

50376
1972
33

50376
1972
33

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

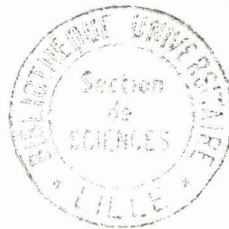
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le grade de Docteur Es Sciences

par

M.T. PLANCOT



ISOLEMENT ET ETUDE D'UNE DIPEPTIDASE DE

MYCOBACTERIUM PHLEI. CARACTERISATION DES AMINOPEPTIDASES

DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE SOLUBLE

Membres du Jury : MM. GUILLAUME, Président
BISERTE, Rapporteur
MONTREUIL, Examineur
TACQUET, Invité
HAN, Invité

Soutenue le 6 Juin 1972

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, sous la direction de Messieurs les Professeurs Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET, dans le laboratoire de Recherche sur les Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur, Monsieur le Docteur R. BUTTIAUX).

Je suis heureuse d'exprimer ici toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur A. TACQUET et Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires, m'ont proposé ce sujet de recherche et m'ont toujours encouragée et conseillée.

En acceptant de participer à ce jury de thèse et en éclairant mon travail de son jugement bienveillant, Monsieur le Professeur G. BISERTE m'a fait un très grand honneur : je lui exprime ici ma plus profonde gratitude, ainsi qu'à Monsieur le Professeur P. BOULANGER, qui m'a accueillie avec la plus grande bienveillance dans son Institut de Biochimie des Protéines.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur J. MONTREUIL qui a bien voulu juger ce travail et participer au jury de cette thèse.

C'est avec le plus grand plaisir que je trouve ici l'occasion de remercier Monsieur le Docteur K. HAN en qui j'ai trouvé un appui constant et un conseil attentif.

Je suis heureuse de remercier tous ceux dont l'aide amicale m'a été précieuse dans la réalisation de ce travail, Messieurs les Professeurs P. BOULANGER, Y. MOSCHETO, J.P. MUH, Monsieur P. ROOS et Monsieur le Docteur Vétérinaire M. CATSARAS.

A mes camarades de travail des laboratoires des Mycobactéries et de Chimie bactérienne, particulièrement à Messieurs M. JOSEPH, M. WERQUIN et H. WROBLEWSKI, ainsi qu'à mes camarades techniciens, en particulier Madame J. BERNARD et Mlle O. DELACROIX, dont j'ai vivement apprécié l'aide journalière et la présence amicale, j'adresse ici mes plus chaleureux remerciements.

TABLE DES MATIERES

	pages
<u>INTRODUCTION</u>	3
<u>CHAPITRE I : NOTIONS PRELIMINAIRES ET ANALYSE DES TRAVAUX ANTERIEURS</u>	7
A - <u>NOTIONS PRELIMINAIRES</u>	8
B - <u>PROPRIETES ENZYMATIQUES DES EXOPEPTIDASES, ROLE DES PEPTIDASES</u> <u>DANS LA CELLULE</u>	11
<u>Première partie :</u>	
I - <u>EQUIPEMENT PROTEOLYTIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI</u>	11
II- <u>PROPRIETES DES EXOPEPTIDASES</u>	13
1) <u>Les carboxypeptidases</u>	13
a) <u>La carboxypeptidase A</u>	14
b) <u>La carboxypeptidase B</u>	14
c) <u>Les carboxypeptidases hydrolysant les dérivés contenant</u> <u>la proline</u>	14
d) <u>La carboxypeptidase de la levure</u>	15
2) <u>Les aminopeptidases</u>	16
a) <u>La leucine aminopeptidase</u>	16
b) <u>Las leucine aminopeptidases d'origine bactérienne</u>	20
c) <u>L'aminopeptidase ou aminoacyl-oligopeptide hydrolase</u>	22
d) <u>Les aminopeptidases bactériennes</u>	24
e) <u>La proline aminopeptidase</u>	28
f) <u>L'aminopeptidase P</u>	28
g) <u>L'aminotriptidase ou aminoacyl-dipeptide hydrolase</u>	29
h) <u>Les β-naphtylamidases</u>	29
3) <u>Les dipeptidases</u>	36
a) <u>Dipeptidases à spécificité restreinte</u>	36
b) <u>Peptidases à spécificité large</u>	39
c) <u>Dipeptidases à spécificité large hautement purifiées</u>	42

<u>Deuxième partie : PROPRIETES DES METALLO-PEPTIDASES</u>	49
1) <u>Métalloenzymes et complexes métal-enzymes</u>	49
a) <u>Les métalloenzymes</u>	49
b) <u>Les complexes métal-enzymes</u>	49
2) <u>Rôle fonctionnel et structural des ions métalliques</u>	53
3) <u>Nature des sites d'attachement du métal à la protéine</u>	55
4) <u>Influence de la nature du métal sur la spécificité</u>	57
<u>Troisième partie : ROLE DES PEPTIDASES IN VIVO DANS LA CELLULE</u> <u>BACTERIENNE</u>	59
1) <u>Fonction des peptidases</u>	59
a) <u>Rôle nutritif</u>	59
b) <u>Rôle protecteur des peptidases intracellulaires contre l'effet</u> <u> nocif de certains peptides</u>	63
c) <u>Autres rôles éventuels des peptidases intracellulaires</u>	64
2) <u>Régulation des peptidases</u>	66
<u>CHAPITRE II : RECHERCHES PRELIMINAIRES</u>	70
I - <u>PROTOCOLE DE MESURE DES ACTIVITES PEPTIDASQUES</u>	71
1) <u>Dosage de l'activité peptidasique par une technique colorimé-</u> <u> trique directe</u>	71
2) <u>Dosage des protéines</u>	74
3) <u>Etude de la cinétique de l'hydrolyse des peptides</u>	76
a) <u>Par les préparations cellulaires</u>	76
b) <u>Cinétique d'hydrolyse des dipeptides par les extraits cel-</u> <u> lulaires et les préparations enzymatiques purifiées</u>	77
II - <u>OBTENTION DU MATERIEL BACTERIEN</u>	82
1) <u>Culture avec diverses sources d'azote</u>	83
2) <u>Cultures en fermenteur</u>	84
III- <u>EXTRACTION DU MATERIEL ENZYMATIQUE. DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES</u> <u> PEPTIDASES</u>	87
1) <u>Action des Ultra-sons</u>	87
2) <u>Rupture des bactéries par broyage avec la zéolithe</u>	89
3) <u>Activité peptidasique de l'extrait cellulaire brut et distri-</u> <u> bution subcellulaire des peptidases</u>	92
4) <u>Démonstration de l'absence de l'activité endopeptidasique</u>	100
5) <u>Choix des substrats</u>	105

<u>CHAPITRE III : IDENTIFICATION DES EXOPEPTIDASES DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE SOLUBLE</u>	107
I - <u>METHODE UTILISEE</u>	108
1) <u>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose</u>	108
2) <u>Caractérisation des peptidases dans les gels d'acrylamide</u>	109
II- <u>RESULTATS</u>	112
1) <u>Caractérisation de cinq exopeptidases dans la fraction cytoplasmique soluble</u>	112
III- <u>ISOLEMENT DES PROTEINES PRESENTANT UNE ACTIVITE PEPTIDASIQUE</u>	114
IV - <u>SPECIFICITE DES EXOPEPTIDASES ISOLEES DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE SOLUBLE DE MYCOBACTERIUM PHLEI 689</u>	117
<u>CHAPITRE IV. I EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATERIEL DIPEPTIDASIQUE</u>	124
<u>STABILITE DE L'ENZYME</u>	125
1ère étape : <u>Précipitation par le sulfate de Streptomycine</u>	125
2ème étape : <u>Adsorption sur hydroxylapatite</u>	127
3ème étape : <u>Fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium</u>	128
4ème étape : <u>Filtration sur gel de Sephadex</u>	129
a) <u>Chromatographie sur DEAE-cellulose, DEAE-sephadex et CM-sephadex</u>	129
b) <u>Electrophorèse en film liquide</u>	130
c) <u>Filtration sur gel de Sephadex G.100</u>	132
5ème étape :	139
II - <u>COEFFICIENT DE PURIFICATION</u>	141
III- <u>CRITERES DE PURETE</u>	141
<u>CHAPITRE IV : PROPRIETES DE LA DIPEPTIDASE DE MYCOBACTERIUM PHLEI</u>	147
I - <u>DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE</u>	148
1) <u>Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel de Sephadex G.150</u>	148
2) <u>Détermination du poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide</u>	148
II - <u>Composition en acides aminés</u>	152
III - <u>Spécificité</u>	154
IV - <u>Etude des constantes de MICHAELIS-MENTEN : Km</u>	155
V - <u>Influence du pH</u>	157
a) <u>Stabilité de la préparation enzymatique en fonction du pH</u>	157
b) <u>Influence du pH sur l'activité peptidasique</u>	161

VI -	<u>Influence de la température</u>	161
	a) <u>Stabilité de la préparation enzymatique en fonction de la température</u>	161
	b) <u>Influence de la température sur l'activité peptidasique</u>	164
VII -	<u>Influence des inhibiteurs</u>	167
VIII-	<u>Influence des ions métalliques</u>	169
	<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	174

ANNEXE TECHNIQUE

A -	<u>METHODES DE DOSAGE</u>	183
I -	<u>MESURE DES ACTIVITES PEPTIDASQUES</u>	183
	1) <u>Technique de dosage de TACQUET et coll.</u>	183
	a) <u>Contact germe peptide</u>	183
	b) <u>Dosage des acides aminés libérés</u>	183
	2) <u>Variante de la technique de dosage de MATHESON et TATTRIE</u>	184
	a) <u>Réactifs</u>	184
	b) <u>Protocole expérimental</u>	184
	3) <u>Technique de PLANCOT et HAN</u>	185
	a) <u>Réactifs</u>	185
	b) <u>Protocole expérimental</u>	185
	c) <u>Mesure de la cinétique d'hydrolyse d'un peptide</u>	186
	4) <u>Hydrolyse de la leucine-β-naphtylamide</u>	187
II-	<u>DOSAGE DE DIVERSES ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	187
	1) <u>Mesure de l'activité phosphatasique</u>	187
	2) <u>Dosage de l'activité lipasique</u>	187
	3) <u>Dosage de l'activité peroxydasique</u>	187
III-	<u>DOSAGE DES PROTEINES</u>	188
B -	<u>OBTENTION DU MATERIEL BACTERIEN</u>	188
I -	<u>METHODES DE CULTURE</u>	188
	1) <u>Culture en milieu liquide de YOUMANS</u>	188
	2) <u>Culture en fermenteur - Procédé de ROOS</u>	189
II-	<u>RUPTURE DES BACTERIES. BROYAGE AVEC DE LA ZEOLITHE</u>	190

C -	<u>TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE</u>	190
I -	<u>ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE</u>	190
II-	<u>ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE</u>	191
III-	<u>ELECTROPHORESE SUR GEL MIXTE DE POLYACRYLAMIDE-AGAROSE</u>	193
D -	<u>CHROMATOGRAPHIES - ELECTRO-CHROMATOGRAPHIES</u>	193
	1) <u>Chromatographies sur papier</u>	193
	2) <u>Electrochromatographies sur papier</u>	194
	3) <u>Chromatographies sur échangeur d'ions</u>	194
E -	<u>DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE</u>	194
	1) <u>Filtration sur gel de Sephadex G.150</u>	194
	2) <u>Détermination du poids moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium</u>	195
F -	<u>MISE EN EVIDENCE DES CONSTITUANTS EN GEL D'ELECTROPHORESE OU EN IMMUNODIFFUSION</u>	196
	1) <u>Caractérisation des peptidases</u>	196
	a) <u>Gel d'acrylamide</u>	196
	b) <u>Immunodiffusion</u>	197
	2) <u>Coloration des protéines</u>	197
	a) <u>Fixation</u>	197
	b) <u>Coloration par le bleu de Coomassie</u>	197
	c) <u>Coloration par le noir d'amide</u>	198
G -	<u>IMMUNODIFFUSION. TECHNIQUE DE PRECIPITATION EN GEL D'OUCHTERLONY</u>	198
H -	<u>TECHNIQUES D'ETUDES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES</u>	199
I -	<u>DETERMINATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX, METHODE DES DANSYL-AMINO-ACIDES (GRAY et HARTLEY)</u>	199
	1) <u>Dansylation du peptide</u>	199
	2) <u>Chromatographie en couche mince sur gel de Silice</u>	200
	3) <u>Chromatographie en couche mince sur feuille de polyamide</u>	200
II-	<u>DOSAGE DU TRYPTOPHANE : METHODE DE SPIES ET CHAMBERS</u>	201
III-	<u>DOSAGE DES GROUPEMENTS THIOLS : PROCEDE DE SAVILLE</u>	201
	<u>REACTIFS ET MATERIEL DIVERS</u>	202

ABREVIATIONS UTILISEES

A.M.P.	Adénosine monophosphate
A.D.P.	Adénosine diphosphate
A.T.P.	Adénosine triphosphate
Brij 58	Polyoxyéthylène (20) céthyl éther
Bz	Benzoyl
Chlorure de Dansyl	Chlorure de 1 diméthylaminonaphtalène-5-sulfinique
°C	degré celsius
C.M.	carboxyméthyl
D°	Densité optique
D.E.A.E.	Diéthylaminoéthyl
DNA	Acide désoxyribonucléique
D.F.P.	Di-isopropylfluorophosphate
E.D.T.A.	Ethylène-diamine-tétraacétate de sodium
g	Force de gravité
min	minute
N.E.M.	N-éthyl-maléimide
P.C.M.B.	Para-chloromercuri-benzóate de sodium
P.N.P.P.	Paranitrophénylphosphate
P.N.P.	Paranitrophénol
RNA	Acide ribonucléique
S. 105	Surnageant résultant de la centrifugation à 105.000 g
S. G.100	Pic de peptidase obtenu par filtration sur gel de Sephadex G100
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Z	Carbobenzoxy

Quand la lettre D n'est pas spécifiée, les peptides sont composés d'acides aminés de configuration L.

* * *

ENZYMES CITEES DANS LE TEXTE

Aminopeptidase	Ec. 3. 4. 1.
Carboxypeptidase	Ec. 3. 4. 2.
Dipeptidase	Ec. 3. 4. 3.
Endopeptidase	Ec. 3. 4. 4.
L. Aminoacide-oxydase	Ec. 1. 4. 3. 2.
Amidase	Ec. 3. 5. 1. 4.
Aminopeptidase (M)	Ec. 3. 4. 1. 4.
Aminotripeptidase	Ec. 3. 4. 1. 3.
Carboxypeptidase A	Ec. 3. 4. 2. 1.
Carboxypeptidase B	Ec. 3. 4. 2. 2.
Carboxypeptidase de la levure	Ec. 3. 4. 2. 3.
Carnosinase (Aminoacyl-histidine-hydrolase)	Ec. 3. 4. 3. 3.
Collagenase	Ec. 3. 4. 4. 19.
Cystéinyl-Glycine dipeptidase	(Ec. 3. 4. 3. 5.)
Glycyl-Glycine dipeptidase	Ec. 3. 4. 3. 1.
Glycyl-Leucine dipeptidase	(Ec. 3. 4. 3. 2.)
Iminodipeptidase : Prolinase	Ec. 3. 4. 3. 6.
Imidodipeptidase : Prolidase	Ec. 3. 4. 3. 7.
Lactate deshydrogénase	Ec. 1. 1. 1. 27
Leucine aminopeptidase	Ec. 3. 4. 1. 1.
Lipase	Ec. 3. 1. 1. 3.
Pepsine	Ec. 3. 4. 4. 1.
Peroxydase	Ec. 1. 11. 1. 7.
Phosphatase alcaline	Ec. 3. 1. 3. 1.
Proline Imino-peptidase	Ec. 3. 4. 1. 4.
Trypsine	Ec. 3. 4. 4. 4.

* * *

INTRODUCTION

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des dipeptidases, en comparaison de ceux qui ont été consacrés, au cours de ces dernières années, aux enzymes protéolytiques. L'explication en est sans doute la complexité du milieu cellulaire, la grande instabilité de ces enzymes et la difficulté de les distinguer, lors de leur purification, d'autres peptidases qui agissent sur les mêmes composés.

Dans les cellules animales où les enzymes de ce type sont abondantes, certaines, parmi les plus stables, ont été purifiées; en particulier, quelques dipeptidases très spécifiques ont pu être extraites des reins des animaux supérieurs et ont été isolées. De même, HAYMAN et coll. (92), à partir de la fraction soluble des cellules tumorales de souris, ont extrait, purifié et étudié une métalloenzyme qui hydrolyse de nombreux dipeptides.

Cependant, des recherches dans cette direction sont nécessaires en raison de l'importance supposée de ces dipeptidases dans les cellules animales. Leur étude, limitée jusqu'ici aux cellules animales, mérite d'être étendue aux bactéries dont cette structure enzymatique est pratiquement inconnue.

A ce propos, bien que plusieurs travaux aient clairement démontré l'existence de dipeptidases intracellulaires - notamment dans le cytoplasme d'Escherichia coli (168, 224) - il faut constater qu'aucune dipeptidase de ce type n'a été ni purifiée, ni caractérisée. Seuls, BEHAL et coll. en 1967 (13) et HALEY en 1968 (81) ont, les premiers, partiellement purifié

une dipeptidase de la fraction membranaire de Neisseria catharralis pour le premier, d'Escherichia coli pour le second. HALEY a obtenu ainsi une enzyme particulièrement spécifique, puisqu'il s'agit d'une β -aspartyl-dipeptidase. Toutefois, ces préparations n'ont qu'une activité relativement faible, et sans rapport avec celle décelée dans la fraction cytoplasmique de nombreuses bactéries.

Notre étude a porté sur l'analyse des dipeptidases des Mycobactéries. Nous avons été amené à étudier cette activité enzymatique particulière, en poursuivant les travaux de TACQUET et coll., 1964 (230) qui ont étudié ces propriétés peptidasiques dans un but taxinomique. Sélectionnant quelques activités intéressantes pour cette classification, nous avons constaté, dans la fraction intracellulaire des Mycobactéries (notamment de Mycobacterium phlei, 1967, 178), l'existence d'une activité dipeptidasique relativement élevée. Nous avons alors entrepris l'extraction, l'isolement et la purification des dipeptidases qui seraient à l'origine de cette activité (activité à laquelle semblaient participer plusieurs peptidases, comme l'indiquaient les comportements distinctifs des diverses espèces mycobactériennes).

Enfin, ces travaux nous ont conduit à isoler, purifier et caractériser plusieurs peptidases dont les propriétés hydrolytiques sont analogues : d'une part, plusieurs aminopeptidases intracellulaires, d'autre part et surtout, une dipeptidase à large spécificité, dont l'étude des propriétés chimiques et enzymatiques fait l'objet principal de ce travail.

Avant d'exposer nos travaux personnels, nous analyseront l'état actuel des connaissances nécessaires à cette étude.

Nous envisagerons successivement :

(A) quelques notions préliminaires concernant la caractérisation des enzymes étudiées;

(B) les propriétés enzymatiques et le rôle des peptidases dans la cellule:

- dans une première partie, après une rapide description de l'équipement protéolytique du Mycobacterium phlei, nous exposerons les propriétés essentielles des différentes exopeptidases;

- dans une seconde partie, nous envisagerons les propriétés des métallopeptidases;

- dans une troisième partie, nous étudierons le rôle des peptidases "in vivo", dans la cellule bactérienne.

CHAPITRE I

NOTIONS PRELIMINAIRES ET ANALYSE DES TRAVAUX ANTERIEURS

A - NOTIONS PRELIMINAIRES

Dans les publications, une certaine confusion apparaît quant à la nomenclature des enzymes étudiées. De plus, beaucoup de travaux exposant les propriétés des peptidases bactériennes présentent des résultats incertains (soit en raison du peu de pureté des extraits étudiés; soit en raison du choix inadéquat de substrats d'identification, et par le fait que plusieurs enzymes de la même famille peuvent coexister dans la cellule bactérienne). Aussi devons-nous par la suite nous référer aux définitions données par les commissions internationales d'enzymologie, et comparer nos résultats avec les propriétés des enzymes les mieux connues.

Il nous faut donc définir les enzymes dont il sera question, rappeler leurs critères d'identification, préciser les propriétés des enzymes hautement purifiées.

Les termes d'endopeptidase ou de peptidylpeptide hydrolase et d'exopeptidase, désignent respectivement les enzymes qui rompent les liaisons peptidasiques à l'intérieur des chaînes peptidiques pour les premières, et aux extrémités du substrat pour les secondes.

Parmi les exopeptidases, les carboxypeptidases ou peptidylamino-acide hydrolases (Ec. 3. 4. 2.) exigent un groupement α -carboxylique libre adjacent à la liaison peptidique C-terminale, et les aminopeptidases ou α -aminoacyl peptide hydrolases (Ec. 3. 4. 1.) exigent un groupe α -aminé libre qui se situe en position N-terminale.

Les termes de dipeptidase ou dipeptide hydrolase (Ec. 3. 4. 3.) désignent les enzymes qui exigent à la fois, un groupe α -aminé libre et un groupe α -carboxylique libre.

Le terme dipeptidase pourrait laisser sous entendre que seules les enzymes de ce type dégradent les dipeptides ; or, il n'en est rien. Ainsi, la plupart des aminopeptidases peuvent hydrolyser les dipeptides aussi bien que les tripeptides ou les oligopeptides.

Du point de vue expérimental, pour définir l'activité dipeptidase, il faut mettre en évidence l'exigence de l'enzyme par rapport aux groupes polaires libres avec des dipeptides synthétiques convenablement substitués. Un exemple du manque d'information quant à la spécificité d'action d'une enzyme nous est donné par les travaux de CAPOBIANCO et coll., 1967 (36). Ceux-ci ont hautement purifié (6.000 fois) une enzyme, uniquement sur la base de son action envers trois dipeptides (le Gly-Leu, le Leu-Gly, et le Gly-Gly). Or, ces dipeptides peuvent être scindés aussi bien par une aminopeptidase que par une dipeptidase.

Ainsi les difficultés rencontrées au cours de la purification des dipeptidases sont dûes, en partie, à la multiplicité du mode d'action des enzymes de la même famille. Il est souvent nécessaire d'analyser la dégradation de plusieurs substrats et, conjointement, d'établir quel est le rapport entre les divers types d'activités.

Il existe cependant des dipeptidases dont la spécificité d'action est limitée à un petit nombre de substrats. Pourtant, il est toujours nécessaire d'analyser avec soin le contenu des préparations.

Ainsi, l'iminodipeptidase ou L.prolylaminoacide hydrolase (Ec. 3. 4. 3. 6. — 8) dégrade spécifiquement les prolyldipeptides.

Or, quand une préparation cellulaire hydrolyse un dipeptide du type prolyl-X, son action peut être attribuée à une iminodipeptidase, mais non à elle seule. Ainsi BJARE et coll., 1970 (20) ont montré que l'hydrolyse des prolyldipeptides par la fraction intracellulaire soluble d'Arthrobacter, est le fait d'une prolyl-iminopeptidase (Ec. 3. 4.1. 4.) et également d'une aminopeptidase (Ec. 3. 4. 1.) dont la spécificité d'action est beaucoup plus large.

Ainsi la complexité du milieu cellulaire ajoutée à la multiplicité d'action des peptidases, rend difficile la purification de ces dernières, l'étude aussi de leurs propriétés enzymatiques, mais plus encore l'étude de leurs propriétés "in vivo".

B - PROPRIETES ENZYMATIQUES DES EXOPEPTIDASES, ROLE DES PEPTIDASES DANS LA CELLULE

Première partie :

I - EQUIPEMENT PROTEOLYTIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI

De nombreuses protéases sont produites, par diverses espèces bactériennes, dans le milieu de culture de ces bactéries. Il en est ainsi des subtillisines (132) et d'autres protéases alcalines des Bacillaceae (115), et de même pour les protéinases produites par les Streptocoques (126), les collagénases produites par diverses espèces (205), ainsi que pour les Clostripaïnes (148) et pour de nombreuses autres protéases neutres, acides ou alcalines produites par les bactéries, en particulier par certains Streptomycètes (MATSUEARA et FEDER, 1971, 149 , 141). En revanche, il faut rappeler que les Mycobactéries ont des propriétés endopeptidasiques relativement limitées.

En règle générale, la plupart des auteurs observent que les Mycobactéries ne dégradent ni l'albumine de blanc d'oeuf dénaturée par la chaleur, ni la caséine, ni la gélatine. Cependant, deux collagénases ont été décelées par TAKAHASHI en 1967 (231) , dans une culture de quatre semaines d'une souche de Mycobacterium tuberculosis. L'extrait cellulaire brut de cette bactérie hydrolyse également la caséine. Ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres travaux.

RYCHTER et HUNDERFUND en 1967 (195) ont mis en évidence une activité de type endopeptidasique qui dégrade, à pH neutre, un substrat synthétique (classique pour la trypsine) le Bz-Arginyl-p.nitroanilide. Cette endopeptidase est exocellulaire : elle est produite dans le milieu de culture de Mycobacterium phlei après quinze jours de culture en agitation à 37°C sur milieu de DUBOS liquide, donc à la fin de la phase

stationnaire de croissance pour les bactéries de cette espèce. Dans nos conditions expérimentales, aucune préparation de Mycobacterium phlei - cellules, extraits cellulaires ou milieu de culture - n'a montré une activité analogue, envers la Bz-Arginyl-paranitroanilide, ou divers substrats des endopeptidases.

Par contre, la présence de dipeptidases intracellulaires est connue depuis longtemps pour les Mycobactéries : ROULET et ZELLER décrivaient une activité de ce type en 1945 (193) et précisaient l'activité des diverses espèces de Mycobactéries, dont Mycobacterium phlei, 1948 (194).

BLOCH et coll., 1946 (22) observaient déjà, dans les broyats cellulaires de Mycobacterium tuberculosis, un pouvoir hydrolytique beaucoup plus important pour les dipeptides que pour les tripeptides. Enfin, HALPERN et coll. en 1957 (87) mettaient en évidence dans les broyats cellulaires de plusieurs espèces de Mycobactéries - et en particulier de Mycobacterium phlei - une dipeptidase capable de dégrader la Gly-Asn.

Une activité "Leucine aminopeptidasique" a été décrite par BEL en 1968 (18) pour de nombreuses Mycobactéries scotochromogènes ; mais cet auteur utilisait un seul substrat : la leucine- β -naphtylamide (nous verrons par la suite que ce composé peut être hydrolysé par plusieurs enzymes différentes de la leucine aminopeptidase "Ec. 3. 4. 1. 1.").

La même remarque s'applique aux travaux de MUFTIC, 1965-1967 (150, 151, 152). Celui-ci a décrit des activités peptidasiques importantes et diverses, pour plusieurs espèces de Mycobactéries, mais en utilisant surtout des substrats chromogènes synthétiques, qui peuvent être hydrolysés à la fois par des aminopeptidases et les naphtylamidases (ou arylamidases).

II - PROPRIETES DES EXOPEPTIDASES

Rappelons les propriétés des exopeptidases animales ou bactériennes les mieux étudiées et décrivons brièvement les exigences des spécificités de ces enzymes.

1) Les carboxypeptidases

Bien que les carboxypeptidases soient largement répandues dans la nature, ce sont surtout les carboxypeptidases A et B, isolées du pancréas des mammifères, qui ont été purifiées et étudiées en détail (158, 90, 68); sans doute parce qu'il est possible de les extraire en grande quantité (de l'ordre du gramme) du pancréas de boeuf en particulier.

En 1966, FELIX et coll. (63) ont purifié une carboxypeptidase de la levure de brasserie. Mais à notre connaissance, aucun travail de purification et d'étude approfondie n'a été réalisé pour les carboxypeptidases des bactéries, en dehors des travaux de GOLDMAN et LEVY, 1967 (76) concernant une carboxypeptidase ayant une spécificité très particulière : la carboxypeptidase G. Cependant, certains chercheurs ont, au cours de la purification d'autres protéinases d'origine bactérienne, décelé, et même ont caractérisé de façon rigoureuse, des enzymes ayant une spécificité carboxypeptidasique (travaux de MORIHARA, 1967, 149).

Les carboxypeptidases hydrolysent les acides α -aminés de configuration L, ayant une fonction carboxylique libre. Pour les carboxypeptidases A et B d'origine animale, si l'acide aminé C-terminal

est la proline ou l'hydroxyproline, l'activité est nulle; et, si l'acide aminé qui le précède est l'acide glutamique ou la proline, la réaction est pratiquement nulle.

a) La carboxypeptidase A (Ec. 3. 4. 2. 1. — 8)

Elle agit de façon préférentielle sur les dipeptides substitués qui contiennent un acide α -aminé aromatique C-terminal - Z.Gly-Phe ; Z.Gly-Tyr ; Z.Gly-Trp -; elle est inactive à l'égard des Z.Gly-Arg ; Z.Gly-Lys et Z.Gly-Pro. Le pH optimal est 7,5.

b) La carboxypeptidase B (Ec. 3. 4. 2. 2. — 8)

Au contraire de la précédente, elle hydrolyse les peptides dont le résidu C-terminal est la lysine, l'arginine ou l'ornithine. Le pH optimal est 7,8.

Les carboxypeptidases A et B ont un poids moléculaire de 34.000 (90, 68). Elles contiennent un atome-gramme de zinc par molécule; et le zinc a un rôle catalytique au centre actif de l'enzyme (90, 68).

c) Les carboxypeptidases hydrolysant les dérivés contenant la Proline

DEHM et NORDWIG (54) rapportent qu'une carboxypeptidase lysosomale, ayant un pH d'action acide, avait été décelée dans le rein de porc par FRUTON et BERGMANN en 1939. Cette carboxypeptidase libère les

résidus Proline C-terminaux ; elle n'a pas été purifiée. Une carboxypeptidase P a été purifiée et étudiée par DEHM et NORDWIG en 1970 (55), c'est une carboxypeptidase qui hydrolyse les résidus acides aminés C-terminaux adjacents au résidu Prolyl (R-Pro[↓]Y) ; elle est fortement activée par le Mn²⁺, son pH optimum est 7,7.

d) La carboxypeptidase de la levure (Ec. 3. 4. 2. 3.— 8)

Elle a surtout été étudiée par FELIX et coll., 1966 (63) et HAYASHI et coll., 1970 (91). Les observations de ces deux équipes de chercheurs montrent que la spécificité de cette enzyme est beaucoup plus large que celle des carboxypeptidases animales.

Elle libère, à partir de l'extrémité C-terminale, la plupart des acides aminés y compris: la proline, le glycoacide et les acides aminés basiques et dicarboxyliques, qui sont résistants à l'action de l'une ou de l'autre des carboxypeptidases A ou B du pancréas. Le pH optimum est 6,0 et c'est une métalloenzyme réactivée par le Zn²⁺ ou par le Co²⁺.

La carboxypeptidase de Streptomyces fradiae, décelée dans le milieu de culture de la bactérie, et caractérisée par MORIHARA en 1967 (149), a sans doute des propriétés analogues. Elle hydrolyse en priorité le Z.Gly-Leu ; elle est inhibée par l'O.phénanthroline et fortement réactivée par le Co²⁺.

La carboxypeptidase G a été purifiée par GOLDMAN et coll. (76), à partir de l'extrait cellulaire obtenu par rupture à la "french press", des bactéries d'une souche de Pseudomonas.

Cette enzyme hydrolyse spécifiquement le résidu acide glutamique C-terminal de nombreux peptides. C'est également une métallo-enzyme qui est activée obligatoirement par le zinc.

Les Myobactéries présentent une activité carboxypeptidasique comparable à celle de la carboxypeptidase A. Le Z.Gly-Phe, Z.Gly-Trp, le Z.Gly-Tyr sont hydrolysés (230, 178, 179). Cette activité est inhibée par les chélateurs de métaux (E.D.T.A., O.phénanthroline) ; elle est optimale à pH neutre. Ces bactéries ne présentent aucune activité comparable à celles de la carboxypeptidase B, de la carboxypeptidase G, ou de la carboxypeptidase de la levure de brasserie. Les peptides synthétiques suivants : Z.Gly-Arg, Z.Gly-Lys, Z.Gly-Gly, Z.Gly-Pro, Z.Glu-Phe, ne sont jamais hydrolysés (230, 179). Nous verrons que la fraction présentant une activité carboxypeptidasique est écartée aux premiers stades de la purification de la dipeptidase. Le tableau I résume les propriétés des carboxypeptidases.

2) Les aminopeptidases

Nous rappellerons brièvement les propriétés essentielles des aminopeptidases qui ont été purifiées.

a) La leucine aminopeptidase (Ec. 3. 4. 1. 1.)

Cette enzyme catalyse plus rapidement l'hydrolyse des dipeptides ayant la leucine en position N-terminale. SMITH et BERGMAN en 1944 (56)

Noms : <u>systematique</u> , trivial	Origine	Liaison hydrolysé - Substrat spécifique	Métal activateur	pH	Remarques	Réf.
<u>Carboxypeptidase A</u> Ec. 3. 4. 2. 1.	Pancréas bovin	--B ↓ Y Z.Gly-Phe Z.Gly-Tyr Y : A.A. aromatiques	Zn ²⁺ (Mn ²⁺ Fe ²⁺) (Co ²⁺ etc.)	7,5	métalloenzyme 1 Zn ²⁺ PM : 34.300	158 90
<u>Carboxypeptidase B</u> Ec. 3. 4. 2. 2.	Pancréas porcin	--B ↓ Y Bz.Gly-Lys Bz.Gly-Arg	Zn ²⁺ (Co ²⁺ Cd ²⁺)	8,0	PM : 34.300 Métalloenzyme 1 Zn ²⁺	68
	Pancréas bovin	Y : Lys, Arg, Orn			PM : 34.000	258
<u>Yeast-Carboxypeptidase</u> Ec. 3. 4. 2. 3.	Saccharomyces cerevisiae	--B ↓ Y Z.Gly-Leu Z.Gly-Phe Y : A.A. neutre, basique, acide	Zn ²⁺ Co ²⁺	6,0		63 91
Carboxypeptidase	Streptomyces fradiae	--B ↓ Y Z.Gly-Leu	Co ²⁺			149
Carboxypeptidase G	Pseudomonas	--B ↓ Glu Z.Gly-Glu	Zn ²⁺	6,0		76
Carboxypeptidase P	Rein de porc	--Pro ↓ Y Z.Pro-Ala	Mn ²⁺	7,7	PM : 240.000	55
Carboxypeptidase lysofemale	Rein de porc	--B ↓ Pro Z.Leu-Pro		acide		55

TABLEAU N° I

Carboxypeptidase ou Peptidylaminoacide hydrolase Ec. 3. 4. 2.

Y : Acide aminé ayant la fonction COOH libre

B : Acide aminé adjacent au résidu C-terminal



ont montré que la leucinamide était également hydrolysée, et, bien que cette enzyme puisse hydrolyser de nombreux substrats ne contenant pas de résidu Leucyl (SMITH et HILL, 1960, 218), le nom de leucine aminopeptidase a cependant été retenu pour indiquer que les composés de la leucine sont parmi les plus rapidement hydrolysés par cette enzyme. La leucine aminopeptidase du rein de porc a été purifiée 1.700 fois par SPACKMAN, SMITH et coll., 1955 (221), et d'autres préparations homogènes ont été obtenues, qui ont fait l'objet d'études approfondies : HIMMELHOCH et PETERSON, 1968 (96) DEFTOS et coll., 1969 (53).

D'autres enzymes ayant les caractères de spécificité de la leucine aminopeptidase de SPACKMAN et SMITH sont présentes dans de nombreux tissus animaux et végétaux, et chez les microorganismes. Quelques-unes de ces enzymes ont été hautement purifiées par DELANGE et SMITH en 1971 (56). Nous nous bornerons à résumer les propriétés de la leucine aminopeptidase du rein de porc qui nous sert de référence.

L'enzyme préparée par SPACKMAN et SMITH, 1955 (221), a un poids moléculaire estimé à 300.000 ; la même valeur a été mesurée par HIMMELHOCH en 1968 (96), par filtration sur gel de Sephadex G.200; et MELIUS et coll., 1970 (143) ont estimé le poids moléculaire de l'enzyme native à 255.000 ± 5.000 , et celui de la protéine dissociée (par le β -mercaptoéthanol à 0,5 p. 100 et la guanidine 6 M) à 63.500. MELIUS en 1970 (143) démontre que cette enzyme est composée d'un seul type de sous-unité ; ce qui est en accord avec les travaux de SCHWABE en 1969 (201) sur les leucine aminopeptidases du tissu conjonctif.

Pendant longtemps, on a cru que la leucine aminopeptidase était une métallopeptidase qui contenait du Magnésium ou du Manganèse dans le site actif (SMITH et HILL, 218). En effet, elle est fortement activée par ces ions métalliques (Mn^{2+} , Mg^{2+}). HIMMELHOCH et coll., 1969 (95) ont préparé une enzyme en évitant toute contamination par la zinc ou les autres ions métalliques ; ils ont démontré que l'enzyme native contient non du Manganèse ou du Magnésium, mais du zinc : 1 atome gramme de zinc par sous-unité enzymatique (4 à 5 atomes grammes pour un poids moléculaire égal à 300.000). Cependant, le zinc peut être déplacé facilement par d'autres ions métalliques; et la leucine aminopeptidase contenant du Manganèse ou du Magnésium est beaucoup plus active que la zinc-leucine aminopeptidase : HIMMELHOCH (95), BRYCE et RABIN, 1964 (28).

Toutes les études ont montré que les ions métalliques stabilisent la leucine aminopeptidase, et que l'ion métallique le plus efficace à ce point de vue est le Magnésium.

La structure du site actif de l'enzyme est encore très mal connue : les informations concernant les groupes impliqués dans le processus catalytique, et les sites d'attachement du substrat, sont encore très succinctes. Le rôle de certains groupes au site actif de l'enzyme, du résidu cystéine en particulier, est encore discuté. Cependant, la plupart des travaux concernant les leucine aminopeptidases d'origines diverses, permettent de dire qu'elles ne sont pas des thiol-enzyme.

Il est maintenant établi qu'un résidu tryptophane joue un rôle important dans l'attachement du substrat à l'enzyme : DELANGE et SMITH, 1971 (56). La leucine aminopeptidase du rein de porc est stable entre les pH 6 à 10 ; l'activité est maximale à pH 9,0 - 9,5.

Il faut remarquer que les enzymes isolées d'autres tissus - la leucine aminopeptidase du muscle de porc, par exemple - présentent une spécificité légèrement différente de celle de l'enzyme de SPACKMAN et SMITH (221), ainsi les taux relatifs de dégradation des divers substrats sont différents. Pour l'enzyme du muscle de porc, la leucinamide est hydrolysée moins vite que le Leu-Gly et le Leu-Gly-Gly : JOSEPH et SANDERS (105).

b) Les leucine aminopeptidases d'origine bactérienne

Plusieurs auteurs ont décrit des exopeptidases bactériennes ayant les propriétés caractéristiques de la leucine aminopeptidase (Ec. 3. 4. 1. 1.)

Deux préparations ont été extraites et hautement purifiées : par VOGT, 1970 (248) de la fraction intracellulaire soluble d'Escherichia coli K12 (cette enzyme est désignée habituellement sous le nom d'aminopeptidase I d'Escherichia coli), et par MATHESON et coll., 1971 (137, 57) de la fraction ribosomale d'Escherichia coli B. Ces deux peptidases présentent de nombreux caractères communs avec ceux de la leucine aminopeptidase du rein de porc. Ainsi leur poids moléculaire est élevé : 323.000 (248) et 350.000 à 400.000 (57). dans les deux cas, l'enzyme native est formée de sous-unités dont le poids moléculaire est voisin de 60.000 (248, 57). Les deux enzymes d'origine bactérienne sont inhibées par les chélateurs des métaux, et activées par le Mg^{2+} et le Mn^{2+} ; leur stabilité est augmentée en présence de Mg^{2+} , et leur pH optimum est compris entre 8,0 et 10.

Quelques aspects de la spécificité sont communs avec ceux de la leucine aminopeptidase : les composés de la leucine sont parmi les plus rapidement hydrolysés. Mais une comparaison précise entre les caractères de spécificité pour divers substrats est difficile ; en effet, VOGT (248), ainsi que MATHESON (57, 136), ont étudié surtout la dégradation des composés ayant la L.Méthionine en position N-terminale; et ces peptides sont très rarement utilisés pour l'étude du mode d'action des peptidases. Lorsque nous envisagerons le rôle biologique des peptidases, nous préciserons quelles sont ces propriétés particulières des enzymes bactériennes. Mais indiquons dès l'abord que VOGT (248) a étudié conjointement l'activité hydrolytique de la leucine aminopeptidase du rein de porc et celle de l'aminopeptidase I d'Escherichia coli B. Les propriétés sont semblables (Tableau XVII) p 120.

Les investigations de plusieurs chercheurs ont montré que les filtrats de culture de plusieurs champignons microscopiques contiennent des leucine aminopeptidases (56) : isolées par JOLLES et coll., 1969 (103) et par LHEMAN et coll., 1969 (118) pour les Aspergillus orizae, et par d'autres auteurs, particulièrement OUCHI et coll., 1962 (162), MORIHARA et coll., 1967 (149), pour des cultures de diverses espèces de Streptomyces. Toutes ces enzymes ont la particularité d'être thermostables à 76°C. Une autre leucine aminopeptidase thermostable a été purifiée et étudiée par PRESCOTT et WILKES. (182, 183) ; elle est extraite du milieu de culture d'Aeromonas. Comme l'enzyme du rein de porc, cette enzyme contient du zinc.

D'autres enzymes de ce type ont été décelées dans la fraction intracellulaire soluble de nombreuses bactéries. Citons les travaux de

BEHAL et FOLDS, 1967 (13) pour Neisseria catarrhalis et Sarcina lutea en 1971 (10), de FRITSCH et HANSON en 1969 (71) pour diverses espèces de Bacillus (84).

La plupart des enzymes d'origine bactérienne présentent, au point de vue spécificité, des caractères voisins de ceux de la leucine aminopeptidase du muscle de porc purifiée par JOSEPH et SANDERS (105) : ainsi, les dipeptides et tripeptides ayant la leucine en position N-terminale, sont hydrolysés plus vite que la leucinamide.

Les informations concernant ces enzymes sont généralement restreintes, car la plupart ont été partiellement purifiées ou caractérisées. En général, leur poids moléculaire est élevé, supérieur à 200.000 ; elles sont inhibées par les chélateurs des métaux et réactivées par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} . La présence de telles enzymes dans d'autres espèces bactériennes (254) n'a pas été confirmée par des études détaillées. Enfin, nous ne mentionnerons pas dans ce travail les nombreuses études décrivant, sur le seul critère de la dégradation de la leucine β -naphtylamide, une activité de type leucine aminopeptidase ; en effet, il existe dans la cellule bactérienne des naphtylamidases qui hydrolysent de tels substrats, et dont-il est bien établi maintenant qu'elles sont différentes de la leucine aminopeptidase (TJEDER et coll. 1967, 234 ; BEHAL et CARTER, 1971, 10).

c) L'aminopeptidase (Ec. 3.4.1.2.) ou aminoacyl oligopeptide hydrolase

Cette enzyme est aussi appelée aminopeptidase M. par DELANGE et SMITH (56).

L'aminopeptidase du rein de porc a été étudiée de façon exhaustive surtout par PFLEIDERER et coll. (173) et par WASCHMUTH et coll. (250, 251). Elle hydrolyse les résidus N-terminaux des peptides. Seuls les composés des acides α -aminés de configuration L sont hydrolysés. L'alanine en position N-terminale est libérée de façon préférentielle. Les peptides ayant un groupe α -iminé libre (prolyl, sarcosyl) sont hydrolysés mais lentement ; par contre, l'aminopeptidase n'agit sur aucun des dérivés dans lesquels le résidu proline est en position pénultième à la position N-terminale. De façon générale, les écarts entre les taux d'hydrolyse des divers substrats sont faibles, alors que, pour la leucine aminopeptidase, cet écart peut être un multiple de 1000 (DELANGE et SMITH, 1971, 56).

Cette enzyme a un poids moléculaire élevé 280.000 ; elle est formée de 10 sous-unités qui comprennent deux types de chaînes peptidiques réunies par des ponts disulfure (le poids moléculaire des sous-unités est 28.000 et 30.000 ; 173). L'enzyme est un complexe métal-enzyme, mais les auteurs obtiennent des résultats variables, même contradictoires, quant à l'activation produite par addition des ions métalliques. En général, le cobalt à faible concentration active la préparation (PFLEIDERER, 173). L'effet est plus constant après traitement par les agents chélateurs ; après inhibition par l'O.phénanthroline (0,1 mM), il y a réactivation par le cobalt, mais non par le cadmium, le zinc ou le magnésium.

Il n'y a pas d'inhibition de cette enzyme par l'iodoacétamide ou le bromoacétamide. Par usage de l'iode radioactif $^{131}\text{I}_2$, WASCHMUTH (249) montre que la monoiodination de 10 résidus tyrosine par molécule d'enzyme, entraîne l'inactivation totale (56). Les résidus histidine

joueraient également un rôle important dans le site actif : l'action du Diazonium -1-H-tétrazole (qui réagit rapidement avec la chaîne imidazole des résidus histidine) produit une décroissance de l'activité peptidasique; et l'inhibition totale correspond à 4 résidus histidine (173). Les connaissances concernant le site actif de l'enzyme sont limitées à ces informations.

d) Les aminopeptidases bactériennes

Bien que des aminopeptidases intracellulaires soient très largement répandues parmi les espèces bactériennes, à notre connaissance, seules quelques aminopeptidases thermostables ont été purifiées et étudiées de façon approfondie.

α) L'aminopeptidase AP1 de Bacillus stearothermophilus a surtout été étudiée par RONCARI et ZUBER, 1967-1970 (189, 190, 268).

Diverses variétés de Bacillus stearothermophilus contiennent, selon leur température optimale de croissance, trois types d'aminopeptidases. Ces enzymes ont des caractères de spécificité et de thermostabilité légèrement différents. Mais comme d'autres peptidases de ce type (décrites par MATHESON et coll., 1967, 135, chez Bacillus stearothermophilus, et par MINAMIURA, 1969, 146 chez Bacillus subtilis) les aminopeptidases isolées par RONCARI et ZUBER (189, 268) ont des propriétés catalytiques peu spécifiques : elles libèrent l'acide α-aminé N-terminal de configuration L de divers peptides. Les dipeptides contenant la leucine, la valine et

acides aminés aromatiques, sont hydrolysés plus rapidement. La proline est libérée lentement quand elle est en position N-terminale ; mais si le deuxième résidu d'acide aminé est la proline, le résidu N-terminal n'est pas hydrolysé. Seule l'aminopeptidase AP₁ de Bacillus stearothermophilus a été hautement purifiée (189, 190). Cette enzyme reste attachée à la membrane des cellules bactériennes lors de la lyse des bacilles par le lysozyme (189) ; seule la désintégration sonique libère l'enzyme.

D'un poids moléculaire élevé sous sa forme native (395.000 à 400.000) l'aminopeptidase AP₁ est dissociée en sous-unités identiques (poids moléculaire 36.500/40.000) en présence d'urée 8M et d'E.D.T.A. 0,01 M à pH 5,6. Cette enzyme est inactivée irréversiblement par le dodécyl sulfate de soude à 0,3 p. 100 (p/v), alors qu'elle est insensible à l'inactivation par l'urée.

C'est un complexe enzyme-métal. Les ions cobalt sont fortement liés à l'enzyme à pH alcalin ; à pH 6,0, il y a formation d'une apoenzyme par simple dialyse avec l'E.D.T.A. 0,01 M. Les ions cobalt et manganèse activent l'enzyme non traitée par les agents chélateurs ; et le cobalt réactive fortement l'apoenzyme.

En présence du cobalt, l'enzyme est thermostable 15 heures à 80°C. L'apoenzyme est très instable. Le pH optimal est 9,2 à 9,4 (pour le Gly-Leu-Tyr). La température optimale d'hydrolyse du Leu-Gly est 90°C (10 min). Le Km pour le Leu-Gly et la Leucine-~~par~~paranitroanilide est respectivement de 95 mM et 8 mM à 65°C. Cependant, les dipeptides et tripeptides sont hydrolysés beaucoup plus rapidement que la leucinamide et la leucine-p-nitroanilide (hydrolyse du Gly-Leu-Tyr 900 unités par min, Leu-Gly 400 unités par min, leucine-~~par~~paranitroanilide 6,6 unités par min, 190).

β) Amino-peptidases partiellement purifiées

Il est intéressant de remarquer que certaines amino-peptidases isolées de Bacillus subtilis par MINAMIURA en 1969 (146), qui n'ont malheureusement pas été hautement purifiées, ont la propriété de libérer les résidus N-terminaux de peptides ayant un acide aminé de configuration D en position pénultième, et de plus, libèrent également certains acides aminés N-terminaux de configuration D (D-Leu, D-Ala).

Au cours de la purification d'autres peptidases, de nombreuses amino-peptidases ont été décelées chez les bactéries; mais n'ont pas été purifiées ou ne l'ont été que partiellement (145).

- Certaines de ces enzymes sont activées par le cobalt et le manganèse et sont thermostables à des températures moins élevées cependant que pour l'aminopeptidase PI (40°C à 60°C). Il en est ainsi pour l'aminopeptidase intracellulaire d'Escherichia coli, BOLTON et coll., 1959 (24) TSAI et MATHESON, 1965 (238) ; et l'aminopeptidase intracellulaire de Bacillus stearothermophilus purifiée par MATHESON et coll., 1967 (135).

- D'autres sont activées par le manganèse et le magnésium, elles ne sont pas thermostables : ce sont en particulier les amino-peptidases de Serratia indica, RYDEN et coll., 1968 (197) ; de Klebsiella aerogenes, BAKER et coll., 1969 (6) ; d'Arthrobacter, BJARE et coll., 1970 (20).

Le tableau II résume les principales propriétés des leucine amino-peptidases et amino-peptidases.

Noms : systématique, trivial	Origine	Liaison hydrolysée - Substrat spécifique	Métal activateur	pH	Poids moléculaire -Cofacteur stéréo- chimique	Réf.
<u>Leucine-aminopeptidase</u> Ec. 3. 4. 1. 1.	Rein de porc	X ↓ A... Leu-NH ₂ Leu-Gly Leu-Gly-Gly	Mn ²⁺ Mg ²⁺	9-9,5	300.000 4-5 Zn ²⁺ su. = 63.500 - 1Zn ²⁺ 326.000 - 8-12 Zn ²⁺ su. = 32.000	56, 8
	Cristallin de boeuf	X : L Acide aminé neutre				56, 8
Peptidase ribosomale de MATHESON	Escherichia coli B	X ↓ A... Leu-Gly Met-Gly Met-Ala-Ser	Mn ²⁺ Mg ²⁺	7,5-9,2	350-400.000 su. = 60.000	136 140 57
Aminopeptidase I (thermostable 76°C)	Escherichia coli K12	Leu ↓ A... Met ↓ A... Met-Ala-Ser	Mn ²⁺ Mg ²⁺	8,0-10,5	323.000 su. = 52.000	248
Aeromonas-Aminopeptidase (thermostable 70°C)	Aeromonas	X ↓ A... Leu-p.nitroanilide Leu-Gly Leu-Gly-Gly	Zn ²⁺ Co ²⁺ Mn ²⁺	8,5	Zn ²⁺ (1-2) 29.500	183
Aminopeptidase	Aspergillus orizae	X ↓ A... Leu-Gly Leu-NH ₂ Leu-Gly-Gly	Co ²⁺	8,0	60.000	56, 103
Aminopeptidase M Aminoacyl-oligopeptide hydro- lase. Ec. 3. 4. 1. 2.	Rein de porc	X ↓ A... Ala-p.nitroanilide Ala-Gly Leu-Gly	Co ²⁺	7,2	280.000 su. (10) 28-30.000	173
Aminopeptidase AP 1 (thermostable 80°C)	Bacillus stearo.	X ↓ A... Leu-Y Val-Y Phe-Y	Co ²⁺ Mn ²⁺	8,0	395-400.000 Co ²⁺ su. = 36.500	190 268
<u>Amino-tripeptidase</u> Ec. 3.4.1.3. Aminoacyl-dipeptide-hydrolase	Tissus animaux	X ↓ B-Y Ala-Gly-Gly Gly-Gly-Gly		8,0		56 8

TABLEAU N° II

Aminopeptidases ou Alpha-aminoacyl-hydrolases Ec. 3. 4. 1.

X : L acide aminé ayant la fonction NH₂ libre

Y : Acide aminé ayant la fonction COOH libre

A : Acide aminé adjacent au résidu N-terminal

B : Acide aminé adjacent au résidu C-terminal



e) La proline iminopeptidase (Ec. 3. 4. 1. 4. — 8)

Cette enzyme, qui libère uniquement les résidus L.prolyl N-terminaux des substrats peptidiques, a été isolée de la fraction intracellulaire soluble d'un mutant d'Escherichia coli K12 par SARID et coll., 1959-1962 (200, 199). Elle a été décelée chez d'autres espèces bactériennes, en particulier pour Bacillus brevis, SARID et coll. (200), et pour Arthrobacter, BJARE et coll., 1970 (20) et RYDEN et coll., 1971 (196).

Le manganèse est indispensable à l'activité de la proline iminopeptidase : le magnésium ne peut pas lui être substitué. Les métaux lourds sont inhibiteurs, en particulier le Ca^{2+} , CO^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} . Le paramercuribenzoate et l'iodoacétamide sont également inhibiteurs. Le pH optimum est 7,8 à 9,5 (199).

Les résidus N-terminaux de l'hydroxyproline ne sont pas hydrolysés par cette enzyme.

f) L'aminopeptidase P (DELANGE et SMITH, 1971, 56)

YARON et MLYNAR en 1968 (262) ont hautement purifié une enzyme de la fraction intracellulaire d'Escherichia coli B qui libère les acides α -aminés ou iminés N-terminaux, de configuration L, adjacents aux résidus Proline (X-Pro ou X-Pro-R). Le radical hydroxyproline ne peut pas être substitué au résidu proline.

L'aminopeptidase P a un poids moléculaire de 230.000, c'est une enzyme qui est activée par le Manganèse. Elle est inhibée par les métaux

lourds et par l'E.D.T.A. Le pH optimal est 8,0. Cette enzyme ressemble étroitement à la X-Prolyl-aminopeptidase du rein de porc purifiée par DEHM et NORDWIG, 1970 (54), avec cette différence que cette dernière enzyme hydrolyse lentement les résidus terminaux adjacents à l'hydroxyproline.

g) L'aminotripeptidase ou aminoacyl-dipeptide hydrolase (3.4.1.3. - 8)

Des préparations pures de cette enzyme ont été obtenues à partir de nombreux tissus animaux (DELANGE et SMITH, 1971, 56). Elle hydrolyse spécifiquement l'acide L.α-aminé, N-terminal, d'un tripeptide ayant les fonctions aminée libre et carboxylique terminale libre. Les substrats les plus caractéristiques sont le triglycocolle, et l'alanyl-glycyl-glycocolle. Les aminotripeptidases d'origine animale sont inhibées par le Cd²⁺ et insensibles à l'action de l'E.D.T.A. et de la cystéine.

Aucune aminotripeptidase n'a été isolée ni purifiée à partir des préparations bactériennes. Quelques chercheurs signalent cependant des enzymes dont l'activité est analogue ; en particulier SUSSMAN et GILVARG, 1970 (224) décrivent une fraction intracellulaire d'Escherichia coli K12 qui hydrolyse spécifiquement les tripeptides de la lysine.

h) Les β-naphtylamidases

Pour des raisons de commodité, commandées principalement par les techniques histochimiques visant à localiser la leucine aminopeptidase dans les tissus des animaux supérieurs, des substrats synthétiques

chromogènes ont été préparés (156). Un hydrogène de l'amide d'un acide aminé (leucinamide par exemple) est remplacé par un radical β -naphtyl, après libération enzymatique, ce dernier peut être décelé par fluorescence ou couplé avec un colorant azoïque.

En fait, de nombreux arguments ont prouvé que l'hydrolyse de ces composés, de la L.Leucyl- β -naphtylamide en particulier, n'est pas rigoureusement assimilable à celle des amides (leucinamide) ou d'autres composés hydrolysés préférentiellement par les aminopeptidases.

SMITH et HILL (218) ont montré que le substrat chromogène n'était hydrolysé que très lentement par la leucinaminopeptidase vraie, purifiée. Ce fait a été confirmé par PATTERSON et coll., 1963 (163). De ces travaux et de ceux de beaucoup d'autres chercheurs décrivant les propriétés de ces enzymes, il peut être conclu que l'activité, ou les activités dosées par les substrats chromogènes, ne sont pas identifiables à celles de la leucinaminopeptidase ou des aminopeptidases; et, comme l'ont proposé SMITH et RUTENBURG en 1963 (219), il valait mieux leur attribuer le nom d'aminocyl-naphtylamide amidohydrolase, ou plus simplement de β -naphtylamidase. Quelques auteurs ont choisi pour leur part le nom d' arylamidase, BEHAL et coll. (12). Plusieurs groupes de chercheurs ont montré que les cellules animales, végétales et bactériennes contenaient des β -naphtylamidases, et ont tenté de purifier et caractériser ces enzymes. Ce sont surtout les travaux de BEHAL et coll. (14, 15, 10, 9, 16, 17, 11, 12, 13, 125), BRECHER et coll. (26, 226), BESARQUES (19), COX et coll. (44, 45), ELLIS (60), HOPUSU et coll. (97, 246), HOPUSU-HAVU et coll. (98, 99, 100), PATTERSON et coll. (163, 164, 165), TJEDER et coll. (233, 234), enfin ceux de SZEWCZUK et coll. (228, 229). Beaucoup d'études histologiques ont également fait l'objet de publications,

mais nous ne mentionnons que les travaux se rapportant à l'étude de la purification, de la caractérisation et des propriétés catalytiques de ces enzymes.

En dépit du nombre important de ces travaux, il est difficile de dégager les propriétés essentielles communes aux naphtylamidases et de les classer de façon simple, car les différentes études démontrent clairement l'hétérogénéité des enzymes qui hydrolysent les substrats chromogènes suivants : aminoacyl- β -naphtylamides, dipeptidyl- β -naphtylamides, tripeptidyl-naphtylamides.

De nombreuses enzymes peu spécifiques ont été caractérisées. Elles hydrolysent surtout les dérivés comprenant un acide aminé neutre. Elles peuvent être d'origine animale : BEHAL et coll. (15, 9, 16, 17); BRECHER et coll. (26); MARKS et coll. (133). Elles existent également chez les bactéries : BEHAL et coll. (11, 12, 13); HANSON et coll. (85).

D'autres au contraire ont un mode d'action limité :

- aux composés ayant un résidu N-terminal acide (α .L.glutamyl, α .L.aspartyl)

Pour ce qui est des enzymes d'origine animale, elles ont été étudiées sous la dénomination d'aminopeptidase A (DELANGE et SMITH, 56). Elles ont été purifiées et caractérisées par GLENNER en 1962 (74), HOPUSU et coll., 1966 (97), BEHAL et STORY, 1969 (17), YMAN (263, 264).

Une enzyme bactérienne, l' Arylamidase II de Neisseria catarrhalis étudiée par COX et coll. en 1969 (44, 45), semble avoir les mêmes propriétés spécifiques et les mêmes caractères biochimiques (Tableau III) que l'aminopeptidase A.

- aux composés ayant un acide aminé basique de configuration L en position N-terminale (Lysyl, Arginyl)

Plusieurs enzymes d'origine animale ont été étudiées par ELLIS et coll., 1967 (60), HOPSU-HAVU et coll., 1964 (98), HOPSU et coll., 1967 (97), MARKS et coll., 1968 (133). Ces peptidases sont regroupées sous le nom d'Amino-peptidase B (DELANGE et SMITH, 1971, 56).

L' Arylamidase C de Sarcina lutea, étudiée par BEHAL et CARTER, 1971 (10), peut être identifiée à ces enzymes (Tableau III).

- aux composés comprenant le radical Prolyl en position avant N-terminale (Glycyl-proline- β -naphtylamide)

Ce sont les travaux réalisés par HOPSU-HAVU et coll., 1967 (100), 1968 (99) pour des cellules animales. Pour les bactéries, ces enzymes sont peut-être identiques à l'Amino-peptidase P précédemment décrite.

- enfin une enzyme bactérienne aux propriétés très particulières a été étudiée, c'est une Pyroolidonyl-peptidase (DELANGE et SMITH, 1971, 56)

Cette enzyme peut être classée parmi les exopeptidases hydrolysant le résidu "N-terminal" ; mais elle est la seule qui libère les résidus ayant perdu leur groupement α -aminé ou α -iminé libre.

Elle a été purifiée de l'extrait cellulaire de Pseudomonas fluorescens par DOOLITHE en 1968 (58), puis par SZEWCZULK et coll. en 1969 (228) d'une souche de Bacillus subtilis. Elle a été par la suite caractérisée par les mêmes auteurs (227) dans les tissus animaux et végétaux.

L'enzyme de Pseudomonas libère l'acide Pyrolidine carboxylique (ou Pyroglutamique) des substrats divers et de certains fibrinopeptides, alors que l'enzyme de Bacillus subtilis s'attaque uniquement aux substrats synthétiques : (L.pyrolidonyl- β -naphtylamide). Ce sont des enzymes à groupement thiol (DELANGE et SMITH, 56), et l'enzyme de Bacillus subtilis est plus active en présence d'E.D.T.A. et de mercaptoéthanol.

Cette enzyme a été décelée chez les Enterobactéries et chez de nombreux germes de bactéries Gram $^+$ ou Gram $^-$, MULCZYK, 1970 (153) : Bacillus, Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Sarcina, Nesseria et Pseudomonas.

Les composés chromogènes ont été utilisés pour la classification de nombreuses bactéries : BUSSIERE et coll., 1967 (30), BÜGER, 1967 (29), MUFTIC, 1966-1967 (150, 151, 152), WESTLEY et coll., 1967 (254), MULCZYK, 1970 (153). Mais peu d'enzymes ont été purifiées. Les bactéries Gram $^+$ sont en général dépourvues de leucyl- β -naphylamidase (11) (sauf Sarcina lutea qui contient un groupe d'enzymes de ce type, 10), alors que les bactéries Gram $^-$ sont très actives à ce point de vue : BEHAL et FOLDS, 1967 (13), BEHAL et COX, 1968 (11). Pour les enzymes bactériennes, il semble qu'il y ait plusieurs types de naphtylamidases. Pour certaines, le radical "aryl" (naphtyl ou autre) a peu d'influence dans la formation du complexe enzyme-substrat (11) ; pour d'autres au contraire, la nature du résidu "aryl" est primordiale, ainsi les dérivés de l'acide paranitroanilide sont hydrolysés beaucoup plus lentement que les dérivés de la β -naphtylamine. Alors que beaucoup d'enzymes d'origine animale sont actives en présence d'un cation bivalent (9, 16, 17, 30),

la plupart des enzymes bactériennes présentent une absence d'activation par les ions métalliques - notamment par le Mn et le Mg - ce qui les distingue nettement des leucine aminopeptidases (Ec. 3. 4. 1. 1.). COX et BEHAL, 1969 (45) ont observé que pour beaucoup de naphtylamidases bactériennes, le Co^{2+} réactive l'enzyme. Pour la plupart, il n'y a pas activation directe par les ions métalliques, mais réactivation après une dénaturation des enzymes obtenues par une action prolongée des complexants des métaux (234, 10). L'ion métallique ne participerait pas directement à l'action catalytique au site actif, mais jouerait un rôle dans la stéréochimie de l'enzyme.

Pour certaines arylamidases bactériennes, aucun des ions métalliques utilisés ne réactive la préparation (11, 12). Le pH d'action des naphtylamidases est voisin de la neutralité : pH 6,0 à 7,6.

Une propriété intéressante de certaines d'entre elles (13), ainsi que de certaines naphtylamidases d'origine animale (133, 15, 60,9) est l'inhibition compétitive de l'activité enzymatique par la puromycine. Enfin, quelques unes sont des enzymes à groupement thiol : l'arylamidase I de Neisseria catarrhalis par exemple (10). Le tableau III résume les propriétés des naphtylamidases bactériennes qui ont été purifiées.

Lors de nos travaux, la contamination éventuelle des préparations par ces enzymes a été envisagée; nous avons donc utilisé quelques substrats types et mesuré l'activité peptidasique en présence de puromycine 10 mM.

Noms : <u>systématique</u> , trivial	Origine	Liaison hydrolysée - Substrat spécifique	Métal activateur	pH	Poids moléculaire - Cofacteur stéréo- chimique	Réf.
<u>Proline-iminopeptidase</u> L. prolyl-peptide hydrolase Ec. 3. 4. 1. 4.	Escherichia coli K12	Pro-↓A... Poly-Pro Pro-Gly	Mn ²⁺	7,8-9,5		199 200
Aminopeptidase P	Escherichia coli B	X ↓ Pro... Gly-Pro-Hyp Gly-Pro-Ala	Mn ²⁺	8,0	230.000	262
X - Prolyl-aminopeptidase	Rein de porc	X ↓ Pro... Gly-Pro-Hyp	Mn ²⁺	8,0	200.000	54
<u>Leucyl-bétanaphthylamidases</u>	Rein de rat	X ↓ β.Na Ala-β.Na Leu-β.Na	Co ²⁺	7-8		99
Arylamidase I	Neisseria catarrhalis		aucun	7,3	150-160.000	13,12,11
Arylamidase A } ---	Garcinia lutea	X = acides aminés neutres	Co ²⁺	7,6	80.000 82.000	10
Arylamidase B }	Tissus animaux	X ↓ β.Na Glu-β.Na	Co ²⁺			56
Arylamidase II	Neisseria catarrhalis	X = acides Asp-β.Na aminés acides	Co ²⁺	7,5	17.000	45
Aminopeptidase B	Foie de rat	X ↓ β.Na Arg-β.Na	aucun	7,0	95.000	97
Arylamidase C	Sarcina lutea	X = acides Lys-β.Na aminés basiques	Co ²⁺	6,7	90.000	10
Pyrrolidonylpeptidase	Pseudomonas fluor. Bacillus subtilis Tissus animaux	Pyr ↓ β.Na Pyr ↓ A...	aucun			229 228 227

TABIEAU N° III

Aminopeptidases ou Alpha-amino-peptide-hydrolases Ec. 3. 4. 1.

β.Na : β-Naphtylamine
Pyr : acide Pyrrolidone-carboxylique

X : L acide aminé ayant la fonction NH₂ libre
A : acide aminé adjacent au résidu N-terminal

577
578
579

3) Les dipeptidases

Pour l'ensemble des travaux consacrés à l'étude des peptidases, les tentatives de purification des dipeptidases ont été peu nombreuses et les essais souvent limités à une purification partielle. Par ailleurs, la spécificité de ces enzymes n'a pas toujours été clairement démontrée.

a) Dipeptidases à spécificité restreinte

DAVIS et SMITH en 1953 (49) ont isolé du rein de porc deux enzymes, dont la spécificité dipeptidasique a été clairement établie à partir de substrats synthétiques (acyl-dipeptides et dipeptides-amides), ce sont l'iminodipeptidase et l'imidodipeptidase.

α) L'iminodipeptidase ou prolinase (Ec. 3. 4. 3. 6.)

Cette enzyme est très labile ; elle a été purifiée et étudiée surtout par SMITH et coll. (49, 217). Elle est également présente chez les bactéries. SARID et coll., 1959 (199), l'ont mis en évidence dans la fraction cytoplasmique d'Escherichia coli, et ils ont étudié comparativement les propriétés de l'enzyme bactérienne et de celle du rein de porc, 1962 (200). L'iminodipeptidase hydrolyse les dipeptides qui possèdent le groupe imino libre de la proline ou de l'hydroxyproline. Le pH optimal est 8,0 (49, 200) au delà du pH 9,0, l'enzyme est très instable. Elle est activée par le Manganèse (49, 200).

β) L'imidodipeptidase ou Prolidase (Ec. 3. 4. 3. 7.)

La prolidase a été purifiée 1.200 fois (50) par DAVIS et coll. en 1957. Cette enzyme hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques du type $-Co-N<$ pour les dipeptides ayant les groupements L.α-aminé libre et L.α-carboxylique libre. Les dipeptides dans lesquels l'azote de la proline ou de l'hydroxyproline est engagée dans la liaison peptidique sont hydrolysés; mais le noyau pyrrolidine n'est pas essentiel, car la Gly-Sar est également hydrolysée : DAVIS et SMITH (50). La prolidase des tissus animaux exige spécifiquement le Mn^{2+} pour son activité, et l'activation est fonction du temps d'incubation de l'enzyme avec le métal : SMITH, 1948 (213). Cette enzyme est inhibée par les complexants de métaux, les réactifs des groupes thiol, et les métaux suivants : Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Ag, Pb. La présence préalable du Mn^{2+} annule l'effet de l'iodoacétamide et du p.chloromercuribenzoate (SMITH, 1955, 217). Le pH optimum est 8,0.

La propriété dipeptidasique de cette enzyme est maintenant suspectée : DELANGE et SMITH, 1971 (56). En effet, plusieurs auteurs ont démontré, à la suite de HILL et SCHMIDT, 1962 (94), que cette enzyme hautement purifiée libère lentement les résidus N-terminaux des oligopeptides dans lesquels la proline est le second résidu. Cependant, cette activité pourrait être due à la contamination par l'aminopeptidase P. Inversement, certains auteurs pensent que la présence d'une activité comparable à celle d'une aminopeptidase P dans le rein des animaux peut être due à la prolidase : YARON et coll., 1968 (262).

Une activité de type Imidodipeptidasique a été caractérisée dans l'extrait intracellulaire d'Arthrobacter (BJARE et HOFTSEN, 1970, 20),

conjointement à une activité aminopeptidasique similaire à celle de l'aminopeptidase P. L'enzyme bactérienne est réactivée par le Co^{++} .

γ) La Carnosinase ; Aminoacyl-L Histidine hydrolase
(Ec. 3.4.3.3.) (BARMAN, 8)

Une enzyme qui hydrolyse préférentiellement les dipeptides dans lesquels l'azote de l'histidine est engagé dans la liaison peptidique, a été décrite par SMITH (217, 218). Le blocage du carboxyle libre du dipeptide hydrolysé, ralentit seulement l'activité de cette enzyme. Le caractère dipeptidasique de cette enzyme n'a donc pas été démontré de façon certaine (DELANGÉ et SMITH, 1971, 56). Elle est très instable en absence du substrat, inhibée par les complexants des métaux, et activée par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} ; les autres métaux sont sans effet ou légèrement inhibiteurs. Il faut remarquer que le zinc est le métal de l'enzyme native (ROSENBERG, 1960, 192). Cependant, l'enzyme est beaucoup plus stable en présence de Mn^{2+} , ou des deux ions Mn^{2+} et Zn^{2+} que lorsqu'elle contient uniquement du zinc (86).

δ) La β -aspartyl-dipeptidase d'*Escherichia coli*

Elle a été isolée en 1968 par HALEY (81) et purifiée 110 fois à partir de la fraction cytoplasmique soluble d'*Escherichia coli*. Cette enzyme n'est pas activée par les ions métalliques. Son poids moléculaire est de 120.000, et elle a une activité optimale à pH 7,5. Son action est strictement limitée aux β -aspartyl-dipeptides. La nature du résidu ayant le groupement COOH libre, est moins importante ; cependant, lorsqu'il

s'agit du glycocolle ou de l'histidine, il n'y a pas d'hydrolyse.

b) Peptidases à spécificité large

Nous décrirons rapidement les enzymes dont l'identification et le caractère dipeptidasique est encore hypothétique.

- La Cysteinyl-glycine dipeptidase

Purifiée 2.000 fois par SEMENZA, 1957 (206), après avoir été décelée en 1950 par OLSON et coll.(161) dans le rein de porc, cette enzyme hydrolyse le Cys-Gly, le Gly-Cys, le Leu-Gly, le Gly-Gly. Elle est activable par le Mn^{2+} , le Fe^{2+} , le Co^{2+} : OLSON (161). La spécificité dipeptidasique de cette enzyme n'a pas été rigoureusement établie (DELANGE et SMITH, 56).

- La Glycyl-tyrosinase

Les mêmes remarques sont valables pour cette dernière, purifiée par LOUGHIN et coll. en 1964 (129) à partir de la glande thyroïde de boeuf. Le mode d'action de cette enzyme est peu spécifique : elle est exempte d'endopeptidase et de leucine aminopeptidase, mais le pouvoir hydrolytique limité aux dipeptides ayant les fonctions α -aminée et α -carboxylique libres n'a pas été démontré.

- La Glycyl-leucinedipeptidase

C'est une peptidase des tissus animaux. Bien que ce terme, adopté dans les ouvrages spécialisés, laisse supposer une activité

restreinte au substrat Glycyl-Leucine (SMITH, 1960, 218 et PATTERSON et coll., 1965, 164), il n'y a pas eu de purification ultérieure de cette enzyme, ni de confirmation des travaux de SMITH (56, 215).

UZMAN et coll. en 1960 (241) décrivent une activité analogue dans le cerveau des mammifères, mais dont le pouvoir hydrolytique n'est pas limité à la scission du Gly-Leu. Les travaux de PATTERSON (164) mettent en évidence deux enzymes ayant une activité Glycyl-Leucine dipeptidasique, dont l'une est inhibée par le zinc. Mais ces enzymes n'étant que très sommairement purifiées, les arguments en faveur de leur activation différentielle, soit par le zinc, soit par le Manganèse, ne sont pas convaincants.

- L'Alanyl-glycine dipeptidase

Cette activité est très largement répandue dans les tissus animaux, particulièrement dans la muqueuse intestinale où elle compte parmi les activités de type dipeptidasique les plus abondantes. Tous les ouvrages (164, 218) constatent que cette enzyme est remarquablement instable et que, en conséquence, elle n'a pu être purifiée. Les observations de PATTERSON et coll., 1965 (164) ont cependant indiqué qu'elle est chargée électronégativement, et que son poids moléculaire est compris entre 65.000 et 85.000.

Une Alanyl-glycine-dipeptidase ou (Alanine-Amino hydrolase) d'origine bactérienne a été étudiée par BEHAL et coll. en 1967 (13). Elle hydrolyse la plupart des dipeptides composées de deux acides α -aminés neutres. Le résidu N-terminal a moins d'importance. L'alanyl-glycocolle est hydrolysé de façon préférentielle. Cette enzyme n'a

malheureusement pas été totalement purifiée, et elle est encore active à l'égard du tripeptide Ala-Gly-Gly (alors que son action envers le Leu-Gly-Gly est nulle).

Celle-ci est une enzyme de la fraction membranaire de Neisseria catarrhalis d'où elle est extraite par désintégration sonique. Elle est très labile. C'est un complexe métal-enzyme qui est fortement inhibé par les agents chélateurs et activé par le Co^{2+} et le Mn^{2+} (5 mM). Les ions Manganèse et Magnésium sont indispensables au maintien de la stabilité de l'enzyme.

HAYMAN et PATTERSON, 1971 (92) ont isolé et purifié une dipeptidase animale peu spécifique dont nous rélaterons les propriétés de façon détaillée; et qui hydrolyse préférentiellement l'alanyl-glycocolle. Ne peut-on identifier cette dipeptidase à l'alanyl-glycine dipeptidase ?

- La Glycyl-glycine dipeptidase (Ec. 3. 4. 3. 1. — 8)

Cette dipeptidase n'a jamais été hautement purifiée. Cependant, elle a été décelée par de très nombreux auteurs : dans les tissus animaux, les tissus végétaux, la levure, les champignons microscopiques et chez les bactéries (JOHNSON et BERGER, 1939, 106). Nous ne citerons que les ouvrages les plus importants : SMITH et coll., 1948 (214, 216), TOGASAWA et coll., 1957-1958 (236, 237), WILCOX et coll., 1963 (256).

Cette dipeptidase n'hydrolyse pas l'Ala-Gly ni le Gly-Ala. La spécificité dipeptidasique de cette enzyme a été bien établie par WILCOX, 1963 (256). Elle hydrolyserait spécifiquement le dipeptide Gly-Gly, mais il faut remarquer que le pouvoir hydrolytique spécifique

de cette enzyme a été admis par de nombreux chercheurs, uniquement sur le seul critère de son activation spécifique par le cobalt.

SMITH, 1948 (216) a étudié le rôle du cobalt : la spécificité restreinte de la glycyl-glycine dipeptidase s'expliquerait par l'affinité du cobalt (au pH optimal de l'enzyme) beaucoup plus grande pour le glycyl-glycocolle que pour les autres dipeptides utilisés. Ainsi, le sarcosyl-glycocolle, capable de former dans les mêmes conditions un complexe avec le cobalt, est également hydrolysé. La glycyl-glycine dipeptidase est inhibée par les métaux lourds (Zn, Pb, Cd, Ag, Hg). Le Mn et le Mg sont sans effet. Elle est également inhibée par les réactifs des métaux lourds et par les réactifs des groupes thiol ; TOGASAWA, 1957 (236), 1958 (237). Le pH optimum de cette enzyme est 7,5. La leucine et l'isoleucine sont des inhibiteurs compétitifs (WILCOX et FRIED, 1963, 256).

c) Dipeptidases à spécificité large hautement purifiées

α) Dipeptidase ayant une spécificité non rigoureuse pour les isomères optiques (D ou L)

Ces dipeptidases hydrolysent les L.dipeptides et les dipeptides ayant un acide aminé C-terminal de configuration D. Plusieurs dipeptidases ont été isolées du rein des animaux supérieurs. La mieux étudiée et la plus représentative de ces dipeptidases ayant un mode d'action étendu, a été isolée du cortex de rein de porc par CAMPBELL et coll. (32, 34, 56).

- Dipeptidase rénale isolée et purifiée par CAMPBELL et coll.
1966-1971 (32, 34, 88)

Cette enzyme est active envers de nombreux dipeptides. Pour que l'hydrolyse ait lieu, il faut que l'acide aminé N-terminal du substrat soit de configuration L, tandis que l'acide aminé C-terminal peut être de configuration D ou L. Le dipeptide le plus rapidement dégradé est l'alanyl-glycocolle (32) ; le glycyl-glycocolle est parmi les dipeptides les plus rapidement scindés (88). RENE et CAMPBELL, 1969, (187) ont démontré que l'enzyme native est un dimère (poids moléculaire 87.000 à 93.000), formé de sous-unités dont le poids moléculaire est 47.200 (32, 187). Elle contient un atome de zinc par molécule (de poids moléculaire 47.200). Cependant, cette enzyme n'est pas active spécifiquement par le zinc, mais aussi par le Mg^{2+} et le Co^{2+} . le pH optimum varie de 7 à 9,0 selon les substrats. Cette enzyme est insensible à l'inhibition par le p.hydroxymercuribenzoate, l' α -iodoacétamide et le N-éthylmaleimide : travaux de CAMPBELL et coll., 1966, (34), HARPER et CAMPBELL, 1971 (88).

L'O.phénanthroline déplace le zinc de la molécule protéique, et l'activité est restaurée par dialyse avec un tampon contenant du zinc. CAMPBELL et coll. en 1970 (32), ont observé que la dipeptidase est inhibée par le phosphate inorganique, les nucléotides (ATP, ADP, AMP) et les ions monovalents.

- Dipeptidase du cortex de porc purifiée par ROBINSON et coll.
1953 (188)

Cette autre enzyme du cortex du rein de porc (purifiée par ROBINSON et coll., 1963, 188) présente la particularité d'hydrolyser

rapidement le Gly-D.Ala.

La spécificité de cette enzyme est très large : la plupart des peptides utilisés pour l'étude de son mode d'action (du type Gly-X) sont hydrolysés, l'acide aminé C-terminal étant de configuration L ou D.

Cette enzyme est une lipoprotéine acide dont le poids moléculaire est compris entre 75.000 et 80.000. Elle est beaucoup plus active à une température élevée : pour le Gly-D.Ala₂ à 50°C, 220.000 rotations par min, et à 37°C, 600 rotations par min. Pourtant, c'est une enzyme thermosensible, elle est rapidement inactivée à 40°C.

Bien qu'elle soit une métallo-enzyme, le rôle des ions métalliques n'a pas été clairement élucidé. L'analyse de la protéine montre que cette enzyme ne contient pas de cobalt, mais uniquement du zinc et du magnésium. Pourtant, elle est activée par le cobalt à faible concentration, et l'effet du cobalt sur l'activité enzymatique varie considérablement selon la nature du substrat (188). Le pH optimum est compris entre 7,0 et 8,0.

- Dipeptidase du rein humain isolée et purifiée par FELICETTI et HANSON, 1970 (62)

Les caractères de spécificité de cette enzyme sont proches de ceux de la dipeptidase purifiée par ROBINSON et coll. (188). C'est également une métallo-enzyme dont le poids moléculaire est beaucoup plus élevé (poids moléculaire de l'enzyme native = 300.000). L'activité est optimale à pH 7,0.

β) Dipeptidases douées d'une spécificité stricte pour les dérivés de configuration L

Plusieurs dipeptidases ont un mode d'action limité strictement aux substrats composés par des acides aminés de configuration L.

- La dipeptidase de la levure. Travaux de CORDONNIER, 1966 (43)

Cette dipeptidase de la levure de brasserie Saccharomyces cerevisiae a des propriétés différentes de celles des dipeptidases rénales : elle hydrolyse uniquement les dipeptides dont les deux acides aminés sont de configuration L. Les glycyldipeptides sont hydrolysés plus rapidement que les alanyldipeptides correspondants.

Cette enzyme est inhibée par les réactifs des groupements thiol. C'est une métallo-enzyme dont le métal est fortement lié à la protéine; mais la nature du métal n'a pas été précisée, car l'apoenzyme est trop modifiée et ne peut être réactivée par les ions métalliques. La préparation dipeptidasique obtenue par CORDONNIER n'est certainement pas homogène. Ce chercheur a réuni de nombreux arguments en faveur de l'existence d'une contamination par une dipeptidase qui aurait une affinité plus particulière pour le glycyldipeptide. Mais toutes les tentatives entreprises pour séparer ces deux types d'activités dipeptidasiques ont échoué.

- La dipeptidase isolée des cellules tumorales de souris par HAYMAN et PATTERSON, 1971 (92)

Cette enzyme hydrolyse les L.α-dipeptides ayant un groupement aminé et un groupement carboxylique libres. Les dipeptides ayant un

résidu N-terminal de petite taille et un résidu C-terminal non polaire, sont rapidement hydrolysés. Le prolyl-glycocolle et le glycyglycocolle sont hydrolysés, mais non le glycyproline.

C'est une zinc-métalloenzyme dont le poids moléculaire est de 85.000 ± 5.000 . Elle est inhibée par les réactifs des groupements thiol.

Pour cette enzyme, HAYMAN et coll. (92), comme pour l'enzyme de la levure de brasserie, CORDONNIER (43), les auteurs indiquent une divergence des réactions catalytiques à l'égard du Ala-Gly et du Gly-Gly, en présence de divers ions métalliques, et en particulier du cobalt. Ils ont donc supposé qu'il existe une activité de type glycyglycinase dans leur préparation ; mais tous les essais entrepris pour séparer deux enzymes, ont échoué. Les deux dipeptidases que l'on ne peut séparer, auraient donc des charges électrophorétiques et des poids moléculaires très voisins.

Aucune dipeptidase d'origine bactérienne douée d'une spécificité large n'a été purifiée. La seule tentative de purification a été celle de BEHAL et coll., 1967 (13), qui ont obtenu une dipeptidase dépourvue d'activité leucine aminopeptidasique ; mais non d'activité aminopeptidasique ; puisqu'elle hydrolyse encore l'Ala-Gly-Gly. Comme toutes les peptidases de ce type, elle est très labile, surtout en absence des ions métalliques (Mn^{2+} et Mg^{2+}).

SUSSMAN et GILVARG en 1970 (224) ont clairement démontré que les extraits cellulaires d'Escherichia coli contenaient une dipeptidase (Ec. 3. 4. 3.) qui hydrolyse le dipeptide lysyl-lysine. La nature de

cette dipeptidase n'a pas été précisée. De nombreux autres travaux non cités décrivent des activités dipeptidasiques, mais sans établir cette spécificité de façon rigoureuse.

Les propriétés essentielles des dipeptidases purifiées sont exposées dans le tableau IV.

Noms : systématique, trivial	Origine	Liaison hydrolysée - Substrat spécifique	Métal activateur	pH	Remarques	Réf.
<u>Glycyl-glycine dipeptidase</u> Ec. 3. 4. 3. 1.	Animaux, végétaux Bactéries	Gly-Gly	Co ²⁺ Mg ²⁺	7,5		238, 256 214, 216
<u>Aminoacyl L-histidine hydrolase</u> Ec. 3. 4. 3. 3. = Carnosinase	Rein de porc	X ↓ His β-Ala-His	Zn ²⁺ Mn ²⁺	8,0		217, 182
<u>Iminodipeptidase</u> Ec. 3. 4. 3. 6. : Prolinase	Rein de porc Escherichia coli	Pro ↓ Y Hyp ↓ Y Pro-Gly	Mn ²⁺	8,0		49, 217 200
<u>Imidodipeptidase</u> Ec. 3. 4. 3. 7. : Prolidase	Tissus animaux Rein de porc Arthrobacter	X ↓ Pro Gly-Pro	Mn ²⁺ Co ²⁺	8,0 8,0		50 20, 196
<u>Dipeptidases</u> Ec. 3. 4. 3. <u>Hydrolysant :</u>	Cortex du rein de porc isolée par CAMPBELL	Gly-D.Leu Ala-Gly Gly-Gly	Mn ²⁺ Co ²⁺	7-9	PM : 90.000 1 Zn ²⁺ su.=47.200	32
X ↓ Y X : configuration L Y : configuration D ou L	rein de porc isolé par ROBINSON et coll.	Gly-D.Ala Gly-D.Leu Gly-D.Me	Co ²⁺	7-8	PM : 75 à 85.000	188
X et Y : acides aminés neutres	rein humain isolé par FELICETTI et coll.	Gly-D.Leu Ala-Gly	Mg ²⁺ Mn ²⁺ Co ²⁺	7,0	PM : 300.000	62
X ↓ Y X et Y acides aminés neutres de configuration L	cellules tumorales de souris levure	Ala-Ileu Gly-Leu Ala-Gly Gly-Met Ala-Gly			métalloenzyme (1 Zn) PM : 850.000 métalloenzyme (Zn)	92 43

TABLEAU N° IV

Dipeptides Hydrolases ou Dipeptidases

X : Acide alpha-aminé ayant la fonction aminé libre. Y : Acide alpha-aminé ayant la fonction carboxylique libre.



Deuxième partie : PROPRIETES DES METALLO-PEPTIDASES

1) Métalloenzymes et complexes métal-enzymes

Selon VALLEE, 1964 (242), on peut classer les enzymes nécessitant un cofacteur métallique selon la force de la liaison du métal avec la protéine enzymatique.

a) Les métalloenzymes

Le métal a une liaison suffisamment forte avec les protéines pour leur rester associé pendant tout le processus d'isolement et de purification, et pour être présent dans le matériel final purifié.

De tels métaux ne sont pas déplacés par les procédés usuels de dialyse, et l'enzyme hautement purifiée peut être isolée avec sa pleine activité.

Il en est ainsi pour la carboxypeptidase A pancréatique qui peut être isolée avec son métal, le zinc (242, 243, 244), de même pour la dipeptidase rénale de CAMPBELL, qui n'est pas inhibée par dialyse contre des agents non chélateurs. Cette dernière enzyme contient également 1 atome de zinc par molécule (CAMPBELL, 1967, 32).

b) Les complexes métal-enzymes

La liaison du métal avec la protéine est plus faible, l'ion métallique est libéré facilement par dialyse. Mais la présence des ions

métalliques est nécessaire au fonctionnement de l'enzyme, car ils doivent être additionnés après le processus d'isolement pour restaurer l'activité enzymatique. Chez ces complexes métal-enzyme, la fonction du métal est encore mal connue ; mais certaines peptidases demandent un temps d'incubation avec le métal pour leur pleine activité, ce qui montre clairement que le phénomène d'activation doit comprendre la formation d'un complexe métal-protéine. Un exemple de complexe métal-enzyme est celui formé par la leucine-aminopeptidase du rein de porc (56). L'enzyme native contient du zinc (1 atome gramme par sous-unité, 95). Pourtant, ce métal peut être facilement déplacé par simple dialyse. Il est remplacé aisément par le Manganèse ou le Magnésium.

Quelques dipeptidases sont des complexes métal-enzymes. Il en est ainsi de l'Iminodipeptidase (Ec. 3. 4. 3. 6.) (49) de l'Imido-dipeptidase (Ec. 3. 4. 3. 7.) SMITH, 1948 (213, 50), de la Carnosinase (Ec. 3. 4. 3. 3.) ROSENBERG (192).

Les métalloenzymes et les complexes métal-enzymes se distinguent donc par leur constante d'affinité pour les ions métalliques ; celle-ci étant beaucoup plus grande pour les premières. Mais des formes intermédiaires sont possibles ; et cette classification correspond à des données expérimentales mesurables. Pour les métalloenzymes, la mesure des constantes de stabilité de la liaison métal-protéine a été réalisée par des techniques d'équilibre de dialyse. Ces constantes sont de $3,2 \times 10^{-10}$ M pour la Zn-Carboxypeptidase A du pancréas bovin, COLEMAN et VALLEE, 1961 (42) et de 1×10^{-10} M pour la Zn-phosphatase alcaline d'Escherichia coli (242).

Pour la carboxypeptidase A et pour les métalloenzymes en général,

les rapports métal-protéine, métal-activité, activité enzymatique-protéine, atteignent des valeurs limites au cours de la purification des enzymes; et, quand celle-ci est complète, le rapport métal-protéine, en atome-gramme de métal par molécule de protéine, atteint un nombre entier, attestant à la fois la spécificité de l'association et impliquant une relation stéréochimétrique. Corrélativement, les ions métalliques non nécessaires à l'association sont déplacés; ils diminuent et atteignent des valeurs négligeables dans le matériel final. De telles mesures sont réalisables à condition de prendre de nombreuses précautions pour éviter toute contamination par des métaux extrinsèques (VALLEE, 1955 et THIERS, 1957 (242)). Par ailleurs, ces observations nécessitent des quantités relativement importantes de produits purifiés (VALLEE et WACKER, 244). Pour cette raison, les enzymes les plus étudiées ont été les enzymes animales; et en particulier les carboxypeptidases A et B, qui peuvent maintenant être préparées par gramme.

La mesure des constantes de stabilité entre divers métaux et l'apoenzyme, ont été établies pour les procarboxypeptidases et les carboxypeptidases par COLEMAN et VALLEE, 1961 (42).

Les métallopeptidases formées avec les métaux de la période II B (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) ne perdent pas leur métal par dialyse à pH neutre. La valeur des constantes de stabilité indique que l'équilibre est atteint pour des concentrations extrêmement basses d'ions métalliques libres.

Les liaisons formées par les métaux de transition (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) avec l'apoenzyme, sont beaucoup plus faibles, et ces métaux sont déplacés par simple dialyse à pH neutre. Avec ces métaux, l'activité enzymatique est maintenue seulement en présence d'un excès de métal

qui assure l'équilibre avec les ions métalliques du milieu externe.

Donc, si les Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} -carboxypeptidases existent dans la nature, leur détection est entravée par les conditions expérimentales, puisque des changements relativement faibles du pH, pendant le processus d'isolement, causent la dissociation et provoquent la formation d'une apoenzyme qui ne peut être décelée. Dans ce cas particulier, la seule enzyme native isolée est la Zn-carboxypeptidase. Mais des études ont montré qu'il existe des procarboxypeptidases natives contenant du Fe^{2+} et du Ni^{2+} qui sont dissociées pendant le processus d'isolement (PIRAS et VALLEE, 1967, 244).

En fait, de nombreuses enzymes sont isolées, complexées avec un ion métallique spécifique, qui reflète: soit l'affinité particulièrement haute des liaisons du site actif pour cet ion métallique; soit l'abondance relative de ce métal dans le milieu extrinsèque.

Beaucoup de liaisons biologiques ne présentent pas une haute spécificité ou une affinité exclusive pour un ion métallique donné. En particulier, de nombreux complexes métal-enzymes sont activés par une série d'ions métalliques, et il est donc très difficile de déterminer quel est le métal biologiquement actif qui est chimiquement associé avec ce système dans son état natif.

L'identification des complexes métal-enzyme repose sur la démonstration de l'activation par les ions métalliques, l'inhibition par les complexants des métaux, et la réactivation par les ions métalliques.

2) Rôle fonctionnel et structural des ions métalliques

Le métal dans les métalloenzymes peut participer aux fonctions catalytiques, mais également stabiliser la structure secondaire, tertiaire ou quaternaire de la protéine enzymatique. Ces divers rôles ont été démontrés pour plusieurs enzymes.

- Le rôle du métal peut être uniquement fonctionnel. Ainsi la carboxypeptidase A n'est pas dépolymérisée, mais inactivée par élimination du zinc. Cependant, il est possible que la modification structurale soit limitée à une petite région de la molécule, qui ne peut être décelée par les méthodes utilisées par NEURATH, 1960 (158). Une telle altération est envisagée, car la stabilité de l'apoenzyme est plus faible en comparaison de celle de l'enzyme native.

- Souvent le rôle du métal est à la fois structural et fonctionnel. Il en est ainsi pour la leucine aminopeptidase (Ec. 3. 4. 1. 1.). Les ions métalliques, le Mg^{2+} (travaux de SMITH, 1955, 220) ou le Zn^{2+} (travaux de HIMMELHOCH, 1969, 95), jouent un rôle de stabilisant et de catalyseur. C'est également le rôle du zinc pour la protéase neutre de Bacillus thermoproteolyticus (244), du cobalt pour de nombreuses peptidases thermostables comme l'Aminopeptidase API de Bacillus stearothermophilus, étudiée par RONCARI et ZUBER (190) ; enfin du Manganèse pour l'Iminodipeptidase (49), l'Imidodipeptidase (50) et la Carnosinase (192).

Les ions les plus souvent concernés dans le rôle stabilisateur sont le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le Zn^{2+} (244).

Le plus souvent un seul métal remplit ces diverses fonctions, mais plusieurs métaux peuvent intervenir. Ainsi, la protéase neutre de

Bacillus subtilis contient du zinc, lequel est nécessaire à la fonction catalytique, mais elle est stabilisée par le calcium et l'autolyse se produit rapidement en absence de ce métal (244).

Il est difficile de définir sans ambiguïté quels sont les différents rôles des ions métalliques, car ceux-ci peuvent être inter-dépendants. Plusieurs modes d'action ont été envisagés (VALLEE et WACKER, 1970, 244).

- Le métal participe à l'attachement du substrat;
- il participe à la fois aux deux fonctions (41);
- il peut apporter des changements de conformation qui présentent des avantages, soit fonctionnels, soit structuraux, soit les deux ensembles;
- il peut réagir avec les chaînes latérales des aminoacides de la protéine, d'une façon telle, que le complexe formé par ses liaisons de coordination puisse acquérir une fonction catalytique;
- enfin, le métal interviendrait dans le processus de l'hydrolyse de la liaison peptidique, en provoquant une redistribution des charges sur la molécule de substrat; de sorte que la liaison peptidique, devenue plus labile, nécessiterait une énergie d'activation plus faible pour l'hydrolyse (RABIN, 1960, 184 ; VALLEE et coll., 245).

Pour beaucoup de métalloenzymes, la nécessité absolue d'un ion métallique pour l'activité catalytique a été démontrée; car l'ion métallique peut être déplacé par les agents chélateurs ou par un changement de pH, et l'apoenzyme obtenue est inactive ; cependant, la pleine activité peut être restaurée par addition de métal.

Mais parfois le déplacement du métal provoque une modification de la structure, suffisante pour entraîner une altération irréversible. Dans ce cas, le remplacement de l'ion métallique par un autre peut

apporter quelques indications sur le rôle catalytique du métal. Ainsi HIMMELHOCH (95) a démontré le rôle du zinc pour la leucine aminopeptidase en déplaçant celui-ci par le Cd^{2+} . La leucine aminopeptidase est alors inactivée, mais non dénaturée, et le déplacement inverse du Cd^{2+} par le zinc provoque une réactivation proportionnelle à la concentration en Zn^{2+} .

3) Nature des sites d'attachement du métal à la protéine

Les connaissances en ce domaine sont encore limitées. L'identification des sites d'attachement du métal avec la protéine est fondée principalement sur l'étude de l'interaction entre les métaux et les groupements réactionnels des acides aminés, des peptides et de leurs dérivés.

L'étude de tels modèles a montré que les groupes impliqués dans la coordination des métaux avec les protéines peuvent être les suivants : le groupe α -carboxylique terminal, les acides carboxyliques (acides aspartique et glutamique), le groupe epsilon aminé de la lysine, l'imidazole de l'histidine, le groupe thiol de la cystéine, l'hydroxyle phénolique de la tyrosine et le groupe α -aminé terminal.

Dans les conditions les plus favorables, la nature des groupes "donneurs" libérés par le déplacement du métal peut être démontrée par des modifications bien définies, au moyen des réactifs habituels spécifiques des groupements réactionnels des acides aminés.

La cystéine et la tyrosine ont été le plus souvent impliquées dans la liaison du métal avec la protéine au site actif de l'enzyme.

Les résidus histidyl sont très souvent suspectés, en comparaison avec des modèles catalytiques plus simples, mais ils ont été rarement identifiés (VALLEE, 244). Cette incertitude est due en partie au manque de réactif chimique spécifique, modifiant uniquement ce groupement réactionnel (VALLEE et RIORDAN, 243).

La nature des résidus impliqués au site actif est pratiquement inconnue pour la plupart des exopeptidases. Le groupe thiol a été suspecté pour plusieurs exopeptidases : la Leucine aminopeptidase d'Escherichia coli B (DICK et MATHESON, 1970, 57), la Prolidase (Ec. 3. 4. 3. 7.) SMITH, 1955 (217), la Proline iminopeptidase d'Escherichia coli K12 (SARID et coll., 200).

Mais seul le site actif de la carboxypeptidase A a été bien étudié : le zinc, dans le site catalytique de cette enzyme, est coordonné à un résidu glutamyl et deux résidus histidyl (travaux de HARTSUCK, 1968 et de BRADSHAW et coll., 1969, 90). Le site actif de la Leucine aminopeptidase est encore très mal connu. Plusieurs auteurs (SMITH et SPACKMAN, 220 ; BRYCE et RABIN, 28) ont réalisé des études qui semblent indiquer que l'ion métallique est coordonné à un groupe imidazole non chargé ou à un groupe α -aminé non chargé.

De ces travaux, comme de ceux concernant la carboxypeptidase A, il se dégage que le rôle, dans la fonction catalytique, des groupes réactionnels de la protéine enzymatique (non liés au métal au niveau du site actif), est beaucoup plus important qu'on ne le pensait tout d'abord; et le rôle des ions métalliques est peut être plus limité (DELANGE et SMITH, 1971, 56).

4) Influence de la nature du métal sur la spécificité

Beaucoup d'enzymes ne présentent pas une exigence spécifique pour un seul métal. Les ions Zn, Co, Ni, Mn, Cd, Hg et Pb produisent des carboxypeptidases actives (242). Mais la nature du métal peut modifier profondément la spécificité pour différents substrats.

SMITH en 1948 (216) expliquait la spécificité particulière de la Glycyl-Glycine dipeptidase, qui est activée par le cobalt, par l'affinité particulière de ce métal pour le Glycyl-Glycocolle au pH optimal de l'enzyme.

Plusieurs observations ont montré que l'amplitude de la réaction catalytique dépend à la fois de la nature du métal au site actif et de la nature du substrat. Ainsi les Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} - carboxypeptidases présentent à la fois des activités peptidasiques et estérasiques, alors que les Cd^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} - carboxypeptidases sont douées uniquement d'activité estérasique; et les carboxypeptidases contenant du Cd^{2+} ou du Hg^{2+} ont une activité estérasique plus élevée que celle de l'enzyme native contenant du Zn (VALLEE et coll., 242). Cette action des ions métalliques ne se limite pas à la réactivation de l'apoenzyme. L'incubation de la Zn-carboxypeptidase A avec le Co^{2+} provoque une augmentation de l'activité peptidasique (qui est doublée) alors que l'activité estérasique reste inchangée (FOLK et GLADNER, 69).

Un tel phénomène a été observé pour d'autres enzymes que les dipeptidases; la substitution du Zn par le Co change la spécificité de la phosphatase alcaline d'Escherichia coli, qui perd son activité phosphotransférante, mais garde son activité hydrolytique (46, 185).

Ainsi la substitution d'un métal par un autre peut induire des changements notables dans la spécificité d'action des métalloenzymes.

L'activation différentielle par un ion métallique est donc un critère insuffisant pour établir l'existence d'une peptidase spécifique, et comme l'ont soulignés SMITH, 1960 (218) et DELANGE et SMITH, 1971 (56), l'existence d'une dipeptidase spécifique telle que la Glycyl-Glycine dipeptidase restera une hypothèse de travail tant que l'enzyme n'aura pas été purifiée.

Troisième partie : RÔLE DES PEPTIDASES IN VIVO DANS LA CELLULE BACTERIENNE

1) Fonction des peptidases

a) Rôle nutritif

α) Utilisation des peptides comme source d'acides aminés

On n'a pu confirmer que certains peptides spécifiques (Streptogénine) intervenaient dans la stimulation de la croissance de certaines bactéries (travaux de WOLLEY, 259, pour Lactobacillus casei et certaines espèces de Streptocoques). Plusieurs équipes de chercheurs démontrent que cet effet stimulateur de la croissance est en relation directe avec l'hydrolyse des peptides qui provoque un apport supplémentaire en acides aminés (KIHARA et SNELL, 1960, 111).

Ce rôle des peptidases est démontré par de nombreux travaux (39, 112, 116, 119, 166, 169, 171) et non seulement par le fait que les peptides accélèrent la croissance des bactéries en milieu minimal, mais aussi par le fait que la croissance des bactéries exigeantes en certains acides aminés peut être assurée uniquement par des peptides qui contiennent ces acides aminés indispensables. Une preuve directe de cette fonction a été établie par KESSEL et LUBIN (110), un mutant d'Escherichia coli auxotrophe pour le glycocolle et ayant perdu son pouvoir hydrolytique à l'égard du Glycyl-glycocolle, est incapable de croître sur un milieu contenant ce dipeptide, bien qu'il possède la capacité de le transporter et de le concentrer à l'intérieur de la cellule.

β) Localisation intracellulaire des peptidases

Beaucoup de bactéries utilisent les dipeptides comme source d'acides aminés, cette utilisation peut se faire par deux mécanismes :

1° - Les peptides sont hydrolysés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et les acides aminés libérés seront transportés à l'intérieur de la cellule pour être utilisés. Mais, s'il existe des peptidases extracellulaires, par exemple l'aminopeptidase d'Aeromonas proteolytica (LICHFIELD et PRESCOTT, 1970, 124) et l'Aminopeptidase des Streptomyces (MORIHARA, 149 et OUCHI, 162), la plupart des aminopeptidases et les dipeptidases qui ont été caractérisées ou purifiées sont intracellulaires.

2° - C'est donc un deuxième processus qui intervient : les peptides seront transportés à l'intérieur de la cellule, et ensuite hydrolysés.

La localisation intracellulaire des exopeptidases est montrée pour diverses bactéries par les travaux de BACKER et coll. (6), BOLTON et BRITTEN (24), FRITSCHÉ et HANSON (71), HALEY (81), LEVY et coll. (120, 121), MATHESON et coll. (134, 138, 140, 154, 238), Mc CORQUODALE (142), SARID et coll. (200), SIMMONDS et coll. (208, 209, 210, 211, 247), ROULET et ZELLER (193), enfin SWECZULK (228), SEIDEL (204).

La plus grande partie de l'activité peptidasique est localisée dans la fraction cytoplasmique soluble.

Une peptidase ribosomale d'Escherichia coli a été étudiée par MATHESON et coll. (135, 136, 137, 138, 140, 154). Cette peptidase paraît identique à celle décrite par Mc CORQUODALE (142). Pour l'ensemble

des peptidases d'Escherichia coli, tous les travaux de MATHESON et coll. (140), SARID et coll. (200), SIMMONDS et coll. (210), SUSSMAN et coll. (224) et VOGT (148) s'accordent pour démontrer que ces enzymes sont vraiment intracellulaires, car ni les chocs osmotiques, ni la formation de sphéropastes ne produisent de libération de ces enzymes qui soit significative, en comparaison avec celle d'autres enzymes bactériennes souvent situées entre la membrane cytoplasmique et la paroi (phosphatase alcaline, nucléase) (travaux de NEU et coll., 1965, 157).

Il en est ainsi pour les peptidases de la plupart des espèces bactériennes (qui ont été étudiées : FRISTCHE et HANSON, 71 ; RYDEN et coll., 197) exception faite pour quelques aminopeptidases thermostables des Bacillacées qui sont libérées par la lyse de la paroi (ZUBER et RONCARI, 189, 190, 268).

γ) Transport des dipeptides et des oligopeptides

Le rôle des peptidases dans la digestion des aliments azotés est limité, du fait de leur caractère endocellulaire, aux peptides qui pénètrent dans la cellule. De nombreuses études ont été consacrées ces dernières années au processus de transport des dipeptides et des oligopeptides chez les bactéries (travaux de PAYNE et GILVARG, 73, 166, 167, 168, 169, 170, 171 ; SUSSMAN et GILVARG, 224 ; PITTMAN, 177).

Le prélèvement du peptide est établi par le fait qu'il assure la croissance d'une souche d'Escherichia coli exigeante pour un acide aminé particulier : Lysine, Arginine, Proline ou Glycocolle (110, 167, 168).

Alors qu'il existe de nombreuses perméases pour les acides aminés (COHEN et coll., 39 ; KEPES, 109 ; PIPERNO, 176), la plupart des oligopeptides utilisent le même système de transport (PAYNE et GILVARG, 167, 168, 169, 170, 171) et il existe quelques perméases pour les dipeptides. Tandis que les perméases des dipeptides limitent leur action à ceux-ci, le système de transport des oligopeptides transporte également les dipeptides (PAYNE et GILVARG, 169, 171).

Dans tous les cas, pour que le transport ait lieu, la présence d'un groupe α -aminé ou α -iminé est essentielle, la substitution de ce groupe empêche le transport (LOSICK et GILVARG, 128 et PAYNE et GILVARG, 167, 169). Les systèmes de transport des dipeptides et celui des oligopeptides se distinguent par la nécessité d'un groupement carboxyle terminal libre pour les premiers; tandis que pour les oligopeptides: le carboxyle terminal peut être substitué ou absent (PAYNE et GILVARG, 169, 171).

8) Distinction entre le transport des dipeptides et l'activité peptidasique

La possibilité d'un rôle éventuel des peptidases dans le transport des dipeptides a été envisagée, mais KESSEL et LUBIN (110) ont démontré clairement que ces deux systèmes sont indépendants :

Un mutant d'Escherichia coli exigeant en glycoColle, mais qui a perdu la capacité d'hydrolyser le glycyL-glycoColle, accumule ce dipeptide sans pouvoir l'utiliser pour la croissance.

Cependant, un autre mutant, déficient en perméase (permettant le transport du dipeptide), présente un taux normal d'activité peptidasique.

Enfin, la preuve de la différence entre le transport des dipeptides et l'activité peptidasique est fournie par de nombreuses observations; ainsi, certains mutants d'Escherichia coli ayant perdu leur système de transport des oligopeptides, deviennent résistants au pouvoir nocif de certains oligopeptides - mais il n'y a aucun changement appréciable de leur activité peptidasique (PAYNE et coll., 1968-1971, 166, 171 ; SUSSMAN et coll., 1969-1970, 223, 224).

b) Rôle protecteur des peptidases intracellulaires contre l'effet nocif de certains peptides

Plusieurs études démontrent que les peptides non dégradés s'accumulent dans la cellule et peuvent inhiber la croissance bactérienne. Par exemple, certains peptides de la Leucine (Leu-Gly, Gly-Leu) augmentent considérablement la période de latence précédant la phase exponentielle de croissance chez Escherichia coli (154). Les acides aminés qui constituent ces peptides sont sans effet sur la croissance; et l'inhibition est d'autant plus forte que les cellules sont plus "âgées", et que la capacité peptidasique des cellules est plus réduite (154). De la même façon, les dipeptides suivants : Lys-Ala, Ala-Lys, Lys-Leu, inhibent la croissance bactérienne (166, 171). La triornitine, qui est dégradée lentement par Escherichia coli, est également toxique

pour cette bactérie (171). Par ailleurs, SUSSMAN et GILVARG (223) ont montré que la croissance d'un mutant ayant perdu la capacité d'hydrolyser rapidement la trilyisine, est inhibée par ce peptide, qui est utilisé habituellement pour la nutrition, sans effet inhibiteur, par la souche sauvage d'Escherichia coli. Ainsi, certains peptides non hydrolysés, peuvent inhiber la croissance bactérienne. Il faut noter à ce propos que les peptides antibiotiques (Bacitracine, Pénicilline, Gramicidine) contiennent généralement des acides aminés non usuels ou des structures inhabituelles (BODANSKY, 1969, 23) qui empêchent leur dégradation par les peptidases.

c) Autres rôles éventuels des peptidases intracellulaires

α) Intervention des peptidases au stade final de la synthèse des protéines

Quand les protéines sont synthétisées, l'acide aminé initial est la formyl-méthionine. Il est donc nécessaire qu'une déformylation et une hydrolyse ménagée ait lieu pour que la protéine parvienne à son état final. L'hydrolyse du groupe formyl est catalysée par une déformylase hautement spécifique (ADAMS, 1965, 1 ; LIVINGSTON et LEDER, 1969, 127 ; TAKEDA et WEBSTER, 232). Pour Escherichia coli et pour Bacillus subtilis, la proportion des protéines ayant la méthionine en position N-terminale est respectivement de 45 p. 100 et 10 p. 100 (101, 252). La présence d'acides aminés N-terminaux autres que la méthionine indique qu'il y a une hydrolyse ménagée par une aminopeptidase pour une

grande partie des peptides nouvellement synthétisés. PINE (175) en 1969, a étudié la maturation des protéines, et il a conclu :

- 1° - que la déformylation précède le clivage par la peptidase,
- 2° - que cette déformylation peut se produire pendant l'élongation de la chaîne ou bien après la libération de la chaîne protéique du ribosome,
- 3° - que le clivage peptidasique se produit après la libération des chaînes peptidasiques complètes et du ribosome.

β) Intervention des exopeptidases dans la dégradation intracellulaire des protéines jusqu'au stade des acides aminés

Des variations cycliques des activités peptidasiques et protéinasiqes pour des cultures de bactéries, synchronisées avec la multiplication cellulaire, indiquent que ces enzymes pourraient exercer quelques fonctions essentielles en rapport avec la croissance (travaux de NISHI et coll., 113, 159, 160 ; MURAYAMA et MATHESON, 155). L'activité de ces enzymes est maximale après la phase de division cellulaire. Des résultats semblables ont également été obtenus avec des cultures synchrones de levures (43).

Un "pool" de protéines labiles (2 à 7 p. 100 des protéines totales) est dégradé pendant la phase exponentielle de croissance des bactéries (SUSSMAN et GILVARG, 1971, 225). Le rôle de ces protéines et la signification de leur dégradation sont inconnus. Les expériences réalisées avec les cultures synchrones de bactéries, ont montré qu'une partie des protéines totales d'Escherichia coli est dégradée pendant

la phase de la division cellulaire. Cette protéolyse ne se produit pas à un autre moment du cycle cellulaire. Cependant, l'identité entre les protéines labiles dégradées pendant la phase exponentielle de croissance et celles qui sont dégradées pendant le cycle de la division cellulaire, n'a pas été démontré et cette fonction des peptidases n'a pas été bien établie (SUSSMAN et GILVARG, 1971, 225).

2) Régulation des peptidases

Tous les travaux ont montré que les bactéries cultivées en milieu minimal, en absence des peptides exogènes, présentent une activité peptidasique aussi complète et aussi élevée que celle des cellules cultivées en présence de peptides (209, 223, 248). La synthèse de ces enzymes ne semble pas non plus soumise à la régulation répressive, car les cultures de l'enzyme avec divers substrats ont montré que les cellules contiennent des taux élevés de peptidases et que l'activité peptidasique est insensible aux fluctuations endogènes ou exogènes des produits du catabolisme (GILVARG, 73).

Mais ces peptidases constitutives existent peut être sous une forme partiellement latente (travaux de SIMMONDS et coll., 208, 209, 210, 211, 247). En fait, l'activité peptidasique des cellules non traitées est beaucoup plus faible que celle des extraits cellulaires obtenus par rupture des cellules (par les ultra-sons). SIMMONDS observe que cette "cryptycité" des bactéries est beaucoup plus accentuée chez les cellules âgées qui sont plus pauvres en cofacteurs métalliques et,

que l'inhibition est peut être due à des traces d'ions métalliques ou à un abaissement du pH; mais, comme nous l'avons rappelé précédemment, ces différents facteurs influencent directement l'activité peptidasique "in vitro". Et ces observations n'apportent aucun éclaircissement sur la signification physiologique du phénomène de latence. De plus, il est difficile de déterminer quelle est l'importance de ces diverses conditions de culture dans l'environnement naturel d'Escherichia coli. Enfin, de nombreux faits prouvent que cette latence ne peut être que partielle, puisque des peptidases sont actives pendant la phase logarithmique de croissance. Par exemple l'hydrolyse d'un dipeptide (oligopeptide, dipeptide) fournissant un acide aminé indispensable, n'est pas un facteur limitant de la croissance : le taux de croissance pendant la phase exponentielle est le même en présence de peptides ou en présence de l'acide aminé indispensable (GILVARG et coll., 73, 171).

Mais si les peptidases sont actives, comment les chaînes peptidiques nouvellement formées sont-elles protégées de la dégradation produite par les peptidases cytoplasmiques ?

Le phénomène de latence étant partiel, ne peut assurer ce rôle de protection, qui pourrait être réalisé par divers processus :

- La formylation du groupe α -aminé terminal protège les peptides de l'attaque par les aminopeptidases. Cette protection a été démontrée "in vitro" (1, 127, 232). Ceci est en accord avec l'observation de PINE (175) montrant que la déformylation précède l'attaque peptidasique.

L'estérification du groupement C-terminal par les t-RNA protège les chaînes peptidiques de l'action des enzymes nécessitant

un groupement carboxyle libre pour leur action. Mais cette protection n'est peut-être pas nécessaire, car cette extrémité peptidique est toujours intimement associée au ribosome.

- Plusieurs peptidases paraissent capables d'agir rapidement uniquement sur les dipeptides et les tripeptides; et PINE (175) a montré que les protéines nouvellement formées sont modifiées après leur libération du ribosome. Celui-ci pourrait donc protéger les peptides naissants de l'hydrolyse par les peptidases, en permettant une croissance de la chaîne peptidique, suffisante pour la garantir de l'action des enzymes les plus actives. Le danger de dégradation des peptides naissants a peut-être été surestimé.

En relation avec les connaissances acquises sur la structure des groupes initiaux des protéines d'Escherichia coli, plusieurs auteurs ont caractérisé des peptidases répondant aux exigences de spécificité requises pour l'élimination du groupement méthionyl terminal et l'hydrolyse ménagée des protéines.

Ce sont l'aminopeptidase I d'Escherichia coli (VOGT, 1970, 248) et la peptidase ribosomale de MATHESON (57, 137). Selon VOGT ces deux enzymes, dont la spécificité d'action est assez large, seraient identiques, et l'association de la peptidase de MATHESON avec les ribosomes ne serait que transitoire, et serait peut être un artefact, dû aux conditions d'extraction de cette enzyme (force ionique faible, 248). Mais, indépendamment de ces différences, si le rôle de ces peptidases dans la maturation des protéines est possible, il n'a pas été clairement démontré.

BROWN et KRALL, 1971 (27) ont identifié une peptidase cytoplasmique, qui hydrolyse sélectivement les dipeptides et les tripeptides ayant le groupement méthionine en position N-terminale. Mais, à l'encontre des observations de PINE, l'action de cette peptidase devrait se situer à un stade précoce de la synthèse des protéines.

On peut donc conclure que la nécessité d'action d'une peptidase pour la maturation des chaînes peptidiques a été bien établie; mais l'identification de cette peptidase, l'étude de son mode d'action spécifique et la possibilité de son association avec le ribosome sont encore très mal connus.

CHAPITRE II

RECHERCHES PRELIMINAIRES

I - PROTOCOLE DE MESURE DES ACTIVITES PEPTIDASIQUES

1) Dosage de l'activité peptidasique par une technique colorimétrique directe

La mesure de l'hydrolyse enzymatique des dipeptides par les méthodes colorimétriques, nécessite l'emploi de réactifs spécifiques des acides aminés et qui soient peu sensibles à l'égard des peptides et des protéines. Cette mesure était faite lors des travaux préliminaires par le procédé de TACQUET et coll. (230); il s'agit d'une technique semi-quantitative (annexe technique page 183). Avant d'effectuer la réaction avec la ninhydrine, du 2.4.dinitrofluorobenzène est ajouté à l'hydrolysate, de façon à bloquer la réaction donnée par le peptide initial et les produits du métabolisme cellulaire. La coloration est provoquée alors, par l'une des deux molécules d'acides aminés produites au cours de l'hydrolyse.

Cependant, pour évaluer l'activité relativement élevée des extraits cellulaires, cette méthode s'est révélée insuffisante et, par la suite, nous avons mis au point, en 1969 (180), une technique de dosage plus précise et fidèle, permettant de suivre l'hydrolyse d'une gamme étendue de dipeptides en présence de cellules ou de préparations enzymatiques purifiées.

La technique proposée permet de mesurer directement l'hydrolyse des dipeptides ; elle repose sur la réaction de la ninhydrine avec les acides aminés libérés, en présence d'acide ascorbique, et sur la formation d'un complexe du pourpre de RUHEMANN et du cadmium.

Les travaux de YANARI en 1956 (261) et de MATHESON et TATTRIE en 1964 (139) ont précisé les conditions expérimentales qui permettent de diminuer spécifiquement la coloration de certains dipeptides par la réaction à la ninhydrine. D'autre part, HEILMAN, BAROLLIER et WATZKE en 1957 (93) ont obtenu, en électrophorèse sur papier, une coloration stable et spécifique des acides aminés et des peptides par la formation d'un complexe du pourpre de RUHEMANN et du cadmium en milieu acide. Nous avons associé ces divers procédés. Nous avons suivi les indications de MATHESON et TATTRIE (139) qui préconisent l'emploi du réactif de YEMM et COCKING (265) en présence d'une concentration finale bien définie de tampon citrate ou acétate. Nous avons remplacé le cyanure de potassium dangereux à manipuler par de l'acide ascorbique, selon le procédé de SCHWERDTFERGER (203); et nous avons utilisé le tampon acétate de sodium à pH 4 pour favoriser l'action du cadmium sur le pourpre de RUHEMANN, le cadmium donnant un précipité avec le citrate (les détails du protocole expérimental sont exposés dans le chapitre "Appendice Technique").

L'examen des résultats obtenus montre que la sensibilité du dosage est comparable à celle des techniques classiques (Tableau V), mais, pour certains peptides, la spécificité est beaucoup plus grande. En effet, la densité optique de la réaction donnée par ces peptides est bien plus faible que celle donnée par les acides aminés. Il devient donc facile de mesurer l'hydrolyse par les dipeptidases, de substrats tels que le Gly-Leu, Gly-Try, Gly-Pro, Gly-Phe, Gly-Ser et Gly-Met; alors que ces dipeptides donnent, avec les techniques proposées antérieurement, un "témoin" (dipeptide non hydrolysé) beaucoup trop élevé (Tableau V).

Peptides	D.O. x 100 5 μ M/ml de dipeptide		D.O. x 100 (1) de 0,25 μ M des 2 acides aminés + 4,75 μ M de dipeptide	
	I	II	I	II
Ala-Gly	18 à 24	6 à 8	19,2	6,8
Leu-Gly	17 à 22	6 à 8	14,6	12,5
Pro-Gly	8 à 10	0 à 0,5	7,3	6,7
Bz.Gly-NH ₂	0 à 0,5	0 à 0,5	14,3	6,2
Z.Gly-Phe	0 à 0,5	0 à 0,75	10	3,6
Z.Gly-Trp	0 à 0,5	0 à 1,0	11,3	4,1
Gly-Leu	200	14 à 16	-	11,9
Gly-Trp	200	11 à 13	-	8,9
Gly-Phe	200	6 à 8	-	9,6
Gly-Pro	200	9 à 11	-	5,3
Gly-DL-Ser	100	9 à 12	-	7,8
Gly-DL-Met	100	6 à 8	-	10,0

TABLEAU N° V

Comparaison des résultats obtenus par diverses techniques

I - Variante de la technique de MATHESON et TATTRIE

II - Procédé proposé

- (1) Densité optique de la solution de dipeptide à 4,75 μ M/ml + 0,25 μ M/ml de chacun des deux acides aminés constitutifs du peptide. Densité optique lue par rapport au témoin peptide à 5 μ M/ml.



A partir d'une gamme de Leu-Gly ($5 \mu\text{M/ml}$ à $2,5 \mu\text{M/ml}$) contenant 0 à $2,5 \mu\text{M/ml}$ de leucine et de glyco-colle libres, nous avons effectué 15 mesures successives pour chacune des dix concentrations de la gamme ; d'abord par notre technique, et ensuite, par celle de MATHESON et TATTRIE (Tableau VI). La reproductibilité est bonne, les écarts types n'étant pas élevés, et la concordance entre les deux techniques est parfaite. Nous avons soumis les deux séries de résultats au test de STUDENT, qui montre que les valeurs de "t" (Tableau VI) sont inférieures à 2,145 pour une probabilité de 5 p. 100 lorsque le nombre de mesures est égal à 15; ce qui implique la concordance des deux méthodes, SCHWARTZ, 1960 (202). L'application à la mesure de l'hydrolyse des dipeptides par les microorganismes ou les extraits cellulaires, ne présente pas de difficultés, car la réaction avec les protéines est faible dans nos conditions expérimentales.

2) Dosage des protéines

La concentration en protéines des solutions enzymatiques a été déterminée par deux méthodes :

- Pour les premières étapes de l'extraction : la teneur en protéines des bactéries broyées et des suspensions cellulaires est déterminée par la technique de YOUNG, 1968 (266) qui est une adaptation de la technique de LOWRY pour le dosage des protéines des Mycobactéries.
- Par la suite, la concentration en protéines des fractions enzymatiques est mesurée directement par la méthode de LOWRY (130).

P %	M		Ecart-type		t
	I	II	I	II	
5	0,23	0,25	0,0303	0,0196	1,51
10	0,52	0,53	0,0316	0,031	0,71
15	0,78	0,78	0,062	0,028	0,44
20	1,05	1,03	0,064	0,041	1,21
25	1,32	1,30	0,062	0,056	1,08
30	1,52	1,51	0,070	0,062	0,43
35	1,79	1,78	0,071	0,090	0,194
40	2,03	2,0	0,075	0,083	0,89
45	2,24	2,19	0,086	0,074	1,33
50	2,49	2,43	0,078	0,103	1,81

TABLEAU N°VI

Etude statistique des résultats obtenus.

P : Pourcentage théorique des acides aminés libres pour une gamme de Leu-Gly exemple 5 % = 0,25 μ M/ml Leu + 0,25 μ M/ml Gly + 4,75 μ M/ml Leu-Gly

M : Moyenne de 15 mesures du taux d'hydrolyse en μ M/ml

σ : Ecart-type ($p < 0,05$)

t : Test de student pour 15 mesures

I : Variante de la technique de A. MATHESON et B. TATTRIE

II: Procédé décrit



Dans les deux techniques, une gamme standard de sérum albumine bovine (Poviet - Amsterdam) est utilisée comme référence. Nous avons mesuré le rapport entre le poids sec des bactéries et la concentration en protéines dosée par la technique de YOUMANS (LOWRY). Le résultat moyen obtenu pour 15 mesures est de 265 mg de protéines pour un gramme de bacilles secs. Ces résultats correspondent à ceux de SAGNIEZ et coll. qui ont pratiqué des mesures analogues avec des souches de Mycobacterium tuberculosis.

Divers auteurs ont indiqué que ces valeurs sont relativement faibles si on les compare à celles mesurées par d'autres techniques (Biuret, quantité d'azote total, 266, 114, 198). SAGNIEZ et coll. (198) expliquent cette différence par la faible teneur en tyrosine des protéines totales des Mycobactéries (2 p. 100 pour Mycobacterium phlei, EDSALL (59) par rapport à la sérum-albumine 4,94 p. 100)

La densité optique des éluats de chromatographie est mesurée à 280 nm.

3) Etude de la cinétique de l'hydrolyse des peptides

a) Par les préparations cellulaires

Lors des essais préliminaires, les peptides sont hydrolysés dans le tampon Tris 5 mM de pH 7, à la température de 37°C, pendant des durées variables selon le substrat utilisé. La concentration en substrat est de 5 mM. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acide acétique 0,1 N (1 vol. pour 2 vol. d'hydrolysate) et par refroidissement à 4°C. Le poids sec des bactéries est inférieur à 10 mg par ml de milieu réactionnel : dans ces conditions, la quantité de peptides

hydrolysés est proportionnelle à la concentration en bactéries (figure 1).

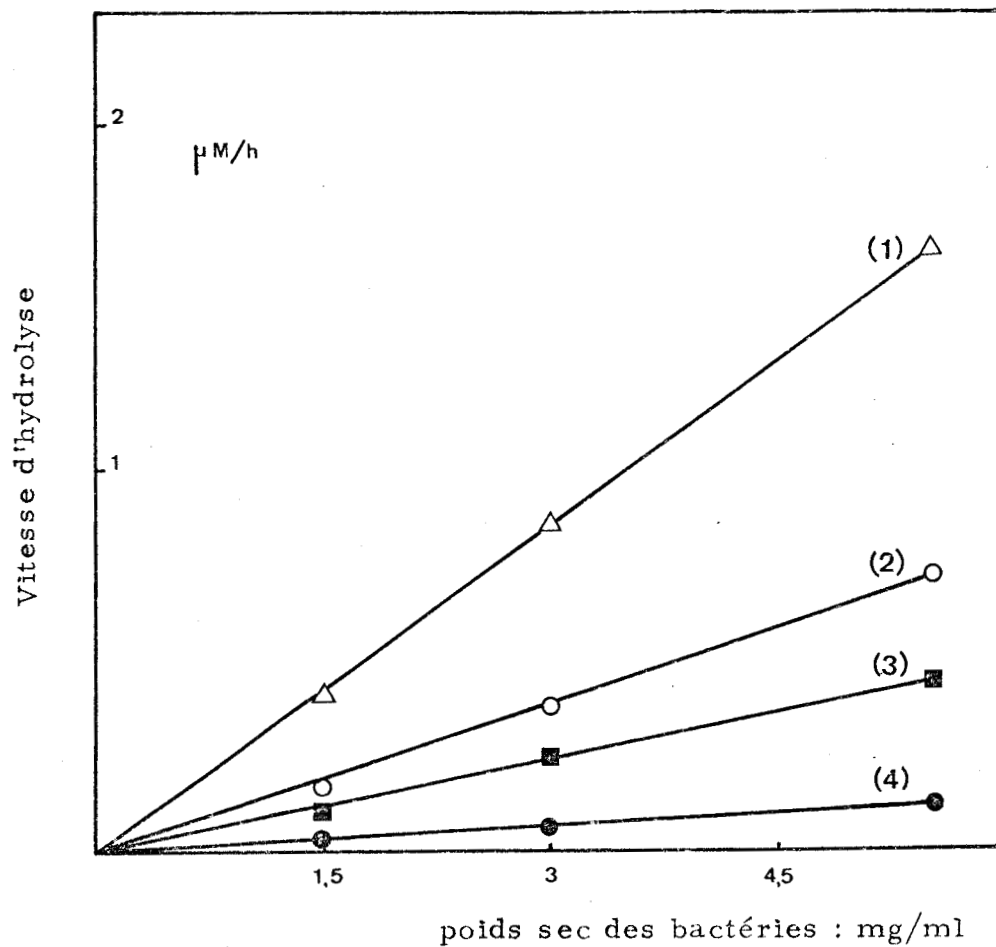
La cinétique d'hydrolyse du dipeptide Ala-Gly par Mycobacterium phlei 689 (figure 2) montre que la vitesse de réaction est d'abord constante pendant un certain temps, puis diminue. Il est donc nécessaire de faire la mesure de l'activité peptidasique pendant un temps limité; dans l'exemple choisi, pendant une période inférieure à 2 heures.

On exprime l'activité des bactéries en μM d'acide aminé libéré par heure et par mg de bactérie en poids sec. Pour les préparations cellulaires, la vitesse de la réaction varie considérablement selon les peptides. La figure 3 montre que, pour la cinétique d'hydrolyse du Pro-Gly et du Leu-Gly, la vitesse de la réaction est constante pendant 8 heures.

b) Cinétique d'hydrolyse des dipeptides par les extraits cellulaires et les préparations enzymatiques purifiées

Les conditions de mesure des activités, donnant une bonne proportionnalité entre le taux d'hydrolyse d'une part, les temps d'hydrolyse et les concentrations en enzymes d'autre part, ont été précisées de façon à rendre possible les mesures aux différents stades de la purification des enzymes.

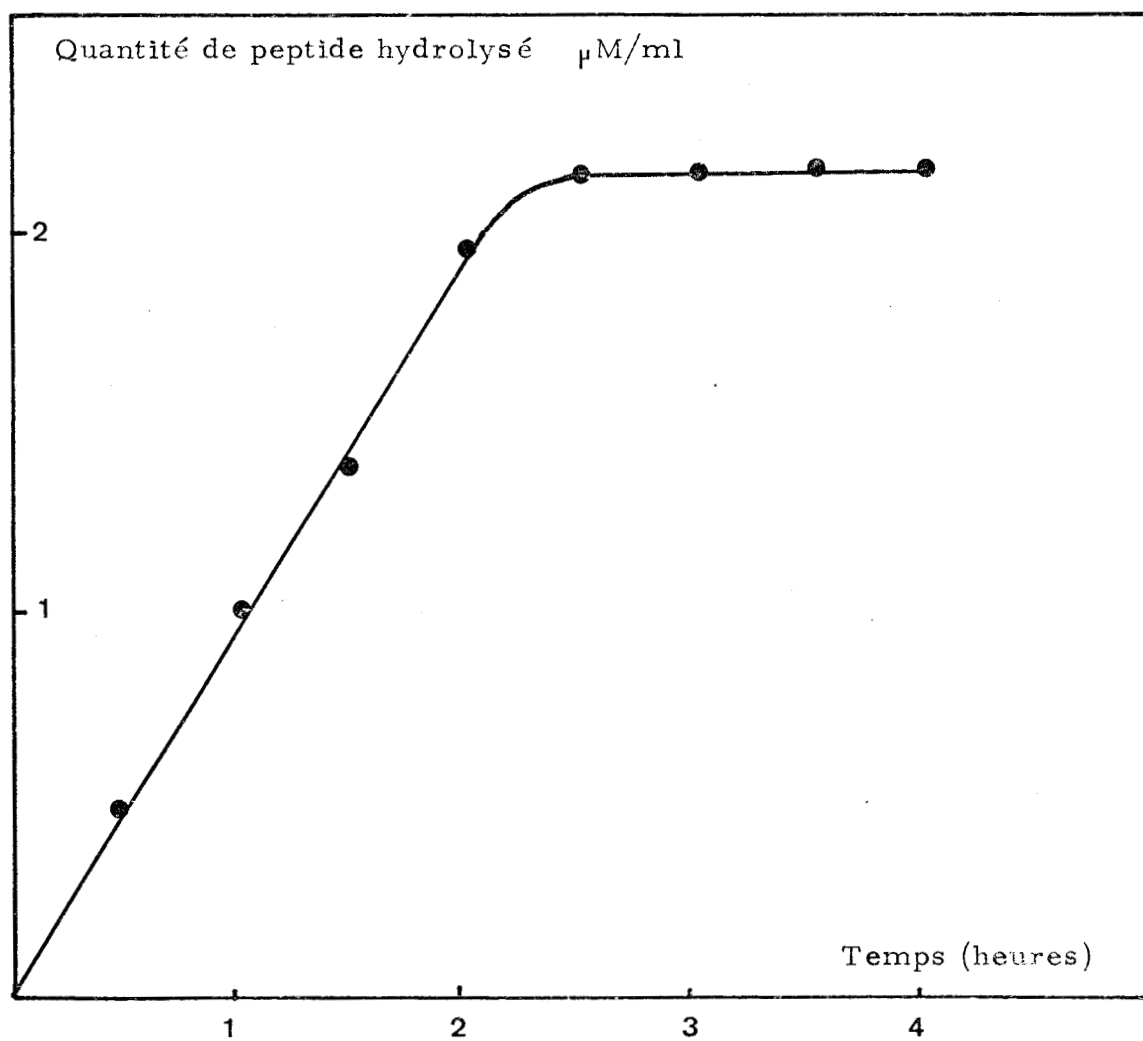
Nous avons effectué plusieurs essais avec divers dipeptides (Ala-Gly, Leu-Gly, Pro-Gly). Nous avons rapporté sur la figure 4 la cinétique d'hydrolyse d'un dipeptide - le Pro-Gly - par une préparation enzymatique partiellement purifiée. En ce qui concerne l'hydrolyse des dipeptides Ala-Gly et Leu-Gly, les résultats sont comparables. Nous



Variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en bactéries

Concentration en substrat : 5 mM (1) Leu-Gly (2) Pro-Gly (3) Z Gly-Phe (4) Bz Gly-NH₂

Figure 1

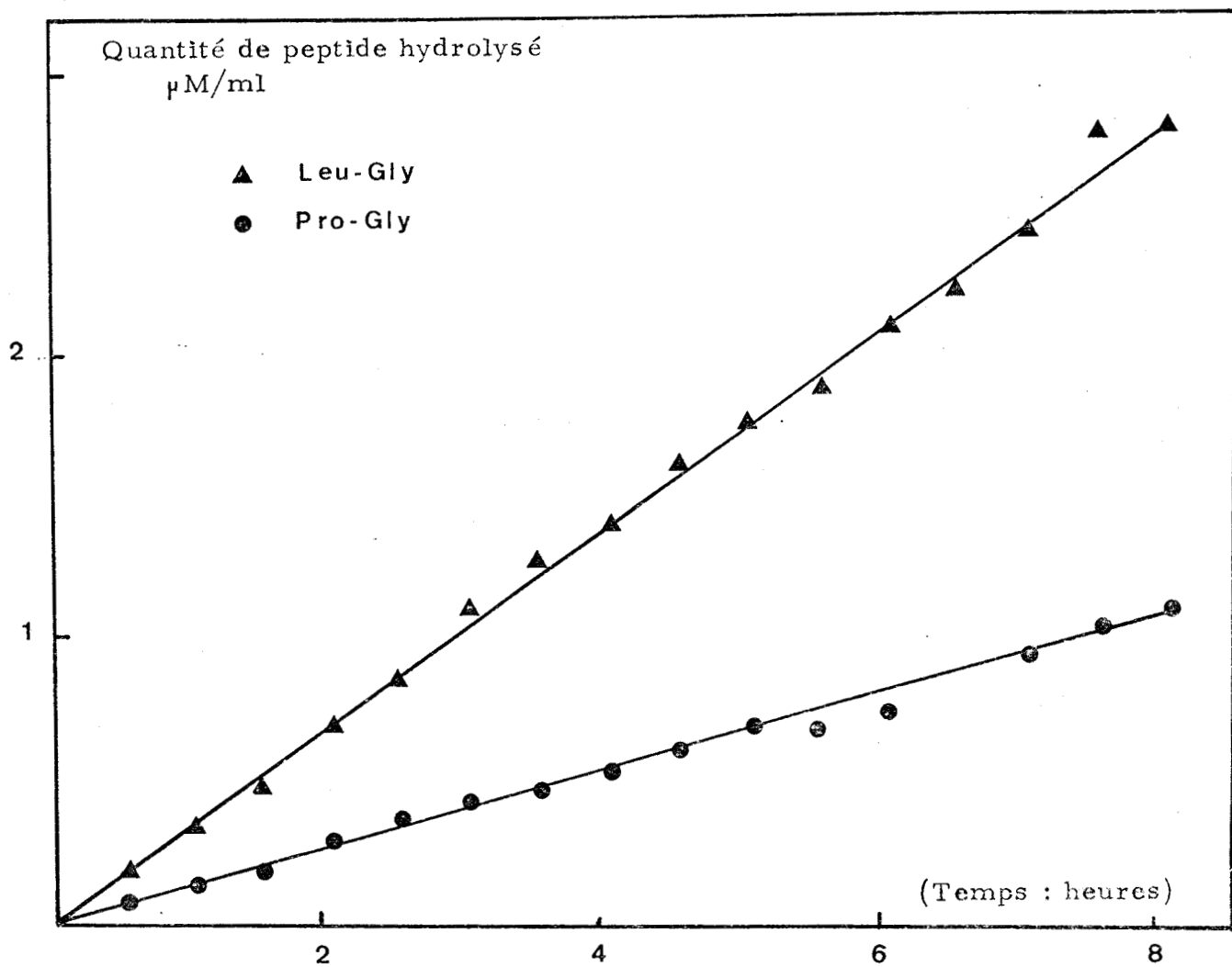


Concentration au temps 0 : Ala-Gly 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ - Myc. phlei 689 7,5 mg/ml (poids sec)

CINETIQUE D'HYDROLYSE DU L-Ala-Gly par MYC. PHLEI 689

Figure 2



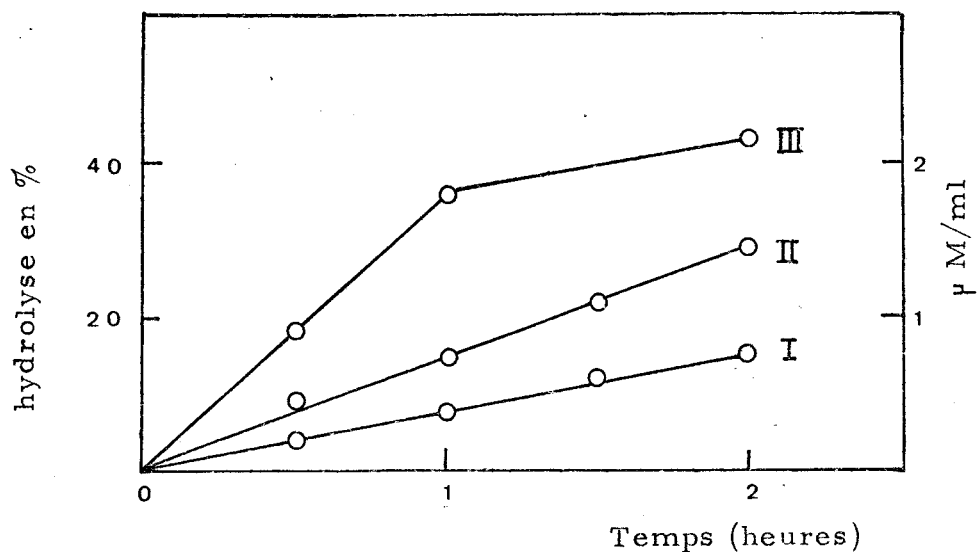


Concentration au Temps 0. Peptide $5 \mu\text{M}/\text{ml}$ - Myc. phlei 689. 5 mg/ml (Poids sec)

CINETIQUE D'HYDROLYSE DU Leu-Gly ET DU Pro-Gly

PAR MYC. PHLEI 689

Figure 3



CINETIQUE D'HYDROLYSE DU PRO-GLY

Concentration en substrat 5 mM. Concentration en protéines de la solution enzymatique : I = 0,02 mg/ml, II = 0,04 mg/ml, III = 0,08 mg/ml. L'hydrolyse est effectuée après une pré-incubation de la solution enzymatique en présence de chlorure de magnésium 10 mM pendant 30 min. à 37°C

Figure 4

pouvons en tirer les conclusions suivantes : quand la concentration en substrat est égale ou supérieure à 5 mM, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en protéines de la solution enzymatique, à condition de limiter la concentration en enzyme, ou la durée de la réaction. La dilution des solutions à doser est donc calculée pour que l'hydrolyse du substrat 5 mM soit inférieure à 20 p. 100 pour un temps de réaction de 30 min. Aux derniers stades de la purification des enzymes, nous mesurons la cinétique d'hydrolyse des dipeptides toutes les minutes, pendant 10 min. Ainsi, la concentration des protéines du mélange réactionnel varie généralement de 0,2 à 1,5 mg par ml, pour les extraits cellulaires et les préparations enzymatiques partiellement purifiées, et de 0,005 mg à 0,080 mg par ml, pour les produits purifiés.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant 1 μ M de substrat par min, à 37°C, dans le tampon Tris 5 mM à pH 8; et les activités spécifiques sont exprimées en μ M de substrat hydrolysé par min et par mg de protéine.

II - OBTENTION DU MATERIEL BACTERIEN

Les études ont été réalisées avec une souche de Mycobacterium phlei 689, Centre de Collection des types microbiens de Lausanne. Nous avons choisi cette souche car son activité peptidasique est importante, et sa culture relativement plus rapide que celle des autres Mycobactéries. De plus, Mycobacterium phlei a fait l'objet de nombreuses études métaboliques

et enzymatiques, ce qui pouvait être intéressant pour la poursuite ultérieure de notre recherche.

1) Culture avec diverses sources d'azote

Les travaux de plusieurs auteurs ont montré que les amino-peptidases et dipeptidases des bactéries sont des enzymes constitutives, LEACH et SNELL, 1960 (116) avec Lactobacillus casei ; MEISSLER et SIMMONDS, 1963 (144) ; KESSEL et LUBIN, 1963 (110) et SUSSMAN et GILVARG, 1969 (223) avec des souches d'Escherichia coli. De nombreux auteurs confirment ces résultats (247,248 , 171).

Les essais de HALPERN et GROSSOWICZ, 1957 (87) concernant l'hydrolyse d'un dipeptide - le Gly-Asn par Mycobacterium bovis et Mycobacterium phlei - indiquent qu'il pourrait en être de même pour les Mycobactéries. Néanmoins, nous avons étudié l'influence des divers composés azotés sur la teneur en peptidases des préparations cellulaires de Mycobacterium phlei 689.

Les bactéries sont cultivées sur milieu de YOUMANS (Annexe Technique page 183), milieu semi-synthétique contenant de l'asparagine (0,02 M) et de la fraction V d'albumine bovine (0,5 p. 100,p/v). Nous avons remplacé ces deux produits par le sulfate d'ammonium (0,02 M) ou le glutamate de soude, ou l'alanine (0,02 M), ou l'asparagine seule (0,02 M) ou la sérum albumine bovine (0,5 p. 100,p/v) ou enfin la bactopeptone Difco (0,5 p. 100,p/v).

Dans une seconde expérience (Tableau VII) nous utilisons, soit des dipeptides (0,02 M), soit les acides aminés constitutifs des

dipeptides, soit enfin le sulfate d'ammonium à la même concentration (0,02 M). La culture est faite en agitation à 30°C, six jours. Nous mesurons ensuite l'activité peptidasique des bactéries. Dans aucune des expériences, nous n'observons d'augmentation ou de diminution significative de l'activité peptidasique à l'égard des dipeptides (Tableau VII). Enfin, les cellules cultivées sur milieu minéral contenant du sulfate d'ammonium, sont recueillies en phase logarithmique de croissance, et mises en incubation avec les dipeptides pendant 4 heures, à 30°C, en agitation, avant la détermination de l'activité peptidasique. Les résultats obtenus (Tableau VIII) indiquent qu'il n'y a pas de modification importante de cette activité.

Nous pouvons donc conclure que la présence de peptone, d'acides aminés ou de peptides n'est pas indispensable à la formation des enzymes. Toutefois, afin d'éviter toute variation, nos conditions expérimentales sont identiques pour toutes les expériences préliminaires : la souche est mise en culture sur milieu de YOUNG contenant de l'asparagine et de la fraction V d'albumine bovine, en agitation à 30°C, pendant une semaine.

2) Cultures en fermenteur

Les méthodes d'obtention des Mycobactéries en milieu liquide sont d'un rendement médiocre : 1 à 2 g de bactéries (poids sec) par litre de culture. Nous avons donc préparé des cultures en fermenteur pour lesquelles les rendements sont cinq fois supérieurs. La méthode utilisée est celle de ROOS, 1970 (191). Ce procédé est décrit dans l'annexe technique page 189.

Source d'N 0,02 M	A	P	Source d'N 0,02 M	A	P
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,56	1,6	Gly-Leu	0,68	1,5
Met	0,34	1,2	Gly-Pro	0,67	1,4
Pro	0,68	1,65	Pro-Gly	0,67	1,7
Ser	0,71	1,70	Gly-Trp	0,70	1,5
Gly	0,54	1,70	Leu-Gly	0,68	1,6
Leu	0,57	1,45	Gly-Ser	0,72	1,6
Trp	0,70	1,9	Gly-Met	0,67	1,4

TABLEAU N°VII

Activité peptidasique de Mycobacterium phlei 689 en culture agitée avec
diverses sources d'azote.

A : Activité à l'égard du Leu-Gly $\mu\text{M}/\text{h}/\text{ml}$.

P : Quantité de germes en mg/ml (poids sec).



Préparations : Substrats :	Activité $\mu\text{M}/\text{h}/\text{ml}$		
	A	B	C
Pro-Gly	1,50	1,37	1,50
Gly-Trp	0,04	0,04	0,04
Z.Gly-Phe	0,70	0,62	0,78
Bz.Gly-NH ₂	0,42	0,55	0,90

TABLEAU N°VIII

Activité peptidasique de Mycobacterium phlei 689 après incubation dans
une solution de dipeptide.

- A : Suspension bactérienne non traitée ; poids sec = 10,6 mg/ml
- B : Suspension bactérienne lavée par une solution de Pro-Gly (50 mM) puis par le tampon Tris 10 mM de pH 7,5 ; poids sec des bactéries = 11,8 mg/ml
- C : Bactéries mises en incubation 4 h, dans une solution de Pro-Gly 50 mM en tampon Tris 10 mM de pH 7,5, puis lavées par le même tampon avant le dosage de l'activité peptidasique ; poids sec des bactéries = 9,2 mg/ml.



Nous limitons la culture à cinq jours afin d'obtenir des bactéries en phase logarithmique de croissance. Les cellules sont recueillies par centrifugation et lavées deux fois en tampon Tris 10 mM pH 7,5 contenant 10 mM de $MgCl_2$, afin d'éliminer les produits du métabolisme cellulaire qui pourraient modifier l'activité peptidasique. La quantité des bactéries obtenues est de 70 à 100 g de bactéries (poids humide) pour un fermenteur de 15 litres. Les analyses ultérieures nous ont montré que ce procédé de culture améliore les résultats obtenus lors de la rupture des cellules (Tableau IX), sans doute parce que les cultures bactériennes forment moins d'agrégats, et parce que la taille des bacilles est plus homogène.

III - EXTRACTION DU MATERIEL ENZYMATIQUE. DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES PEPTIDASES

1) Action des Ultra-sons

Quand on soumet les cellules à l'action des ultra-sons dans le Raythéon 10 Kc, muni d'un dispositif de refroidissement à 4°C, il y a augmentation considérable de l'activité peptidasique pour le Pro-Gly et le Gly-Trp. Au contraire, l'activité des préparations cellulaires à l'égard du Bz.Gly-NH₂ et du ZGly-Phe diminue et même s'annule (figure 5).

Le traitement des cellules par le Brij 58 (2 p. 100, p/v, en agitation à froid) ou par le toluène (1 p. 100, v/v, 20 min à 20°C) favorise la désintégration sonique. Il suffit d'un traitement de 20 min

Mode de culture	Quantité de protéines dans la fraction S105 (Lowry)	hydrolyse du L.Leu-Gly	
		Activité spécifique u = $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$	Activité totale
Culture en fiole à toxine dans le milieu de Youmans 7 jours en agitation.	146 mg	27,8 u	4058 u
Culture en fermenteur en milieu de Sauton 5 jours.	354 mg	53,6 u	18974 u

TABLEAU N° IX

Comparaison entre les procédés de culture.

Mesures correspondant à 10 g de bactéries (poids humide).

Les bactéries sont rompues par broyage avec la zéolithe après traitement
par le désoxycholate de soude.



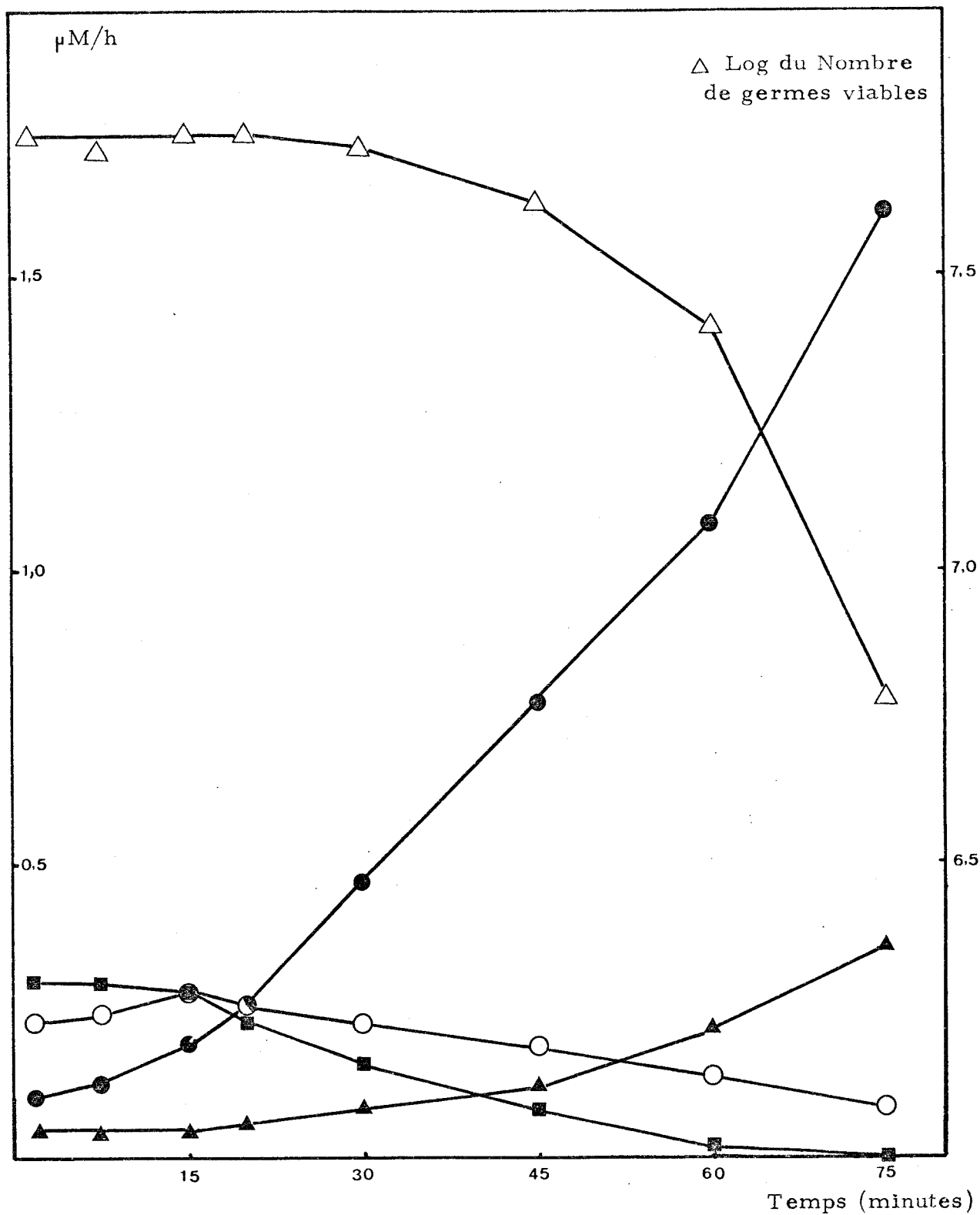
pour libérer la majeure partie de l'activité enzymatique hydrolysant le Gly-Trp et le Pro-Gly. Par contre, l'activité des préparations à l'égard du Bz.Gly-NH₂ et du Z.Gly-Phe, s'annule après 20 min de traitement aux ultra-sons (figure 6). Ainsi, la rupture des bactéries entraîne une libération des peptidases qui hydrolysent les dipeptides du type Ala-Gly, Leu-Gly, Pro-Gly, Gly-Trp.

Par contre, les enzymes qui hydrolysent le Bz.Gly-NH₂, le Z.Gly-Phe, le Z.Gly-Trp, sont détruites ou inactivées lorsqu'elles sont soumises à ce traitement.

La mesure du nombre de cellules viables, en fonction du temps de traitement aux ultra-sons (figure 5), montre qu'il y a une corrélation entre l'activité dipeptidasique des préparations cellulaires et le nombre de cellules rompues. Mais les rendements obtenus par ce procédé de rupture sont faibles.

2) Rupture des bactéries par broyage avec la zéolithe

Nous avons employé par la suite un procédé de broyage des bactéries avec la zéolithe en poudre (Annexe technique p. 183). Plusieurs auteurs, ZIPPER et PERSON, 1966 (267) et WISTREICH et coll., 1968 (259) proposaient l'emploi des aluminosilicates cristallins de synthèse, les zéolithes, pour la rupture des levures et des bactéries. Plus récemment, cette méthode a été utilisée au laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Institut Pasteur de Lille, pour l'étude de la structure antigénique de Mycobacterium phlei, par JOSEPH et coll., 1970 (104) ; les résultats obtenus ont été analysés en microscopie électronique dans ce laboratoire.

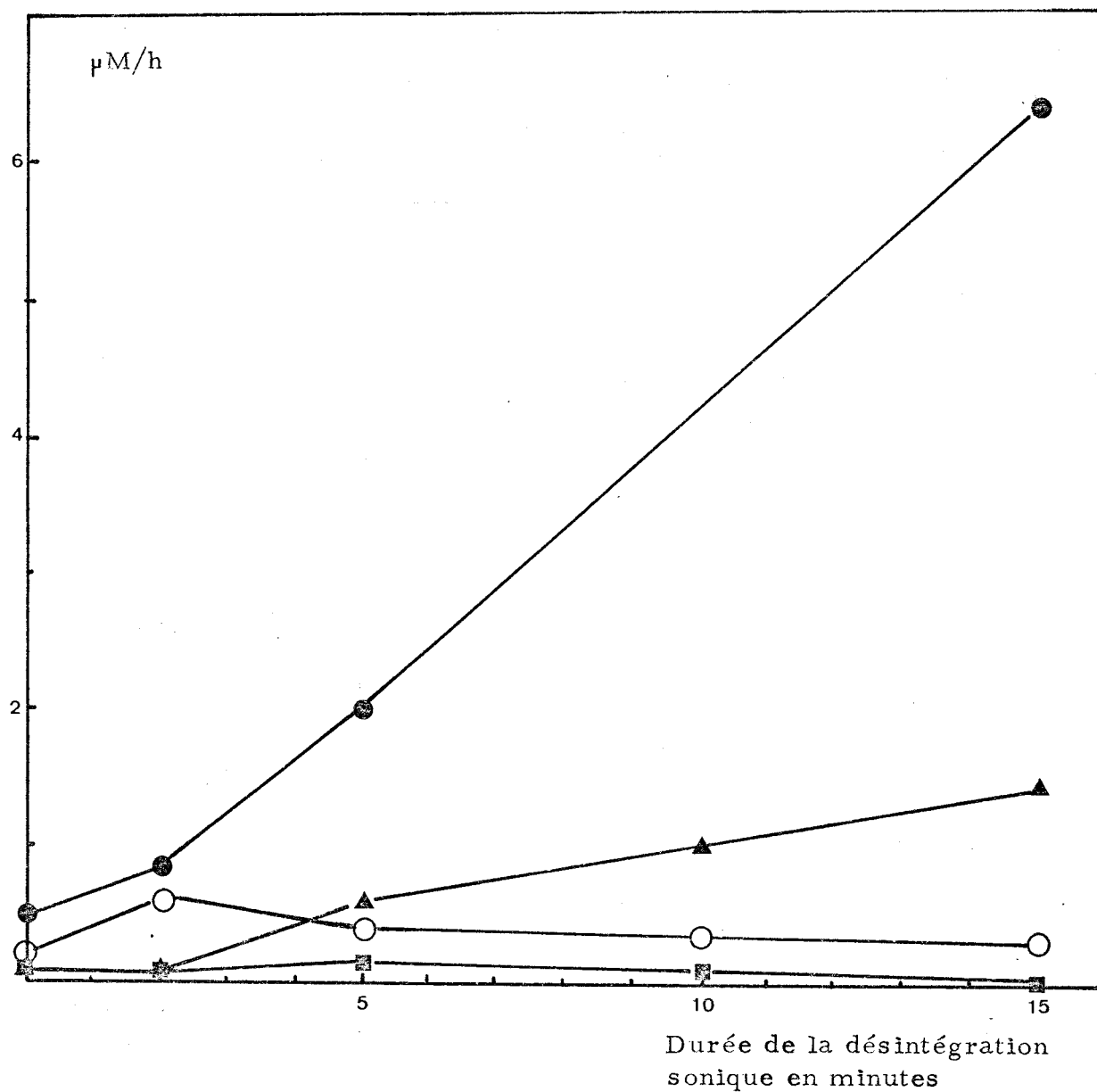


Peptides hydrolysés : ● Pro-Gly, ▲ Gly-Trp, ○ Z Gly-Phe,
■ Bz Gly-NH₂

Activité de la suspension bactérienne en fonction
de la durée du traitement aux ultra-sons

Figure 5





Peptides hydrolysés : ● Pro-Gly, ▲ Gly-Trp, ○ Z Gly-Phe,
■ Bz Gly-NH₂

Activité peptidasique de Myc. phlei 689 traitée par le toluène en fonction
de la durée de la désintégration sonique

Figure 6



Après un broyage de 10 min avec la zéolithe, la masse de cellules rompues atteint 60 p. 100 du matériel de départ. Le broyage par la zéolithe semble entailler partiellement les parois plutôt que les broyer ou les fragmenter ; le contenu cellulaire s'échappe, et les bactéries sont réduites à leur enveloppe vide. Quand on mesure la quantité de protéines produites par ce procédé dans la fraction soluble, on s'aperçoit que les rendements sont plus élevés que ceux obtenus par d'autres méthodes. Par la suite, nous avons augmenté considérablement ces rendements en traitant les bacilles avant le broyage, par le désoxycholate de soude à 1 p. 100 (p/v) de pH 8,5, en agitation magnétique 20 h à 4°C. Cette préparation a pour effet de disperser les bacilles et de faciliter ainsi l'action de la zéolithe. Le broyat est débarrassé de la zéolithe par centrifugation à 4°C à 600 xg pendant 20 min.

Bien que les dipeptidases soient dénaturées par la chaleur, l'élévation de température qui accompagne la rupture des cellules, ne diminue pas leur activité dans nos conditions expérimentales. Au contraire, quand on compare les résultats obtenus (Tableau X) avec ceux des divers procédés d'extraction, on observe une augmentation notable de l'activité dipeptidasique dans la fraction soluble.

3) Activité peptidasique de l'extrait cellulaire brut et distribution subcellulaire des peptidases

Les broyats cellulaires sont soumis à deux centrifugations, la première à 17.600 x g pendant 20 min, précipite les bactéries intactes et les parois bactériennes ; la seconde, à 105.000 x g pendant 2 heures,

Procédé de rupture des bactéries	Quantité de protéines dans la fraction soluble	Hydrolyse du L. Leu-Gly	
		Activité spécifique $\mu\text{M/h/mg}$	Activité totale $u = \mu\text{M/h}$
Brij. 58_2p. 100 (p/v) agitation 20 h à 4°C puis traitement aux ultra-sons	20 mg	6,3	126,2 u
Broyage avec la zéolithe sans traitement préalable	21,7 mg	8,8	190,9 u
Traitement par le désoxy- cholate de soude 1p. 100 (p/v) agitation 20 h à 4°C puis broyage avec la zéolithe	146 mg	27,8	4058 u

TABLEAU N° X

Comparaison entre divers procédés de rupture des bactéries

Traitement de 10 g de bactéries (poids humide) après
culture en fiole à toxine 7 jours en agitation
à 37°C.



sépare les produits solubles (Fraction S.105) et les éléments particuliers (Fraction Fp), c'est-à-dire, les ribosomes, les fragments de membranes et les mésosomes.

Nous avons résumé dans le tableau XI les propriétés des cellules non traitées, du broyat cellulaire et des fractions particulières et solubles. Certaines activités peptidasiques sont très faibles. Nous avons donc exprimé l'activité en nM d'acide aminé libéré par h et par ml, et l'activité spécifique en nM de substrat hydrolysé par h et par mg de protéines.

Si nous mesurons l'activité globale de chaque préparation par rapport à l'activité de la cellule bactérienne non traitée, nous pouvons faire les observations suivantes (Tableau XI).

Les propriétés carboxypeptidasiques des broyats cellulaires sont plus faibles que celles des cellules non traitées ; la fraction cytoplasmique soluble est inactive. Toute l'activité de ce type est située dans la fraction particulière ; l'activité spécifique de cette fraction envers le Z.Gly-Phe et le Z.Gly-Trp est relativement importante par rapport à celle du broyat cellulaire, mais cependant plus faible que celle des cellules intactes. Il en est de même pour l'enzyme responsable de l'hydrolyse du Bz.Gly-NH₂.

Donc la rupture des bactéries entraîne la modification de certaines structures cellulaires responsables de l'activité carboxypeptidasique et de l'activité hydrolytique envers le Bz Gly-NH₂. La majeure partie de ces activités est située dans les fractions particulières. Ces observations convergent avec les résultats obtenus par des travaux préliminaires (figure 5) dans lesquels on utilisait l'action des ultrasons pour rompre les cellules.

Préparations :	C		B		Fp		S.105	
Activité :	A	As	A	As	A	As	A	As
Substrats	%	u	%	u	%	u	%	u
Z - Gly - Phe	100	37	21,3	8	11,8	20	0	
Z - Gly - Trp	100	34	11,7	4	9,8	13	0	
Bz - Gly - NH ₂	100	60	14,9	9	13,0	43	0	
Leu - Gly - Gly	100	1470	113,5	1670	14,9	520	92,2	4910
Leu - Gly	100	780	830,1	13600	32,0	2840	980,4	66800
Ala - Gly	100	1470	1677,6	12200	72,3	2380	2365,5	52200

TABLEAU N° XI

Activité peptidasique des préparations cellulaires de Mycobacterium phlei 689

A : Pourcentage d'activité totale (nM hydrolysés par h) par rapport à la préparation cellulaire non traitée.

As : Activité peptidasique spécifique 1u = 1 nM/h/mg.

C : Préparation cellulaire non traitée.

B : Bactéries broyées.

Fp : Fractions particulières (culots des centrifugations 17.760 Xg et 105.000 X g)

S.105 : Fraction cytoplasmique soluble (surnageant de la centrifugation à 105.000 X g)



Par contre, la rupture des bactéries entraîne une libération et une augmentation considérable de l'activité dipeptidasique, car celle-ci est multipliée par 8,3 pour la Leu-Gly et par 16,7 pour la Ala-Gly. L'hydrolyse du L.Leu-Gly-Gly n'augmente pas dans les mêmes proportions; mais l'activité spécifique des fractions particulières est faible en comparaison de celle de la fraction cytoplasmique soluble (Tableau XI). L'écart entre les deux taux de dégradation des dipeptides est particulièrement important. Donc l'activité de type dipeptidasique augmente considérablement quand les cellules sont rompues ; cette activité est située en majeure partie dans la fraction cytoplasmique soluble.

Enfin, après rupture des bactéries, l'élimination des éléments particuliers produit une activation. L'activité spécifique est multipliée par 4 pour le dipeptide Ala-Gly, par 5,5 pour le Leu-Gly. Cet effet activateur est moins net pour le Leu-Gly-Gly.

Les tableaux XII, XIII et XIV rassemblent les résultats obtenus avec : les bactéries non traitées, la fraction cytoplasmique soluble (S 105) et une fraction purifiée dont-il sera question ultérieurement.

Dans la fraction S 105 l'activité endopeptidasique est nulle, puisque les substrats de la trypsine et de la chymotrypsine ne sont pas hydrolysés (Bz.Arg O Et, Tos.ArgO Me, Bz.Tyr O Et, Ac.Tyr O Et). Il en est de même pour les substrats des carboxypeptidases (Z.Gly-Phe, Bz.Gly-Lys, Bz.Gly-Gly, Z.Gly-Trp). L'étude chromatographique de l'hydrolyse des tripeptides montre la libération prioritaire des acides aminés ayant une fonction alpha-aminée libre. Les dipeptides sont dégradés très rapidement. L'activité à l'égard de la Leucinamide et de la Leucine- β -naphtylamide est relativement faible.

Préparations : Substrats	A	B	C
Bz.Arg O Et	0	0	0
Tos.Arg O Me	0	0	0
Ac.Tyr O Me	0	0	0
Bz.Tyr O Et	0	0	0
Z.Gly-Phe	0,01	0	0
Z.Gly-Trp	0,09	0	0
Bz.Gly-Gly	0	0	0
Bz.Gly-Lys	0	0	0
Bz.Gly-NH ₂	0,01	0	0
Leu - Gly-Gly	0,50	2,50	3,40
Ala - Gly-Gly	0,006	1,20	1,40
Phe - Gly-Gly	0,007	0,10	0,10
Pro - Gly-Gly	<0,001	0,006	0,008
Leu - Gly-Tyr	0,60	2,40	2,40
Met - Ala-Ser	0,70	4,00	4,90
Gly - Leu-Tyr	0,15	2,10	1,80
Gly - Gly-Gly	<0,001	0,030	0,020
Leu - NH ₂	<0,001	8,5	1,75
Leu-β.Naphtylamide	<0,001	3,0	2,70

TABLEAU N°XII

Activité peptidasique spécifique de différentes fractions.

Activité exprimée en $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$.

A : Bactéries non traitées.

B : Extrait cellulaire soluble.

C : Pic de la filtration sur Sephadex G100.



Préparations : Substrats	A	B	C
Ala-Gly	0,21	62,5	320,0
Leu-Gly	0,76	57,5	255,0
Pro-Gly	0,05	33,7	70,5
Val-Gly	0,03	28,0	38,0
Tyr-Gly	0,05	24,0	29,0
Trp-Ala	0,01	15,0	17,0
Gly-Ser	0,27	38,7	422,0
Gly-Leu	0,98	62,5	235,0
Gly-Trp	0,13	31,0	105,0
Gly-Met	0,06	60,0	250,0
Gly-Val	0,14	36,0	135,0
Gly-Phe	0,19	43,0	321,5
Gly-Tyr	0,11	30,0	170,0
Gly-Ileu	0,15	24,0	25,0
Gly-Glu	0,002	14,5	17,0
Gly-Gly	< 0,001	2,0	2,5
Gly-Pro	0	0	0
D.Leu-Gly	< 0,001	2,4	2,4
D.Leu-Tyr	0,015	2,8	2,7
Gly-D.Leu	< 0,001	0,06	0,07
Gly-D.Ala	< 0,001	0,05	0,05
Gly-D.Asp	< 0,001	0,05	0,06

TABLEAU N° XIII

Activité peptidasique spécifique des différentes fractions.

Activité exprimée en $\mu\text{M/h/mg}$.

A : Bactéries non traitées

B : Extrait cellulaire soluble

C : Pic de la filtration sur Sephadex G.100



	A	B	C
Leu- _↑ Gly-Gly	++	++	+++
Gly- _↑ Leu- _↑ Tyr	+	++	+++
Gly- _↑ Gly-Gly	(+)	(+)	+
Asp- _↑ Lys-Phe	(+)	+	+
Pro- _↑ Gly-Gly	(+)	(+)	(+)
Leu-Ala	++	+++	+++
Ala-Leu	++	+++	+++
Phe-Lys	++	+++	+++

TABLEAU N° XIV



Appréciation de l'hydrolyse en chromatographie.

+++ : hydrolyse complète de l'acide aminé N terminal en 4 h. 37°C

++ : hydrolyse complète de l'acide aminé N terminal en 24 h.

+ : hydrolyse complète en 48 h.

(+) : hydrolyse incomplète en 48 h.

A : Bactéries non traitées.

B : Extrait cellulaire soluble.

C : Pic de la filtration sur Sephadex G.100.

Il faut remarquer qu'il n'y a pas d'hydrolyse du dipeptide Gly-Pro; que l'hydrolyse du Gly-Gly est relativement faible; qu'il existe une activité inhabituelle envers les dipeptides ayant un acide aminé de configuration D en position N-terminale (D.Leu-Gly et D.Leu-Tyr); et que les dipeptides dont l'acide aminé C-terminal est de configuration D sont également hydrolysés lentement (Gly-D.Leu, Gly-D.Ala, Gly-D.Asp). De toutes ces observations, nous pouvons penser que :

- La fraction soluble est dépourvue d'activité endopeptidasique (ces résultats seront confirmés par d'autres expériences), et dépourvue d'activité carboxypeptidasique.

- L'activité de type prolidasique (Imidodipeptidase : Ec 3.4.3.7.) hydrolysant les dipeptides de type X-Pro, est également absente ; de même celle d'une aminopeptidase comparable à celle de l'aminopeptidase P d'Escherichia coli (262).

- L'ensemble des résultats de la dégradation des dipeptides et tripeptides indique une importante activité aminopeptidasique (Ec. 3.4.1.) et dipeptidasique (Ec.3.4.3.).

4) Démonstration de l'absence de l'activité endopeptidasique

Plusieurs tests utilisés en bactériologie nous ont montré que Mycobacterium phlei 689, en culture, n'hydrolyse pas l'albumine de blanc d'oeuf dénaturé par la chaleur, et ne dégrade ni l'hémoglobine, méthode de LECLERCQ (117), ni la caséine, méthode de GORDON (78), ni la gélatine, méthode de FRAZIER (70, 131).

Il en est de même pour la sérum albumine bovine non dénaturée. Avant et après un contact prolongé avec les extraits bactériens (le broyat cellulaire ou le surnageant S 105), l'analyse chromatographique (Sephadex G.100) des peptides de la fraction V d'albumine bovine, montre qu'il n'y a aucune formation de peptides, mais seulement une légère modification de la vitesse d'élution des composés initiaux. Il n'y a donc pas digestion endopeptidasique.

Ces observations ont été complétées par l'étude de la dégradation de deux peptides obtenus par action du bromure de cyanogène sur la Myoglobine de boeuf (HAN et coll., 82). Il s'agit du peptide N-terminal (55 résidus d'acides aminés) et du peptide C-terminal (22 résidus d'acides aminés). Ces deux peptides sont soumis à l'action de la fraction S.105 de Mycobacterium phlei à pH 7,0 et à 37°C pendant 4, 6, 8 et 20 heures. La concentration en peptide est de 20 mg/ml; la concentration de l'extrait bactérien, de 2 mg/ml.

Les "finger-print" des hydrolysats obtenus par électrochromatographie sur papier (figures 7 et 8) montrent qu'il n'y a pas formation de peptides. Par contre, de nombreux acides aminés libres sont apparus (figures 7 et 8).

L'activité de la fraction cytoplasmique soluble S.105 est donc bien du type exopeptidasique et non endopeptidasique.

Il faut également préciser la nature de l'enzyme de Mycobacterium phlei 689 hydrolysant la benzoylglycinamide. L'hydrolyse de ce substrat libère de l'ammoniaque, du glycolle et de l'acide benzoïque. Nous avons vérifié chez Mycobacterium phlei 689 la présence de deux enzymes : l'une hydrolysant le benzoylglycolle (GORDON, 1966, 77), l'autre (une amidase, Ec. 3.5.1.4.) (8) la glycinamide (BONICKE, 25).

FIGURES 7 et 8

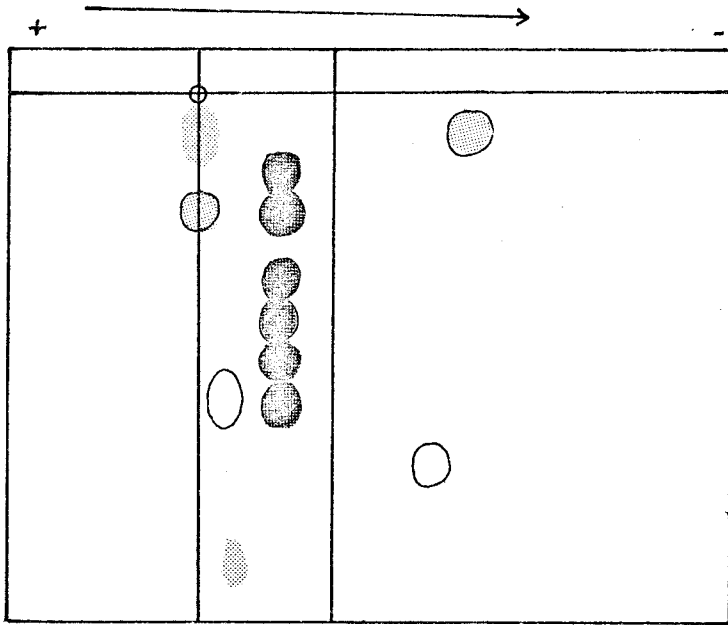
"Finger-prints". Electro-chromatographie sur papier des peptides de la Myoglobine de boeuf (obtenus par coupure au bromure de cyanogène) soumis à l'hydrolyse par la fraction S. 105 de Mycobacterium phlei

Figure 7 : I peptide C terminal (dépôt 200 μ l). Témoin
II hydrolysats après une incubation de 6 h à 37°C pH 7 (dépôt 200 μ l)
III hydrolysats après une incubation de 20 h à 37°C pH 7 (dépôt 200 μ l)

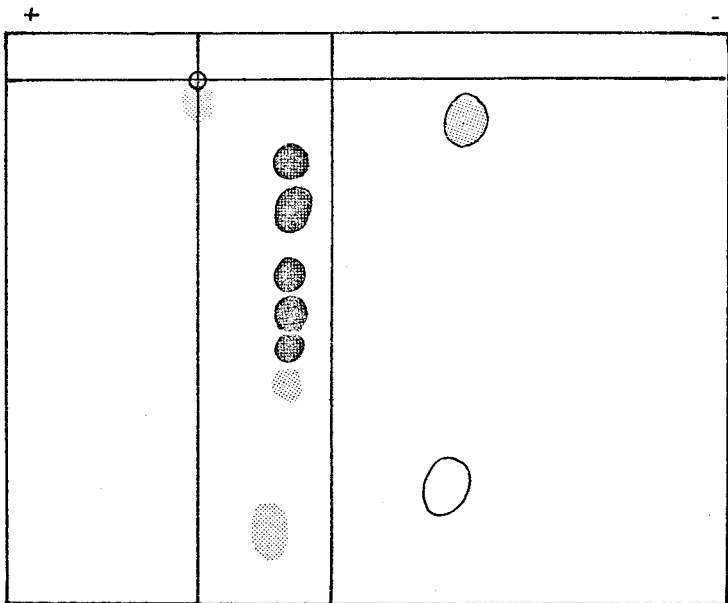
Figure 8 : I peptide N terminal (dépôt 200 μ l). Témoin
II hydrolysats après une incubation de 6 h à 37°C pH 7 (dépôt 200 μ l)
III hydrolysats après une incubation de 20 h à 37°C pH 7 (dépôt 200 μ l)

"Finger-Prints" de
l'hydrolysate du peptide
C terminal de Myoglobine
de boeuf

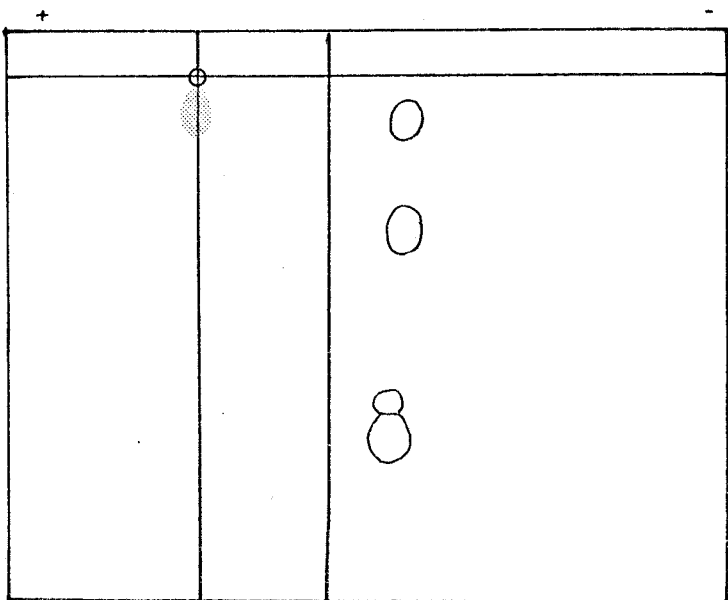
chromatographie
↓



III



II



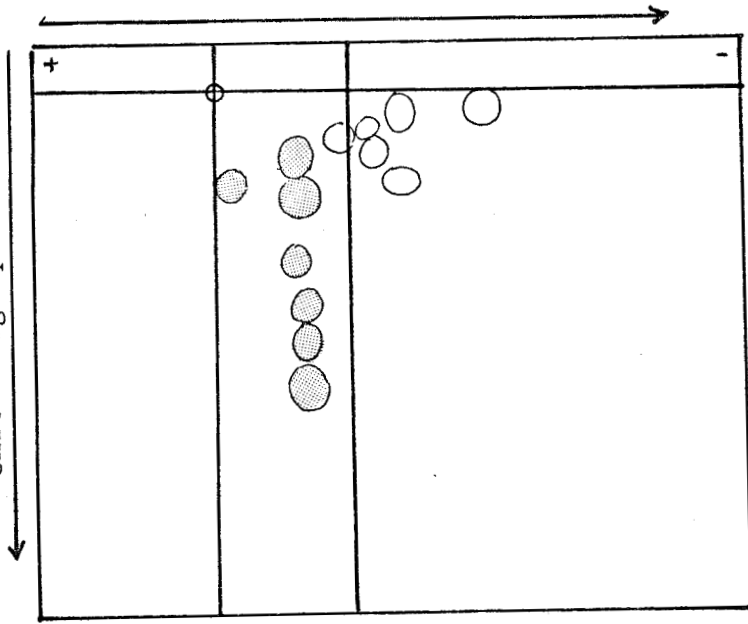
I



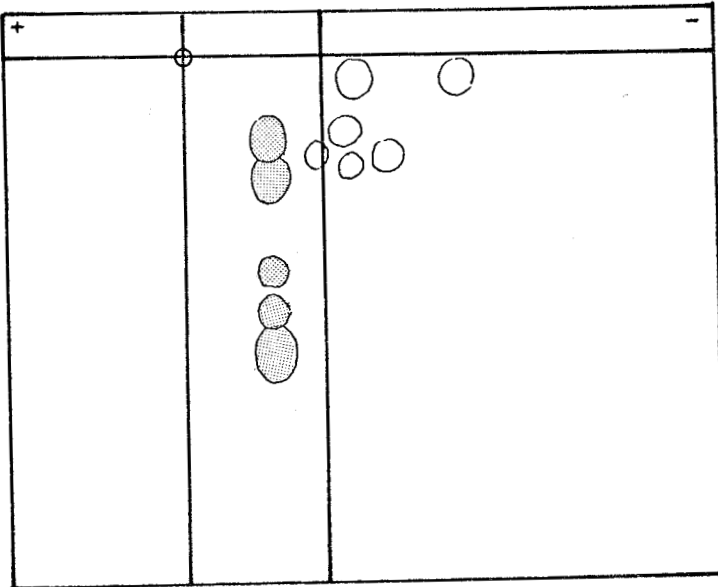
"Finger-prints" de
l'Hydrolysate du Peptide N
terminal de Myoglobine de
boeuf

Electrophorèse

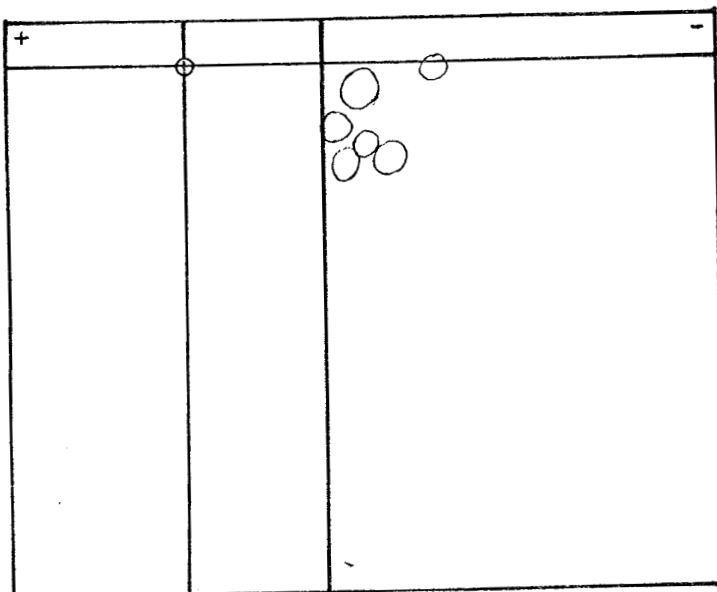
chromatographie



III



II



I



La même enzyme hydrolyse-t-elle le benzoylglycocolle et la benzoyl-glycinamide ? Ce dernier substrat n'est pas utilisé habituellement par les auteurs qui ont purifié et caractérisé des acylases bactériennes. Quelques unes des α -amino-acylases sont très spécifiques (LEVY et GOLDMAN, 121), mais d'autres (par exemple la benzoylaminoacid-amido-hydrolase de Pseudomonas purifiée par KAMEDA et coll., 107), ont une spécificité étroite pour le groupement acyl, mais étendue pour le groupement aminé.

L'enzyme responsable de la dégradation de la benzoyl-glycinamide pourrait être de ce type. La libération de l'acide benzoïque et de la glycinamide serait immédiatement suivie d'une dégradation de ce dernier composé. Nous n'avons pu dissocier les deux activités; mais l'hydrolyse du benzoyl-glycocolle étant très lente (25 nM/20 h) par rapport à celle de la glycinamide (450 nM/20 h) celle-ci doit être hydrolysée avant de s'accumuler en quantité suffisante pour être décelée.

5) Choix des substrats

Pour la purification des dipeptidases et pour la séparation des aminopeptidases, plusieurs dipeptides ont été choisis, ce sont : l'Ala-Gly, le Leu-Gly, le Pro-Gly et le Gly-Trp. Nous avons sélectionné tout d'abord le Pro-Gly et le Gly-Trp, car lors de l'étude des activités peptidasiques dans un but taxinomique, nous avons constaté selon les espèces mycobactériennes, une activité hydrolytique préférentielle pour l'un ou l'autre des deux dipeptides. Nous pouvions donc supposer que ces deux produits étaient hydrolysés par deux enzymes distinctes. Mais, comme nous le verrons au Chapitre III, envers ces deux dipeptides,

ainsi qu'à l'égard de l'Ala-Gly et du Leu-Gly, l'activité majeure est le fait d'une seule enzyme. Par la suite, seuls l'Ala-Gly et le Leu-Gly ont été retenus pour l'étude de la purification. Ce dernier substrat est utilisé particulièrement en comparaison avec l'activité hydrolytique pour le Leu-Gly-Gly, qui est dégradé préférentiellement par les aminopeptidases.

CHAPITRE III

IDENTIFICATION DES EXOPEPTIDASES DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE
SOLUBLE

Nous avons associé un procédé de séparation électrophorétique ayant un haut pouvoir de résolution, l'électrophorèse en gel mixte d'acrylamide-agarose, avec la caractérisation directe de l'activité peptidasique dans le gel. Cette méthode permet une analyse parallèle du contenu protéique des préparations et de l'équipement enzymatique.

Par la suite, nous utilisons le même procédé pour isoler des fractions contenant une seule bande de protéines actives, et nous étudions la spécificité peptidasique de ces différentes fractions.

I - METHODE UTILISEE

1) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose

Les électrophorèses sont faites en gel mixte de polyacrylamide-agarose à 7 p. 100 d'acrylamide préparé selon le procédé d'URIEL (239) (Annexe technique page 183).

Pour le lavage des gels et l'électrophorèse, nous avons préféré au tampon Tris-glycocolle d'URIEL, un tampon ne contenant pas d'acide aminé, car celui-ci pouvait modifier éventuellement les réactions peptidasiques ultérieures. Nous utilisons le tampon Tris-borate de pH 9 contenant 1 mM de $MgCl_2$ (Annexe technique page 183).

Bien que les opérations soient réalisées en chambre froide à 4°C, une légère élévation de température se produit pendant l'électrophorèse. L'addition de Magnésium dans le tampon protège certaines peptidases thermosensibles de l'inactivation due à ce dégagement de chaleur. Enfin, une dialyse prolongée des gels d'électrophorèse dans

le tampon est nécessaire, car nous avons observé une inactivation de certaines enzymes par le persulfate d'ammonium utilisé pour induire la polymérisation du gel de polyacrylamide (Annexe technique page 183). L'électrophorèse est pratiquée verticalement. La migration des protéines se produit de la cathode vers l'anode, et le bleu de bromophénol est utilisé comme colorant traceur.

La réaction de caractérisation des peptidases est réalisée immédiatement après la migration électrophorétique des constituants. Parallèlement, nous colorons les protéines par le bleu de coomassie (Annexe technique page 183).

2) Caractérisation des peptidases dans les gels d'acrylamide

LEWIS et HARRIS en 1967 (122) ont décrit un procédé de détection des peptidases après électrophorèse en gel d'amidon. Nous avons adapté cette méthode pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Annexe technique page 183). Le principe de la réaction est le suivant : la libération, par les dipeptidases, des acides aminés de la série L, est mise en évidence par deux réactions enzymatiques couplées :

- Une L.amino-acide-oxhydrase ou amino-acide-oxydase (Ec. 1.4.3.2.)
(7) du venin de Crotalus adamanteus agit sur les acides aminés libérés par la peptidase. Il se produit une désamination oxydative de l'acide aminé avec libération finale d'un acide cétonique, d'eau oxygénée et d'ammoniac.

- L'eau oxygénée libérée est dégradée par la catalase de raifort (Ec. 1. 11. 1. 7.) (7), cette réaction s'accompagne d'une oxydation de l'O-dianisidine et il se forme une coloration brune au site de la réaction.

Le choix des substrats peptidasiques est limité par la spécificité de la L.aminoacide-oxydase du venin de Crotalus adamanteus : certains acides aminés ne sont pas ou sont peu transformés ; ce sont les acides D- α -aminés, le glycoacide, l'alanine, la sérine, la thréonine et la valine ; par contre, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la cystéine, la tyrosine et le tryptophane sont rapidement attaqués. Nous avons donc utilisé les peptides suivants : Leu-Gly, Gly-Trp, Gly-Met, Gly-Cys, le DL.Leu-Gly-Gly et le Met-Ala-Ser. L'hydrolyse de la leucineamide et de la leucyl- β -naphtylamide peut également être décelée par cette méthode.

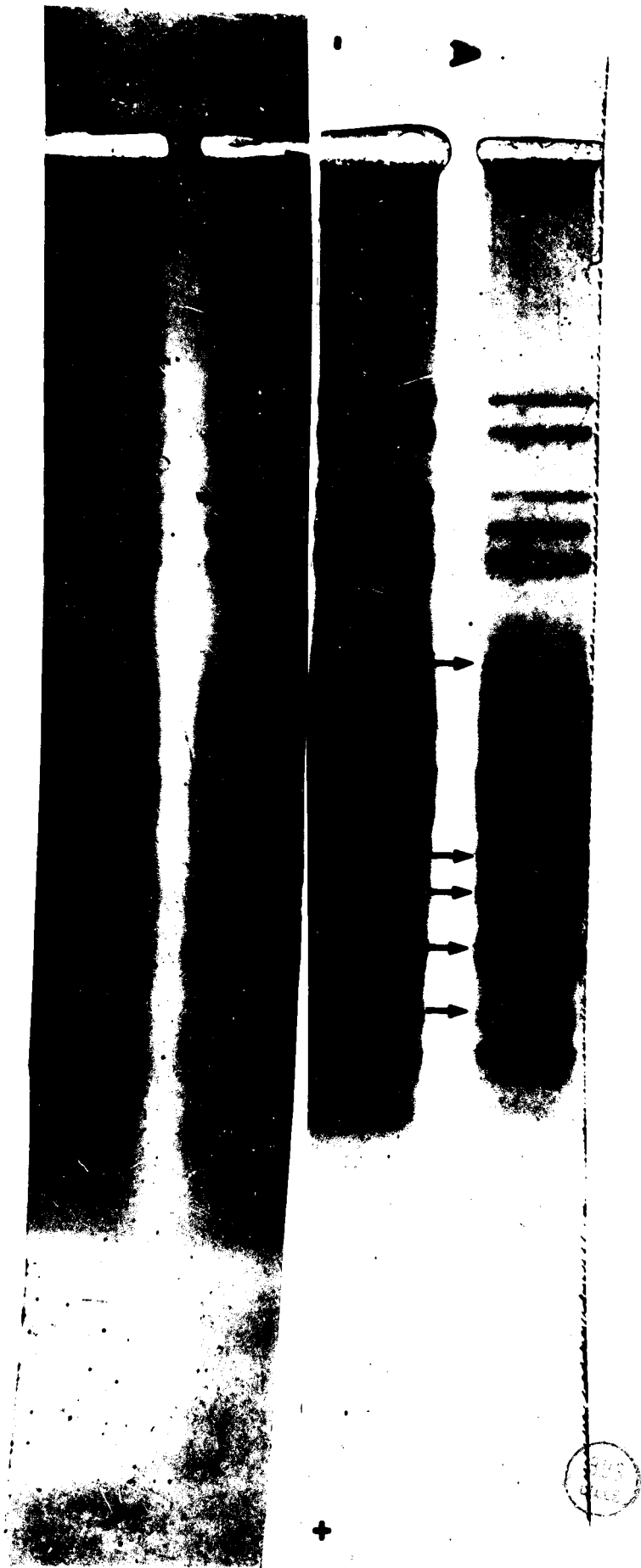
Il faut remarquer qu'il se produit une oxydation diffuse de l'O-dianisidine lorsque la durée de l'incubation dans le mélange réactionnel dépasse 4 heures. Ainsi les activités peptidasiques les plus faibles ne sont pas détectées. Lorsque la réaction est rapide (30 min à 1 heure), nous procédons à une coloration ultérieure du gel par le bleu de coomassie, après avoir pratiqué une entaille au niveau de la réaction peptidasique (figure 9). Nous pouvons donc identifier exactement de cette façon, la protéine active.

Figure 9

Electrophorégramme de la fraction S. 105

A : Séparation par migration en gel d'acrylamide-agarose puis coloration des protéines par le bleu de Coomassie

B - Réaction peptidasique : substrat L. Leu-Gly durée de la réaction 1 heure, puis fixation et coloration par le bleu de Coomassie



II - RESULTATS

- Caractérisation de cinq exopeptidases dans la fraction cytoplasmique soluble

La figure 10 illustre les résultats de plusieurs essais effectués avec la fraction surnageante (105.000 x g) de Mycobacterium phlei 689. L'aspect de l'électrophorégramme obtenu après coloration par le bleu de coomassie varie légèrement selon les préparations bactériennes ; cependant, certaines fractions sont présentes de façon constante, bien que la coloration soit variable en intensité. Nous les avons numérotées de 1 à 23, selon leur ordre de migration de la cathode vers l'anode. Cinq fractions présentent une activité peptidasique; nous les avons numérotées de I à V, selon la rapidité de leur migration électrophorétique vers l'anode. L'enzyme n° I étant celle qui migre le plus rapidement. Le tableau XV résume les résultats obtenus avec divers substrats.

L'enzyme I hydrolyse rapidement le DL.Leu-Gly-Gly (1 à 2 heures) et beaucoup plus lentement la leucinamide et la leucyl- β -naphtylamide.

La fraction peptidasique II dégrade rapidement les dipeptides, mais la leucinamide et les tripeptides ne sont jamais hydrolysés.

Les enzymes III et IV présentent une activité hydrolytique relativement intense à l'égard des dipeptides, beaucoup plus lente à l'égard des tripeptides. L'hydrolyse de la leucinamide n'apparaît pas.

Enfin, l'enzyme V réagit lentement avec le DL.Leu-Gly-Gly; cette enzyme est très instable. Seules les préparations bactériennes fraîchement isolées présentent une activité de ce type. Les produits lyophilisés sont inactifs, bien que la bande protéique n° 9 à laquelle cette activité correspond, soit généralement révélée par la coloration avec le bleu de coomassie.

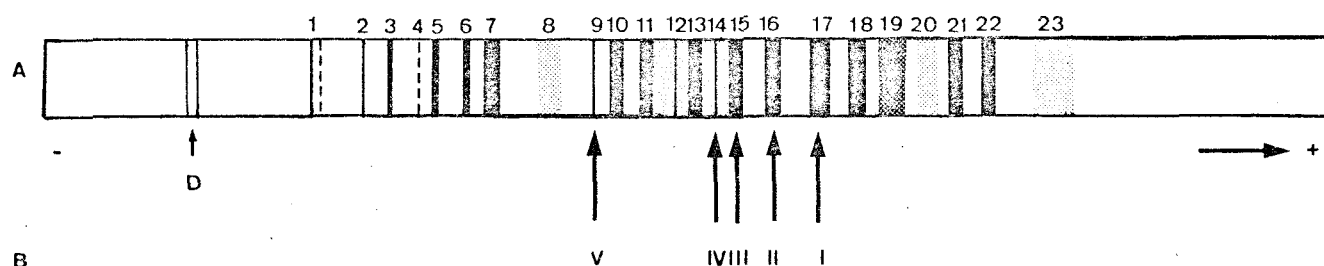


Figure 10

Electrophoregramme sur gel de polyacrylamide-agarose de la fraction cytoplasmique soluble de Myc. phlei

A - Coloration des protéines par le bleu de coomassie

B - Zones présentant une activité peptidasique

D - Niveau du dépôt de la préparation

<u>Activité peptidasique des différentes zones</u>					
	+ réaction forte (1 h à 2 h)		(+) réaction faible (2 h à 4 h)		
Substrats	V	IV	III	II	I
Leu-Gly	0	+	+	+	(+)
Gly-Leu	0	+	+	+	(+)
Gly-Trp	0	+	+	+	(+)
DL. Leu-Gly-Gly	+	(+)	+	0	+
Leucinamide	0	0	0	0	+

Tableau XV



III - ISOLEMENT DES PROTEINES PRESENTANT UNE ACTIVITE PEPTIDASIQUE

Nous réalisons une électrophorèse sur plaque d'acrylamide-agarose, mais la réaction peptidasique est pratiquée uniquement au bord du gel (figure 11). Nous utilisons comme substrat le Leu-Gly (A) qui est dégradé rapidement (en une heure) par les enzymes numérotées : II, III, IV et le DL.Leu-Gly-Gly (B) qui est hydrolysé par les enzymes : I, III, IV et V (en deux heures). Le reste du gel est placé à 4°C pendant le processus de révélation des dipeptidases. Les différentes zones peptidasiques sont ainsi localisées exactement; le reste du gel est découpé à leur niveau en lanières de 1 mm de largeur, légèrement en deçà des limites de la coloration due à l'O.dianiside oxydée. Ces lanières de gel sont congelées immédiatement et réduites en poudre dans un mortier de porcelaine refroidi préalablement à - 20°C. Les protéines sont extraites de cette poudre par élution dans un volume minimum de tampon (6 ml). Chaque fraction est centrifugée à 4°C (39.100x g, 20 min) afin d'éliminer le gel d'acrylamide-agarose. L'activité peptidasique du surnageant est mesurée immédiatement avec une gamme variée de dipeptides et de tripeptides. Parallèlement, chaque fraction est analysée en électrophorèse sur disque d'acrylamide à 7,5 p. 100 d'acrylamide contenant de l'urée 6 M (Annexe technique, page 183). Seules seront retenues pour l'étude de la spécificité enzymatique, les fractions révélant une seule bande de protéines après coloration par le bleu de coomassie.

Le rendement de l'opération est très faible : pour un dépôt de 40 mg de protéines (LOWRY), on obtient après électrophorèse et séparation des différentes fractions, au maximum 0,600 mg de chaque fraction. toutefois cette quantité est suffisante pour étudier la spécificité.

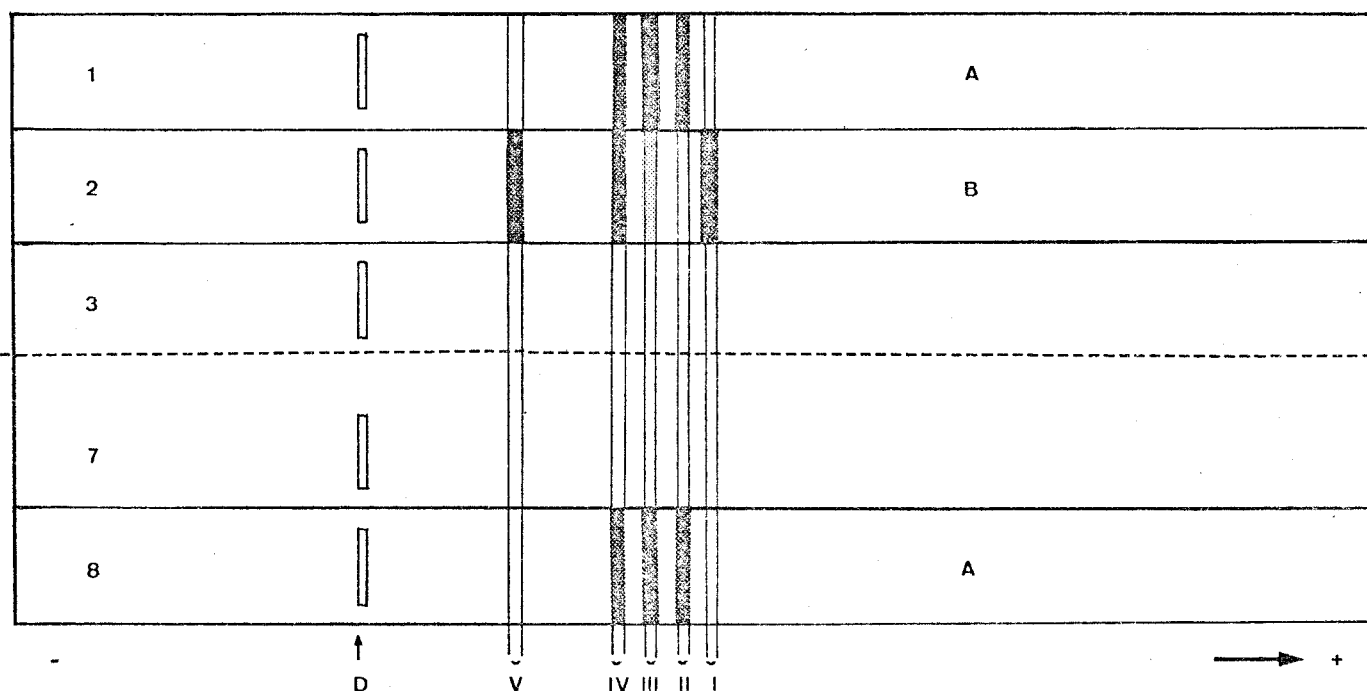


FIGURE 11

Préparation des différentes fractions peptidasiques par électrophorèse
sur gel de polyacrylamide-agarose

D : niveau du dépôt de la préparation à fractionner

Caractérisation des peptidasés sur les parties du gel correspondant aux godets 1, 2 et 8 :

A (1 et 8) le substrat utilisé est le Leu-Gly

B (2) le substrat est le DL Leu-Gly-Gly

Les fractions peptidasiques I à V sont découpées dans la partie du gel non révélée, godets 3 à 7 .



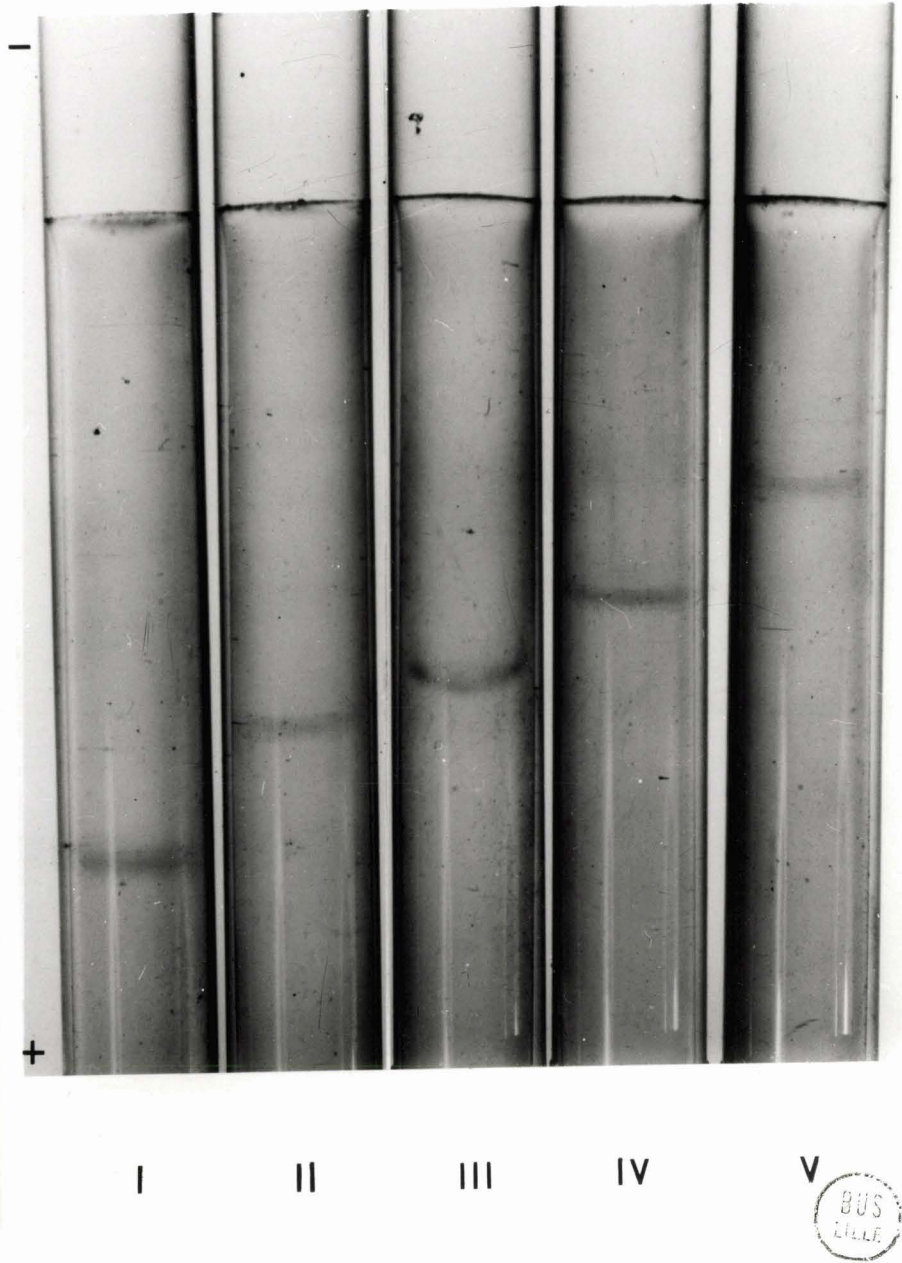


Figure 12

Migration électrophorétique sur disque d'acrylamide des différentes fractions peptidasiques isolées.

gel à 7,5 p. 100 d'acrylamide-urée 6 M - S.D.S.0,1 p. 100

La figure 12 montre la migration électrophorétique sur disque d'acrylamide des différentes fractions de Mycobacterium phlei présentant une activité peptidasique. Les fractions III et IV ont une mobilité électrophorétique différente, bien que leurs propriétés soient très voisines, comme nous le verrons par la suite.

IV - SPECIFICITE DES EXOPEPTIDASES ISOLEES DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE SOLUBLE DE MYCOBACTERIUM PHLEI 689

Selon les résultats des premiers essais, l'hydrolyse des divers peptides est mesurée après une incubation à 37°C à pH 7,5, pendant 1 h à 20 h, selon le substrat utilisé. Lorsque l'activité est forte, nous mesurons le taux d'hydrolyse obtenu en 15 min, dans les mêmes conditions expérimentales. Le tableau XVI indique l'activité moyenne des fractions pures obtenues par trois séparations électrophorétiques successives. Afin de comparer les divers taux d'hydrolyse, l'activité spécifique est présentée en μM d'acide aminé libéré par heure et par mg de protéine (les substrats classiques de la trypsine et de la chymotrypsine "Bz.Arg.O Et, Tos.Arg.O Me, Ac.Tyr.O Me, Bz.Tyr.O Et", ainsi que les substrats des carboxypeptidases "Z.Gly-Phe, Bz.Gly-Lys, Bz.Gly-Gly, Z.Gly-Trp" ne sont pas hydrolysés).

L'enzyme n°I a un profil de spécificité voisin de celui de l'aminopeptidase I d'Escherichia coli. VOGT en 1970 (248) a étudié conjointement l'activité de l'aminopeptidase 1 d'Escherichia coli et de la leucine aminopeptidase du rein de porc (Ec. 3.4.1.1.). Si on compare

ces activités avec celles de la fraction I de Mycobacterium phlei, nous constatons, en dépit de conditions expérimentales différentes, que les taux relatifs de dégradation des triptides et du Leu-Gly, sont analogues (Tableau XVII). D'autres propriétés sont communes : la peptidase I de Mycobacterium phlei est activée par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} . En absence de ces ions ou en présence d'E.D.T.A., l'inactivation est rapide.

Les travaux de VOGT (248) et de MATHESON et coll. (136) sont discrets quant à l'activité de l'aminopeptidase d'Escherichia coli à l'égard de la leucinamide. Or cette activité est élevée pour la leucine-aminopeptidase du rein de porc, étudiée par SMITH et SPACKMAN (220). Par contre, certaines leucine-aminopeptidases (par exemple celle qui est isolée du muscle de porc, DELANGE et SMITH en 1971, 56), hydrolysent plus rapidement que la leucinamide, les dipeptides et les tripeptides ayant la leucine en position N-terminale.

Remarquons par ailleurs, que la mesure de l'hydrolyse du Leu-Gly présente peut être une erreur par excès. En effet, des traces de la fraction II peuvent persister dans la fraction I, bien que cette dernière paraisse pure en électrophorèse sur disque d'acrylamide. Or l'enzyme n° II est très active à l'égard du Leu-Gly (500 fois plus que la fraction I). En fait, si l'on tient compte des résultats obtenus par la révélation directe de l'activité en gel d'acrylamide-agarose (figure 10), il semble que l'activité de la fraction I soit plus intense à l'égard de la leucinamide qu'à l'égard du Leu-Gly. D'autres indications confirment les propriétés leucine-aminopeptidasique de cette enzyme.

Les peptides ayant un D-aminoacide en position N-terminale (D.Leu-Gly et D.Leu-Tyr) ne sont pas hydrolysés ; de même les peptides

Fractions :	I	II	III	IV	V
Ala-Gly	0,07	131,3	2,80	1,87	0,30
Ala-Leu	0,16	12,3	2,20	1,17	0,36
Leu-Gly	0,16	78,7	1,90	1,08	0,28
Leu-Ala	0,14	46,0	2,33	2,35	0,44
Pro-Gly	0	42,0	2,00	1,12	0
Val-Gly	0	19,0	2,26	1,12	0,07
Tyr-Gly	0	6,0	0,82	0,24	0
Trp-Ala	0	4,0	0,71	0,21	0,12
Gly-Ser	0,12	99,0	1,86	1,16	0,02
Gly-Leu	0,16	56,0	2,00	1,15	0,11
Gly-Trp	0,09	43,0	2,26	0,80	0,08
Gly-Met	0,11	34,3	0,99	0,70	0,006
Gly-Val	0,08	20,0	0,73	0,31	0,005
Gly-Phe	0,14	17,0	1,54	0,47	0,36
Gly-Tyr	0,05	10,0	0,79	2,09	0
Gly-Pro	0	0	0	0	0
Gly-Gly	0,005	0	0,01	0,01	0
D.Leu-Gly	0	6,1	0,27	0,06	0
Leu-NH ₂	0,015	0	0,03	0,01	0
Met-Ala-Ser	0,39	0	0,21	0,15	0,66
Leu-Gly-Gly	0,25	0	0,01	0,05	0,58
Leu-Gly-Tyr	0,16	0	0,03	0,02	0,44
Gly-Leu-Tyr	0,18	0	0,10	0,09	0,40
Ala-Gly-Gly	0,01	0	0,13	0,02	0
Phe-Gly-Gly	0,08	0	0,01	0,001	0
Pro-Gly-Gly	0	0	0,01	0,001	0
Gly-Gly-Gly	0,07	0	0	0	0

TABLEAU N°XVI

BUS
JULE

Activité peptidasique des différentes fractions séparées par électrophorèse
en gel d'acrylamide agarose. Activité peptidasique exprimée
en $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$

	Am I (1)	L . A . P .(1)	I
Met - Ala - Ser	100	100	100
Leu - Gly - Gly	33	19	63
Phe - Gly - Gly	0,8	4,7	20,4
Ala - Gly - Gly	0,7	1,2	2,4
Gly - Gly - Gly	0,3	< 0,3	1,9
Leu - Gly	5,5	18	41,5
Conditions expérimentales	Tampon Tris 10 mM KCl 50 mM Substrat 1 mM pH 8,4 T = 37°C		Tris 10 mM Substrat 5 mM pH 8 T = 37°C

TABLEAU N° XVII

Etude comparative de l'activité spécifique de diverses préparations
enzymatiques.

(1) Activité établie par VOGT 1970 (248). Activité relative calculée
en pourcentage par rapport au taux d'hydrolyse du témoin Met-Ala-Ser

Am I : Aminopeptidase I d'Escherichia coli B.

L.A.P. : Leucine aminopeptidase du rein de porc.

I : Fraction peptidasique n° I de Mycobacterium phlei 689.



ayant une fonction α -iminée libre (Pro-X), ne sont pas dégradés (ou trop faiblement pour que cette hydrolyse puisse être détectée).

La spécificité de la fraction peptidasique I de Mycobacterium phlei n'est pas entièrement définie par les essais relatés dans ce travail. Néanmoins, nous observons une activité spécifique proche de celle de l'aminopeptidase I d'Escherichia coli, activité apparentée à celle de certaines leucines aminopeptidases des tissus animaux, mais non identique à celle de la leucine aminopeptidase étudiée par SMITH et SPACKMAN (220).

L'enzyme II est une dipeptidase que nous avons isolée et purifiée. Nous étudierons ses propriétés en détail au chapitre V.

Les enzymes III et IV présentent certaines propriétés communes avec celles de l'aminopeptidase du rein de porc (Ec. 3.4.1.2.) (8), DELANGE et SMITH, 1971 (56).

- Les tripeptides ou dipeptides ayant l'alanine en position N- α -aminée terminale, sont hydrolysés plus rapidement que les peptides contenant la leucine.
- L'hydrolyse des acides aminés aromatiques et celle des groupes α -iminés libres (Pro-Gly) est relativement rapide (par rapport à l'activité de la leucine aminopeptidase).
- Enfin, l'écart entre les divers taux d'hydrolyse des acides α -aminés terminaux est relativement réduit (toujours par rapport aux grandes divergences observées pour la leucine aminopeptidase entre les taux d'hydrolyse de certains peptides).

Par tous ces aspects, les fractions III et IV montrent une spécificité voisine de celle de l'aminopeptidase M du rein de porc

purifiée par WASCHMUTH et coll., 1966 (250, 251), mais elles s'en distinguent cependant par certaines propriétés:-- les acides α -aminés de configuration D en position N-terminale sont hydrolysés (D.Leu-Gly),-- la leucinamide est très faiblement hydrolysée. Les dipeptides sont hydrolysés plus rapidement que les tripeptides. Ce dernier caractère est commun à de nombreuses aminopeptidases bactériennes (dont certaines ont été partiellement purifiées par MATHESON et coll., 1967 (135) par BROWN et coll., 1971 (27) et à l'aminopeptidase A.P.I. de Bacillus stearothermophilus (qui a été hautement purifiée par ZUBER et RONCARI, 268, 189, 190. Cette dernière enzyme présentant aussi une activité faible à l'égard de la leucinamide). Des enzymes actives à l'égard des acides α -aminés de configuration D en position N-terminale, ont été décelées dans la fraction intracellulaire de certaines bactéries (en particulier par MINAMIURA et coll. en 1969 (147) pour Bacillus subtilis), aucune peptidase de ce type n'a été purifiée.

La figure 12 montre la migration électrophorétique des enzymes III et IV sur disque d'acrylamide contenant du S.D.S. et de l'urée 6 M--méthode de SHAPIRO et MAIZEL (207). La mobilité différente de ces protéines indique que ces enzymes sont distinctes et ne sont pas des formes polymères de la même enzyme, comme on aurait pu le supposer.

Enzyme V, cette enzyme a une spécificité aminopeptidasique, mais très particulière, différente de celle de la leucine aminopeptidase (Ec. 3.4.1.1.) puisque la leucinamide n'est pas (ou très peu) hydrolysée. Les résidus D- α -aminés terminaux ne sont pas libérés, non plus que les résidus α -iminés et la tyrosine.

La dégradation des peptides contenant la leucine est forte, mais

l'hydrolyse du Ala-Gly-Gly est faible ou nulle. Par ces caractères, elle se distingue à la fois de la leucineaminopeptidase, de l'aminopeptidase (Ec. 3.4.1.2.) et des aminopeptidases bactériennes précédemment décrites.

CHAPITRE IV

EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATERIEL DIPEPTIDASIQUE

STABILITE DE L'ENZYME

L'influence du pH et des ions métalliques sur la stabilité de la dipeptidase de Mycobacterium phlei sera exposée plus en détail au chapitre V. Cependant, précisons que la dipeptidase est très instable en absence d'ions métalliques Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Après un séjour de 24 h à différentes températures il reste : en absence de Mg^{2+} , à $-20^{\circ}C$, 1 p. 100 seulement de l'activité initiale à l'égard du Leu-Gly ; à $4^{\circ}C$, 10 p. 100 de l'activité, et 50 p. 100 de l'activité lorsque la préparation enzymatique non purifiée est congelée à $-20^{\circ}C$. Après un séjour de 24 h en présence de 10 mM de Mg^{2+} , l'activité atteint 44 p. 100 de l'activité initiale à $4^{\circ}C$, et 85 p. 100 à la température de $-20^{\circ}C$. Au delà de 8 jours de congélation à $-20^{\circ}C$, l'activité résiduelle est très faible.

Le procédé de conservation le plus avantageux est la lyophilisation après congélation rapide de la préparation enzymatique. Cependant, il y a une diminution de l'activité d'environ 30 à 66 p. 100 après chaque étape de la purification.

Toutes les manipulations sont donc faites à $4^{\circ}C$, et pendant toute la durée de la préparation, l'enzyme est protégée de l'inactivation par adjonction de $MgCl_2$ 10 mM (concentration finale). La méthode de purification est résumée dans le tableau XVIII.

1ère étape : Précipitation par le sulfate de Streptomycine

Après centrifugation du broyat bactérien à $17.600 \times g$ pendant 20 min, puis à $105.000 \times g$ pendant 120 min. - afin d'éliminer les débris cellulaires et les éléments figurés - les acides nucléiques contenus dans la fraction surnageante sont précipités par le sulfate de Streptomycine

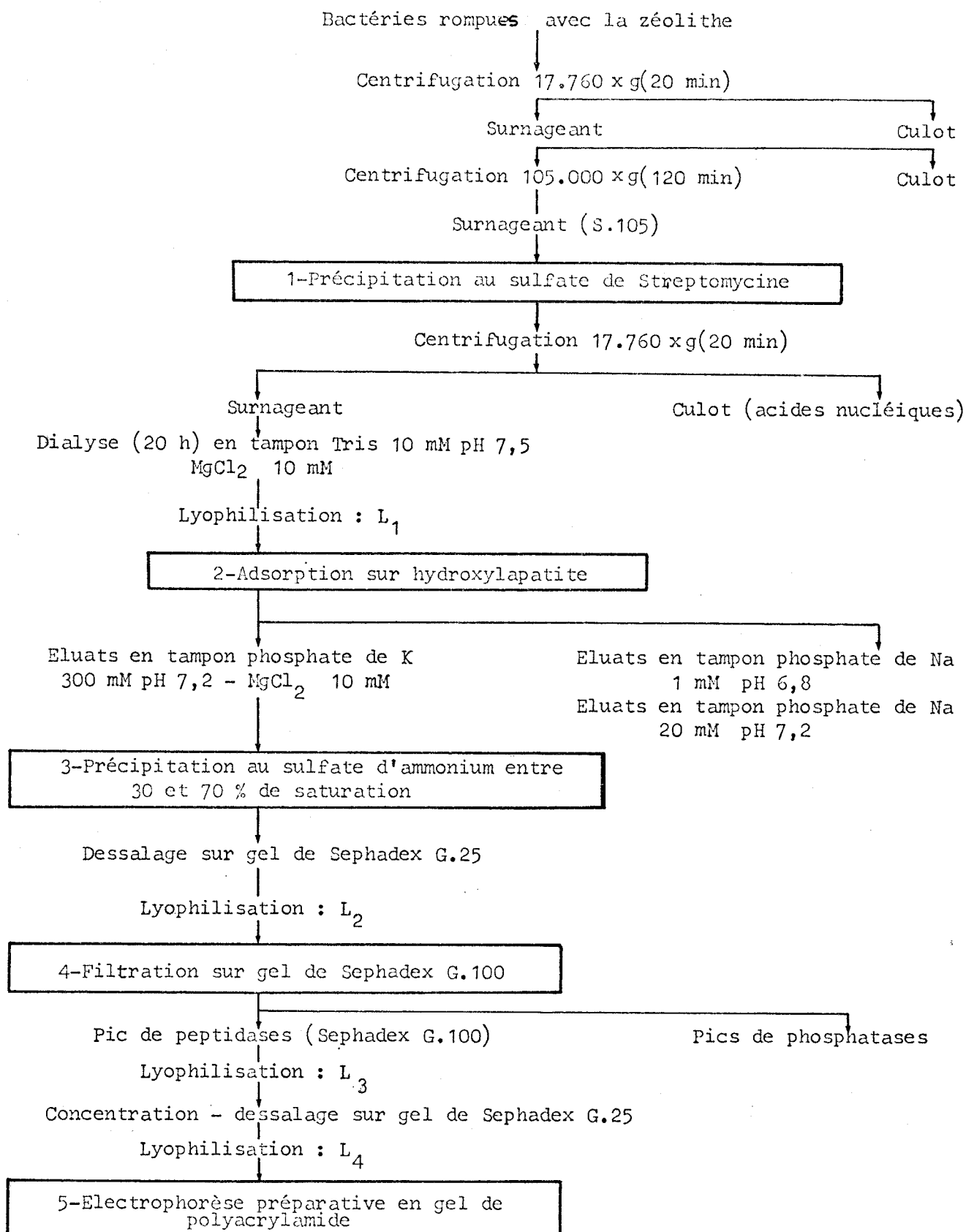


TABLEAU N° XVIII

Méthode de purification



selon le procédé de FERGUSON et coll. (64). Le sulfate de Streptomycine à 10 p. 100 (p/v) en solution aqueuse, est additionné lentement à l'extrait cellulaire (1 v/100 v) sous agitation magnétique à 4°C. Le précipité est éliminé par centrifugation à 17.760 x g 20 min et le surnageant est dialysé 20 heures à 4°C, sous agitation magnétique, en tampon Tris 10 mM de pH 7,5 contenant du MgCl₂ 10 mM, puis lyophilisé. Le sulfate de Streptomycine précipite les acides nucléiques, RNA et DNA (40, 47). La concentration en protéines varie très peu au cours de ce processus de purification (Tableau XXI) p. 143 ; cependant, l'activité spécifique étant multipliée par 1,5, il y a élimination d'un inhibiteur de l'activité dipeptidasique.

2ème étape : Adsorption sur hydroxylapatite

La préparation enzymatique est adsorbée sur gel d'hydroxylapatite préparé selon le procédé de JENKINS et ROBINSON (102).

Après étude préalable des conditions d'adsorption et d'élution des activités dipeptidasiques en fonction des éluants et du pH, le procédé suivant a été mis au point :

La préparation enzymatique (100 ml) contenant 100 à 200 mg de protéines (LOWRY) est mélangée lentement sous agitation magnétique, à un volume égal de gel d'hydroxylapatite à 4 p. 100 (poids sec/v) en tampon phosphate de sodium 1 mM de pH 6,8. Après 15 min de décantation, le surnageant est éliminé par centrifugation 20 min à 39.100 x g à 4°C. Le gel est alors lavé deux fois : par le tampon phosphate de sodium 1 mM de pH 6,8 (100 ml), ensuite par le tampon phosphate de sodium 20 mM de

pH 7,2 (100 ml). Les protéines actives sont retenues sur l'adsorbant; les essais préliminaires nous ont montré qu'elles sont éluées par une concentration moléculaire supérieure à 100 mM. Les peptidases sont donc extraites du gel d'hydroxylapatite par trois éluations dans un volume minimum (25 ml) de tampon phosphate de potassium 300 mM à pH 7,2, suivies de centrifugations à 39.100 x g 20 min, à 4°C. Les surnageants sont rassemblés et précipités immédiatement par le sulfate d'ammonium.

L'adsorption sur hydroxylapatite permet d'éliminer de nombreuses impuretés (polysaccharides en particulier) et une fraction non peptidasique comprenant 69 p. 100 des protéines de la préparation initiale (tableau XXI page 143).

3ème étape : Fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium

Une étude préalable des conditions expérimentales, a précisé que le précipité formé avec le sulfate d'ammonium entre 45 et 52 p. 100 de saturation, à pH 7,0 et 4°C, contient les protéines actives à l'égard des dipeptides suivants : Ala-Gly, Pro-Gly, Gly-Trp et Leu-Gly. Une décantation trop longue inactive fortement les dipeptidases. Le temps de précipitation est donc limité à 1 heure 30 min, à 4°C.

Un premier précipité obtenu à 30 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est éliminé par centrifugation (39.100 x g, 30 min). Le surnageant est ajusté à 70 p. 100 de saturation par le sulfate d'ammonium solide, en agitation lente à 4°C, après une décantation d'une heure ; le deuxième précipité formé est recueilli par centrifugation (39.100 x g, 30 min) pour une purification ultérieure. L'élimination du sulfate d'ammonium résiduel par dialyse, inactive la préparation

enzymatique. La fraction isolée est donc dessalée immédiatement par filtration sur gel de Sephadex G.25. Le précipité obtenu est dissout dans 15 ml d'eau distillée et déposé au sommet d'une colonne de Sephadex G.25 (3 cm x 50 cm) équilibrée en tampon Tris 1 mM de pH 8,0 contenant 1 mM de $MgCl_2$, puis éluee par le même tampon (débit 1,2 ml/min). Les protéines enzymatiques sont exclues du gel immédiatement après le volume mort de la colonne, tandis que le volume d'élution du sulfate d'ammonium est de 100 à 140 ml. La fraction peptidasique est immédiatement congelée et lyophilisée.

4ème étape : Filtration sur gel de Sephadex

Avant de décrire la méthode choisie, nous rappellerons brièvement les résultats obtenus avec divers procédés de fractionnement :

a) Chromatographie sur DEAE-cellulose, DEAE-sephadex et CM-sephadex

On constate que la DEAE-cellulose et la DEAE-sephadex ont la propriété de fixer énergiquement les protéines dipeptidasiques dont l'élution est réalisée pour des concentrations de NaCl ou de KCl supérieures à 1 M. Cette concentration ionique importante provoque une inhibition de l'activité peptidasique, et une dialyse est nécessaire pour restaurer l'activité. Des essais de chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (2 cm x 60 cm) préalablement équilibrée avec le tampon Tris 20 mM de pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM, puis éluee par un gradient continu de NaCl de 0 à 2 M (300 ml/300 ml, débit 0,8 ml/min) ont révélé un rendement infructueux : 16 p. 100 seulement de l'activité sont

déplacés avec une concentration de NaCl 1,4 M.

Avec la chromatographie sur DEAE-Sephadex A.25 (colonne de 2 cm x 60 cm dans les mêmes conditions), il faut également une concentration élevée de NaCl (1,2 M) pour déplacer la fraction active; et les rendements sont meilleurs: 88 p. 100 de l'activité totale. Cependant, l'activité optimale à l'égard des divers substrats se localise dans la même fraction; il n'y a donc pas de séparation entre plusieurs types d'activités peptidasiques.

Les protéines enzymatiques ne sont pas retenues sur CM-Sephadex, mais le pouvoir de résolution n'est pas meilleur. La chromatographie sur CM-Sephadex C.50 (colonne 2 cm x 60 cm), avec élution par le tampon Tris 20 mM de pH 7,5 $MgCl_2$ 1 mM (débit 1,6 ml/min), mais sans gradient de NaCl, donne des résultats analogues : toutes les activités dipeptidasiques et tripeptidasiques sont situées dans la même fraction.

b) Electrophorèse en film liquide

L'Electrophorèse en film liquide est réalisée sur un appareil Elphor-Vap I selon la technique de HANNIG (83) (Annexe technique page 183). Les extraits enzymatiques (250 mg) sont dialysés contre le tampon d'électrophorèse (tampon Tris 80 mM - acide citrique 8 mM de pH 8,6). La tension d'électrophorèse est de 1.700 volts et l'intensité de 100 mA. A la sortie de la cellule d'électrophorèse, le film liquide est fractionné dans 48 compartiments dont le contenu est collecté dans 48 tubes. Sur chacune de ces 48 fractions, on détermine l'absorption en ultra-violet

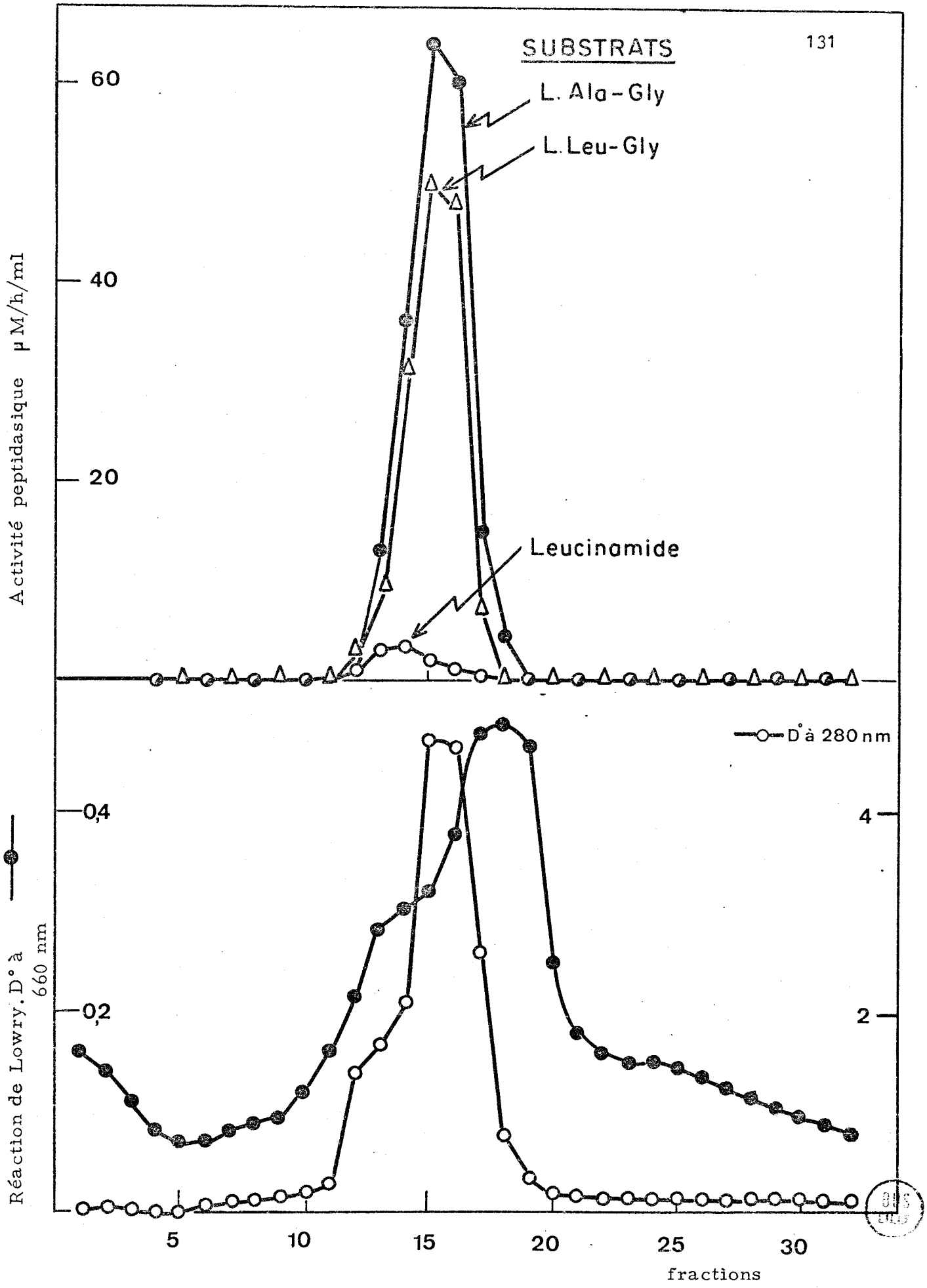


Figure 13

Electrophorèse libre préparative en film liquide

à 280 nm, et la teneur en protéines par la réaction de LOWRY (figure 13). L'activité peptidasique à l'égard des dipeptides est localisée dans un seul pic (fractions 15 et 16) qui présente une grande absorbance à 280 nm.

Les fractions 13 et 14 sont les plus actives à l'égard de la leucinamide. Ce fait indique l'hétérogénéité de la fraction peptidasique, bien que les deux types de protéines actives (aminopeptidases et dipeptidases) ne soient pas séparées par ce procédé. Il n'y a aucune ébauche de séparation entre les activités dipeptidasiques. Ainsi, le rapport entre les activités spécifiques à l'égard des quatre dipeptides demeure sensiblement constant. De plus, bien que l'électrophorèse soit pratiquée à 5°C, l'activité spécifique à l'égard de la Leu-Gly diminue, alors qu'il y a une purification, puisque 50 p. 100 des protéines non peptidasiques sont éliminés. Cette inactivation est peut être due à l'absence de $MgCl_2$ pendant la manipulation (Tableau XIX).

c) Filtration sur gel de Sephadex G.100

Les résultats obtenus par filtration sur gel de Sephadex G.50, G.75, G.100, G.150 et G.200, ainsi que sur Biogel P.30 et P.60 (colonne de 2 cm x 60 cm en tampon Tris 10 mM de pH 7,5 contenant 10 mM de $MgCl_2$) sont similaires. Il y a isolement d'un seul pic ayant une activité hydrolytique à l'égard des quatre dipeptides suivants : Leu-Gly, Ala-Gly, Pro-Gly et Gly-Trp; et à l'égard du Leu-Gly-Gly et de la leucinamide. Les rendements sont excellents, mais on n'obtient aucune séparation entre les différentes activités peptidasiques.

Nous réalisons cependant une purification par filtration sur gel de Sephadex G.100 (figure 15), car nous avons observé une contami-

nation de la fraction peptidasique par une activité phosphatasique : activité relativement élevée, analogue à celle de la phosphatase alcaline (Ec. 3.1.3.1.). La filtration sur gel de Sephadex G.100 permet d'éliminer une partie de cette activité.

Les extraits enzymatiques (80 mg de protéines) sont déposés sur une colonne de gel de 4 cm x 75 cm en tampon Tris 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM de pH 8 (débit 0,8 ml/min). L'activité peptidasique est localisée dans un seul pic (B, volume d'élution 80 à 120 ml) situé entre deux pics de phosphatases, A et C, qui présentent une grande absorbance à 280 nm (figure 14). Ces deux pics de phosphatase correspondent peut-être à des conformations diverses de cette enzyme, dimère et polymère (travaux de FISHMAN et coll., 65 ; SIMPSON et coll., 1968,212).

Le produit de la filtration sur gel de Sephadex est congelé et lyophilisé. Plusieurs lyophilisats sont rassemblés, concentrés, et l'excès de Tris et de sels minéraux est éliminé par dessalage sur gel de Sephadex G.25 (figure 15) selon le procédé déjà décrit.

Si nous analysons la préparation enzymatique à ce stade de la purification, nous remarquons que l'activité spécifique à l'égard des dipeptides a augmenté de façon considérable (Tableaux XII, XIII, XIV), mais l'activité à l'égard des tripeptides et de la leucinamide est encore importante. L'hydrolyse de plusieurs oligopeptides et polypeptides par cette fraction SG.100 est résumée dans le tableau XX.

Les acides aminés N-terminaux des oligo-peptides et des polypeptides sont libérés par une enzyme douée d'activité aminopeptidasique.

L'analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose (figure 16) des composants de la fraction SG.100 (protéines et peptidases),

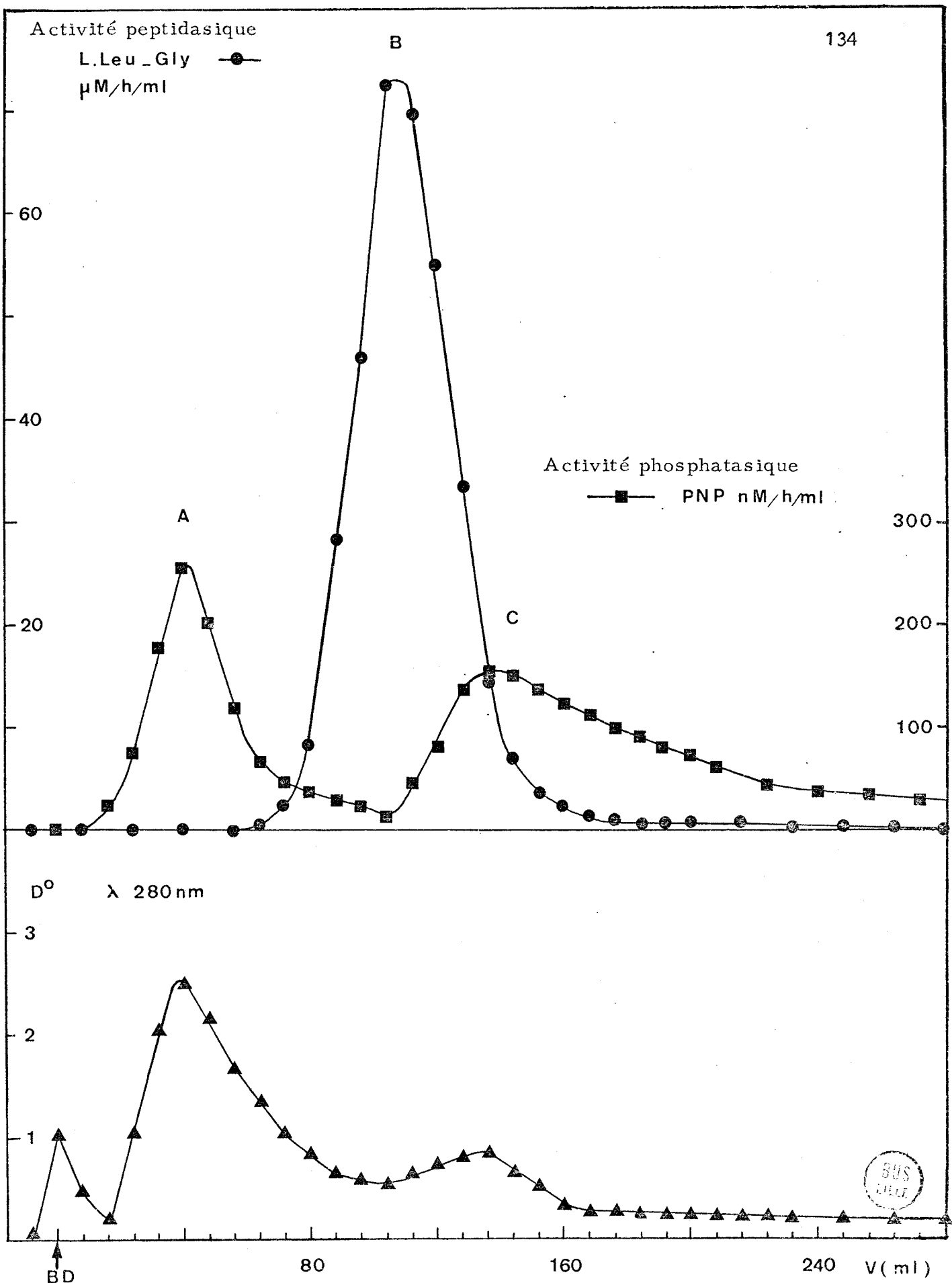


Figure 14

Filtration sur gel de Sephadex G 100

Méthode de fractionnement	Electrophorèse	Filtration sur gel
	Electrophorèse en film liquide "Vap"	Sephadex G.100
Conditions du traitement :		∅ 4 cm x 75 cm débit 0,5 ml/min
Tampon	Tris - Acide citrique 80 mM pH 8,6	Tris - Acide maléique 10 mM pH 8 MgCl ₂ 10mM
Température	5°C	4°C
Quantité de Protéines	avant fract. 250 mg après fract. 124,5 mg Rendement 50 %	80,2 mg 24,7 mg 30,7 %
Activité Spécifique u=μM/h/mg L.Leu-Gly	avant fract. 203 u après fract. 187 u Purification inactivation	127 u 496 u 3,9
Rendement global pour l'activité peptidasique	52 %	92,4 %

TABLEAU N°XIX

Comparaison entre les méthodes de fractionnement



Substrat : Leu-Gly

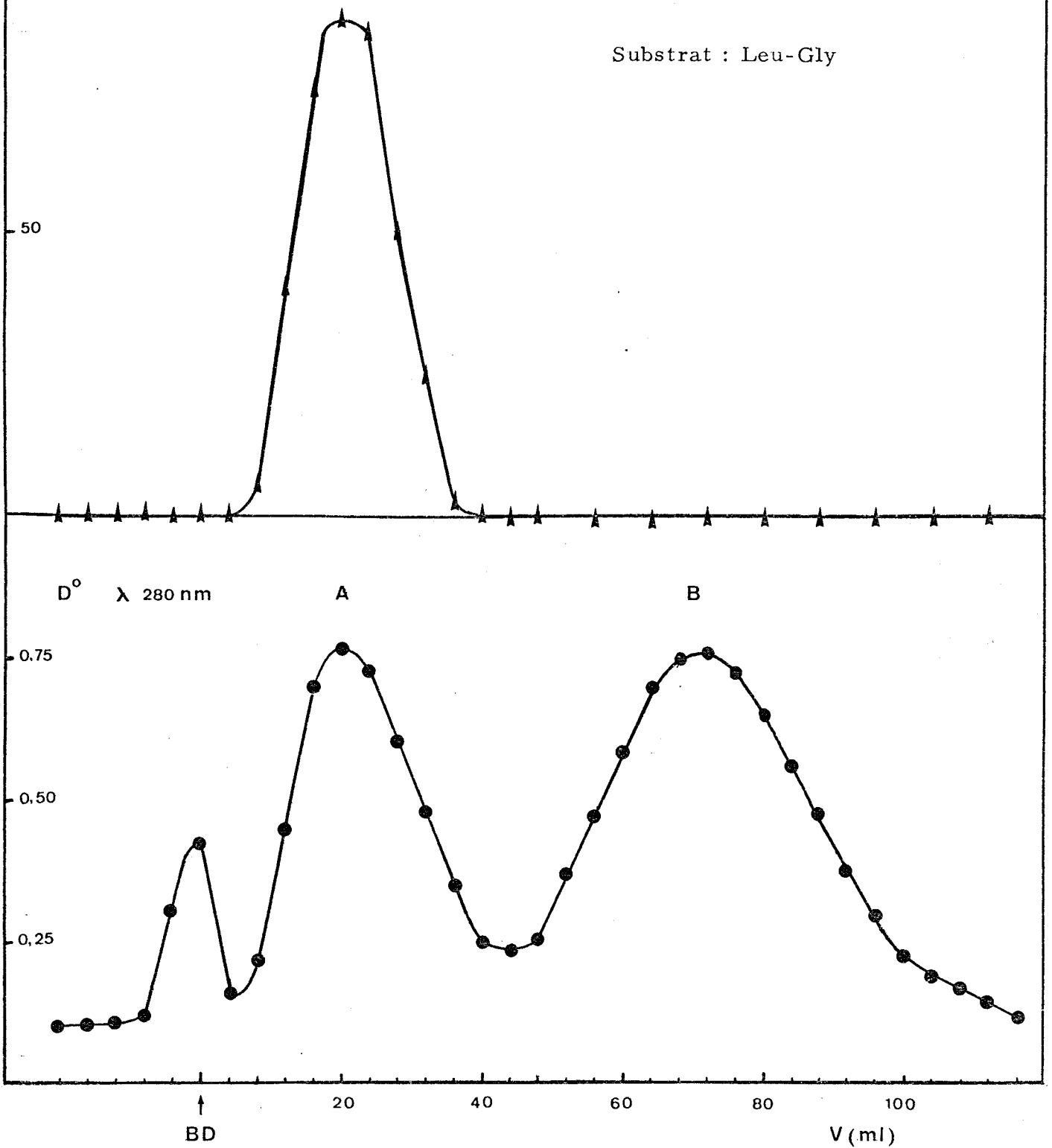


Figure 15

Dessalage sur gel de Sephadex G 25

- BD : pic de Bleu dextran 2000
- A : pic de peptidase
- B : sels minéraux (Tris)
- V : volume d'élution



Concentration du peptide µM/ml	Peptides	A	B
0,6	Asn ↓ Ala - Trp	9	+
2,0	Phe ↓ Asp ↓ Lys	30	++
1,2	Glu ↓ Lys - Phe	9,5	(+)
0,6	His ↓ Leu ↓ Lys	23,5	++
1,2	Ile ↓ Arg ↓ Leu - Phe	39,5	++
2,0	Thr - Glu - Ala - Glu - Hse	0	0
1,2	Thr ↓ Gly ↓ His - Pro - Glu - Thr - Leu	27,5	++
1,2	Thr ↓ Gly ↓ His - Pro - Glu - Thr - Leu - Glu - Lys - Phe	85	++
1,2	Lys ↓ Thr - Glu - Ala - Glu - Hse (lactone)	12	+
1,2	Lys ↓ Thr - Glu - Ala - Glu - Hse	5	+
1,2	Lys ↓ His - Leu - Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Hse	2,5	(+)
1,2	Phe ↓ Asp ↓ Lys - Phe - Lys	11,5	+
1,5	Gly ↓ Leu ↓ Ser ↓ Asp - Glu - Gly - Trp - Gln - Ala - Val - Leu - Ala - Trp - Gly - Lys	48,5	++

TABLEAU N° xx

Hydrolyse des oligopeptides et des polypeptides par la fraction S.G 100 (0,372 mg/ml)

A : densité optique X100 obtenue après la révélation à la ninhydrine des acides aminés libérés
longueur d'onde 500 nm (180), après une hydrolyse de 20 heures.

B : appréciation de l'hydrolyse par chromatographie sur papier et révélation par le réactif de HEILMANN (93)

++ : hydrolyse totale du résidu N-terminal en 20 heures, +:hydrolyse incomplète en 20 h,(+):hydrolyse faible.

Aucun de ces peptides n'est hydrolysé par la dipeptidase pure (0,060 mg/ml)



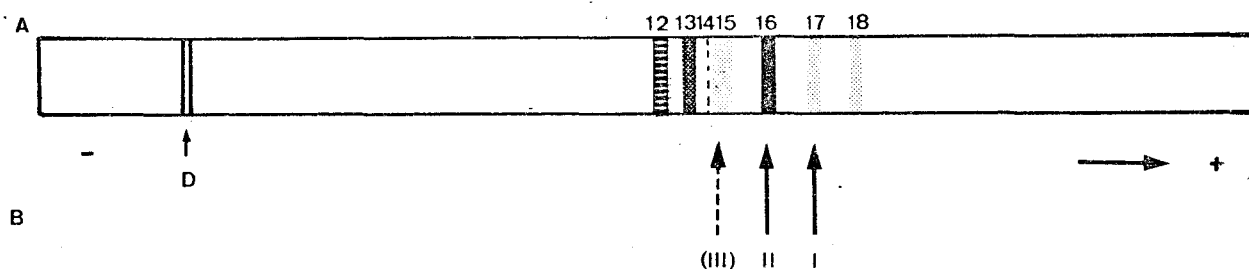


Figure 16

Electrophorogramme sur gel de polyacrylamide-agarose de la fraction S. G 100

A : coloration des protéines par le bleu de coomassie

B : zones présentant une activité peptidasique

D : niveau du dépôt de la préparation

<u>Activité peptidasique des différentes zones</u>			
+ : réaction forte (1 h à 2 h) (+) : réaction faible (2 h à 4 h)			
Substrats	(III)	II	I
Leu-Gly	0	+	(+)
Gly-Leu	0	+	0
Gly-Trp	0	+	(+)
D. L. Leu-Gly. Gly	0	+	+
Leucinamide	0	0	+

BUS
VILLE

montre qu'il subsiste encore deux peptidases : une aminopeptidase (I) et une dipeptidase (II) ainsi que six fractions protéiques importantes (figure 17). Nous ne décelons plus aucune activité correspondant aux peptidases III, IV et V.

Afin de séparer les deux peptidases dont les charges électrophorétiques et les poids moléculaires sont très voisins, il est donc nécessaire d'utiliser un procédé de séparation possédant un grand pouvoir de résolution. L'électrophorèse préparative en film liquide ayant donné une ébauche de séparation, nous avons recherché d'autres procédés de séparation électrophorétiques.

5ème étape

L'enzyme est isolée par migration électrophorétique en gels cylindriques de polyacrylamide.

L'électrophorèse est pratiquée en colonne de Pyrex (2 cm x 21 cm) contenant le gel de migration à 7,5 p. 100 (p/v) d'acrylamide (sur une hauteur de 12 cm) et le gel d'espacement (2 cm) à 2,5 p. 100 (p/v) d'acrylamide. La composition des gels est précisée dans l'annexe technique. Pour éviter la dénaturation de la dipeptidase, nous ajoutons du $MgCl_2$ (3 mM) dans le tampon des gels.

La partie inférieure des colonnes contient du gel à 15 p. 100 (p/v) d'acrylamide, plus rigide, qui colmate l'orifice de la colonne et empêche le glissement des gels de migration dans le réservoir de tampon. L'échantillon est déposé sous forme de mélange dense (2,5 ml) contenant

30 mg de protéines, 25 p. 100 de glycerol (v/v) et des traces de bleu de bromophénol. L'électrophorèse est réalisée en tampon Tris à 20 p. 1000 (p/v) - acide borique 2 p. 1000 (p/v) de pH 9. La tension d'électrophorèse est de 320 à 370 volts et l'intensité est maintenue constante à 10 mA par gel pendant 3 heures à 4°C.

L'activité peptidasique à l'égard du Leu-Gly est décelée directement après démoulage des gels, sur une lanière de 2 mm de section, découpée sur toute la longueur du gel ; elle est révélée par le réactif de LEWIS et HARRIS. La coloration est très rapide, elle apparaît au bout de 5 à 10 min à 37°C. Par cette méthode, la dipeptidase est localisée exactement et, au niveau correspondant, le gel est sectionné en disques de 2 mm d'épaisseur. Chaque fraction est congelée rapidement, puis broyée dans un mortier de porcelaine. L'enzyme est extraite du gel par élution dans le tampon Tris 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8. Après élimination du gel par centrifugation à $39.100 \times g$ 20 min à 4°C, chaque fraction est analysée en électrophorèse sur disque d'acrylamide. Seules sont retenues et lyophilisées les fractions présentant, à la fois une seule bande de protéines et une activité dipeptidasique élevée.

Nous isolons de cette façon une fraction pure sur disque d'acrylamide (figure 18). Cette fraction présente également un seul arc de précipitation en immunoprécipitation (figure 19).

Pendant cette manipulation, nous ne décelons aucune fraction active correspondant à l'aminopeptidase I. En effet, cette enzyme est inactivée par le persulfate d'ammonium. Des essais d'élimination de ce composé avant le dépôt de la préparation enzymatique par une électrophorèse de 30 min, se sont révélés inefficaces.

La figure 17 représente la migration électrophorétique sur gel d'acrylamide-agarose des préparations enzymatiques aux diverses étapes de la purification ; la concentration en protéines de la fraction pure (D) est trop faible pour être révélée par le bleu de coomassie. Mais il y a une réaction peptidasique (substrat Leu-Gly) au niveau de la migration (indiqué par une flèche) ; nous ne décelons plus aucune activité correspondant à l'aminopeptidase I.

II - COEFFICIENT DE PURIFICATION

L'instabilité de la préparation enzymatique rend difficile l'évaluation du coefficient de purification. Si l'on tient compte des résultats partiels (Tableau XXI), obtenus par une mesure immédiate de l'activité à chaque étape de la purification, le degré de purification final est supérieur à 1.011. Le rendement en protéines est de 0,580 mg pour 1.000 g de protéines (LOWRY) ou 36,5 mg d'enzyme pour 1.000 g de bactéries (poids humide).

III - CRITERES DE PURETE

Pour évaluer la pureté des préparations, nous avons effectué des électrophorèses sur gel d'acrylamide à 7,5 p. 100 selon le procédé de DAVIS (48). Les gels sont additionnés de dodecyl-sulfate de sodium 0,26 p. 100 (p/v) et d'urée, 6 M selon la technique de SHAPIRO et coll. (207). Les protéines sont révélées par le bleu de coomassie. Nous

observons une seule bande de protéines (figure 18). Nous avons également caractérisé l'activité peptidasique selon le procédé de LEWIS et HARRIS, modifié pour l'électrophorèse en gel d'acrylamide. Sur gel d'acrylamide ou sur plaque d'acrylamide agarose, nous décelons une seule zone, active uniquement envers les dipeptides. La leucinamide et les tripeptides ne sont pas hydrolysés. Nous analysons également la préparation par immuno-précipitation, effectuée avec un immun-sérum de lapin anti-protéines de la fraction SG.100. Nous obtenons un seul arc de précipitation avec plusieurs préparations successives (figures 1, 2, 3), l'enzyme est donc immunologiquement pure.

Une autre observation confirme la pureté de cette préparation. L'analyse des acides aminés terminaux par la technique de Dansylation de HARTLEY (89) montre un seul résidu N-terminal : la leucine.

Etapas de la purification	Total de protéines par mg	Activité (Leu-Gly)		Purification		Rendement en p. 100	
		Activité spécifique u	Activité totale	par étape	totale	par étape	total
Bactéries broyées	62.400,0	0,20	12.480				
Surnageant (S 105)	34.000,0	0,87	29.580	4,6	4,6	237,0	
1. <u>Précipitation à la Streptomycine</u>	32.440,0	1,38	44.767	1,5	6,9	151,3	358,7
Lyophilisation 1	32.115,0	0,76	24.407	-	-	54,5	195,5
2. <u>Adsorption sur Hydroxylapatite</u>	8.350,0	2,18	18.203	2,8	19,3	74,5	145,8
3. <u>Précipitation au Sulfate d'ammonium (70 %)</u>	3.231,0	4,81	15.541	2,2	42,5	85,3	124,5
Lyophilisation 2	3.199,0	2,12	6.781	-	-	43,6	54,3
4. <u>Filtration sur Sephadex G.100</u>	764,5	8,27	6.322	3,9	165,8	93,2	50,6
Lyophilisation 4	651,7	4,53	2.952	-	-	-	-
5. <u>Electrophorèse préparative en polyacrylamide</u>	52,1	27,7	1.445	6,1	1011,4	48,9	11,5
Lyophilisation 5	36,5	8,20	299	-	-	20,6	2,4

TABLEAU N° XXI

Bilan de la purification pour 1.000 g de bactéries (400 mg poids sec)

u = $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$



Figure 17

ETAPES DE LA PURIFICATION

(Electrophorèse en gel d'acrylamide-agarose)

A = Fraction (S. 105)

B = Fraction éluée après adsorption sur Hydroxylapatite

C = Fraction S. G 100

D = Fraction pure (il y a une réaction dipeptidasique au niveau de la flèche, mais la concentration en protéine est trop faible pour être colorée par le bleu de coomassie).

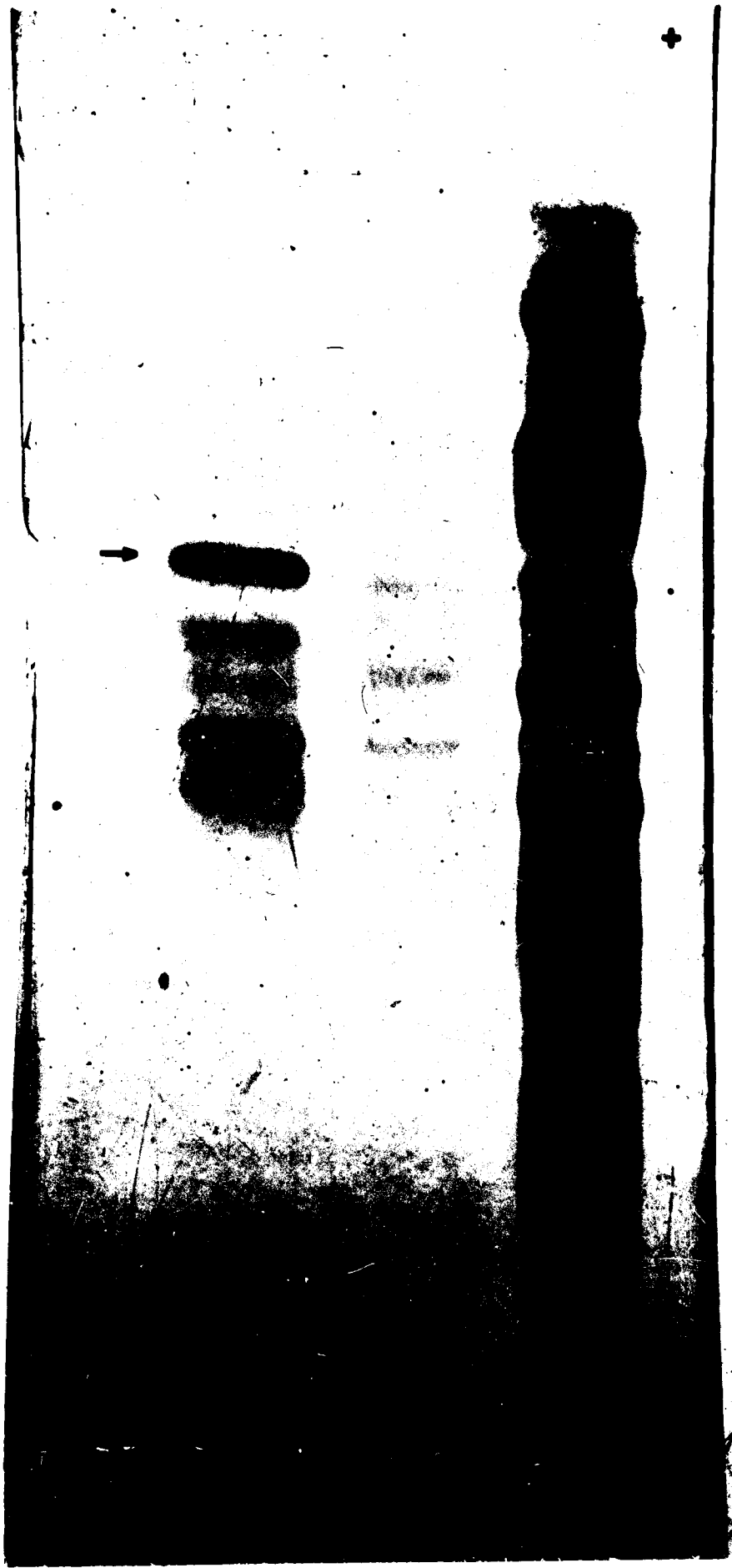




FIGURE 18

Electrophorèse sur gel d'acrylamide

système de tampon de DAVIS (48) gels de 7 cm de longueur contenant de l'urée 6 M et du S.D.S. 0,1 p. 100 selon SHAPIRO (207)

A Fraction S. 105 après précipitation par la streptomycine

B Fraction S. G 100

C dipeptidase pure

D dipeptidase pure - migration sur gel d'acrylamide 7,5 p. 100 contenant du S.D.S. 0,1 p. 100 (longueur 15 cm) après dénaturation de l'enzyme

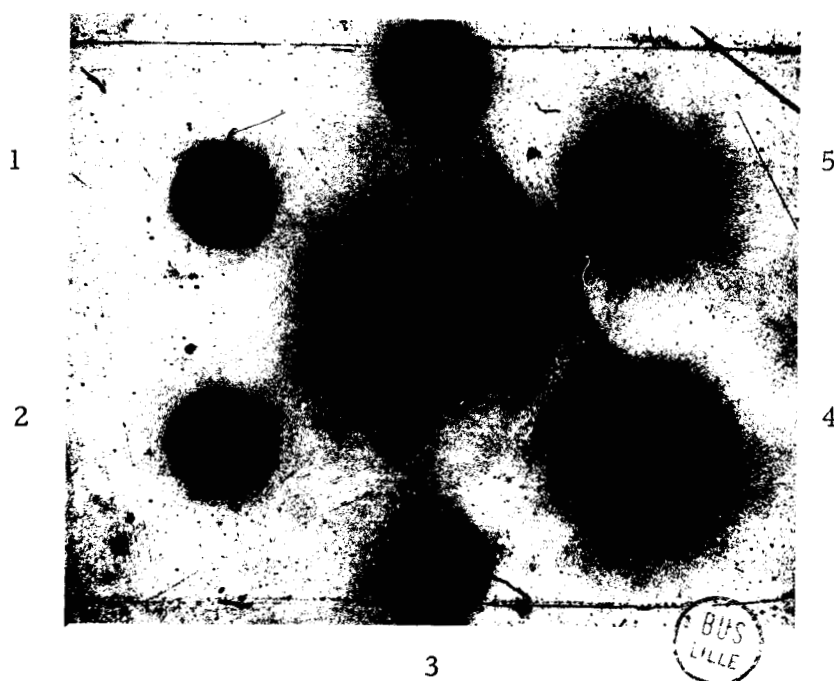


FIGURE 19

Réaction d'immuno précipitation

Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti
fraction S. G 100 - godet central et :

- deux concentrations différentes de la fraction S. G 100
(0,300 mg et 0,700 mg/ml) godets 1 et 2
- ainsi que trois préparations de la dipeptidase pure
(0,160 ; 0,172 ; 0,200 mg/ml) godets 3. 4. 5

CHAPITRE V

PROPRIETES DE LA DIPEPTIDASE DE MYCOBACTERIUM PHLEI

I - DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE

1) Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel de Sephadex G.150

Une estimation du poids moléculaire de la dipeptidase est obtenue par le procédé d'ANDREWS (4) par filtration de la fraction pure (0,200 mg) sur gel de Sephadex G.150, par comparaison des migrations de plusieurs protéines dont le poids moléculaire est connu (les détails expérimentaux sont précisés dans l'annexe technique, page 183). Nous utilisons des témoins dont les poids moléculaires sont les suivants :

- La γ -globuline bovine, 160.000 (156); la sérum-albumine bovine, 68.000 (156); l'ovalbumine, 43.000 (4) ; la peroxydase de raifort, 42.000 (7) ; la lipase porcine du pancréas, 38.000 (8) ; le cytochrome C, 11.700 (52).

La variation du volume d'élution en fonction du log 10 des poids moléculaires est représentée sur la figure 20. Si l'on suppose que la dipeptidase est une protéine globulaire, le poids moléculaire estimé par cette méthode est 88.000 (\pm 8.000).

2) Détermination du poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le poids moléculaire de l'enzyme est déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium, après une dénaturation et une réduction de la protéine obtenue selon le procédé de WEBER et OSBORN (253).

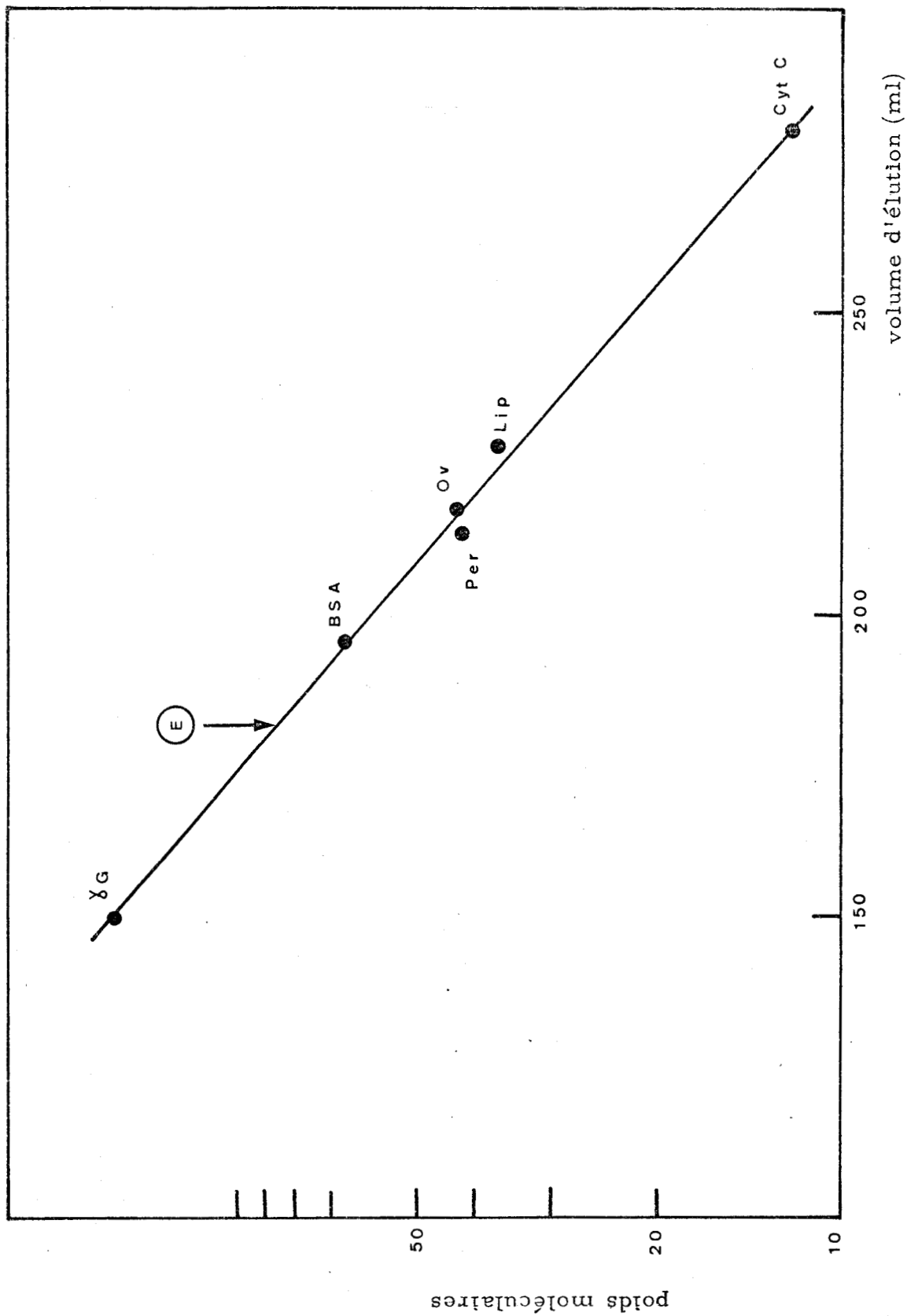


Figure 20

Détermination du poids moléculaire de la dipeptidase par filtration sur gel de Sephadex G 150

γ G : gamma globuline bovine ; B S A : sérum albumine bovine ; Per : peroxydase de Rai fort ; Ov : ovalbumine

Lip : lipase porcine ; Cyt c : cytochrome C



L'échantillon est dissout dans du dodecyl-sulfate de sodium à 1 p. 100 (p/v) avec 1 p. 100 (p/v) de mercaptoéthanol, puis chauffé 2 min à 100°C avant d'être déposé sur les gels de polyacrylamide, à 5 p. 100 et à 7,5 p. 100 d'acrylamide, contenant du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0 avec 0,1 p. 100 (p/v) de dodecyl sulfate de sodium.

L'étalonnage de la migration est réalisé avec différents marqueurs dont les poids moléculaires sont les suivants :

- La sérum-albumine bovine 68.000 (156); la chaîne lourde de γ -globuline humaine, 50.000 (156); l'ovalbumine, 43.000 (253); la lactate deshydrogénase humaine, 36.000 (pour chaque sous-unité, 38) ; la pepsine, 34.000 (72); la trypsine, 23.000 (56) et la myoglobine de coeur de boeuf, 17.000 (82).

La figure 21 représente la variation des distances de migration électrophorétique (en mm) par rapport au log de 10 du poids moléculaire des témoins marqueurs.

Cette figure représente les résultats obtenus avec les gels de polyacrylamide à 7,5 p. 100 de monomère ; les résultats sont analogues avec les gels à 5 p. 100 d'acrylamide. Le poids moléculaire de la dipeptidase, mesuré par cette méthode, est de 45.000 \pm 5.000.

Si nous comparons ce résultat à celui obtenu avec le procédé de filtration sur gel de Sephadex G.150, il semble que la dipeptidase soit associée sous forme de dimère dans son état natif.

Poids moléculaire

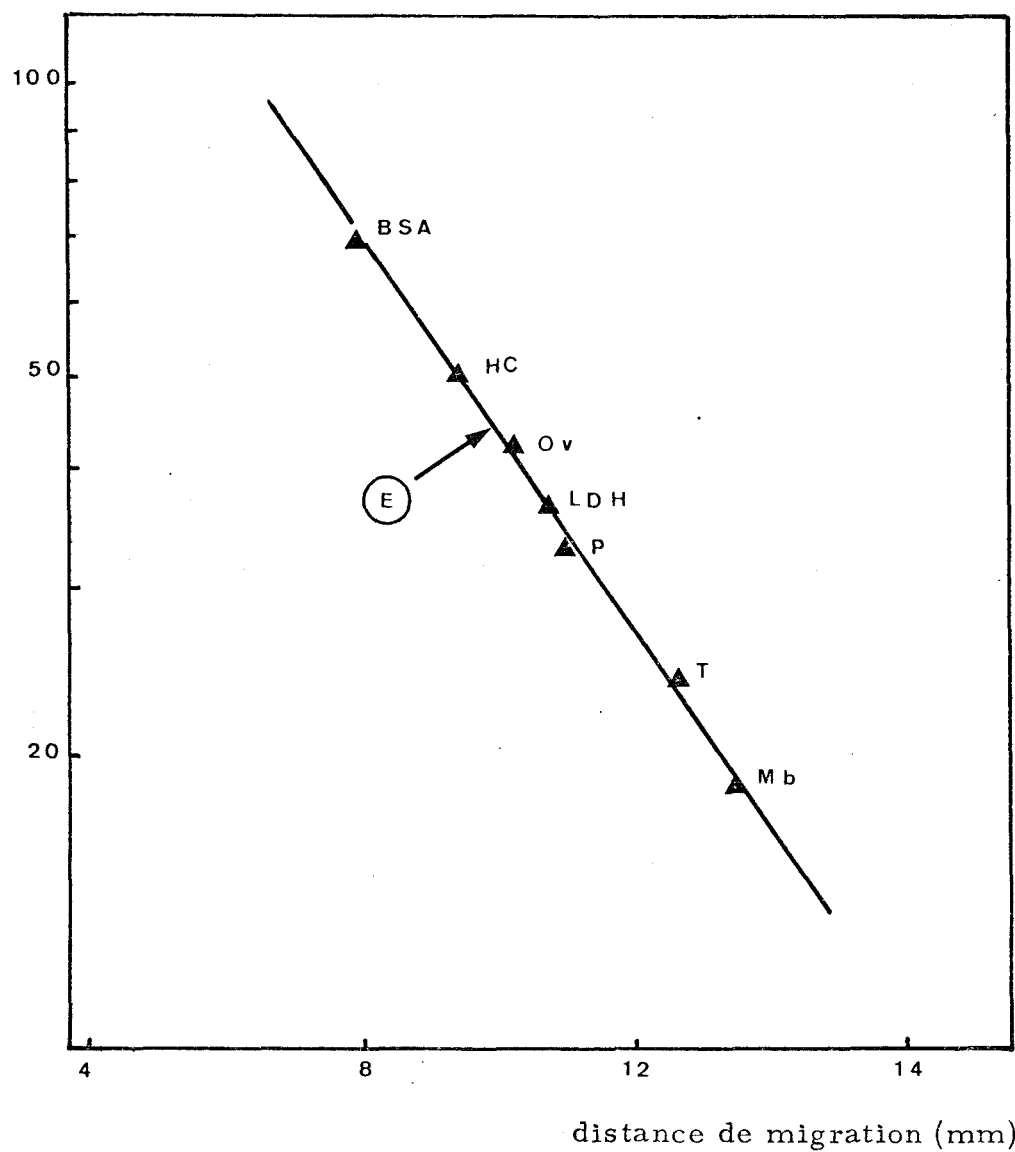


Figure 21

Détermination du poids moléculaire de la dipeptidase par électrophorèse en gel de polyacrylamide - S.D.S. à 7,5 p. 100 d'acrylamide

- E : Dipeptidase
- B S A : Sérum albumine bovine
- H. C. : Chaîne lourde de gamma globuline humaine
- Ov : Ovalbumine
- L D H : Lacticodehydrogénase
- P : Pepsine
- T : Trypsine
- Mb : Myoglobine



II - Composition en acides aminés

100 et 200 nM de protéines sont soumis à l'hydrolyse acide, dans un tube scellé sous vide, à 105°C, pendant 24 h et 72 h, en présence de deux gouttes de phénol en solution aqueuse à 5 p. 100 (v/v) (ceci afin de préserver les résidus tyrosine de la dégradation).

L'analyse des acides aminés est effectuée dans un analyseur automatique (JEOLCO type 5 AH). On réalise deux analyses pour les hydrolysats de 24 h et de 72 h. La détermination du contenu en tryptophane est obtenue par le procédé de SPIES et CHAMBERS (21) (Annexe technique page 183).

Le tableau XXII présente la composition en acides aminés des hydrolysats de 24 h et de 72 h. Le nombre de résidus, pour chaque acide aminé, est calculé pour un poids moléculaire de 45.000. Aucune différence significative n'est observée entre les hydrolysats de 24 h et de 72 h.

Nous observons un taux élevé d'acide glutamique et aspartique (tableau XXII), également d'alanine et de leucine. Le nombre de résidus histidine et tryptophane est faible et il faut remarquer un taux très bas de résidus soufrés : 3 de cystéine (ou demi-cystine) et 5 de méthionine.

Pour la plupart des dipeptidases bactériennes ou animales, la composition en acides aminés est encore inconnue. La seule analyse ayant fait l'objet d'une publication est, à notre connaissance, celle de RENE et CAMPBELL (187) pour la dipeptidase du rein de porc (la composition de cette enzyme est indiquée dans le tableau XXII).

	Hydrolysats de 24 h	Hydrolysats de 72 h	Dipeptidase de CAMPBELL (187)
Lys	16.43 (16)	17.18 (17)	29
His	8.69 (9)	8.00 (8)	10
Arg	19.75 (20)	18.51 (19)	17
Asp	42.32 (42)	44.46 (44)	39
Thr	23.54 (24)	23.98 (24)	22
Ser	22.24 (22)	21.25 (21)	28
Glu	44.09 (44)	42.87 (43)	43
Pro	21.14 (21)	20.45 (20)	21
Gly	37.17 (37)	37.19 (37)	25
Ala	46.53 (47)	47.49 (47)	32
Cys	3.00 (3)	2.76 (3)	17
Met	5.02 (5)	4.75 (5)	7
Val	26.96 (27)	27.36 (27)	27
Ile	18.74 (19)	19.92 (20)	15
Leu	37.74 (38)	37.45 (37)	41
Tyr	12.37 (12)	12.52 (13)	12
Phe	14.33 (14)	14.85 (15)	18
Trp	9.00 (9) *	8.87 (9) *	11
Total des résidus	409	409	411

(*) le contenu en tryptophane est mesuré par la méthode de SPIES et CHAMBERS (21)

TABLEAU N° XXII

Composition en acides aminés de la dipeptidase de Mycobacterium phlei,
comparaison avec celle de la dipeptidase de CAMPBELL.

Le nombre de résidus par molécule de protéine est calculé sur la base
du poids moléculaire minimum: 45.000



L'analogie entre la composition de la dipeptidase rénale et celle de la dipeptidase de Mycobacterium phlei est étroite pour les acides aminés acides (Asp, Glu) et les acides aminés basiques (Lys, Arg) de même que pour le tryptophane et l'histidine, mais la dipeptidase animale est beaucoup plus riche en cystéine (17 résidus) et en méthionine (7 résidus).

La pauvreté en acides aminés soufrés est une propriété commune à plusieurs enzymes d'origine bactérienne (183), mais c'est également un aspect particulier des protéines des Mycobactéries. ASSELINEAU et coll. (5) indiquent la faible proportion des résidus cystéine (2,2 p. 100) et méthionine (1,6 p. 100) par rapport au nombre total des résidus acides aminés pour l'ensemble des protéines de Mycobacterium phlei.

La détermination des groupes N-terminaux est établie par la technique de Dansylation de GRAY et HARTLEY (79), à la fois par chromatographie en couche mince sur feuille de polyamide et par chromatographie en couche mince de Silicagel (technique de GROS et LABOUESSE, 80). Un seul et unique groupe N-terminal, la leucine, est mis en évidence par ces deux procédés.

On met en évidence un seul groupement thiol par la méthode de SAVILLE (235). Il y a donc un seul pont disulfure dans la protéine.

III - Spécificité

L'enzyme purifiée (II) est une dipeptidase (Ec. 3.4.3.) car elle hydrolyse uniquement les dipeptides ayant les fonctions α -aminée et

α -carboxylique libres.

Les protéines, les polypeptides (répertoriés dans le tableau XX), les oligopeptides ne sont pas dégradés . Ni les tripeptides testés (répertoriés dans le tableau XXIII) ne sont hydrolysés, ni les amides des aminoacides (leucine-paranitroanilide), ni les dipeptides synthétiques ayant un radical COOH ou NH₂ substitué.

La dipeptidase de Mycobacterium phlei possède un mode d'action particulièrement large, puisqu'elle hydrolyse même les dipeptides contenant un acide D- α -aminé ou D- α -carboxylique.

Le tableau XVIII expose les différents taux d'hydrolyse des dipeptides par rapport à la vitesse d'hydrolyse obtenue avec le dipeptide Ala-Gly.

Il faut remarquer que la plupart des substrats de certaines dipeptidases, autrefois considérées comme spécifiques, sont hydrolysées. Il en est ainsi pour le Gly-Leu, le Gly-Tyr et l'Ala-Gly. Le Pro-Gly est également hydrolysé. Par contre, il est intéressant de remarquer que le Gly-Pro (Imido-dipeptidase) et le Gly-Gly (Glycyl-Glycine-dipeptidase) et le β -Ala-His (carnosinase) ne sont pas hydrolysés.

IV. - Etude des constantes de MICHAELIS-MENTEN : Km

Pour la détermination des constantes de MICHAELIS-MENTEN, l'enzyme est préincubée 30 min à 37°C dans le tampon Tris 10 mM de pH 8,0 contenant 10 mM de MgCl₂. Après cette préincubation, les vitesses initiales d'hydrolyse sont déterminées, en mesurant la cinétique d'hydrolyse des dipeptides toutes les 30 secondes, pendant 1 à 10 min. La réaction

Substrats	Activité %	Substrats	Activité %
Ala-Gly	100,0	Gly-Gly	0
Leu-Gly	59,9	D.Leu-Gly	5,0
Pro-Gly	18,2	D.Leu-L.Tyr	1,3
Val-Gly	14,4	D.Asp-Gly	1,9
Tyr-Gly	4,5	Gly-D.Leu	2,5
Leu-Ala	35,0	Gly-D.Ala	3,0
Trp-Ala	3,0	Ala-Gly-Gly	0
Lys-Leu	2,4	DL.Leu-Gly-Gly	0
Ala-Leu	9,3	Leu-Gly-Gly	0
Phe-Lys	9,9	Phe-Gly-Gly	0
Gly-Ser	75,1	Pro-Gly-Gly	0
Gly-Leu	42,6	Leu-Gly-L.Tyr	0
Gly-Trp	32,9	Met-Ala-Ser	0
Gly-Met	26,1	His-Leu-Lys	0
Gly-Val	15,2	Phe-Asp-Lys	0
Gly-Phe	12,9	Asp-Lys-Phe	0
Gly-Tyr	7,6	Gly-Lys-Phe	0
Gly-Glu	4,0	Asn-Ala-Trp	0
Gly-Ile	6,1	Gly-Leu-Tyr	0
Gly-Pro	0	Gly-Gly-Gly	0

TABLEAU N° XXIII

Spécificité de la dipeptidase .

Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au taux d'hydrolyse de l'Ala-Gly.

Concentration du substrat dans le mélange réactionnel : 5 mM, concentration en enzyme: 0,060 à 0,300 mg/ml, réaction à 37°C, pH 8,0 en présence de $MgCl_2$ 5 mM.



enzymatique est réalisée en tampon Tris 5 mM de pH 8,0 contenant 5 mM de $MgCl_2$ à 37°C, avec différentes concentrations de substrat (1 mM à 20 mM). La concentration en protéine est de 0,045 à 0,065 mg/ml (LOWRY) - (0,300 mg/ml pour la mesure du K_m avec le D.Leu-Gly).

Nous avons mesuré le K_m à l'aide du diagramme de LINEWEAVER et BURK (51) (figure 22).

Pour chaque substrat, après avoir établi ce diagramme, nous calculons le K_m selon la formule suivante :

$$K_m = [S] \frac{V_{max} - v}{v}$$

"[S]" est la concentration du substrat (mM), "Vmax" : vitesse maximum mesurée exprimée en $\mu M/min/mg$, "v" est la vitesse d'initiale d'hydrolyse correspondant à chaque concentration du substrat. Les différentes valeurs obtenues (tableaux XXIV et XXV) sont les suivantes :

$K_m = 1,25$ mM pour le L.Leu-Gly, 3,1 mM pour le L.Ala-Gly, 6,03 mM pour le Gly-L.Leu et 21 mM pour le D.Leu-Gly.

L'affinité de la dipeptidase est donc plus grande lorsqu'un résidu hydrophobe (Leu ou Ala) est en position N-terminale et cette affinité est beaucoup moins grande pour les résidus de la série D.

v - Influence du pH .

a) Stabilité de la préparation enzymatique en fonction du pH

Pour la fraction S G.100, la stabilité de la préparation enzymatique a été étudiée entre les pH 4,0 et 12 :

- en tampon acétate de soude 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM (pH 4,0 à 5,5),
- en tampon Tris succinate 50 mM $MgCl_2$ 10 mM (pH 5 à 7,0),
- en tampon Tris maléate 50 mM $MgCl_2$ 10 mM (pH 6 à 10),
- en tampon véronal sodé 50 mM $MgCl_2$ 10 mM (pH 7 à 12).

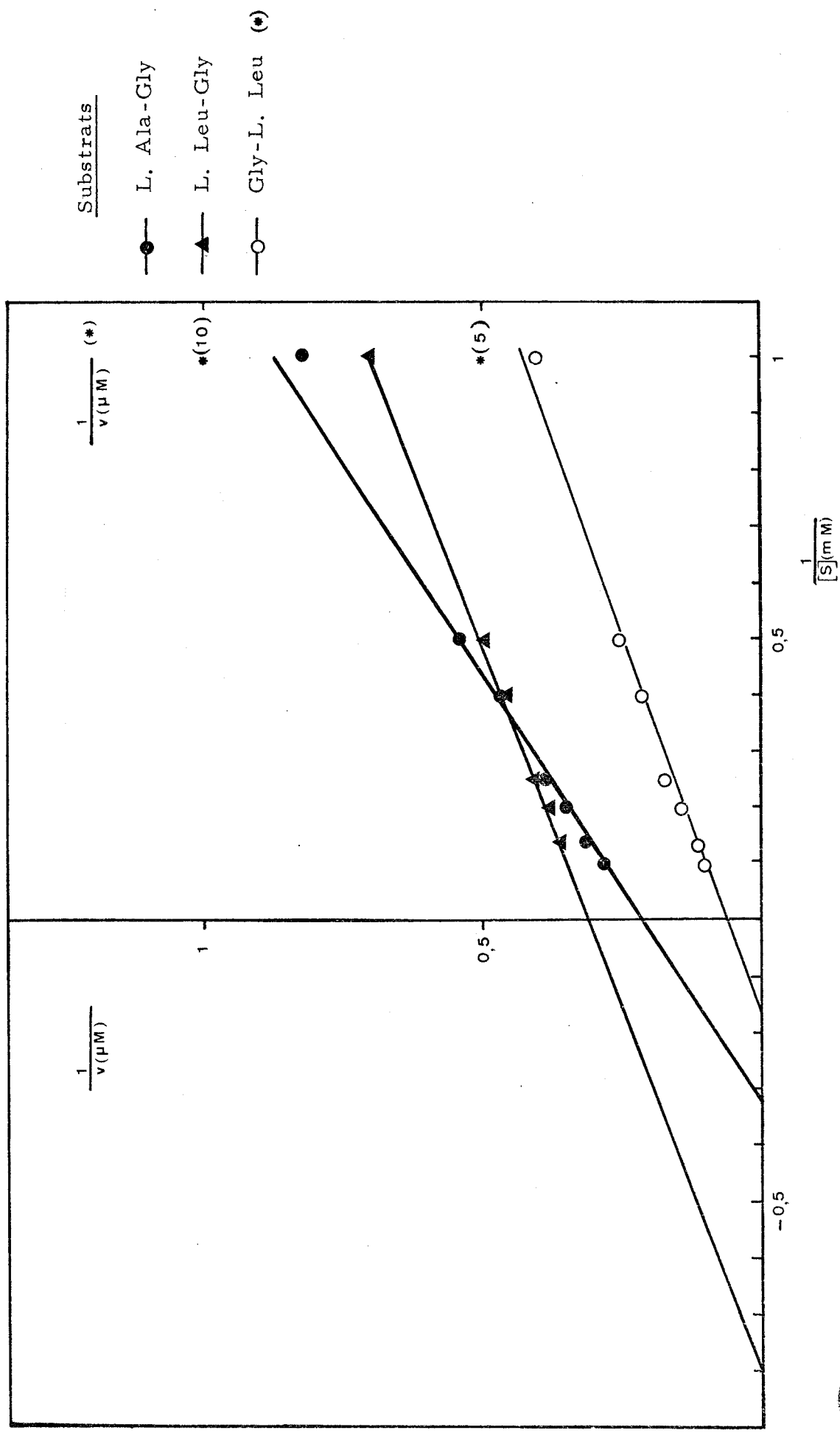


Figure 22

Détermination de la constante de Michaelis par le diagramme de Lineweaver et Burk



Substrat : L.Ala-Gly				
[S]	1/[S]	v	1/v	$K_m = [S] \frac{(V_{max} - v)}{v}$
mM	1/mM	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	$1/\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	mM
1,0	1,0	1,222	0,818	2,80
2,0	0,5	1,851	0,540	3,02
2,5	0,4	2,166	0,461	2,82
4,0	0,25	2,555	0,391	3,20
5,0	0,2	2,814	0,355	3,26
7,5	0,13	3,148	0,317	3,58
10,0	0,10	3,555	0,281	3,08
				Moyenne = 3,12
Valeurs mesurées $1/V_{max} = 0,215$; $V_{max} = 4,65 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; $1/K_m = 3,30$ $K_m = 3,03 \text{ mM}$				

Substrat : L.Leu-Gly				
[S]	1/[S]	v	1/v	$K_m = [S] \frac{(V_{max} - v)}{v}$
mM	1/mM	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	$1/\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	mM
1,0	1,0	1,426	0,701	1,29
2,0	0,5	2,037	0,490	1,22
2,5	0,4	2,204	0,454	1,21
4,0	0,25	2,480	0,403	1,28
5,0	0,2	2,680	0,372	1,10
7,5	0,13	2,730	0,366	1,50
				Moyenne = 1,26
Valeurs mesurées $1/V_{max} = 0,305$; $V_{max} = 3,28 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; $1/K_m = 0,8$ $K_m = 1,25 \text{ mM}$				

TABLEAU N° XXIV

Détermination de la constante de MICHAELIS-MENTEN : K_m 

Substrat : Gly-L.Leu				
[S]	1/[S]	v	1/v	$K_m = [S] \frac{(V_{max} - v)}{v}$
mM	1/mM	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	$1/\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	mM
2	0,5	0,408	2,45	5,5
2,5	0,5	0,472	2,11	5,6
4,0	0,25	0,584	1,70	6,4
5,0	0,2	0,704	1,42	5,8
7,5	0,13	0,880	1,13	5,5
10,0	0,10	0,910	1,09	6,8
				Moyenne = 5,93
Valeurs mesurées $1/V_{max} = 0,65$; $V_{max} = 1,53 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; $1/k_m = 0,165$ $K_m = 6,06 \text{ mM}$				

Substrat : D.Leu-Gly				
[S]	1/[S]	v	1/v	$K_m = [S] \frac{(V_{max} - v)}{v}$
mM	1/mM	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	$1/\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$	mM
2,0	0,5	0,021	47,6	21,8
2,5	0,4	0,024	41,6	23,5
4,0	0,25	0,048	20,8	16,8
5,0	0,2	0,049	20,4	20,5
7,5	0,13	0,062	16,1	22,7
10,0	0,10	0,082	12,19	20,4
				Moyenne = 20,95
Valeurs mesurées $1/V_{max} = 4,0$; $V_{max} = 0,25 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; $1/K_m = 0,475$ $K_m = 21,0 \text{ mM}$				

TABLEAU N° XXV

Détermination de la constante de MICHAELIS-MENTEN : K_m 

La préparation enzymatique est incubée 4 h à la température de 20°C avec les différents tampons. Puis la réaction enzymatique est mesurée à pH 7,0 à 37°C, en présence de $MgCl_2$, 5 mM. L'activité relative est mesurée en pourcentage de l'activité optimale obtenue après une incubation à pH 7,0 (figure 23). L'enzyme est stable aux pH basiques essayés, instable en pH acides inférieurs à 6,0.

b) Influence du pH sur l'activité peptidasique

L'influence du pH sur l'activité dipeptidasique est mesurée avec la fraction pure en tampon Tris-maléate 10 mM, contenant 1 mM de $MgCl_2$ entre les pH 5,5 et 13,0.

L'activité optimale se situe entre les pH 9,5 et 10,0. A pH 8,0 l'activité de la dipeptidase atteint respectivement 26 p. 100 et 39 p. 100 de l'activité optimale, pour le L.Ala-Gly et le L.Leu-Gly (figure 24).

VI - Influence de la température

a) Stabilité de la préparation enzymatique en fonction de la température

Nous avons mesuré la variation de l'activité dipeptidasique après une incubation de durée variable (0 à 2 h) à différentes températures, en présence ou en absence de $MgCl_2$ ou de $MnCl_2$, 5 mM et 10 mM.

Puis la réaction enzymatique est pratiquée à 37°C, en présence de Mg^{2+} 5 mM, ou Mn^{2+} 5 mM et nous calculons le pourcentage d'activité par rapport à l'activité initiale sans incubation.

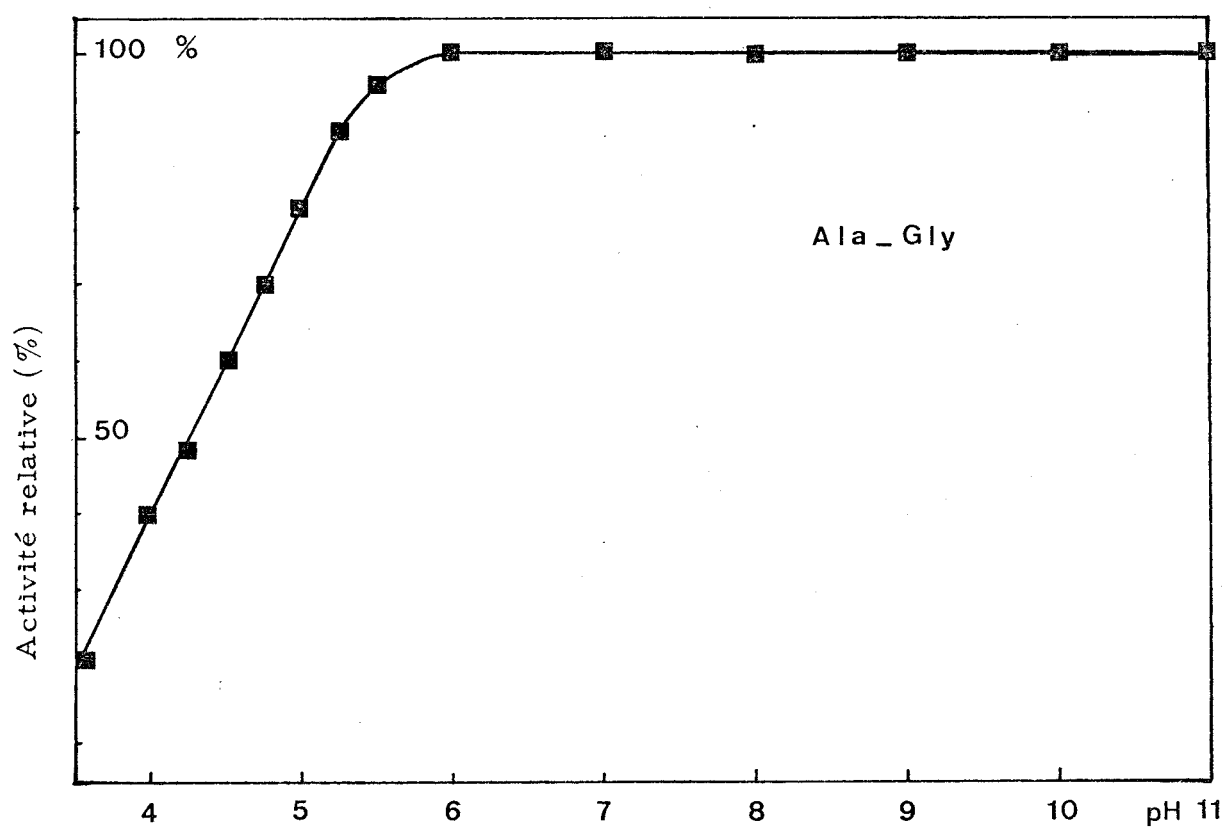


Figure 23

Variation de l'activité dipeptidasique après une incubation de 4 h à différents pH ;

Température 20°C

puis mesure de l'activité dans les conditions habituelles



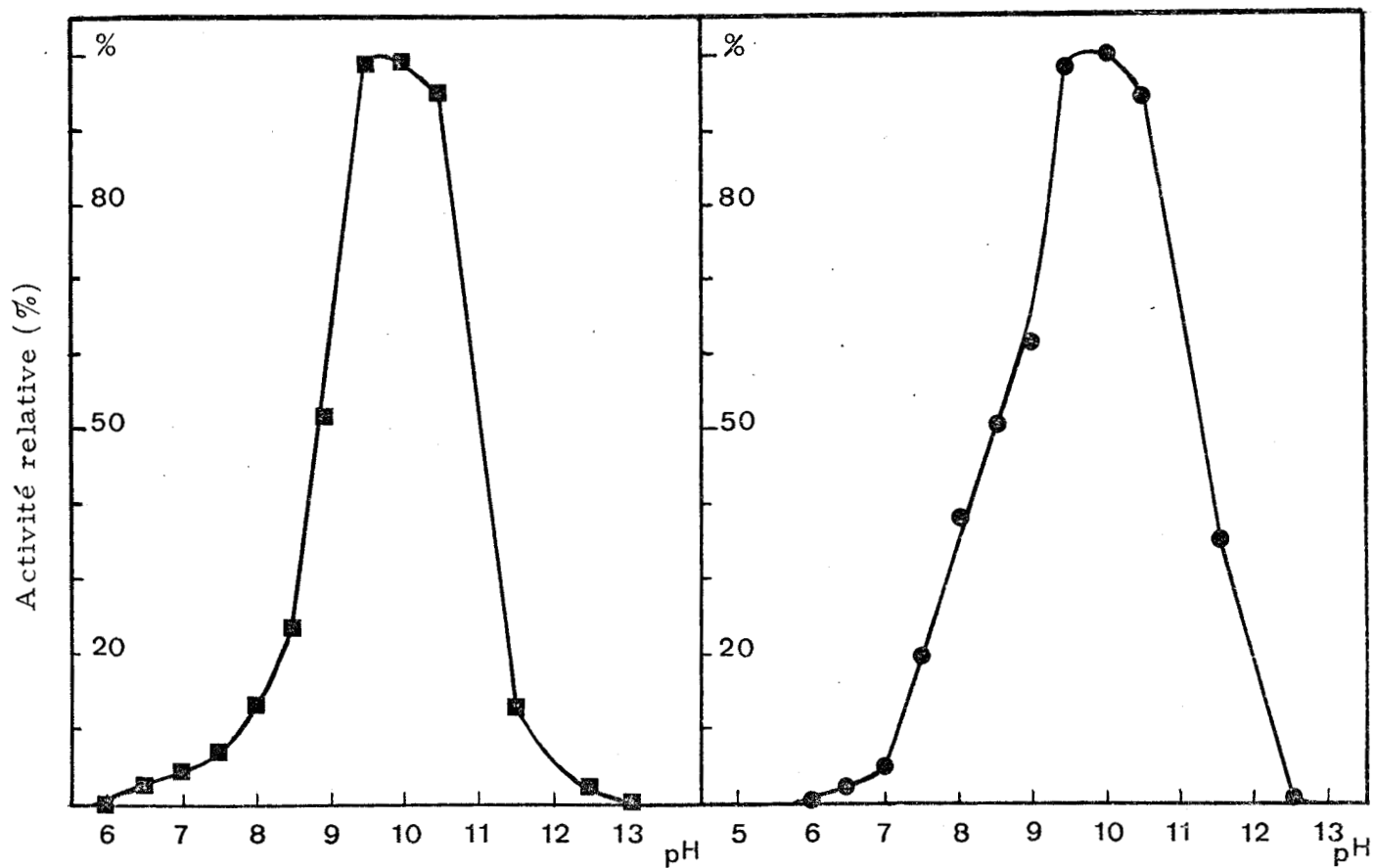


Figure 24

Courbe d'activité en fonction du pH

Ala-Gly ■ activité optimale : 40,6 u. Leu-Gly ● 22,0 u
 Tampon Tris maléate 10 mM MgCl₂ 1 mM

Les résultats obtenus pour l'hydrolyse du Leu-Gly sont reportés sur la figure 25 ; ils sont analogues pour le Ala-Gly. Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

a) L'ion Mg^{2+} joue un rôle important dans la stabilité de l'enzyme ; en effet, il protège les préparations de la dégradation observée à 37°C et à 45°C en absence d'ions métalliques.

Sans incubation préalable avec le magnésium, l'enzyme est très instable, 50 p. 100 de l'activité est perdue après 15 min d'incubation à 37°C. Le manganèse protège également l'enzyme de la dégradation, mais à un degré moindre.

b) La préparation contenant du Mg^{2+} est stable jusqu'à 45°C; au delà, l'activité décroît rapidement.

c) Il est nécessaire d'incuber l'enzyme 30 min à 37°C à pH 8,0 avec le $MgCl_2$ pour obtenir l'activité maximale. Plusieurs essais nous ont montré que pour assurer la stabilité de la dipeptidase pure, une concentration en $MgCl_2$ de 1 mM est suffisante.

b) Influence de la température sur l'activité peptidasique

Une préincubation en tampon Tris 10 mM, pH 8,0 contenant 1 mM de $MgCl_2$ est pratiquée à 37°C pendant 30 min avant la mesure de l'activité peptidasique à différentes températures (figure 26). Dans ces conditions, l'activité maximale se situe à 52,5°C pour tous les dipeptides utilisés, Ala-Gly, Leu-Gly, Pro-Gly.

En effet, la cinétique d'hydrolyse est linéaire pendant des temps relativement courts : 1 à 5 min à 50°C et 52,5°C, après quoi

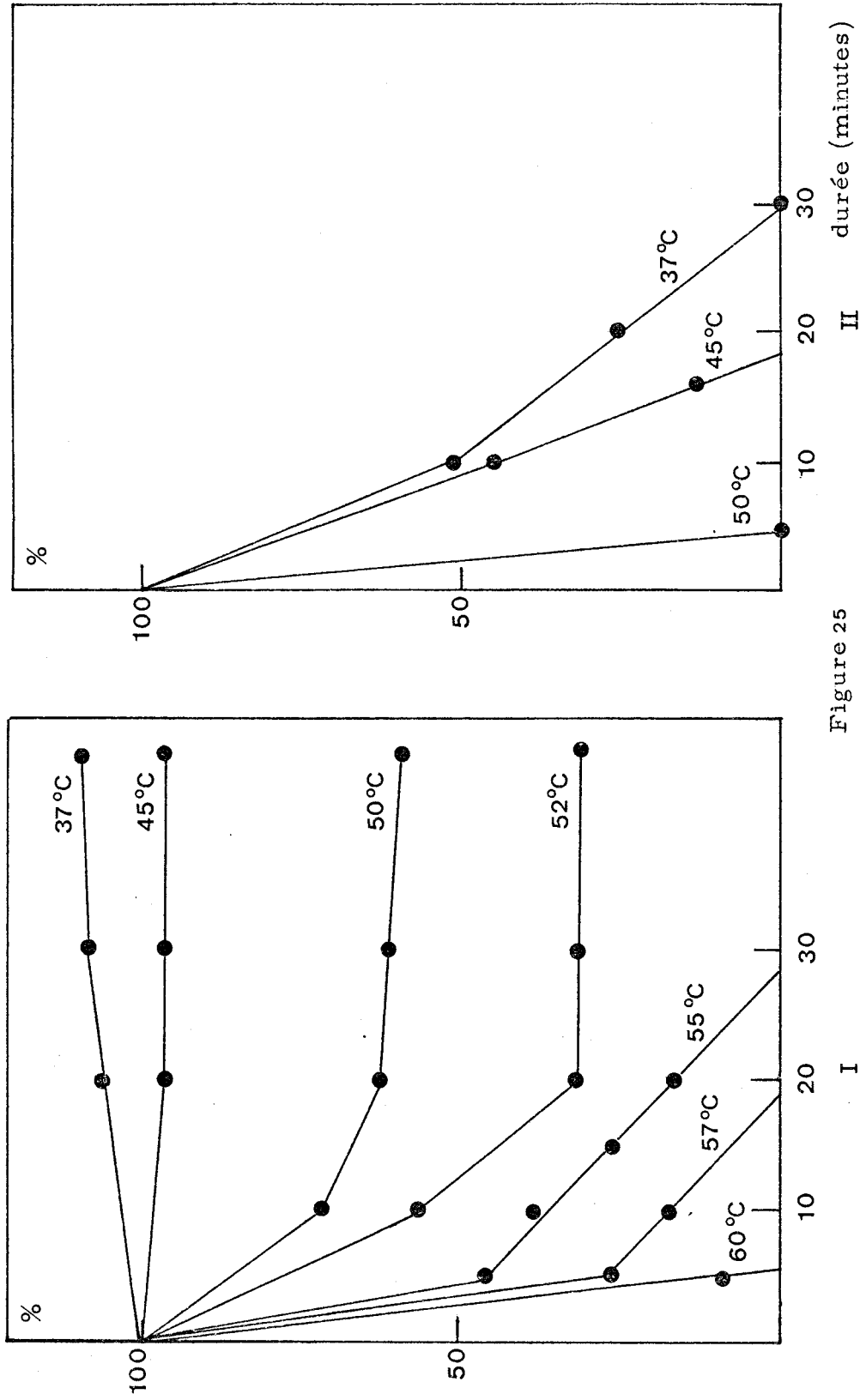


Figure 25

Activité de la préparation enzymatique après incubation de durée variable à différentes températures

Activité relative en pourcentage par rapport à l'activité initiale sans incubation

I - incubation en présence de Mg²⁺ 10 mM ; II - incubation sans ions métalliques

Incubation aux températures suivantes : 37, 45, 50, 52, 55, 57 et 60 °C



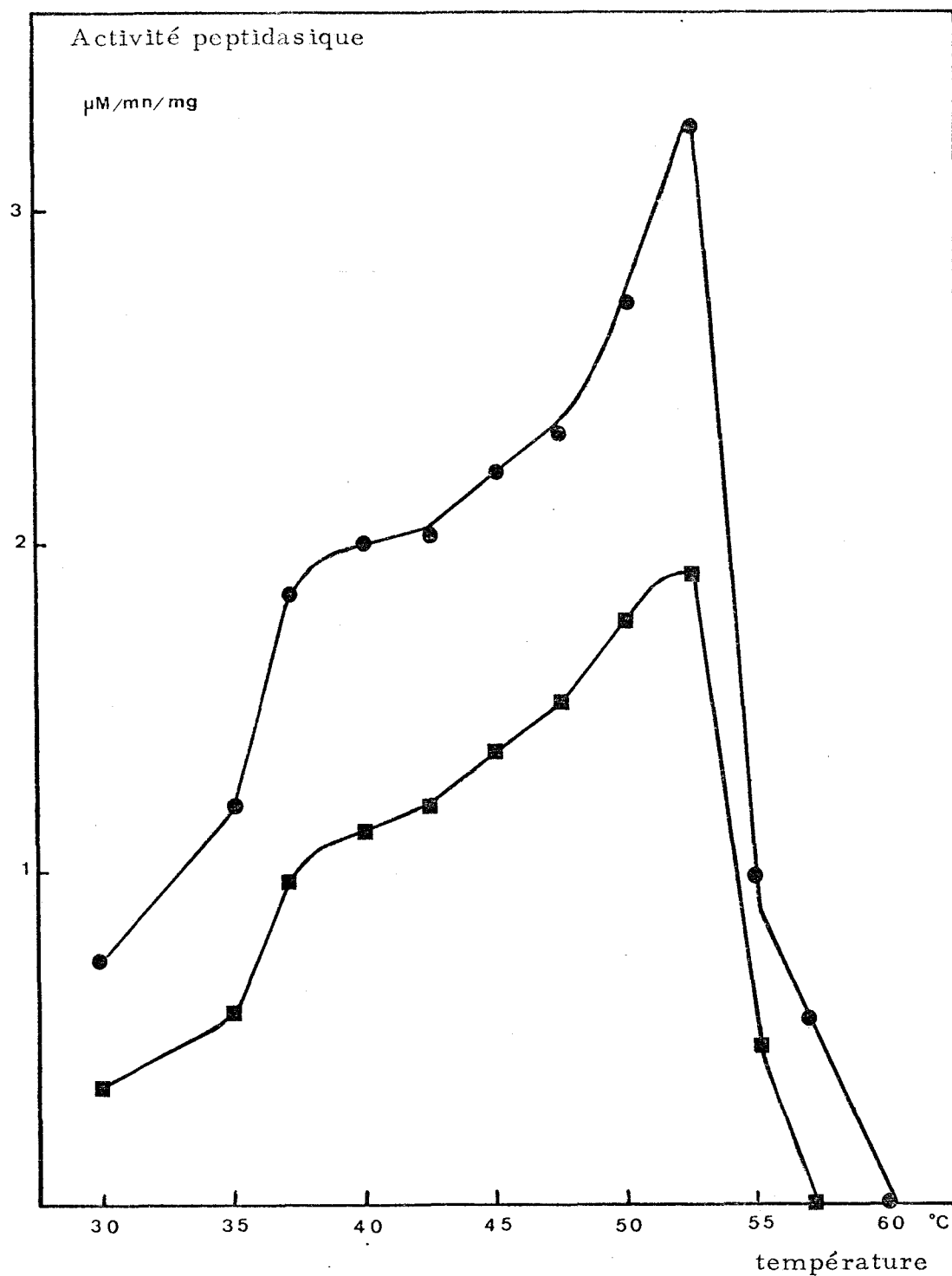


Figure 26

Variation de l'activité de la préparation en fonction de la température

substrat : Ala-Gly ● , Leu-Gly ■

concentration en substrat 5 mM. Concentration en protéine 0,150 mg/ml ;
préincubation 30 minutes à 37°C en Tampon tris 10 mM - Mgcl 2 1 mM
puis mesure de l'activité peptidasique aux différentes températures

l'enzyme est inactivée. A 37°C, l'activité peptidasique à l'égard du Leu-Gly et de l'Ala-Gly, atteint seulement la moitié de l'activité maximale, mais la stabilité de l'enzyme est beaucoup plus grande à 37°C. LEWIS et HUMPHREY (123) ont montré que, pour les enzymes instables, les conditions les plus favorables de mesure de l'activité, sont réalisées en choisissant, pour le processus d'incubation, une température inférieure à celle où l'activité est maximale.

Ainsi, toutes les mesures de l'activité enzymatique ont-elles été réalisées à 37°C.

VII - Influence des inhibiteurs

L'action des divers activateurs inhibiteurs est résumée dans le tableau XXVI.

La préparation enzymatique est laissée en contact avec l'inhibiteur à la concentration indiquée pendant 30 min à 37°C et à pH 8,0 avant l'addition du substrat.

L'activité peptidasique est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport à un échantillon témoin.

Les agents chélateurs : O.phénanthroline, E.D.T.A. et cystéine (10 mM) inhibent l'activité peptidasique. L'action de l'E.D.T.A. et de l'O.phénanthroline est particulièrement forte. On peut donc penser que des ions métalliques sont nécessaires à la catalyse enzymatique.

La préincubation de l'enzyme avec les réactifs des groupements thiols : P.C.M.B., N-éthylmaléimide, acide iodoacétique, ne modifie pas l'activité hydrolytique de la dipeptidase ; seul l'iodoacétamide inhibe partiellement l'activité enzymatique (36 p. 100). Le groupement thiol

Inhibiteurs	Concentration	Substrats	
		L. Ala-Gly % Inhibition	L. Leu-Gly % Inhibition
O Phénanthroline	1 mM	92,7	95,3
E.D.T.A.	1 mM	98,1	98,7
	2 mM	99,6	99,2
Cystéine	10 mM	51,6	57,5
2 Mercaptoéthanol	1 mM	11,7	13,4
P.C.M.B.	1 mM	0	0
Iodoacétate	1 mM	0	0
Iodoacétamide	1 mM	36,7	27,8
N.E.M.	1 mM	0	0
D.F.P.	1 mM	0	0

TABLEAU N° XXVI

Influence des inhibiteurs sur l'activité dipeptidasique

Résultats exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin non traité. Concentration du substrat 5 mM, concentration en protéines 0,252 mg/ml. Préincubation de l'enzyme 30 min dans le tampon Tris 10 min. pH 8 à 37°C avec les différents inhibiteurs, puis mesure de la cinétique d'hydrolyse de 2 à 10 min à 37°C.



libre de l'enzyme ne semble donc pas participer à la catalyse au site actif de l'enzyme.

Le D.F.P. n'étant pas inhibiteur de la dipeptidase, celle-ci ne possède sans doute pas de sérine active au centre catalytique de l'enzyme.

VIII - Influence des ions métalliques

En l'absence d'inhibition préalable, l'addition des ions métalliques suivants : Mn^{2+} et à un moindre degré le Mg^{2+} , le Sn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Pt^{2+} , favorise la réaction enzymatique (Tableau XVII). D'autres ions comme le Fe^{2+} , le Pb^{2+} , le Hg^{2+} , produisent au contraire une inhibition à des degrés divers. L'hydrolyse du Ala-Gly est inhibée par le cobalt et plus légèrement par le cuivre, tandis que l'hydrolyse du Leu-Gly est activée par ces deux ions métalliques. Le Mn^{2+} et le Mg^{2+} réactivent fortement la préparation inhibée par dialyse contre l'E.D.T.A. 1 mM (1 v/100 v) sous agitation magnétique à 4°C pendant 2 heures. Cette réactivation est obtenue par une préincubation de 30 min à 37°C dans le tampon Tris 10 mM à pH 8 en présence des ions métalliques à différentes concentrations (Tableau XXVIII). La réactivation est plus importante en présence de Manganèse (0,5 mM) qu'en présence de Magnésium.

Nous avons obtenu l'apoenzyme en traitant l'enzyme par l'O.phénanthroline 1 mM en tampon Tris 1 mM pH 8 à 20°C, en agitation magnétique 30 min. Ce traitement est suivi d'un dessalage sur gel de Sephadex G.25, qui permet d'éliminer l'O.phénanthroline. L'apoenzyme ainsi obtenue est réactivée par le Mn^{2+} ou le Mg^{2+} (2,5 mM et 5 mM) en incubation dans le tampon Tris 1 mM à pH 8 pendant 30 min à 37°C. L'enzyme

est totalement réactivée (Tableau XIX), il n'y a pas de réactivation par le Zinc ou par le Cobalt dans les mêmes conditions.

La dipeptidase est donc activée par des ions métalliques, fortement inhibée par les complexants des métaux et réactivée par le Manganèse et le Magnésium.

La liaison du métal avec la protéine semble relativement faible, car il suffit d'une dialyse à 4°C en absence d'ions métalliques pour inactiver l'enzyme.

Les ions métalliques auraient une fonction double d'activation et de stabilisation, comme l'ont montré les expériences d'incubation à différentes températures, en présence ou en absence de métal.

Pourcentage d'activation ou d'inhibition par rapport au témoin		
Composés	L.Leu-Gly %	L.Ala-Gly %
Mn ²⁺	+ 772	+ 263
Mg ²⁺	+ 176,2	+ 119,5
Sn ²⁺	+ 174,1	+ 174,4
Zn ²⁺	+ 195,0	+ 86,7
Cu ²⁺	+ 160,3	- 7,4
Ca ²⁺	+ 112,5	+ 89
Pt ²⁺	+ 31,9	+ 107,3
Co ²⁺	+ 54,7	- 64,1
Pb ²⁺	- 17,9	- 58,8
Fe ²⁺	- 85,6	- 84,4
Hg ²⁺	- 100	- 96,4

TABLEAU N° XXVII

Action des ions métalliques

La préparation enzymatique (0,172 mg/ml) est préincubée pendant 30 min à 37°C dans du tampon Tris 10 mM pH 8 en présence des ions métalliques à la concentration de 0,5 mM. Mesure de la cinétique d'hydrolyse en 2, 5, 8 et 10 min à 37°C.



Pourcentage de réactivation après action de l'EDTA			
Métal	Concentration en ions	S U B S T R A T S	
		Leu-Gly	Ala-Gly
Mn ²⁺	0,1 mM	+ 334,1	+ 241,4
	0,5 mM	+ 338,6	+ 243,9
	1 mM	+ 267,8	+ 202,6
	5 mM	+ 95,8	+ 108,0
	10 mM	+ 89,7	+ 104,8
Mg ²⁺	0,1 mM	+ 179,4	+ 230,3
	0,5 mM	+ 201	+ 237,5
	1,0 mM	+ 202	+ 246,7
	5 mM	+ 171,2	+ 180,7
	10 mM	+ 150,7	+ 149

TABLEAU N° XXVIII

Réactivation par les ions métalliques après
action de l'EDTA



Ions métalliques	Concentration	Pourcentage de réactivation par rapport au témoin non traité
		Substrat : Leu-Gly
Mn ²⁺	2,5 mM	70
	5 mM	113
Mg ²⁺	2,5 mM	110
	5 mM	109
Zn ²⁺	2,5 mM	0
	5 mM	0
Co ²⁺	2,5 mM	0
	5 mM	0

TABLEAU N° XXIX

Réactivation par les ions métalliques de l'apoenzyme obtenue après traitement de l'enzyme par l'O.phénantholine suivi d'un dessalage sur Sephadex G.25



DISCUSSION

ET

CONCLUSION

Les propriétés des dipeptidases, en particulier d'origine bactérienne, sont jusqu'ici peu connues, ceci essentiellement en raison des difficultés que présente leur purification du fait de leur instabilité, en raison du manque de substrats spécifiques permettant de les caractériser et en raison de leur localisation dans un milieu complexe comportant plusieurs types d'activités peptidasiques.

Les essais de caractérisation des enzymes, décrites comme dipeptidasiques, ont laissé apparaître des ambiguïtés qui nous conduisent à les identifier avec plus de rigueur à l'aide de plusieurs substrats. A cet effet, nous avons mis au point une technique de dosage qui permet de mesurer l'hydrolyse d'une gamme étendue de peptides, et notamment, de dipeptides du type Gly-X.

Il s'est avéré nécessaire de délimiter quelles peptidases avaient un champ d'action commun à celui des dipeptidases étudiées. Aussi fallait-il préciser l'équipement peptidasique de Mycobacterium phlei 689.

Nous avons établi que les activités dipeptidasique et aminopeptidasique sont localisées essentiellement dans la fraction intracellulaire soluble, et que les propriétés endopeptidasiques et carboxypeptidasiques sont absentes dans cette fraction ; ces activités étant associées, principalement, dans nos conditions expérimentales, aux fractions particulières. Nous avons mis au point un procédé qui permet d'extraire une quantité importante de matériel intracellulaire tout en garantissant l'intégrité de la dipeptidase.

Nous avons démontré que la fraction cytoplasmique soluble contient cinq exopeptidases (une dipeptidase et quatre aminopeptidases) qui présentent certaines propriétés hydrolytiques communes à l'égard des dipeptides. Trois

de ces aminopeptidases (I, III et IV) ont des charges électrophorétiques et un poids moléculaire très voisins de ceux de la dipeptidase (II).

Nous avons réussi à isoler chaque peptidase et à obtenir des préparations présentant une seule bande protéique en gel de polyacrylamide ; ceci en quantité suffisante pour définir la spécificité de ces enzymes :

- L'aminopeptidase I a un profil de spécificité proche de celui de l'aminopeptidase I d'Escherichia coli (248), ou apparenté à celui de certaines Leucine aminopeptidases des tissus animaux (56).

- Les aminopeptidases II et III présentent une spécificité voisine de celle de l'aminopeptidase (M) (Ec. 3. 4. 1. 2.) mais possèdent en outre, plusieurs caractéristiques communes à certaines aminopeptidases bactériennes (147) : les acides α -aminés de configuration D, en position N-terminale sont hydrolysés (D.Leu-Gly) et, d'une façon générale, la dégradation des dipeptides est plus rapide que celle des oligopeptides. Comme l'aminopeptidase M (173), ces deux enzymes hydrolysent les groupements L- α -aminés et L- α -iminés en position N-terminale.

Ces deux peptidases ont des propriétés voisines, mais des charges électrophorétiques et des poids moléculaires différents.

- L'aminopeptidase V hydrolyse uniquement les acides α -aminés de la série L en position N-terminale. Les propriétés hydrolytiques de cette enzyme sont plus restreintes que celles des enzymes décrites ci-dessus, et ses propriétés spécifiques la différencient à la fois de la Leucine aminopeptidase (Ec. 3. 4. 1. 1.) et de l'aminopeptidase M (Ec. 3. 4. 1. 2.). Cette aminopeptidase est extrêmement instable.

Quantitativement, dans les conditions choisies de croissance et de rupture des bactéries, l'activité des aminopeptidases intracellulaires,

à l'égard des dipeptides, est beaucoup plus faible (50 fois) que celle de l'une des enzymes (dipeptidase II) que nous avons purifiée.

La purification de la dipeptidase de Mycobacterium phlei s'effectue en cinq étapes comprenant :

- 1 - la précipitation des acides nucléiques par le sulfate de Streptomycine,
- 2 - l'adsorption sur gel d'hydroxylapatite,
- 3 - la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium,
- 4 - l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide.

Seule cette dernière étape permet de séparer la dipeptidase de l'aminopeptidase I. Malgré les précautions prises, il se produit une dénaturation partielle, et, par la suite, il est difficile de préciser le taux de purification. Par rapport à l'activité de l'extrait cellulaire brut, le taux est estimé égal à 1000 au moins. Le produit final est pur, puisqu'il présente une seule bande de protéine en gel d'acrylamide, un seul arc de précipitation en immunodiffusion et un seul acide aminé N-terminal, qui est la leucine.

La dipeptidase native serait un dimère dont le poids moléculaire est 88.000 (\pm 8.000), alors que la protéine dissociée a un poids moléculaire de 45.000 (\pm 5.000). Les dipeptidases du rein des animaux ont des poids moléculaires du même ordre de grandeur, en particulier celle purifiée par CAMPBELL (34, 32) (90.000, sous unités 47.200). Pour la plupart de ces enzymes, la composition en acides aminés est inconnue. Pour les seuls travaux publiés : ceux de RENE et CAMPBELL (187), la dipeptidase d'origine animale est beaucoup plus riche en demi-cystine et en méthionine que la dipeptidase de Mycobacterium phlei, mais elle est plus pauvre en alanine et en lysine. Il faut remarquer la richesse en acides dicarboxyliques de ces deux dipeptidases, ce qui expliquerait le pH optimum voisin

de 9,5 pour lequel la plupart des groupes carboxyliques sont ionisés. Un ou plusieurs de ces résidus pourraient participer au site actif de l'enzyme.

Il ne semble pas que le groupement thiol de la dipeptidase soit impliqué dans le processus catalytique et qu'il y ait un groupement sérine au centre actif de l'enzyme. Mais le produit étudié étant instable et difficile à extraire et à purifier, nous n'avons pu l'obtenir en quantité suffisante pour pouvoir entreprendre l'étude chimique et préciser la nature des groupements actifs.

La dipeptidase de Mycobacterium phlei est une métalloenzyme, puisqu'elle est activée par les ions métalliques Mn^{2+} et Mg^{2+} , inhibée par les chélateurs des métaux, et que l'apoenzyme est réactivée par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} .

L'effet protecteur des ions métalliques, du Magnésium en particulier, indique le rôle du métal dans le maintien de la conformation de l'enzyme. Comme l'indique, d'une part l'inactivation de la dipeptidase par simple dialyse à 4°C dans un tampon dépourvu d'ions métalliques et, d'autre part, la nécessité de la présence constante de Magnésium, pour éviter la dénaturation de l'enzyme au cours de la purification, la liaison entre le métal et la protéine est relativement faible. Cette liaison pourrait être comparée à celle des métaux avec la Leucine aminopeptidase de SMITH (56). Ainsi, la dipeptidase de Mycobacterium phlei se classerait parmi les complexes enzyme-métal.

Pour la Leucine aminopeptidase qui hydrolyse en priorité le Leu-Gly (ainsi que la dipeptidase de Mycobacterium phlei), les ions métalliques sont impliqués à la fois dans la stabilisation de l'enzyme (le Mg^{2+} en particulier) et dans son activation (le Mn^{2+} plus que le Mg^{2+})

travaux de SMITH et coll., 1955 (220). Par la suite HIMMELHOCH (95) a montré que pour l'enzyme native, le zinc pourrait assurer ces deux fonctions. Il indique aussi que, selon la nature du métal ajouté à la préparation enzymatique, le déplacement du zinc par un autre métal, provoque un effet activateur (Mg^{2+} mais surtout Mn^{2+}) ou un effet inhibiteur (Cd^{2+}).

La Leucine aminopeptidase est activée par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} , inhibée par le Cd^{2+} et le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , le Pb^{2+} ; l'addition Zn^{2+} , de Co^{2+} , de Ca^{2+} , de Ni^{2+} , n'a pas ou peu d'effet sur cette enzyme. Le Pt^{2+} n'a pas été testé par ces auteurs (220, 95).

Des études cinétiques ont montré qu'il y a un seul ion métallique par site actif de l'enzyme et SMITH et coll. (218) proposent un mécanisme d'action dans lequel l'ion métallique paraît attaché à un imidazole ou à un groupe epsilon aminé, non ionisé, pour former un complexe de coordination ternaire entre le substrat et l'enzyme.

Le processus catalytique serait différent pour la dipeptidase de CAMPBELL (32, 187) qui hydrolyse également des dipeptides dont la structure est analogue à celle de ceux dégradés par notre peptidase (Ala-Gly, Leu-Gly). Par suite de leur étude de l'hydrolyse de certains dipeptides catalysés par le cuivre, CAMPBELL et coll. (35,33) ont proposé un mécanisme d'action impliquant la dissociation des protons du groupe α -aminé du substrat et l'activation d'une molécule d'eau coordonnée au zinc au site actif de l'enzyme.

Ainsi, le rôle activateur de certains métaux pour notre peptidase (du platine en particulier), pourrait s'expliquer par une catalyse de l'hydrolyse des dipeptides. La dipeptidase rénale purifiée par CAMPBELL contient du zinc dans son état natif (un atome par gramme de molécule, PM 47.200).

Pour la dipeptidase de Mycobacterium phlei 689, l'apoenzyme obtenue, après traitement par l'O.phénanthroline et élimination de l'agent chélateur, n'est pas réactivée par le zinc, alors qu'elle est pleinement réactivée par le Manganèse et le Magnésium.

On peut donc supposer, soit la présence au centre catalytique de l'enzyme, d'un ion métallique autre que le zinc, soit la nécessité d'un autre métal, pour réaliser la structure fonctionnelle de l'enzyme.

L'action des cations bivalents, sur la dipeptidase purifiée de Mycobacterium phlei, fait apparaître une divergence de réaction entre l'hydrolyse du Ala-Gly qui est inhibée par le Co^{2+} (64 p. 100 d'inactivation) et celle du Leu-Gly qui est activée par le même métal (57 p. 100 d'activation). La substitution d'un métal à un autre peut modifier la spécificité de certaines peptidases ; ainsi, l'incubation de la zinc-carboxypeptidase A avec le Co^{2+} double l'activité peptidasique, alors que l'activité estérasique reste inchangée (FOLK, 1960, 69), et des faits analogues ont été observés aussi pour les dipeptidases par HAYMAN et coll. (92) et par CORDONNIER (43) : la dégradation du Ala-Gly est inhibée par le Co^{2+} et celle du Gly-Gly et du Gly-Ser est activée par le même métal. CAPOBIANCO et coll. (36) ont observé une dualité de la réaction de la peptidase du rein de porc (purifiée 6.000 fois) avec le Co^{2+} , celui-ci activant l'hydrolyse de Gly-Gly et inhibant celle du Gly-Leu et du Leu-Gly. Aucune des tentatives de ces différents chercheurs pour séparer deux types d'activité n'a réussi, et CAMPOBIANCO et coll. présentent des arguments en faveur de l'existence d'une seule enzyme. Toutefois, l'absence de contamination de leurs préparations enzymatiques par une Glycyl-Glycine dipeptidase n'a pas été totalement démontrée. Il est donc intéressant de montrer que l'activité de la dipeptidase purifiée de

Mycobacterium phlei est modifiée en présence de certains ions comme le cobalt, mais que cette enzyme est toujours inactive à l'égard du glycyL-glycocolle.

Pour que les dipeptidases (Ec. 3. 4. 3.) (56) soient actives, il faut essentiellement un dipeptide ayant à la fois un groupement α -aminé libre et un groupement α -carboxylique libre. L'enzyme II de Mycobacterium phlei est bien une dipeptidase, mais qui présente quelques caractères particuliers. Le mode d'action de cette enzyme est peu spécifique, puisque la plupart des dipeptides sont hydrolysés et en particulier les dipeptides comprenant un acide α -aminé de la série D en position C-terminale, ou bien en position N-terminale. Mais l'activité catalytique et l'affinité de l'enzyme à l'égard de ces dipeptides, sont toutefois plus faibles que celles montrées pour les dipeptides de configuration L. A notre connaissance, aucune dipeptidase présentant une telle activité n'a encore été purifiée. En effet, la plupart des dipeptidases ont une action étroitement limitée aux dipeptides de la série L, et celles du rein des animaux ne sont actives, à l'égard des dipeptides contenant un acide D- α -aminé, que lorsque celui-ci est en position C-terminale.

La dipeptidase de Mycobacterium phlei présente une activité hydrolytique peu spécifique, elle hydrolyse les dipeptides de type $H_2N-X-Y-COOH$, X et Y sont de nature indifférente, sauf pour le Gly-Gly, le Gly-Pro et le β -Ala-His qui ne sont pas hydrolysés.

Notre étude a permis de préciser les propriétés d'une dipeptidase d'origine bactérienne. Nos observations à propos de la pluralité des exopeptidases intracellulaires rejoignent celles de plusieurs chercheurs (223, 224). SUSSMAN et GILVARG ont observé, par exemple, chez Escherichia coli.

quatre peptidases intracellulaires, intervenant dans le catabolisme d'un système bien défini : les dipeptides et oligopeptides de la lysine. Il ressort de ces travaux concernant Escherichia coli, qu'il existe au moins huit peptidases différentes dans la fraction intracellulaire, nombre qui accroît la difficulté de l'étude de la régulation de ces enzymes. Contrairement aux aminopeptidases, la plupart des dipeptidases bactériennes étudiées précédemment, présentaient une action limitée à quelques substrats. Le pouvoir catalytique étendu de dipeptidase de Mycobacterium phlei est quantitativement beaucoup plus important que celui des aminopeptidases intracellulaires et le rôle éventuel de cette enzyme, dans les fonctions de nutrition ou de détoxication, serait à considérer.

A- METHODES DE DOSAGE

I- MESURE DES ACTIVITES PEPTIDASQUES1) Technique de dosage de TACQUET et coll. (230)

Ce procédé a été mis au point en 1964 par TACQUET, GUILLAUME et LEFEBVRE (230) pour l'étude taxinomique des Mycobactéries. La dégradation des dipeptides est mesurée au moyen d'une technique semi-quantitative dérivée de celle de STEIN et MOORE (222).

a) Contact germe peptide

0,1 ml de suspension bactérienne est mélangé à 0,1 ml de solution de peptide dans un tampon de potassium 0,15 M de pH 7. La durée de contact est de 20 à 40 h, à 37 °C. Le Gly-Trp est employé à la concentration de 0,2 p 100 (p/v); les autres dipeptides à 0,1 p 100 (p/v). Les suspensions bactériennes contiennent 1 à 10 mg de bactéries par ml (poids sec).

b) Dosage des acides aminés libérés

La réaction colorée est effectuée de la façon suivante:

—On ajoute 0,1 ml d'une solution à 0,75 p 100 (p/v) de 2.4.dinitrofluorobenzène dans du n-butanol. Pour le Gly-Trp, on utilise 0,5 ml de cette solution.
—Le tout est placé au bain-marie bouillant, pendant 50 secondes exactement, puis refroidi à 4 °C.

—On ajoute alors 6 ml de n-butanol et 1,5 ml d'une solution de ninhydrine à 0,2 p 100 (p/v) dans le n-butanol saturé de tampon citrate (0,2 M de pH 5). Après un séjour de 15 min au bain-marie à 70 °C, le mélange est refroidi; la coloration est lue au spectrophotomètre à 590 nm, sous une épaisseur de 5 mm, dans l'heure qui suit la réaction:

Nous avons mesuré la densité optique de la coloration donnée par les gammes témoins de dipeptides et d'acides aminés (voir le paragraphe suivant)

La densité optique des préparations correspondant à 100 p 100 d'hydrolyse varie entre 0,75 et 1,50 selon les dipeptides utilisés; celle des témoins contenant les dipeptides non-hydrolysés se situe entre 0 et 0,06; la densité optique des témoins-bactéries est négligeable. Cette technique de dosage est semi-quantitative: elle permet de mesurer le taux d'hydrolyse d'une concentration bien définie de dipeptide, mais ne permet pas l'évaluation précise de l'activité enzymatique ni la comparaison entre les diverse activités puisqu'elle nécessite des concentrations moléculaires variables selon le substrat utilisé. Nous avons donc sélectionné d'autres procédés de dosages.

2) Variante de la technique de dosage de MATHESON et TATTRIE

a) Réactifs

Solution mère de ninhydrine à 5 p 100 (p/v) dans le méthyl cellosolve (monométhyl éther de l'éthylène glycol, Merck), cette solution est stable 6 mois à la température du laboratoire.

Solution de ninhydrine de YEMM et COCKING (265). La solution mère est diluée au sixième dans le méthyl cellosolve contenant 2 p 100 (v/v) de KCN 0,01 M. Cette solution doit être préparée 24 heures avant l'usage; elle est stable 8 à 10 jours à 4 °C lorsque le flacon est clos hermétiquement.

Tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 5,0. Cette solution est préparée extemporanément.

b) Protocole expérimental

Les échantillons à doser (0,1 ml à 0,3 ml) sont dilués dans l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 ml puis on ajoute 0,5 ml de tampon citrate de sodium et 1,2 ml de réactif à la ninhydrine. Les tubes sont fermés hermétiquement, placés au bain-marie 7 min. 30 sec exactement,

à 100 °C, puis refroidis 5 min dans l'eau glacée. La coloration est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 570 nm. La lecture est faite par rapport à un "blanc" contenant 1 ml d'eau distillée et les réactifs employés, sans acide aminé ni peptide.

3) Technique de PLANCOT et HAN (180)

a) Réactifs

Solution mère de ninhydrine. Elle est identique à celle décrite ci-dessus. Cette solution est diluée au sixième au moment de l'emploi, dans le méthylcellosolve contenant 2 p 100 (v/v) de solution d'acide ascorbique 0,4 M dans l'eau distillée.

Tampon acétate de sodium. 0,2 M de pH 4 et 0,025 M en acétate de Cadmium: cette solution est préparée extemporanément.

Nous avons préparé des gammes étalons contenant des proportions variables du dipeptide et du mélange équimoléculaire des acides aminés constitutifs, représentant le produit de l'hydrolyse du dipeptide.

Exemples:

-témoin avant hydrolyse: Leu-Gly 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$, sans acides aminés;

-5 p 100 d'hydrolyse = leucine 0,25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ + glycocolle 0,25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ + Leu-Gly 4,75 $\mu\text{M}/\text{ml}$;

-10 p 100 d'hydrolyse = leucine 0,50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ + glycocolle 0,50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ + Leu-Gly 4,50 $\mu\text{M}/\text{ml}$;...etc

Les solutions étalons sont faites dans de l'eau distillée et conservées au congélateur à -20 °C.

b) Protocole expérimental.

Les échantillons à doser, 10 μl à 0,3 ml, sont dilués dans l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 ml, puis on ajoute 0,5 ml

de tampon acétate de sodium + acétate de cadmium, et 1,2 ml du réactif à la ninhydrine. Les tubes sont fermés hermétiquement, placés au bain-marie à 70 °C pendant 10 minutes exactement, puis refroidis dans de la glace pendant 5 minutes. La coloration du milieu réactionnel est rouge (sauf pour la proline et pour les peptides ayant la proline en position N-terminale, qui sont colorés en jaune); elle est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 500 nm. La lecture est faite par rapport à 1 "blanc" contenant de l'eau distillée et les réactifs employés. La coloration est stable pendant plusieurs heures. Lorsque la densité optique est trop grande, la lecture est faite immédiatement après dilution dans l'eau distillée.

La densité optique obtenue après la réaction ninhydrine-cadmium est proportionnelle aux taux d'acides aminés libres jusqu'à 2,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ce qui correspond à 50 p 100 d'hydrolyse pour un dipeptide dont la concentration initiale est 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (tableau n° V).

Pour chaque substrat nous établissons une gamme étalon, et nous effectuons dix mesures pour chacune des dix concentrations de la gamme. Ces opérations nous permettent d'obtenir pour chaque peptide la courbe de la densité optique obtenue en fonction de la concentration en acides aminés libres, nous nous référons à cet étalonnage pour le titrage de l'hydrolyse du peptide.

c) Mesure de la cinétique d'hydrolyse d'un peptide:

La réaction est effectuée de la manière suivante: 0,1 ml d'une préparation enzymatique dans le tampon Tris 10 mM contenant 10 mM de MgCl_2 et de pH 8, est mélangé au bain-marie à 37 °C avec 0,1 ml d'une solution de peptide (10 mM) dans l'eau distillée stérile. L'arrêt de l'hydrolyse aux différents temps est effectuée par addition de 0,1 ml d'acide acétique 0,1 N

et refroidissement dans la glace. Le volume est alors amené à 1 ml par de l'eau distillée et le dosage s'effectue dans les conditions décrites précédemment.

4) Hydrolyse de la Leucine- β -Naphtylamide

Nous évaluons la quantité de β -Naphtylamide libérée par l'hydrolyse de la Leu β -Naphtylamide (Sigma) selon le procédé de GOLBARG et RUTENBURG (75) après avoir mesuré les densités optiques obtenues par une gamme témoin de β -Naphtylamine de (0,1 μ M/ml à 1 μ M/ml)

II - DOSAGE DE DIVERSES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1) Mesure de l'activité phosphatasique (Ec 3. 1. 3. 1.) (31)

L'hydrolyse de P.N.P.P. (400 mM) a lieu à 37 °C en tampon Tris 10 mM, de pH 8, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoéthanol 1 mM, elle est arrêtée par addition de tampon phosphate de potassium 40 mM, pH 8, contenant de L'E D T A 8 mM (3 volumes pour un volume d'hydrolysats)

La quantité de P.N.P. libérée est mesurée au spectrophotomètre à 410 nm. Une unité d'enzyme correspond à l'activité libérant dans nos conditions 1 nM de P.N.P. en 1 heure.

2) Dosage de l'activité lipasique (Ec 3. 1. 1. 3.)

L'activité lipasique est évaluée par la technique colorimétrique d'ANDREJEW et coll (3) en utilisant la tributyrine (Sigma) comme substrat.*

3) Dosage de l'activité peroxydasique (Ec 1. 11. 1. 7.)

L'activité des éluats de chromatographie est décelée par le test colorimétrique d'ANDREJEW et coll (2)* Ce procédé est semi quantitatif, mais il permet de repérer le pic d'éluat de la lipase, en rapport avec l'activité d'un témoin (Lipase porcine du pancréas, N.B.C.)

III - DOSAGE DES PROTEINES

Technique de YOUNG (266): on mélange, dans des tubes en pyrex, 1 ml de suspension cellulaire et 1 ml d'acide trichloracétique à 10 p 100 (p/v). Les tubes sont chauffés 15 minutes à 90 °C puis refroidis 20 heures à 4 °C, enfin centrifugés à 600 x g, 20 minutes. Les protéines précipitées sont homogénéisées puis dissoutes dans de la soude, 0,05 N. Pour chaque titrage on prélève trois échantillons (0,4 ml) qui sont dosés par la technique de LOWRY (130), la sérum albumine bovine étant prise comme référence.

La densité optique des éluats de chromatographie est mesurée à 280 nm sur un spectrophotomètre Zeiss.

B- OBTENTION DU MATERIEL BACTERIEN

I- METHODES DE CULTURE

La souche de Mycobacterium phlei 689 est entretenue sur milieu solide de LOWENSTEIN-JENSEN (37); on ensemence à partir de ce milieu des fioles dites "à toxine", contenant un litre de milieu liquide; ces fioles sont placées en agitation à 30 °C.

1) Culture en milieu liquide de YOUNG (37)

Nous utilisons un milieu semi-synthétique contenant:

L.Asparagine	5g
Phosphate monopotassique	5g
Sulfate de potassium	0,5g
Citrate de magnésium	0,5g
Citrate de fer	0,05g
Glycérine bidistillée	20ml
H ₂ O	q.s.p. 1000 ml

Le milieu est ajusté à pH 7,2 avec de la soude 1 N et stérilisé

20 minutes à 115 °C; puis on ajoute stérilement: 110 ml de fraction V de sérum albumine bovine à 5 p 100 (p/v) stérilisée par filtration sur bougie L 3. La durée de la culture en agitation est de 7 jours à 30 °C.

2) Culture en fermenteur - Procédé de ROOS (191)

Pour les cultures en masse nous utilisons un milieu minéral simple, le milieu de SAUTON:

Asparagine	4g
Acide citrique	2g
Phosphate bipotassique	0,5g
Sulfate de magnésium	0,5g
Citrate de fer	0,05g
Glycérine bidistillée	48ml
H ₂ O	q.s.p. 1000 ml

Le milieu est stérilisé: 1 h 30 à 120 °C. Les bactéries sont cultivées en fiole à toxine contenant 1 litre de SAUTON en agitation pendant 5 à 6 jours pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance. Cette préculture est inoculée stérilement dans les fermenteurs. Le pH au cours des cultures est maintenu constant (pH 7,2) par addition automatique de HCl 1 N ou de NH₄OH 1 N. Une faible oxygénation est nécessaire pendant la phase de latence (↑ 1 par min); la vitesse d'agitation du milieu est de 200 tours/min; après 24 h le débit d'air est augmenté (3l/min), vitesse d'agitation 300 tours/min; puis du 2ème au 5ème jour, le débit d'air est de 5 l/min, la vitesse d'agitation de 400 tours/min.

Les bactéries sont recueillies stérilement par un système de centrifugation en continu du type Szent - Gyorgyi et Blum. La suspension bactérienne est envoyée dans une centrifugeuse par surpression d'air stérile. Les bactéries, après lavage à l'eau distillée stérile sont recueillies et

lavées en tampon Tris 10 mM contenant 10 mM de $MgCl_2$ et de pH 7,5.

II - RUPTURE DES BACTERIES - BROYAGE AVEC DE LA ZEOLITHE

Le broyage est réalisé en chambre stérile, dans un mortier de porcelaine préalablement refroidi avec son pilon à $-20\text{ }^{\circ}C$ et placé dans la glace pendant la manipulation. La masse bactérienne (10 g poids humide) est mélangée, à l'aide du pilon, au double de son poids en zéolithe 4 A sèche, ajoutée par petites quantités successives et soigneusement homogénéisées avec le matériel cellulaire. Après la dernière addition de Zéolithe, l'ensemble est malaxé le temps nécessaire pour obtenir un mélange pulvérulent, puis de consistance visqueuse. On ajoute alors lentement 60 ml de tampon stérile et froid. Le broyat est centrifugé à $600\times g$ pendant 20 minutes, à $4\text{ }^{\circ}C$; le culot, constitué par la Zéolithe et les bactéries intactes qui subsistent, est éliminé.

C- TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

I- Electrophorèse préparative en film liquide*

L'appareil utilisé est un appareil ELPHOR-Vap construit par BENDER et HOBEIN (Munich).

Les conditions expérimentales sont les suivantes:

- concentration en protéines: 250 mg dans 15 ml de tampon
- débit de la solution de protéines: 2,6 à 2,8 ml/heure
- débit du tampon: 114 ml/h.
- le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris 80 mM, acide citrique 8 mM de pH 8,6.

*Nous remercions M. le Dr. Moschetto qui nous a permis de réaliser l'électrophorèse en film liquide dans son laboratoire à l'Unité de l'INSERM n° 16.

-l'injection du tampon d'électrophorèse entre les plaques de verre (film liquide de 0,5 ml d'épaisseur se fait par six trous. Dans les trous 1 et 6 on injecte le tampon d'électrode dans les quatre autres le tampon d'électrophorèse trois fois plus dilué.

La solution à fractionner est introduite du côté cathodique. La tension aux bornes est de 1700 volts soit 30 volt/mm, et l'intensité est de 100 mA; la température est maintenue à 5 °C.

II- Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide

Les électrophorèses sont pratiquées en colonnes de pyrex de 8 x 80 mm selon la technique de DAVIS (48) la concentration en acrylamide est de 7,5 p 100 pour le gel de migration et 2,5 p 100 pour le gel d'espacement. (La composition des gels est indiquée au tableau n° XXX). (Le persulfate d'ammonium et le T.E.M.E.D. sont des produits Canalco, l'acrylamide et le bisacrylamide des produits Ape lab.)

Quand cela est nécessaire les gels sont additionnés de dodécyl sulfate de sodium (S.D.S.) à 0,26 p 100 (p/v) et d'urée 6 M selon le procédé de SHAPIRO et coll (217).

Le tampon d'électrophorèse est le tampon de DAVIS (48): Tris 6 p 1000 (p/v), glycoColle 28,8 p 1000 (p/v) pH 8,3. La tension d'électrophorèse est de 85 à 200 volts et l'intensité réglée de façon constante à 5 mA par colonne. La migration a lieu de la cathode vers l'anode.

Les colonnes sont montées sur l'appareil à électrophorèse (Shandon) et l'échantillon est déposé (25 µl) sous forme d'un mélange à parties égales de glycérol à 15 p 100 (v/v) et de protéines (10 à 100 µg) contenant des traces de bleu de bromophénol (0,006 p 100) (p/v), comme colorant traceur.

Après fixation, 1 heure dans l'acide trichloracétique à 12,5 p 100 (p/v), les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie.

Composants Composition des gels en g ou ml pour 100 ml :			Electrophorèse préparative			Electrophorèse analytique	
			gels : inférieurs		d'espacement	inférieur	d'espacement
			A	B	C		
Matrice des gels	Monomère d'acrylamide	(p/v)	15 %	7,5 %	2,5 %	7,5 %	3,75 %
	Bis acrylamide (1)	(p/v)	0,10	0,20	0,725	0,20	0,72
Catalyseurs de polymérisation	T.E.M.E.D. (2)	(v/v)	0,050		-	0,05	
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	(p/v)	0,070		-	0,043	
	Riboflavine	(p/v)	-		0,0005	-	
Substances tampon :	Acide borique	(p/v)	0,060		-	-	
	Tris (3)	(p/v)	0,650		0,575	4,517	
	HCl 1 N	(v/v)	-		-	6,4	
	H ₃ PO ₄ 1 N	(v/v)	-		3,2	-	
	pH		9		6,5	8,8	
	Mg Cl ₂	(p/v)	0,06		0,04	-	
	Urée	(p/v)	-		-	36,36	
	Dodécyl sulfate de sodium	(p/v)	-		-	0,26	

TABLEAU N° xxx

Composition des gels d'acrylamide



- (1) Bis = N N' Méthylène bis acrylamide
(2) T.E.M.E.D. = N.N.N'.N' tétraméthylène diamine
(3) Tris = trishydroxyméthylaminométhane

III- Electrophorèse sur gel mixte de polyacrylamide - agarose

Nous préparons un gel mixte d'acrylamide agarose à 7 p 100 d'acrylamide selon le procédé d'URIEL (239). La composition finale des gels est la suivante: agarose 0,80 p 100 (p/v), monomère d'acrylamide 0,7 p 100 (p/v), N N' méthylène bis acrylamide 0,09 p 100 (p/v), N.N.N'.N' tétraméthyléthylène diamine 0,06 p 100 (v/v). Les dimensions des gels sont 123 mm x 220 mm et 2 mm d'épaisseur. Huit réservoirs de 10 mm x 1 mm et de 1,5 mm de profondeur sont situés à 50 mm du bord du gel correspondant à la cathode. Pour le lavage des gels et l'électrophorèse nous avons préféré, au tampon d'URIEL, un tampon dépourvu de glyocolle, nous utilisons le tampon Tris 2 p 100 (p/v) acide borique 0,2 p 100 (p/v) de pH 9 contenant du MgCl 1 mM. Le tampon de lavage est renouvelé deux fois en 48 heures (4 litres de tampon).

Les échantillons (5 à 10 mg/ml en protéines) sont mélangés à parties égales avec de l'agarose (Agarose A 37. Industrie Biologique Française) 0,5 p 100 (p/v) maintenue en surfusion à 42 - 45 °C, et déposés dans les réservoirs (25 µl). Ces opérations sont effectuées très rapidement (30 secondes au maximum) pour éviter la dénaturation des enzymes. L'électrophorèse est pratiquée verticalement à 4 °C, l'intensité du courant est réglée (régulateur de courant Shandon) à 16 mA sous une tension de 220 à 250 volts pendant 3 heures. La migration a lieu de la cathode vers l'anode.

La réaction de caractérisation des peptidases est réalisée immédiatement après la migration électrophorétique des constituants.

D- CHROMATOGRAPHIES - ELECTRO - CHROMATOGRAPHIES

1) -Chromatographies sur papier

Les chromatographies sur papier sont effectuées sur feuilles de papier Whatman n° 1 à l'aide du système solvant, n Butanol-acide acétique-eau (4/1/5) (v/v)

2) -Electrochromatographies sur papier

En première dimension (sur la plus grande dimension de la feuille) d'une feuille de papier Whatman n° 3, on effectue une électrophorèse en toit à pH 3,9 en tampon pyridine-acide acétique-eau (60/200/9740) (v/v): durée de l'électrophorèse 15 h; 450 volts. En deuxième dimension, on effectue une chromatographie descendante pendant 18 h, dans le solvant: n butanol-acide acétique-eau (4/1/5) (v/v).

3) -Chromatographies sur échangeur d'ions

La DEAE-cellulose (Whatman) a été régénérée selon la technique de WINTERSBERGER (258). Les DEAE-Sephadex A 25, A 50 (Pharmacia) sont régénérés selon le procédé décrit par URIEL et AVRAMEAS (240); la CM-Sephadex C 50 par la méthode préconisée par le fabricant (les échangeurs d'ions Sephadex, septembre 1966, I, BECKMAN HANSSON A.B. Suède).

E - DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE

1) Filtration sur gel de Sephadex G 150

Le gel de Sephadex est préparé selon la technique d'ANDREWS (4). La colonne de gel (2 cm x 115 cm) est équilibrée pendant 3 jours à 4 °C en tampon Tris 10 mM KCl 100 mM de pH 8,0 contenant 1 mM de MgCl₂. Le débit est de 9 ml par heure. Le volume des fractions recueillies de 1,5 ml.

L'échantillon déposé au sommet de la colonne (2 ml) contient 0,200 mg de peptidase pure, et différents témoins. La concentration des marqueurs est la suivante: bleu dextran 2000 (Pharmacia), 3 mg; gamma globuline humaine (Poviet Amsterdam), 40 mg; sérum albumine bovine (Poviet Amsterdam) 40 mg; ovalbumine, 40 mg; lipase porcine du pancréas (Nutritional Biochemical Corporation), 5 mg; Cytochrome de coeur de cheval (N B C), 10 mg.

peroxydase de raifort (grade II Boehringer) 1 mg. Le volume d'éluat est le volume émergent mesuré à partir du dépôt de l'échantillon. Les résultats obtenus présentent la moyenne de trois essais. La densité optique des éluats de la filtration est mesurée à 280 nm, à 615 nm (bleu dextran), et à 416 nm (cytochrome C). Pour la gamma globuline, la sérum albumine et l'ovalbumine, la composition des différents pics de protéine est confirmée par électrophorèse sur gélose par rapport à des témoins purs. L'activité lipasique à l'égard de la tributyrine est mesurée par la technique semi quantitative d'ANDREWS (4) par rapport à un témoin contenant 1 mg/ml de lipase pure. Il en est de même pour la peroxydase.

2) Détermination du poids moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide contenant du dodecyl sulfate de sodium. (207) (255)

La migration électrophorétique est réalisée en tubes (2 mm × 200 mm) contenant du gel de polyacrylamide à 5 p 100 ou à 7,5 p 100 sur une longueur de 150 mm, et du gel de concentration à 2,5 p 100 d'acrylamide (20 mm). Les gels sont montés sur un appareil d'électrophorèse (Quickfit) le tampon d'électrophorèse est le tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0 contenant 1 p 100 (p/v) de dodecyl sulfate de soude.

L'intensité du courant est maintenue constante à 8 mA par tube (bloc régulateur Shandon) pendant 4 heures. La migration a lieu de la cathode vers l'anode. Les gels sont ensuite fixés et colorés par le bleu de coomassie.

Les dépôts d'échantillons comprennent 3 µl de traceur; (bleu de bromophénol, à 0,05 p 100, p/v) 1 goutte de glycérol bidistillé; 5 µl de mercaptoéthanol; 50 µl de tampon et 50 µl de solution de protéine (0,2 mg à 0,6 mg/ml). La concentration de la solution de peptidase est de 0,6 mg/ml (LOWRY).

Les témoins marqueurs sont les suivants:

-(en dehors de ceux déjà cités au précédent paragraphe).

-la lactate deshydrogénase humaine *, la pepsine et la trypsine (Sigma),
la myoglobine de coeur de boeuf et le bleu de bromophénol (R A L - Vasse).

F - MISE EN EVIDENCE DES CONSTITUANTS EN GEL D'ELECTROPHORESE, OU EN
IMMUNODIFFUSION.

1) Caractérisation des peptidases.

a) Gel d'acrylamide

Nous avons adapté le procédé de LEWIS et HARRIS (122) pour l'électrophorèse en gel d'acrylamide agarose ou en gel d'acrylamide. Immédiatement après l'électrophorèse, les gels sont mis en incubation à 37 °C, dans un réactif obtenu en mélangeant extemporanément: 25 ml d'une solution de peptide (20 à 40 mg), et, 25 ml d'une préparation comprenant 5 mg d'odanisidine hydrochloride (Sigma), 10 mg de peroxydase de raifort. (Boehringer POD II), 20 mg de venin de *Crotalus adamanteus* (Sigma) et 1 mg de $MnCl_2$. Tous ces constituants sont en solution dans le tampon phosphate de sodium 0,2 M de pH 7,5. La durée du contact enzymatique est de 5 minutes à quelques heures suivant le substrat utilisé et le degré de pureté de la préparation.

Dès que la coloration apparaît sur la plaque d'acrylamide agarose, la distance de migration de la zone active est mesurée, et un croquis est établi sur papier millimétré, de plus une encoche est pratiquée dans le gel au niveau de la réaction.

*Préparée par Monsieur le Dr. HAN et coll. Technique de Pfleiderer et coll.(174)

Ceci permet de localiser exactement les peptidases en dépit des phénomènes de diffusion et de l'instabilité de la coloration. De plus cette précaution permet le repérage de la bande protéique active lors d'une coloration ultérieure par le bleu de Coomassie.

b) Immuno diffusion

La mise en évidence de l'activité peptidasique au niveau des arcs de précipitation en immuno diffusion nécessite certaines précautions.

En effet, l'immunsérum contient des peptidases et il est nécessaire de laver soigneusement les lames avant de procéder à la réaction qui s'effectue à 37 °C avec le réactif décrit au paragraphe précédent.

2) Coloration des protéines

a) Fixation

Les plaques d'acrylamide agarose ou les disques d'acrylamide sont fixés une heure dans l'acide trichloracétique à 12,5 p 100 (p/v).

Les lames d'électrophorèse sur gélose sont fixés 3 heures dans une solution d'éthanol à 60 p 100 contenant 2 p 100 d'acide acétique concentré.

b) Coloration par le bleu de Coomassie

Le bleu de Coomassie (brillant blue R) a été introduit comme colorant des protéines par FAZEKAS DE ST. GROTH et coll (61). Pour certaines protéines il a un pouvoir de coloration supérieur à celui du noir d'amide (239)

La solution du bleu de Coomassie 0,5 p 100 (p/v) est faite dans le solvant d'URIEL: - Alcool méthylique 40 p 100 (v/v), acide acétique 5 p 100 (v/v) glycérol bidistillé 2,5 p 100 (v/v). La durée de la coloration est de 16 h. Les gels sont lavés dans le solvant d'URIEL: Alcool méthylique à 20 p 100 (v/v) contenant 5 p 100 (p/v) d'acide acétique et 2,5 p 100 (v/v) de glycérine.

Après décoloration les gels mixtes d'acrylamide agarose sont séchés entre deux feuilles de cellophane. Les disques d'acrylamide sont conservés dans l'acide acétique à 7 p 100.

c) Coloration par le noir d'amide

L'amidoschwarz 10 B (Merck) est dissous 6 p 100 (p/v) dans une solution aqueuse de méthanol 45 p 100 (v/v) et d'acide acétique 10 p 100 (v/v). Les lames de gélose sont colorées 2 minutes (les gels d'acrylamide 20 heures). Le rinçage est effectué dans une solution de méthanol à 20 p 100 (v/v) contenant 5 p 100 (v/v) d'acide acétique et 2,5 p 100 de glycérine (v/v) jusqu'à décoloration.

G - IMMUNODIFFUSION-TECHNIQUE DE PRECIPITATION EN GEL D'OUCHTERLONY

La micro méthode sur lame est pratiquée avec une gélose (Agar noble Difco) à 1 p 100 (p/v) dans du tampon véronal à pH 8,6. La composition du tampon véronal est la suivante: Diéthylmalonylurée sodée 0,05 M, Diéthylmalonylurée chlorhydrique 0,01 M, acétate de sodium 0,05 M; de force ionique 0,1 et de pH 8,6. Le tampon est dilué au quart au moment de l'emploi. On charge les godets avec l'immunsérum et les fractions pendant trois jours à raison d'un dépôt journalier. La réaction antigène-anticorps se fait en chambre chaude à 30 °C dans des enceintes closes saturées d'humidité.

Ensuite les lames d'Ouchterlony sont mises en chambre froide à 4 °C de nouveau pendant 5 jours de façon à favoriser la précipitation du complexe antigène-anticorps. Les lames sont ensuite lavées dans un bain de chlorure de sodium à 1 p 100, les bains étant renouvelés chaque jour pendant cinq jours. Finalement, on lave les lames à l'eau distillée.

Les lames sont séchées et colorées. Pour sécher, on emploie des bandes de papier Whatman n° 1 découpées à la largeur des lames et humidifiées avant d'être déposées sur les lames. Celles-ci sont finalement colorées par la technique à l'amidoschwarz .

H - TECHNIQUES D'ETUDES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES

I - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX METHODE DES DANSYL-AMINO-ACIDES -GRAY ET HARTLEY (79)

1) Dansylation du peptide

La solution de peptides (1 à 2 n moles dans 10 µl d'eau) est placé dans un tube de verre spécial (tube de Teswel-Warner Wilcott) de 5 mm Ø × 26 mm.)

On ajoute 10 µl d'une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M, et 20 µl d'une solution acétonique de chlorure de Dansyl (Sigma) à 1 mg par ml. Le tube est fermé avec une feuille de "parafilm" "N" (Marathon American Can Company) et laissé en contact 2 à 6 heures à l'obscurité, et à la température ambiante. Le tube est ensuite placé dans un dessiccateur en présence d'acide sulfurique et son contenu est évaporé à sec sous vide partiel (trompe à eau). Après addition de 50 µl d'acide chlorhydrique 6 N l'hydrolyse est réalisée à 105 °C pendant 16 heures. Pour cette opération, le tube est placé dans la partie supérieure d'un tube présentant un étranglement et rempli d'acide chlorhydrique 6 N dans sa partie inférieure.

L'hydrolysate est séché dans un dessiccateur en présence de pastilles de soude, sous vide partiel, puis repris dans 50 µl d'un mélange acétone/acide acétique (3 : 2) en vue de la chromatographie.



2) Chromatographie en couche mince sur gel de Silice.

25 g de gel de Silice G (Merck) en suspension dans 50 ml d'eau sont étalés en couche de 0,25 mm d'épaisseur sur cinq plaques de verre 20 × 20 cm juxtaposées. Les plaques sont séchées plusieurs heures à la température ambiante et 1 h. à 100 °C. L'hydrolysate est déposé à 3 cm de chacun des bords de la plaque. La migration dans le premier solvant se fait perpendiculairement au sens de l'étalement du gel.

La plaque est réactivée dix minutes à 100 °C, puis elle est soumise à une deuxième migration dans un sens perpendiculaire à la première. La plaque est placée dans la cuve, avant la migration, pendant 30 minutes, jusqu'à saturation en vapeurs de solvant. Chaque migration dure 45 à 75 minutes environ.

Nous utilisons les systèmes solvants décrits par GROS et LABOUESSE (80)

-En première dimension un solvant benzène/ pyridine/ acide acétique (80: 20: 5; v/v/v)

-En deuxième dimension, un solvant toluène/ monochloro-éthanol/ ammoniacque concentré (6/10/4; v/v/v).

3) Chromatographie en couche mince sur feuille de polyamide

L'échantillon est déposé en double exemplaire sur une feuille de polyamide (9 cm × 5 cm) Le deuxième dépôt comprend également les témoins Dansyl amino acides; la migration a lieu en première dimension dans le solvant acide formique à 1,5 p 100 (v/v) puis en seconde dimension dans le solvant benzène/acide acétique (9: 1; v/v) Enfin, à nouveau dans la même direction dans le solvant acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique. (20: 1: 1; v/v).

II - Dosage du tryptophane: méthode de SPIES et CHAMBERS (21)

Cette technique est basée sur la réaction du tryptophane avec le p.diméthylaminobenzaldéhyde en solution acide pour former une coloration bleue après oxydation par le nitrite de sodium. On mélange dans un flacon conique bouché émeri: 30 mg de diméthylaminobenzaldéhyde, 9 ml d'acide sulfurique 21,4 N, et la solution du mélange d'acides aminés dans 1 ml de soude 1 N. Le mélange est gardé à 25 °C, pendant 1 heure à l'obscurité.

0,1 ml d'une solution de nitrite de sodium 0,04 p 100 (p/v) préparée extemporanément, est ajoutée pour développer la couleur.

Après une incubation de 30 minutes, la densité optique est mesurée à 590 nm et 600 nm par rapport à un "blanc" ne contenant pas de diméthylaminobenzaldéhyde. Une courbe étalon est préparée en utilisant des solutions contenant des quantités connues de tryptophane (5 à 120 gamma) dans la soude 1 N.

La quantité de tryptophane dans la solution à doser doit être inférieure à 120 gamma.

III - Dosage des groupements thiols: procédé de SAVILLE (235)

Solution A: On mélange extemporanément 1 volume de nitrite de soude à 0,12 p 100 (p/v) dans l'eau distillée, à 4 volumes d'acide sulfurique 1 N.

Solution B: Sulfamate d'ammonium à 1 p 100 dans l'eau distillée.

Solution C: On mélange extemporanément: 2 volumes de sulfamilamide à 6,9 p 100 (p/v) dans le HCl 0,4 N avec un volume de HgCl₂ à 1 p 100 (p/v) dans le HCl 0,4 N.

Solution D: Solution à 0,2 p 100 (v/v) de N-1-Naphtyléthylène diamine chlorydrique dans le HCl 0,4 N.

Solution E: Le glutathion réduit est en solution à 0,002 p 100 (v/v) dans le HCl dégazé. L'échantillon, en solution dans le HCl 0,25 N, sous un volume total de 0,2 ml est mélangé à 0,05 ml de la solution A et laissé 5 minutes à la température de la pièce. Puis on ajoute, en agitant vigoureusement au vortex, 0,02 ml de la solution B, et enfin, selon l'ordre suivant: 0,1 ml de la solution C, et 0,15 ml de la solution D. La couleur se développe à la température de la pièce pendant 10 à 30 minutes.

La gamme témoin est faite avec la solution de glutathion réduit (E). La lecture de la coloration des échantillons est faite par rapport aux témoins réactifs à 550 nm avec un spectrophotomètre BECKMAN DK II et muni d'un dispositif permettant la lecture en microcellules (0,3 ml).

REACTIFS ET MATERIEL DIVERS

Les substrats synthétiques suivants ont été utilisés.

-Le Gly-L-Leu, le Gly-L-Pro, le Gly-L-Trp, le Gly-L-Val, le L-Leu-Gly, le L-Leu-Gly-Gly (Calbiochem).

-Le L-Ala-Gly, le L-Pro-Gly (Fluka), le L-Ala-L-Leu, le L-Leu-L-Ala (Yeda)

-Gly-Gly, Gly-L.His, Gly-L.Tyr, Gly-Gly-Gly, β .Ala-L.His (Hoffman Laroche Paris).

-L'ester éthylique de la Benzoylarginine (Bz.Arg O Et),

-L'ester méthylique de la tosylarginine (Tos. Arg O Me),

-L'ester éthylique de l'acétyltyrosine (Ac. Tyr. O Me),

-L'ester éthylique de la Benzoyltyrosine (Bz. Tyr O Et),

-La leucyl-bêta naphthylamide, la leucinamide, le Gly-L.Met, le Gly-L.Ser,

le Gly-L.Ile, le Gly-L.Glu, le L.Trp-Ala, le L.Lys-L.Leu, le D.Leu-Gly,

le Gly-D.Leu, le Gly-D.Ala, le L.Pro-Gly-Gly, le L.Met-L.Ala-L.Ser,

le Gly-D.Asp, le L.Leu-Gly-L.Tyr. (Sigma).

-La benzoyl glycineamide (Bz-Gly-NH₂) (K et K laboratories); le carbo benzoylglycyl-L.phenylalanine (Z.Gly-L.Phe) le carbobenzoy-glycyl-L.tryptophane (Z.Gly-L.Trp) (Cyclochemical Corporation).

-Le benzoyl-glycyl-glycine (Bz-Gly-Gly), le DL.Leu-Gly-Gly, le L.Ala-Gly-Gly, le D.Leu-L.Tyr, le L.Phe-Gly-Gly, le L.Tyr-Gly, le L.Val-Gly, le Gly-L.Phe, (Nutritional Biochemical Corporation)

-Le leucine-p-nitroanilide (Pierce Chemical)

-Le benzoyl-glycyl-L.Lysine (Bz Gly-L.Lys), le Gly-L.Leu-L.Tyr (Mann Research Laboratories)

-Le paranitrophénylphosphate (P.N.P.P.) (Laboratoire Koch Light).

Traitement des sacs de dialyse. (PETERSON et CHIAZZE 172)

On fait bouillir les sacs de cellophane 15 minutes avec le carbonate de soude à 2 p 100, puis après un rinçage abondant avec de l'eau distillée, les sacs sont trempés dans une solution d'EDTA 10 mM pH 8,6 pendant une semaine à la température de la pièce. Puis les sacs sont rincés abondamment à l'eau bidistillée sur quartz.

Produits chimiques divers.

Pour le broyage des bactéries nous utilisons la zéolithe de type 4 A en poudre produite par l'union Carbide Corporation.

-Le sulfate de streptomycine est un produit S.I.F.A.

-Le sulfate d'ammonium est un produit purifié ne contenant pas d'impuretés métalliques: Special Enzyme Grade (SCHWARZ/MANN).

-Le Tris est également un produit pur R.P. CARLO ERBA.

Les sels minéraux et les inhibiteurs sont des produits purifiés Merck N.B.C., et B.D.H.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ADAMS J.M.
On the release of formyl-group from nascent protein
J. Mol. Biol., 1968, 33, 571-578
- 2 - ANDREJEW A., TACQUET A. et GERNEZ-RIEUX C .
L'activité peroxydasique des Mycobactéries
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 586-589
- 3 - ANDREJEW A. et TACQUET A.
Différents types d'activité lipasique chez les
Mycobactéries
Ann. Inst. Pasteur, 1965, 108, 652-661
- 4 - ANDREWS P.
Estimation of the molecular weights of proteins
by sephadex gel filtration
Biochem. J., 1964, 91, 222-223
- 5 - ASSELINEAU J. and LEDERER E.
Constituents of Mycobacteria in BARRY V.C.
Chemotherapy of Tuberculosis
Edit. Butterworths London, 1964, 1-37
- 6 - BARKER S.A., SOMERS P.J. and EPTON R.
Peptide hydrolase activity of Klebsiella aerogenes
Biochem. J., 1969, 111, 19 p
- 7 - BARMAN T.E.
Enzyme Handbook
Vol. 1, Springer Verlag Berlin, 1969, 1-15
- 8 - BARMAN T.E.
Enzyme Handbook
Vol. 2, Springer Verlag Berlin, 1969, 602-610
- 9 - BEHAL F.J., ASSERSON B., DAWSON F. and HARDMAN J.
A study of human tissue aminopeptidase components
Arch. Biochem., 1965, 111, 335-344
- 10 - BEHAL F.J. and CARTER R.T.
Naphtylamidase of Sarcina lutea
Canad. J. Microbiol., 1971, 17, 39-45

- 11 - BEHAL F.J. and COX S.T.
Arylamidase of *Neisseria catarrhalis*
J. Bacteriol., 1968, 96, 1240-1248
- 12 - BEHAL F.J. and FOLDS J.D.
Arylamidase of *Neisseria catarrhalis*
Arch. Biochem., 1967, 121, 364-371
- 13 - BEHAL F.J. and FOLDS J.D.
A comparative study of bacterial alanine
aminohydrolase
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27,
344-349
- 14 - BEHAL F.J., HAMILTON R.D., CANAVAGE C.B. and KELLY E.C.
Studies on aminopeptidases in human blood
Arch. Biochem., 1963, 100, 308-312
- 15 - BEHAL F.J., KLEIN R.A. and DAWSON F.B.
Separation and characterization of aminopeptidase
components of human liver
Arch., Biochem., 1966, 115, 545-554
- 16 - BEHAL F.J., LITTLE G.H. and KLEIN R.A.
Arylamidase of human liver
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 118-127
- 17 - BEHAL F.J. and STORY M.N.
Arylamidase from human kidney
Arch. Biochem., 1969, 131, 74-82
- 18 - BEL F.
Biochemical and serologic study of atypical
scotochromogenic *Mycobacteria* isolated from
adenoids
Rev. Immun. (Paris), 1968, 32, 11-29
- 19 - BERSAQUES J.D.
Leucine aminopeptidase et naphtylamidases dans
l'épiderme humain
Enzym. Biol. Clin. (Basel), 1968, 9, 219-233
- 20 - BJARE U. and HOFSTEN B.
Cell bound proteolytic enzymes of *Arthrobacter*
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 220, 134-136
- 21 - BLACKBURN S.
Tryptophan amino acid determination in DEKKER M.
Methods and Techniques
Ed. I.N.C. New-York, 1968, 190-194

- 22 - BLOCH H. and SUTER E.
Extraktion und Nachweis Kleiner Peptidasennegen
aus Bakterein
Schweiz Z. Path., 1946, 9, 597-605
- 23 - BODANSKY M. and PERIMAN D.
Peptide Antibiotics
Science, 1969, 163, 352-358
- 24 - BOLTON E.T., BRITTEN R.J., COWIE D.B., Mac CARTY B.J.,
QUILLEN K.M. and ROBERTS R.B.
Canergie Institution of Washington Year Book,
1959, 58, 278-282
- 25 - BÖNICKE R., LISBOA B.P.
Über das Vorkammer von Acylamidase in Mycobak-
terium
Zbl. Bakt. (Orig.), 1954, 403-412
- 26 - BRECHER A.S. and SUSZKIW J.B.
Brain arylamidase purification and characterization
of the soluble bovine enzyme
Biochem. J., 1969, 112, 335-342
- 27 - BROWN J.L. and KRALL J.F.
Studies on the substrate specificity of an
Escherichia coli peptidase
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 42,
347-388
- 28 - BRYCE G.F. and RABIN B.R.
The function of the metal ion in Leucine amino
peptidase and mecanism of action of the enzyme
Biochem. J., 1964, 90, 513-518
- 29 - BÜGER H.
Biochemische Leistungen nichtprolifferender
micro organismen III : Nachweis von Arylsulfatasen
und Peptidasen
Zbl. Bakt. (Orig.), 1967, 202, 395-401
- 30 - BUISSIERE M.J., FOUCARD A. et COLOBERT C.
Usage des substrats synthétiques pour l'étude de
l'équipement enzymatique des microorganismes
C.R. Acad. Sciences Paris, 1967, 264,
915-917
- 31 - BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A.
Manuel de Techniques Bactériologiques
3è Ed. Flammarion, 1967, 484

- 32 - CAMPBELL B.J.
Renal dipeptidase in Methods in Enzymology
Vol. 19, Ed. Perlman G.E. and Lorand L.,
Academic Press. New-York, 1970, 722-729
- 33 - CAMPBELL B.J., LIN Y.C. and BIRD M.E.
Renal aminopeptidase and copper activated peptide
hydrolysis
J. Biol. Chem., 1963, 238, 3632-3639
- 34 - CAMPBELL B.J., LIN Y.C., DAVIS R.V. and BALLEW E.
The purification and properties of a Renal
Dipeptidase
Biochim. Biophys. Acta., 1966, 118, 371-386
- 35 - CAMPBELL B.J., LIN Y.C. and BALLEW E.
Reactions of Renal Dipeptidase and cupric ions
with unsaturated dipeptides
J. Biol. Chem., 1967, 242, 930-935
- 36 - CAPOBIANCO G. and VESCIA A.
Further studies on the effect of metal ions on
the specificity of peptidase activity
J. Biochem., 1967, 16, 33-42
- 37 - CASSAGNE H.
Milieux de culture
Vol. 2, Ed. La Tourelle, 1961, 30
- 38 - CASTELLINO F.J. and BAKER R.
Examination of the dissociation of multichain
proteins in guanidine hydrochloride by membrane
osmometry
Biochemistry, 1968, 7, 2207-2217
- 39 - COHEN G.N. et RICKENBERG H.V.
Concentration spécifique réversible des amino
acides chez Escherichia coli
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 693-699
- 40 - COHEN S.S. and LICHTENSTEIN J.
Polyamine and ribosome structure
J. Biol. Chem., 1960, 235, 2112-2116
- 41 - COLEMAN J.E. and VALLEE B.L.
Metallo-carboxypeptidase - Substrate complexes
Biochemistry, 1962, 1, 1083-1092

.../...

- 42 - COLEMAN J. and VALLEE B.L.
Metallo carboxypeptidases : stability constants
and enzymatic characteristics
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2244-2248
- 43 - CORDONNIER R.
Recherches sur l'Amino-carboxypeptidase (Dipepti-
dase) de *Saccharomyces cerevisiae*
Thèse Faculté des Sciences de l'Université
d'Aix-Marseille, 1966
- 44 - COX S.T. and BEHAL F.J.
Mechanism of action of *Neisseria catarrhalis*
arylamidase
Bacteriol. Proc., 1969, 137
- 45 - COX S.T. and BEHAL F.J.
 α -Glutamic acid- β Naphtylamidase from *Neisseria*
catarrhalis
Canad. J. Microbiol., 1969, 15, 1293-1300
- 46 - CSOPAK H., FALK K.E. and SZAJN H.
Effet of E.D.T.A. on *Escherichia coli* Alkaline
Phosphatase
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 258, 466-472
- 47 - CUON G.
Chimiothérapie de la tuberculose
J. Biol. Med., 1970, 54, 475-477
- 48 - DAVIS B.J.
Disc electrophoresis.II:Method and application to
human serum proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427
- 49 - DAVIS N.C. and SMITH E.L.
Partial purification and specificity of Iminodipep-
tidase
J. Biol. Chem., 1953, 200, 373-385
- 50 - DAVIS N.C. and SMITH E.L.
Purification and some properties of a prolidase
of Swine Kidney
J. Biol. Chem., 1957, 224, 261-275
- 51 - DAWES E.A.
Enzyme Kinetics in DAVIDSON J.N.
Quantitative problems in Biochemistry
4ème Ed. E et S Livingstone L.T.D. London,
1969, 136-160

- 52 - DAYHOFF M.O. and ECK R.V.
Atlas protein sequence and structure
National Biochemical Research Foundation,
Silver Spring-Maryland, 1967, 31
- 53 - DEFTOS L.J. and POTTS J.T.
Contamination of D.F.P. treated Leucine amino-
peptidase with multiple endopeptidases
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 171, 121-127
- 54 - DEHM P. and NORDWIG A.
The cleavage of Prolylpeptides by Kidney Peptidases
Partial purification of a "X-Prolylaminopeptidase"
from Swine Kidney microsomes
Europ. J. Biochem., 1970, 17, 364-371
- 55 - DEHM P. and NORDWIG A.
The cleavage of Prolylpeptides by Kidney Peptidases
Isolation of microsomal carboxypeptidase from Swine
Kidney
Europ. J. Biochem., 1970, 17, 372-377
- 56 - DELANGE R.J. and SMITH E.
Leucine Aminopeptidase and other N-terminal Exopep-
tidases
BOYER P. the Enzymes Vol. 3 , Academic Press
New-York, 1971, 87-118
- 57 - DICK A.J., MATHESON A.T. and WANG J.H.
A ribosomal-bound aminopeptidase in Escherichia
coli B : purification and properties
Canad. J. Biochem., 1970, 48, 1181-1188
- 58 - DOOLITTLE R.F. and ARMENTROUT R.W.
Pyrrolidonyl peptidase. An enzyme for selective
removal of pyrrolydone carboxylic acid residues
from polypeptides
Biochemistry, 1968, 7, 516-521
- 59 - EDSALL J.T.
Composition de la serum albumine - Exposés annuels
de Biochimie Médicale
18ème série, Edit. Masson Paris, 1956, 86
- 60 - ELLIS S. and NUENKE J.M.
Dipeptidyl arylamidase III of pituitary purifica-
tion and characterization
J. Biol. Chem., 1967, 242, 4623-4629

- 61 - FAZEKAS DE St GROTH S., WEBSTER R.G. and DATYNER A.
Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 377-381
- 62 - FELICETTI D. and HANSON H.
Charakterisierung einer Glycyl-D.Leucin spaltenden Präparation aus Menschlichen Nieren
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 1970, 351, 1260-1267
- 63 - FELIX F. et BROUILLET N.
Purification et propriétés de deux peptidases de la levure de brasserie
Biochim. Biophys. Acta., 1966, 122, 127-144
- 64 - FERGUSON A.H. and ELBEIN A.D.
Purification of a D.Mannose Isomerase from Mycobacterium smegmatis
J. Bact., 1970, 101, 777-780
- 65 - FISHMAN W.H. and GHOSH N.K.
Advances in clinical chemistry
Vol. 10, Academic Press, 1967, 259
- 66 - FLORKIN M. and SOTZ E.
Enzymes general considerations. Comprehensive Biochemistry
Vol. 13, Elsevier Publishing Company Amsterdam, 1964, 130
- 67 - FOLDS J.D. and BEHAL F.J.
Amino-peptidase and Arylamidase of Neisseria catarrhalis
Bacteriol. Proc., 1966, 105
- 68 - FOLD J.E.
Carboxypeptidase B in the Enzymes
Vol. 3, 3ème Ed., BOYER P.D., Academic Press New-York, 1971, 57-77
- 69 - FOLK J.E. and GLADNER J.A.
Cobalt activation of Carboxypeptidase A
J. Biol. Chem., 1960, 235, 60-68
- 70 - FRAZIER W.
A method for the detection of changes in gelatine due to bacteria
J. Infect. Dis., 1926, 39, 302-309

- 71 - FRITSCHÉ M. und HANSON H.
Über die Lokalisation von Exopeptidasen in
Bacillus brevis
Acta. Biol. Med. Germ., 1969, 22, 519-523
- 72 - FRUTON J.S.
Pepsin in Boyer P.D. The Enzymes
Vol. 3, 3ème Ed. Academic Press. New-York,
1971, 125-126
- 73 - GILVARG C. and KATCHALSKI E.
Peptide utilisation in Escherichia coli
J. Biol. Chem., 1965, 240, 3093-3098
- 74 - GLENNER G.G., Mc MILLAN P.J. and FOLK J.E.
A mammalian peptidase specific for the hydrolysis
of N-terminal α -L-glutamyl and aspartyl residues
Nature, 1962, 194, 867
- 75 - GOLBARG J.A. and RUTENBURG A.M.
The colorimetric determination of Leucine amino-
peptidase
Cancer, 1958, 11, 283-291
- 76 - GOLDMAN P. and LEVY C.C.
Carboxypeptidase G. purification and properties
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58,
1299-1306
- 77 - GORDON R.E.
Some strains in Search of a genus Corynebacterium,
Mycobacterium Nocardia or ~~what~~ ?
J. Gen. Microbiol. G.B., 1966, 43, 329-343
- 78 - GORDON R.E. and MIHM K.
A comparison of four species of Mycobacteria
J. Gen. Microbiol., 1959, 21, 736-749
- 79 - GRAY W. and HARTLEY B.S.
Strategy and Tactics in Protein chemistry
Biochem. J., 1970, 119, 805-822
- 80 - GROS C. and LABOUESSE B.
Study of Dansylation reaction of amino acids,
peptides and proteins
Europ. J. Biochem., 1969, 7, 463-470
- 81 - HALEY E.E.
Purification and properties of a 3-aspartyl
peptidase from Escherichia coli
J. Biol. Chem., 1968, 243, 5748-5752

.../...

- 82 - HAN K., DAUTREVAUX M., CHAILA X. and BISERTE G.
The covalent structure of Beef Heart Myoglobin
Europ. J. Biochem., 1970, 16, 465-470
- 83 - HANNIG K.
Die Tragerfrage Kontinuierliche Electrophorese und
ihre Anwendung
Z. Anal. Chem., 1961, 181, 244-254
- 84 - HANSON H., FRITSCHKE M. und IWIG K.
Stereospezifität und Aktivität einiger Exopeptida-
sen und Azyklase von gram positiven Bakterien beson-
der Berücksichtigung des Zellalters
Acta. Biol. Med. Germ., 1969, 22, 507-517
- 85 - HANSON H., HUTTER J.H., MANNSFELDT H.G., KRETSCHMER K.
and SOHR C.
Zur Darstellung und Substratspezifität einer von
der Leucinamino-peptidase untercheibaren Aminopep-
tidase aus Neirenpartikelr
HoppeSeyler Z. Physiol. Chem., 1967, 348,
480-486
- 86 - HANSON H.T. and SMITH E.L.
Carnosinase : An Enzyme of Swine Kidney
J. Biol. Chem., 1949, 179, 789-801
- 87 - HALPERN B.M. and GROSSOWICZ N.
Amidase Activity of Mycobacteria Extracts
Biochem. J., 1957, 65, 715-720
- 88 - HARPER C., RENE A. and CAMPBELL J.
Renal dipeptidase : localization and inhibition
Biochim. Biophys. Acta., 1971, 242, 446-458
- 89 - HARTLEY B.S.
Strategy and Tactics in Protein chemistry
Biochem. J., 1970, 119, 805-822
- 90 - HARTSUCK J.A. and LIPSOMB W.N.
Carboxypeptidase A. in BOYER P.D. The enzymes
Vol. 3, 3ème Ed. Academic Press New-York,
1971, 1-46
- 91 - HAYASHI R., AIBARAS S. and HAJA T.
A unique carboxypeptidase activity of yeast protei-
nase c
Biochim. Biophys. Acta., 1970, 212, 359-361
- 92 - HAYMAN S. and PATTERSON E.K.
Purification an properties of a Mouse Ascites tumor
Dipeptidase a Metalloenzyme
J. Biol. Chem., 1971, 246, 660-669

- 93 - HEILMANN J., BAROLLIER J. and WATZKE E.
Beitrag zur Aminosäure bestimmung auf Papier
Chromatogrammen
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 1957, 309,
219-220
- 94 - HILL R.L. and SCHMIDT W.R.
The complete enzymic hydrolysis of proteins
J. Biol. Chem., 1962, 237, 389-396
- 95 - HIMMELHOCH S.R.
Leucine Aminopeptidase a zinc-metalloenzyme
Arch. Biochem., 1969, 134, 597-602
- 96 - HIMMELHOCH S.R. and PETERSON E.A.
Purification of Leucine amonipeptidase free of
endopeptidase activity
Biochemistry, 1968, 7, 2085-2091
- 97 - HOPUSU V.K., MAKINEN K.K. and GLENNER G.G.
Characterization of aminopeptidase B substrate
specificity and effector studies
Arch. Biochem., 1966, 114, 567-575
- 98 - HOPUSU-HAVU V.K., KANTONEN U.M. and GLENNER G.G.
A peptidase from Rat tissues selectively hydroly-
zing N-terminal arginine and lysine residues
Life. Sci., 1964, 3, 1444-1453
- 99 - HOPUSU-HAVU V.K., RINTOLA P. and GLENNER G.G.
A Hog Kidney aminopeptidase liberating N-terminal
dipeptides partial purification and characteristics
Acta. Chem. Scand., 1968, 22, 299-308
- 100 - HOPUSU-HAVU V.K. and SARINO S.R.
Purification and characterization of an amino-
peptidase hydrolyzing Glycyl-Proline Naphtylamide
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 1967, 348,
1548-1550
- 101 - HORIKOSHI K. and DOI R.H.
The NH₂-terminal residues of Bacillus subtilis
proteins
J. Biol. Chem., 1968, 243, 2381-2384
- 102 - JENKINS W.T. and ROBINSON W.G.
Hydroxylapatite for proteins chromatography in
COON M.J.
Biochemical preparations Vol. 9, Ed. John
Wiley and Sons (New-York), 1966, 83-85

- 103 - JOLLES J., JOLLES P., UHLIG H. and LEHMANN K.
Study of a microbial aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 1969, 350,
139-142
- 104 - JOSEPH M., ROOS P. et PLANCOT M.T.
Obtention d'antigènes bactériens par une technique de broyage utilisant des zéolithes de synthèse
Ann. Inst. Pasteur (Lille), 1970, 21, 61-66
- 105 - JOSEPH R.L. and SANDERS W.J.
Leucine Aminopeptidase in extracts of Swine muscle
Biochem. J., 1966, 100, 827-832
- 106 - JOHNSON J.M. and BERGER J.
Metal enzyme
J. Biol. Chem., 1939, 130, 641-650
- 107 - KAMEDA Y., KURAMOTO T., MATSUI K. and EBARA T.
Studies on Acylase activity and microorganisms. Purification and properties of Benzoylamino acid Amidohydrolase in KT 801 *Pseudomonas*
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1968, 16,
1023-1029
- 108 - KASUYUKI M., TATSUSHI O. and MIROSHIGE T.
Proteolytic enzymes of *Streptomyces fradiae*
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 139, 382-393
- 109 - KEPES A. and COHEN C.N.
Permeation in GUNZALUS I.C., STANIER R.Y.
The Bacteria
Vol. 4 New-York Academic Press, 1962, 179-221
- 110 - KESSEL D. and LUBIN M.
On the distinction between peptidase activity and peptide transport
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 656-663
- 111 - KIHARA H. and SNELL E.E.
Peptides and Bacterial growth.VIII; The nature of Streptogenin
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1409-1414
- 112 - KIHARA H. and SNELL E.E.
Peptides and Bacterial growth.IX: Release of double inhibitions with single peptides
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1415-1418

- 113 - KOGOMA T. and NISHI A.
Rhythmic variations in proteolytic activities during
the cell cycle of *Escherichia coli*
J. Gen. Appl. Microbiol., 1965, 11, 321-329
- 114 - KWAPINSKI J.B.C.
Antigenic structure of the Actinomycetales.XI:
Spectra of the serological activity of the plasma
Antigens
Zblt. Bakt. (Orig.), 1966, 200, 380-387
- 115 - LATT S.A., HOLMQUIST B. and VALLEE B.L.
Thermolysin : A zinc metalloenzyme
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 37,
333-337
- 116 - LEACH F.R. and SNELL E.E.
The absorption of glycine and alanine and their
peptides by *Lactobacillus casei*
J. Biol. Chem., 1960, 235, 3523-3531
- 117 - LECLERCQ H.
Etude de Bacilles à gram négatif présentant une
activité β galactosidasique isolés des eaux.
Thèse Faculté de Médecine et de Pharmacie
LILLE, 1961
- 118 - LEHMANN K. and UHLIG H.
Amino-peptidasen aus *Aspergilli* : Isolierung, Reini-
gung und charakteristische Eigenschaften
HoppeSeyler Z. Physiol. Chem., 1969, 350,
99-104
- 119 - LEVINE E.M. and SIMMONDS S.
Further studies on metabolite uptake by serine,
glycine auxotrophes of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem., 1962, 237, 3718-3724
- 120 - LEVY C.C. and GOLDMAN P.
Bacterial peptidase.II:An enzyme specific for
N acyl linkages to aspartate
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3507-3511
- 121 - LEVY C.C. and GOLDMAN P.
Bacterial peptidase.III:An enzyme specific for
N acyl linkages to alanine
J. Biol. Chem., 1969, 244, 4467-4472
- 122 - LEWIS W.H.P. and HARRIS H.
Human Red cell peptidases
Nature, 1967, 215, 351-355

- 123 - LEWIS Y.H.O. and HUMPHREY A.E.
Optimal control of an enzyme reaction subject to
enzyme deactivation.I : Batch. Process.
Botechn. Bioengin., 1970, 12, 291-311
- 124 - LITCHFIELD C.D. and PRESCOTT J.M.
Regulation of proteolytic enzyme production by
Aeromonas proteolytica.II: Extracellular aminopepti-
dase
Canad. J. Microbiol., 1970, 16, 23-27
- 125 - LITTLE C.H. and BEHAL F.J.
Human liver arylamidase. Molecular weight and
Subunit structure
Biochim. Biophys. Acta., 1971, 243, 312-319
- 126 - LIU T.Y. and ELLIOTT S.D.
Streptococcal proteinase in Boyer P.D., the Enzymes
Vol. 3, Academic Press. New-York, 1971,
609-639
- 127 - LIVINGSTON D.M. and LEDER P.
Deformylation and Protein Biosynthesis
Biochemistry, 1969, 8, 435-442
- 128 - LOSICK R. and GILVARG C.
Effect of α -acetylation on utilisation of Lysine
oligopeptide in Escherichia coli
J. Biol. Chem., 241, 2340-2346
- 129 - LOUGHIN R.E. and TRIKOJUS V.M.
A metal dependent peptidase from thyroid glands
Biochim. Biophys. Acta., 1964, 92, 529-542
- 130 - LOWRY G.H. and ROSEBROUGH N.J.
Protein measurement with folin phenol reagent
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275
- 131 - MARIAT F.
Etude comparative des souches de Nocardia
Ann. Inst. Pasteur, 1965, 109, 90-104
- 132 - MARKLAND F.S. and SMITH E.L.
Subtilisins : Primary structure, chemical and
physical properties in Boyer P.D. The Enzymes
Vol. 3, Academic Press. New-York, 1971,
562-605
- 133 - MARKS N., DATTA R.K. and LAJTHA A.
Partial resolution of brain arylamidases and
aminopeptidases
J. Biol. Chem., 1968, 243, 2882-2889

- 134 - MATHESON A.T.
The localisation and properties of an Aminopeptidase in *Escherichia coli* B
Canad. J. Biochem., 1963, 41, 9-18
- 135 - MATHESON A.T. and ARMSTRONG J.
Partial purification and properties of a peptidase fraction from *Bacillus stearothermophilus*
Canad. J. Biochem., 1967, 45, 1644-1647
- 136 - MATHESON A.T. and DICK A.J.
A possible role in protein synthesis for ribosomal bound Aminopeptidase in *Escherichia coli* B
Febs Letters, 1970; 6, 235-237
- 137 - MATHESON A.T. and DICK A.J. and ROLLIN F.
A ribosomal bound Aminopeptidase in *Escherichia coli* B : Substrate specificity
Canad. J. Biochem., 1970, 48, 1292-1296
- 138 - MATHESON A.T. and MURAYAMA T.
The limited release of ribosomal peptidase during formation of *Escherichia coli* Spheroplasts
Canad. J. Biochem., 1966, 44, 1407-1415
- 139 - MATHESON A.T. and TATTRIE B.L.
A modified Yemm and Cocking ninhydrin reagent for peptidase assay
Canad. J. Biochem., 1964, 42, 95-103
- 140 - MATHESON A.T. and TSAI C.S.
A ribosomal peptidase from *Escherichia coli* B
Canad. J. Biochem., 1965, 43, 323-329
- 141 - MATSUBARA H. and FEDER J.
Bacterial, Mold and Yeast protease in Boyer P.D. The Enzymes
Vol. 3 , Academic press. New-York, 1971, 721-786
- 142 - Mc CORQUODALE D.J.
Some properties of a ribosomal Cysteinyl-glycinase of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem., 1963, 238, 3914-3920
- 143 - MELIUS P., MOSELEY M.H. and BROWN D.M.
Characterisation of the subunits of Swine Kidney Leucine aminopeptidase
Biochim. Biophys. Acta., 1970, 221, 62-68

- 144 - MEISLER N. and SIMMONDS S.
The metabolism of Glycyl-Leucine in *Escherichia coli*
J. Gen. Microbiol., 1963, 31, 109-118
- 145 - MILLONIG R.C.
Isolation of an Aminopeptidase from type B *Clostridium botulinum*
J. Bact., 1956, 72, 301-307
- 146 - MINAMIURA N., MATSUMURA Y., YAMAMOTO T. and FUKUMOTO J.
Intracellular peptidase of *Bacillus subtilis*. V: A comparative study on some enzymatic properties of four aminopeptidases obtained from *Bacillus subtilis*
Arg. Biol. Chem. (Tokyo), 1969, 33, 653-661
- 147 - MINAMIURA N., YAMAMOTO T. and FUKUMOTO J.
Intracellular peptidase of *Bacillus subtilis*
Arg. Biol. Chem. (Tokyo), 1966, 30, 186-192
- 148 - MITCHELL W.M. and HARRINGTON W.F.
Clostripaine, in Boyer P.D. *The Enzymes*
Vol. 3, Academic Press. New-York, 699-717
- 149 - MORIHARA K.
Multiples proteolytic enzymes of *Streptomyces fradiae*. Production, isolation and preliminary characterization
Biochim. Biophys. Acta., 1967, 139, 382-387
- 150 - MUFTIC M.
Classification of Mycobacteria by their peptidase action on various amino acid naphthylamides
Prax. Pneumol., 1965, 19, 33-44
- 151 - MUFTIC M.
Application of chromogenic substrates to determination of peptidases in Mycobacteria
Folia Microbiol., (Praha), 1967, 12, 500-507
- 152 - MUFTIC M. and SCHRODER E.
Peptidasegram in differentiation of Bacilli species
Path. Microbiol., (Basel), 1966, 29, 252-260
- 153 - MULCZYK and A. SZEWCZULK A.
Pyrrolydonyl peptidase in Bacteria a new colorimetric test for differentiation of Enterobacteriaceae
J. Gen. Microbiol., 1970, 61, 913-917
- 154 - MURAYAMA T. and MATHESON A.T.
The effect of Magnesium starvation on the localisation of peptidase activity in *Escherichia coli* B
Canad. J. Biochem., 1966, 44, 654-657

- 155 - MURAYAMA T. and MATHESON A.T.
The behaviour of certain intracellular peptidases
in a synchronized population of *Escherichia coli* B
Mem. Ehime. Univ. Sect II (Sci), Ser B. (Biol)
1967, 5, 35-39
- 156 - NACHLAS M.N., GOLDSTEIN T.P. and SELIGMAN A.M.
An evaluation of aminopeptidase specificity with
seven chromogenic substates
Arch. Biochem., 1962, 97, 223-231
- 157 - NEU H.H. and HEPPEL L.A.
The release of Enzymes from *Escherichia coli* by
osmotic shock and during the formation of sphero-
plasts
J. Biol. Chem., 1965, 240, 3685-3692
- 158 - NEURATH H.
Carboxypeptidases A et B in Boyer P.D., Lardy H.
and Myrbäck K. The Enzyme
Vol. 4, 2 Ed. Academic Press. New-York, 1960,
11-20
- 159 - NISHI A. and HIROSE S.
Further observations on the rhythmic variation in
peptidase activity during the cell cycle of various
strains of *Escherichia coli*
J. Gen. Appl. Microbiol., 1966, 12, 293-297
- 160 - NISHI A. and KOGOMA T.
Protein turn over in the cell cycle of *Escherichia*
coli
J. Bacteriol., 1965, 90, 884-890
- 161 - OLSON C.K. and BINKLEY F.
Enzymatic hydrolysis of Cysteinyl-glycinase
J. Biol. Chem., 1950, 186, 731-737
- 162 - OUCHI T.
Studies on proteolytic enzymes of *Streptomyces*
griseus Part I. Separation purification of pepti-
dase and proteinase from culture media of *Strepto-*
myces griseus
Agric. Biol. Chem. (Tokyo), 1962, 26, 723-728
- 163 - PATTERSON E.K., HSIAO S.H. and KEPPEL A.
Studies on dipeptidases and Aminopeptidases. I:
Distinction between Leucine aminopeptidase and
enzymes that hydrolyse L.Leucyl- β -Naphthylamide
J. Biol. Chem., 1963, 238, 3611-3618

- 164 - PATTERSON E.K., HSIAO S.H., KEPPEL A. and SOROF S.
Studies on dipeptidases and aminopeptidases
II Zonal Electrophoresis separation of liver
peptidases
J. Biol. Chem., 1965, 240, 711-716
- 165 - PATTERSON E.K., KEPPEL A. and HSIAO S.H.
Evidence from purification procedures that the
enzyme which hydrolyzes L-Leucyl- β -Naphthylamide
is not a classical Leucineaminopeptidase
J. Histochem. Cytochem., 1963, 9, 609-614
- 166 - PAYNE J.W.
Oligopeptide transport in Escherichia coli
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3395-3403
- 167 - PAYNE J.W.
The requirement for the protonated α -amino group
for the transport of peptides in Escherichia coli
Biochem. J., 1971, 123, 245-253
- 168 - PAYNE J.W.
The utilization of Prolyl-peptides by Escherichia
coli
Biochem. J., 1971, 123, 255-260
- 169 - PAYNE J.W. and GILVARG C.
The role of terminal carboxyl group in Peptide
transport in Escherichia coli
J. Biol. Chem., 1968, 243, 335-340
- 170 - PAYNE J.W. and GILVARG C.
Size restriction on peptide utilisation in
Escherichia coli
J. Biol. Chem., 1968, 243, 6291-6299
- 171 - PAYNE J.W. and GILVARG C.
Peptide transport
Advances Enzym., 1971, 35, 187-244
- 172 - PETERSON E.A. and CHIAZZE E.A.
Some experimental factors in the gradient chroma-
tography of serum proteins
Arch. Biochem., 1962, 99, 136-147
- 173 - PFLEIDERER G.
Particle-bound aminopeptidase from Pig Kidney in
Perlmann G.E. and Lorand L. Methods in Enzymology
Vol. XIX Academic Press New-York, 1970,
514-521

- 174 - PFLEIDERER G. and WASHMUTH E.G.
 Abstersund Funktion Sabhängige Differenzierung der
 Laktat Deshydrogenase menschlicher Organe
 Biochem. Z., 1961, 334, 185-198
- 175 - PINE M.J.
 Kinetics of maturation of the aminotermini of the
 cell proteins of Escherichia coli
 Biochim. Biophys. Acta., 1969, 174, 359-372
- 176 - PIPERNO J.R. and OXENDER D.L.
 Amino Acid transport Systems in Escherichia
 coli K 12
 J. Biol. Chem., 1968, 243, 5914-5920
- 177 - PITTMAN K.A., LAKSHMANAN S. and BRYANT M.P.
 Oligopeptide uptake by Bacteroides ruminicola
 J. Bact., 1967, 93, 1499-1508
- 178 - PLANCOT M.T., GUILLAUME J., ROOS P. et TACQUET A.
 Activité peptidasique des Mycobactéries
 Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, 132-137
- 179 - PLANCOT M.T. et GUILLAUME J.
 Etude de l'activité peptidasique d'une fraction
 soluble de Mycobacterium phlei 689. Extraction,
 purification, caractérisation
 Ann. Inst. Pasteur (Lille), 1969, 11, 77-90
- 180 - PLANCOT M.T. et HAN K.K.
 Dosage de l'activité peptidasique par une techni-
 que colorimétrique directe
 Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 1969, 51,
 1111-1114
- 181 - PLANCOT M.T., HAN K., BISERTE G. et TACQUET A.
 Purification partielle et propriétés exopeptida-
 siques d'une fraction intracellulaire de Mycobac-
 terium phlei 689
 Ann. Inst. Pasteur, 1970, 119, 730-732
- 182 - PRESCOTT J.M. and WILKES S.H.
 Aeromonas aminopeptidase purification and some
 general properties
 Arch. Biochem., 1966, 117, 328-336
- 183 - PRESCOTT J.M. and WILKES S.H., WAGNER F.W. and
 WILSON J.
 Aeromonas Aminopeptidase. Improved isolation and
 some physical properties
 J. Biol. Chem., 1971, 246, 1756-1764

.../...

- 184 - RABIN B.R.
Metal peptide complexes and proteolytic enzymes
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1247-1261
- 185 - REID T.W. and WILSON I.B.
Echerichia coli Alkaline Phosphatase in Boyer P.D.
The enzymes
Vol. IV Academic Press. New-York, 1971,
373-410
- 186 - REISFELD R.A. and SMALL P.A.
Electrophoretic heterogeneity of polypeptide
chains of specific antibodies
Science, 1966, 152, 1253-1255
- 187 - RENE A.M. and CAMPBELL B.J.
Amino acid composition and effect of pH on the
Kinetic parameters of Renal Dipeptidase
J. Biol. Chem., 1969, 244, 1445-1450
- 188 - ROBINSON D.S., BIRBAUM S.M. and GREENSTEIN J.P.
Purification and properties of an Aminopeptidase
from Kidney cellular particulate
J. Biol. Chem., 1953, 202, 1-25
- 189 - RONCARI G. and ZUBER H.
Thermophilic aminopeptidases from Bacillus
stearotherophilus. Isolation specificity and
general properties of the Thermostable amino-
peptidase
Intern. J. Protein. Res., 1969, 1, 45-61
- 190 - RONCARI G. and ZUBER H.
Thermophilic Aminopeptidases : A P I from Bacillus
stearotherophilus in Perlman G.E. and Lorand L.
in Methods in Enzymology
Vol. XIX, Academic Press. New-York, 1970,
544-555
- 191 - ROOS P.
Etude immunologique de Mycobacterium phlei
Thèse de Faculté des Sciences de l'Université
de Lille, 1970, 20-24
- 192 - ROSEWBERG A.
The activation of carnosinase by divalent metal
ions
Biochim. Biophys. Acta., 1960, 45, 297-316
- 193 - ROULET F. and ZELLER E.A.
Über die L. Peptidasen des Tuberkelbazillus
Experientia, 1945, 1, 122-123

- 194 - ROULET F. and ZELLER E.A.
Über die Enzyme des Mycobacterium Tuberculosis und
anderer säurefester Bakterien
Helv. Chim. Acta., 1948, 31, 1915-1928
- 195 - RYCHERT R.C. and HUNDERFUND C.R.
Effect of heparin upon the growth of Mycobacterium
phlei
Bact. Proc., 1967, 100
- 196 - RYDEN A.C.
Separation and characterization of three proline
peptidases from a strain of Arthrobacter
Acta. Chem. Scand., 1971, 25, 848-858
- 197 - RYDEN A.C. and HOFSTEN B.
Some properties of the extracellular proteinase
and the cell bound peptidase of Serratia
Acta. Chem. Scand., 1968, 22, 2803-2808
- 198 - SAGNIEZ G., LE CAM M., MADEC Y. and BERNARD S.
Préparation d'un homogénat cellulaire de Mycobac-
terium tuberculosis par un procédé mécanique
Ann. Inst. Pasteur, 1969, 117, 663-667
- 199 - SARID S., BERGER R.A. and KATCHALSKI E.
I Proline Imino-peptidase
J. Biol. Chem., 1959, 234, 1740-1746
- 200 - SARID S., BERGER R.A. and KATCHALSKI E.
II Proline Imino-peptidase. Purification and com-
parison with Iminodipeptidase (Prolinase)
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2207-2212
- 201 - SCHWABE C.
Peptide hydrolases in Mammalian connective tissues.
II: Leucine aminopeptidase purification and evidence
of Subunit structure
Biochemistry, 1969, 8, 783-791
- 202 - SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et
biologistes
Editions Médicales flammation Paris, 1960, 56
- 203 - SCHWERDTFERGER E.
Ein stabiles Ninhydrin reagent für die automatische
Aminosäuren Bestimmung
Angew. Chem. (Dtsch), 1965, 77, 1039-1040

- 204 - SEIDEL S.A. and ZIMMERMAN L.N.
A cytoplasmic peptidase of *Streptococcus faecalis*
var *liquefaciens*
Bact. Proc., 1968, 130
- 205 - SEIFER S. and HARPER E.
The collagenase in Boyer P.D. The Enzymes
Vol. 3, 3^e Ed. Academic Press. New-York,
1971, 649-693
- 206 - SEMENZA G.
Chromatographic purification of Cysteinyl-glycinase
Biochim. Biophys. Acta., 1957, 24, 401-413
- 207 - SHAPIRO A.L., VINUELA E. and MAIZEL J.V.
Molecular weight estimation of polypeptides chains
by electrophoresis in S D S polyacrylamide gels
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28,
815-820
- 208 - SIMMONDS S.
The role of dipeptidases in cells of *Escherichia*
coli strain K 12
J. Biol. Chem., 1966, 241, 2502-2508
- 209 - SIMMONDS S.
Peptidase activity and peptide metabolism in
Escherichia coli K 12
Biochemistry, 1970, 9, 1-9
- 210 - SIMMONDS S. and TOYE N.O.
Peptidases in Spheroplast of *Escherichia coli* K 12
J. Biol. Chem., 1966, 241, 3852-3860
- 211 - SIMMONDS S. and TOYE N.O.
The role of metals ions in the peptidase activity
of *Escherichia coli* K 12
J. Biol. Chem., 1967, 242, 2086-2093
- 212 - SIMPSON R.T. and VALLEE B.L.
Two differentiable classes of metal atoms in
Alkaline phosphatase of *Escherichia coli*
Biochemistry, 1968, 7, 4343-4350
- 213 - SMITH E.L.
The Glycyl-glycine dipeptidases of heart and
uterine muscle
J. Biol. Chem., 1948, 173, 553-569

- 214 - SMITH E.L.
The Glycyl-glycine dipeptidases of skeletal,
muscle, and human uterus
J. Biol. Chem., 1948, 173, 571-584
- 215 - SMITH E.L.
Studies on Dipeptidases.II:Some properties of
Glycyl-L.Leucine dipeptidases of animal tissues
J. Biol. Chem., 1948, 176, 9-20
- 216 - SMITH E.L.
Studies on Dipeptidases.III:Hydrolysis of methy-
lated peptides, the role of cobalt in the action
of Glycyl-glycine dipeptidase
J. Biol. Chem., 1948, 176, 21-31
- 217 - SMITH E.L.
Dipeptidases, Carnosinase, Imino-peptidase in
Colowick S.P. and Kaplan N.O. Methods in Enzymology
Vol. 2 Academic Press. New-York, 1955, 93-97
- 218 - SMITH E.L. and HILL R.L.
Leucine aminopeptidase in Boyer P.D., Lardy A. and
Myrback K. The Enzymes
Vol. 4, 2è Ed. Academic Press. New-York, 1960,
37 -62
- 219 - SMITH E.L. and RUTENBURG A.M.
Starch gel electrophoresis of human tissue enzymes
which hydrolyse L.Leucine β .Naphthylamide
Science, 1966, 154, 1256
- 220 - SMITH E.L. and SPACKMAN D.H.
Leucine aminopeptidase V. Activation and specifi-
city and mechanism of action
J. Biol. Chem., 1955, 212, 271-299
- 221 - SPACKMAN D.N., SMITH E.L. and BROWN D.M.
Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties
of the enzyme from Swine Kidney
J. Biol. Chem., 1955, 212, 255-269
- 222 - STEIN W.H. and MOORE S.
Chromatographic determination of the aminoacid
composition of proteins
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1950,
14, 179-185
- 223 - SUSSMAN A.J. and GILVARG C.
Constitutive peptidase of Escherichia coli K 12
capable of cleaving lysine homopeptide
Fed. Proc., 1969, 28, 661

- 224 - SUSSMAN A.J. and GILBARG C.
Peptidases in *Escherichia coli* K 12 capable of
cleaving Lysine homopeptide
J. biol. Chem., 1970, 245, 6518-6524
- 225 - SUSSMAN A.J. and GILVARG C.
Peptide transport and metabolism in Bacteria
Ann. Rev. Biochem., 1971, 40, 397-408
- 226 - SUSZKIW J.B. and BRECHER A.S.
Brain aminoacyl arylamidase : Further purification of the soluble bovine enzyme and studies on substrates specificity and possible active site residues
Biochemistry, 1970, 9, 4001-4017
- 227 - SZEWCZULK A. and KWIATKOWSKA J.
Pyrrolidonyl peptidase in animal plant and human tissues
Europ. J. Biochem., 1970, 15, 92-96
- 228 - SZEWCZULK A. and MULCZYK M.
Pyrrolidonyl peptidase in Bacteria. The enzyme from *Bacillus subtilis*
Europ. J. Biochem., 1969, 8, 63-67
- 229 - SZEWCZULK A. and MULCZYK M.
Studies on γ -glutamyl peptidase from *Pseudomonas aeruginosa*
Arch. Immun. Ther. Exp., 1970, 18, 515-528
- 230 - TACQUET A., GUILLAUME J. et LEFEBVRE G.
Etude des peptidases des Mycobactéries
Zbl. Bakt. (orig.), 1964, 194, 55-57
- 231 - TAKAHASHI S.
Isolation of Collagenolytic enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*
J. Biochem. (Tokyo), 1967, 61, 258-259
- 232 - TAKEDA M. and WEBSTER R.E.
Protein chain initiation and deformylation in *Bacillus subtilis* homogenates
Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 1968, 60, 1487-1494
- 233 - TJEDER A.
The occurrence of Aminoacid naphthylamidase in Baker's yeast
Acta. Chem. Scand., 1966, 20, 1442-1444

.../...

- 234 - TJEDER A. and HOFSTEN B.
The occurrence of amino acid naphthylamidase distinct
from Leucine aminopeptidase in *Serratia indica*
Acta. Chem. Scand., 1967, 21, 1721-1724
- 235 - TODD P. and GRONOW M.
Estimation of thiol content of Basic proteins in
acid solution by Saville's method
Anal. Biochem., 1969, 28, 369-375
- 236 - TOGASAWA Y. and KATSUMATA T.
Effect of metal ions on the Glycyl-glycine dipep-
tidase.VI: Isolation and purification of the
Glycyl-glycine Dipeptidase
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 1957, 23,
163-169
- 237 - TOGASAWA Y. and KATSUMATA T.
Effect of metal ions on the Glycyl-glycine Dipep-
tidase.VII: on the interaction between Glycyl-
glycine derivatives and Co^{++} , Mn^{++} and Mg^{++}
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 1958, 23,
625-631
- 238 - TSAI C.S. and MATHESON A.T.
Purification and properties of a ribosomal pepti-
dase from *Escherichia coli* B
Canad. J. Biochem., 1965, 43, 1643-1652
- 239 - URIEL J.
Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acryla-
mide agarose
Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 969-982
- 240 - URIEL J. and AVRAMEAS S.
Systematic fractionation of Swine pancreatic
Hydrolases
I Fractionation of Enzymes solubles in Ammonium
Sulfate Solution
Biochemistry, 1965, 4, 1740-1757
- 241 - UZMAN L.L. and RUMLEY M.K.
Dipeptidase activity of Brain
Nature, 1960, 186, 559-560
- 242 - VALLEE B.L. and COLEMAN J.E.
Metal coordination and Enzyme action in Florkin M.
and Sotz E.
Vol. 12, Elsevier Amsterdam, 1964, 166-233

- 243 - VALLEE B.L. and RIORDAN J.E.
 Chemical approaches to the properties of active
 site of enzymes-metal
 Ann. Rev. Biochem., 1969, 38, 733-794
- 244 - VALLEE B.L. and WACKER W.E.C.
 Metalloproteins : metal protein interaction in
 Neurath H. The proteins
 Vol. 5, 2è Ed. Academic Press. New-York,
 1970, 25-168
- 245 - VALLEE B.L. and WILLIAMS R.J.P.
 Metalloenzymes the entatic nature of their active
 sites
 Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 1968, 59, 498
- 246 - VANHA-PERTULLA T., HOPUSU V.K. and GLENNER G.G.
 Enzymes in Hog Kidney hydrolyzing aminoacid
 naphthylamides
 J. Histochem. Cytochem., 1966, 14, 314-325
- 247 - VAN LENTEN E.J. and SIMMONDS S.
 Dipeptidases in Spheroplasts and osmotically
 Shocked cells prepared from Escherichia coli K 12
 J. Biol. Chem., 1967, 242, 1439-1444
- 248 - VOGT V.M.
 Purification and properties of an Aminopeptidase
 from Escherichia coli
 J. Biol. Chem., 1970, 245, 4760-4769
- 249 - WACHSMUTH E.D.
 The iodination of super reactive and essential
 tyrosine residues in a microbial aminopeptidase
 Biochem. J., 1967, 102, 17 c
- 250 - WACHSMUTH E.D., FRITZE I. and PFLEIDERER G.
 An Aminopeptidase occuring in Pig Kidney
 1) An improved method of preparation physical and
 enzymic properties
 Biochemistry, 1966, 5, 169-175
- 251 - WACHSMUTH E.D., FRITZE I. and PFLEIDERER G.
 An Aminopeptidase occuring in Pig Kidney
 2) A study on the mechanism of the hydrolysis
 Biochemistry, 1966, 5, 175-182
- 252 - WALLER J.P.
 The NH₂ terminal residue of protein from cell free
 extracts of coli
 J. Mol. Biol., 1963, 7, 483-496

- 253 - WEBER K. and OSBORN M.
The reliability of molecular weight determinations
by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406-4412.
- 254 - WESTLY J.W., ADERSON P.J., CLOSE V.A., HALPERN B. and
LEDERBERG D.M.
Amino-peptidase profiles of various bacteria
Appl. Microbiol., 1967, 15, 822-825
- 255 - WILLIAMS J.G. and GRATZER W.B.
Limitations of the detergent polyacrylamide gel
electrophoresis method for molecular weight determination
of proteins
J. Chromatogr., 1971, 57, 121-125
- 256 - WILCOX H.G. and FRIED M.
Studies on Rat liver Glycyl-glycine dipeptidases
Biochem. J., 1963, 87, 192-199
- 257 - WILLET N.S.
Intracellular protein break down in growing cells
in Escherichia coli
Biochem. J., 1967, 103, 462-466
- 258 - WINTESBERGER E., COX D.J. and NEURATH H.
Bovine pancreatic pro-carboxypeptidase B
Biochemistry, 1962, 1, 1069-1078
- 259 - WISTREICH G., LECHTMAN M.D., BARTHOLOMEW J.W., and
BILS R.F.
Disruption of bacterial cells by synthetic
zeolithe
Appl. Microbiol., 1968, 16, 1269-1275
- 260 - WOOLLEY D.W. and MERRIFIELD R.B.
Specificity of peptides - New aspects of specificity
of peptides with vitamine and hormone action
were decribed
Science, 1958, 128, 238-240
- 261 - YANARI S.
The reaction of ninhydrin with dipeptides :
differences in reaction rates and theoretical
yields
J. Biol. Chem., 1956, 220, 683-689
- 262 - YARON A. and MLYNAR D.
Amino-peptidase P
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 32,
658-663

- 263 - YMAN L. and KULLING B.
A convenient method for purification of an amino-
peptidase fraction including oxyto-cinase (cystine
aminopeptidase) from retroplacental serum
Acta. Pharm. Suec., 1969, 6, 313-319
- 264 - YMAN L. and KULLING B.
An aminopeptidase from human serum specific for
hydrolysis of α -L-dicarboxylic amino acid residues
Acta. Pharm. Suec., 1969, 6, 561-568
- 265 - YEMM E.W. and COCKING E.C.
Estimation of amino acids by Ninhydrin
Analyst., 1955, 80, 209
- 266 - YOUMANS A.S. and YOUMANS G.P.
Protein content of cells of different ages of
Mycobact. Tuberculosis
J. Bact., 1968, 95, 272-279
- 267 - ZIPPER H. and PERSON P.
Rapid disruption of intact yeasts by synthetic
zeolite
J. Bact., 1966, 92, 1252-1253
- 268 - ZUBER H. and RONCARI G.
Thermophile und mesophile Aminopeptidasen aus
Bacillus stearothermophilus
Angewandte Chemic., 1967, 20, 906-907

