N-butiryl et le  $\beta$ -N-(toluène-p-sulfonyl)-glucosaminides ne sont pas hydrolysés par l'enzyme à l'exception toutefois du méthyl- $\beta$ -N-formyl-glucosaminide qui est rapidement hydrolysé (NEUBERGER et PIT-RIVERS)(93).

T A B L E A U X

Variations du pH optimum de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase  
isolée à partir de différentes sources.

Origine de l'enzyme	Substrats hydrolysés	pH optimum	Références
Epididyme de Porc	Phénol	4,2	FINDLAY et LEVY (94)
	p-N-p (*)	4,2	
Rein de Rat	Phénol	4,3	PUGH, LEABACK et WALKER (95) WALKER, WOOLLEN et HEYWORTH (96)
	p-N-p	4,4-4,5	
Testicule de Bélier	Phénol	4,4	BOROOAH, LEABACK et WALKER (97)
	p-N-p	4,5	
	o-N-p (**)	4,8	
Foie de Boeuf	p-N-p	4,5	WEISSMANN <u>et al.</u> (98)
<u>Turbo cornutus</u>	p-N-p	4,0	MURAMATSU (99)
Pneumocoque type I	p-N-p	5,3	HUGHES et JEANLOZ (100)
<u>Trichomonas foetus</u>	p-N-p	7,0-7,2	WATKINS (101)
<u>Streptomyces griseus</u>	Phénol	6,3	BERGER et REYNOLD (102)
<u>Aspergillus oryzae</u>	Phénol	4 - 5	MEGA <u>et al.</u> (103)
<u>Phaseolus vulgaris</u>	p-N-p	4,6	BAHL et AGRAWAL (104)
Fève Jack	p-N-p	4,2-6,5	LI et LI (105)

(\*) p-N-p : para-nitrophénol

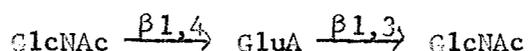
(\*\*) o-N-p : ortho-nitrophénol



c - Les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases hydrolysent les substrats synthétiques renfermant de la N-acétylgalactosamine. En effet, en 1961, WOOLEN, WALKER et HEYWORTH (106) ont remarqué que dans un grand nombre de préparations enzymatiques il était impossible de séparer les deux activités  $\beta$ -N-acétylglucosaminidasique et galactosaminidasique. Depuis, de nombreux auteurs ont fait les mêmes remarques. Il faut cependant signaler que les préparations sont généralement plus actives vis-à-vis des N-acétylglucosaminides que des galactosaminides. Nous avons dans le Tableau XI (p. 26) rassemblé des valeurs de la constante de Michaelis de quelques N-acétylglucosaminidases vis-à-vis de substrat synthétique. Nous pouvons remarquer qu'il existe des différences d'affinité selon l'aglycone utilisé. Cette propriété peut être le reflet de la stabilité de la liaison contractée entre le monosaccharide et l'aglycone. Cette propriété se retrouvera d'ailleurs au moment de l'hydrolyse de produits naturels.

## 2 - SPECIFICITE VIS-A-VIS DES SUBSTRATS NATURELS

LINKER, MEYER et HOFFMAN (109) ont montré que les di- et tétrasaccharides renfermant de la D N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice sont totalement hydrolysés par une enzyme isolée du Foie de Boeuf. Ces résultats sont confirmés par WEISSMANN et al. (110) pour le trisaccharide suivant :



Par contre le trisaccharide n'est pas hydrolysé par les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases isolées du Pneumocoque ou de l'Emulsine d'amande. De même FROHWEIN et GATT (111) ont confirmé par la suite l'existence d'une spécificité d'action; Le tableau XII (p. 27) nous montre les résultats obtenus par ces auteurs. Cette spécificité d'action est en fait beaucoup plus liée à l'origine de la source enzymatique qu'à la nature du substrat. Plus récemment VIKHA et al. (112) ont mis en évidence la spécificité de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée de l'Épididyme de Porc vis-à-vis du type de la liaison à hydrolyser. Nous avons rassemblé dans le tableau XIII (p. 28) les résultats qu'ils ont obtenus. D'après ces auteurs l'ordre d'affinité décroissante de l'enzyme est la suivante : liaison 1,6, 1,3 et 1,4.

## T A B L E A U X I

Constante de Michaelis d'hexosaminidases d'origines différentes  
vis-à-vis des phényl et p-nitrophényl 2-amino-2 déoxy- $\beta$ -D-hexosaminidas

$K_M$ $m_M$		Origine de l'enzyme	Références
P Glu(*)	(**) p-N-P Glu		
1,3	0,7	Rein de Rat	WALKER, WOOLLEN et HEYWORTH (112)
2,9	1,2	Testicule de Bélier	WOOLLEN, HEYWORTH et WALKER (113)
0,7	0,4	Epididyme de Rat	FINDLAY, LEVY et MARSH(114)
-	0,47	<u>Phaseolus vulgaris</u>	BAHL et AGRAWAL (115)
-	0,22	Pneumocoque Type I	HUGHES et JEANLOZ (116)
-	0,66	<u>Aspergillus niger</u>	BAHL et AGRAWAL (117)
-	0,64	Fève Jack	LI et LI (118)
1,8	0,85	<u>Aspergillus oryzae</u>	MEGA, IKENAKA et MATSUSHIMA (119)
P.Gal (***)	P-N-P Gal (****)		
1,0	0,4		
1,2	0,3	Testicule de Bélier	WOOLLEN, HEYWORTH et WALKER (121)
-	0,31	Fève Jack	LI et LI (122)
5,0	-	<u>Aspergillus oryzae</u>	MEGA, IKENAKA et MATSUCHIMA (123)

(\*) phényl-2-amino-2-déoxy- $\beta$ -D-glucosaminide

(\*\*) p-nitrophényl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosaminide

(\*\*\*) phényl-2-amino-2-déoxy- $\beta$ -D-galactosaminide

(\*\*\*\*) p-nitrophényl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-galactosaminide



T A B L E A U    X I I

Spécificité des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases isolées du cerveau  
de Veau selon FROHWEIN et GATT (124)

Substrats	Pourcentage d'hydrolyse		
	1	2	3
p-N-P Glu (a)	100	100	100
p-N-P Gal (b)	22	4	100
P-Glu (c)	54	100	85
Lacto-N-triose (d)	7	5	6,5
Chitobiose (e)	0,25	0,3	0,7
Disaccharide (f)	0,13	0,1	0,17

- 1 -  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase  
 2 -  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase  
 3 -  $\beta$ -N-acétylgalactosaminidase

- a - para-nitrophenyl-2-acétamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosaminide  
 b - para-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galactosaminide  
 c - phényl-2-acétamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucosaminide  
 d - GlcNAc- $\beta$ -1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Glc  
 e - GlcNAc- $\beta$ -1,4-GlcNAc  
 f - GlcNAc- $\beta$ -1,4-acide muramique



T A B L E A U XIII

Spécificité de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée à partir de l'épididyme de Porc selon VIKHA, KAVERZNEVA et KHORLIN(125).

Substrats	$K_M$ mM	V max M/sec/mg de protéine
GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,4}$ GlcNAc	33,0	0,36
GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,3}$ GlcNAc	17,0	0,15
GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,6}$ Glc	3,3	0,016
GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,3}$ Glc	12,5	0,014
GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,6}$ Gal	6,7	0,018



Signalons enfin que : TARENTINO et MALEY (126) ont mis en évidence une différence de spécificité des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases A et B isolées de l'oviducte de Poule vis-à-vis d'un tétra-N-acétylchitotetraose. Par contre, d'autres auteurs comme HUCHES et JEANLOZ (127) ; CAYGILL, ROSTON et JEVONS (128) ; BAHL et AGRAWAL (129) et MURAMATSU (129) ont signalé qu'il n'existait pas de spécificité enzymatique vis-à-vis du substrat. Ces résultats sont encore trop fragmentaires et contradictoires pour pouvoir se prononcer définitivement sur les variations de spécificité enzymatique en fonction de la nature du substrat.

## C - LES EFFECTEURS

### 1 - LES ACTIVATEURS

Les cations bivalents ne semblent pas avoir d'action directe sur l'enzyme purifiée. Il apparaît, à la vue du tableau XIV, p. 30 que la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase n'est pas une métalloprotéine. Il existe, par contre, d'autres composés qui activent l'enzyme.

D'une part, MURAMATSU (130), montre que l'osidase isolée du foie de Turbo-cornutus est activée par le chlorure de sodium. On aurait pu penser à un cas particulier, car le Turbo cornutus est un gastéropode marin, mais FINDLAY et LEVY (131), WEISSMAN et al. (132) observent la même action pour les enzymes isolées de l'épididyme du Porc et du foie de Boeuf.

D'autre part, on sait que l'albumine augmente la vitesse de réaction, mais ce n'est pas un "activateur vrai" car elle stabilise l'enzyme et diminue la perte d'activité spécifique qu'entraîne la dilution.

### 2 - LES INHIBITEURS

Nous pouvons voir dans le Tableau XV (p. 31) que l'action de l'EDTA n'entraîne pas une inhibition de l'enzyme. Par contre, la N-acétyl-glucosamine et ses dérivés, les tampons acétates et les sels de métaux lourds entraînent une inhibition.

T A B L E A U X I V

Action des différents ions sur l'activité des  $\beta$ -N-acétyl-  
glucosaminidases d'origines diverses

Nature des ions	Pourcentage d'activité résiduelle			
	Pneumocoque Type I (1)	Turbo cornutus (2)	Fève Jack (3)	Foie de Boeuf (4)
Mg <sup>++</sup>	84	102	85	74
Ca <sup>++</sup>	82	105	90	91
Zn <sup>++</sup>		95	93	
Na <sup>+</sup>		100		78
Cd <sup>++</sup>	34			77
Mn <sup>++</sup>			82	84
Co <sup>++</sup>				
Hg <sup>++</sup>	21		0	0
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>			50	
EDTA (5)	100	63		97
pCMB (6)		84		
N-acétylglucosamine			88	

(1) HUGHES et JEANLOZ (133)

(2) MURAMATSU (134)

(3) LI et LI (135)

(4) LANGLEY et JEVONS (136)

(5) Sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique

(6) Para-chloromercuribenzoate de sodium



T A B L E A U XV

Constante d'inhibition de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase selon WALKER (137)

Origine de l'enzyme	N-acétylglucosamine (mM)	N-acétylgalactosamine (mM)	N-acétylglucosami- nonolactone ( $\mu$ M)	N-acétylgalactosa- minonolactone ( $\mu$ M)
Rein de Rat	3,1	0,4	0,7	0,5
Epididyme de Rat	-	-	0,09	0,4
Testicule de BÉLIER	5,2	2,5	3,7	1,2
Patelle ( <u>Patella</u> <u>vulgata</u> )	-	-	4,0	32

### a - La $\beta$ -N-acétyl-glucosamine et ses dérivés

L'hydrolyse des  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminides est inhibée de manière compétitive par la N-acétyl-glucosamine libre. Ceci est très important car il y a nécessité au cours de l'hydrolyse d'éliminer la N-acétyl-glucosamine au fur et à mesure de sa libération. FINDLAY, LEVY et MARSH (138), dans la poursuite des travaux de LEVY (139) et de CONDHIE et LEVY (140) sur l'inhibition des osidases par les aldono-lactones correspondantes ont synthétisé la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminolactone (2-acétamido-2-désoxy-D-gluconolactone) et ont remarqué que la lactone est un inhibiteur compétitif.

Ces travaux ont été confirmés par la suite par LEABACK (141) Nous avons dans le tableau XV (p. 31) rassemblé quelques valeurs de la constante d'inhibition en fonction de différents inhibiteurs.

### b - Action des tampons acétate

PUGH, LEABACK et WALKER (142) montrent que la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase est inhibée par les tampons acétate. L'inhibition est compétitive, l'acétate formerait un complexe inactif avec l'enzyme, dû probablement à la grande affinité et à la haute spécificité de l'enzyme envers les groupements acétyls.

### c - Action des métaux

Certains métaux possèdent la propriété d'inhiber l'action de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Parmi ces métaux nous citerons le par-chloromercuribenzoate, le nitrate d'argent et l'iodoacétamide qui selon FROHWEIN et GATT (143) inhibent l'enzyme du cerveau de Veau. HUGHES et JEANLOZ (144) remarquent une inhibition de l'enzyme par les sels de mercure et de cadmium, ce qui indique le rôle important d'une fonction thiol dans le site actif de l'enzyme.

## VI - INTERET BIOLOGIQUE DES HEXOSAMINIDASES

Le dosage de l'activité de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase d'un point de vue biologique peut être intéressant. WALKER, WOOLLEN et PUGH (145) ont montré que les taux de l'enzyme sont identiques dans le sérum de l'Homme et de la Femme, mais que, chez la Femme, le taux augmente régulièrement pendant la grossesse et diminue rapi-

dement pour atteindre un taux normal après l'accouchement. Il semble donc que la quantité d'enzyme soit sous la dépendance d'un contrôle hormonal. CONCHIE et FINDLAY (146), pour leur part, ont remarqué que chez le Rat, le taux de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase diminue après la castration et que le taux redevient normal après injection de testostérone ou d'oestrogènes. Quant à WOOLLEN et TURNER (147), ils ont montré que le taux de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase du plasma variait, au cours du diabète, de façon synchrone avec le taux de glucose sanguin. Ces auteurs ont, aussi mis en évidence une augmentation du taux de la  $\beta$ -N-acétyl-glycosaminidase au cours d'infarctus du myocarde. Toujours selon ces auteurs, au cours de l'hépatite infectieuse, des carcinomes du poumon, de l'estomac, du pancréas et de la prostate, on observe une augmentation du taux de l'enzyme. L'enzyme semble donc être en rapport direct avec la modification de structure des glycoprotéides tissulaires.

Comme nous l'avons vu page 19 l'absence de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase ou de l'une de ses formes (forme A) est la cause des maladies héréditaires graves, comme la maladie du Tay-Sachs par exemple. Le dépistage de certaines maladies rénales peut être réalisé selon DANCE et al. (148) par l'identification de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase dans les urines.

## VII - CONCLUSIONS

Il apparaît une grande diversité dans les propriétés des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases selon leur origine. En particulier, on note que le pH optimum varie dans de larges proportions et que les masses moléculaires avancées par les auteurs ne sont pas identiques. On peut penser que selon leur origine, les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases ne possèdent pas toutes une structure semblable et on peut s'attendre à ce que leur action diffère également.

Les difficultés d'isolement proviennent principalement de la complexité des milieux d'extraction, de la similitude des propriétés physico-chimiques des glycodidases, de l'existence d'isozymes, du risque de la diminution d'activité enzymatique au cours du fractionnement, l'enzyme étant sensible au pH et à la température. De plus la stabilité de l'enzyme diminue avec son degré de pureté. A côté de ces problèmes il existe aussi celui de savoir si les deux activités  $\beta$ -N-acétyl-glycosaminidase et galactosaminidase sont portées par la même protéine et s'il existe un ou deux sites actifs.

## 2.- $\alpha$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

### I - REPARTITION

ROSEMAN et DORFMAN (149) ont caractérisé l'  $\alpha$ -N-acétylglucosaminidase dans les tissus de mammifères (extraits de foie, rate, poumon du Rat et du Lapin), et dans le filtrat de culture de Pneumocoque type II. Cette enzyme a été par la suite caractérisée par WEISSMANN et al. (150) dans le foie de Boeuf mais la source la plus riche, selon WATKINS (151) reste un protozoaire Trichomonas foetus.

L'  $\alpha$ -N-acétylglucosaminidase et l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase ont été localisées chez Trichomonas foetus par WATKINS (151), puis chez Helix pomatia par TUPPY et STAUDENBAUER (152). WEISSMANN et FRIEDERICI (153) ont déterminé l'activité de l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase dans différents organes du Porc. Le tableau XVI (p. 35) rassemble les résultats obtenus par ces auteurs. Cette enzyme a été par ailleurs mise en évidence dans la rate de Boeuf par WERRIES et al. (154).

### II - ISOLEMENT DES ENZYMES

TUPPY et STAUDENBAUER (155), WERRIES et al. (156) ont réussi à purifier l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase.

Il faut aussi noter que WEISSMANN et HINRICHSSEN (157) ont purifié 300 fois l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase du foie de Porc, par précipitation au sulfate d'ammonium puis chromatographie sur DEAE-cellulose et gél de dextran. Ces auteurs par électrofocalisation caractérisent jusqu'à jusqu'à huit isoenzymes de l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase. Le taux des  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases dans les tissus est relativement faible, cela explique dans un sens le peu de renseignements que nous possédons.

### III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Aucune propriété physico-chimique des  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases n'a encore été déterminée. La difficulté d'obtenir des solutions enzymatiques suffisamment pures explique l'absence totale de ces études.

T A B L E A U    X V I

Répartition de l'  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase  
dans différents organes du Porc (WEISSMANN et  
FRIEDERICI)(157)

Sources enzymatiques	Quantité de phénol libéré en $\mu$ g par heure et par mg de tissu frais
Rate	4520
Rein	4480
Foie	4180
Intestin	3900
Epididyme	1090
Cerveau	570
Testicules	470
Coeur	300

#### IV - PROPRIETES ENZYMATIQUES

Nous étudierons successivement l'influence :

- du pH de la réaction,
  - de la nature du substrat
- et des effecteurs

sur l'action enzymatique des  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases.

##### A - INFLUENCE DU PH DE LA REACTION

Le pH optimum des  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases se situe entre pH 4 et 6. Les solutions enzymatiques sont inactivées à des pH supérieures à 6.

##### B - INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT

A notre connaissance, aucun travail n'a porté jusqu'à maintenant sur l'étude de la spécificité d'action des  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases.

##### C - INFLUENCE DES EFFECTEURS

MURAMATSU (150) a montré que l' $\alpha$ -N-acétylglucosaminidase isolée de Turbo cornutus était activée par le chlorure de sodium et inhibée par le pCMB  $10^{-4}$  M.

A part cet auteur aucune mise en évidence de composés activant ou inhibant les  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases n'a été signalée.

#### V - CONCLUSIONS

De nombreux travaux sont encore nécessaires avant que l'on connaisse ces  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases d'une manière aussi parfaite que la  $\beta$ -D-galactosidase isolée d'Escherichia coli. Les renseignements que nous possédons sont beaucoup trop fragmentaires et le problème majeur est de savoir comme dans le cas des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases s'il existe une ou deux protéines responsables des deux activités  $\alpha$ -N-acétylglucosaminidasique et galactosaminidasique. Signalons enfin que depuis les travaux de WERRIES et al. (159) il semble que les deux  $\alpha$ -N-acétylhexosaminidases soient des enzymes différentes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES
-----------------------

On peut remarquer que les N-acétylhexosaminidases forment un groupe d'enzyme relativement homogène. Leurs propriétés physico-chimiques sont en grande partie identiques. Cela se traduit par la description d'un nombre considérable de méthodes de préparation sans qu'aucune d'elle ne soit parfaite. Il ne faut pas oublier que la première N-acétylhexosaminidase cristallisée a été obtenue en 1970 ; la  $\beta$ -N-galactosidase d'Escherichia coli l'est depuis 1959.

A côté de ces problèmes de préparations il existe un autre problème, beaucoup plus important : la spécificité des N-acétylhexosaminidases. Toutes les enzymes qui ont été étudiées jusqu'à présent l'ont été à l'aide de substrats synthétiques ou de substrats naturels tellement différents qu'il n'est pas possible de mettre en évidence l'affinité générale de ces enzymes envers les substrats comme ce fut le cas pour la  $\beta$ -D-galactosidase d'Escherichia coli.

La découverte de formes différentes de N-acétylhexosaminidases à l'intérieur d'un même organe ou d'un même organisme laisse prévoir (à moins qu'il ne s'agisse de véritable isozyme), une spécificité d'hydrolyse vis-à-vis des substrats, hydrolyse adaptée au métabolisme de l'endroit où est synthétisée l'enzyme.

Le nombre restreint des résultats sur la spécificité de ces N-acétylhexosaminidases nous a amené à étudier l'affinité de certaines  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases sur des substrats naturels.

-----

TRAVAUX PERSONNELS

Une étude chromatographie préalable des produits obtenus après hydrolyse d'oligosaccharides par des préparations de rate de Boeuf et d'*Aspergillus niger* nous a amené à penser que la vitesse d'hydrolyse dépendait d'une part, de la préparation enzymatique utilisée, et d'autre part, de la nature de la liaison. Pour confirmer ces résultats nous avons repris ces expériences d'une manière quantitative et nous avons déterminé la constante de Michaelis de cinq  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines différentes lors de l'hydrolyse de substrats de structure variable.

Notre travail a donc consisté dans un premier temps à préparer des solutions de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines différentes et à connaître quelques unes des propriétés de ces enzymes. Dans un second temps, nous avons étudié l'influence :

- de l'origine de l'enzyme,
- de la nature de la liaison osidique à hydrolyser,
- de la taille du substrat

sur la vitesse d'hydrolyse des cinq  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases.

MATERIEL ET METHODES
----------------------

Nous examinerons d'abord les méthodes analytiques utilisées pour déterminer l'activité des  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases (E.C. 3.2.1.30), puis nous exposerons les différentes techniques employées pour préparer ces enzymes. Nous donnerons ensuite la structure des osides qui ont servis de substrats. Enfin nous décrirons le protocole expérimental de l'hydrolyse enzymatique.

### 1. - METHODES ANALYTIQUES

#### I - MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE A L'AIDE D'HETEROSIDES DE SYNTHESE

La présence de glucosaminidases dans une solution peut être décelée en utilisant des hétérosides de synthèse. Ces hétérosides sont constitués par un résidu de N-acétylglucosamine uni par une liaison  $\alpha$  ou  $\beta$  osidique à un aglycone.

L'action d'une enzyme sur l'hétéroside correspondant provoque d'une part la libération de l'ose et d'autre part la libération de l'aglycone. La mise en évidence de l'activité glycosidasique peut être réalisée en mesurant soit la quantité d'ose libéré, soit la quantité d'aglycone libre dans le milieu.

La méthode de dosage de l'aglycone varie suivant la nature de l'hétéroside utilisé. Jusqu'à présent, les hétérosides employés ont été les méthyl-osides, les phényl-osides, les p-nitrophényl-osides et les méthyl-umbelliferyl-osides. Les méthyl-osides sont actuellement très peu utilisés car ils manquent de sensibilité au point de vue de l'hydrolyse et des méthodes de dosage. Au contraire, les méthyl-umbelliferyl-osides permettent d'effectuer des dosages de l'ordre du nanogramme par spectrofluorimétrie. Au laboratoire, nous utilisons principalement les phényl (\*) et p-nitrophényl-osides (\*\*), nous dosons le phénol et le p-nitrophénol libérés, la sensibilité de la méthode est de l'ordre de 0,1 ug.

---

(\*) Nous adressons nos plus vifs remerciements au Professeur E. BUDDECKE qui nous a fourni le phényl- $\alpha$ -N-acétyl-glucosaminide.

(\*\*) Les hétérosides du p-nitrophénol nous sont fournis par PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, Illinois, U.S.A.

Le principe de la méthode est le suivant :

#### A - PRINCIPE

Les hétérosides du p-nitrophénol en solution sont incolores. Après action de l'enzyme correspondante sur l'hétéroside, il y a coupure du substrat selon la figure 3 , p. 42. En milieu basique, le p-nitrophénol libéré prend une coloration jaune. Cette coloration s'explique en admettant la présence de deux formes tautomères ; l'une phénolique incolore qui est celle des nitrophénols à l'état solide, l'autre, quinonique colorée, dite variété acinitrée qui prédomine en présence de base (figure 3, p. 42).

#### B - REACTIFS

1 - Solution aqueuse d'hétéroside 5mM (Cette solution se conserve un mois à 4°C et à l'obscurité ; la liaison étant labile, il y a ensuite une hydrolyse).

2 - Solution enzymatique pure ou mélange enzymatique.

3 - Solution tampon de Mc ILVAINE (150).

4 - Solution de carbonate de sodium molaire.

#### C - MODE OPERATOIRE ET DISCUSSION

Dans un tube à hémolyse bien propre contenant 25  $\mu$ l de la solution d'hétéroside sont ajoutés 100  $\mu$ l de solution enzymatique et 900  $\mu$ l de solution tampon dont le pH est équivalent au pH optimum de l'enzyme. Le mélange est ensuite porté à 37°C pendant 10 minutes. Il s'agit de la méthode de CONCHIE (161) que nous avons adaptée à nos besoins, c'est-à-dire que nous avons diminué la concentration des solutions d'hétéroside et de ce fait diminué les volumes réactionnels.

Le p-nitrophénol libéré par hydrolyse enzymatique est mis en évidence par addition de 500  $\mu$ l de carbonate de sodium molaire. La solution jaune obtenue est stabilisée 15 minutes à température ambiante. La solution peut ensuite être dosée par rapport

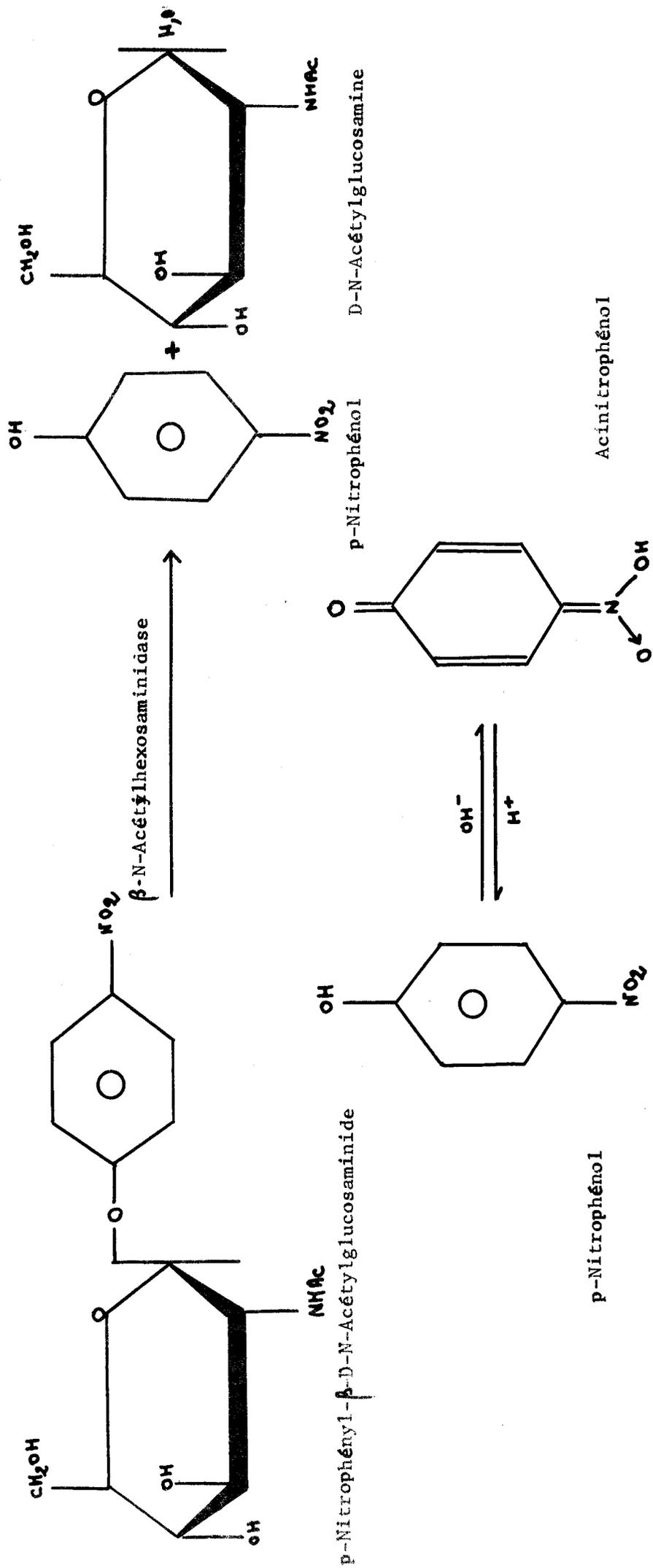


Figure n° 3 :



à une gamme étalon de p-nitrophénol.

Le tracé du spectre d'absorption du p-nitrophénol en milieu alcalin (figure 4, p. 44) nous montre que le maximum d'absorption de l'aglycone se situe à 400 nm. La proportionnalité des résultats est vérifiée pour des concentrations de p-nitrophénol comprises entre 0 et 22,5 µg (figure 5, p. 45).

Le dosage du p-nitrophénol libéré s'effectuera donc à 400 nm en se référant à une gamme étalon d'aglycone.

## II - MESURE DU POUVOIR REDUCTEUR

Dans un premier temps nous avons employé la méthode de PARK et JOHNSON (162) qui est la méthode la plus souvent citée par les auteurs. Cette méthode permet de doser 0,5 µg d'ose réducteur mais, malgré la sensibilité de cette méthode nous n'avons pu l'employer car la présence d'ions phosphate en concentration élevée provoque l'apparition d'un précipité dû probablement à la formation de phosphate ferrique. De plus le tampon phosphate inhibe le développement de la coloration. Aussi nous avons repris la méthode de MONTREUIL (163) et MONTREUIL et SCHEPPLER (164). Nous avons augmenté la sensibilité de la méthode en diminuant toutes les quantités des réactifs.

### A - PRINCIPE

Le dosage des oses réducteurs est fondé sur la réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure et sur la formation de ferrocyanure ferrique par l'addition d'un sel ferrique. Le ferrocyanure ferrique est maintenu en solution par l'addition d'acide oxalique.

### B - REACTIFS

- Solution de ferricyanure de potassium pur à 0,20 g p.100 ml d'eau distillée. Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

- Solution alcaline de cyanure de sodium

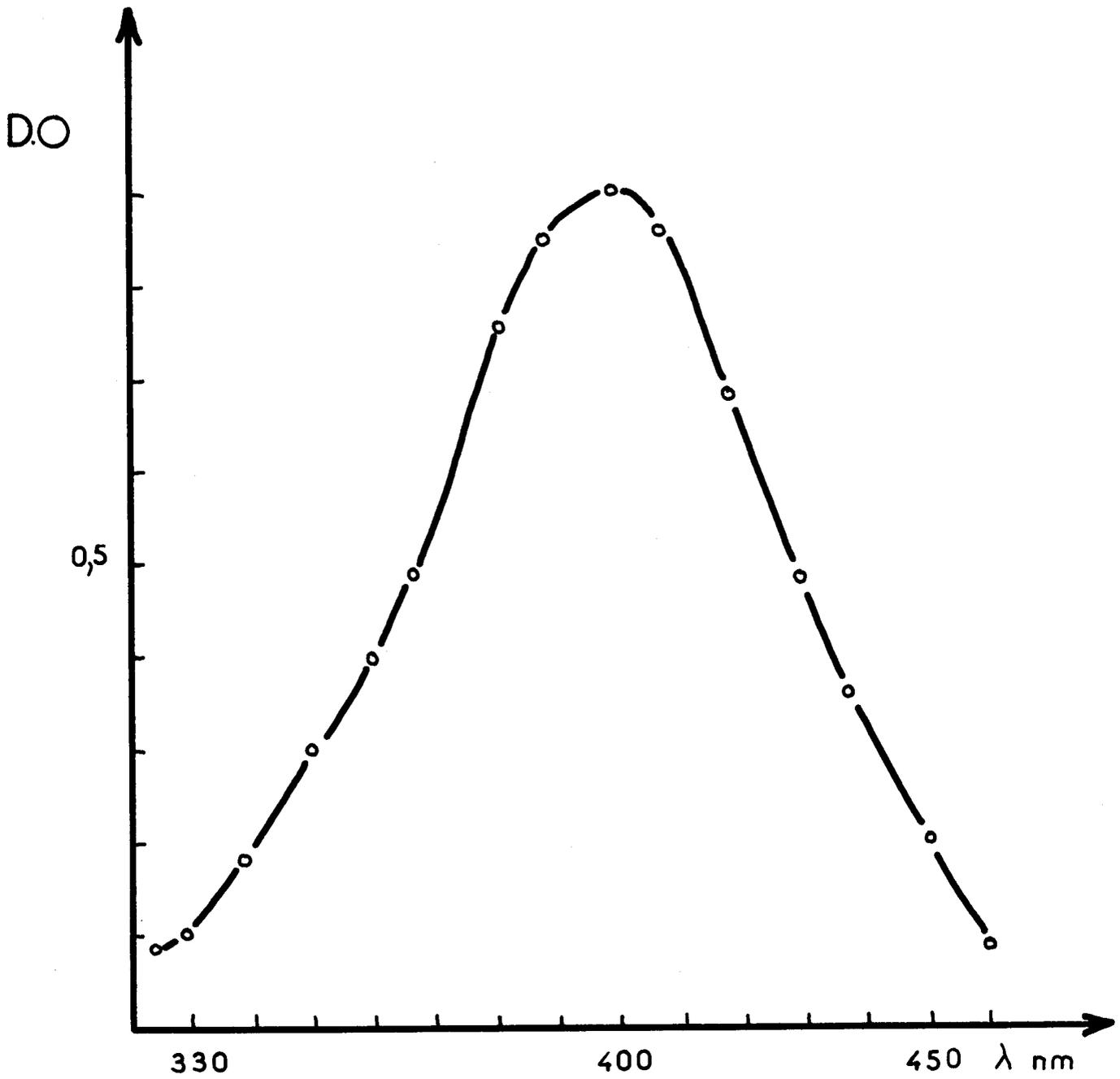


Figure n° 4 : Spectre d'absorption d'une solution aqueuse de p-nitrophénol.

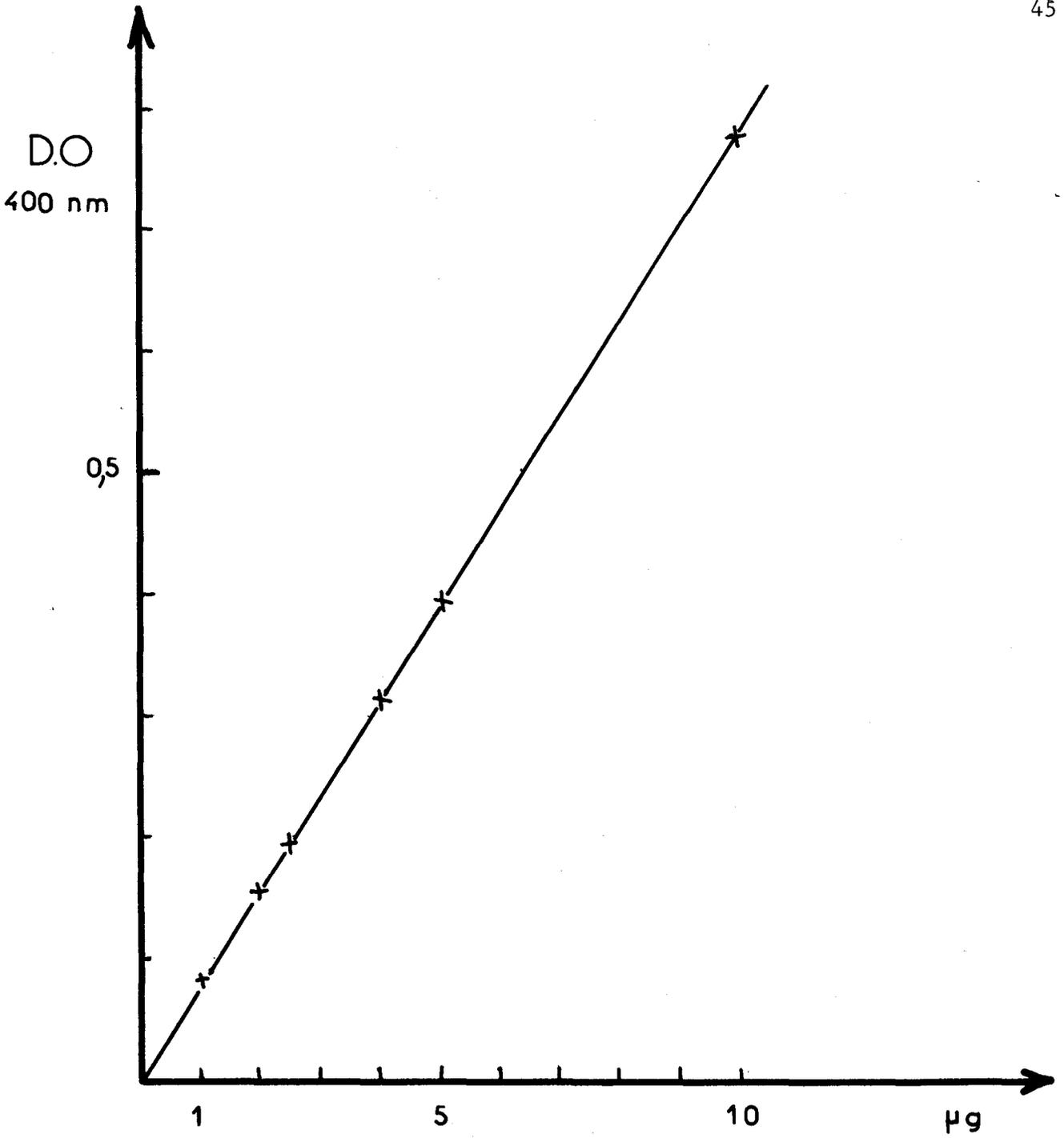


Figure n° 5 : Variations de l'absorbance des solutions aqueuses de p-nitrophénol en fonction de la concentration en p-nitrophénol.



Cyanure de sodium pur ..... 0,3 g  
 Carbonate de sodium pur anhydre .. 1,6 g  
 Eau bidistillée q.s.p. .... 100 ml

- Solution aqueuse d'acide oxalique pur à 2 g p.100 ml  
 d'eau bidistillée.

- Solution phosphoferrique :

Sulfate ferrique anhydre pur ..... 1 g  
 Acide phosphorique pur 60°Bé ..... 15 ml  
 Eau bidistillée q.s.p. .... 100 ml

Dissoudre à chaud le sulfate ferrique dans 50 à 60 ml  
 d'eau bidistillée additionnée de l'acide phosphorique. Compléter  
 après refroidissement.

#### C - MODE OPERATOIRE ET DISCUSSION

On introduit dans des tubes à hémolyse très propres,  
 500  $\mu$ l de la solution de glucides réducteurs (1 à 4  $\mu$ g d'oses), 100  
 $\mu$ l de la solution aqueuse de ferricyanure de potassium et 100  $\mu$ l  
 du réactif au cyanure de sodium.

Toutes les opérations sont ensuite effectuées à l'a-  
 bri de la lumière.

Le mélange est maintenu pendant 9 minutes au bain-marie  
 bouillant et refroidi rapidement sous un courant d'eau froide. On  
 ajoute 1,7 ml d'eau bidistillée puis 25  $\mu$ l de la solution d'acide  
 oxalique et 100  $\mu$ l de la solution phosphoferrique.

Après agitation et un séjour à l'obscurité de 3 à 5  
 heures, l'intensité de la coloration bleue est déterminée à 670 nm.

Cette méthode de dosage est très sensible. La figure 6,  
 (p. 47) montre que les densités optiques sont proportionnelles pour  
 des quantités d'oses comprises entre 1 et 4  $\mu$ g. Les ions des tampons  
 ne présentent pas d'interférence notable. Comme les densités opti-  
 ques varient en fonction de la nature de l'ose, il est nécessaire  
 de se référer à des solutions témoins de même composition que la  
 solution à doser. Nous avons appliqué cette méthode lors de l'hydro-  
 lyse des osides que nous avons étudiés.

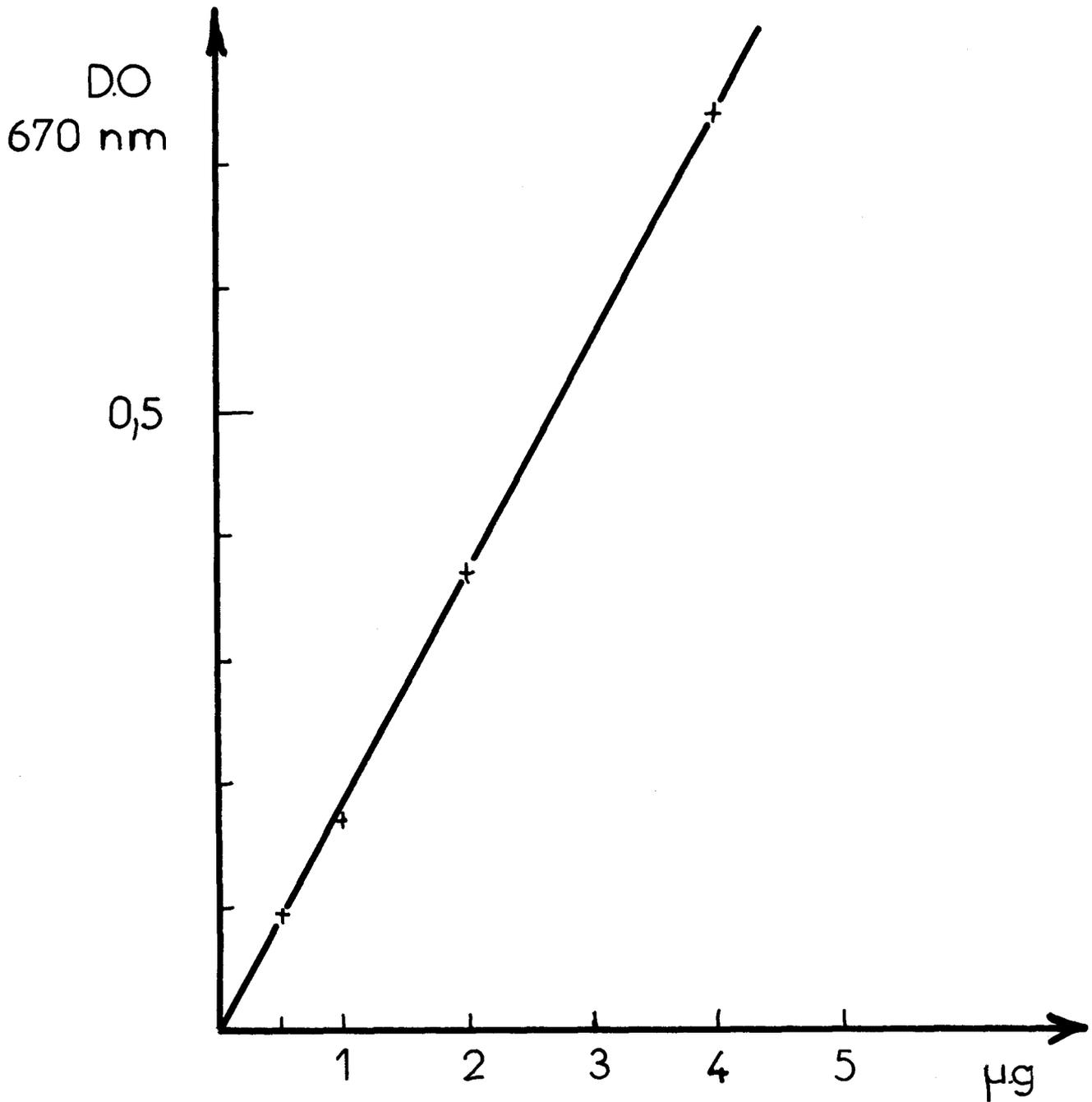


Figure n° 6 : Variations de l'absorbance en fonction de la concentration en oligosaccharide réducteur au cours du dosage par la méthode au ferricyanure.

### III - METHODE SPECIFIQUE DE DOSAGE DES N-ACÉTYLHEXOSAMINES

Nous avons employé la méthode de GOOD et BESSMAN (165) pour doser les N-acétylhexosamines libérées après hydrolyse enzymatique.

#### A - PRINCIPE

Par chauffage en milieu alcalin; les N-acétyl-glucosamines libérées après hydrolyse enzymatique et les N-acétyl-glucosamines conjuguées en position terminale dont l'hydroxyl en C<sub>4</sub> est libre, donnent trois chromogènes identifiés par STANLEY (166), KUHN et KRUGER (167). Le chromogène III se condense ensuite avec le p-diméthyl-aminobenzaldéhyde.

#### B - REACTIFS

##### 1 - Solution de tétraborate de potassium pH 9,2

Acide borique .....	1,12 moles
Potasse .....	0,56 mole
Eau bidistillée q:s.p. ....	1000 ml

##### 2 - Solution de p-diméthylamino-benzaldéhyde

La solution est obtenue en dissolvant 10 g de p-DMAB dans 100 ml d'acide acétique glacial renfermant 12,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. La solution est diluée au dixième avec de l'acide acétique glacial au moment de l'emploi.

##### 3 - Mode opératoire et discussion

Dans des tubes à hémolyse très propres, on introduit 100 µl de la solution à doser et 100 µl de la solution de tétraborate de potassium. Les tubes, bouchés, sont placés exactement 3 minutes au bain-marie bouillant. Les tubes sont ensuite portés dans un bain d'eau et de glace pendant 5 minutes. 800 µl de la solution diluée de p-DMAB sont alors ajoutés. On place les tubes après

agitation pendant 20 minutes à 37°C. Ils sont ensuite ramenés à température ambiante et les mesures sont effectuées à 585 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration en osamines pour des quantités comprises entre 2 et 10 µg p. 100 ml (figure 7, p. 50). Ces résultats ont été acquis sur des solutions aqueuses. Nous nous sommes heurtés à de nombreux problèmes lorsque nous avons voulu doser directement les N-acétylosamines dans un milieu tamponné. En effet l'intensité de coloration était très faible, voir nulle. Nous avons voulu vérifier si le tampon intervenait sur l'intensité de coloration. Le tableau XVII, p. 51) rassemble les résultats obtenus. L'ensemble des résultats dénote un effet inhibiteur joué par les tampons phosphates sur l'apparition de la coloration. Cette inhibition s'explique fort probablement par la formation d'esters phosphoriques de la N-acétylglucosamine au cours d'hydrolyse enzymatique prolongée. Pour éliminer cette inhibition nous avons réalisé des hydrolyses uniquement en présence de tampon citrate.

La méthode de GOOD et BESSMAN (168) est une méthode relativement simple pour le dosage des N-acétylhexosamines libérées après hydrolyse enzymatique des glycoprotéides ; de plus nous obtenons une bonne reproductibilité des résultats. Nous ne pouvons par contre employer cette méthode pour le dosage des N-acétylhexosamines libérées d'un hétéroside de synthèse, en effet, il y a une interférence due au p-nitrophénol en milieu alcalin. Dans ce dernier cas, nous employons la méthode au ferricyanure.

## 2. - PREPARATION DES ENZYMES

Notre travail nous a amené à préparer des β-N-acétylglucosaminidases d'origines différentes. Nous avons préparé ces hexosaminidases :

a - à partir de microorganisme : Aspergillus niger

b - à partir de végétaux : graines germées de Fenugrec  
farine de Fève Jack

c - à partir de tissus d'animaux : Rate de Boeuf et foie de Boeuf.

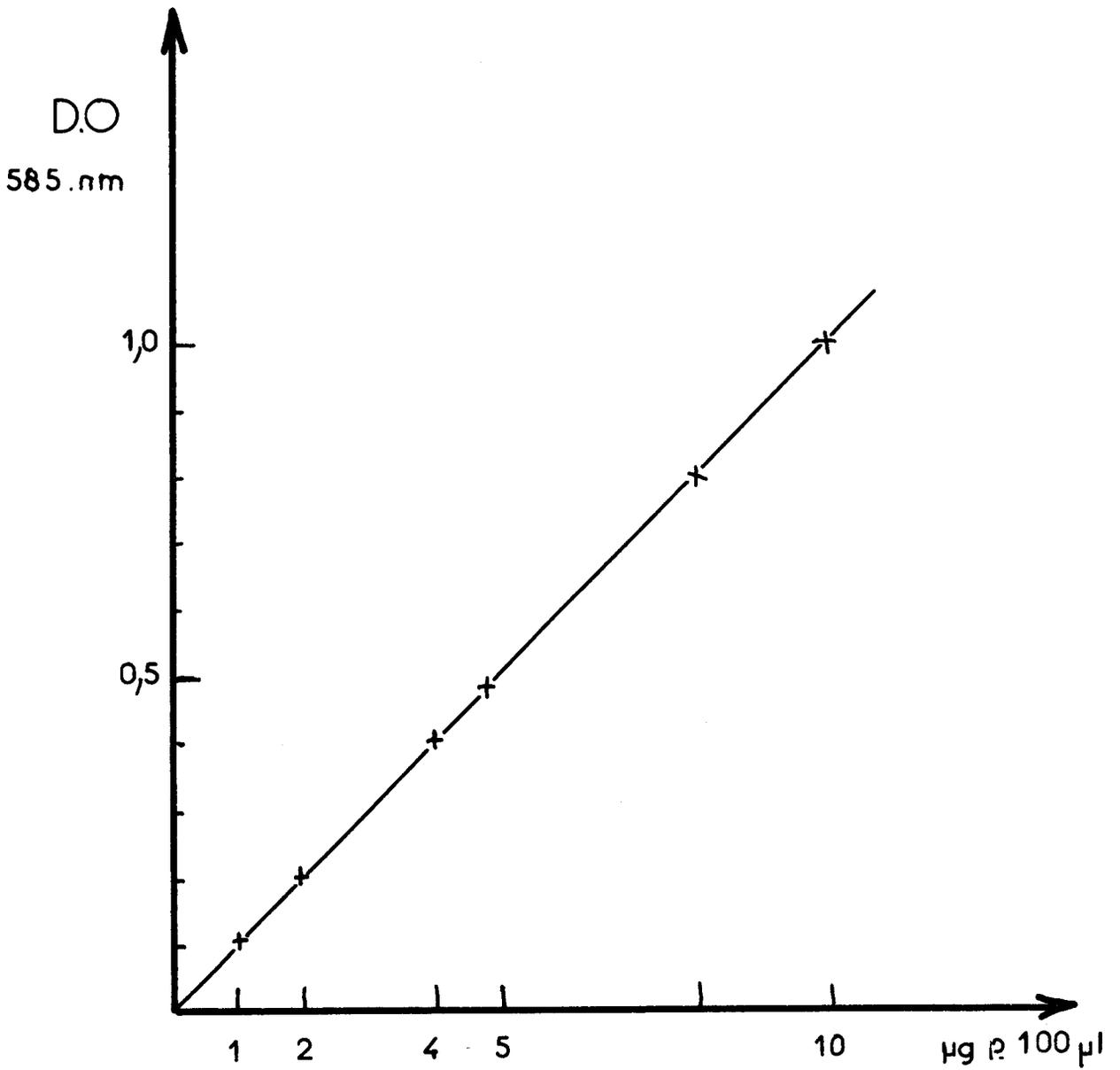


Figure n° 7 : Variations de l'absorbance en fonction de la concentration en N-acétylglucosamine par la méthode de Good et Bessman.

Influence de différents tampons sur le dosage de la N-acétylglucosamine  
par la méthode de GOOD et BESSMAN (199)

Nature du tampon	Pourcentage de récupération au bout de				
	0 h	12 h	24 h	38 h	120 h
Témoin N-acétylglucosamine dans l'eau	100	100	100	100	100
N-acétylglucosamine dans un tampon : phosphate monosodique 0,01 M et phosphate disodique 0,02 M de pH 4,5	100	121	121	100	10
N-acétylglucosamine dans un tampon : acide citrique 0,01 M et phosphate disodique 0,02 M de pH 4,5	100	99	99	71	8
N-acétylglucosamine dans un tampon : acide citrique 0,01 M et citrate trisodique 0,02 M de pH 4,5	100	88	90	90	22

Les solutions sont maintenues à 37°C dans les mêmes conditions qu'une hydrolyse enzymatique.

Nous allons exposer les protocoles expérimentaux utilisés pour la purification de ces enzymes.

I -  $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE ISOLEE A PARTIR DE MICROORGANISME :  
ASPERGILLUS NIGER.

Nous avons repris le protocole de BAHL et AGRAWAL (170). La méthode implique un fractionnement des enzymes par le sulfate d'ammonium suivi d'une purification par chromatographie sur colonne de Bio-gel P-300.

A - PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

30 g de Rhozyme HP 150(\*) source commerciale d'Aspergillus niger sont mis en suspension dans 100 ml d'eau. La solution est agitée pendant 1 heure et centrifugée pour éliminer l'insoluble. Au surnageant est ajouté une quantité suffisante de sulfate d'ammonium cristallisé pour obtenir une saturation équivalente à 20 p.100. Le précipité obtenu après centrifugation est alors dissous dans un tampon citrate de sodium 0,05 M, pH 4,6. Une deuxième précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation permet d'obtenir un précipité qui est dissous dans 250 ml du tampon citrate de sodium.

B - ULTRAFILTRATION DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE

Pour éviter l'action des cellulases présentes dans le Rhozyme HP 150, sur les membranes de cellophane, nous soumettons la solution enzymatique à une ultrafiltration sur membrane "Amicon" PM 30. Cette méthode permet d'une part, de désioniser le milieu et d'autre part de concentrer la solution enzymatique.

C - CHROMATOGRAPHIE SUR BIOGEL P 300

La chromatographie de la solution enzymatique a été réalisée sur une colonne de Bio-gel P 300, (5 x 100 cm). L'élution a été effectuée à l'aide d'un tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 5,0. Une deuxième chromatographie a été réalisée sur colonne de

---

(\*) Le Rhozyme HP 150 nous est fourni par ROHM et HAAS Company, Philadelphie, U.S.A.

Bio-gel P 300 (2,5 x 120 cm) l'élution est effectuée par un tampon citrate de sodium 0,01 M de pH 5,0 renfermant du chlorure de sodium 0,1 M. La figure 8, (p. 54) rassemble les différentes étapes de la purification de l'enzyme.

## II - $\beta$ -N-ACÉTYL-HEXOSAMINIDASES ISOLEES A PARTIR DE VEGETAUX

### A - $\beta$ -N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE A PARTIR DES GRAINES GERMEES DE FENUGREC

La méthode décrite par COURTOIS et PERCHERON (171) modifiée par BEAUGIRAUD et al. (172) pour l'isolement de galactosidases et de mannosidases à partir des graines germées de Fenugrec a été utilisée. L'emploi de p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucosaminide nous a permis de mettre en évidence une activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminidasique non soupçonnée par ces auteurs. Nous avons effectué une cinétique de germination afin de déterminer les meilleures conditions d'apparition de cette hexosaminidase. Nous avons, en outre, simplifié le mode opératoire de préparation des glycosidases à partir des graines germées de Fenugrec.

#### 1 - La germination

100 g de graines de Fenugrec (Trigonellum foenum graecum) sont lavés dans une solution d'acide sulfurique à 10 p.100 pendant 15 minutes, puis à l'eau courante jusqu'à neutralité des eaux de lavage. Les graines sont ensuite immergées dans l'eau distillée pendant 24 heures. Cette opération permet d'éliminer une partie des pigments jaunes. Le Fenugrec est ensuite placé dans des plateaux sur des nappes de coton hydrophile humecté d'eau. Les plateaux sont recouverts d'une plaque de verre pour éviter l'évaporation et maintenus à l'obscurité à la température du Laboratoire pendant 48, 60 et 130 heures. Cela nous permet en outre, de vérifier les hypothèses de KREBS (173) et de DAVIES (174) à savoir l'augmentation du taux d'enzyme au cours de la germination ou de la croissance.

#### 2 - Extraction des glycosidases

Les graines germées sont broyées finement à l'aide d'un mixer dans une solution de chlorure de sodium à 9 p.1000 renfermant

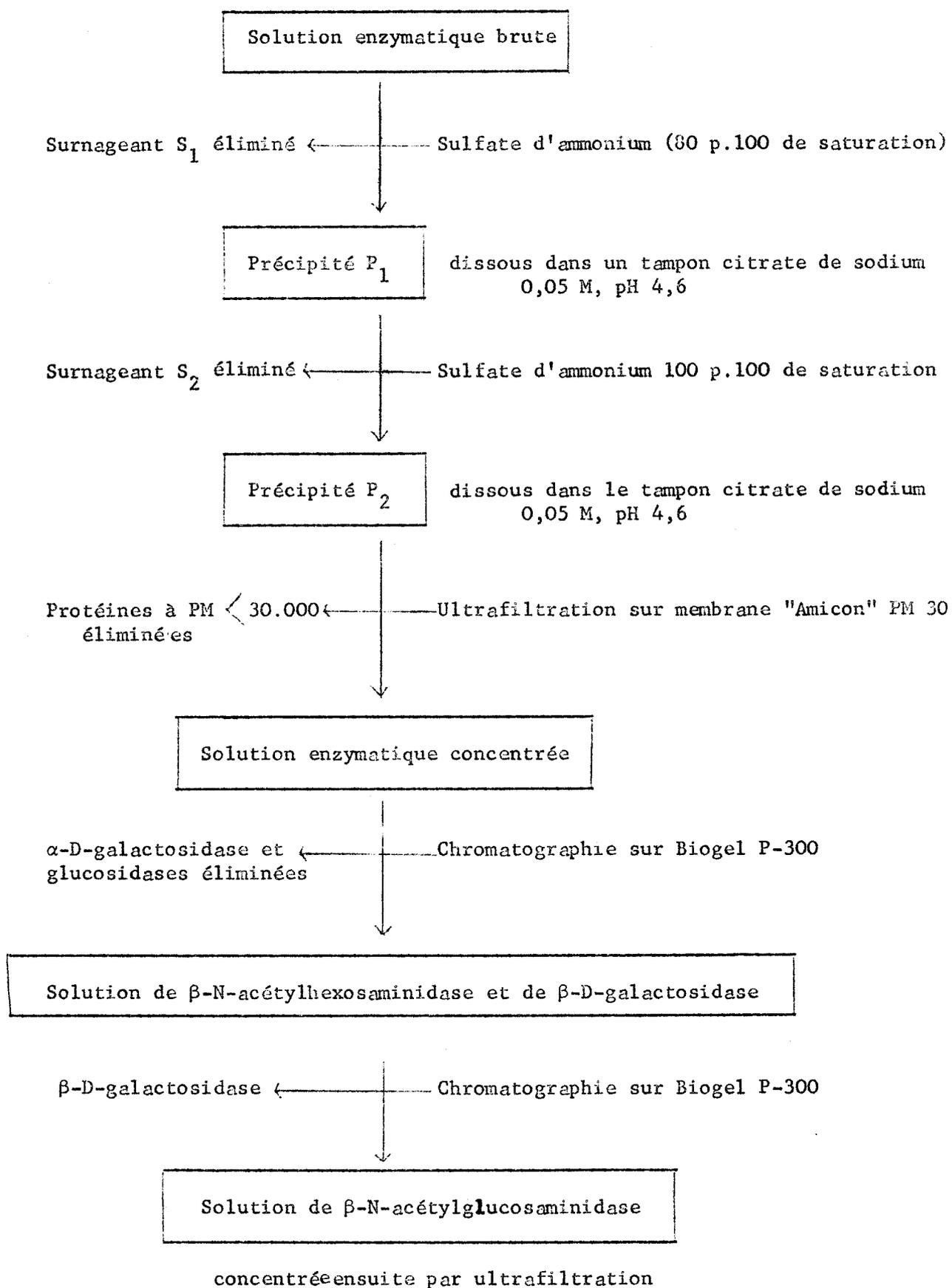


Figure n° 3 : Schéma de fractionnement de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase à partir d'Aspergillus niger selon BAHIL et AGRAWAL (175)

1 mg par litre de cyanure de mercure destiné à inhiber les oxydases. La suspension laiteuse est filtrée sur büchner muni de gaze puis dialysée pendant 2 jours contre une solution de chlorure de sodium à 9 p.1000. L'adialysable est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 3600 tours par minute dans une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant renfermant les osidases est considéré comme la solution enzymatique brute.

### 3 - Fractionnement au sulfate d'ammonium

Le surnageant obtenu après centrifugation est fractionné par le sulfate d'ammonium cristallisé afin d'obtenir une saturation en sel équivalente à 0,8. Après un repos en chambre froide (+ 4°C) pendant une nuit; la suspension est centrifugée pendant 45 minutes à 19.000 tours par minute dans une centrifugeuse réfrigérée Spinco, rotor 21. Le précipité est repris par le minimum d'eau distillée et mis en dialyse contre de l'eau distillée jusqu'à élimination totale des ions sulfate (3 jours). Un faible précipité de protéine apparait, il est éliminé par une dernière centrifugation. Une première modification du protocole expérimental a consisté à soumettre l'adialysable à une ultrafiltration sur membrane "Amicon" PM 30. Cette étape nous permet d'une part de concentrer la solution enzymatique et d'autre part d'éliminer toutes les molécules dont la masse moléculaire est voisine de 30.000 et en particulier les pigments indésirables.

### 4 - Chromatographie sur colonne de Sephadex G-200

La purification est achevée par chromatographie sur colonne de Sephadex G-200. Une deuxième modification introduite a consisté à utiliser deux colonnes de Sephadex (5 x 100 cm) montées en série, avec possibilité de recycler les produits élués. Ces colonnes sont équilibrées dans un tampon acide citrique-phosphate disodique 0,05 M - 0,1 M de pH 5,6. A la fin du fractionnement, des prises d'essai sont réalisées tous les trois tubes et la présence des enzymes est recherchée à l'aide d'hétérosides de synthèse.

Nous avons rassemblé dans la figure 9, (p. 56) les différentes étapes de ce fractionnement.

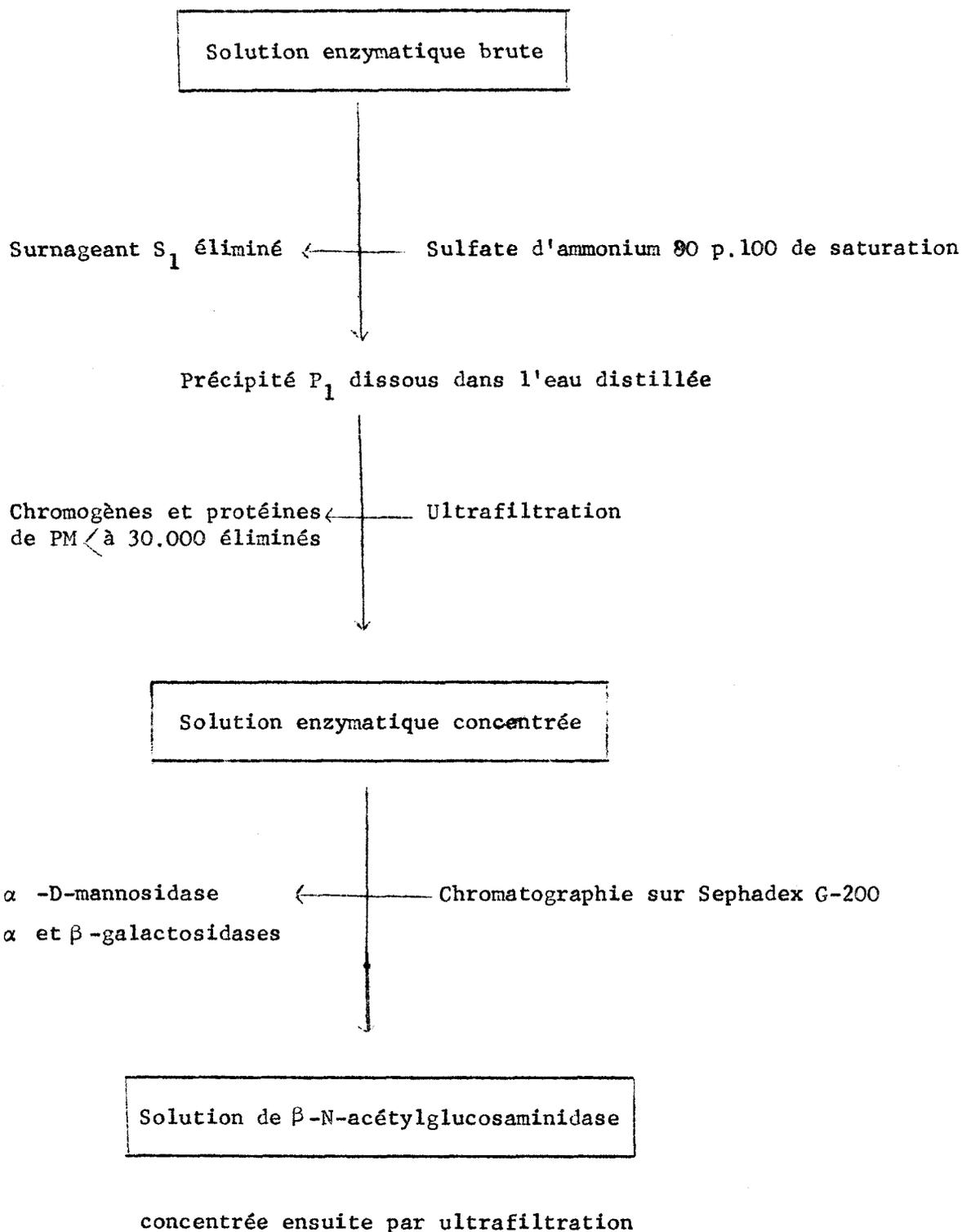


Figure n° 9 : Schéma de fractionnement de la  $\beta$  -N-acétylglucosaminidase à partir de graines germées de Fenugrec selon BEAUGIRAUD et al. (176) modifié.

B - PREPARATION DE LA  $\beta$ -N-ACÉTYL-GLUCOSAMINIDASE A PARTIR DE LA FEVE JACK

Nous avons appliqué le protocole expérimental préconisé par LI et LI (177), protocole fondé sur la précipitation de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase de la Fève Jack à son pH isoélectrique de pH 4,9.

1 - Extraction

A 200 g de farine de Fève Jack (\*) on ajoute 1.200 ml d'eau distillée. La suspension est agitée pendant une heure à température ambiante puis filtrée sur Büchner muni de gaze. Le filtrat est ajusté à pH 5,5 à l'aide de citrate de sodium 1,5 M, pH 2,7 et centrifugé. Le surnageant ainsi obtenu (760 ml) renferme la majorité des glycosidases.

2 - Fractionnement au sulfate d'ammonium

Du sulfate d'ammonium cristallisé est ajouté au surnageant pour obtenir 30 p.100 de saturation. Après un repos d'une nuit le précipité P1 est éliminé par centrifugation et le surnageant est amené à 50 p.100 de saturation par addition de sulfate d'ammonium cristallisé. Le précipité P2 est recueilli après une nuit de repos et dissous dans 50 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,0.

3 - Fractionnement éthanolique

Dans la figure 10 (p. 58) nous avons résumé les différentes étapes du fractionnement par l'éthanol du précipité obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium. Notons que les précipitations sont réalisées à  $-10^{\circ}\text{C}$ , la dernière précipitation est effectuée au point isoélectrique de l'enzyme.

4 - Chromatographie sur colonnes de Sephadex- Chromatographie sur Sephadex G-200

La solution enzymatique est chromatographiée sur colonne de Sephadex G-200 (5 x 100) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1M de pH 7,0. Les fractions renfermant l'activité -N-acétylglucosaminidase sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration.

(\*) La farine de Fève Jack est fournie par SIGMA Chemical Company, St Louis, Missouri, U.S.A.

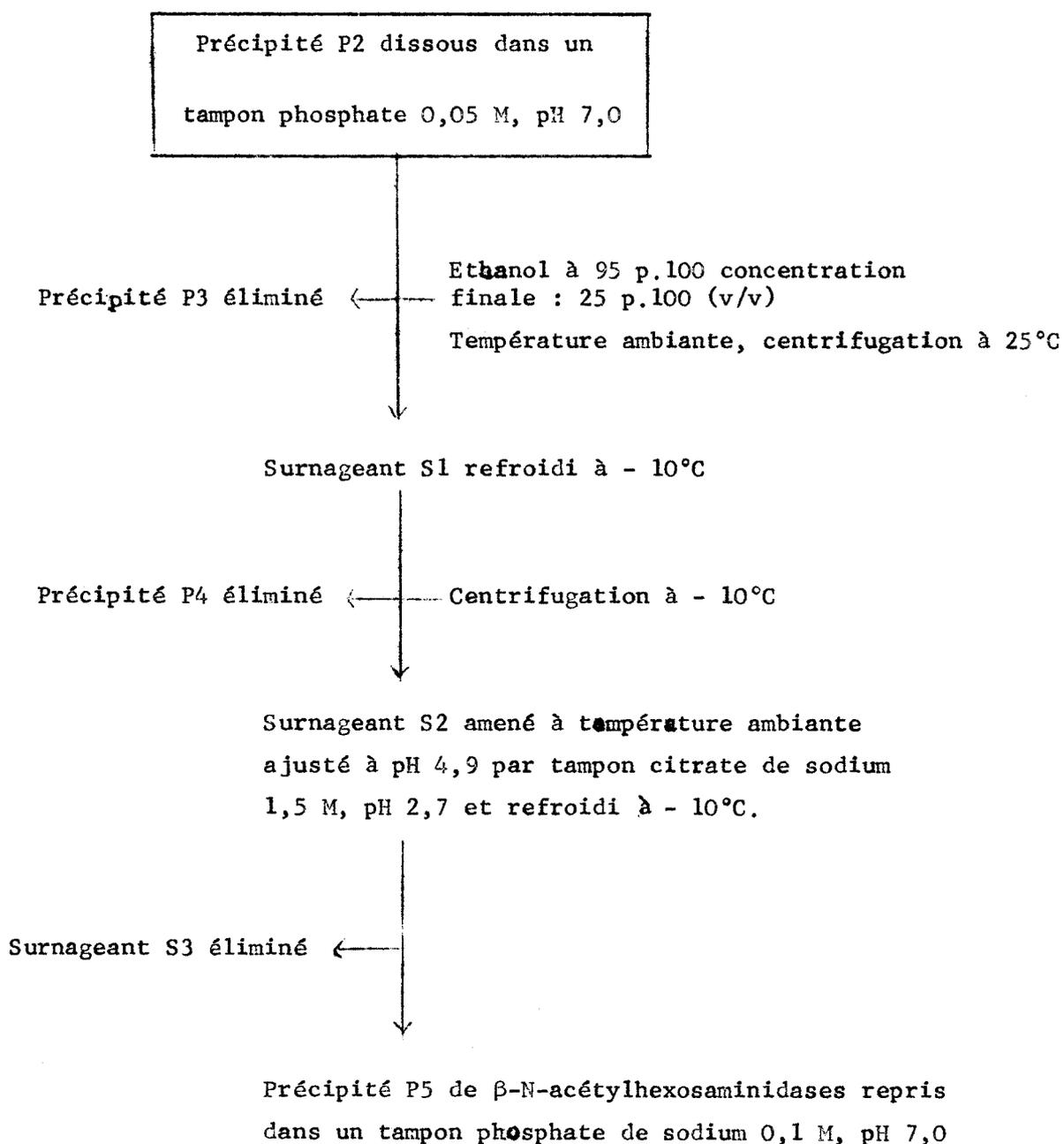


Figure n° 10 : Précipitation des β-N-acétylhexosaminidases de la farine de Fève Jack par l'éthanol selon LI et LI (178).

- Chromatographie sur DEAE Sephadex A-50

La solution est chromatographiée sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 (2 x 50 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,05M de pH 7,0. La  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase est éluée par un tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 6,0 renfermant du chlorure de sodium 0,05M. Les fractions recueillies sont concentrées par ultrafiltration et ajustées à pH 4,4.

- Chromatographie sur CM Sephadex C-50

La solution enzymatique ajustée à pH 4,4 est chromatographiée sur colonne de CM-Sephadex C-50 (2 x 50 cm) équilibrée en tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 4,4. La  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase est éluée par un gradient linéaire de pH (500 ml de tampon pH 4,4 - 500 ml de tampon pH 5,5). Les fractions enzymatiques sont recueillies puis concentrées par ultrafiltration. La solution enzymatique est ajustée à pH 7,0.

La figure 11, (p. 60) résume les différentes étapes de la purification des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de la Fève Jack.

III -  $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES ISOLEES A PARTIR DE TISSUS ANIMAUX

A - ISOLEMENT DE  $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE A PARTIR DE LA RATE DE BOEUF

La méthode de fractionnement décrite par WERRIES et al. (179) a été reprise et modifiée.

1 - EXTRACTION

Une rate de Boeuf de 710 g, congelée, est débarrassée du tissu conjonctif et découpée en petits morceaux, qui sont broyés au mixer dans un tampon citrate 0,1 M de pH 6,0. Un volume égal du même tampon renfermant du chlorure de sodium 0,15 M est ensuite ajouté et le mélange est agité pendant une nuit. La suspension est filtrée sur Büchner muni de gaze, puis centrifugée pendant 1 heure à 3000 tours/minute dans une centrifugeuse réfrigérée.

Nous avons modifié cette méthode en introduisant une étape

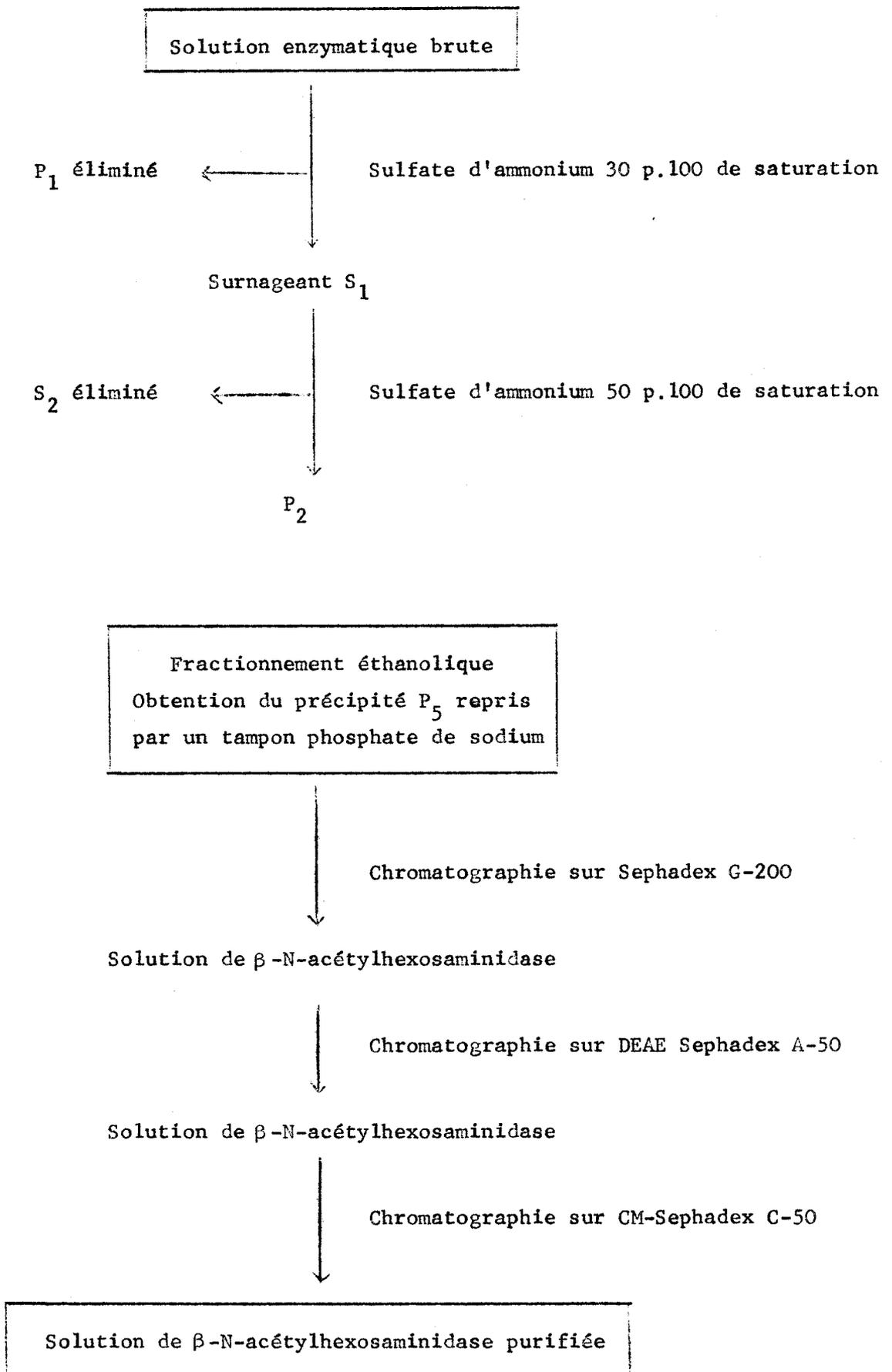


Figure n° 11 : Schéma de fractionnement des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases à partir de la Fève Jack selon LI et LI (180).

supplémentaire qui consiste à ajuster le surnageant à pH 4,0 à l'aide d'acide citrique 0,1 M et à éliminer le précipité de protéines non enzymatiques par centrifugation.

## 2 - FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM

Au surnageant obtenu nous ajoutons du sulfate d'ammonium cristallisé jusqu'à obtenir 80 p.100 de saturation. Après un repos d'une nuit à 4°C. le précipité est recueilli par centrifugation. Il est dissous dans le minimum d'eau et dialysé pendant 3 jours contre de l'eau distillée. L'adialysable est centrifugé, le surnageant est lyophilisé.

Les protéines sont précipitées ensuite à 33, 50 et 66 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium. Chacun des précipités obtenus est repris par le minimum d'eau distillée, dialysé contre de l'eau distillée et centrifugé.

## 3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES

### - Chromatographie sur Sephadex G-200

200 mg de protéines obtenues à 66 p.100 de saturation sont fractionnées sur une colonne de Sephadex G-200 (5 x 100 cm) équilibrée dans un tampon acide citrique 0,05 M-phosphate disodique 0,1 M, de pH 4,6.

### - Chromatographie sur hydroxylapatite

L'hydroxylapatite est préparée selon la méthode de TISELIUS HJERTEN et LEVIN (181). Le gel est équilibré dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 6,4. La solution enzymatique est éluée par un gradient discontinu de concentration : 0,05 M, 0,1 M et 0,2 M en phosphate.

La figure 12 (p. 52) résume les différentes étapes de la purification de l'enzyme isolée de la rate de Boeuf.

## B - $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE DU FOIE DE BOEUF

Nous avons utilisé sans purification préalable une préparation enzymatique de  $\beta$ -galactosidase vendue par la firme SIGMA. Cette préparation renferme, en effet, une proportion notable de  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase (3 mU/mg).

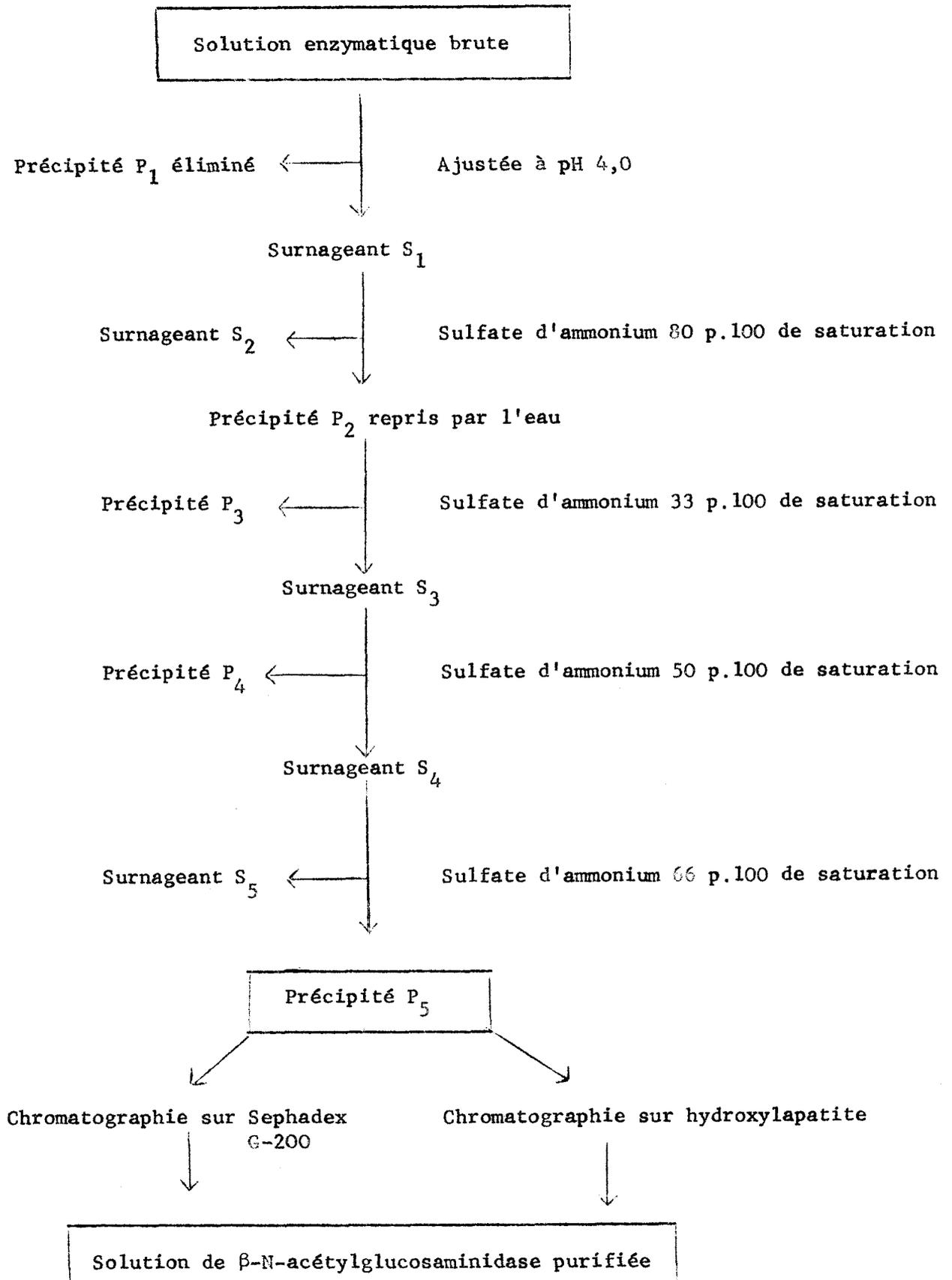


Figure n° 12 : Schéma de fractionnement de la β-N-acétylglucosaminidase à partir de la rate de Boeuf selon WERRIES et al. (182) modifié.

### 3. - STRUCTURE DES SUBSTRATS UTILISES AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Outre les hétérosides de synthèse : phényl- $\alpha$ -D-N-acétylglucosaminide, p-nitrophényl- $\beta$ -D-N-acétylglucosaminides et p-nitrophényl- $\beta$ -D-N-acétylgalactosaminide, nous avons utilisé des substrats naturels (\*) obtenus par acétolyse du glycopeptide  $\beta$  de l'ovomucoïde. Selon le procédé mis au point au Laboratoire par BAYARD (183). La structure des oligosaccharides a été déterminée par BAYARD, FOURNET, STRECKER et MONTREUIL (184).

La réalisation d'acétolyse provoque préférentiellement des ruptures des liaisons glycosidiques des oses neutres. Les osides obtenus par cette méthode comportent donc généralement une ou plusieurs molécules de N-acétyl-glucosamine en position terminale non réductrice. Ainsi ils se prêtent particulièrement bien à l'action de N-acétyl-glucosaminidases.

Dans ces osides, les liaisons contractées par la N-acétylglucosamine sont du type  $1 \rightarrow 2$ ,  $1 \rightarrow 4$  et  $1 \rightarrow 3$ . Les liaisons de type  $1 \rightarrow 6$ , si elles existent dans le groupement polysaccharidique sont préférentiellement coupées par la réaction d'acétolyse.

Pour notre travail nous avons utilisé les oligosaccharides suivants :

- 1 - Le  $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2 acétamidoglucopyranosyl-( $1 \rightarrow 4$ )- $\underline{D}$ -mannopyranose (Osides A).
- 2 - Le  $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-( $1 \rightarrow 4$ )- $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2 acétamidoglucopyranosyl-( $1 \rightarrow 4$ )- $\underline{D}$ -2-désoxy-2-acétamidoglucopyranose (Osides B).
- 3 - Le  $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-( $1 \rightarrow 2$ )- $\underline{D}$ -mannopyranose (Osides C).
- 4 - Le  $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-( $1 \rightarrow 2$ )- $\underline{O}$ - $\alpha$ - $\underline{D}$ -mannopyranosyl-( $1 \rightarrow 3$ )- $\underline{D}$ -mannopyranose (Osides H).
- 5 -  $\underline{O}$ - $\alpha$ - $\underline{D}$ -mannopyranosyl-( $1 \rightarrow 3$ )- $\underline{O}$ - $\beta$ - $\underline{D}$ -2-désoxy-2-acétamidoglycopyranosyl-( $1 \rightarrow 4$ )- $\underline{D}$ -mannopyranose (Osides I)

(\*) Nous tenons à remercier très vivement Monsieur B. BAYARD qui nous a aimablement fourni toutes les quantités d'osides nécessaires à nos recherches.

- 6 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglycopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{0}\text{-}\underline{\alpha}\text{-}\underline{D}\text{-manno-}$   
 $\text{pyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)}$   
 $\text{-}\underline{D}\text{-mannopyranose (Osido L)}$
- 7 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}$   
 $\text{-}\underline{D}\text{-manopyranose (Osido F)}$ .
- 8 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}$   
 $\text{-}\underline{D}\text{-mannopyranose (Osido E)}$ .
- 9 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\underline{D}\text{-mannopyranose}$   
 $\text{(Osido 1) (*)}$
- 10 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{D}\text{-galactopyra-}$   
 $\text{nose (**)}$
- 11 - Le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}2\text{-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-galac-}$   
 $\text{topyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\underline{D}\text{-glucopyranose (***)}$

Nous avons dans la figure 13 (p.65) rassemblé les différentes formules de ces oligosaccharides.

Nous avons utilisé en outre, le glycopeptide  $\beta$  de l'ovomucofde obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucofde selon le procédé décrit par YAMASHINA et MAKINO (185) modifié par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (186).

#### 4. - L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

L'hydrolyse enzymatique doit être effectuée dans des conditions bien précises de pH, de température, de concentration en enzyme et en substrat, en présence ou non d'effecteurs.

Nos hydrolyses ont été réalisées de la manière suivante :

##### I - CAS DES CINÉTIQUES DE CONCENTRATION EN ENZYME ET EN SUBSTRAT

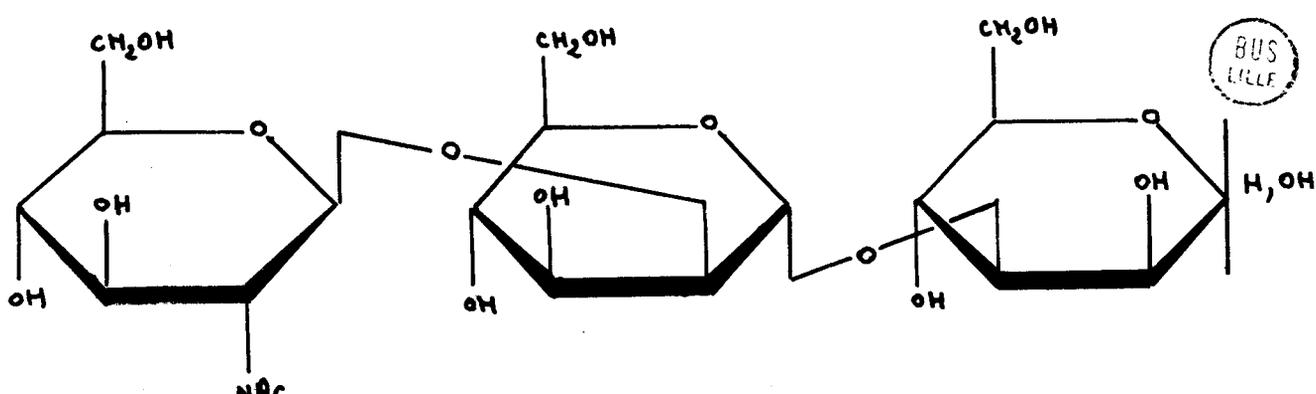
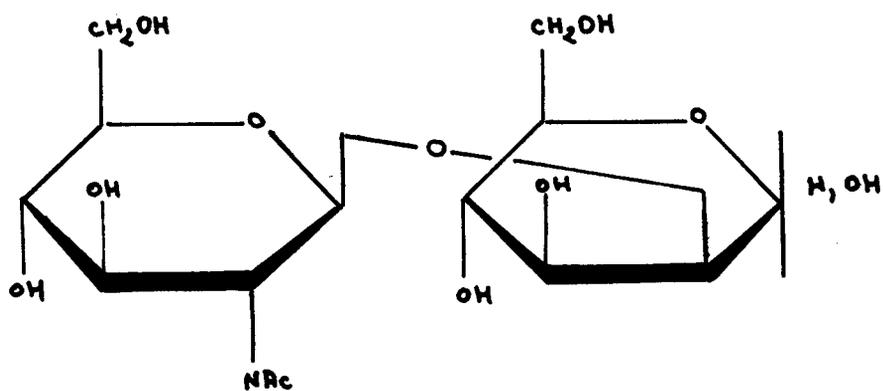
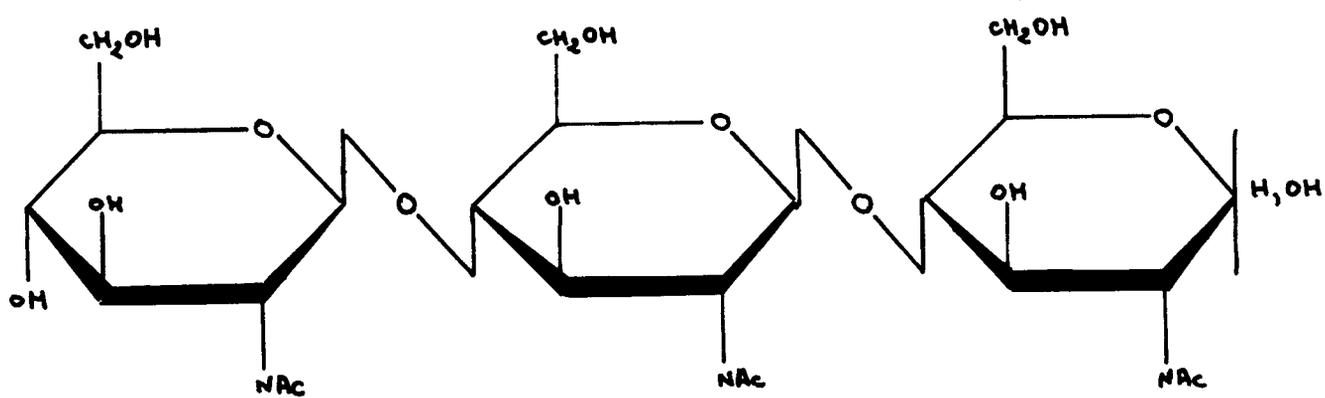
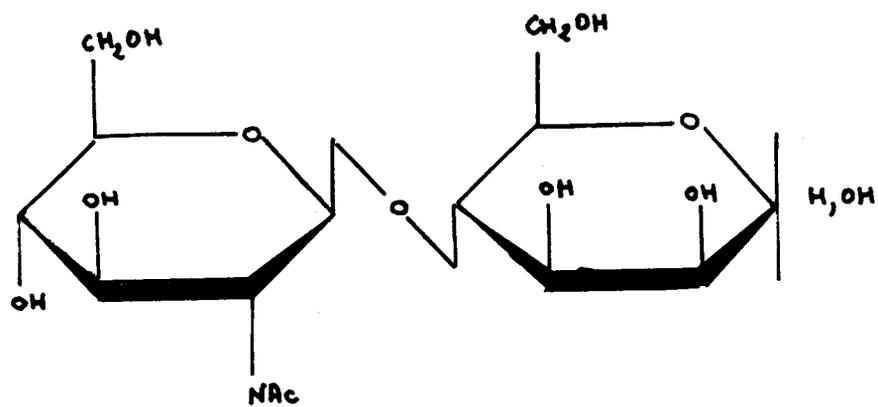
Les conditions de l'hydrolyse sont toujours les mêmes : à 100  $\mu\text{l}$  d'une solution renfermant de l'hétéroside en concentration variable 0 à 10 mM, on ajoute 300  $\mu\text{l}$  de tampon de Mc ILLVAINE (186) et 100  $\mu\text{l}$

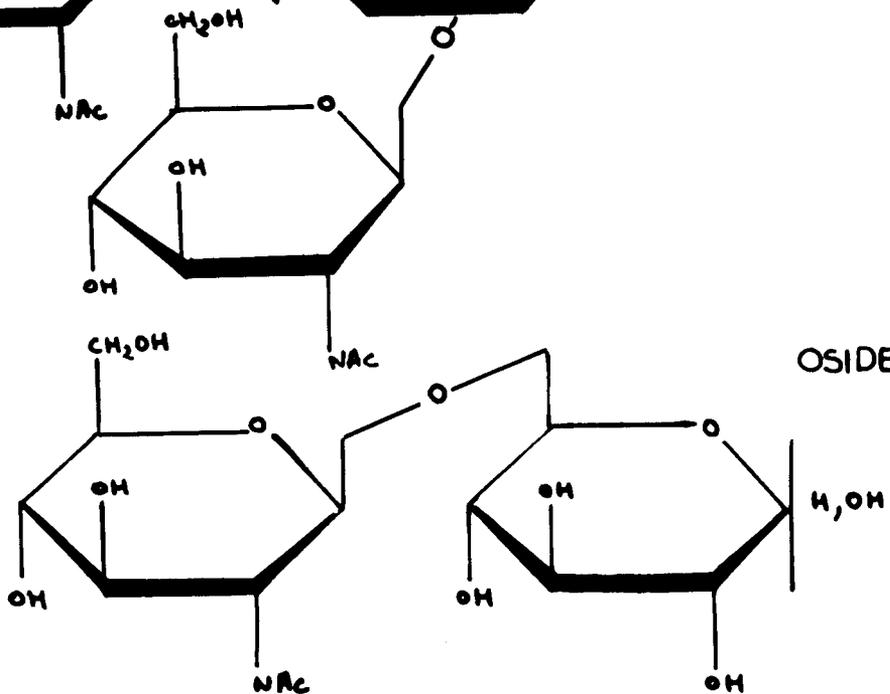
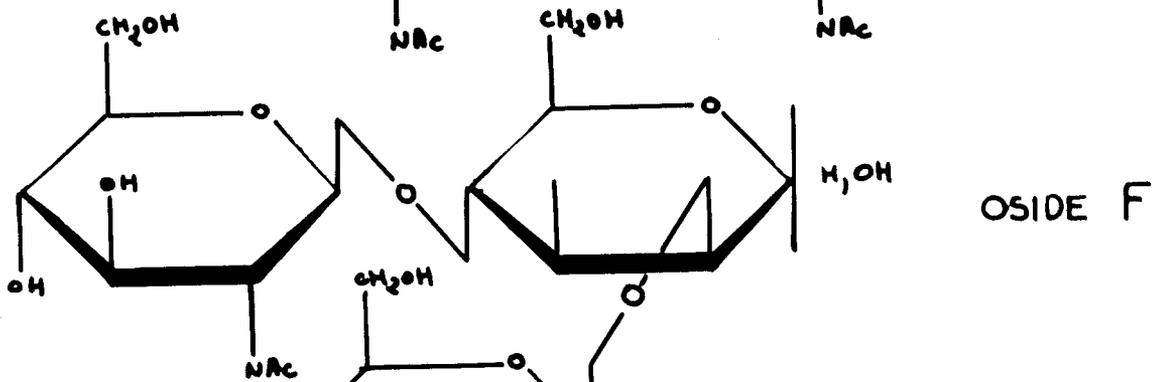
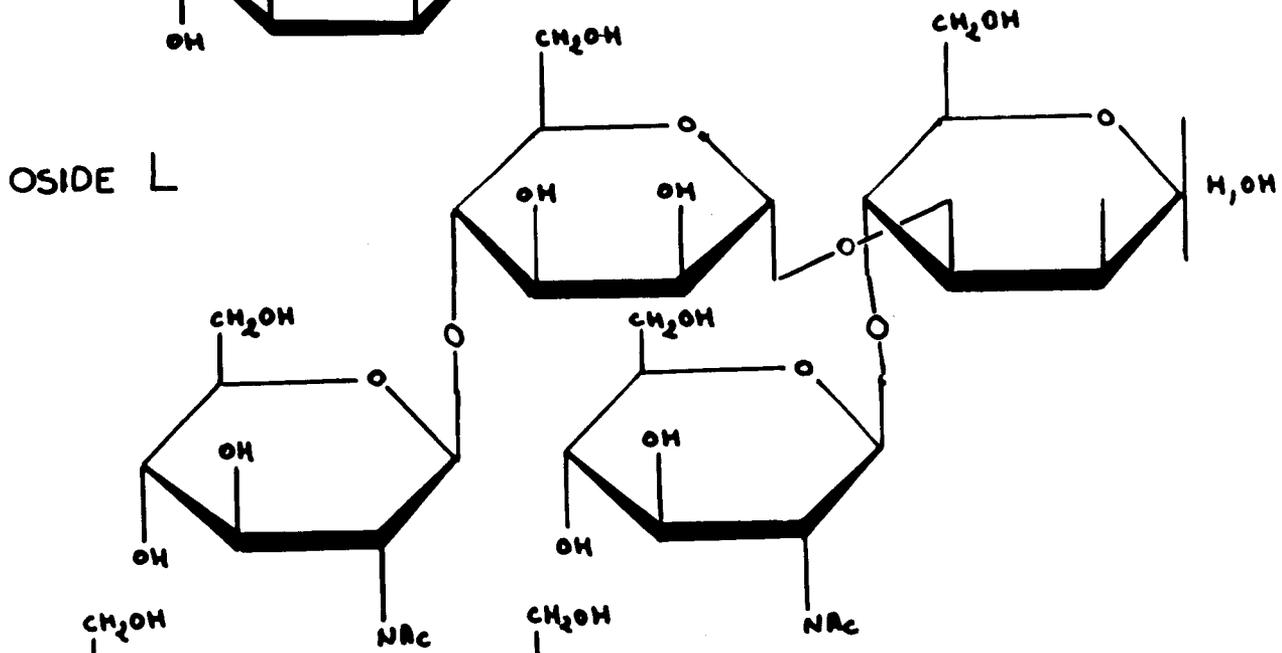
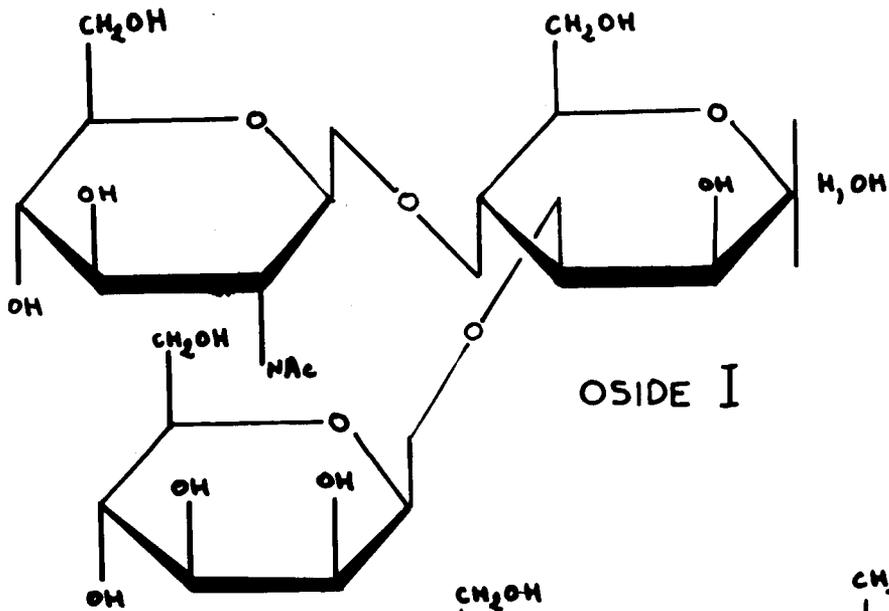
(\*) Nous remercions très vivement Monsieur le Professeur O.P. BAHL qui nous a fourni cet oligosaccharide.

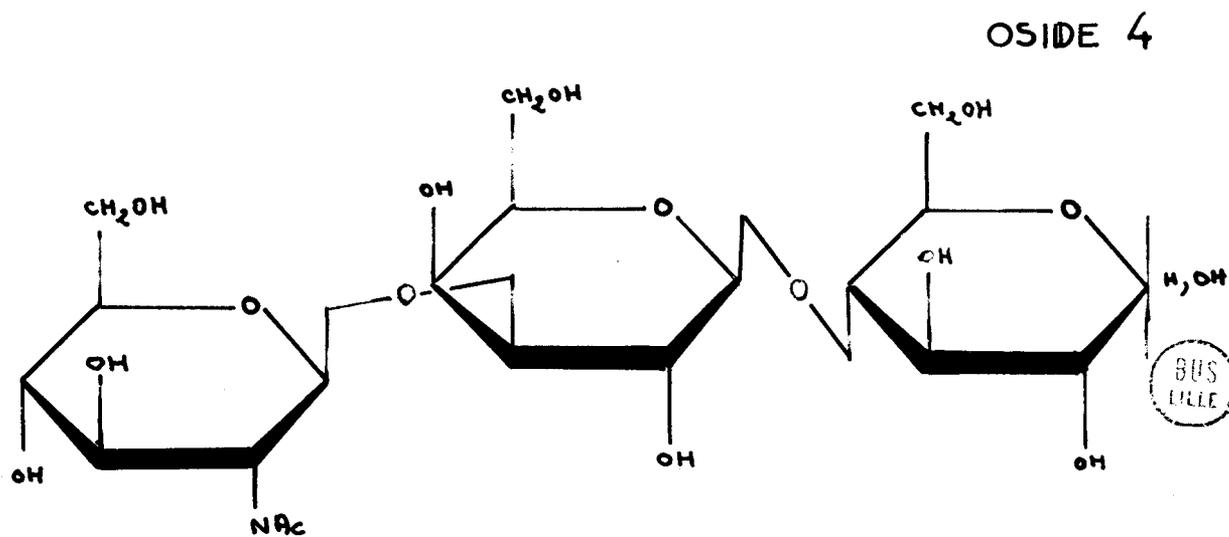
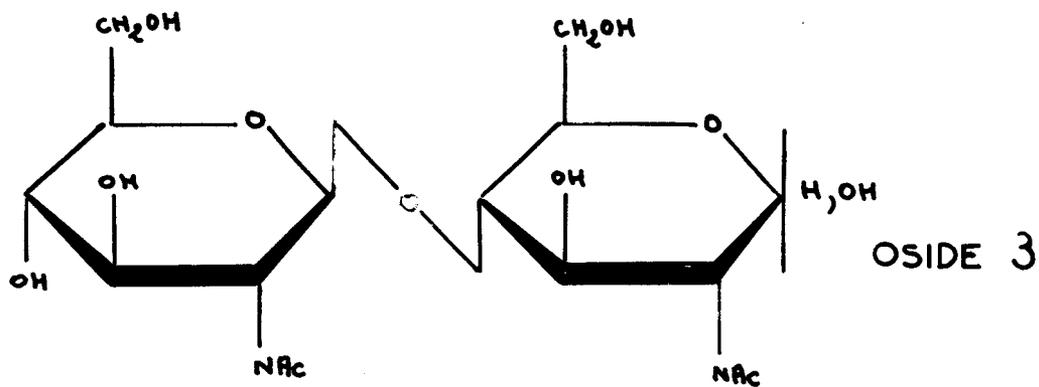
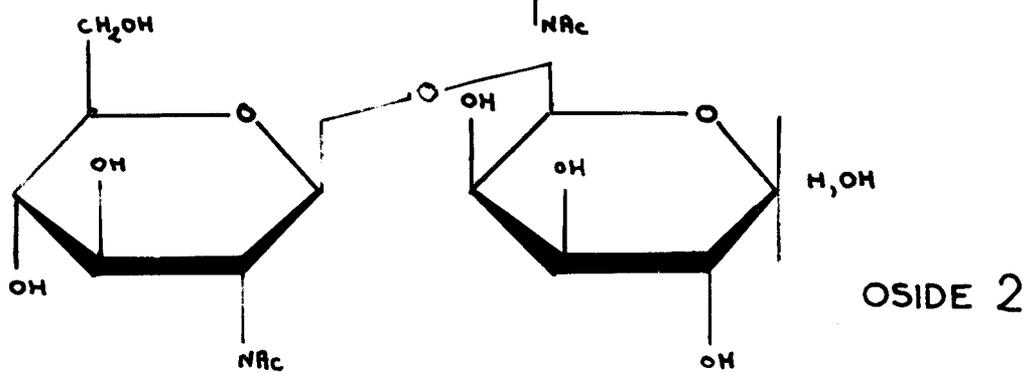
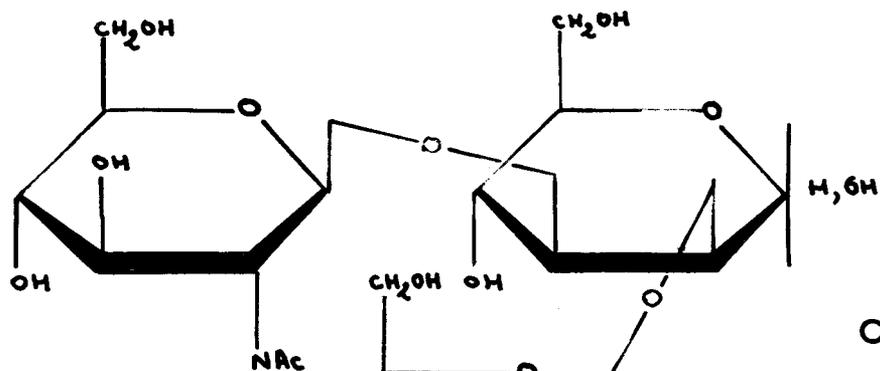
(\*\*) Nous remercions Monsieur G. STRECKER qui nous a fourni cet oligosaccharide.

(\*\*\*) Nous remercions Monsieur L. GRIMMONPREZ qui nous a fourni cet oligosaccharide.

Figure n° 13 : Schémas de structure des osides utilisés  
au cours de l'hydrolyse enzymatique.







BUS  
LILLE

de la solution enzymatique dont la teneur en protéine est variable. Les hydrolysats sont ensuite maintenus à 37°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par addition de 500 µl de carbonate de sodium molaire.

## II - DETERMINATION DU PH OPTIMUM

A 100 µl de solution enzymatique on ajoute 800 µl de solution tampon de pH variable. On abandonne les solutions pendant 30 minutes à température ambiante afin d'obtenir l'équilibre. Puis l'hydrolyse est réalisée dans les conditions précédemment décrites.

## III - ACTION DE LA TEMPERATURE

Toutes les solutions sont d'abord maintenues à la température étudiée pendant 10 minutes. Ensuite l'hydrolyse d'une solution d'hétéroside de synthèse 5mM est réalisée comme décrit à la page 64. I.

## IV - ACTION DES EFFECTEURS

### A - ACTION DES CATIONS

A 100 µl de solution enzymatique on ajoute 800 µl de tampon de Mc ILLVAINE (187) dont le pH correspond au pH optimum de l'enzyme. Les tampons renferment des cations de nature variable à une concentration de 10 mM. Le mélange est maintenu 30 minutes à température ambiante, ensuite, 100 µl de la solution 5 mM d'hétéroside de synthèse sont ajoutés. Les hydrolysats sont maintenus 10 minutes à 37°C.

### B - ACTION DES INHIBITEURS

Le protocole expérimental est identique à celui qui vient d'être décrit. Les cations sont remplacés par des inhibiteurs dont la concentration varie entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  M pour le parachloro-mercuribenzoate de sodium, la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et la N-acétylgluconolactone enfin de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  M pour l'iodoacétamide et les ions acétate.

V - DETERMINATION DE LA CONSTANCE DE MICHAELIS

A 100  $\mu$ l d'une solution de 0,2 à 5 mM d'hétéroside de synthèse ou l'oligosaccharide naturel on ajoute 300  $\mu$ l de tampon de Mc ILLVAINE (188) dont le pH correspond au pH optimum de l'enzyme et 100  $\mu$ l de la solution enzymatique. Les solutions sont maintenues pendant 10 minutes à 37°C lors de l'hydrolyse des hétérosides de synthèse et pendant 2 heures lors de l'hydrolyse des oligosaccharides naturels. La réaction est arrêtée par chauffage de 3 minutes à 100°C.

-----

R E S U L T A T S
-------------------

L'ensemble des résultats obtenus peut s'incrire dans les chapitres suivants :

1. Purification des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases.
2. Etude de différents facteurs sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique.
3. Spécificité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases.

1. - PURIFICATION DES  $\beta$ -N-ACÉTYLHEXOSAMINIDASES

I - PURIFICATION DE LA  $\beta$ -N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ISOLÉE D'ASPERGILLUS NIGER SELON LE PROCÉDE DE BAHL et ACRAWAL (139).

Les résultats obtenus après précipitation du Rhozyme HP 150 par le sulfate d'ammonium à 80 p.100 après ultrafiltration et chromatographie sur colonne de Biogel P 300 sont illustrés dans les figures 14 et 15 (p. 72 et p. 73). Nous voyons que sur colonne de Biogel P-300, la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase est éluée frontalement, elle est suivie de la  $\beta$ -D-galactosidase. Après une **ultrafiltration** et un deuxième passage sur colonne de Biogel P-300 nous obtenons une solution de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, sans aucune trace d'activité  $\beta$ -D-galactosidasique. L'enzyme est purifiée 96 fois.

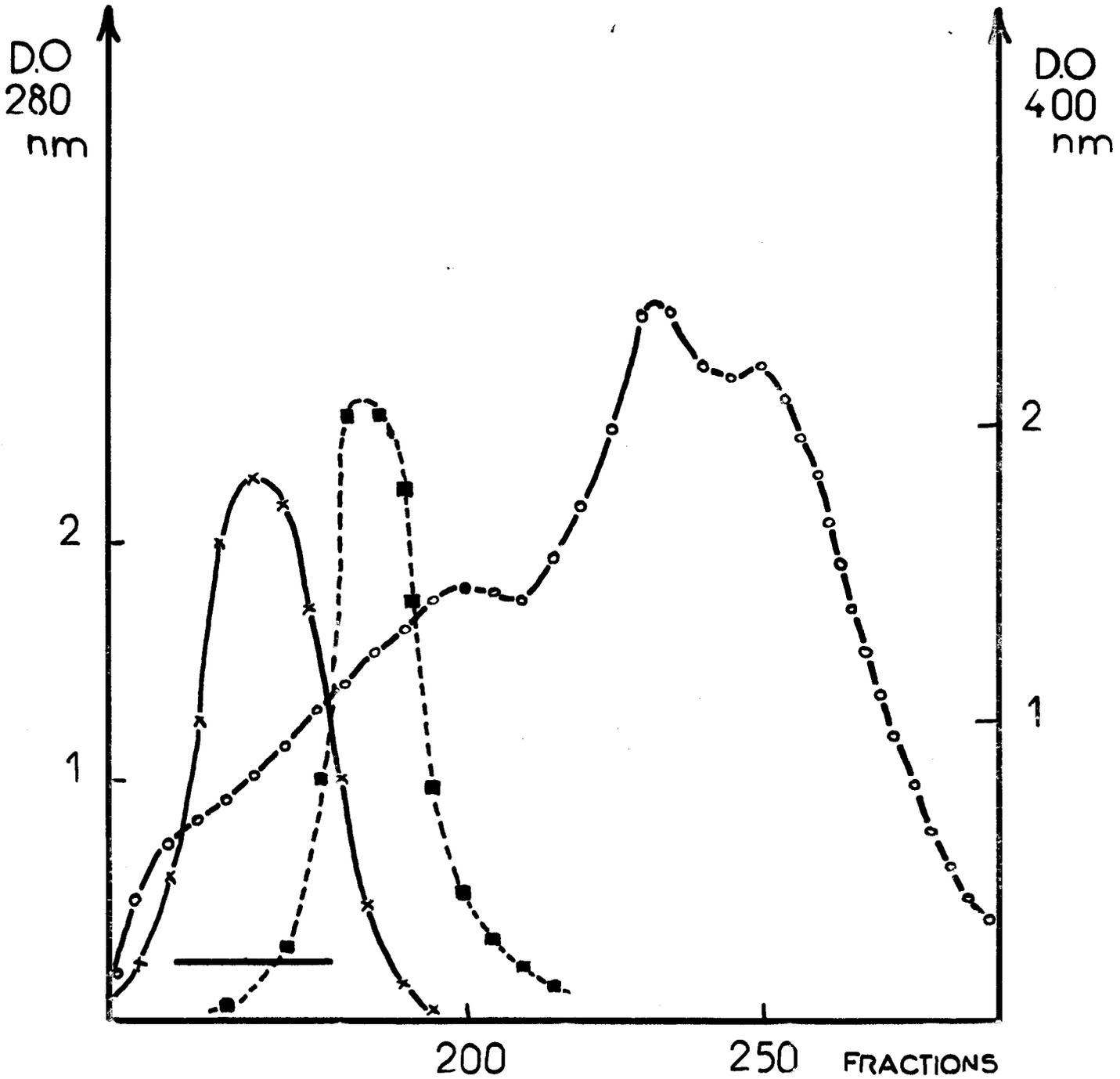


Figure n° 14 : Diagramme de fractionnement des osidases de l'*Aspergillus niger* après chromatographie sur Bio-gel P-300 (5 x 100).

- ——— ○ Absorbance à 280 nm
- x ——— x  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase
- - - - ■  $\beta$ -D-galactosidase
- Fractions concentrées



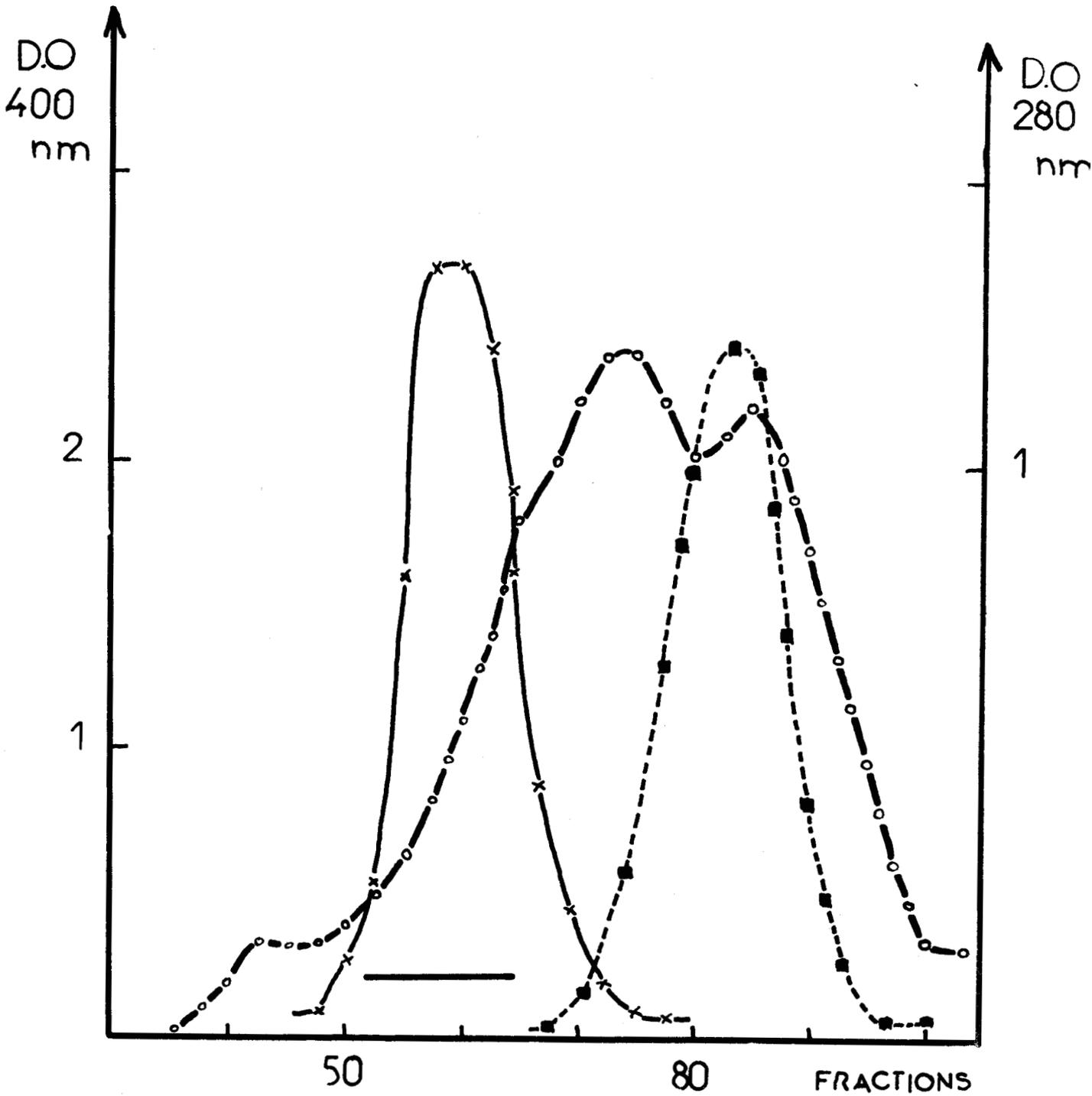


Figure n° 15 : Diagramme de fractionnement des osidases de l'Aspergillus niger après une deuxième chromatographie sur Bio-gel P-300 (2,5 x 120 cm).

- ——— ○ Absorbance à 280 nm
- x ——— x β-N-acétylglucosaminidase
- - - - ■ β-D-galactosidase
- Fractions concentrées



II - PURIFICATION DE LA  $\beta$ -N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ISOLÉE DES GRAINES  
GERMÉES DE FENUGREC, SELON LE PROCÉDE DE BEAUGIRAUD et al. (190)  
MODIFIÉ.

La purification sur colonnes couplées de Sephadex G-200 de la solution enzymatique a été réalisée dans les conditions décrites à la page 53. Après élution par le tampon citrate-phosphate, les mesures d'absorbance réalisées à 280 nm ont permis de tracer le diagramme donné dans la figure 16 (p. 75). Nous avons reporté sur ce même diagramme les courbes d'activités enzymatiques. Nous remarquons que dans une zone pauvre en protéine, 4 glycosidases sont éluées dans l'ordre suivant :  $\alpha$ -D-mannosidase,  $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminidase,  $\beta$  et  $\alpha$ -D-galactosidases.

Le passage sur deux colonnes couplées de Sephadex améliore nettement la séparation de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase des autres glycosidases. Cette méthode présente cependant un inconvénient : l'augmentation du volume d'élution, et la nécessité de concentrer par ultrafiltration sur membrane "Amicon" PM 30. Notons que l'enzyme reste stable après ultrafiltration mais perd 70 p.100 de son activité au cours de la lyophilisation.

Les études de cinétique de germination réalisées au bout de 48, 60 et 130 heures ont montré que le maximum de l'activité de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase est obtenu après 48 heures de germination. Dans les figures 17 et 18 (p. 76 et p. 77) sont rassemblés les diagrammes d'élution des solutions enzymatiques obtenus après des temps variables de germination, enfin dans le tableau XVIII (p. 78) sont reportées les activités spécifiques de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase au cours de la cinétique de germination. Nous voyons qu'au bout de 48 heures, l'activité spécifique est 21 fois supérieure à celle du temps 0. Cette durée de 48 heures sera donc utilisée lors de la préparation de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase à partir des graines germées de Fenugrec. On obtient ainsi une enzyme purifiée 58 fois.

III - PURIFICATION DE LA  $\beta$ -N-ACÉTYLHEXOSAMINIDASE ISOLÉE DE LA FEVE  
JACK SELON LE PROCÉDE DE LI ET LI (191)

Les résultats analogues à ceux obtenus par LI et LI (192)

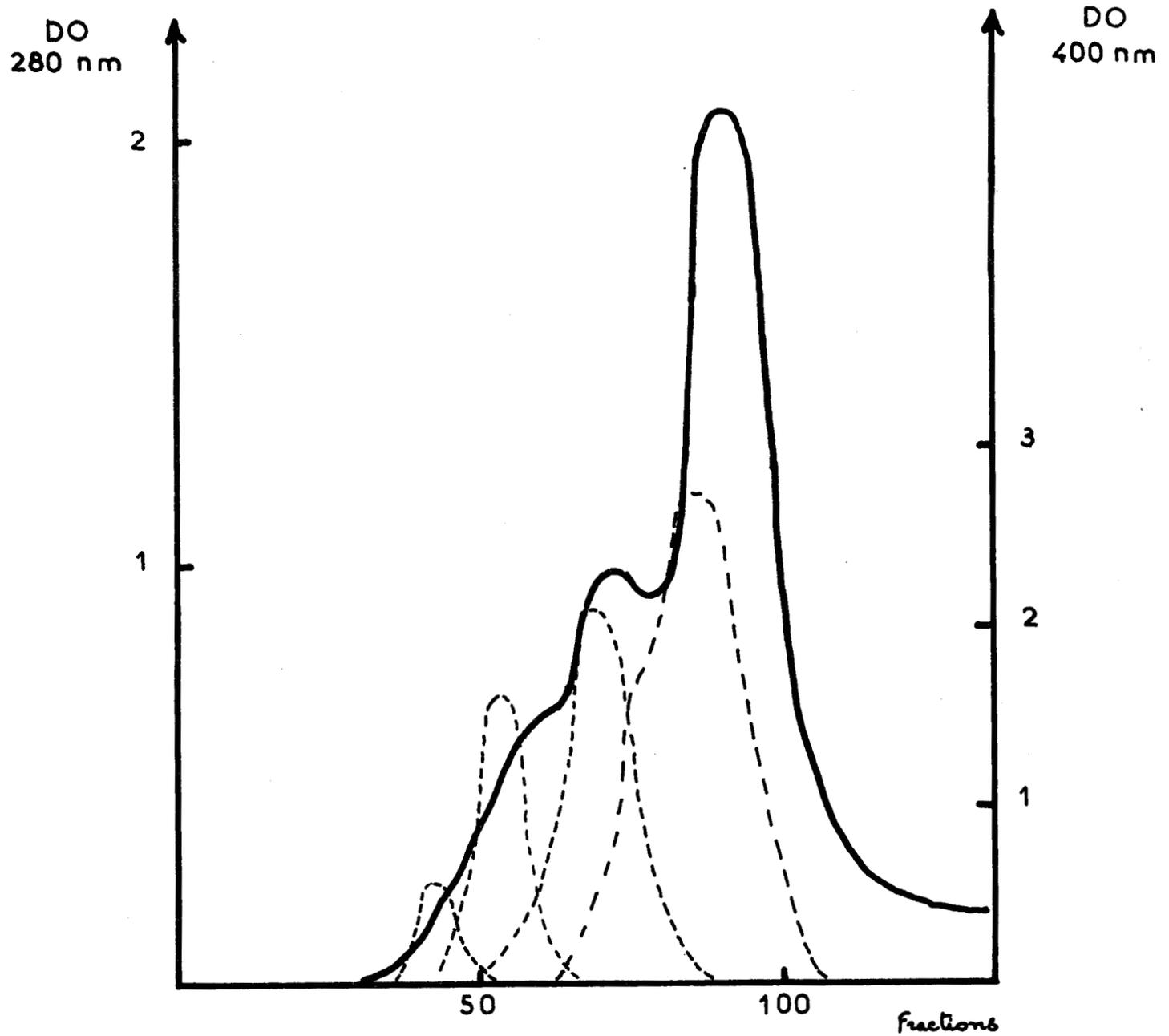


Figure n° I6 : Diagramme de fractionnement des osidases des graines germées de Fenugrec après chromatographie sur Sephadex G 200.

— Proteines  
 - - - - - Osidases



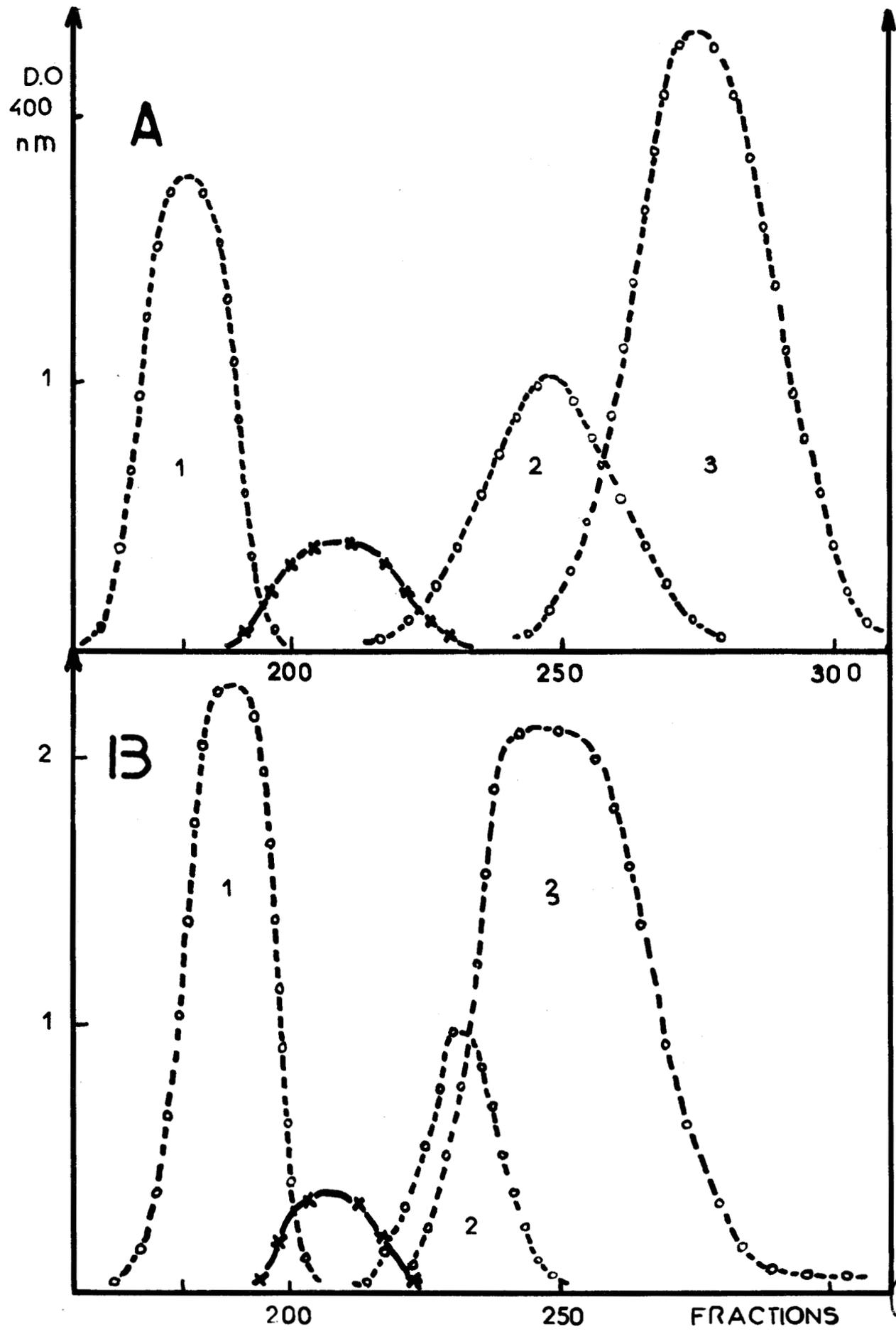


Figure n° 18 : Diagramme de fractionnement des osidases des graines germées de Fenugrec après chromatographie sur Sephadex G-200.

A : 60 heures de germination  
 B : 130 heures de germination

$\times$  —  $\times$   $\beta$ -N-acétylhexosaminidase  
 1  
 $\times$  —  $\times$   $\alpha$ -D-mannosidase  
 2  
 $\times$  —  $\times$   $\beta$ -D-galactosidase  
 3  
 $\times$  —  $\times$   $\alpha$ -D-galactosidase

T A B L E A U XVIII

Activités spécifiques de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée à partir de graines germées de Fenugrec. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g de p-nitrophénol libéré par minute et par mg de protéine.

Durées de la germination (en heures)	Solution enzymatique obtenue	
	Après précipitation au sulfate d'ammonium	Après gel filtration sur colonne de Sephadex G-200
0	7,6	166
48	59,5	3498
60	40,7	1134
130	11,7	231

sont donnés dans les figures 19 et 20 (p. 80 et p. 81). Cependant, une seule précipitation par l'éthanol au point isoélectrique s'est révélée être insuffisante pour purifier la  $\beta$ -D-N-acétylhexosaminidase. Aussi nous avons réalisé un deuxième cycle de précipitation éthanolique dans les mêmes conditions. Après les différentes chromatographies sur colonne de Sephadex dans les conditions décrites à la page 57, nous obtenons une enzyme purifiée 477 fois.

#### IV - PURIFICATION DE LA $\beta$ -N-ACÉTYLHEXOSAMINIDASE ISOLÉE DE LA RATE DE BOEUF SELON LE PROCÉDE DE WERRIES et al. (193)

Les conditions expérimentales sont décrites à la page 59. Le précipité obtenu à 66 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium renferme des hexosaminidases et une  $\alpha$ -D-mannosidase. Après chromatographie sur colonne de Sephadex G-200 et d'hydroxylapatite nous avons obtenus les résultats donnés dans les figures 21 et 22 (p. 82 et 83). Une seule chromatographie sur Sephadex est suffisante pour obtenir une enzyme purifiée 84 fois. Lorsque la chromatographie est réalisée sur gel d'hydroxylapatite les éluions par des tampons phosphate 0,05 M, 0,1 M et 0,2 M permettent d'obtenir chaque fois un pic possédant une activité  $\beta$ -N-acétylhexosaminidasique.

Nous ne savons pas encore si les trois formes de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases éluées à des molarités différentes correspondent à des isozymes ou tout simplement à des associations entre la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase et des protéines non enzymatiques qui entraîneraient un retard dans l'éluion.

#### II - CONCLUSIONS

Nous avons rassemblé dans le tableau XIV (p. 84) les variations de l'activité spécifique des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases au cours des différentes étapes des quatre fractionnements que nous avons décrits. Nous pouvons remarquer que 3 à 6 étapes sont nécessaires pour obtenir des purifications qui vont de l'ordre de 3.000 à 11.000. La purification de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase de la Fève Jack nécessite un nombre d'étapes élevé mais cela permet d'obtenir une enzyme très

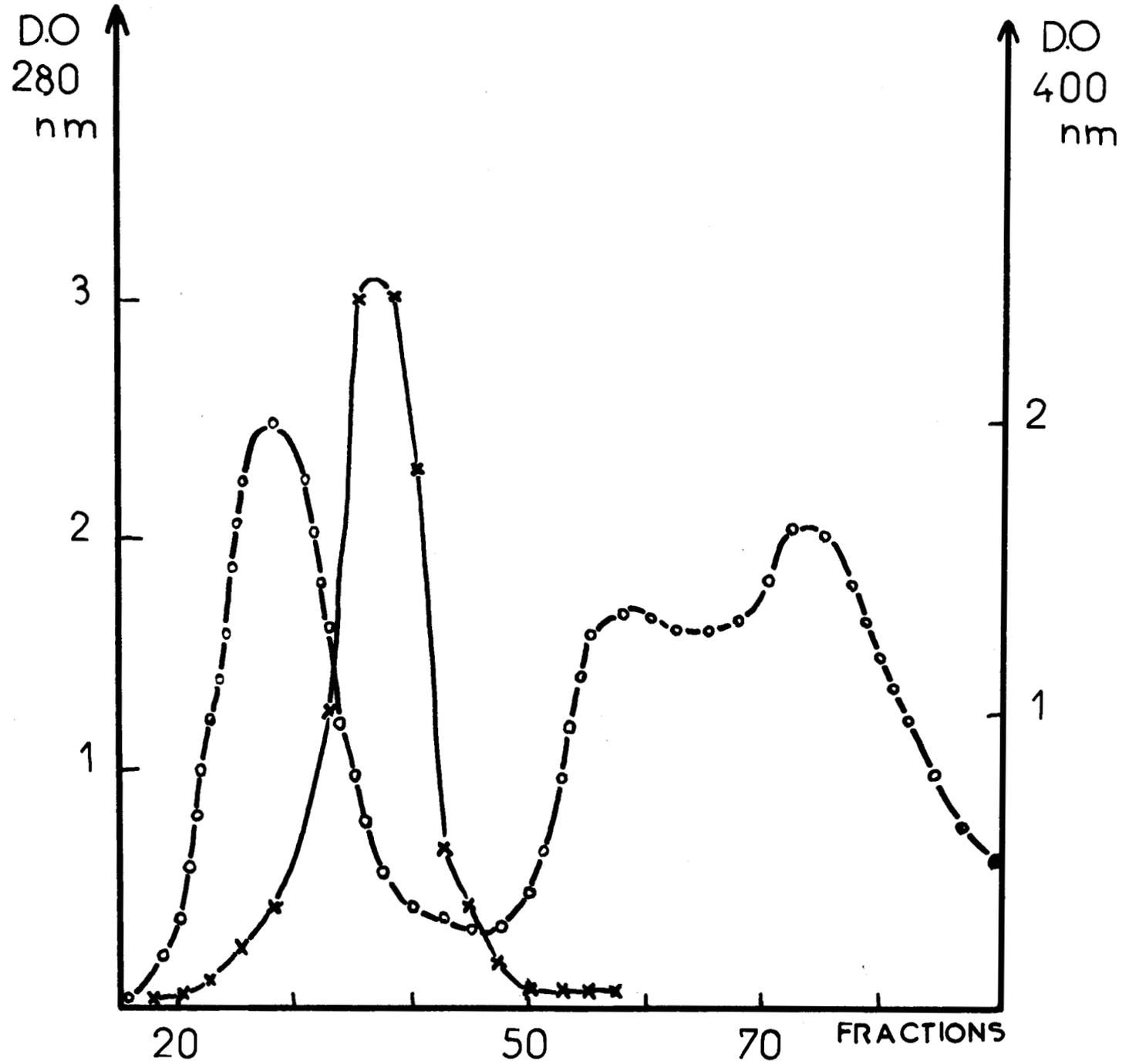


Figure n° 19 : Diagramme de fractionnement de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase de la Fève Jack. Chromatographie sur Sephadex G-200 (5 x 100 cm)

○ ——— ○ Absorbance à 280 nm  
 x ——— x  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase



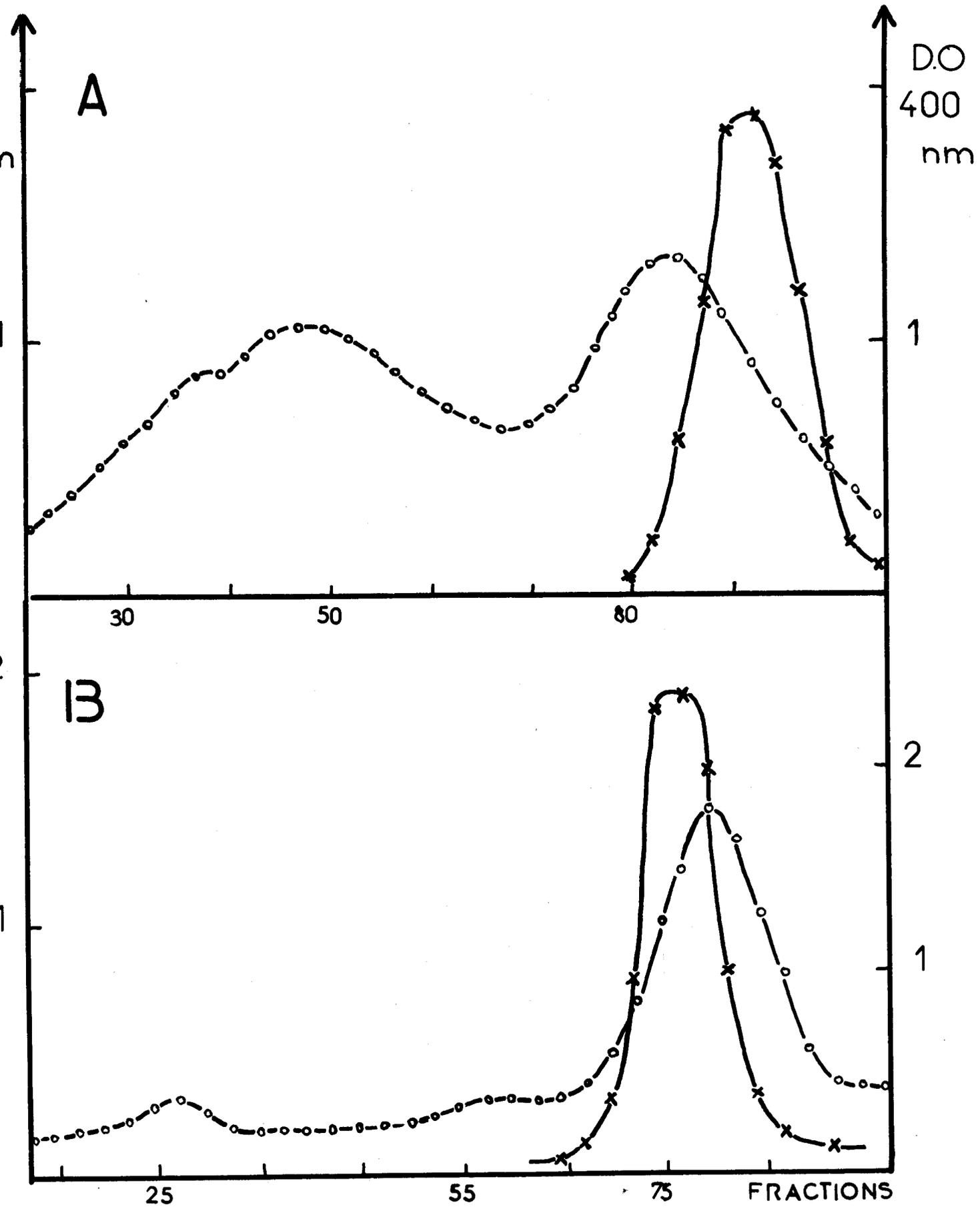


Figure n° 20 : Purification de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase de la Fève

Jack .

A : Chromatographie sur DEAE Sephadex

B - Chromatographie sur CM-Sephadex



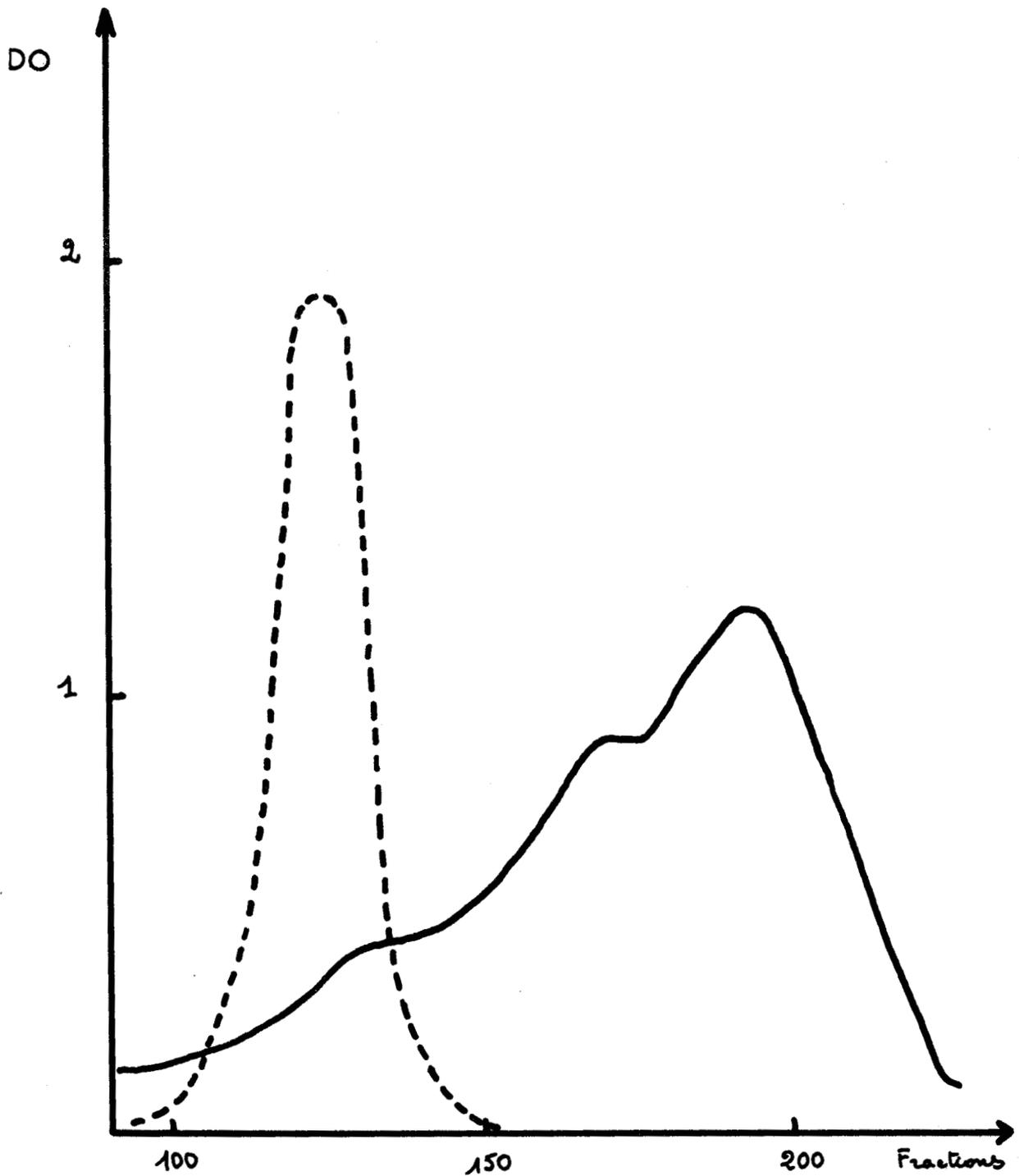


Figure n° 21 : Diagramme de fractionnement de la  $\beta$ -N-Acétylexosaminidase de la Rate de Boeuf. Chromatographie sur Sephadex G 200 .

————— Proteines  
-----  $\beta$ -N-Acétylexosaminidase

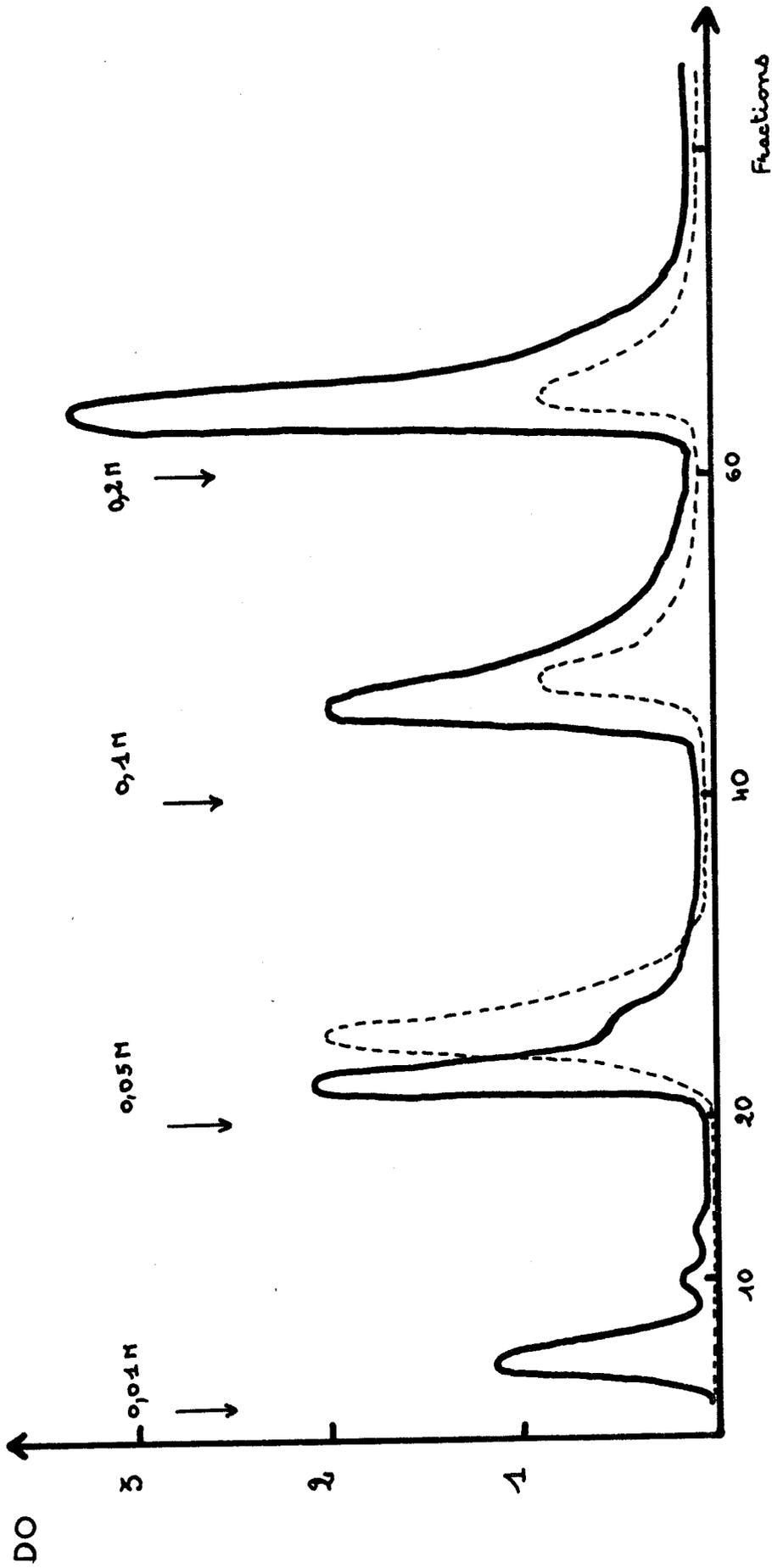


Figure n° 22 : Diagramme de fractionnement des  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidases de la Rate de Boeuf.

Chromatographie sur hydroxylapatite.

— Proteines

- - -  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase

Activités spécifiques des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines diverses. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g de p-nitrophénol libéré par mn et par mg de protéine.

Enzymes Etapas de fractionnement	<u>Aspergillus niger</u>		Graines germées de Fenugrec		Fève Jack		Rate de Boeuf	
	Teneur en protéine totale(mg)	Activité	Teneur en protéine totale(mg)	Activité	Teneur en protéine totale(mg)	Activité	Teneur en protéine totale(mg)	Activité
Fraction brute	2524	47,6		non déterminée	7463	23,8	12.563	44
Traitement pH 4,0							4.152	154
Sulfate d'ammonium I	460	75	240	59,5	1018	178,5	624	642
Sulfate d'ammonium II							93	1499
Ultrafiltration	414	82,1	48	202,3				
Précipitation à l'éthanol					212	476		
Bio-Gel P-300 I	36	714						
Bio-Gel P-300 II	3,75	4545						
Sephadex G-200			4,2	3498	29	606	7,5	3819
DEAE Sephadex					2,24	4046		
CM Sephadex					1,2	11.543		

pure. LI et LI (194) ont réussi à cristalliser cette enzyme.

Il est à noter que la stabilité des solutions enzymatiques diminue en fonction du degré de pureté de l'enzyme. Pour éviter cette perte d'activité, les solutions peuvent être concentrées par passage sur membrane Amicon ou additionnées de sérum-albumine. La sérum-albumine joue un rôle protecteur lorsque la solution enzymatique est trop diluée.

S'il est assez difficile de préparer des solutions enzymatiques suffisamment pures il est tout aussi malaisé de les conserver. Elles sont sensibles aux chocs thermiques, en particulier à la congélation, décongélation, enfin à 4°C, il y a risque d'autodégradation.

## 2. - CINETIQUES D'HYDROLYSES ENZYMATIQUES

Comme nous l'avons déjà précisé page 64, les hydrolyses doivent être réalisées dans des conditions bien définies. Nous allons étudier quelques uns des facteurs influençant la cinétique d'hydrolyse enzymatique.

### I - DETERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION

L'action du pH sur l'activité enzymatique a été étudiée à l'aide de tampon phosphate citrate de Mc ILVAINE (195). Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 23 et 24 (p. 86 et p. 87). Nous pouvons remarquer que les pH optima des enzymes isolées à partir de la rate et du foie de Boeuf ainsi que celle isolée de l'Aspergillus niger sont très voisin de 4,5 et 5,0. Les deux enzymes isolées à partir des végétaux possèdent au pH optimum de 5,2 à 5,6. Il est à noter que le pH ne varie pas lorsque l'hétéroside de synthèse est remplacé par un oside naturel (variations maximales : 0,2 unité de pH).

### II - ACTION DE LA TEMPERATURE

Nous avons fait réagir les enzymes à des températures variables afin de déterminer la température optimale d'action de chaque hexosaminidase. Les figures 25 et 26 (p. 88 et 89) nous montrent les résultats obtenus. Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

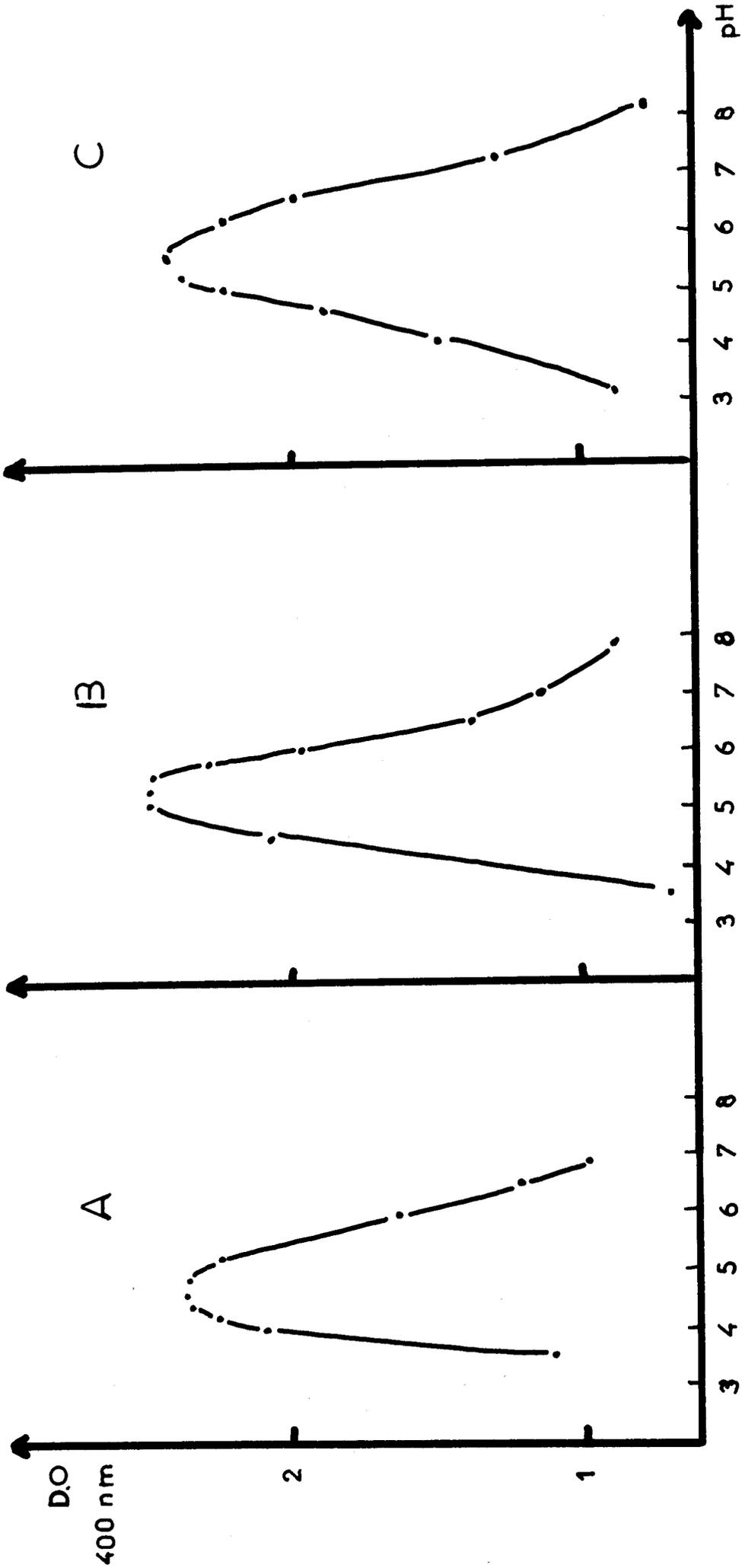


Figure n° 23 : Détermination du pH optimum des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

A - Aspergillus niger

B - Fève Jack

C - Graines germées de Fenugrec



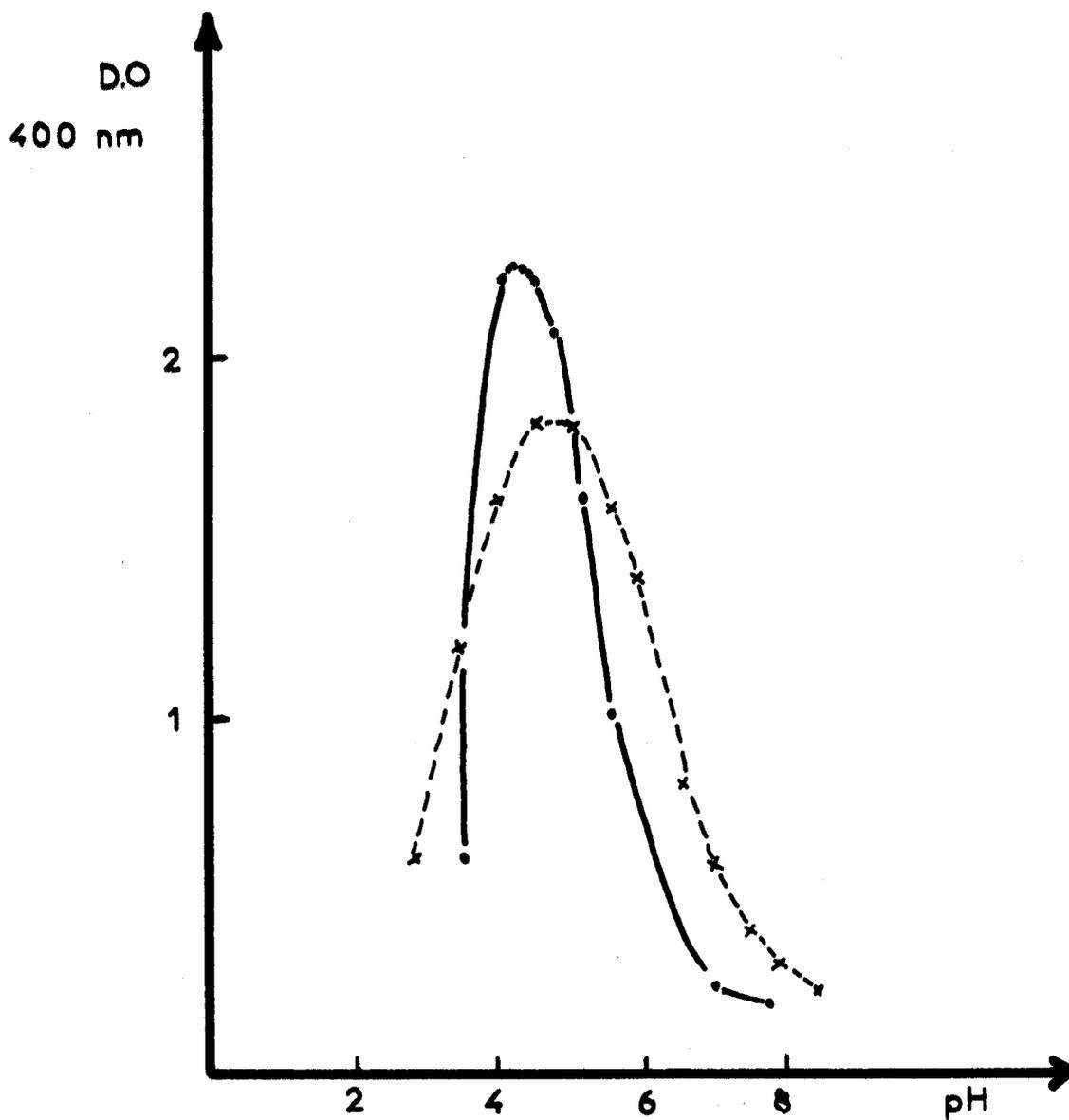


Figure n° 24 : Détermination du pH optimum d'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- ——— ● Rate de Boeuf  
x - - - - x Foie de Boeuf

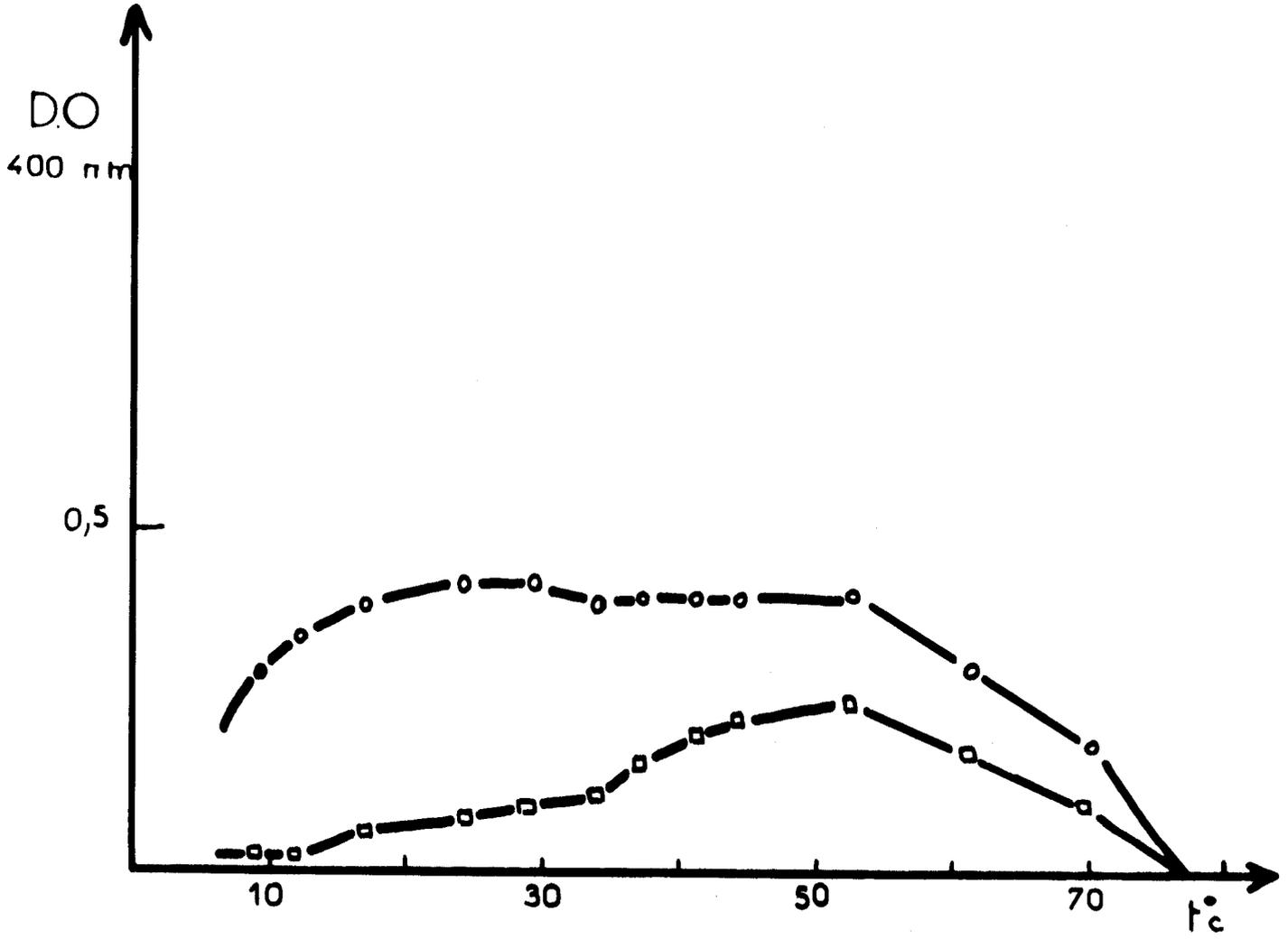


Figure n° 25 : Détermination de la température optimale d'action de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- ——— ○ Rate de Boeuf
- ——— □ Foie de Boeuf



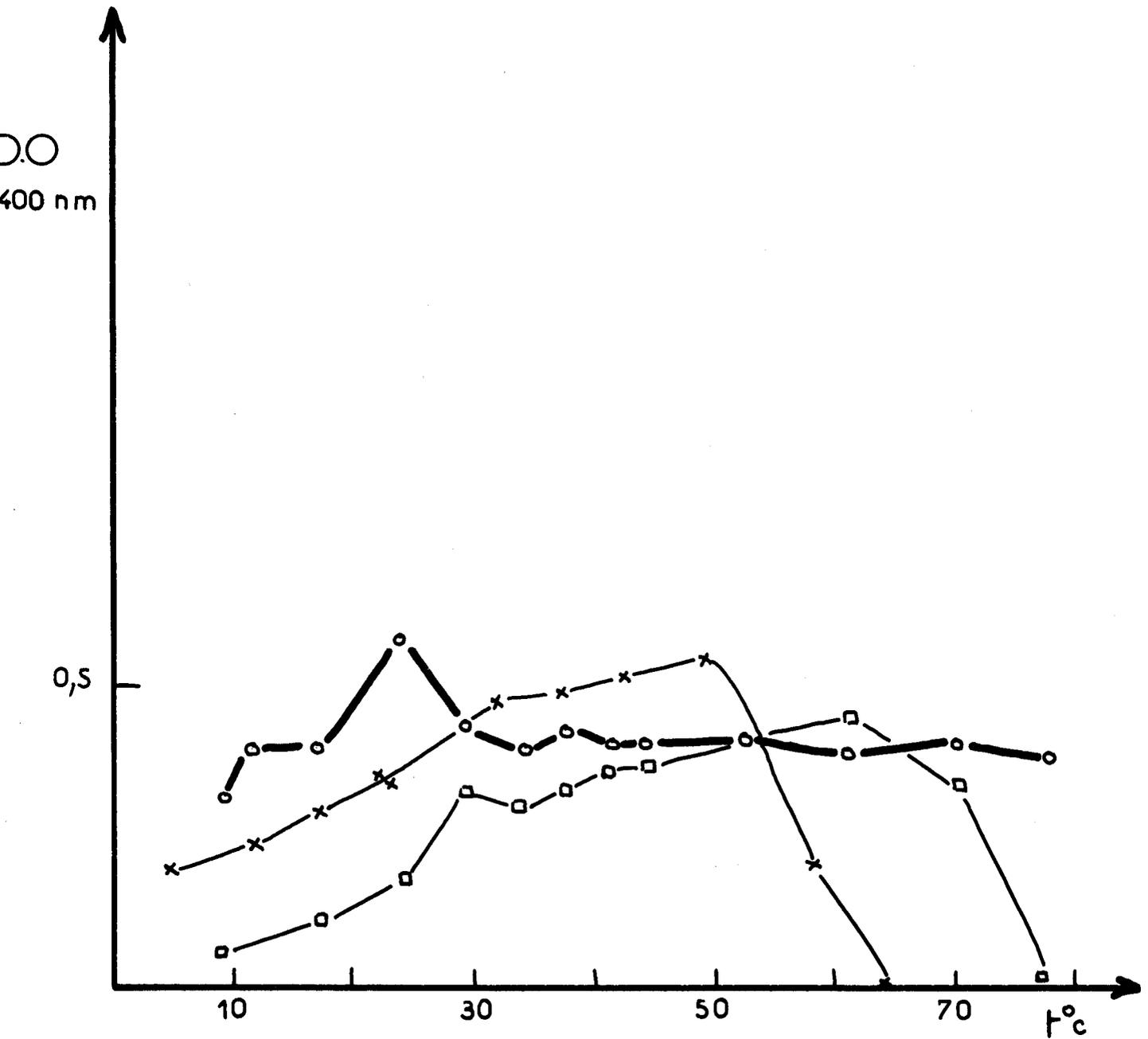


Figure n° 26 : Détermination de la température optimale d'action de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- ——— ○ Aspergillus niger
- ——— □ Fève Jack
- × ——— × Graines germées de Fenugrec

- L'enzyme isolée de la rate de Boeuf est stable entre 17 et 52°C, celle du foie présente un maximum entre 41 et 52°C. Elles sont complètement détruites à 70°C.
- L'enzyme isolée à partir d'Aspergillus niger présente un maximum d'activité à 24°C. Puis l'activité reste stable jusqu'à 70°C.
- L'hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec présente un maximum d'activité entre 37 et 40°C mais elle est détruite à partir de 60°C.
- L'enzyme isolée de la Fève Jack est stable jusqu'à 60°C mais elle est totalement détruite à 70°C.

Malgré ces larges variations, les hydrolyses seront réalisées à une température de 37°C sauf dans le cas d'Aspergillus niger où la température adoptée a été celle de 24°C.

### III - CINETIQUE DE CONCENTRATION EN ENZYME

Nous avons fait varier la concentration en enzyme de manière à définir les conditions expérimentales qui permettent d'obtenir des résultats proportionnels à cette concentration. Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans la figure 27 (p. 91). Nous remarquons que la proportionnalité de la réaction est vérifiée entre 0 et 10  $\mu$ l de solution enzymatique pour les enzymes isolées d'Aspergillus niger et de la Fève Jack ; soit respectivement des solutions renfermant de 0 à 9,8 et de 0 à 2,17  $\mu$ g de protéine ; entre 0 et 50  $\mu$ l, pour l'enzyme isolée de la rate de Boeuf soit une teneur en protéine variant de 0 à 2,7  $\mu$ g. Enfin la proportionnalité est vérifiée entre 0 et 100  $\mu$ l pour les enzymes isolées du foie de Boeuf et des graines germées de Fenugrec, soit respectivement de 0 à 44  $\mu$ g et de 0 à 4,4  $\mu$ g de protéines.

### IV - CINETIQUE DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT

Afin de définir les meilleures conditions de formation du complexe enzyme-substrat nous avons étudié les variations de l'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat. La figure 28 (p. 92)

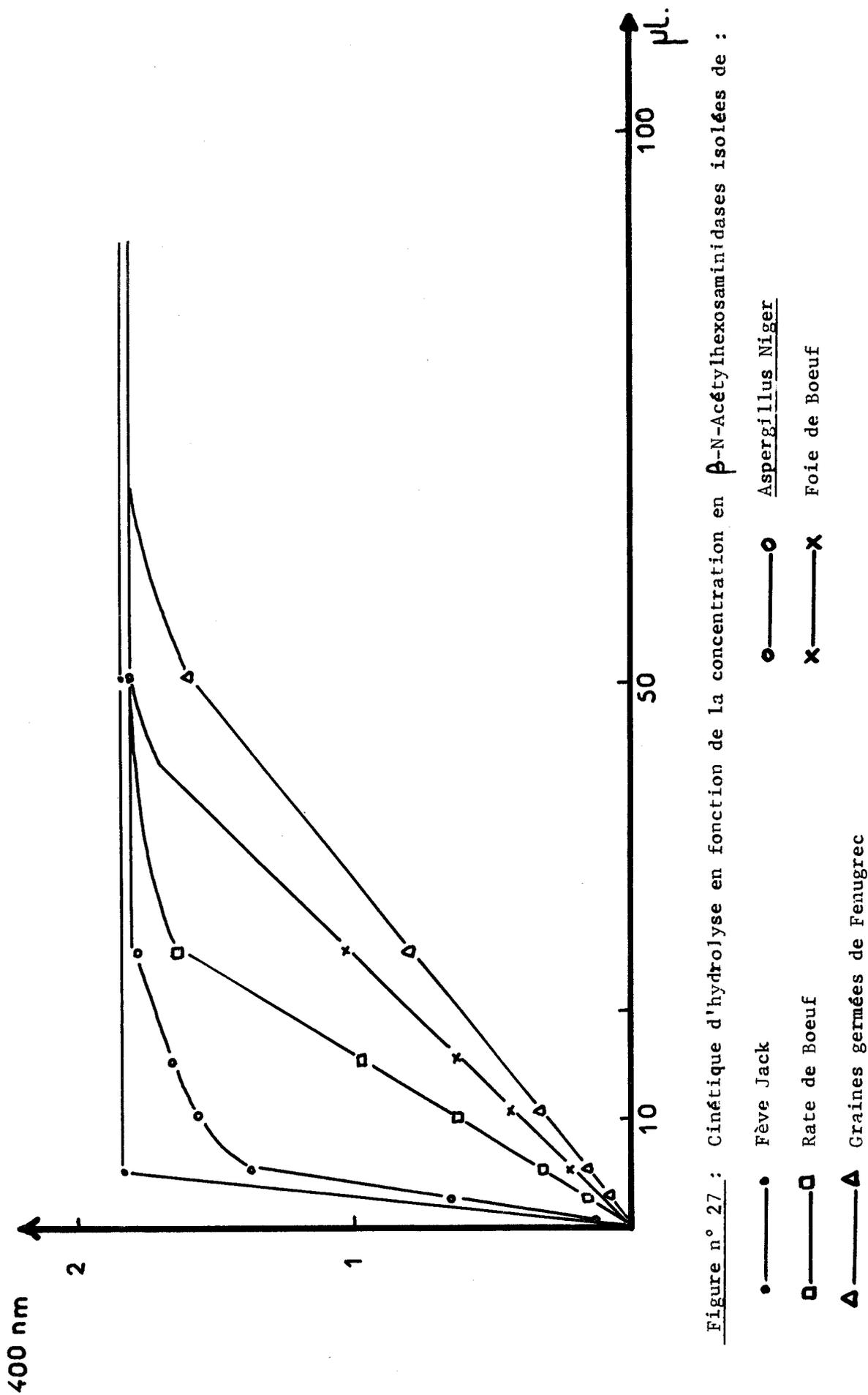


Figure n° 27 : Cinétique d'hydrolyse en fonction de la concentration en  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidases isolées de :

- — Fève Jack
- — Rate de Boeuf
- △ — Graines germées de Fenugrec
- — Aspergillus Niger
- × — Foie de Boeuf

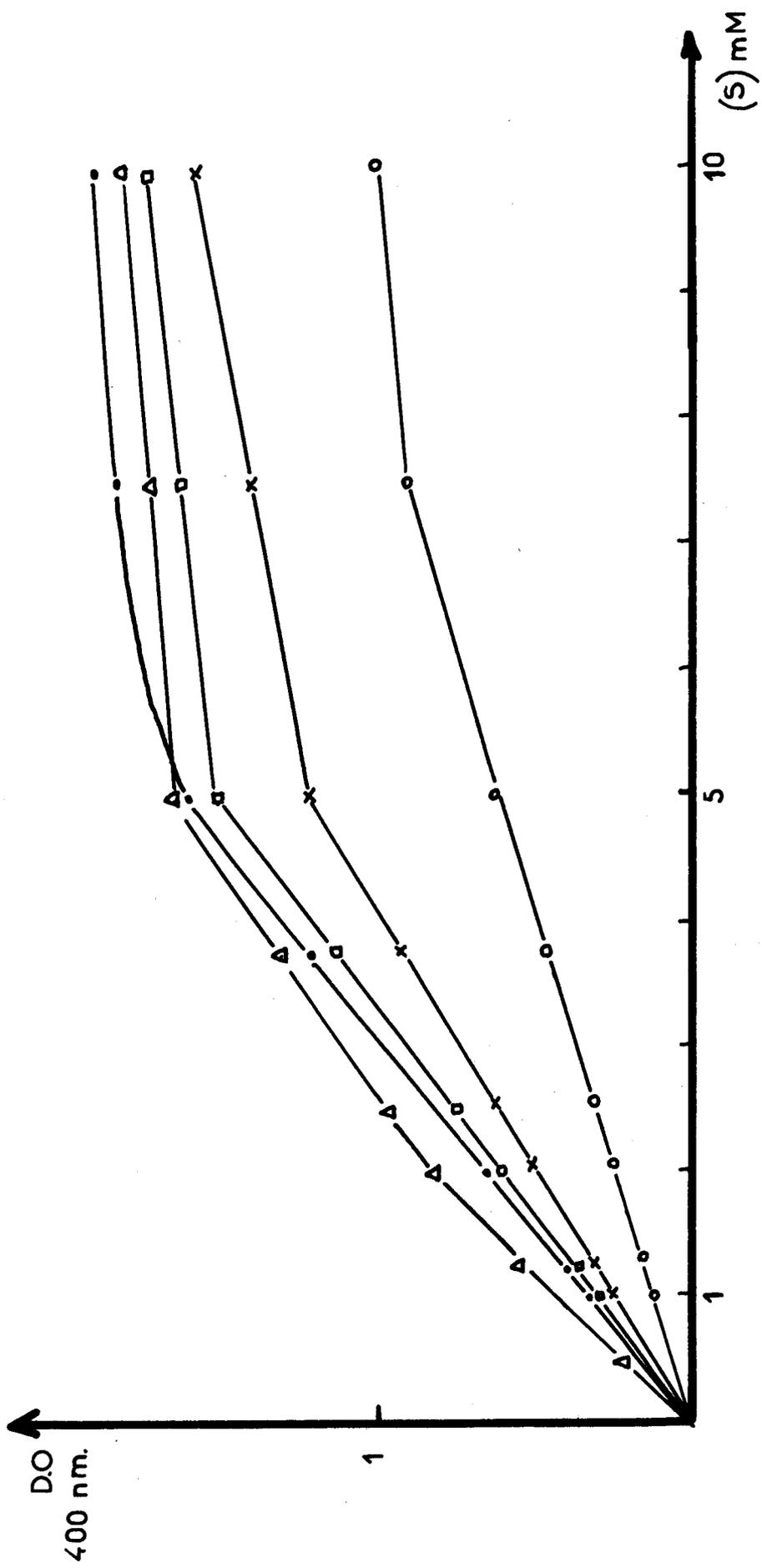


Figure n° 28 : Cinétique d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat

$\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- — Graines germées de Fenugrec
- ▲ — Aspergillus niger
- — Fève Jack
- × — Rate de Boeuf
- — Foie de Boeuf



rassemble les différents résultats obtenus. Nous pouvons remarquer que dans tous les cas la proportionnalité est vérifiée pour des concentrations en substrat variant de 0 à 5 mM.

## V - ACTION DES EFFECTEURS

### A) ACTION DES CATIONS

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées dans les conditions décrites à la page 69. L'influence des cations bivalents à une concentration de  $10^{-2}$  M sur les hydrolyses réalisées à l'aide des différents  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases est analysée dans le tableau XX (p. 94). D'une façon générale les enzymes que nous possédons ne sont pas ou peu influencées par les cations, toutefois l'action de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec est augmentée en présence des ions calcium. Le maximum d'activation est obtenu pour une concentration équivalente à 3mM en ions  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 29, p. 95). L'action de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée du foie de Boeuf est inhibée légèrement en présence de tous les cations, LI et LI (196) ; HUGHES et JEANLOZ (197) ont montré que les ions métalliques possèdent sur les hexosaminidases une action légèrement inhibitrice sauf toutefois les ions mercuriques qui inhibent fortement les enzymes. Nos résultats sont en accord avec ceux de ces auteurs. Par contre MURAMATSU (198) démontre que le chlorure de sodium est un activateur puissant de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée de Turbo cornutus. On pouvait penser que c'était un cas particulier, dû au fait que T. cornutus est un gastéropode marin. Or cette propriété avait été mise en évidence respectivement pour les enzymes isolées de l'épididyme de de Porc et du foie de Boeuf par FINDLAY et LEVY (199) et par WEISSMAN et al. (200).

L'activation dans ces deux derniers cas n'est que de l'ordre de 5 à 10 p.100. Dans notre cas le chlorure de sodium aurait même un rôle légèrement inhibiteur.

Nous avons d'autre part fait agir le monolauryl sulfate de sodium sur nos différentes préparations enzymatiques. Nous remarquons que toutes les enzymes sont inhibées sauf celle isolée de l'Aspergillus niger. Nous concluons que contrairement aux autres enzymes cette hexosaminidase se présenterait sous une forme de pelote statistique insensible

T A B L E A U XX

Influence des cations bivalents sur l'hydrolyse enzymatique de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines diverses. Résultats exprimés en p.100 d'hydrolyse.

Origine de l'enzyme cations $10^{-2}M$	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	Aspergillus niger
$Ca^{++}$	100	66	79,4	140	90
$Mn^{++}$	101	78	84,9	121	93,2
$Mg^{++}$	80,6	72,3	102,7	100	91,7
$Cd^{++}$	100	66	69,8	95	90,2
$Co^{++}$	100	70,4	-	94	94,7
$Hg^{++}$	0	0	0	4	35
NaCl	94,3	76,1	94,5	97	88
$Li^{+}$	78,4	87,6	87,6	-	67,6
S.D.S. (*)	3,7	0	0,5	0,2	90,2

(\*) S.D.S. : monolauryl sulfate de sodium



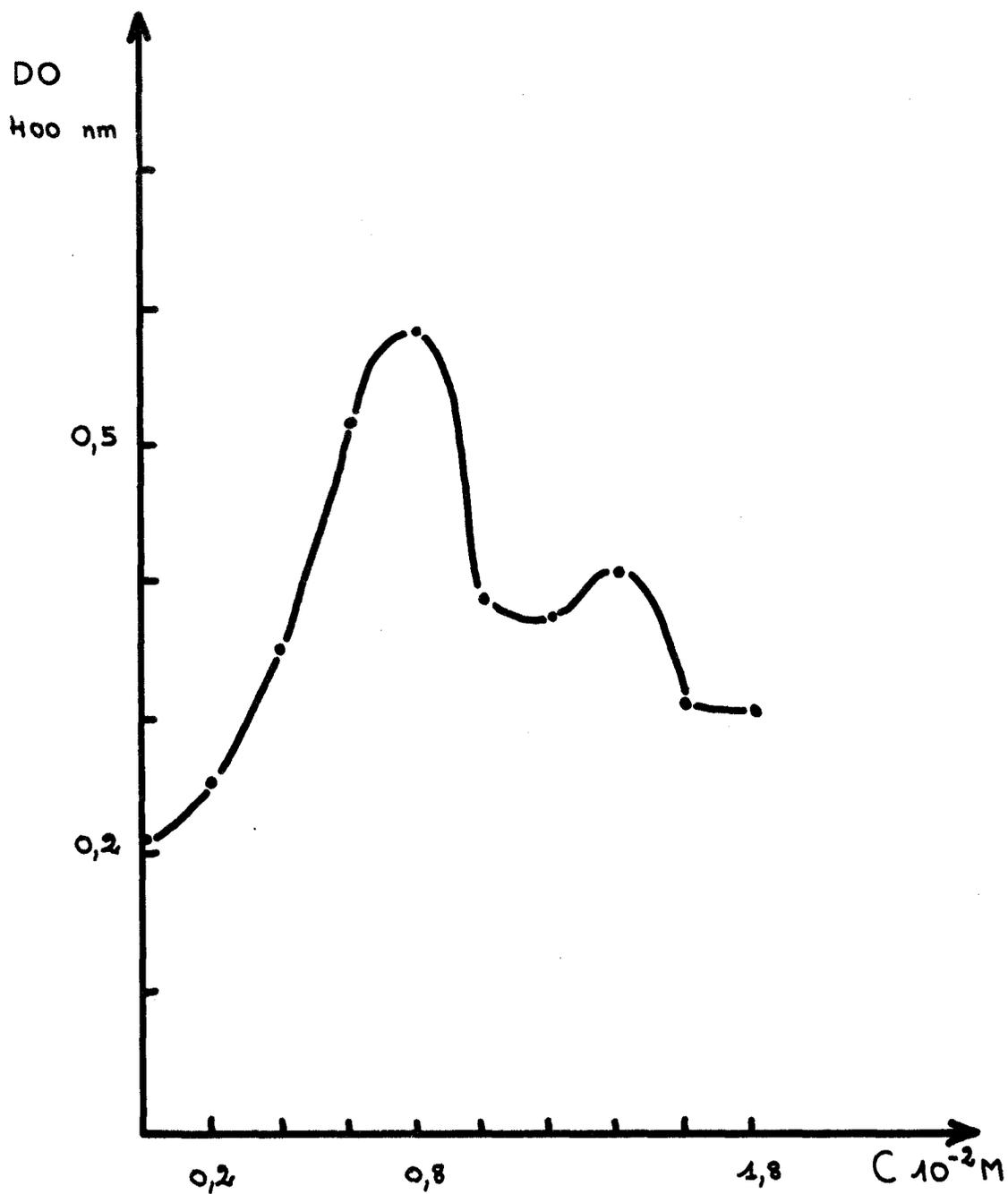


Figure n° 29 : Action des ions calcium sur l'activité de la  $\beta$ -N-Acétylexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec.

à l'action des substances qui dissocient les structures protéiques et de la même, insensible à un certain point à l'action de la chaleur (Tableau XX, p. 94).

Il semble donc que la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée de microorganisme soit du point de vue structural, différente des autres hexosaminidases.

## B - ACTION DES INHIBITEURS

Nous avons étudié l'action de quelques inhibiteurs en fonction de leur rôle, ainsi nous avons étudié l'action des inhibiteurs des fonctions thiols, tel le para-chloromercuribenzoate de sodium (p.CMB) et l'iodoacétamide. Nous avons étudié ensuite l'action de la N-acétylglucosamine sur la réaction enzymatique ainsi que l'action des analogues structuraux de la N-acétylglucosamine : le glucose, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamino-(1,5)-lactone et les ions acétate.

### 1 - ACTION DU P-CHLOROMERCURIBENZOATE DE SODIUM (p.CMB)

Le premier concept considérant les substances renfermant du mercure comme des agents dénaturants non spécifiques des enzymes a été abandonné petit à petit au profit d'une conception faisant intervenir ces agents, uniquement au niveau des groupements S-H des protéines. Généralement une ou plusieurs fonctions thiol sont impliquées soit au niveau du site actif, soit aux environs immédiats de ce site. Nous avons déterminé les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) lors de l'action du p-CMB sur les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines diverses. Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par les figures 30 (p. 97), 31 (p. 98) et 32 (p. 99).

Ces résultats sont en faveur d'une inhibition compétitive du p-CMB puisqu'une concentration de l'ordre de 7  $\mu$ M en p-CMB est suffisante pour provoquer une inhibition de 50 p.100. Les enzymes isolées de la rate de Boeuf, du Fenugrec et de l'Aspergillus niger sont plus stables, elles sont inhibées pour des concentrations variants de 40 à 96  $\mu$ M.

L'enzyme isolée du foie de Boeuf est nettement plus résistante car pour obtenir le même pourcentage d'inhibition il faut une concentration équivalente à 0,41 mM en inhibiteur. Ces résultats permettent de supposer qu'il existe, au niveau du site actif des enzymes, au moins une fonction thiol.

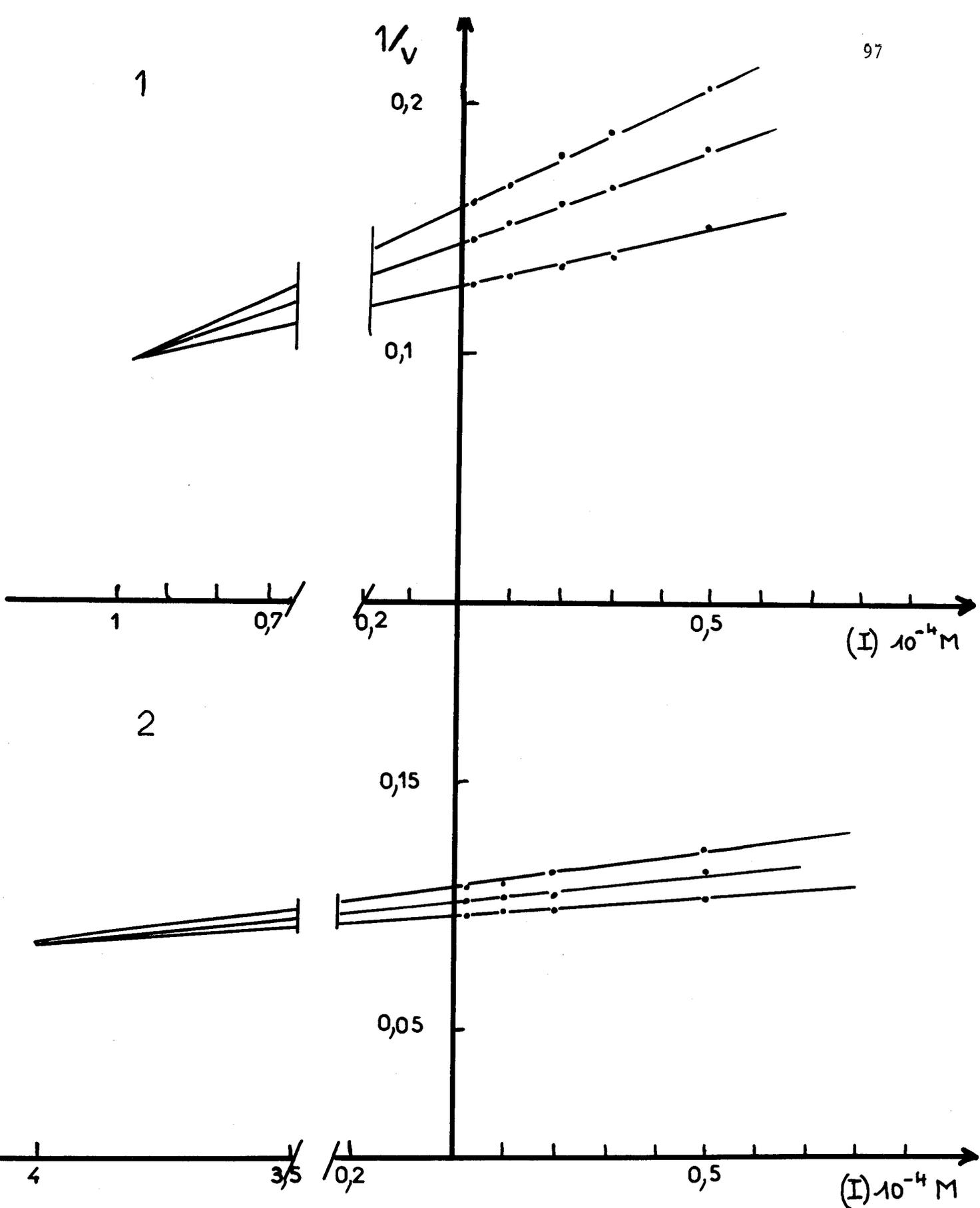


Figure n° 30 : Action du p.chloromercuribenzoate de sodium sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

1 -Rate de Boeuf

2 -Foie de Boeuf



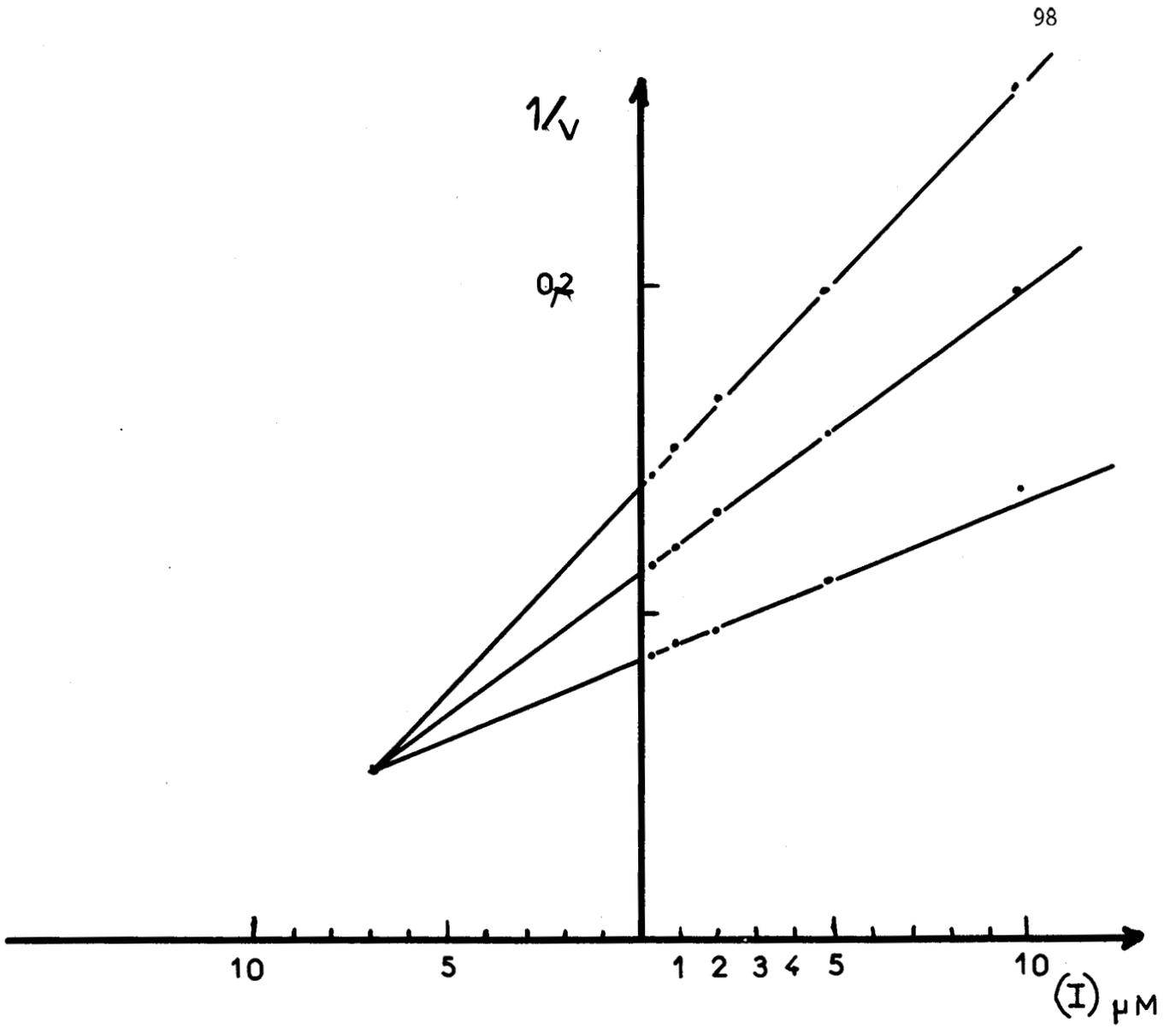


Figure n° 31 : Action du p-chloromercuribenzoate de sodium sur l'activité de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée de la Fève Jack.

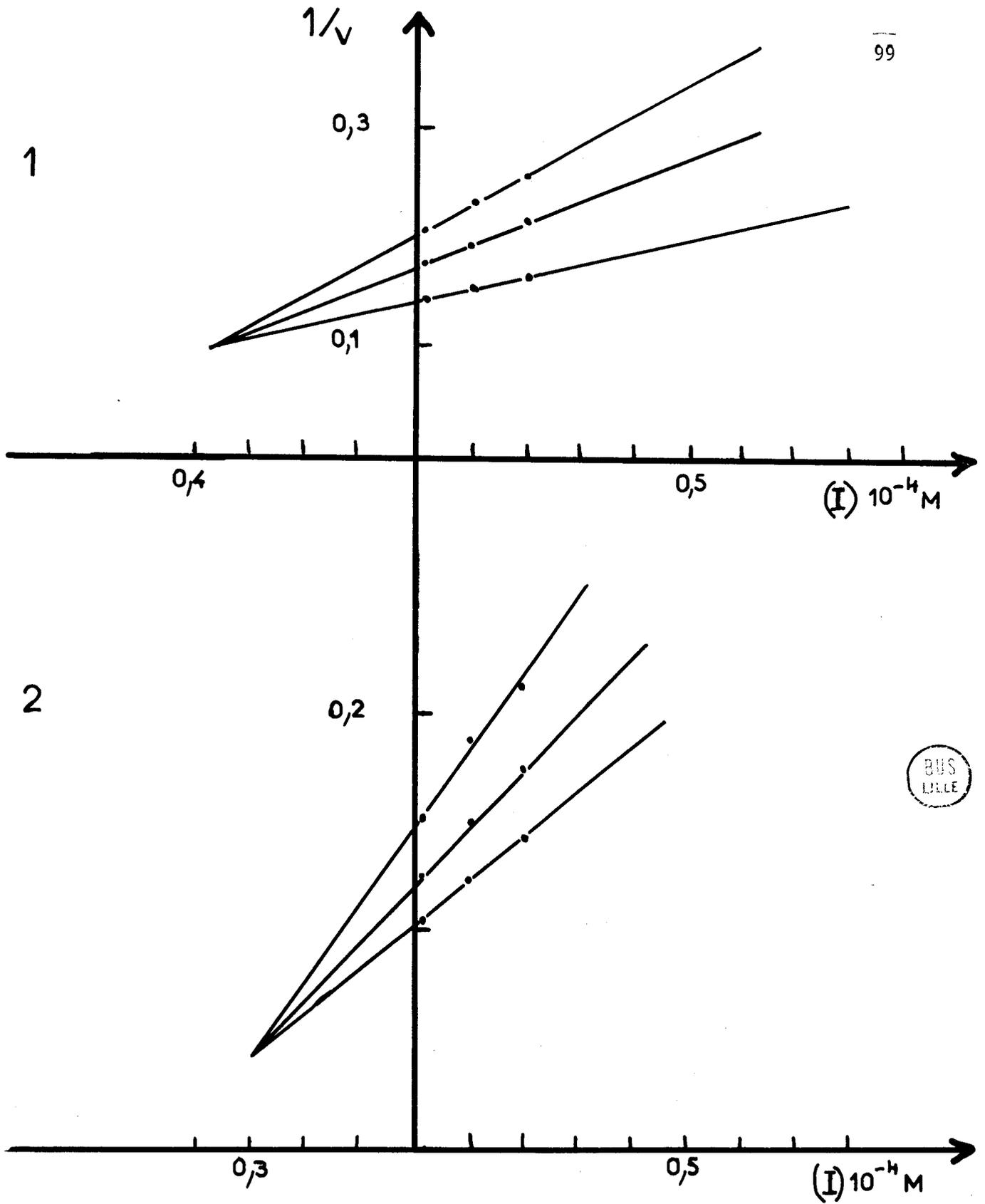


Figure n° 32 : Action du p-chloromercuribenzoate de sodium sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- 1 - Graines germées de Fenugrec
- 2 - Aspergillus niger

## 2 - ACTION DE L'IDOACETAMIDE

L'iodoacétate et ses dérivés sont utilisés depuis longtemps pour inhiber le métabolisme du glucose ou celui d'autres oses. L'iodoacétamide est un réactif capable d'alkyler les groupements thioles et capable de réagir avec des composés autres que les fonctions SH des enzymes, il est donc moins spécifique que les dérivés du mercure. Nous avons dans la figure 33 (p. 101) rassemblé les résultats obtenus lors de l'action de l'iodoacétamide sur les hydrolyses enzymatiques catalysées par les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines différentes. Nous pouvons remarquer que les enzymes sont plus résistantes vis-à-vis de l'iodoacétamide que vis-à-vis du p-CMB. Les enzymes isolées du foie de Boeuf et de l'*Aspergillus niger* ne sont pas inhibées. Pour les trois autres enzymes, l'inhibition est du type compétitive.

## 3 - ACTION DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINE

Il est connu que les produits libérés lors de l'hydrolyse enzymatique sont capables d'inhiber la réaction par rétroinhibition. Nous avons voulu vérifier si les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases que nous avons isolées étaient inhibées par un excès de N-acétylglucosamine dans le milieu réactionnel. Nous avons fait varier les concentrations en N-acétylglucosamine de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  M. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 34 (p. 102). Les enzymes isolées de la rate et du foie de Boeuf sont très sensibles à l'action de ce composé. On obtient en effet une inhibition de 50 p.100 pour des concentrations en N-acétylglucosamine variant de 0,14 à 49 mM. L'enzyme isolée de la Fève Jack est sensible à des concentrations de l'ordre de 4,9 mM ; en cela nous rejoignons les valeurs données par LI et LI (200). Les enzymes isolées de l'*Aspergillus niger* et des graines germées de Fenugrec ne sont pas inhibées par la N-acétylglucosamine.

La différence entre enzymes végétales et animales d'une part et enzymes de microorganismes s'accroît par l'étude de cette propriété.

## 4 - ACTION DE LA N-ACÉTYLGALACTOSAMINE

Nous avons voulu savoir si un isomère de la N-acétylglucosamine pouvait avoir une action sur l'hydrolyse enzymatique. Les résultats

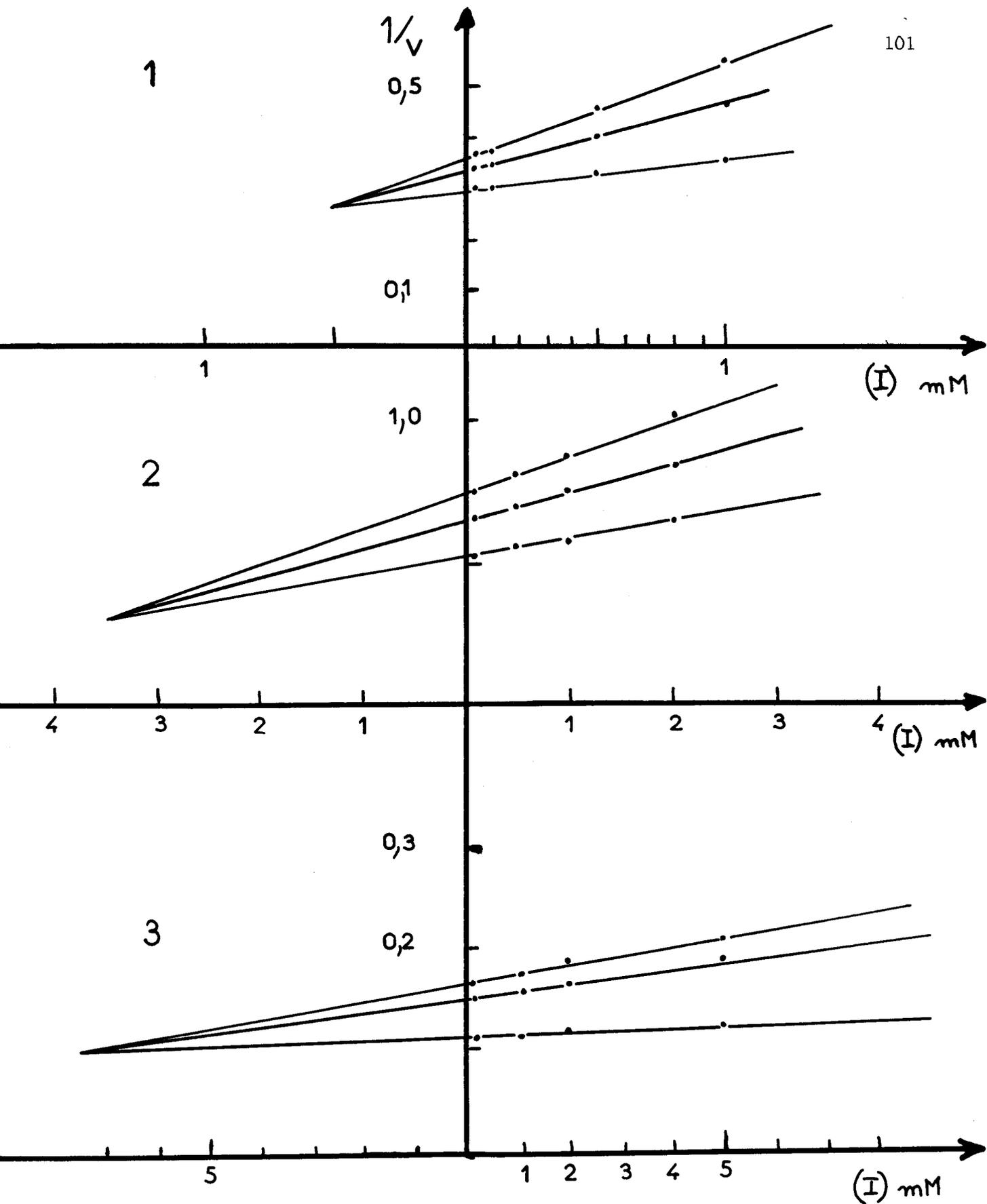


Figure n° 33 : Action de l'iodacétamide sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- 1 - Rate de Boeuf
- 2 - Fève Jack
- 3 - Graines germées de Fenugrec



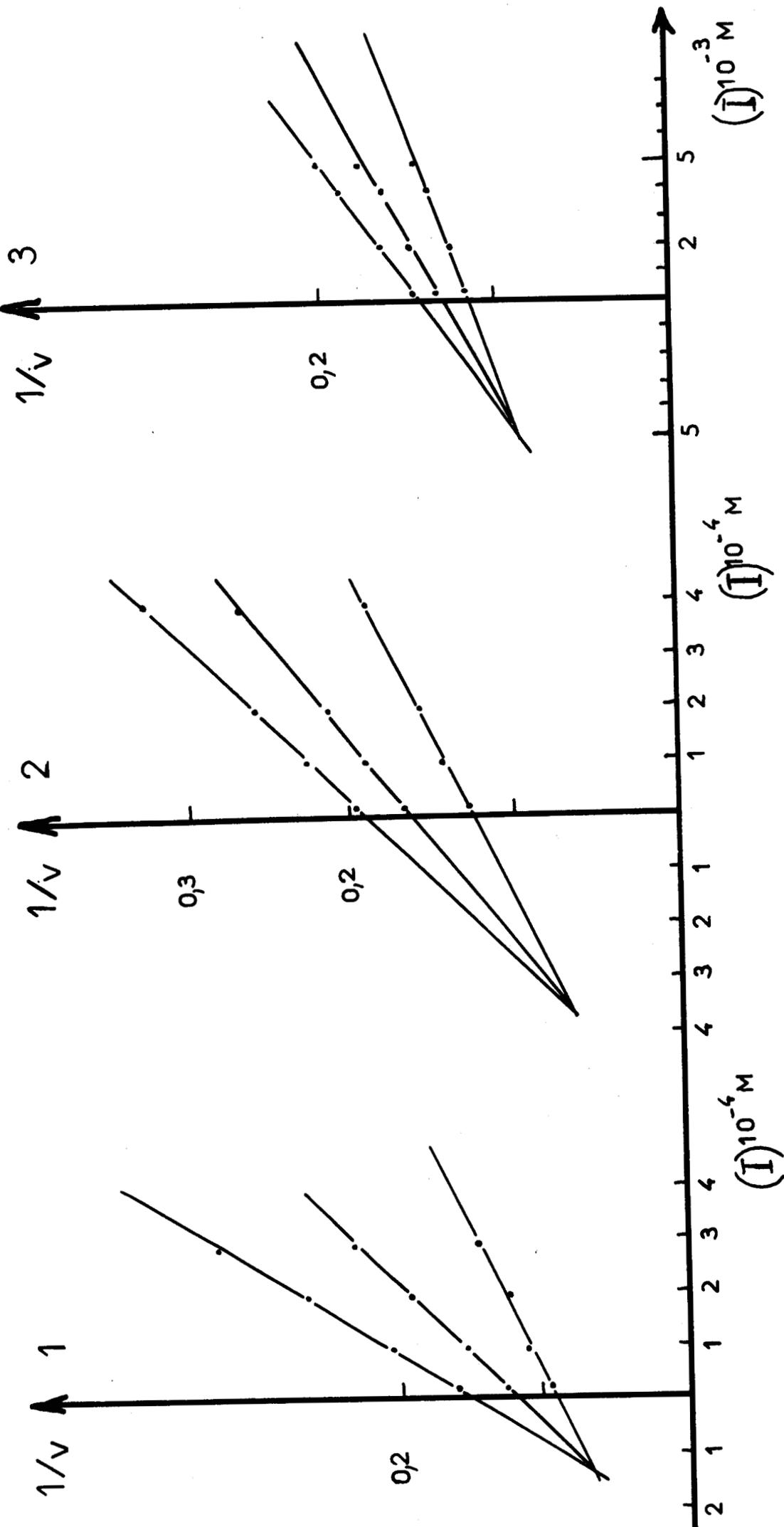


Figure n° 34 : Action de la N-acétylglucosamine sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases

isolées de :

- 1 - Rate de Boeuf
- 2 - Foie de Boeuf
- 3 - Fève Jack



que nous avons obtenus sont illustrés dans les figures 35 (p.104) et 36 (p.105). On remarquera que la N-acétylgalactosamine inhibe de façon plus importante que la N-acétylglucosamine dans le cas de l'enzyme isolée de la Fève Jack, 0,75 mM au lieu de 4,9 mM pour obtenir une inhibition de 50 p.100. Il en est de même pour l'enzyme isolée des graines germées de Fenugrec, l'inhibition de 50 p.100 est obtenue avec une concentration en N-acétylgalactosamine de l'ordre de 2,8 mM alors que la N-acétylglucosamine n'est pas inhibitrice. Par contre, il apparaît que les enzymes d'origine animale (rate et foie de Boeuf) possède une spécificité plus étroite en effet, il faut augmenter au contraire la concentration pour obtenir une même inhibition : 0,7 et 1,10 mM au lieu de 0,14 et 0,36 mM avec la N-acétylglucosamine. L'enzyme isolée d'*Aspergillus niger* n'est pas inhibée par la N-acétylgalactosamine. Notons enfin que l'inhibition est du type compétitif.

#### 5) ACTION DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINO-(1,5)-LACTONE (2 ACÉTAMIDO-2-DEOXY-D-GLUCONO-(1,5)-LACTONE)

Depuis les travaux de CONCHIE et al. (201) on sait que les aldono-(1,5)-lactones sont des inhibiteurs compétitifs très spécifiques des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des glycosides de configuration correspondante. LEABACK (202) a montré que l'inhibition n'était pas due uniquement à la fonction lactone mais plutôt à quelques propriétés que la fonction lactone confère au cycle. Il existerait une similitude de conformation entre la lactone et l'état transitoire de l'enzyme catalysant la réaction.

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par les figures 37 et 38 (p. 106 et 107). Nous pouvons remarquer que toutes les enzymes sont inhibées sauf celle isolée de l'*Aspergillus niger*. L'inhibition est compétitive et très spécifique puisque l'on obtient une inhibition de 50 p.100 pour des concentrations en lactone variant de 0,6 à 13  $\mu$ M. Nos résultats rejoignent ceux de LI et LI (203) pour l'enzyme de Fève Jack et ceux de SANDHOFF et WASSLE (204) pour les hexosaminidases du foie humain.

#### 6 - ACTION DU GLUCOSE

Nous avons fait varier les concentrations en glucose de

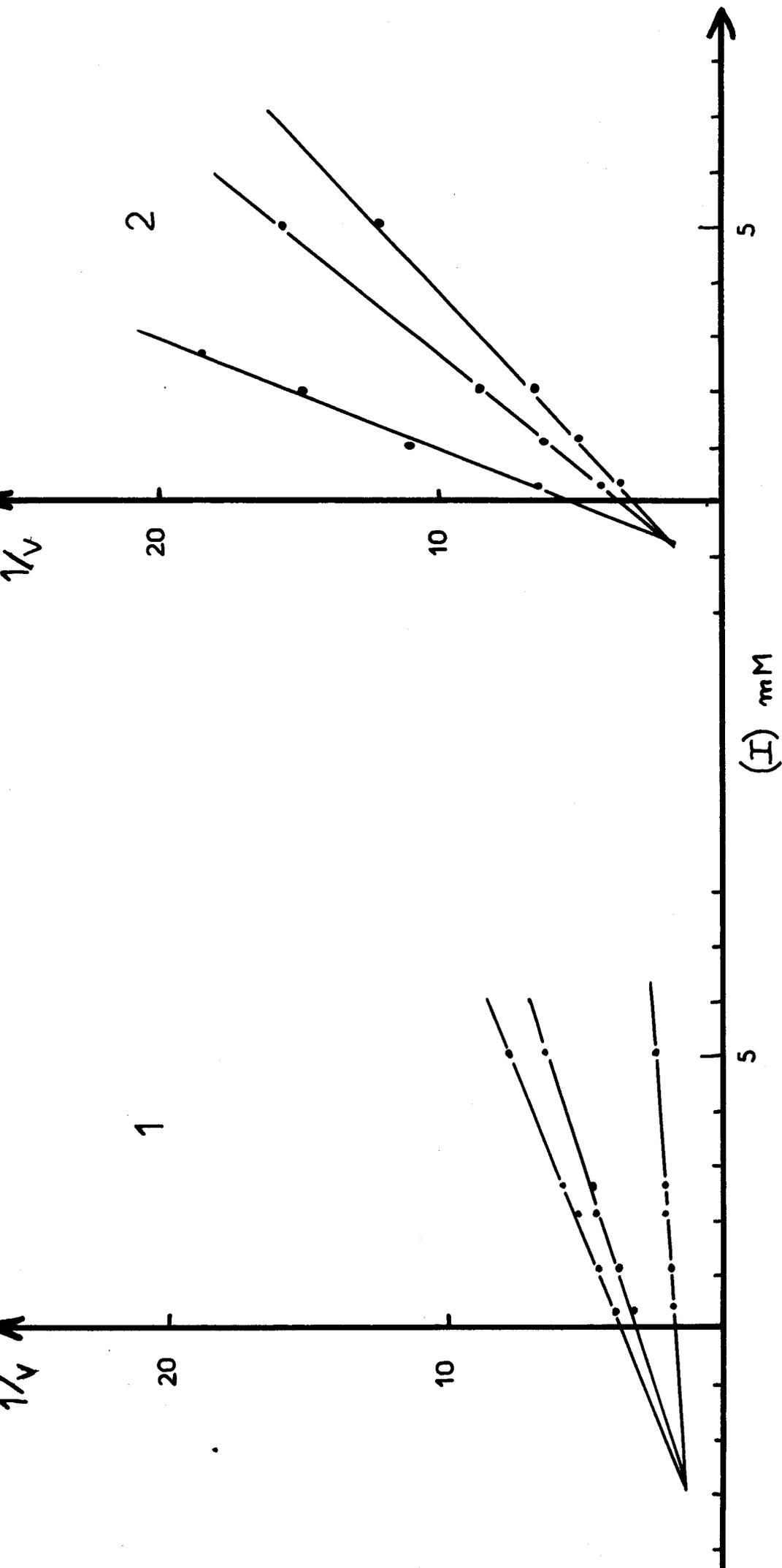


Figure n° 35 : Action de la N-acétylgalactosamine sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases

isolées de :

- 1 - Graines germées de Fenugrec
- 2 - Fève Jack



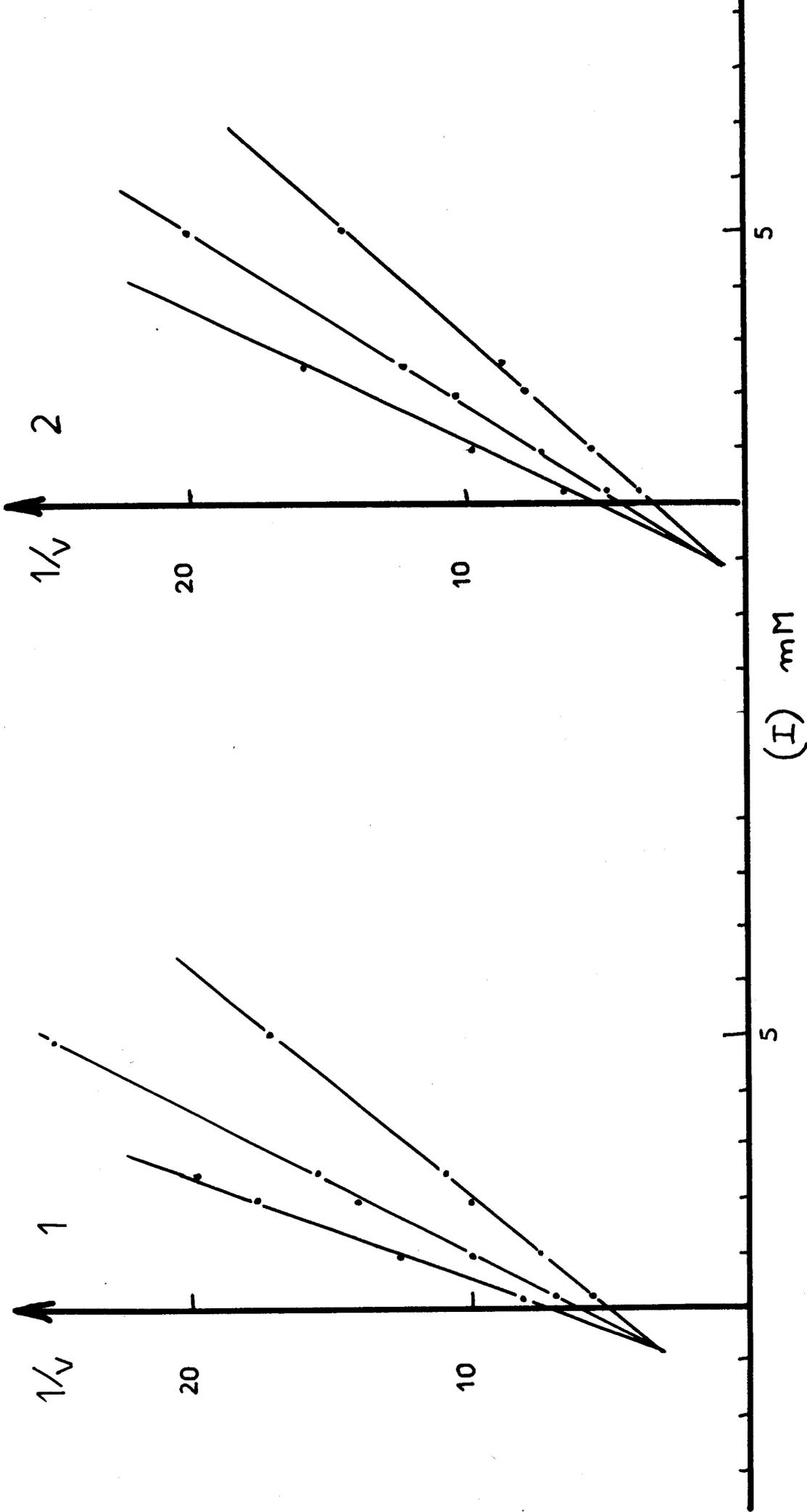


Figure n° 36 : Action de la N-acétylgalactosamine sur l'activité des  $\beta$ -N-

acétylhexosaminidases isolées de :

- 1 - Rate de Boeuf
- 2 - Foie de Boeuf

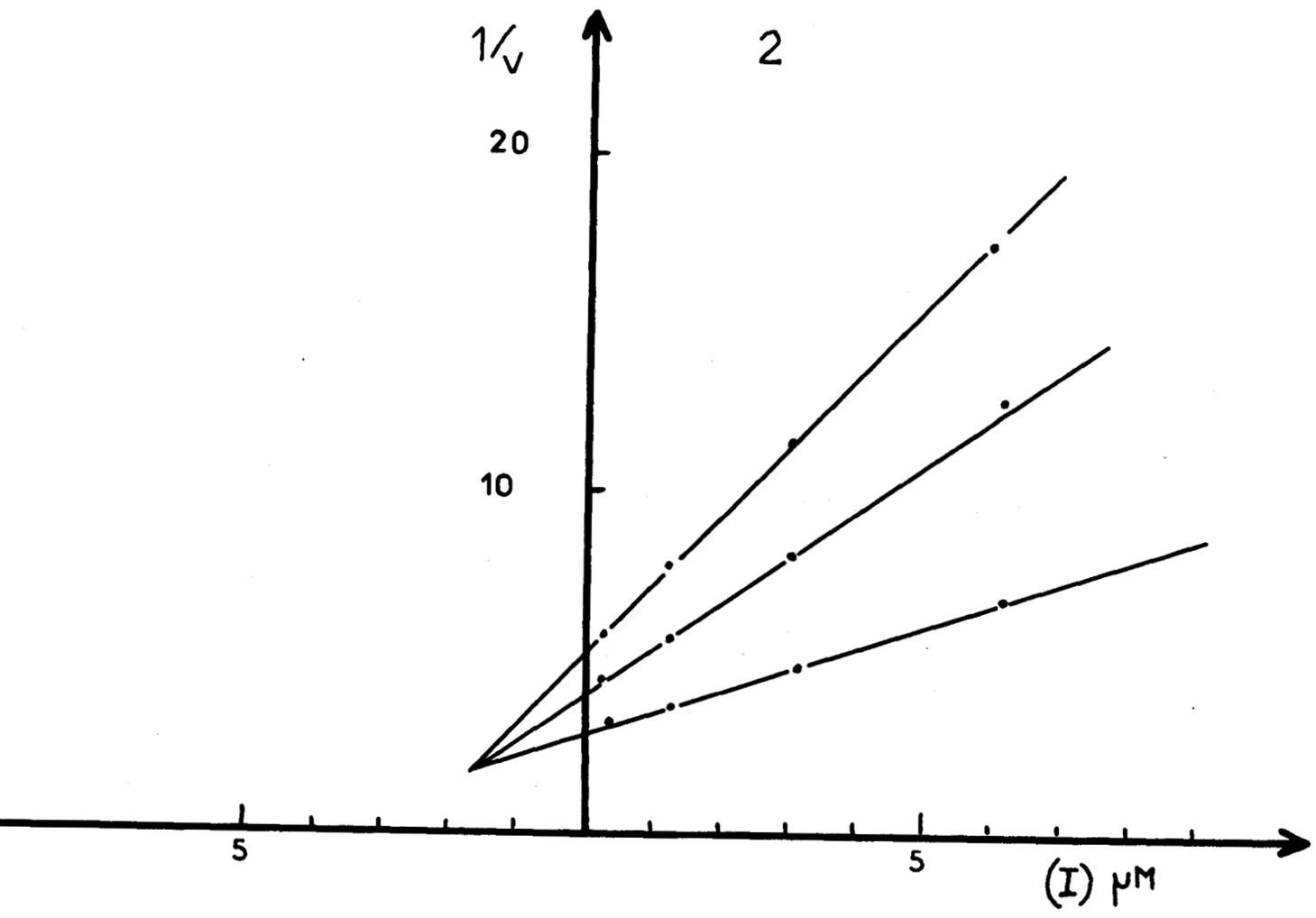
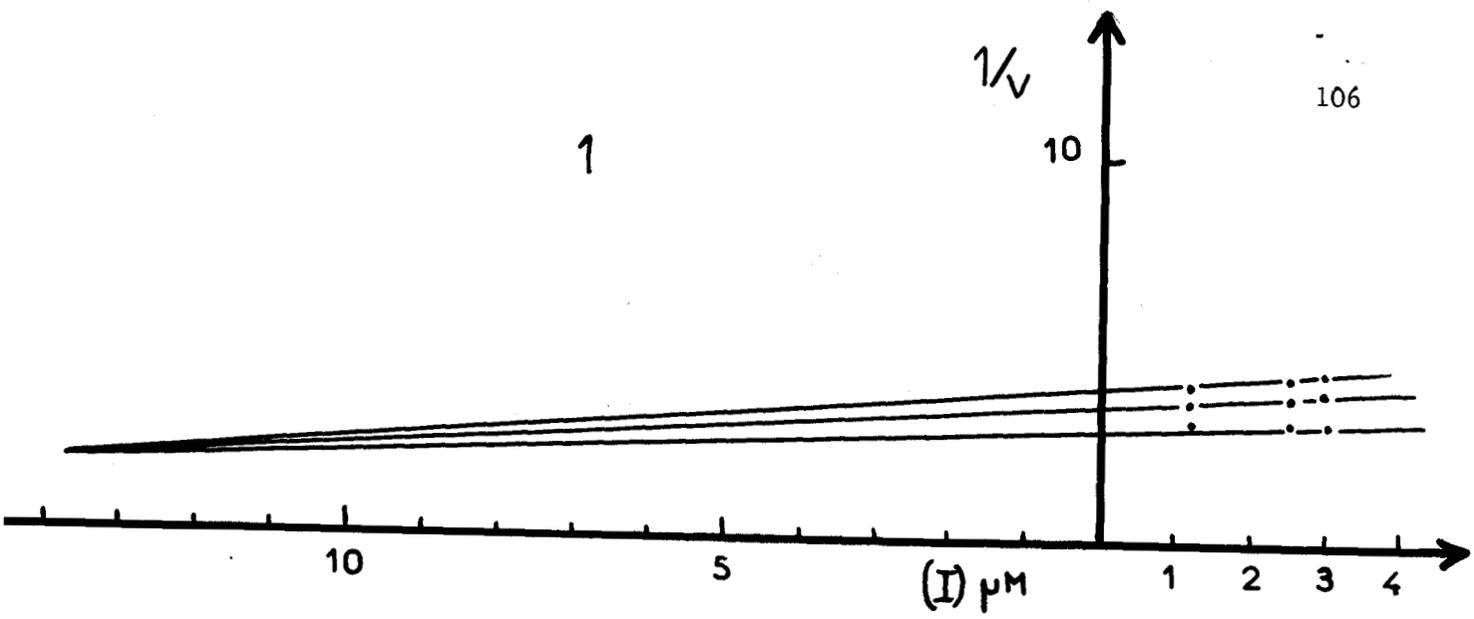


Figure n° 37 : Action de la glucono-(1,5)-lactone sur l'activité des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées de :

- 1 - Graines germées de Fenugrec
- 2 - Fève Jack



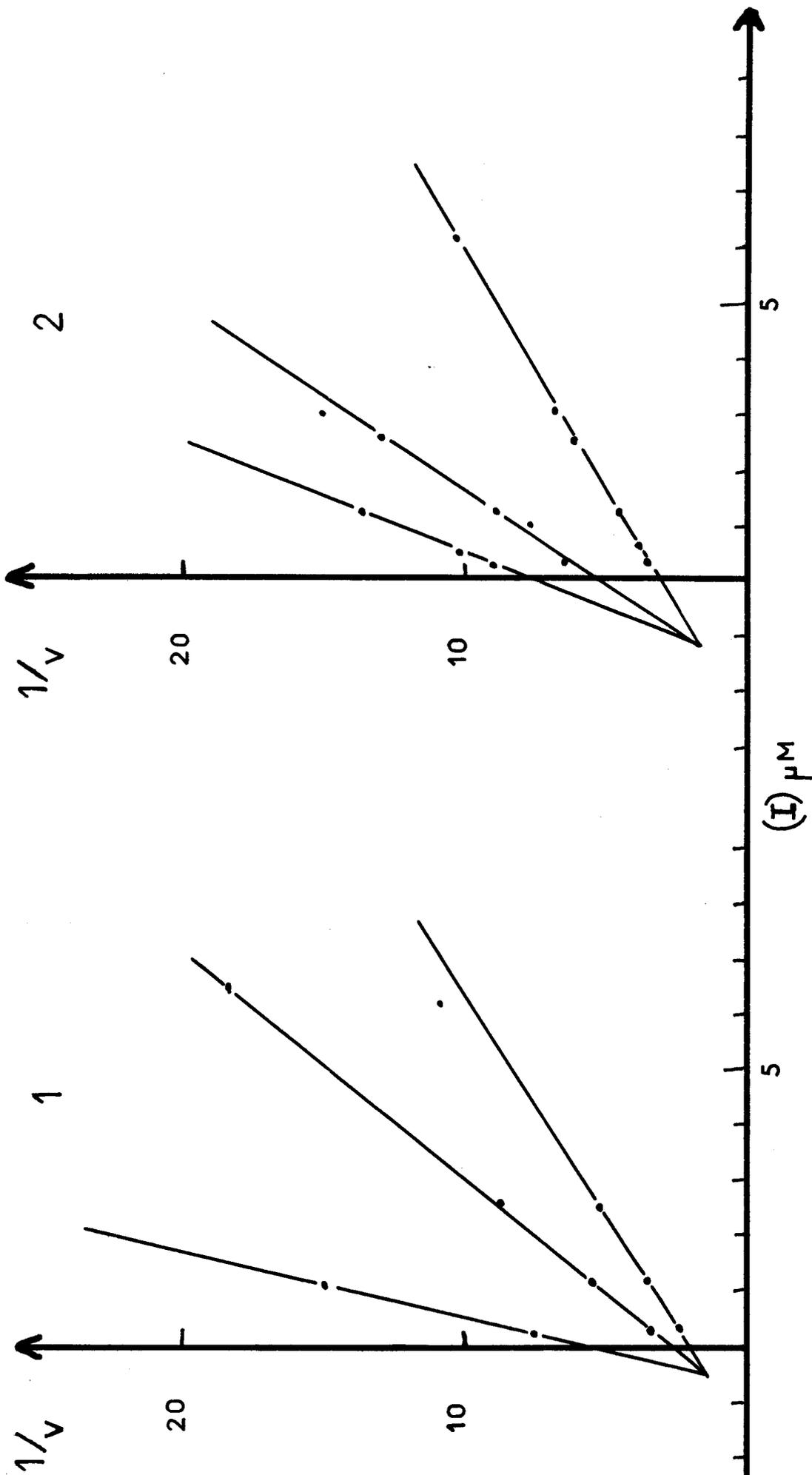


Figure n° 38 : Action de la glucono-(1,5)-lactone sur l'activité des  $\beta$ -N-acétyl

hexosaminidases isolées de :

- 1 - Rate de Boeuf
- 2 - Foie de Boeuf



de  $10^{-5}$  à  $10^{-2}$  M. Dans aucun des cas nous n'avons obtenu une inhibition. Le glucose n'est donc pas un inhibiteur des  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases.

### 7 - ACTION DE L'ACETATE DE SODIUM

PUGH, LEABACK et WALKER (205) ont montré que les  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases étaient inhibées par les tampons acétate. L'inhibition est compétitive, les ions acétate formeraient un complexe inactif avec l'enzyme, complexe dû probablement à la grande affinité et à la haute spécificité de l'enzyme envers les groupements acétyls. Les résultats que nous avons obtenus confirment les observations de ces auteurs. L'inhibition est cependant moins importante que dans le cas du p-CMB ou de la glucono (1,5)-lactone.

Cependant, l'enzyme isolée des graines germées de Fenugrec est inhibée pour une concentration en ion acétate équivalente à 0,33 mM. Nous avons rassemblé dans les figures 39 (p. 109) et 40 (p.110), les différents résultats obtenus.

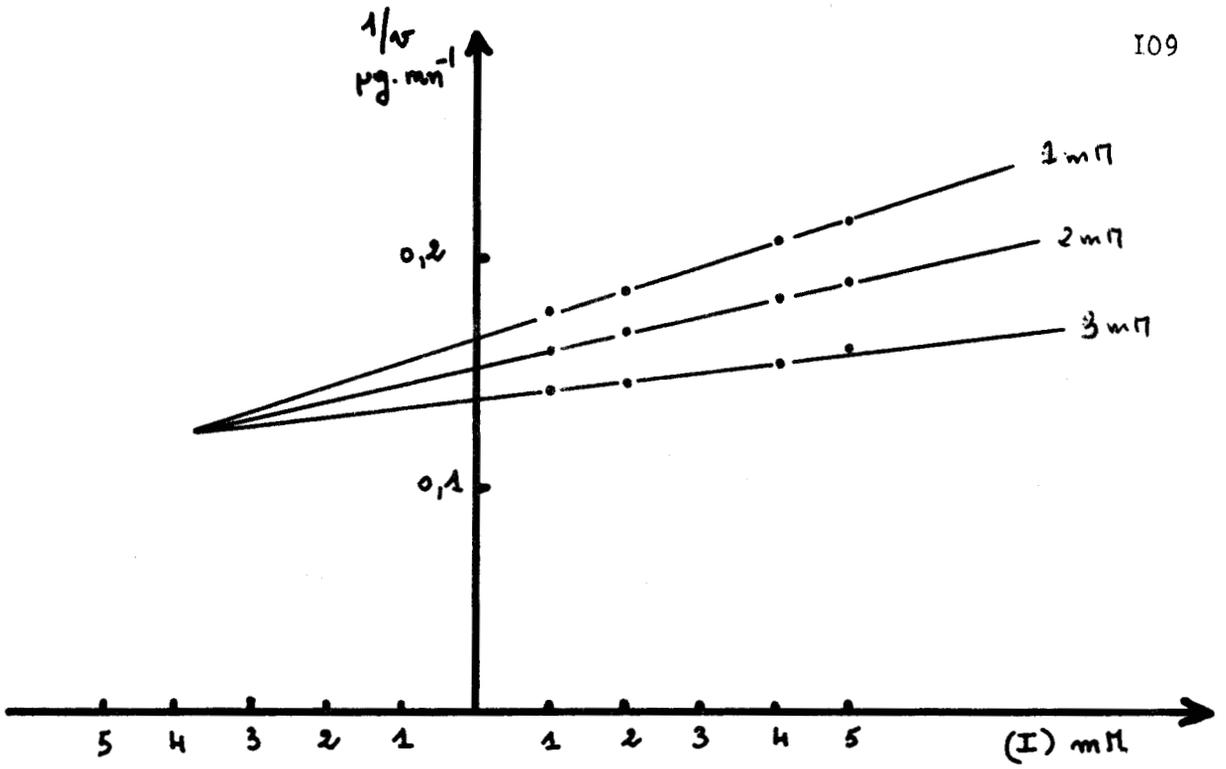
### 8 - CONCLUSIONS

Nous voyons que lors des hydrolyses enzymatiques effectuées par les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases isolées du foie et de la rate de Boeuf, il est important de tenir compte de l'inhibition possible par la N-acétylglucosamine libérée. Pour lever cette rétroinhibition il est nécessaire d'éliminer au fur et à mesure la N-acétylglucosamine libérée en dialysant par exemple.

D'autre part, il est important de ne pas employer de tampon acétate lors de l'hydrolyse enzymatique par les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases.

Nous pouvons remarquer, en outre, que les enzymes réagissent de façon différentes vis-à-vis des différents effecteurs et en particulier vis-à-vis des inhibiteurs. La  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase isolée de l'*Aspergillus niger* n'est sensible qu'au p-CMB et aux ions acétate. Les enzymes d'origine animale et végétale sont sensibles à tous les inhibiteurs utilisés. La N-acétylgalactosamine est cependant beaucoup plus inhibitrice que la N-acétylglucosamine dans le cas des enzymes d'origine végétale.

A



B

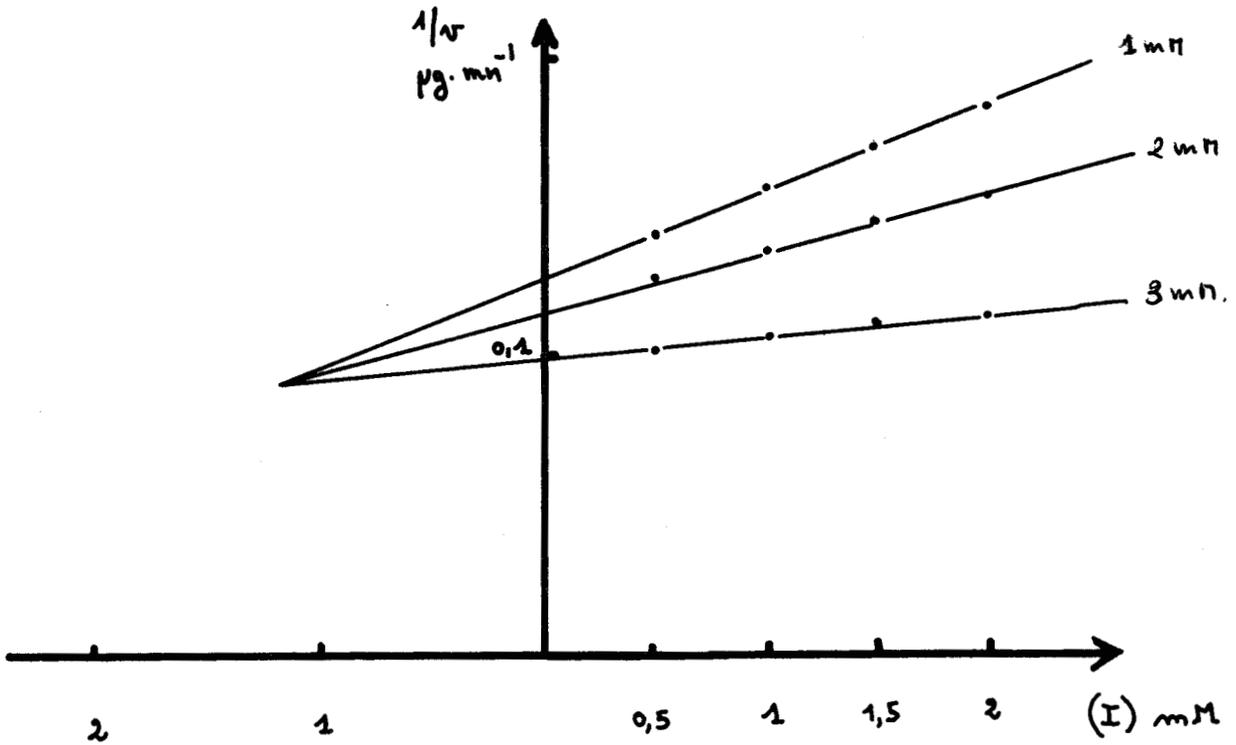


Figure n° 39 : Action des ions acétate sur l'activité des  $\beta$ -N-Acétylhexosaminidases

A -Graines germées de Fenugrec

B -Aspergillus Niger



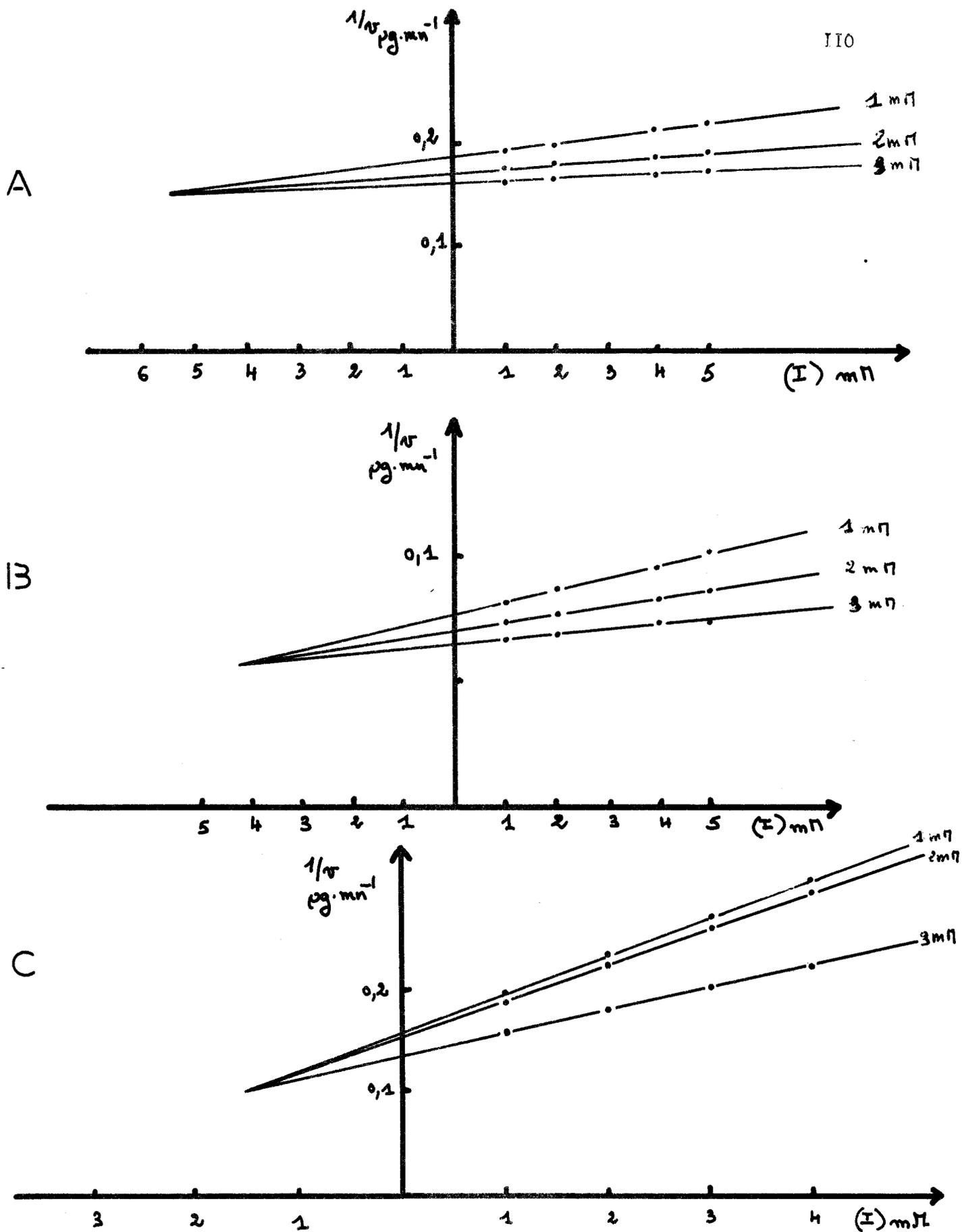


Figure n° 40 : Action des ions acétate sur l'activité des  $\beta$ -N-Acéthylhexosaminidases

- A -Foie de Boeuf
- B -Fève Jack
- C -Rate de Boeuf



T A B L E A U XXI

Constante d'inhibition de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines  
diverses. Les constantes exprimés en mM sont les valeurs moyen-  
nes de trois expériences.

Inhibiteurs	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	<u>Aspergillus niger</u>
p-chloromercuribenzoate	0,096	0,41	0,007	0,060	0,040
Iodoacétamide	0,50	∞	3,55	7,50	∞
N-acétylglucosamine	0,14	0,36	4,9	∞	∞
N-acétylgalactosamine	0,70	1,10	0,75	2,8	∞
Glucosamino-(1,5)-lactone	0,0006	0,0013	0,0016	0,0135	∞
Glucose	∞	∞	∞	∞	∞
Acétate de sodium	1,50	5,50	4,25	0,38	1,18

### 3 - SPECIFICITE ENZYMATIQUE

Pour préciser la spécificité d'action des cinq  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases isolées, nous les avons fait agir sur des hétérosides de synthèse, sur des osides de structure variable et sur un glycopeptide isolé de l'ovomucoïde.

Les constantes de Michaëlis et les vitesses maximales d'hydrolyse ont été déterminées lors de l'hydrolyse des hétérosides de synthèse et de l'hydrolyse de certains osides que nous possédions en quantité importante. Dans le cas de tous les osides étudiés, les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine, ont été calculés après une durée d'hydrolyse de 24 heures.

#### I - ACTION SUR DES HETEROSIDES DE SYNTHESE

Les hétérosides utilisés diffèrent d'une part par l'anomérie de la liaison hexosaminidasique et d'autre part par la nature de l'hexosamine.

#### A - ACTION SUR LE p-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDE ET LE p-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GALACTOSAMINIDE

##### 1 - RESULTATS

Les cinq préparations de N-acétyl-hexosaminidases se sont révélées être sans action sur les hétérosides renfermant des liaisons  $\alpha$ -N-acétyl-glucosaminide et  $\alpha$ -N-acétyl-galactosaminide.

##### 2 - DISCUSSION

Les préparations enzymatiques utilisées ne renferment donc pas de souillures de  $\alpha$ -N-acétyl-hexosaminidase, et peuvent être considérées comme spécifiques des liaisons  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidasiques.

#### B - ACTION SUR LE p-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDE ET SUR LE p-NITROPHENYL- $\beta$ -D-GALACTOSAMINIDE.

## 1 - RESULTATS

Les cinq préparations enzymatiques étudiées possèdent une action sur le p-nitrophényl- $\beta$ -glucosaminide et sur le p-nitrophényl- $\beta$ -galactosaminide. Dans le tableau XXII (p. 114), nous avons rassemblé les valeurs des activités spécifiques des différentes hexosaminidases vis-à-vis des deux hétérosides de synthèse.

Nous pouvons remarquer que les rapports des activités spécifiques varient avec l'origine de l'enzyme, l'activité  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase étant 1,5 à 3,9 fois supérieure à l'activité  $\beta$ -N-acétyl-galactosaminidase.

Les valeurs des constantes des Michaelis et les vitesses maximales d'hydrolyse des préparations enzymatiques étudiées lors de l'hydrolyse du p-nitrophényl  $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminide sont données dans les tableaux XXIII et XXIV (p. 115-116). Ces valeurs qui représentent la moyenne des valeurs obtenues au cours de 6 expériences différentes sont très variables suivant l'origine de la préparation enzymatique. L'hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec possédant la plus grande affinité, le  $K_m$  étant de 0,16 mM et l'hexosaminidase du foie de Boeuf la plus faible affinité pour le substrat, la valeur du  $K_m$  étant de 1,18 mM.

## 2 - DISCUSSION

Les deux activités N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase et N-acétyl- $\beta$ -galactosaminidase se sont manifestées dans les mêmes rapports au cours de tous les stades de purification des enzymes. Ces deux activités pourraient donc être portées par la même protéine.

Les valeurs de  $K_m$  de différentes préparations enzymatiques (épididyme, rein de Rat et émulsine) pour le p-nitrophényl- $\beta$ -N-acétylglucosaminide variant de 0,4 mM à 3,8 mM ont été reportées par WALKER (206) dans la revue générale sur les hexosaminidases. Une telle différence d'affinité mise en évidence dans nos propres résultats confirment l'extrême diversité des propriétés enzymatiques des hexosaminidases suivant leur origine.

## II - ACTION SUR DES OSIDES DE STRUCTURE VARIABLE

Les osides utilisés se différencient d'une part par la nature de la liaison et d'autre part par leur structure.

T A B L E A U XIII

Rapport des activités  $\beta$ -N-acétylglucosaminidasique et galactosaminidasique  
de cinq  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases d'origines diverses.

Origine de l'enzyme	Activité spécifique des $\beta$ -N-acétylglucosaminidases (*)	Activité spécifique des $\beta$ -N-acétylgalactosaminidases (*)	Rapport des deux activités
Rate de Boeuf	3819	1157	3,3
Foie de Boeuf	1540	394	3,9
<u>Aspergillus niger</u>	4545	2164	2,1
Graines germées de Fenugrec	3498	1060	3,3
Fève Jack	11543	7352	1,57

(\*) L'activité spécifique est déterminée en  $\mu$ g de p.nitrophénol libéré par minute et par milligramme de protéine.



Détermination de la constante de Michaelis de cinq  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidases d'origines diverses. Les valeurs de Km sont exprimées en mM.

Substrats	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines de Fenugrec	<u>Aspergillus niger</u>
p-nitrophényl- $\beta$ -N-acétyl glucosaminide	0,58 $\pm$ 0,08	1,18 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01
GlcNac $\xrightarrow{1,2}$ Man	0,64 $\pm$ 0,01	2,86 $\pm$ 0,17	0,36 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,14	1,33 $\pm$ 0,02
GlcNac $\xrightarrow{1,4}$ Man	10 $\pm$ 0,0	$\infty$	1,49 $\pm$ 0,09	0,52 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,07
GlcNac $\xrightarrow{1,5}$ Man	0,038	0,38	0,32	0,58	0,018

Vitesses maximales d'hydrolyse de cinq  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidases d'origines diverses.

Les valeurs sont exprimées en  $\mu$ mole/min/mg de protéine.

Substrats	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	<u>Aspergillus niger</u>
p-nitrophényl- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminide	5,94	0,79	6,05	2,7	4,1
GlcNac $\xrightarrow{1,2}$ Man	0,39	0,1	1,03	0,45	0,47
GlcNac $\xrightarrow{1,4}$ Man	1,54	0	1,40	0,72	0,85
GlcNac $\xrightarrow{1,6}$ Man	6,13	6,6	6,2	8,3	5,37

## A - INFLUENCE DE LA NATURE DE LA LIAISON

Les valeurs des constantes de Michaelis, les vitesses maximales d'hydrolyse ont été déterminées lors de l'hydrolyse de disaccharides renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par des liaisons  $\beta$  1,2 ;  $\beta$  1,4 et  $\beta$  1,6 à un résidu de mannose.

Les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine après 24 heures d'incubation ont été calculés dans le cas de l'hydrolyse des disaccharides précédents et dans le cas :-d'un disaccharide renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par une liaison  $\beta$  1,6 à un résidu de galactose, - dans le cas d'un trisaccharide renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par une liaison  $\beta$  1,3 à un résidu de lactose.

Les conditions d'hydrolyse utilisées sont décrites à la page 64.

### 1 - RESULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux XXIII, XXIV et XXV (p. 115, 116 et 117).

Les remarques que nous pouvons faire à propos de ces résultats sont les suivantes :

- Toutes les préparations enzymatiques utilisées possèdent une affinité plus grande pour l'hétéroside de synthèse que pour les oligosaccharides analysés, on observe cependant que la N-acétyl-glucosaminidase isolée de la Fève Jack possède une affinité plus grande pour le disaccharide A, soit le O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,2)-mannose que pour l'hétéroside de synthèse.

- Les constantes d'affinité, les vitesses maximales d'hydrolyse et les pourcentages d'hydrolyse varient d'une part avec l'origine de l'enzyme et d'autre part avec la nature de la liaison à hydrolyser.

#### a - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,2)-mannose

Les hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de la Fève Jack possèdent une très grande affinité pour le disaccharide O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,2)-mannose.

Pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine à partir d'oligosaccharides renfermant différents types de liaison, après 24 heures d'hydrolyse par des  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases d'origines diverses.

Substrats	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	<u>Aspergillus niger</u>
p-nitrophényl- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminide (*)	100	100	100	100	100
GlcNAc $\xrightarrow{1,2}$ Man	100	26	100	25	62
GlcNAc $\xrightarrow{1,4}$ Man	12,1	2,3	35	32	56,5
GlcNAc $\xrightarrow{1,5}$ Man	77	23,5	23	13,1	100
GlcNAc $\xrightarrow{1,4}$ Gal	3,4	29	22,9	30	28,4
GlcNAc $\xrightarrow{1,3}$ Gal $\xrightarrow{1,4}$ Glc	50,4	91	62	0	40,8

(\*) L'hétéroside de synthèse est hydrolysé totalement en 10 minutes.

Au bout de 24 heures d'hydrolyse la libération de la N-acétyl-glucosamine est quantitative comme l'indique le tableau XXV.

L'affinité des hexosaminidases isolées du foie de Boeuf, des graines germées de Fenugrec et d'Aspergillus niger pour le disaccharide O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,2)-mannose, est relativement faible. Les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine sont d'autre part de 26, 25 et 62 p.100. La libération de la N-acétyl-glucosamine liée en 1,2 à du mannose sera donc réalisée de préférence à l'aide des hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de la fève Jack.

b - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,3)-galactose

L'influence de l'action des différentes préparations enzymatiques sur une liaison de type  $\beta$ 1,3 n'a pu être étudiée que sur un trisaccharide : le O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,3)-O- $\beta$ -D-galactosyl-(1,4)-glucose.

Les pourcentages d'hydrolyse ont été calculés uniquement, les valeurs données dans le tableau XXV indiquent que seule l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf libère quantitativement le résidu de N-acétyl-glucosamine, au contraire, l'hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec ne possède aucune action sur le substrat. L'activité des hexosaminidases de la rate de Boeuf, de la fève Jack et d'Aspergillus niger n'est pas totale, elle atteint respectivement 50,4, 68 et 40,8 p.100.

c - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,4)-mannose

L'affinité des préparations enzymatiques isolées de la rate et du foie de Boeuf pour le disaccharide : O- $\beta$ -N-acétyl-glucosaminyl-(1,4)-mannose est faible voire nulle. Au bout de 24 heures d'hydrolyse les pourcentages de N-acétyl-glucosamine libérée sont négligeables.

L'affinité des préparations enzymatiques isolées de la fève Jack, des graines germées de Fenugrec et d'Aspergillus niger pour le disaccharide : O- $\beta$ -N-acétyl-glucosaminyl-(1,4)-mannose est relativement importante, comprise entre 0,51 et 1,43 mM, les vitesses maximales ne sont pas négligeables, elles sont comprises entre 0,72 et 1,40  $\mu$ mole/mn/mg de protéine. On remarque cependant que les pourcentages de libération

de N-acétyl-glucosamine dans les conditions décrites sont faibles, le maximum de libération (56,5 p.100) est obtenu lors de l'action de l'hexosaminidase isolée d'Aspergillus niger.

d - Liaison O- $\beta$ -D-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$ 4)-galactose

La faible quantité dont nous disposions de ce disaccharide, ne nous a pas permis de déterminer les constantes d'affinité de différentes préparations enzymatiques pour ce substrat. Seuls les pourcentages de libération de la N-acétylglucosamine au bout de 24 heures d'hydrolyse ont été mesurés. Les valeurs données dans le tableau XXV (p.118) montrent qu'aucune des préparations enzymatiques utilisées n'est très active sur ce disaccharide. Un maximum de libération de 30 p.100 est obtenu pour la préparation enzymatique des graines germées de Fenugrec.

e - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétylglucosaminyl-(1  $\rightarrow$ 6)-mannose

Nous avons étudié l'affinité des 5 préparations de  $\beta$ -D-N-acétylhexosaminidases pour le disaccharide O- $\beta$ -D-2-déoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1  $\rightarrow$ 6)-D-mannose, ainsi que les pourcentages de libération de la N-acétylglucosamine au bout de 24 heures d'hydrolyse.

L'affinité des préparations enzymatiques isolées de la rate de Boeuf et de l'Aspergillus niger est très grande, elle est respectivement de 0,038 et 0,018 mM, soit une affinité supérieure à celle trouvée pour l'hétéroside de synthèse. Pour les préparations isolées de la Fève Jack, des graines germées de Fenugrec et du foie de Boeuf, les affinités sont nettement plus faibles, elles sont respectivement de 0,32, 0,58 et 0,38 mM. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIII (p.115). Les vitesses maximales de réactions sont élevées par comparaison à celles obtenues précédemment, elles varient de 5,3 à 8,5  $\mu$ moles/min/mg de protéine, valeurs légèrement supérieures à celles obtenues pour l'hydrolyse de l'hétéroside de synthèse (T.XXIV, p.116). Les pourcentages d'hydrolyse obtenus après 24 heures d'incubation sont rassemblés dans le tableau XXV (p.118). On remarquera que la préparation d'Aspergillus niger coupe à 100 p.100 la liaison N-acétylglucosaminyl  $\beta$  1  $\rightarrow$  6 mannose. La préparation enzymatique isolée de la rate de Boeuf libère 77 p.100 de la N-acétylglucosamine alors que les autres préparations donnent des pourcentages d'hydrolyse variant de 13 à 23 p.100. La libération de la N-acétylglucosamine liée par une liaison  $\beta$  1  $\rightarrow$  6 à du mannose sera donc

réalisée de préférence à l'aide des hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de l'Aspergillus niger.

## 2 - DISCUSSION

Des résultats que nous venons d'exposer ci-dessus nous ne pouvons en aucun cas conclure à la spécificité stricte de telle ou telle enzyme vis-à-vis de tel ou tel type de liaison, à hydrolyse. Nous pouvons cependant remarquer les faits suivants : toutes les enzymes étudiées ici sauf celle isolée des graines germées de Fenugrec présente une affinité très grande pour les liaisons  $\beta$ -N-acétylglucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 6).

MATTA et BAHL (207) ont obtenu une libération totale de la N-acétyl-glucosamine lors de l'hydrolyse du O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl 1 $\rightarrow$ 6 mannose par l'enzyme isolée d'Aspergillus niger. VIKHA et al. (208) ont observé que la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase isolée de l'épididyme de Porc présente une affinité décroissante pour les liaisons  $\beta$  1 $\rightarrow$ 6,  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 et  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 lorsque la N-acétylglucosamine est liée à du glucose. Si on se réfère uniquement aux valeurs de Km, on remarque que les 5 préparations de  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases étudiées peuvent être classées en deux groupes. Le premier groupe constitué par les enzymes isolées de la rate, du foie de Boeuf et de la Fève Jack, ces enzymes présentent une activité décroissante pour les liaisons N-acétylglucosaminyl  $\beta$  1 $\rightarrow$ 6,  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2 et  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 mannose. Le deuxième groupe constitué par les enzymes isolées de l'Aspergillus niger et des graines germées de Fenugrec. Ces enzymes présentent une affinité décroissante pour les liaisons N-acétylglucosaminyl  $\beta$  1 $\rightarrow$ 6,  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 et  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2 mannose. Les variations observées sont d'ailleurs confirmées par l'étude des vitesses maximales théoriques d'hydrolyse. Si l'on examine d'autre part les résultats obtenus lors de la cinétique d'hydrolyse enzymatique on remarque quelques anomalies. La  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec est incapable d'hydrolyser la liaison N-acétylglucosaminyl  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 galactose. C'est cette observation qui a été d'ailleurs à l'origine de nos travaux sur la spécificité enzymatique. Pour l'étude systématique que nous venons de réaliser sur la spécificité des hexosaminidases, nous montrons que seule l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf est capable de libérer quantitativement la N-acétyl-glucosamine liée en  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 au galactose. Ce résultat nous a d'ailleurs permis de déterminer la nature des anoméries présentes dans le dilactaminyl-lacto-N-tétraose isolé du lait de Femme GRIMMONDREZ, BOUQUELET, BAYARD, SPIK,

MONSIGNY et MONTREUIL (209).

Dans la littérature, d'autres exemples de l'incapacité des hexosaminidases à hydrolyser certains types de liaisons sont donnés, ainsi que la N-acétyl-glucosamine présente dans l'oligosaccharide suivant :  $\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcUA} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNAc}$ , est libérée par l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf, (WEISSMANN et al)(210), de l'aorte bovine (BUDDECKE et WERRIES)(211) et enfin par l'hexosaminidase isolée de la fève Jack (LI et LI)(212). Par contre, aucune libération de N-acétyl-glucosamine obtenue par les hexosaminidases isolées de l'émulsine d'amande et de l'*Aspergillus niger* (WEISSMANN et al)(213) et par des extraits de pneumocoques (LINKER et al.)(214) (WEISSMANN et al.)(215). L'hypothèse de l'existence d'une différence d'activité entre enzymes d'origines animales et celles provenant de micro-organismes et de végétaux, a dû être abandonnée. En effet, la spécificité semble beaucoup plus liée à l'environnement spatial et à la nature de l'ose pénultième qu'à l'origine de l'enzyme.

Nous avons d'ailleurs montré dans le tableau XXV (p.118) que l'ose sur lequel est branchée la N-acétylglucosamine est important pour la spécificité enzymatique. Le seul fait de passer d'un  $\underline{\text{O}}-\underline{\beta}-\underline{\text{D}}-2$  désoxy-2-acétamidoglucoopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\underline{\text{D}}$ -mannose à un  $\underline{\text{O}}-\underline{\beta}-\underline{\text{D}}-2$ -désoxy-2-acétamidoglucoopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\underline{\text{D}}$ -galactose entraîne une diminution notable du pourcentage d'hydrolyse des liaisons sauf dans le cas de l'hydrolyse par la  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase du foie de Boeuf. Ces observations sont en accord avec les résultats trouvés par VIKHA et al. (216).

Ils remarquent que l'affinité diminue lorsqu'on remplace un glucose par un galactose ou par une N-acétyl-glucosamine. Il n'est donc pas possible dans l'état actuel de nos connaissances de conclure à l'existence d'une spécificité plus ou moins stricte des enzymes vis-à-vis du type de la liaison à hydrolyser.

## B - INFLUENCE DE LA TAILLE SU SUBSTRAT

Des tri et tétra saccharides renfermant des liaisons N-acétyl-glucosamine  $\beta 1 \rightarrow 2$  et  $\beta 1 \rightarrow 4$  ont été hydrolysées par deux préparations enzymatiques isolées de la fève Jack et d'*Aspergillus niger* afin d'étudier les variations de libération de la N-acétyl-glucosamine en fonction de la structure du substrat. Les hexosaminidases isolées de la fève Jack et d'*Aspergillus niger* ont été choisies car ces deux

préparations se sont révélées être parmi les plus actives sur les liaisons  $\beta 1 \rightarrow 2$  et  $\beta 1 \rightarrow 4$ .

### 1 - RESULTATS

#### a - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 2)-mannose

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXVI (p.124). Nous pouvons remarquer tout d'abord que l'activité des préparations enzymatiques de la fève Jack et de l'Aspergillus niger au bout de 24 heures d'hydrolyse est nettement inférieure quand on compare les pourcentages obtenus pour le O- $\beta$ -D-2-désoxy 2-acétamido-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-D-mannose et le O- $\beta$ -D-2-désoxy-2-acétamido-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-D-mannose. La poursuite de l'hydrolyse pendant 5 jours ne modifie pas le pourcentage de libération. Ces travaux ont été vérifiés au laboratoire par VANDERSYPPE (217).

#### b - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 4)-mannose

L'hexosaminidase isolée de la fève Jack est plus active sur le trisaccharide (oside I)(cf.p. 53 - 5) et le tétrasaccharide (Oside L) (cf. p.64-6). On obtient respectivement 81 et 60 p.100 d'hydrolyse alors que l'on obtient seulement 35 p.100 pour le disaccharide (Oside A) (cf. p.63-1). Au contraire l'hexosaminidase isolée de l'Aspergillus niger est sans action sur le tri- et le tétrasaccharide. L'enzyme possède toutefois une affinité assez grande vis-à-vis du disaccharide.

#### c - Liaison O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-N-acétyl-glucosamine.

L'action des cinq préparations enzymatiques a été étudiée sur le N-acétyl-chitotriose. Les constantes d'affinité, les vitesses maximales théoriques ainsi que les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine ont été déterminées et rassemblés dans le tableau XXVII (p.125). Les hexosaminidases isolées de la rate et du foie de Boeuf sont sans action sur le N-acétyl-chitotriose. Les trois autres préparations possèdent une action négligeable, dans les conditions utilisées, sur la libération de la N-acétyl-glucosamine. L'affinité des hexosaminidases, principalement celle d'Aspergillus niger est importante, les

T A B L E A U XXVI

Pourcentages de N-acétyl-glucosamine libérée au bout de 24 heures d'hydrolyse à partir d'oligosaccharides de taille variable par des préparations enzymatiques isolées de la Fève Jack et d'Aspergillus niger.

Substrats	N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase isolée à partir	
	Fève Jack	<u>Aspergillus niger</u>
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1,2} \text{Man} \\ \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \\ \uparrow 1,2 \\ \text{GlcNAc} \end{array}$	100	62
$\begin{array}{c} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \\ \uparrow 1,2 \\ \text{GlcNAc} \end{array}$	47	53
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1,4} \text{Man} \\ \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \\ \uparrow 1,4 \\ \text{GlcNAc} \end{array}$	35	56,5
$\begin{array}{c} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \\ \uparrow 1,4 \\ \text{GlcNAc} \end{array}$	81	0
$\begin{array}{c} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \\ \uparrow 1,4 \quad \uparrow 1,4 \\ \text{GlcNAc} \quad \text{GlcNAc} \end{array}$	71	0

T A B L E A U XXVII

Hydrolyse du tri-N-acétyl-chitotriose par cinq N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidases d'origines diverses.

Origine de l'hexosaminidase	Km (mM)	VMax ( $\mu$ mole/mn/ mg de protéine)	p.100 de libération au bout de 24 heures
Rate de Boeuf		0	0
Foie de Boeuf		0	0
Fève Jack	1,66 $\pm$ 0,17	0,08	1,2
Graines de Fenugrec	1,66 $\pm$ 0,11	0,59	7,1
<u>Aspergillus niger</u>	0,58 $\pm$ 0,02	0,31	14

enzymes isolées de la rate et du foie de Boeuf sont incapables d'agir sur le N-acétyl-chitotriose.

## 2 - DISCUSSION

La modification de structure du substrat entraîne une modification dans les modalités d'hydrolyse de ces oligosaccharides. Cependant, les différences ne vont pas toutes dans le même sens. En présence d'une liaison  $\beta 1 \rightarrow 2$  à hydrolyser, les enzymes isolées de la fève Jack et de l'Aspergillus niger coupent plus facilement la liaison du disaccharide par rapport à celle du trisaccharide.

Dans le cas des liaisons  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$  4)-mannose, l'enzyme de la fève Jack agit de préférence sur le tri- et le tétrasaccharide, l'hexosaminidase de l'Aspergillus niger est par contre sans action sur ces oligosaccharides. Cependant, nous avons remarquer que l'enzyme d'Aspergillus niger est capable d'hydrolyser le chitotriose. BAHL et AGRAWAL (218) ont montré que cette enzyme était capable d'agir sur le N-acétyl-chitotétraose et le N-acétyl-hexochitohexaose avec des vitesses d'hydrolyse d'autant plus faible que la masse moléculaire est plus élevée.

De notre étude, il apparait que si la masse moléculaire intervient, elle joue un rôle assez faible, le facteur influençant le plus l'hydrolyse est sans nul doute la conformation spatiale du substrat.

Ainsi il semble que l'enzyme de l'Aspergillus niger soit capable d'hydrolyser les N-glycannes, par contre, l'hexosaminidase de la fève Jack est capable d'hydrolyser plus facilement les isoglycannes.

## III - ACTION SUR UN GLYCOPEPTIDE ISOLE DE L'OVOMUCOIDE

Le comportement des cinq préparations enzymatiques a été étudié sur un glycopeptide dont la masse moléculaire est de 3220, isolé de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule selon le procédé décrit par YAMASHINA et MAKINO (219), modifié par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (220). Le glycopeptide renferme 40 p.100 d'hexosamines soit 10 résidus de N-acétyl-glucosamine.

Les résultats obtenus par méthylation par FOURNET (221) sont en faveur de l'existence de 6 résidus de N-acétyl-glucosamine en position externe non réductrice, soit 60 p.100 des hexosamines totales.

## 1 - RESULTATS

Dans les conditions d'hydrolyse utilisées, le nombre de résidus de N-acétyl-glucosamine libéré par l'hydrolyse du glycopeptide de l'ovomucoïde par les cinq préparations enzymatiques étudiées, est très faible. Le tableau XXVIII (p. 128) rassemble les résultats obtenus. Les enzymes isolées de la fève Jack et de la rate de Boeuf libèrent un seul résidu de N-acétyl-glucosamine. L'action des autres préparations enzymatiques est négligeable : 0,1 à 0,3 résidu de N-acétyl-glucosamine.

## 2 - DISCUSSION

L'activité restreinte des différentes N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases sur le glycopeptide  $\beta$  de l'ovomucoïde peut s'expliquer de différentes manières.

- Existence possible de liaisons N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasiques; Cette hypothèse est à rejeter car la détermination de la structure des oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide natif de l'ovomucoïde par BAYARD et al. (222) a montré que la N-acétyl-glucosamine était toujours liée par une liaison  $\beta$ -glycosidique.

- Présence de nombreuses liaisons N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasiques 1  $\rightarrow$  4, difficiles à hydrolyser.

- Existence d'une conformation spatiale telle qu'il existe de nombreux encombrements stériques empêchant les exohexosaminidases d'intervenir.

- Le faible taux de N-acétyl-glucosamine libéré peut être encore dû à l'existence de nombreux variants glycaniques ne renfermant pas le même taux de N-acétyl-glucosamine situé en position externe non réductrice.

- Le faible pourcentage d'hydrolyse peut encore s'expliquer par l'existence de conditions d'hydrolyse impropres au maximum d'efficacité des enzymes.

Ainsi l'action des effecteurs est toujours déterminée à l'aide des hétérosides de synthèse jamais en présence d'oligosaccharides naturels. Enfin il est connu que certaines enzymes sont capables de couper les

Libération de N-acétyl-glucosamine à partir d'un glycopeptide obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucofide.

	Hexosaminidase isolée à partir de				
	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	<u>Aspergillus niger</u>
Pourcentage de libération de N-acétyl-glucosamine	15	0	14,6	1,4	5
Nombre de résidus de N-acétyl-glucosamine libérée	1	0	1	0,1	0,3



grosses molécules sans pour cela couper les molécules de poids moléculaire plus faible. C'est le cas des neuraminidases solubles et lysosomales mises en évidence par TULSIANI et CARUBELLI (223).

Cependant, des essais d'hydrolyse réalisés par MURAMATSU et EGAMI (224) à l'aide de l'hexosaminidase de Turbo cornutus sur un glycopeptide de l'ovomucoïde donnent 19 p.100 de libération de N-acétyl-glucosamine par rapport aux hexosamines totales. De même CLAMP et HOUGH (225) ont obtenu par action de l'hexosaminidase isolée de l'épididyme de Bélier sur un glycopeptide de l'ovomucoïde une libération de 0,95 résidu de N-acétyl-glucosamine.

Comme on peut le remarquer, ces résultats viennent confirmer ceux que nous avons obtenus et ils démontrent que la libération de la N-acétyl-glucosamine à partir des glycopeptides n'est jamais totale.

#### IV - CONCLUSIONS CONCERNANT LA SPECIFICITE ENZYMATIQUE

Lorsque nous avons commencé cette étude, nous pensions qu'il existait une spécificité de liaison très étroite. Il a fallu très vite abandonner cette idée au fur et à mesure que nous avançons dans notre travail.

A la vue des résultats obtenus, nous pouvons conclure à une affinité assez élevée de toutes les enzymes vis-à-vis de la liaison  $\beta$  1  $\rightarrow$  6. Pour les autres spécificités, il est plus difficile de les définir ; elles dépendent en effet de nombreux facteurs : type de la liaison à hydrolyser, nature de l'ose sur lequel est branchée la N-acétylglucosamine, conformation spatiale du substrat (N-glycane ou iso-glycane) et enfin conformation spatiale de la molécule enzymatique (à ceci se rattachent toutes les conditions de l'hydrolyse : température, pH optimum et effecteurs).

Les résultats que nous avons obtenus peuvent cependant nous permettre de tirer les conclusions suivantes :

- Lorsque la N-acétylglucosamine est liée par une liaison  $\beta$  1  $\rightarrow$  2 à un oligosaccharide quelconque : l'affinité décroît avec l'augmentation de la masse moléculaire.

- Lorsque la N-acétyl-glucosamine est liée par une liaison  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 à un oligosaccharide, l'affinité décroît avec la masse moléculaire lorsque la molécule est linéaire, mais elle augmente par rapport

à un disaccharide dans le cas de molécules branchées (fève Jack). Cependant l'enzyme d'*Aspergillus niger* qui coupe assez facilement les liaisons  $\beta 1 \rightarrow 4$  quand la molécule est linéaire mais cette enzyme est sans action sur une molécule branchée.

- L'affinité des enzymes diminue lorsqu'on remplace un mannose ou un glucose par une molécule de galactose ou de N-acétyl-glucosamine.

- Nous pouvons rassembler les enzymes que nous avons étudiées en deux groupes. Le premier groupe renfermera les enzymes isolées de la rate et du foie de Boeuf et de la fève Jack dans l'ordre d'affinité décroissante est le suivant :  $\beta 1 \rightarrow 6$  ;  $\beta 1 \rightarrow 2$  , et  $\beta 1 \rightarrow 4$ . Le deuxième groupe est constitué par les enzymes isolées des graines germées de Fenugrec et d'*Aspergillus niger* dont l'ordre d'affinité décroissant est le suivant :  $\beta 1 \rightarrow 6$  ,  $\beta 1 \rightarrow 4$  et  $\beta 1 \rightarrow 2$ .

- Lorsqu'il s'agira de déterminer uniquement la nature de l'anométrie de la liaison N-acétyl-glucosaminyle présente dans un polysaccharide, le choix de l'origine de l'enzyme sera donc plus vaste car sans avoir une libération totale de la N-acétyl-glucosamine cette libération pourra être significative quant à la nature de l'anométrie. Lorsque la libération doit être quantitative le choix des enzymes est plus limité. Nous conseillons d'hydrolyser de préférence :

- . Les oligosaccharides linéaires ou ramifiés à liaison  $\beta 1 \rightarrow 2$  par les enzymes isolées de la rate de Boeuf ou de la fève Jack.
- . Les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta 1 \rightarrow 3$  par les enzymes isolées du foie ou de la rate de Boeuf.
- . Les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta 1 \rightarrow 4$  par les enzymes isolées de l'*Aspergillus niger* ou les graines germées de Fenugrec.
- . Les oligosaccharides ramifiés à liaison  $\beta 1 \rightarrow 4$  par l'enzyme isolée de la fève Jack.
- . Enfin, les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta 1 \rightarrow 6$  par les enzymes isolées de l'*Aspergillus niger* et de la rate de Boeuf.

Grâce à l'utilisation de ces différentes hexosaminidases nous avons pu déterminer la nature de l'anomérisation des liaisons dans le dilactaminyllac α-N-tétraose. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la publication suivante : GRIMMONPREZ, BOUQUELET, BAYARD, SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL, Eur. J. Biochem., 1970, 13, 494)..

Nous avons en outre participé à la détermination de la structure de 10 oligosaccharides isolés par acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la publication de BAYARD, FOURNET, BOUQUELET, STRECKER, SPIK et MONTREUIL, Carbohydr. Res., (sous presse).

---

CONCLUSIONS GENERALES

---

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'ensemble des résultats que nous avons exposés peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Nous avons préparé quatre  $\beta$ -D-N-acétyl-hexosaminidases à partir de différentes sources, les unes classiques : la rate de Boeuf, la fève Jack et l'Aspergillus niger, la quatrième originale : les graines germées de Fenugrec et nous nous sommes livré, sur ces préparations et sur un échantillon commercial provenant du foie de Boeuf, à une étude systématique des conditions et de la spécificité de leur action en vue de les utiliser dans la détermination de la structure des polysaccharides libres ou conjugués sous forme de glycoprotides ou de glycolipides.

2 - Nous avons entrepris de purifier ces enzymes par différents procédés chromatographiques et nous sommes parvenu à des enrichissements, par rapport aux protéides totaux, de 95 fois dans le cas de l'Aspergillus niger, de 405 fois dans le cas de la fève Jack et de 86 fois dans le cas de la rate de Boeuf. Dans le cas des enzymes du foie de Boeuf, nous n'avons pas tenté de purifier les préparations commerciales dont nous disposions. Enfin, la forte coloration des premiers extraits des graines germées de Fenugrec ne nous a pas permis de mesurer leur activité et, en conséquence, de déterminer le taux de purification.

Les degrés de pureté que nous avons atteints ne permettent pas évidemment d'entreprendre, dès à présent, l'étude de la structure de ces enzymes et la recherche de la nature de leur site actif. Ils sont toutefois suffisants pour définir les conditions optimales d'action, les valeurs de  $K_m$  et de  $K_i$  des  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidases.

3) Toutes les préparations que nous avons utilisées possèdent une activité, à la fois,  $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidasique et  $\beta$ -N-acétyl-D-galactosaminidasique.

Ces activités varient avec l'origine des enzymes ; Les rapports Activité  $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidasiq ue/Activité  $\beta$ -N-acétyl-D-galactosaminidasiq ue sont, en effet, les suivantes : 1,57 pour l'enzyme de la fève Jack ; 2,1 pour l'enzyme d'Aspergillus niger ; 3,3 pour l'enzyme de la rate de Boeuf et les graines germées de Fenugrec ; 3,9 pour l'enzyme du foie de Boeuf.

Il nous paraît important de signaler que ces rapports ne varient pas au cours de la purification des enzymes ; Ce résultat représente un premier argument expérimental en faveur de l'hypothèse de la double activité enzymatique portée par la même molécule d'enzyme.

4 - Nous avons étudié les variations d'activité vis-à-vis du p-nitrophényl- $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminide de cinq préparations de -N-acétyl-D-hexosaminidases, en fonction de la température, du pH et de la présence de différents cations ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) et défini, pour chacune d'elles, les conditions d'action optimales. Cette étude a révélé le comportement particulier de la  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase d'Aspergillus niger. En effet, cette enzyme est pratiquement insensible aux cations métalliques et les sels mercuriques eux-mêmes n'inhibent que partiellement son action à une concentration qui abolit totalement l'activité des autres préparations. En outre, le S.D.S. est sans action sur l'enzyme d'Aspergillus niger alors qu'il inhibe les autres enzymes. Ce résultat révèle donc l'existence d'une structure particulière de la  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidase d'Aspergillus niger dont il serait passionnant d'entreprendre l'étude.

4 - L'analyse de la spécificité des cinq préparations de -N-acétyl-D-hexosaminidases a montré qu'il n'existait pas de spécificité étroite vis-à-vis des différents types de liaisons 1  $\rightarrow$  2 ; 1  $\rightarrow$  3 ; 1  $\rightarrow$  4 ou 1  $\rightarrow$  6  $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidasiques, mais seulement des différences dans les vitesses d'hydrolyse de ces liaisons. En effet, de l'ensemble des résultats que nous a fournis notre étude sur la spécificité d'action vis-à-vis de divers oligosaccharides nous pouvons retenir les points suivants :

a) Toutes les préparations libèrent difficilement le résidu de N-acétyl-glucosamine du O- $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminyl-(1,4)-mannose et du O- $\beta$ -D-N-acétyl-D-glucosaminyl-(1,4)-O- -D-N-acétyl-D-

glucosaminyl-(1,4)-N-acétyl-glucosamine. Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'enzyme d'Aspergillus niger avec un rendement de 56,5 p.100 dans le cas de disaccharide et 14 p.100 dans le cas du trisaccharide.

Les  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases de la fève Jack, des graines de Fenugrec libèrent respectivement 35 et 32 p.100 du résidu de N-acétyl-glucosamine présent dans le disaccharide et 1,2 et 7,1 p.100 du résidu de N-acétyl-glucosamine présent dans le trisaccharide. L'action des  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases de la rate et du foie de Boeuf est pratiquement nulle sur les deux oligosaccharides.

b) La libération quantitative de la N-acétyl-glucosamine présente dans le O- $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminyl-(1,2)-mannose est réalisée grâce aux préparations extraites de la rate de Boeuf et de la fève Jack. L'action de la  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidase d'Aspergillus niger permet une libération de 62 p.100, alors que les  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidases du foie de Boeuf et des graines de Fenugrec ne provoquent qu'une libération de 26 et 25 p.100 du résidu de N-acétyl-glucosamine. Ces pourcentages d'hydrolyse sont obtenus après 24 heures d'hydrolyse, et ils n'augmentent pas ou très peu si on prolonge la durée d'hydrolyse jusqu'à cinq jours.

c) La libération quantitative après 24 heures d'hydrolyse, du résidu de N-acétyl-glucosamine présent dans le O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1,3)-O- $\beta$ -D-galactosyl-(1,4)-glucose est réalisée uniquement par la  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidase du foie de Boeuf, les  $\beta$ -N-acétyl-D-hexosaminidases de la rate de Boeuf, de la fève Jack et d'Aspergillus niger libèrent respectivement 50,4 p.100, 68 et 40,8 p.100 du résidu de N-acétyl-glucosamine. La  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase des graines de Fenugrec ne possède aucune action sur la libération de la N-acétyl-glucosamine présente dans le trisaccharide.

d) La libération par les hexosaminidases de la N-acétyl-glucosamine à partir du O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$  4)-D-galactose n'est pas quantitative. Le pourcentage maximum obtenu est de 30 p.100 pour l'enzyme isolée du Fenugrec. Dans tous les cas nous avons constaté une nette diminution de l'activité.

e) La libération quantitative de la N-acétyl-glucosamine présente dans le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 6)\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{\text{mannose}}$  est réalisée par l'enzyme isolée de l'Aspergillus niger. On peut remarquer que l'enzyme de la rate de Boeuf libère 77 p.100 de cette même N-acétyl-glucosamine. Les autres hexosaminidases présentent une affinité normale sans pour cela obtenir un maximum de libération.

6 - Les pourcentages de libération exprimés précédemment ne peuvent être généralisés à différents oligosaccharides renfermant des liaisons  $\beta\text{-N-acétyl-glucosaminyl-}1 \longrightarrow 2, 1 \longrightarrow 3, 1 \longrightarrow 4$  et  $1 \longrightarrow 6$ , en effet, les différences profondes apparaissent dans l'action des  $\beta\text{-N-acétyl-hexosaminidases}$  en fonction de la taille et de la configuration spatiale de l'oligosaccharide étudié.

a) L'action de la  $\beta\text{-N-acétyl-hexosaminidase}$  de la fève Jack provoque la libération de 47 p.100 du résidu de N-acétyl-glucosamine présent dans le  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 2)\text{-}\underline{0}\text{-}\underline{\alpha}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{\text{mannosyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 3)\text{-}\underline{\text{mannose}}$  alors que son action est quantitative sur le dissaccharide  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 2)\text{-}\underline{\text{mannose}}$ .

b) Au contraire, l'action de la  $\beta\text{-N-acétyl-hexosaminidase}$  de la fève Jack augmente en présence du  $\underline{0}\text{-}\underline{\alpha}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{\text{mannosyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 3)\text{-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 4)\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{\text{mannose}}$ , et en présence du  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1,4)\text{-}\underline{0}\text{-}\underline{\alpha}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{\text{mannosyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 3)\text{-}\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 4)\text{-}\underline{\text{mannose}}$ . En effet, les pourcentages de libération atteignent respectivement 81 et 71 p.100 alors qu'il est de 35 p.100 en présence du  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 4)\text{-}\underline{\text{mannose}}$ .

c) Dans le cas de la  $\beta\text{-N-acétyl-D-hexosaminidase}$  d'Aspergillus niger son action est nulle sur les tri- et tétrasaccharides précédents alors que le pourcentage de libération atteint 56,5 p.100 au cours de l'hydrolyse du  $\underline{0}\text{-}\underline{\beta}\text{-}\underline{D}\text{-}\underline{N}\text{-}\underline{\text{acétyl-glucosaminyl}}\text{-}(1 \longrightarrow 4)\text{-}\underline{\text{mannose}}$ .

d) Les différentes préparations enzymatiques possèdent, au cours de leur action sur le glycopeptide de l'ovomucoïde des comportements variables. Dans tous les cas, les enzymes que nous possédons ne semblent pas être adaptées à l'hydrolyse de substrat à poids moléculaire élevé et surtout de conformation spatiale complexe.

7 - De l'ensemble des résultats obtenus sur la spécificité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases les idées essentielles que nous pouvons retenir sont les suivantes :

1. Notre étude comparative est loin d'être complète et homogène puisque tous les cas possibles de structure polysaccharidique et tous les cas possibles d'origine des  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases n'ont pas été envisagés. Cependant, cette étude partielle montre qu'il est important de choisir l'origine d'une  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase en fonction de la structure du polysaccharide étudié, et qu'il n'est pas possible de tirer des lois définitives sur le mode d'action des  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidases.

2 . Le choix de l'origine de l'enzyme peut-être fait en fonction des résultats attendus. S'il s'agit simplement de déterminer l'anomérisation  $\beta$  ou  $\alpha$  de la liaison N-acétyl-hexosaminidasique les possibilités sont plus grandes, car différentes préparations enzymatiques peuvent libérer de la N-acétyl-glucosamine dans des proportions qui sans être totales sont significatives sur la nature de l'anomérisation. Certaines d'entre elles sont néanmoins sans aucune action sur un type donné de liaison. Une conclusion trop hâtive ne doit pas dans ce cas, conduire à l'idée de l'absence de l'anomérisation  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidasique.

3 . Au cours d'une étude structurale de polysaccharide qui nécessite la libération totale des résidus de N-acétyl-glucosamine le choix des préparations enzymatiques est plus difficile car plus limité.

4 . Le problème de l'hydrolyse enzymatique et par conséquent l'étude de la spécificité enzymatique ne pourra être résolu que par l'étude structurale des enzymes. Il sera donc nécessaire d'étudier les différents sites réactionnels de l'enzyme ainsi que sa conformation spatiale. Ces études ne pourront être entreprises qu'à partir de solutions enzymatiques très pures.

- AMINOFF D. et FURUKAWA K., J. Biol. Chem., 1970, 245, 1657 (11, 13, 18).
- BACCINO F.M. et ZURETTI M.F., Biochem. Biophys. Acta., 1971, 235, 353 (65)
- BAHL O.P. et AGRAWAL K.M.L., J. Biol. Chem., 1968, 243, 98 (42, 58, 104).
- BAHL O.P. et AGRAWAL K.M.L., J. Biol. Chem., 1969, 244, 2970-78 (218).
- BAHL O.P., J. Biol. Chem., 1970, 245, 299 (16, 17, 20, 39, 117, 129, 170, 175, 189).
- BAYARD B., Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Lille, 1970 (183).
- BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G. et MONTREUIL J., Eur. J. Biochem. (sous presse).
- BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J., Carbohydr. Res., (sous presse).
- BEAUGIRAUD S., PERCHERON F., COURTOIS J.E. et LANCHEC C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 621 (172, 176, 190).
- BERGER L.R. et REYNOLDS D.M., Biochim. Biophys. Acta, 1958, 29, 522 (38,102)
- BOROOAH J., LEABACK D.H. et WALKER P.G., Biochem. J., 1961, 78, 106 (92,97).
- BUDDECKE E. et WERRIES E., Z. Physiol. Chem., 1965, 340, 257 (211).
- CAYGILL J.C., ROSTON C.P.J. et JEVONS F.R., Biochem. J., 1966, 98, 405 (68, 128).
- CLAMP J.R. et HOUGH L., Chem and Ind. (London), 1963, 82 (225).
- CONCHIE J., Biochem. J., 1954, 58, 552 (161).
- CONCHIE J. et LEVY G.A., Biochem. J., 1957, 65, 389 (140).
- CONCHIE J. et FINDLAY J.J., J. endocrinol., 1959, 18, 132 (146).
- CONCHIE J., FINDLAY J. et LEVY G.A., Biochem. J., 1959, 71, 318 (50, 56).
- CONCHIE J., LEVY G.A. et MARSH C.A., Biochem. J., 1956, 62, 24 P (45).
- CONCHIE J., HAY A.J., STRACHA H.J. et LEVY G.A., Biochem. J., 1967, 102, 929 (201).
- COURTOIS J.E. et LE DIZET P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 535 (9, 12).
- COURTOIS J.E. et PERCHERON F., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 167 (171).
- CUATRECASAS P. et ILLIANO G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 44, 178 (66).
- DANCE N., PRICE R.G. et ROBINSON D., Biochem. J., 1970, 119, 5P (77, 148).
- DANCE N., PRICE R.G., ROBINSON D. et STERLING J.L., Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 189-197 (73).

- DANCE N., PRICE R.G., CATTELL W.R., LANSDELL J. et RICHARDS B., Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 87 (76).
- DAVIES D.D., Biochem. J., 1966, 98, 37 P (174).
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F., Biochem. J., 1955, 60, 604-617 (64).
- DRZENIEK R., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1967, 26, 631 (2,14,19)
- DRZENIEK R. et GAUHE A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1970, 38, 651 (4).
- EAST M.E., MADIMAVEITIA J. et TODD A.R., Biochem. J., 1941, 35, 872 (54).
- EYLAR E.H., J. Theoret. Biol., 1965, 10, 89 (71).
- FAILLARD H., Hoppe Seyl. Z., 1959, 317, 257 (22).
- FINDLAY J., et LEVY G.A., Biochem. J., 1960, 77, 170 (35, 94, 131, 199).
- FINDLAY J., LEVY G.A. et MARSH C.A., Biochem. J.; 1958, 69, 467 (114, 138).
- FISHMAN W.H., GOLDMAN S.S. et DELELLIS R., Nature, 1967, 213, 457 (72).
- FOURNET B., Communication personnelle (221).
- FROHWEIN Y.Z. et GATT S., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 128, 216 (29, 52, 63, 111, 124, 143).
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1963, 89, 380 (21, 23).
- GOOD T.A. et BESSMAN S.P., Anal. Biochem., 1964, 9, 253 (165, 169, 168).
- GRASSMAN W., ZEICHMEISTER L., BENDER R. et TOTH G., Ber. Dent. Chem. Ges., 1934, 67 : I, Abt. B, 1 (26).
- GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., 1970, 13, 494 (1, 209).
- HELFERICH B. et ILOFF A., Z. Physiol. Chem., 1933, 221, 252 (41).
- HUGHES C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry, 1964, 3, 1543(36,59,100,127,133, 144,197).
- JONES G.H. et BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1969, 244, 1052 (8).
- JUNGALWALA F.B. et ROBINS E., J. Biol. Chem., 1968, 243, 4258 (6).
- KARRER P. et HOFMANN A., Helv. Chim. Acta, 1929, 12, 616 (25).
- KHORLIN A. Ya, PRIDALOVA I.M. et BYSTROVA I.B., Carbohydr. Res., 1971, 19, 272-275 (3).
- KREBS H.A., Biochem. J., 1966, 98, 37 P (173).
- KUHN R. et KRUGER G., Chem. Ber., 1956, 89, 1473 et 1957, 90, 264 (167).
- LANGLEY T.J. et JEVONS F.R., Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 312 (136).

- LANGLEY T.J. et JEVONS F.R., Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 312 (136)
- LEABACK D.H. et WALKER P.G., Biochem. J., 1967, 104, 70<sup>P</sup> (53)
- LEABACK D.H., Biochim Biophys. Res. Commun. 1968, 32, 1025-1030 (141, 202)
- LEVY , Biochem. J., 1952, 52, 464 (139).
- LI Y.T. et LI S.C., J. Biol. Chem., 1968, 243, 3994 (62).
- LI S.C. et LI Y.T., J. Biol. Chem., 1970, 245, 5153 (31, 33, 44, 61, 91, 105, 118, 122, 135, 177, 178, 180, 191, 192, 194, 196, 200, 203, 212).
- LINKER A., MEYER K. et WEISSMAN B., J. Biol. Chem., 1955, 213, 237 (109, 214)
- MATTA K.L. et BAHL O.P., Carbohydr. Res., 1972, 21, 460-464 (207).
- Mc ILVAINE J.C., J. Biol. Chem., 1921, 49, 183 (160, 186, 187, 188, 195).
- MEGA T., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., J. Biochem., 1970, 68, 109 (40, 81, 92, 103, 119, 123).
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 843 (186, 220).
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 1639 (163).
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13 (164).
- MURAMATSU T., J. Biochem., 1968, 64, 521 (30, 46, 99, 129, 130, 134, 158, 198)
- MURAMATSU T. et EGAMI F., J. Biochem. Jap., 1967, 62, 700 (1a, 47).
- MURAMATSU T. et EGAMI F., Japan. J. Expt. Med., 1965, 35, 171-179 (224).
- NEUBERGER A. et PITT-RIVERS R.V., Biochem. J., 1939, 33, 1580 (27, 93).
- PARK J.T. et JOHNSON M.J., J. Biol. Chem., 1949, 181, 149 (162).
- POWNING R.F. et IRZYKIEWICZ H., Comp. Biochem. Physiol., 1964, 12, 405 (43)
- PUGH D., LEABACK D.H. et WALKER P.G., Biochem. J., 1957, 65, 464 (95, 142, 206)
- ROBINSON D. et STIRLING J.L., Biochem. J., 1968, 107, 321 (70, 80, 84).
- ROSEMAN S. et DORFMAN A., J. Biol. Chem., 1951, 191, 607 (37, 149).
- SANDHOFF K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 1095 (74).
- SANDHOFF K., F.E.B.S. Letters, 1969, 4, 351 (85).
- SANDHOFF K. et WASSLE W., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1971, 352, 1119, (60, 75, 83, 88, 204).
- STANLEY P.G., Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1953, 31, 187 (166).
- STEEKS E., CUATRECASAS P. et POLLARD H.B., J. Biol. Chem., 1971, 246, 196 (6)

- STIRLING J.C., Biochem. J., 1971, 123, 11 P ( 70 )
- SUZUKI H., LI S.C. et LI Y.T., J. Biol. Chem., 1970, 245, 781 (15).
- TARENTINO A.L. et MALEY F., Arch. Biochem. Biophys., 1972, 147, 446 (79, 87, 90, 126).
- TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 132 (181).
- TULSIANI D.R.P. et CARUBELLI R., J. Biol. Chem., 1970, 245, 1821 (223).
- TUPPY H. et STAUDENBAUER W.L., Biochemistry, 1966, 5, 1742 (152, 155).
- VANDERSYPPE R., D.E.A. de Biochimie, Lille, 1971 (217).
- VIKHA G.V., K<sup>A</sup>VERZNEVA E.D. et KHORLIN A.Ya., Biochemistry Russe, 1971, 36, 26 (48, 112, 125, 208, 216).
- WALKER P.G. in "The amino sugars, Vol. II B. BALAZS 'A and JEANLOZ R.W. Eds. 1966, 155 (24, 137).
- WALKER P.G., WOOLLEN J.W. et PUGH D., J. Clin. Pathol., 1960, 13, 353 (145).
- WALKER P.G., WOOLLEN J.W. et HEYWORTH R., Biochem. J., 1961, 79, 288 (96, 112, 120).
- WATANABE K., J. Biochem., 1936, 24, 297 (34, 49).
- WATKINS W.M., Biochem. J., 1959, 71, 261 (10, 101, 151).
- WEISSMANN B., HADJIOANNOU S. et TORNHEIM J., J. Biol. Chem., 1964, 239, 59-63 (51, 89, 98, 110, 132, 200, 210, 213, 215).
- WEISSMANN B. et FRIEDERICI D., Biochem. Biophys. Acta, 1966, 117, 498 (153, 157).
- WEISSMANN B., ROWIN G., MARSHALL J. et FRIEDERICI D., Biochemistry, 1967, 6, 207 (150).
- WEISSMANN B. et HINRICHSSEN D.F., Biochemistry, 1969, 8, 2034 (157).
- WERRIES E., WOLLEK E., GOTTSCHALK A. et BUDECKE E., Europ. J. Biochem., 1969, 10, 445 (154, 156, 159, 179, 182, 193).
- WIEDERSCHAIN G.Y. et ROSENFELD E.L., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1075 (7).
- WIEDERSCHAIN G.Y. et ROSENFELD E.L., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1971, 44, 1008 (5).
- WINCHESTER B.G., Biochem. J., 1971, 124, 929 (32, 69, 82).
- WINCHESTER B.G., CAFFREY M. et ROBINSON D., Biochem. J., 1971, 121, 161 (86).
- WOOLLEN J.W., HEYWORTH R. et WALKER P.G., Biochem. J., 1961, 78, 111 (28, 113, 120).
- WOOLLEN J.W., WALKER P. et HEYWORTH R., Biochem. J., 1961, 79, 294 (55, 57, 106).
- WOOLLEN J.W. et TURNER P., Clin. Chim. Acta, 1965, 12, 671 (147).
- YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem., 1962, 51, 359 (185, 219).