

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

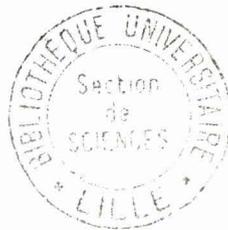
pour obtenir

le Titre de Docteur de Troisième Cycle en Biochimie

par

Pierre RUFFIN

Attaché de Recherche au C.N.R.S.



CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA KERATINOLYSE DETERMINEE
PAR LE DERMATOPHYTE KERATINOMYCES AJELLOI

Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL, Président
G. BISERTE, Rapporteur
Mlle G. SPIK, Examineur
MM. Y. MOSCHETTO, Examineur
J. BIGUET, Examineur

Ce travail a été réalisé, sous la direction de Monsieur Yves MOSCHETTO, Maître de Recherche de l'INSERM, dans les Laboratoires de l'Unité de Recherches sur la Biochimie des Protéines (U 16 de l'INSERM) dirigée par Monsieur le Professeur Paul BOULANGER, Professeur de Biochimie Médicale à l'Université de LILLE II, auquel j'adresse tous mes remerciements pour m'avoir accepté dans son Unité de Recherches INSERM.

Pour sa majeure partie, ce travail s'est intégré dans le cadre du Groupe de Mycologie Fondamentale et Appliquée fondé par Monsieur le Professeur Jean BIGUET, Professeur de Parasitologie à l'Université de LILLE II et Directeur du Groupe de Recherches INSERM d'Immunochimie Parasitaire (U 42).

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL, Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I d'avoir accepté la Présidence du Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Gérard BISERTE, Professeur de Biochimie Pathologique à l'Université de LILLE II, Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE, de ses nombreux conseils, des corrections qu'il a bien voulu apporter à ce travail et de l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger cette thèse.

Je remercie Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK, Maître de Conférences de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean BIGUET, Professeur de Parasitologie à l'Université de LILLE II, Directeur du Groupe de Recherches INSERM d'Immunochimie Parasitaire de l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Yves MOSCHETTO, Docteur ès-Sciences Physiques, Maître de Recherche à l'INSERM pour la formation qu'il m'a donnée et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Mademoiselle Suzanne ANDRIEU, Chef de Travaux à l'Université de LILLE II, pour la mise au point et la réalisation des cultures qui constituent le point de départ de ce travail.

Je remercie Mesdames Michèle LOHEZ, Françoise BRIEZ, Arlette DARGON ; Mesdemoiselles Françoise BOUTTEAU, Odile MOREAU, Thérèse HUART, Françoise BAILLY et plus particulièrement Mademoiselle Edwige TOULOUSE pour l'aide qu'elles ont apportée au cours de ce travail.

Je remercie Monsieur Claude VANDEPERRE pour le travail de photographie.

Je remercie Madame MORANDI, qui a accepté de dactylographier cette thèse.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA KERATINOLYSE

DETERMINEE PAR

LE DERMATOPHYTE KERATINOMYCES AJELLOI

.....

REMARQUES CONCERNANT LA BIBLIOGRAPHIE

- 1°) Le classement des articles se fait dans l'ordre alphabétique du premier auteur.
- 2°) Si pour un premier auteur donné, plusieurs articles sont cités, on les classe du plus ancien au plus récent.
- 3°) A chaque article on attribue un numéro qui représente son ordre d'apparition dans le texte. Si dans la suite du texte l'article est cité de nouveau ce sera avec le même numéro.
- 4°) Pour chaque article, on note la page ou les pages où cet article est cité.

TABLE DES MATIERES

	<u>pages</u>
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
Etude comparative des constituants kératiniques de la laine et du cheveu	2
CHAPITRE II	
Mise en évidence du pouvoir kératinolytique de <u>Kératinomyces ajelloi</u>	16
CHAPITRE III	
Evaluation de la croissance de <u>Kératinomyces ajelloi</u>	23
CHAPITRE IV	
Caractérisation des protéases extraites des cultures de <u>Kératinomyces ajelloi</u>	30
CHAPITRE V	
Purification des enzymes du groupe E_2 Préparation de fractions d'activité élevée	40
CHAPITRE VI	
Activité kératinolytique en fonction du pH	55
CHAPITRE VII	
Etude de la spécificité des enzymes isolées	57
CHAPITRE VIII	
Purification des extraits lyophilisés	70
DISCUSSION	79
RESUME	84
BIBLIOGRAPHIE	86
APPENDICE TECHNIQUE	1-t
BIBLIOGRAPHIE de l'APPENDICE TECHNIQUE	24-t

INTRODUCTION

Le but de notre travail était d'étudier la kératinolyse déterminée par les dermatophytes et la spécificité d'attaque de certains champignons vis-à-vis d'un substrat donné. La spécificité in vivo des champignons pathogènes kératinytiques est plus ou moins large selon les espèces, c'est ainsi que Trichophyton schoenleini est étroitement inféodé à l'homme ainsi que Microsporium audouini alors que Microsporium canis peut infester Chien, Chat, Enfant. Enfin, Trichophyton mentagrophytes est très peu spécifique, non seulement vis-à-vis de l'hôte, mais encore vis-à-vis des tissus kératinisés de celui-ci.

De même, in vitro, chaque espèce possède son propre mécanisme d'action de kératinolyse : présence ou non d'organes perforateurs, différences morphologiques de ces organes mêmes, lésions spécifiques de la peau et des phanères, correspondant à des équipements enzymatiques différents.

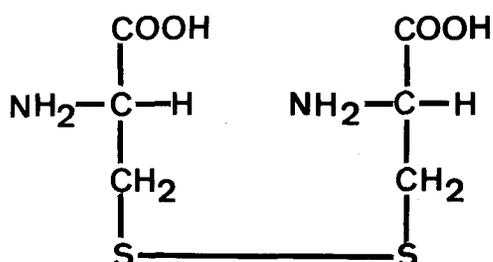
Nous avons choisi Kératinomyces ajelloi, non pathogène, parce qu'il exerce in vitro une action de kératinolyse "biochimiquement vraie" qui a été démontrée par MOSCHETTO et coll. (1) en utilisant la laine comme substrat.

Nous avons cherché à savoir si la nature des enzymes synthétisés variait d'un substrat à l'autre (cheveu, laine, cellules corticales de laine ...). En effet, ces kératines qui appartiennent à une même classe de protéines se distinguent au niveau de leur structure morphologique et par delà même au niveau de certains composants protéiques.

CHAPITRE I

ETUDE COMPARATIVE DE CONSTITUANTS KERATINIQUES
DE LA LAINE ET DU CHEVEU

Les kératines forment une classe de protéines particulièrement insolubles et résistantes. Elles ont en commun des caractères physiques et chimiques et en particulier leur richesse en L-cystine.

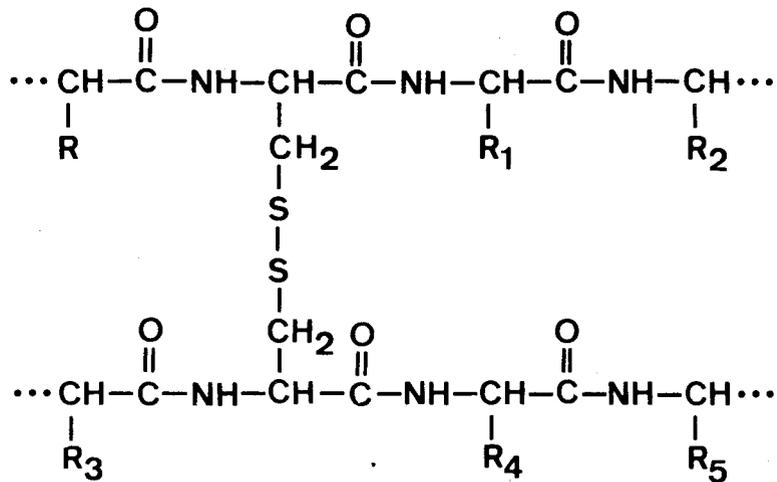


Cet amino-acide est en grande partie responsable de la dureté et de l'insolubilité des kératines. Les ponts disulfure (S-S) permettant la formation d'un réseau tridimensionnel de chaînes peptidiques. La solubilisation des kératines typiquement fibreuses, telles que la

laine ou le cheveu, se fera par rupture des ponts disulfure. On peut réaliser une oxydation par des peracides selon un protocole décrit par SMITH et HARRIS (2), par TOENNIES et coll. (3) ou par ALEXANDER et coll. (4) : ce qui conduit à des kératoses. On peut effectuer une réduction par le thioglycolate de potassium à pH 11 : les groupements thiols ainsi formés sont alkylés pour éviter leur repontage. Cette deuxième méthode a été mise au point par GODDARD et MICHAELIS (5) puis modifiée par GILLESPIE (6)(7).

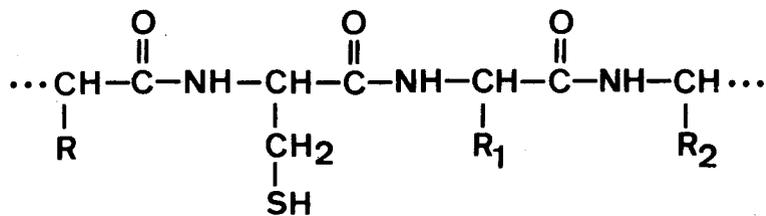
Nous avons préféré la deuxième méthode. En effet, il apparaît des peptides dialysables formés par coupure de liaisons peptidiques après l'action des agents d'oxydation de la laine.

Le schéma réactionnel de la réduction-alkylation est le suivant :

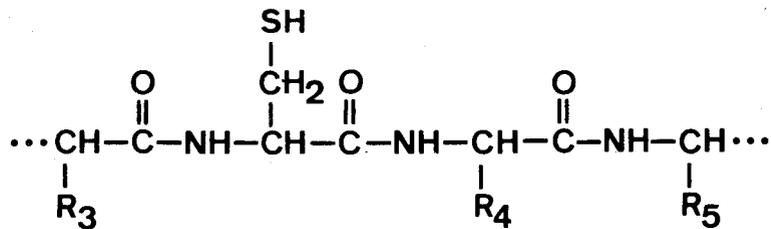


La réduction par l'ion thioglycolate

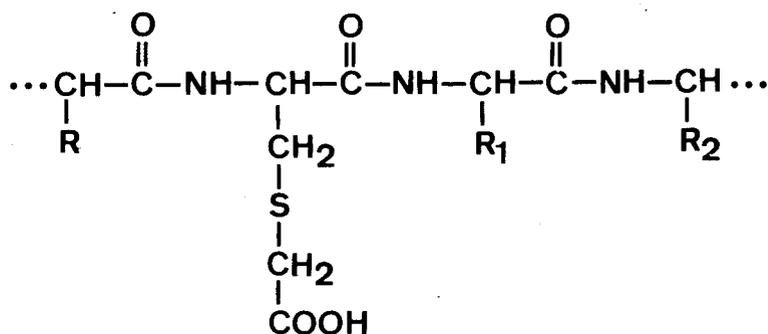
(HS-CH₂-COO⁻) conduit à deux chaînes



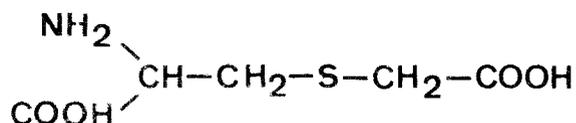
et



Les groupes thiols sont bloqués par l'acide monoiodoacétique ICH₂COOH, on obtient des S-carboxyméthyl kératines (S-CMK, par abréviation)



Après hydrolyse acide (HCl 5,6 N, 105°C, 24 h), la cystine de départ se retrouve sous forme de S-carboxyméthyl cystéine (S - CMC, par abréviation).



Les SCMK peuvent être fractionnées par précipitation à pH 4,4 en milieu de force ionique 0,5 selon O'DONNELL et coll. (8).

Les protéines précipitées (ou SCMK-A) sont relativement "pauvres en soufre" et ont un poids moléculaire de 70 000 et plus. Le surnageant contient les protéines riches en soufre (ou SCMK-B) qui ont un poids moléculaire compris entre 10 000 et 30 000. Le Tableau I rassemble les compositions en amino-acides des kératines totales et des fractions isolées des kératines de la laine et du cheveu.

De nombreux travaux ont été entrepris par des auteurs différents pour isoler à partir de ces deux classes (SCMK-A et SCMK-B) des fractions homogènes. De ce fait il nous paraît utile de préciser quelques définitions concernant ces fractions protéiques.

1°) SCMK-B₁ et SCMK-B₂ : Fractions obtenues à partir de SCMK-B par GILLESPIE (9)(10) en chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 4,50 suivie d'un protocole de purification par précipitation au sulfate d'ammonium.

Au point de vue de la taille moléculaire, elles se caractérisent de la façon suivante :

	Coefficient de sédimentation $S_{20,w}^{\circ}$	Poids moléculaire
SCMK-B ₁	1,65	entre 26 000 et 27 000
SCMK-B ₂	1,55	entre 22 000 et 23 000

COMPOSITION en AMINO ACIDES en NOMBRE de RESIDUS
pour 100 RESIDUS d'ACIDES AMINES

	LAINE native *	CHEVEU natif *	SCMK-A laine **	SCMK-B laine	SCMK-A cheveu (F ₁ G200)	SCMK-B cheveu (F ₃ G200)
Asp	6.0	3.2	9.5	2.8	8.7	4.5
Thr	6.5	7.6	4.9	11.1	6.5	9.8
Ser	9.4	10.3	8.5	14.2	11.2	13.4
Glu	11.7	11.3	14.7	8.0	15.3	7.8
Pro	6.7	7.0	3.6	13.5	3.9	10.1
Gly	9.2	6.5	7.1	6.5	6.5	7.5
Ala	5.1	3.7	6.9	2.8	6.4	3.3
Equiv. I/2 Cys x	12.4	17.0	5.3	17.8	9.15	20.4
Val	5.4	5.8	5.7	5.4	4.9	4.6
Met	0.6	0.7	-	-	traces	traces
Ile	3.3	4.5	3.9	3.4	3.1	2.5
Leu	7.0	6.7	10.2	3.7	7.8	4.4
Tyr	3.4	1.6	3.7	2.0	2.9	1.7
Phe	2.6	2.2	2.9	1.8	2.3	1.5
Lys	2.4	1.9	4.2	0.6	3.4	1.5
His	0.7	0.7	0.8	0.8	1.1	1.4
Arg	6.5	6.8	5.6	5.6	6.3	4.9
Trp	1.1	0.6				

x Equivalent I/2 Cys : I/2 cystine pour la keratine, native ou SCMK
pour les fractions de SCMK

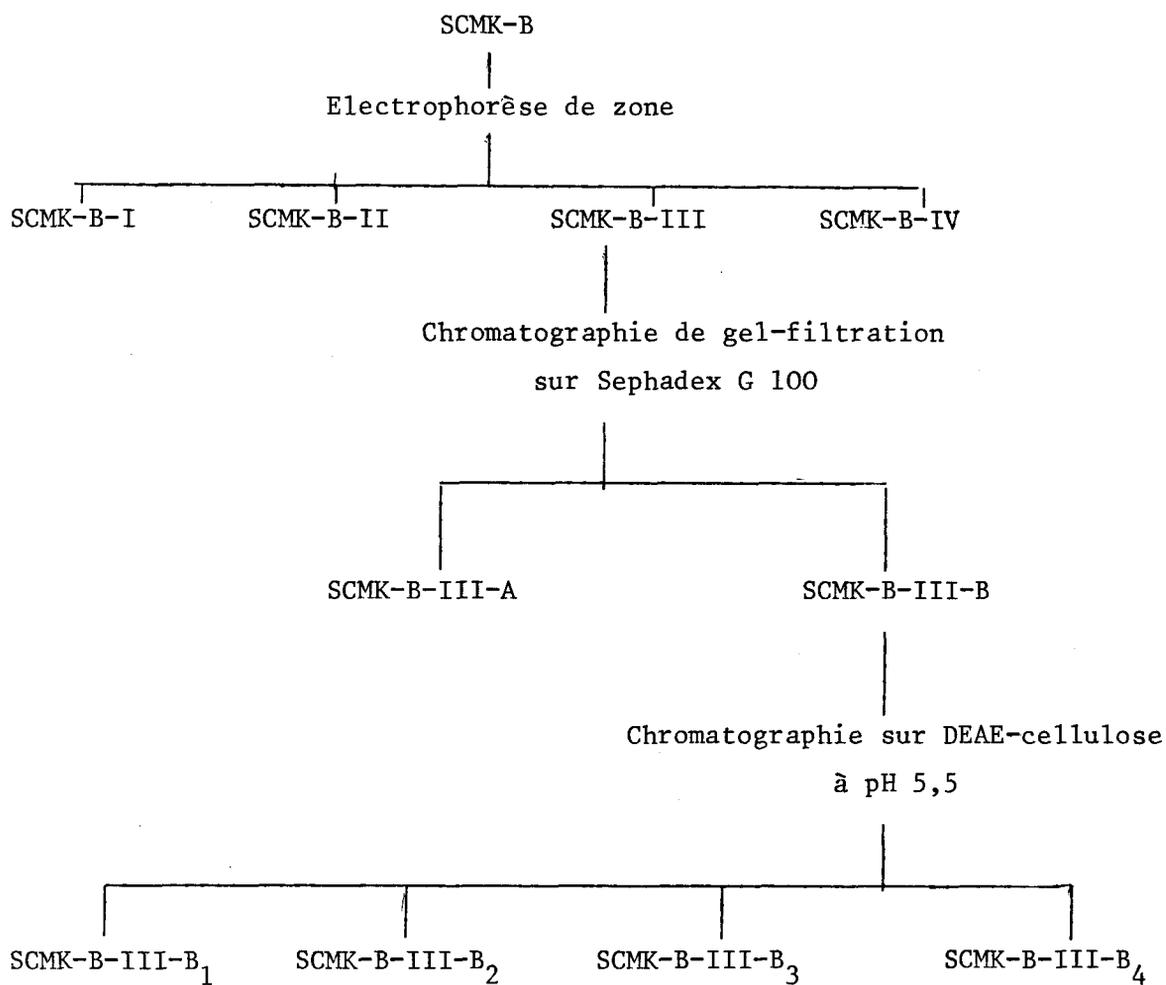
* D'après WARD W et LUNDGREN H.P (11)

** D'après CREWTER W.G et DOWLING L.M (12)



TABLEAU I

2°) SCMK-B-III-B₁ ; SCMK-B-III-B₂ ; SCMK-B-III-B₃ fractions de SCMK-B obtenues par SWART, BAYLETT et JOUBERT (13) selon le protocole suivant :



La séquence en amino-acides de trois de ces fractions a été déterminée. Celle de la protéine SCMK-B-III-B₂ par HAYLETT et SWART (14) ; celle de la SCMK-B-III-B₃ par HAYLETT, SWART et PARRIS (15) et celle de la SCMK-B-III-B₄ par SWART et HAYLETT (16).

Ces trois protéines comportent respectivement 97, 98 et 98 résidus d'acides aminés, ce qui correspond à des poids moléculaires de l'ordre de 11 400.

Si le fractionnement par précipitation donne toute satisfaction pour les kératines de la laine, il n'est pas sélectif pour celles du cheveu. Dans ce cas, l'utilisation de la chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G 200 à pH 8,6 en milieu urée 4 M a permis d'obtenir un fractionnement satisfaisant des SCMK-A et des SCMK-B.

Les Figures 1 et 2 représentent les courbes d'élution des SCMK de laine et de cheveu sur Sephadex G 200 ainsi que les électrophorégrammes en gel d'amidon des différentes fractions obtenues.

On peut observer que les fractions F_1 et F_2 G 200 de SCMK cheveu ont une migration de type SCMK-A et que les fractions F_3 et F_4 migrent comme des SCMK-B.

Nous avons d'autre part utilisé un couplage chromatographique (gel-filtration et chromatographie sur DEAE-cellulose) pour isoler à partir du cheveu une protéine riche en soufre selon un protocole décrit par MOSCHETTO (17) au cours de l'isolement d'une SCMK-B de la laine.

La Figure 3 montre les résultats obtenus par chromatographie sur DEAE-cellulose des SCMK-B de laine ou de cheveu. La colonne est au préalable équilibrée avec du tampon 0,02 M en acétate de sodium. L'élution est réalisée par un gradient linéaire en NaCl de 0,25 à 0,8 M.

Nous pouvons observer que la fraction 2, obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose à partir des SCMK-B de cheveu, est homogène en électrophorèse sur gel d'amidon en milieu urée.

La détermination des compositions en amino-acides des quatre fractions obtenues montre que, dans l'ensemble, les kératines riches en soufre du cheveu sont très voisines de celles de la laine, si on les compare aux fractions SCMK-B₁ et SCMK-B₂ obtenues par GILLESPIE et coll. (18).

Le Tableau II nous donne les compositions en amino-acides de ces différentes fractions.

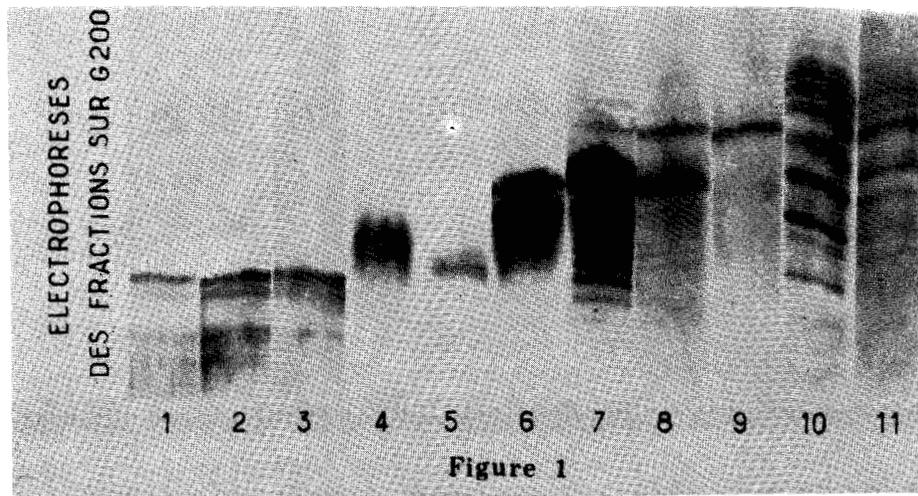
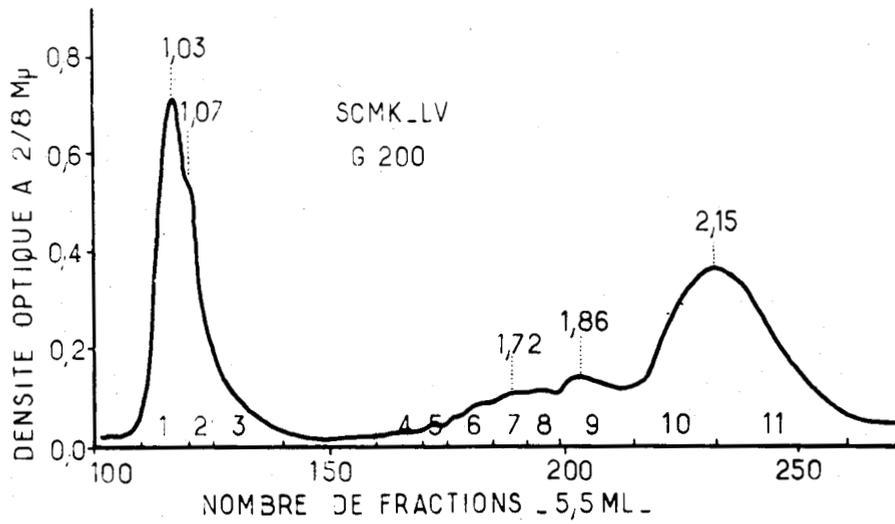


Figure 1

En haut : Chromatographie sur Sephadex G 200 de S-carboxyméthylkératines de laine (d'après MOSCHETTO (17)).

En bas : Electrophorèses



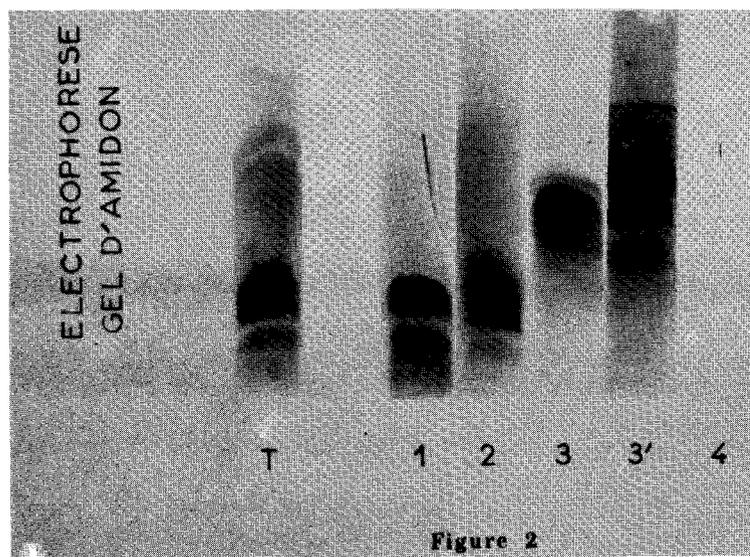
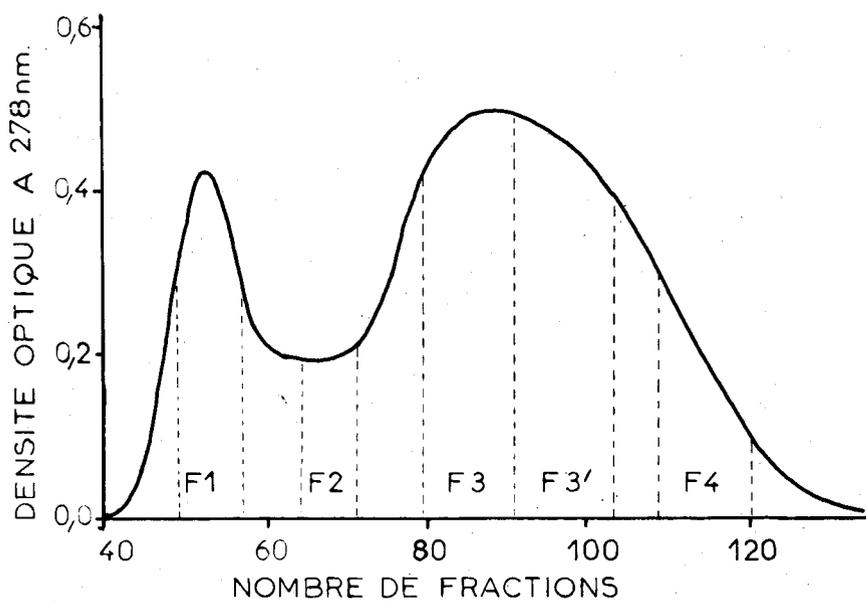


Figure 2

En haut : Chromatographie sur Sephadex G 200 de S-carboxyméthylkératines de cheveu.

En bas : Electrophorèses



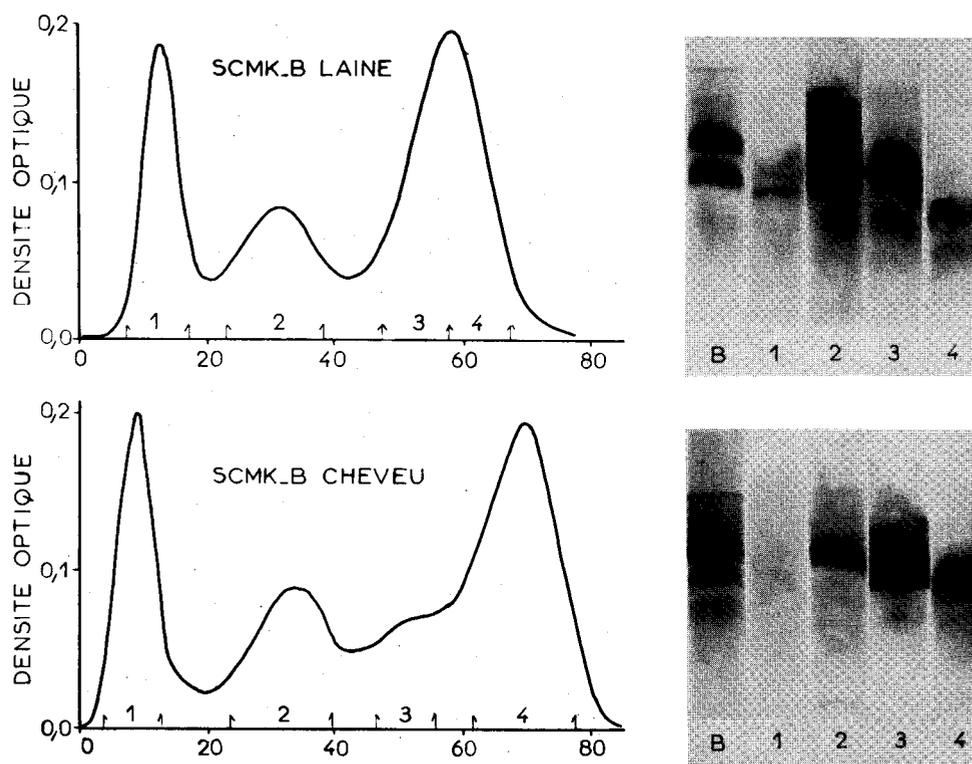


Figure 3

Figure 3



A gauche : Chromatographie comparative des SCM-B de laine et de cheveu sur DEAE-cellulose.

A droite : Electrophorèses

COMPOSITION en AMINO-ACIDES de DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES
à PARTIR du CHEVEU en NOMBRE de RESIDUS d'AMINO-ACIDES pour
100 RESIDUS

	F ₁ DEAE	F ₂ DEAE	F ₃ DEAE	F ₄ DEAE	SCMK-B ₁ laine	SCMK-B ₂ laine
	Résultats personnels				*	*

SCMC	19.1	19.1	25.8	28.2	23.6	23.5
Asp	4.3	5.8	1.8	2.1	0.7	0.9
Thr	10.6	10.9	12.4	10.9	11.4	10.4
Ser	13.0	10.0	13.1	14.0	14.8	14.0
Glu	7.4	7.7	9.5	10.3	9.8	11.7
Pro	11.4	13.7	10.5	9.5	12.3	9.5
Gly	7.6	5.3	5.5	5.9	6.3	8.4
Ala	3.4	2.5	1.9	1.7	3.0	3.3
Val	5.1	4.5	5.4	3.7	4.2	3.9
Met	traces	0.4	0	0	0	0
Ile	2.2	2.3	1.5	1.2	2.7	4.1
Leu	4.2	7.6	2.1	1.4	1.8	2.0
Tyr	1.6	1.3	1.3	1.9	2.1	2.3
Phe	1.9	1.7	0.7	1.1	5.7	1.2
Lys	1.3	1.3	0.4	0.5	0.5	traces
His	1.5	1.7	0.7	1.1	5.7	traces
Arg	5.1	3.9	7.2	5.3	5.1	4.4

* D'après GILLESPIE J.M (9)

** D'après GILLESPIE J.M et coll. (18)

*** Pour la signification des différentes fractions voir figure 3



TABLEAU II

COMPOSITION en ACIDES AMINES

en RESIDUS pour 100 RESIDUS d'ACIDES AMINES

	SCMKB-III B ₂	SCMKB-III B ₃	SCMKB-III B ₄	F ₂ DEAE résultats personnels
SCMC	16.5	17.7	18.8	19.1
Asp	8.2	3.1	3.1	5.5
Thr	10.3	11.5	11.5	10.9
Ser	9.3	12.5	11.5	10.0
Glu	4.1	6.3	6.3	7.7
Pro	13.4	15.6	16.7	13.7
Gly	5.2	2.1	2.1	5.3
Ala	3.1	3.1	3.1	2.5
Val	6.2	5.2	4.2	4.5
Met	—	—	—	0.4
Ile	4.1	3.1	4.2	2.3
Leu	7.2	8.3	7.3	7.6
Tyr	2.1	2.1	1.0	1.3
Phe	3.1	2.1	3.1	1.7
Lys	1.0	1.0	1.0	1.3
His	2.1	2.1	2.0	1.7
Arg	4.1	3.1	3.1	3.9
Trp		1.0	1.0	



TABLEAU III

Par la méthode des dinitrophénylamino-acides nous n'avons pas pu déterminer l'acide aminé en position N-terminale. Nos résultats sont en accord avec les résultats de GILLESPIE et coll. concernant les SCMK-B₂ (18).

Par contre, il y a une différence notable pour les valeurs des coefficients de sédimentation ; en effet, nous avons trouvé pour la fraction 2 obtenue sur DEAE-cellulose un $S_{20,w}^{\circ}$ de 1,2 S, ce qui correspond un poids moléculaire situé entre 10 et 15 000, tandis que la valeur trouvée par GILLESPIE est de $S_{20,w}^{\circ} = 1,55$ S. De plus, des études de masses moléculaires ont donné la valeur de 23 000 pour SCMK-B₂ (ARCHIBALD, diffusion de la lumière).

La ressemblance de la fraction F₂ DEAE est plus nette avec la fraction SCMK-B-III-B₂ isolée de la laine Mérinos par SWART et coll. (13) et dont la séquence en acides aminés a été déterminée par HAYLETT et SWART (14). La protéine SCMK-B-III-B₂ a la S-carboxyméthylcystéine en position C-terminale et l'acide aminé en position N-terminale est l'alanine acétylée. Ces auteurs séparent les SCMK de laine en SCMK-A et SCMK-B par précipitation puis effectuent un fractionnement des constituants des SCMK-B par électrophorèse de zone, gel-filtration et DEAE-cellulose.

HAYLETT et coll. (15), SWART et coll. (16) ont aussi déterminé la séquence en amino-acides de SCMK-B-III-B₃ et SCMK-B₄ obtenues au cours du même fractionnement.

Le Tableau III présente la composition en amino-acides des fractions SCMK-B-III-B₂, SCMK-B-III-B₃ et SCMK-B-III-B₄ et rappelle la composition de notre fraction F₂ obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose.

On remarque la grande analogie entre la Fraction F₂ DEAE et la fraction SCMK-B-III-B₂ ; la seule différence majeure porte sur la teneur en cystine qui est plus élevée dans le cas du cheveu que dans le cas de la laine. Il convient de rappeler que le cheveu "natif" est plus riche en cystine que la laine "native" (Tableau I). Il est à noter que toutes les fractions de SCMK de laine dont la séquence a été publiée : HAYLETT et SWART (14), HAYLETT et coll. (15), SWART et coll. (16), ELLEMAN (19), ELLEMAN et DOPHEIDE (20) ont en position N-terminale l'alanine acétylée et en position C-terminale la S-carboxyméthylcystéine.

Rappelons en plus que le coefficient de sédimentation trouvé pour la fraction F₂ DEAE est de $S_{20,w}^{\circ} = 1,2$ S, ce qui correspond à des poids moléculaires de l'ordre de 10 à 15 000 alors que la fraction SCMK-B-III-B₂ a un poids moléculaire de 11 260.

Il semble donc que la fraction que nous avons obtenue, ainsi que celles étudiées par SWART et coll., puissent représenter la structure de base des kératines riches en soufre.

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR KERATINOLYTIQUE DE

KERATINOMYCES AJELLOI

MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR KERATINOLYTIQUE DE KERATINOMYCES AJELLOI

Nous avons effectué des cultures de Kératinomyces ajelloi (K. ajelloi dans la suite du texte) sur un milieu contenant de la laine ou du cheveu, dont nous venons de décrire les principaux composants protéiques, ou encore des cellules corticales de laine obtenues par hydrolyse pepsique de la laine selon un protocole décrit par BISERTE et PIGACHE (21).

Les kératines natives sont délipidées à l'éther de pétrole qui, d'après les travaux de CREWETHER (22), est sans action sur la kératine. Ensuite, elles sont stérilisées par des antibiotiques ou par de la vapeur d'eau à 110°C et déposées dans le milieu de culture stérile.

Le milieu de culture utilisé (*) est dépourvu de substances nutritives qui, selon les résultats des travaux de ASCHAN-ÅBERG et THYRESSON (23), BÖHME et ZIEGLER (24), FRITSCH (25), CHESTERS et MATHISON (26), RAGOT (27), ROGERS et coll. (28) inhibent presque toujours la kératinolyse. Ce milieu décrit par RAGOT (29) est exclusivement minéral et il est tamponné à pH 7,0 par des phosphates, ce qui d'après KUNERT (30) constitue le meilleur milieu pour dégrader la kératine. L'absence de soufre dans le milieu permet d'examiner l'évolution du soufre kératinique au cours de l'attaque de la fibre.

La croissance du champignon s'effectue à 23°C en chambre noire dans des boîtes de Roux stationnaires pendant des temps choisis, au bout desquels commence l'étude de la culture.

Il faut préciser que, pendant le développement de la culture et avant son traitement, on vérifie l'absence de contaminations bactériennes.

L'étude des cultures a pour objet, d'une part, l'attaque de la fibre par le champignon et d'autre part l'identification des sécrétions enzymatiques du champignon qui se développent sur la fibre.

(*) Par litre de solution, le milieu renferme : 0,497 g de NaH_2PO_4 , H_2O ;
2,486 g de K_2HPO_4 ; 0,252 g de $\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_3)_2$, H_2O ; 0,05 g de MgCl_2 ;
0,016 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de ZnCl_2 .

A - MISE EN EVIDENCE DE LA KERATINOLYSE AU POINT DE VUE MICROSCOPIQUE

Dans le cas de l'attaque de la laine, on observe une libération importante de cellules corticales, mais nous n'observons pas de perforations de la fibre.

Dans le cas du cheveu, nous observons au niveau de la fibre, soit une destruction de la structure cuticulaire, la cuticule prend alors un aspect hérissé, soit des perforations de la fibre dues à des organes perforateurs élaborés par le champignon.

Les photos de la Planche I illustrent l'attaque du champignon sur les fibres de laine, après 40 jours de culture.

Les photos de la planche 2 illustrent les 2 formes d'attaque observées sur le cheveu après 45 jours de culture.

Il convient de noter que nous n'avons pas observé pour toutes les cultures des perforations du cheveu malgré l'identité des conditions opératoires. Par contre, pour certaines cultures, nous avons observé dès le 3ème jour, des perforations de taille équivalente au tiers de l'épaisseur du cheveu et, dès le 7ème jour, à la moitié de l'épaisseur du cheveu. L'abondance des perforations n'est pas fonction de la présence des ions Zn^{++} comme le laissaient prévoir les résultats de ZIEGLER (31) lequel avait constaté une inhibition des protéases des dermatophytes par les sels de zinc ; en effet, nous avons réalisé simultanément deux cultures : l'une sur le milieu habituel contenant du zinc et l'autre sur le même milieu mais sans zinc et nous avons constaté des perforations nombreuses et d'égale importance pour ces deux cultures.

Les perforations pour KUNERT (32) (33) seraient en ce qui concerne le cheveu, le critère le plus sûr de la kératinolyse.

B - MISE EN EVIDENCE DE LA KERATINOLYSE AU NIVEAU DES CONSTITUANTS PROTEIQUES DE LA FIBRE

1°) Cas de la laine

La kératinolyse a été démontrée par MOSCHETTO, RAGOT et BISERTE (1) à propos des cultures de K. ajelloi sur laine attaquée. En effet, les SCMK isolées à partir de la laine attaquée ont un comporte-

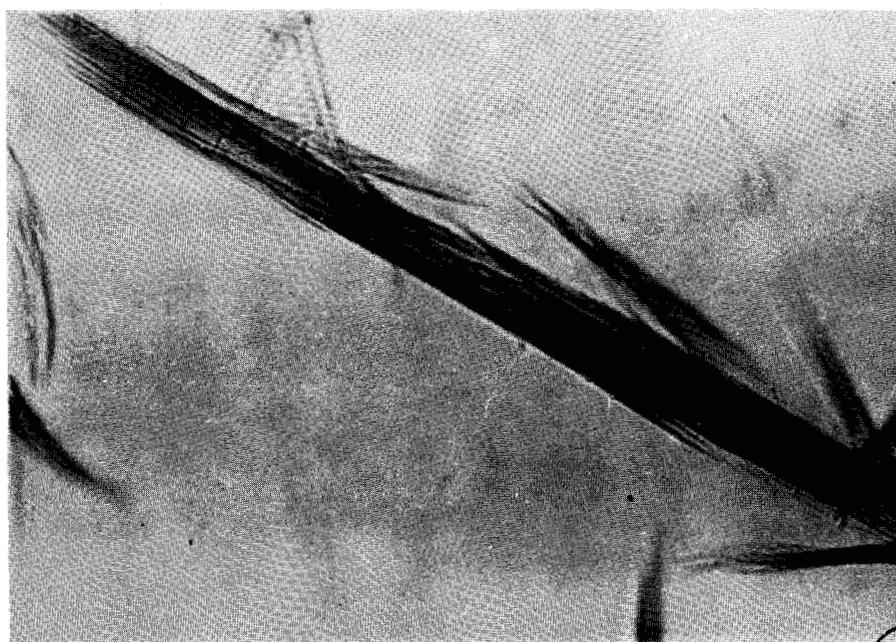
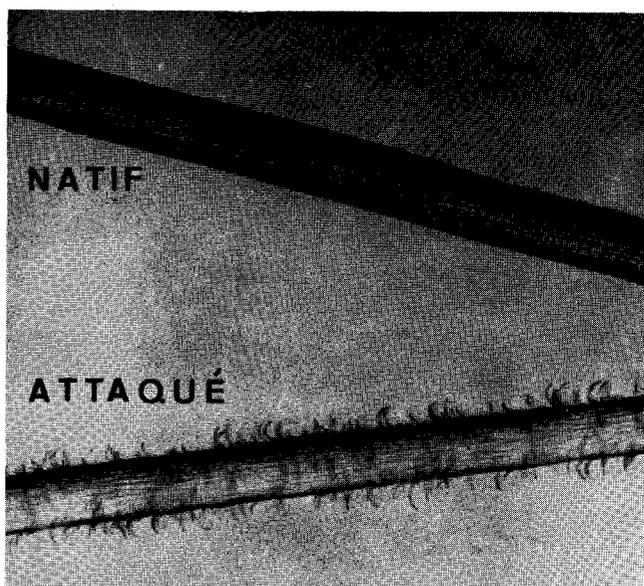


PLANCHE 1

**En haut: cellules corticales libérées par l'attaque
du champignon G=60**

En bas : Attaque au niveau d'une fibre G=160

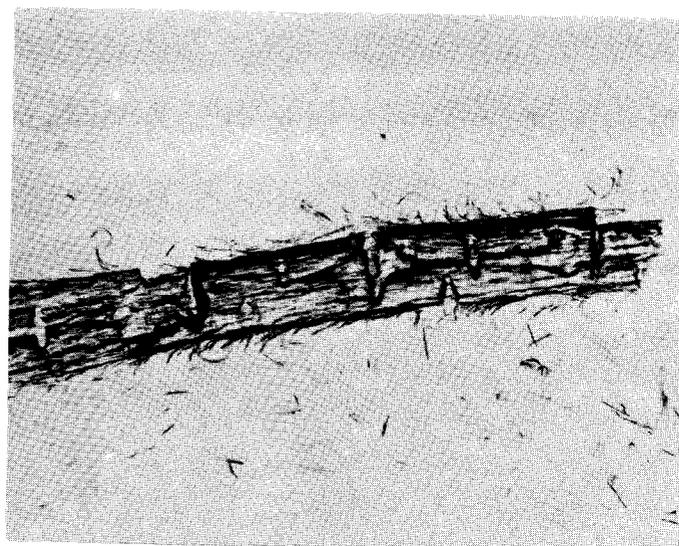


ATTAQUE de la
CUTICULE

G = 160

ORGANE PERFORATEUR

G = 400



CHEVEU ATTAQUÉ

G = 160



ment en gel-filtration sur Sephadex G 200 nettement différent de celui des SCMK de la laine native : le volume d'élution des différentes fractions est différent. De plus, le nombre et la position des bandes obtenues en électrophorèse en gel d'amidon sont très différents, selon que l'on étudie les SCMK de la laine vierge ou de la laine attaquée.

2°) Cas du cheveu

Nous n'observons pas de différences sensibles dans la composition des SCMK isolées à partir du cheveu "natif" ou à partir du cheveu attaqué.

Cependant, la quantité de SCMK extractible par le thioglycolate de potassium est beaucoup plus grande dans le cas du cheveu attaqué. Ceci est illustré par la Figure 4 qui représente les profils d'élution obtenus en chromatographie sur Sephadex G 200 pour les SCMK provenant de 700 mg de cheveu "natif" et pour les SCMK provenant de 700 mg de cheveu attaqué.

3°) Mise en évidence de la rupture des ponts disulfure

La présence de sulfates dans les filtrats est la conséquence de la rupture des ponts - S - S - lesquels sont responsables de la dureté et de l'insolubilité des kératines.

Nous confirmons les résultats de RAGOT quant à la présence dans les filtrats de culture de sulfates que nous avons dosés par la méthode de CHOPRA (34) en utilisant le réactif gélatine baryum.

Pour une fiole de culture où K. ajelloi s'est développé 30 jours sur 500 mg de laine, le filtrat contient 10 mg d'équivalent sulfate de potassium, tandis que le filtrat d'une fiole où le champignon s'est développé 56 jours sur 500 mg de cheveu contient 30 mg d'équivalent sulfate de potassium.

Il faut cependant émettre quelques réserves quant à la spécificité du réactif gélatine baryum : en effet les ions sulfite SO_3^{--} et thiosulfate $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$ réagissent aussi, bien que plus faiblement que les ions sulfate (4 fois moins pour le sulfite et 10 fois moins pour le thiosulfate).

La présence de sulfates dans les filtrats de culture semble générale chez les dermatophytes se développant sur kératines : en effet, KUNERT (35) en trouve dans les cultures de Microsporum gypseum et CLERIVET (36) dans les cultures de Trichophyton verrucosum.

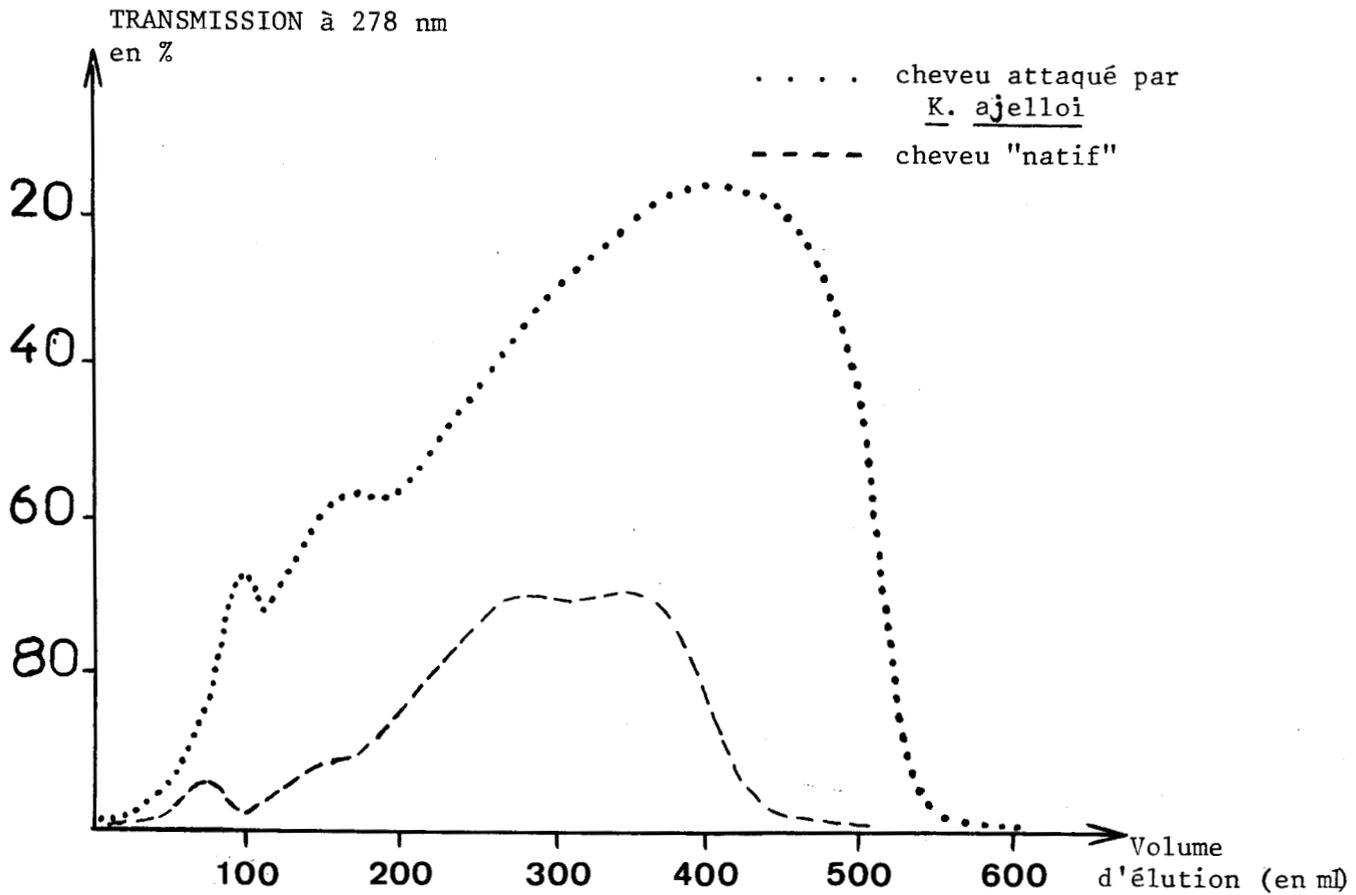


Figure 4

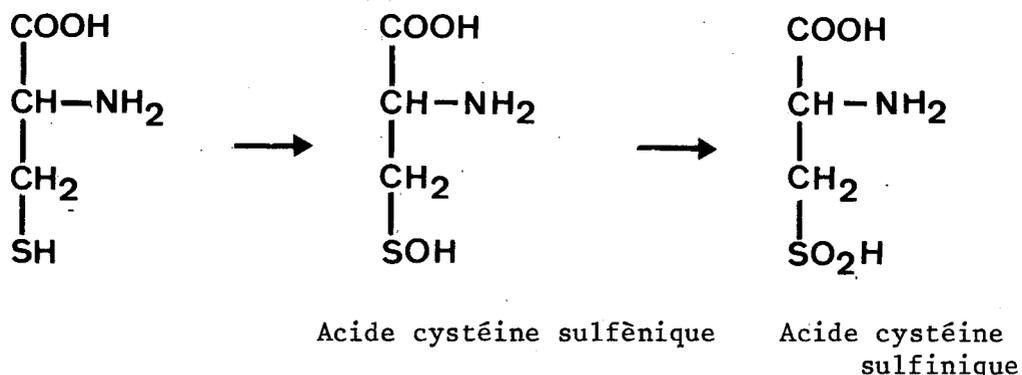
SOLUBILISATION DES KERATINES DU CHEVEU PAR LE THIOLYCOLATE DE POTASSIUM
(CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G 200 DES SCMK EXTRAITES DU CHEVEU)



La quantité de sulfate que nous trouvons dans le cas de la culture sur cheveu correspond à 22 p. 100 de soufre contenu initialement dans la kératine.

Cette valeur est à rapprocher de la disparition de 25 à 60 p. 100 de la cystine constatée par KUNERT (35) lors de l'attaque du cheveu par Microsporium gypseum.

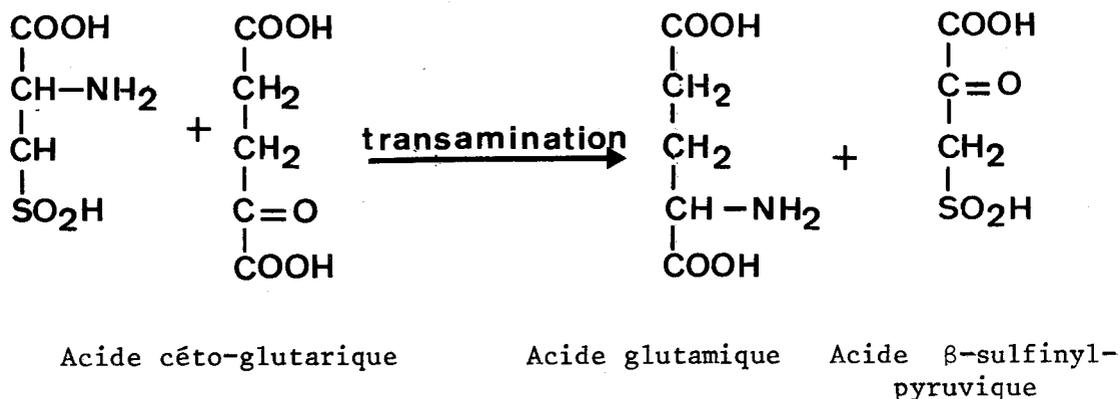
La formation des ions sulfates peut s'expliquer par une réduction des ponts disulfure en groupements thiols qui seraient ensuite oxydés en acide cystéine sulfinique selon un mécanisme proposé par PIRIE (37) pour l'oxydation de la cystéine.



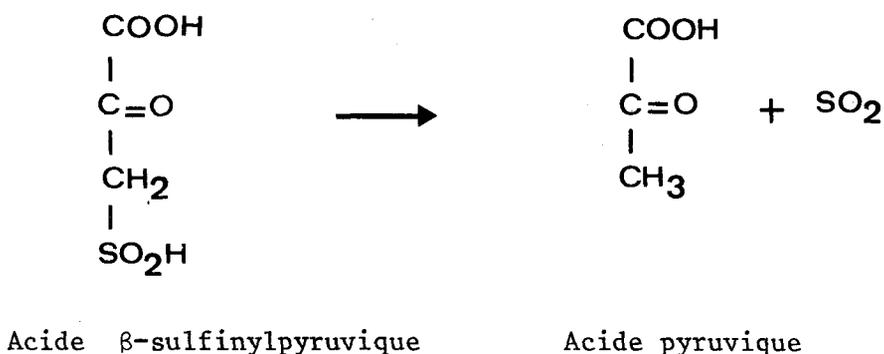
L'acide cystéine sulfinique se transformerait ensuite pour donner naissance à SO_2 , c'est-à-dire aux ions SO_3^{--} puisque les réactions se passent en solution aqueuse.

Nous connaissons deux mécanismes de transformation de l'acide cystéine sulfinique.

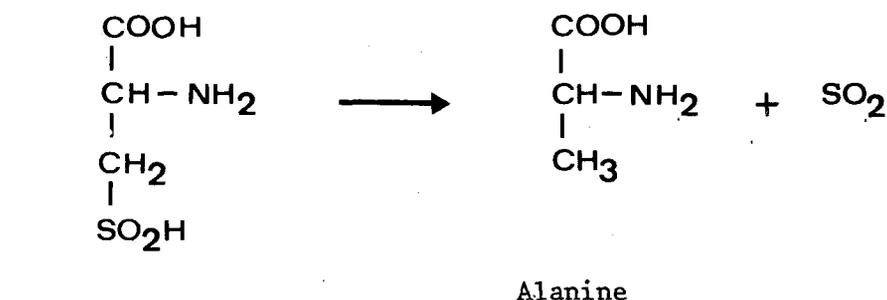
Selon le mécanisme décrit par FROMAGEOT et coll. (38), l'acide cystéine sulfinique est dégradé dans le foie de Lapin après transformation selon le schéma suivant :



L'acide β -sulfinylpyruvique se décompose spontanément en acide pyruvique et anhydride sulfureux.



L'autre mécanisme décrit par SODA et coll. (39) se réduit en fait à une décomposition directe de l'acide cystéine sulfinique en alanine et SO_2 .



Ce deuxième mécanisme a été mis en évidence chez un microorganisme *Alcaligenes foecalis*, l'agent de désulfinisation étant une aspartate- β -décarboxylase. Ce dernier mécanisme, propre aux microorganismes ne semble pas pouvoir être retenu dans le cas des dermatophytes, organismes pluricellulaires.

En résumé, la désorganisation de la fibre, soit par la dispersion des cellules corticales, soit par perforations, la modification des constituants protéiques et l'apparition des sulfates dans les filtrats de cultures prouvent que K. ajelloi détermine une kératinolyse vraie.

CHAPITRE III

EVALUATION DE LA CROISSANCE DE K. AJELLOI

Lorsque le dermatophyte K. ajelloi se développe sur un milieu non kératinique (milieu caséine), on évalue la croissance du champignon par détermination du poids sec du mycélium après filtration des cultures et dessiccation. Le procédé de dessiccation le plus employé consiste à mettre le mycélium une nuit à 110°C. La Figure 5 nous présente deux courbes de croissance sur caséine effectuées à un an d'intervalle dans les mêmes conditions. Les deux courbes sont pratiquement superposées pendant toute la durée de l'expérience. De plus, les profils obtenus sont analogues à ceux obtenus par RAGOT, également sur K. ajelloi et présentent le même maximum absolu vers 11 jours. Il n'est pas possible dans le cas de cultures sur kératines d'évaluer la croissance par une pesée directe, car la fibre est envahie par le mycélium et il faut recourir à d'autres procédés. C'est ainsi que STAHL et coll. (40) mettent à profit la différence de solubilité de la laine et du mycélium dans la soude à 10 p. 100 à l'ébullition. Leur méthode est reprise par CHESTERS et MATHISON (26). Cependant, au cours de leurs expériences, les premiers solubilisent 30 p. 100 du mycélium et les seconds 60 p. 100 du mycélium.

Par ailleurs, ZIEGLER et BOHME (41) calculent la croissance à partir du coefficient économique des dermatophytes que l'on définit par le rapport $\frac{\text{assimilation du glucose}}{\text{poids du mycélium sec}}$ en admettant que ce coefficient reste le même quand on change de substrat. Cette méthode est certes sujette à caution ; RAGOT a montré que l'absorption du glucose est fonction de la teneur du milieu en azote. De plus, nous n'avons pas utilisé le glucose car il inhibe la sécrétion des enzymes protéolytiques. Plus récemment, KUNERT (42) utilise à nouveau les deux méthodes à propos de l'attaque du cheveu par Microsporum gypseum avec une bonne correspondance entre les deux : lorsqu'il utilise la méthode de solubilisation de la fibre dans la soude à 10 p. 100, le poids de mycélium total est obtenu en multipliant par 1,54 le poids de mycélium résiduel après solubilisation complète du cheveu dans la solution de soude. Ces méthodes apparaissent

Poids Sec de 3 Cultures

(Mycélium : en mg)

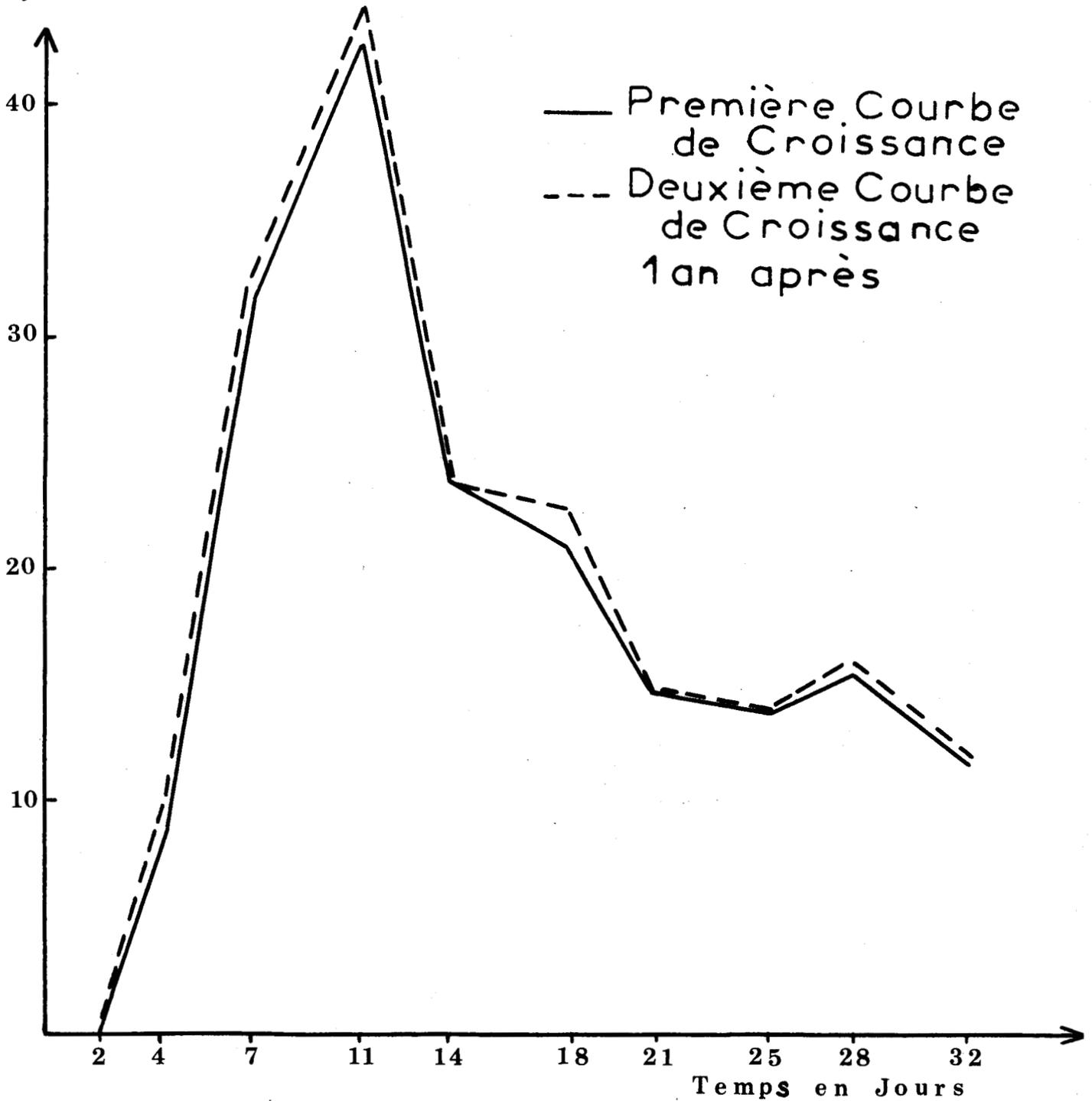


Figure 5

CROISSANCE de K. AJELLOI sur
MILIEU CASEINE



quelque peu subjectives et nous avons essayé de trouver un facteur biochimique permettant une mesure directe de la croissance de champignon. La méthode de DISCHE (43) au carbazole nous a permis de conclure à l'absence d'acides uroniques dans les filtrats et dans le mycélium. Par contre, la méthode de NEUHAUS et LETZRING (44) indique que le mycélium contient des quantités importantes d'osamines pouvant atteindre 185 µg d'osamines par mg de mycélium sec.

Si on considère pour le mycélium, d'une part le poids sec obtenu après 15 heures à 110°C et d'autre part le contenu en osamines déterminé par le dosage de NEUHAUS et LETZRING, on constate que ces deux grandeurs ne sont pas proportionnelles.

Par contre, si on considère les variations, en fonction du temps de culture, du contenu en osamines et du poids sec du mycélium mesuré après 3 jours de dessiccation (sous vide, sur P₂O₅ et à température du laboratoire) on constate une certaine homologie des deux courbes représentant, en fonction du temps, les variations du poids sec et du contenu en osamines. Ceci est illustré par la Figure 6 qui représente pour des cultures de K. ajelloi sur caséine âgées de 2 à 30 jours la variation du poids sec obtenu par les deux méthodes utilisées et le contenu en osamines évalué d'après le dosage de NEUHAUS et LETZRING.

Si on fait le rapport $\frac{\text{poids d'osamines}}{\text{poids sec après dessiccation}}$ on obtient une valeur de 141 µg d'osamines par mg de mycélium sec, l'écart moyen est de 19 µg d'osamines par mg de mycélium sec. Si ce rapport obtenu n'est pas très précis, on peut cependant admettre que la quantité d'osamines contenue dans le mycélium fournit une estimation de la croissance du champignon.

Nous avons appliqué cette méthode pour évaluer la croissance du champignon sur cheveu et ceci, sur deux cultures différentes mais simultanées, l'une sur le milieu minéral habituel et l'autre sur le même milieu mais dépourvu de ZnCl₂; cette deuxième culture avait été faite pour essayer le pouvoir d'inhibition du sel de zinc vis-à-vis des protéases des dermatophytes (pouvoir d'inhibition constaté par ZIEGLER (31)). La Figure 7 présente les courbes de variation du contenu en

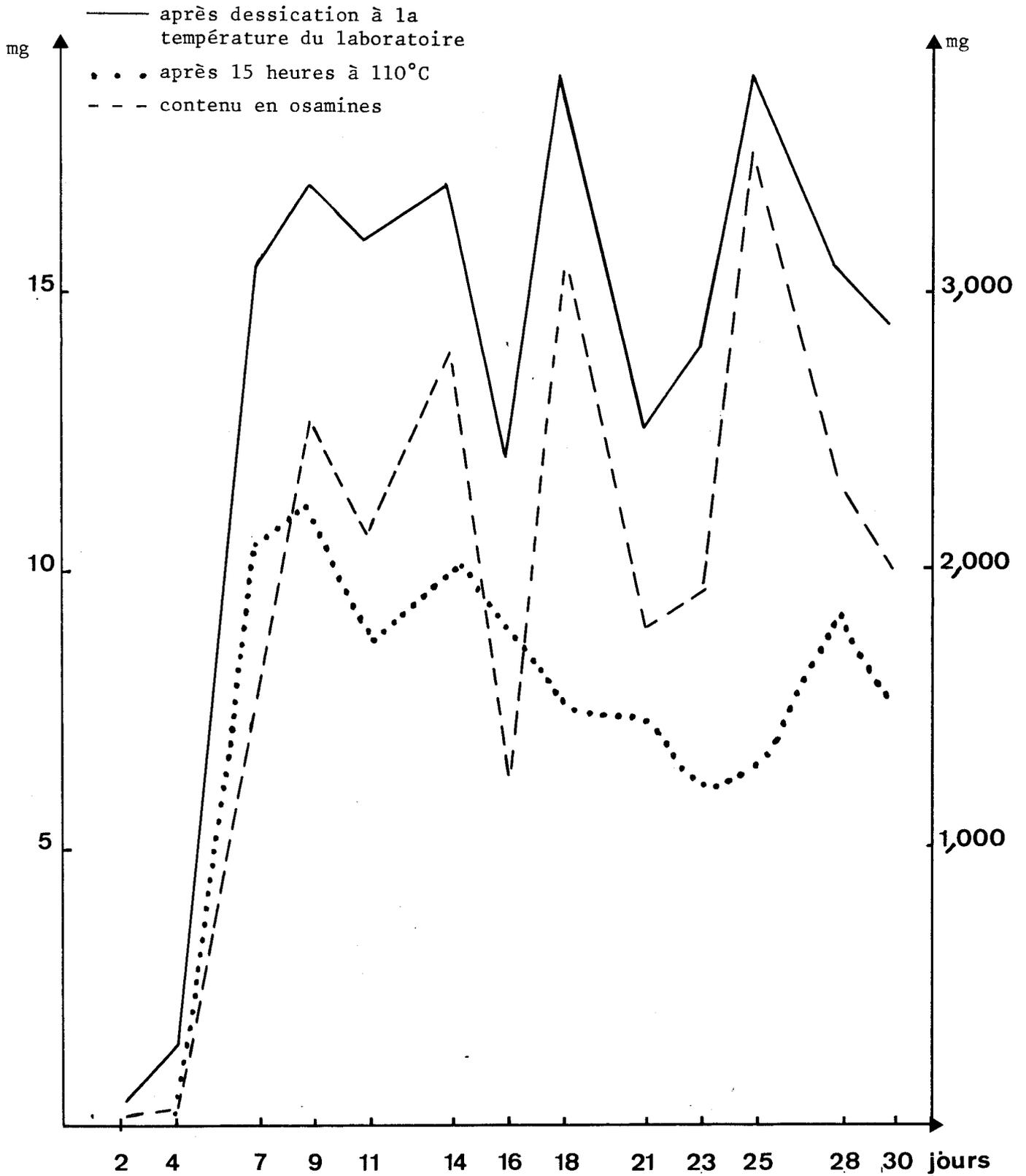


Figure 6

CROISSANCE DE K. AJELLOI SUR CASEINE

Ordonnées de gauche : poids sec d'un mycélium

Ordonnées de droite : contenu en osamines d'un mycélium



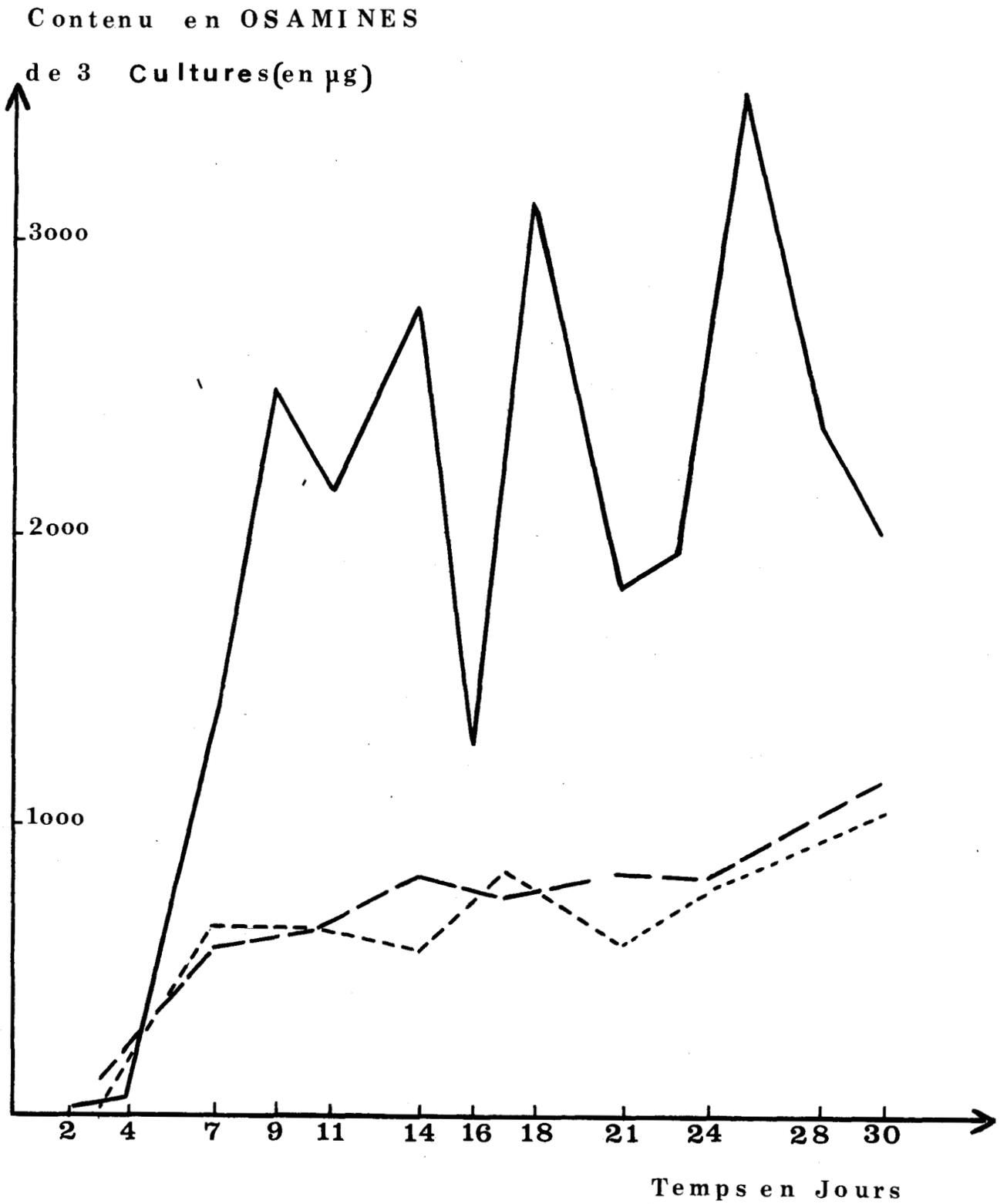


Figure 7

CROISSANCE COMPAREE de K. AJELLOI

sur CASEINE et sur CHEVEU

- Sur Caséine
- - Sur Cheveu sans ZnCl₂
- ... Sur Cheveu avec ZnCl₂



osamines en fonction de l'âge des cultures et rappelle les variations du contenu en osamines pour des cultures sur caséine (courbe de la Figure 6).

Il apparaît que le champignon se développe plus vite sur caséine que sur cheveu et que par ailleurs $ZnCl_2$ n'a pratiquement pas d'effet sur la croissance de K. ajelloi.

En conclusion, on peut dire que si le dosage des osamines selon NEUHAUS et LETZRING ne constitue pas une mesure précise de la croissance du champignon qui se développe sur la fibre, il permet cependant de comparer la croissance du champignon sur des milieux très différents.

C H A P I T R E IV

CARACTERISATION DES PROTEASES
EXTRAITES DES CULTURES DE K. AJELLOI

A - ETUDE DES EXTRAITS ENZYMATIQUES EN ELECTROPHORESE LIBRE

(RUFFIN, ANDRIEU, MOSCHETTO et BISERTE (45))

Nous avons réalisé des cultures comportant 20 fioles de cultures (10 g de kératine pour 2 litres de milieu de culture) dans les conditions décrites au Chapitre II.

Après des temps variables, préalablement choisis, on effectue le fractionnement des cultures à 4°C, selon le mode opératoire décrit par le Tableau IV. Ce mode opératoire comporte notamment une étape d'ultrafiltration sur membrane. Les membranes utilisées sont faites en polymère synthétique hydraté. Elles n'ont pas de charge électrique propre et elles se caractérisent essentiellement par la taille des particules pouvant les traverser : pour prendre un exemple, si on concentre une solution de Cytochrome c, dont le poids moléculaire est de 12 000, à l'aide d'une telle membrane, on retrouve 95 p. 100 du Cytochrome dans la solution concentrée au-dessus de la membrane.

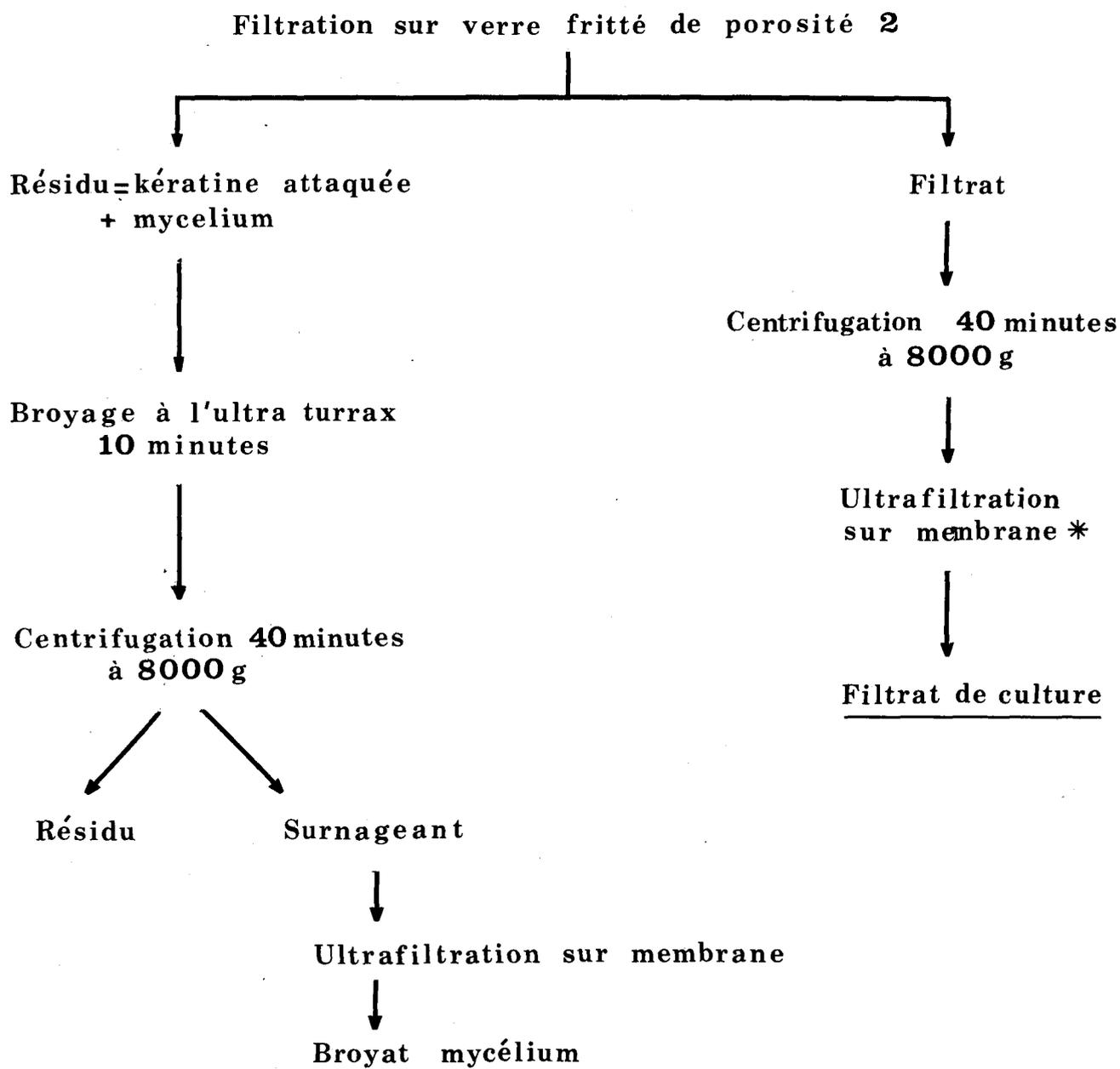
Les deux solutions obtenues au cours du fractionnement : filtrat de culture et broyat mycélien qui ont, après concentration par ultrafiltration, un volume de 15 ml sont soumises à une électrophorèse libre en film liquide, ce qui permet d'identifier les groupes de protéases et de les isoler.

L'activité protéolytique de chacune des 48 fractions obtenues est essayée sur la caséine modifiée selon HAMMARSTEN.

Deux groupes d'enzymes ont été identifiées : l'un (ϵ_1) a un comportement anodique (mobilité de préalbumine), l'autre (ϵ_2) a un comportement cathodique (mobilité de γ -globulines) (Figure 8).

A titre de comparaison, le champignon est d'abord cultivé sur milieu dépourvu de kératine, mais contenant de la caséine. La production des enzymes est alors faible et limitée aux enzymes du groupe ϵ_2 , les enzymes du groupe ϵ_1 sont inexistantes.

FRACTIONNEMENT DES CULTURES DE K. AJELLOI



*Membranes Diaflo UM₂ (MECA-VIGOR)

TABLEAU IV



Dans le cas de la laine, au bout de 10 jours, l'enzyme ϵ_2 est déjà abondante dans le filtrat et il n'y a presque pas d'enzyme dans le broyat mycélien.

Au 30^{ème} jour, on trouve les deux enzymes ϵ_1 et ϵ_2 dans le filtrat et le broyat mycélien contient une quantité importante de ϵ_1 . Les cultures âgées de 45 à 60 jours ne contiennent presque plus d'enzymes dans le broyat mycélien ; par contre, celles-ci sont présentes dans le filtrat, sous forme partiellement autolysée comme le révèle l'élargissement des zones actives des électrophorégrammes.

Dans le cas de cultures sur cheveu, les enzymes sont produites en quantité moindre ; cependant leur variation relative et leur ordre d'apparition sont analogues à ce qu'on observe dans le cas de la laine.

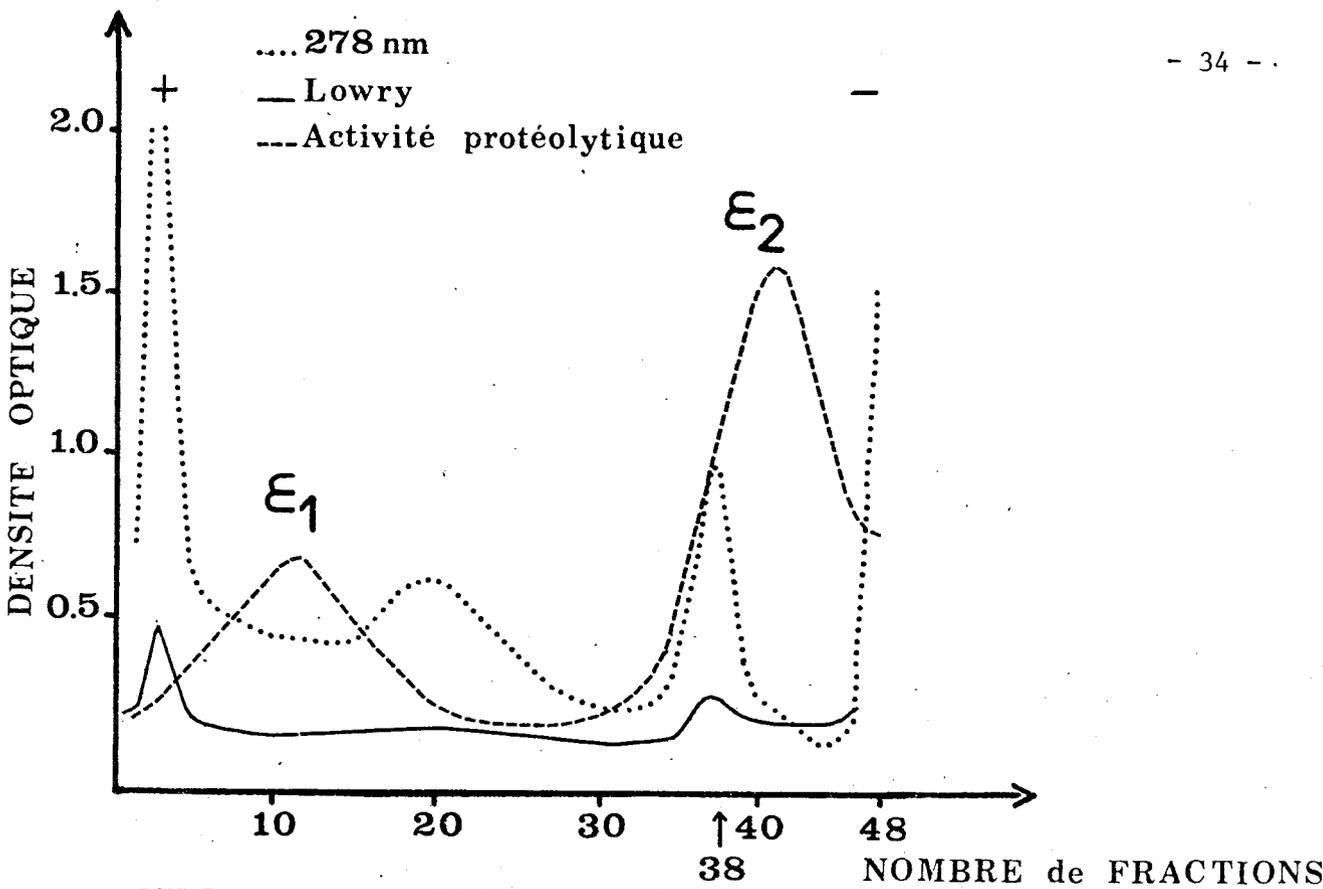
Dans le cas des cellules corticales de laine qui, de par leur préparation, ne contiennent plus ni ciment intercellulaire, ni kératine molle, la croissance du champignon est très lente et faible. D'autre part, la production d'enzymes est faible et limitée à l'enzyme ϵ_2 . La croissance s'arrête rapidement et les cellules corticales ne sont pas digérées.

L'ensemble des résultats obtenus est schématisé sur le Tableau V.

Ces données expérimentales peuvent être interprétées en fonction de la structure du substrat. Elles permettent de proposer une explication de l'hydrolyse de la laine par Kératinomyces ajelloi.

Rappelons que MOSCHETTO (1) avait montré qu'il s'agissait d'une kératinolyse vraie. En effet, l'étude des protéines extraites d'une laine attaquée par K. ajelloi montre que celles-ci sont différentes des protéines extraites de la laine native. De plus, l'étude de leur poids moléculaire permet de les identifier à de gros fragments peptidiques.

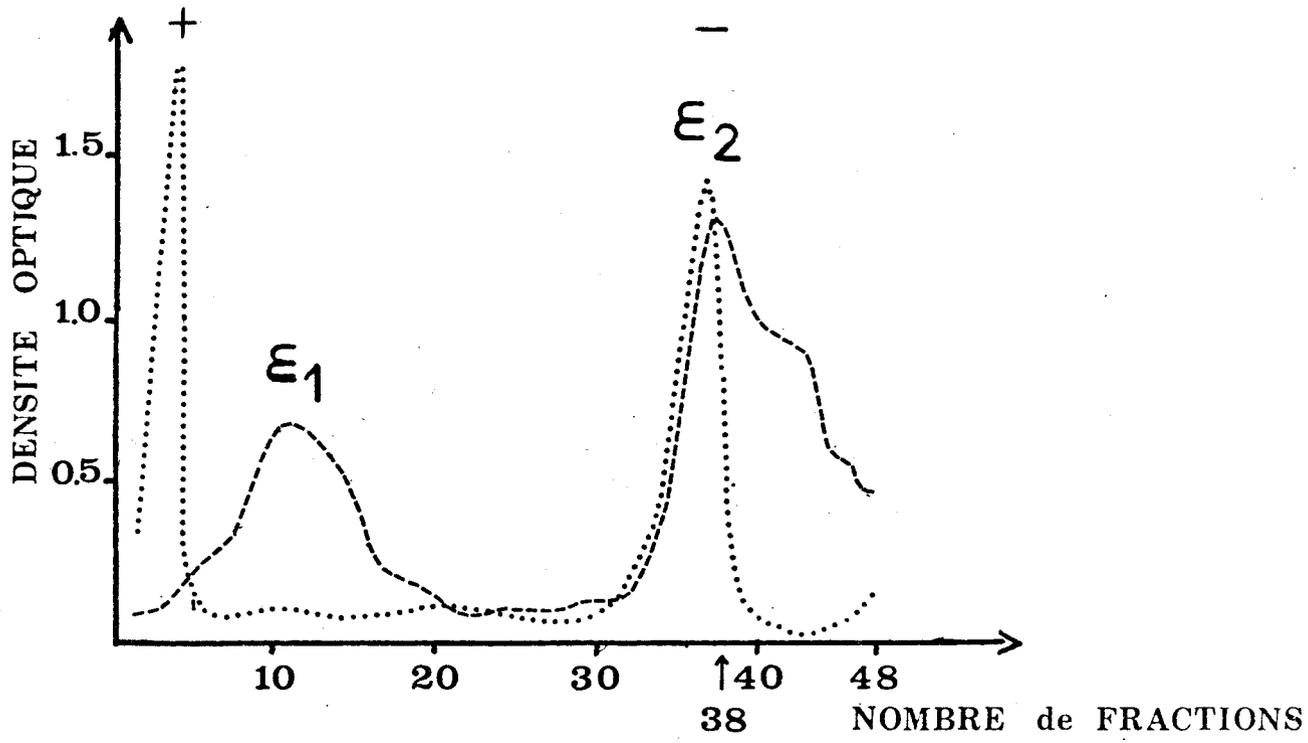
Nous pouvons donc admettre que, dans un premier temps, il y a sécrétion d'une enzyme non spécifique des kératines fortement réticulées. Cette enzyme ϵ_2 s'attaque d'une part aux ciments intercellulaires et aux kératines les plus molles, fournissant ainsi des peptides nécessaires à la croissance du champignon. Lorsque ces éléments, facilement dégradables sont consommés, des hydrolases plus spécifiques sont synthétisées, qui



CONDITIONS OPERATOIRES : POINT D'INJECTION : Tube 38

Température = + 5°C ; Tension : 2200 volts ;

Intensité : 160 mA ; Force ionique : 0,002



ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE DE FILTRATS DE CULTURE DE K.ajelloi
SUR CHEVEU

En haut : culture de 45 jours.

En bas : culture de 56 jours

Figure 8



VARIATION DE L'IMPORTANCE DES GROUPES ϵ_1 et ϵ_2
 EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE ET DU SUBSTRAT UTILISE

LAINE 10 jours		LAINE 30 jours		LAINE 60 jours		CHEVEUX 30 jours		CHEVEUX 45 jours		Cell.cort. DE LAINE 30 jours	
Filtrat		Filtrat									
ϵ_1	ϵ_2	ϵ_1	ϵ_2								
											
Broyat											
ϵ_1	ϵ_2	ϵ_1	ϵ_2								
											

La hauteur des rectangles correspond à la surface située sous la courbe d'activité définie par des électrophorégrammes analogues à ceux de la Figure 8.

TABLEAU V



aboutissent à l'hydrolyse plus avancée des substances fortement kératinisées.

Ces substances sont alors soit directement utilisées par le champignon, soit scindées en fragments plus petits par l'enzyme ϵ_2 .

Ce mécanisme serait le reflet d'une certaine possibilité d'adaptation du champignon. Cette hypothèse se trouve étayée par le fait que sur cellules corticales, le champignon se développe peu, sans doute parce qu'il n'assimile que quelques peptides résiduels provenant de la préparation de cellules corticales obtenues par hydrolyse pepsique ménagée de la laine.

Dans les conditions de l'expérience, la croissance se ralentissant trop par manque de substances assimilables, le champignon ne peut synthétiser assez d'enzyme ϵ_1 pour assurer l'attaque des kératines fortement réticulées et les transformer en substrat assimilable.

Ce mécanisme est analogue à celui proposé par ZIEGLER et RICHTER (46) qui suppose l'existence dans les filtrats de culture de dermatophytes d'une kératinase dont le rôle serait de rendre la kératine hydrolysable par d'autres protéases moins spécifiques.

B - CARACTERISATION DES GROUPES D'ENZYMES ϵ_1 et ϵ_2 .

Pour caractériser les groupes de protéases obtenus par électrophorèse en film liquide à partir des extraits de culture, nous avons étudié leur activité en fonction du pH et leur activité en présence d'inhibiteurs.

1°) Activité caséinolytique en fonction du pH.

Nous avons d'abord étudié les variations d'activité caséinolytique en fonction du pH afin de déterminer le pH optimum d'activité.

Le substrat utilisé est la caséine à 2 p. 100 traitée selon HAMMARSTEN.

Les valeurs de pH essayées varient de pH 6,2 à pH 10,2, les tampons phosphate étant utilisés dans le domaine 6,2 à 7,8 et les tampons borate pour les valeurs supérieures.

Nous avons exprimé l'activité protéolytique en unités protéolytiques: une unité protéolytique (U.P.) est l'activité qui libère, à partir de la caséine, 1 μ g de tyrosine par minute.

L'activité protéolytique spécifique est l'activité protéolytique par mg de protéine contenu dans la préparation enzymatique (U.P./mg).

La Figure 9 représente l'activité protéolytique spécifique des enzymes ϵ_1 et ϵ_2 en fonction du pH.

Les solutions sont isolées par électrophorèse en film liquide à partir d'un filtrat de culture de K. ajelloi, s'étant développé 56 jours sur cheveu (voir Figure 8, diagramme du bas). Seule la fraction ϵ_1 a une activité spécifique notable sur la caséine, la courbe comporte notamment un maximum au voisinage de pH 7,4 qui correspond à une activité spécifique de 39 U.P./mg.

2°) Activité de ϵ_1 et de ϵ_2 en présence d'inhibiteurs.

Nous avons essayé l'inhibiteur trypsique du soja et le diisopropylfluorophosphate (DIFP).

Le DIFP utilisé en gros excès (2 mg de DIFP pour 200 μ g de protéines, inhibe sensiblement ϵ_1 et ϵ_2 (Tableau VI) ; on peut donc classer ces enzymes dans le groupe des enzymes à sérine.

Quant à l'inhibiteur trypsique du soja, il ne les inhibe pas ; à l'inverse, on observe une légère activation (5 %) à pH 7 et une activation plus marquée (10 à 15 %) pour les valeurs de pH comprises entre 9 et 10.

Enzyme	Activité sans effecteur (★)	Activité résiduelle en présence de DIFP (★)
1	100	32
2	100	24

(★) On fixe arbitrairement à 100 p. 100 l'activité de l'enzyme dans les conditions de l'essai et en l'absence d'inhibiteur.

TABLEAU VI

ACTIVITE PROTEOLYTIQUE SPECIFIQUE en U.P./mg DES ENZYMES
EN FONCTION DU pH
(activité mesurée sur caséine)

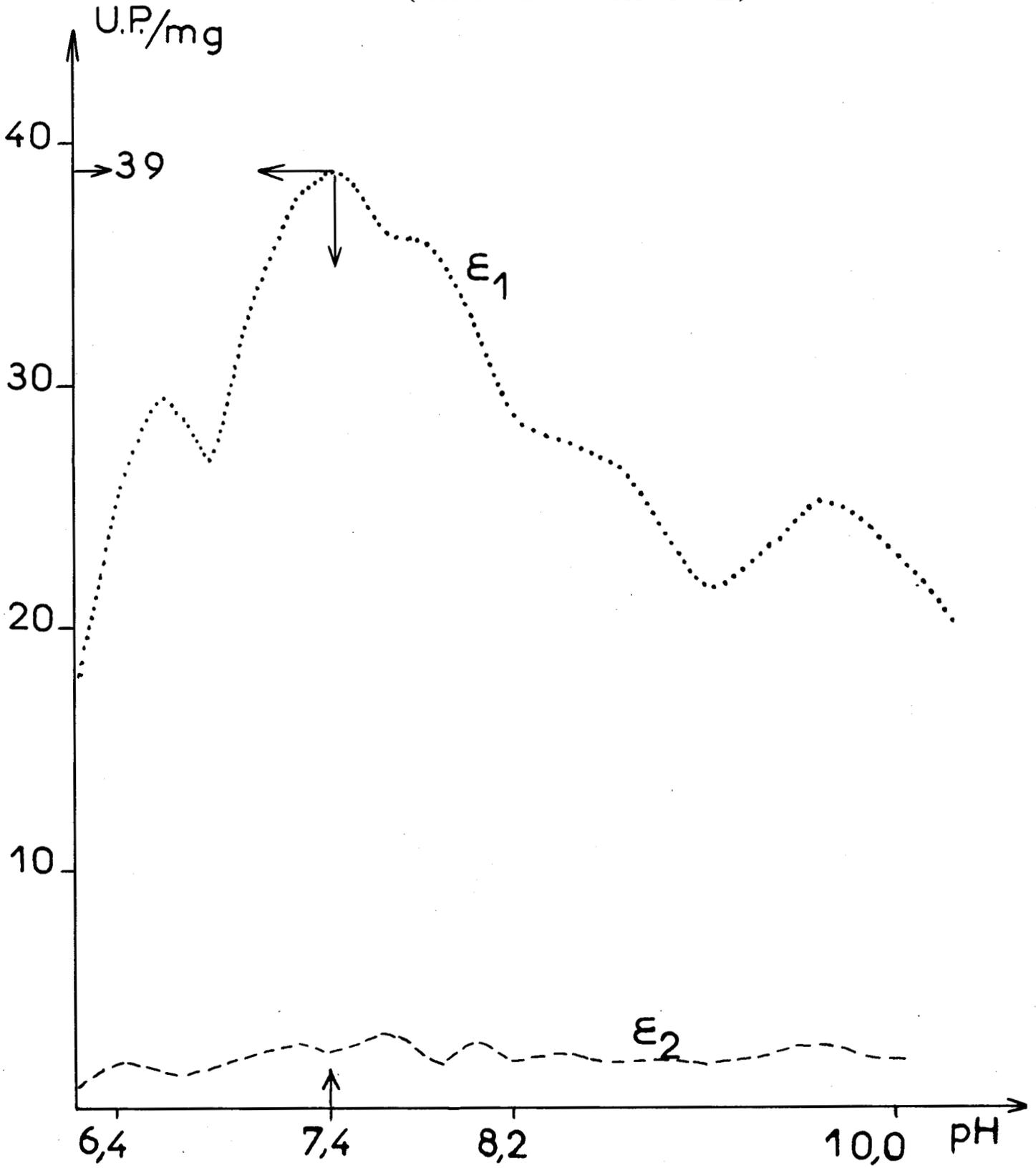


Figure 9



L'étude en électrophorèse en film liquide met donc en évidence deux groupes de protéases ϵ_1 et ϵ_2 .

L'enzyme ϵ_1 a une activité protéolytique spécifique nettement supérieure à celle de ϵ_2 . De plus, son profil de concentration dans les extraits de cultures d'âge varié, indique qu'elle est plus spécifique des kératines fortement réticulées que l'enzyme ϵ_2 .

Leur comportement vis-à-vis du DIFP permet de les classer dans les sérine-protéases ; en outre, le fait qu'elles ne soient pas inhibées par l'inhibiteur tryptique du soja les différencie des enzymes de type trypsine.

CHAPITRE V

PURIFICATION DES ENZYMES DU GROUPE ϵ_2 .
PREPARATION DE FRACTIONS D'ACTIVITE ELEVEE.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DU GROUPE ENZYMATIQUE ϵ_2

Bien que le groupe enzymatique ϵ_1 soit à notre avis déterminant au cours de la kératinolyse, nous avons étudié le comportement chromatographique du groupe ϵ_2 ; en effet, sa mobilité électrophorétique le rapproche de la kératinase isolée par YU et coll. (47) à partir des filtrats de Trichophyton mentagrophytes cultivé sur poil de Cheval.

Il nous a paru intéressant de savoir si deux champignons voisins cultivés sur des substrats analogues, synthétisent le même type d'enzyme, ce qui indiquerait une adaptation au substrat.

Au cours du fractionnement, nous mesurons les activités protéolytiques sur une solution à 2 p. 100, tamponnée à pH 7,4 de caséine préparée selon HAMMARSTEN.

Nous avons également repéré l'activité protéolytique avec électrophorèse sur lame d'agarose selon une technique décrite par URIEL (48) (voir Appendice technique).

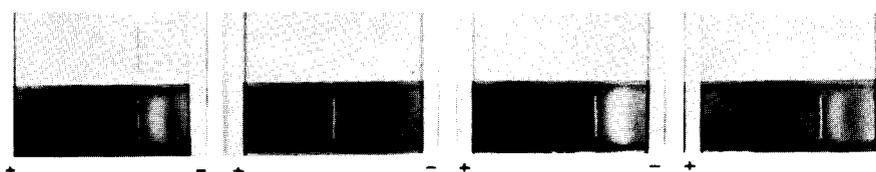
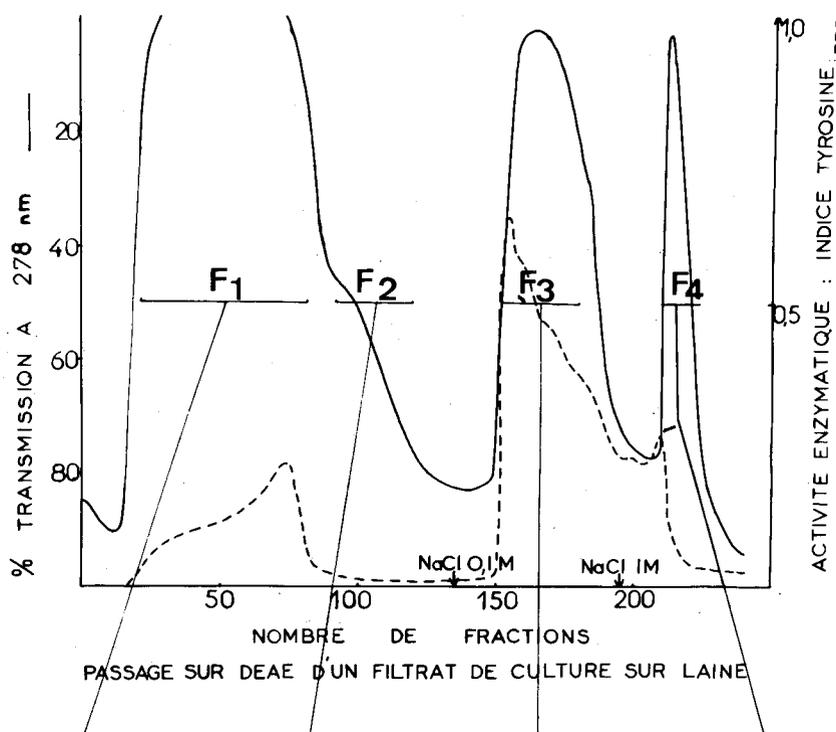
Les solutions enzymatiques de type ϵ_2 sont purifiées par passage sur DEAE-cellulose équilibrée dans du tampon phosphate 0,028 M, pH 7,0. Une partie de l'activité n'est pas fixée. Quant aux protéines fixées, elles sont éluées successivement par NaCl 0,1 M et NaCl 1 M dans le tampon. Le profil d'éluion obtenu est celui de la Figure 10.

Pour chaque fraction sont représentées la réaction avec l'Amidoschwarz et l'enzymogramme. Nous n'obtenons pas de réaction avec l'Amidoschwarz, ceci étant sans doute dû à une trop faible quantité de protéines.

Seule la fraction F_2 n'a pas d'activité protéolytique. Pour l'ensemble des fractions (fraction non fixée comprise), la récupération de l'activité protéolytique est de 85 p. 100.

Les valeurs des activités protéolytiques spécifiques des différentes fractions F_1 , F_3 , F_4 et du produit avant passage sur DEAE-cellulose sont portées sur le Tableau VII.

PASSAGE SUR DEAE-CELLULOSE D'UN FILTRAT
DE CULTURE DE K. AJELLO SUR LAINE



En haut : Profils de la D.O. à 278 nm et de l'activité
protéolytique de l'éluat de colonne.

En bas : Electrophorèses indiquant pour chaque fraction
le contenu protéique (cliché blanc) et l'activité
protéolytique (cliché avec fond noir)

FIGURE 10



Solution essayée	Solution initiale ϵ_2	Fraction F_1 (non fixée)	Fraction F_3 éluée par NaCl 0,1 M	Fraction F_4 éluée par NaCl 1 M
Activité spécifique en U.P./mg**	8,5	0,35	40,8	2,7
Activité totale(*)	100 %	11,5 %	50,6 %	22,8 %

(*) On fixe arbitrairement à 100 p. 100 l'activité totale avant chromatographie.

(**) Pour situer ces activités, signalons que d'après NARAHASHI (49), la Pronase P de Streptomyces griseus a une activité spécifique de 45 U.P./mg.

TABLEAU VII

Toutefois, les trois fractions n'ont pas un comportement homogène en électrophorèse en film liquide à pH 8,6 : en effet, pour chacune des fractions actives, on voit apparaître des composants A et B, respectivement de mobilité anodique et cathodique. A titre d'exemple, la Figure 11 représente la densité optique à 278 nm ainsi que l'activité protéolytique pour les 48 fractions obtenues à partir de la fraction F_1 .

Ces différents composants A et B se différencient par leur activité protéolytique en présence de DIFP et d'inhibiteur trypsique du soja (Tableau VIII).

INHIBITION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES SOUS-FRACTIONS

A et B

(hydrolyse de la caséine à pH 7,4 et à 40°C)

Nature de la solution	Activité protéolytique sans effecteur d'inhibiteur (*)	Activité protéolytique en présence d'inhibiteur trypsique du soja (*)	Activité protéolytique en présence du DIFP (*)
F ₁ -A	100	140	89
F ₁ -B	100	160	39
F ₃ -A	100	16	4
F ₃ -B	100	150	50
F ₄ -A	100	200	100
F ₄ -B	100	200	54

(*) On a fixé arbitrairement à 100 p. 100 l'activité protéolytique sans effecteur.

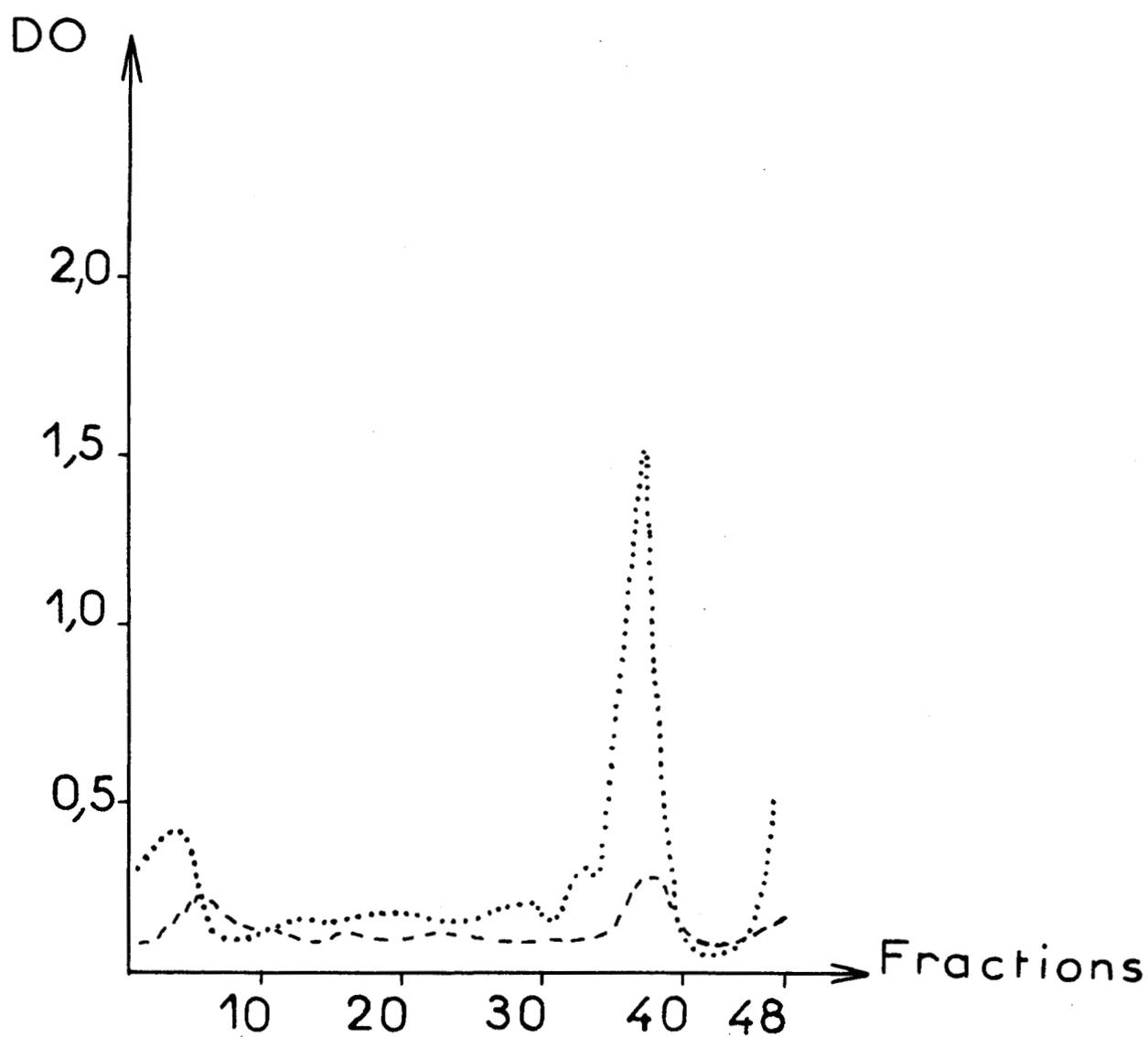
TABLEAU VIII

L'augmentation de l'activité protéolytique en présence d'inhibiteur du soja peut s'expliquer par une compétition entre enzymes de type trypsique et "kératinases". L'inhibition apparente de la kératinase par l'enzyme de type trypsique peut résulter d'une compétition au niveau des sites du substrat.

Ceci est en accord avec les travaux de RAGOT (29) qui, sur des

ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE (*) DE LA FRACTION F₁
(voir Figure 10)

... D.O. à 278 nm (contenu protéique)
--- D.O. à 660 nm (activité protéolytique)



(*) Tension : 2200 volts ; Intensité : 160 mA
Force ionique : 0,002 ; Température : + 5°C

Figure 11



extraits de culture de K. ajelloi, constate une légère augmentation en présence d'inhibiteur trypsique du soja et avec les résultats obtenus par CLERIVET (36) sur des cultures de Trichophyton verrucosum qui rendent compte d'une activité notable des extraits de culture sur l'ester méthylique de la tosyl-arginine (TAME), substrat spécifique de la trypsine.

En résumé, la DEAE-cellulose dans les conditions utilisées, ne permet pas d'obtenir des enzymes pures puisque l'hétérogénéité est évidente en électrophorèse en film liquide, mais elle permet d'obtenir une fraction (F₃) qui a une activité protéolytique 5 fois supérieure à celle du produit de départ.

Les différents extraits de culture et fractions obtenues sur DEAE-cellulose n'étaient pas assez concentrés pour faire des mesures d'activité kératolytiques sur le poil de cobaye, selon la technique de NOVAL et NICKERSON (50) modifiée par YU et coll. (51). Aussi, nous avons étudié les possibilités de concentration compatibles avec la conservation de l'activité.

B - ESSAIS DE CONCENTRATION DES EXTRAITS DE CULTURE DE K. Ajelloi

Plusieurs techniques ont été utilisées : dialyse courte contre de l'eau distillée (24 heures) suivie de lyophilisation ; lyophilisation directe ; ultrafiltrations répétées, évaporation.

La dialyse et l'ultrafiltration ont l'avantage d'éliminer une grosse partie des sels.

L'ultrafiltration répétée consiste à diluer avec de l'eau distillée, une solution déjà concentrée par ultrafiltration et à concentrer à nouveau cette solution obtenue.

Les résultats du Tableau IX nous montrent qu'aucun de ces traitements ne donne de bons résultats en ce qui concerne la récupération de l'activité protéolytique.

RECUPERATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE
APRES DIFFERENTS TYPES DE CONCENTRATION

Solution essayée	Activité protéolytique en p. 100
Filtrat de culture départ	100
Evaporation (a)	33
Ultrafiltration répétée (b)	3
Lyophilisation sans dialyse préalable	3,5
Dialyse contre de l'eau désionisée + lyophilisation	1

(a) Avec un évaporateur rotatif à 28°C

(b) Sous une pression de 3 kg/cm²

TABLEAU IX



Le mauvais résultat obtenu par ultrafiltration répétée peut s'expliquer par l'utilisation de l'eau désionisée mais aussi par la qualité des membranes. En effet, si au cours de la première série d'essais les résultats obtenus étaient satisfaisants, par la suite les membranes ont donné des résultats très inégaux quant à la rétention de l'activité et nous avons cessé de les utiliser.

Ces essais ont finalement abouti à adopter la technique de concentration préconisée par YU et coll. (52), ce qui nous a permis de lyophiliser sans perte importante d'activité et de plus d'obtenir en solution les enzymes liées au mycélium et à la fibre de kératine.

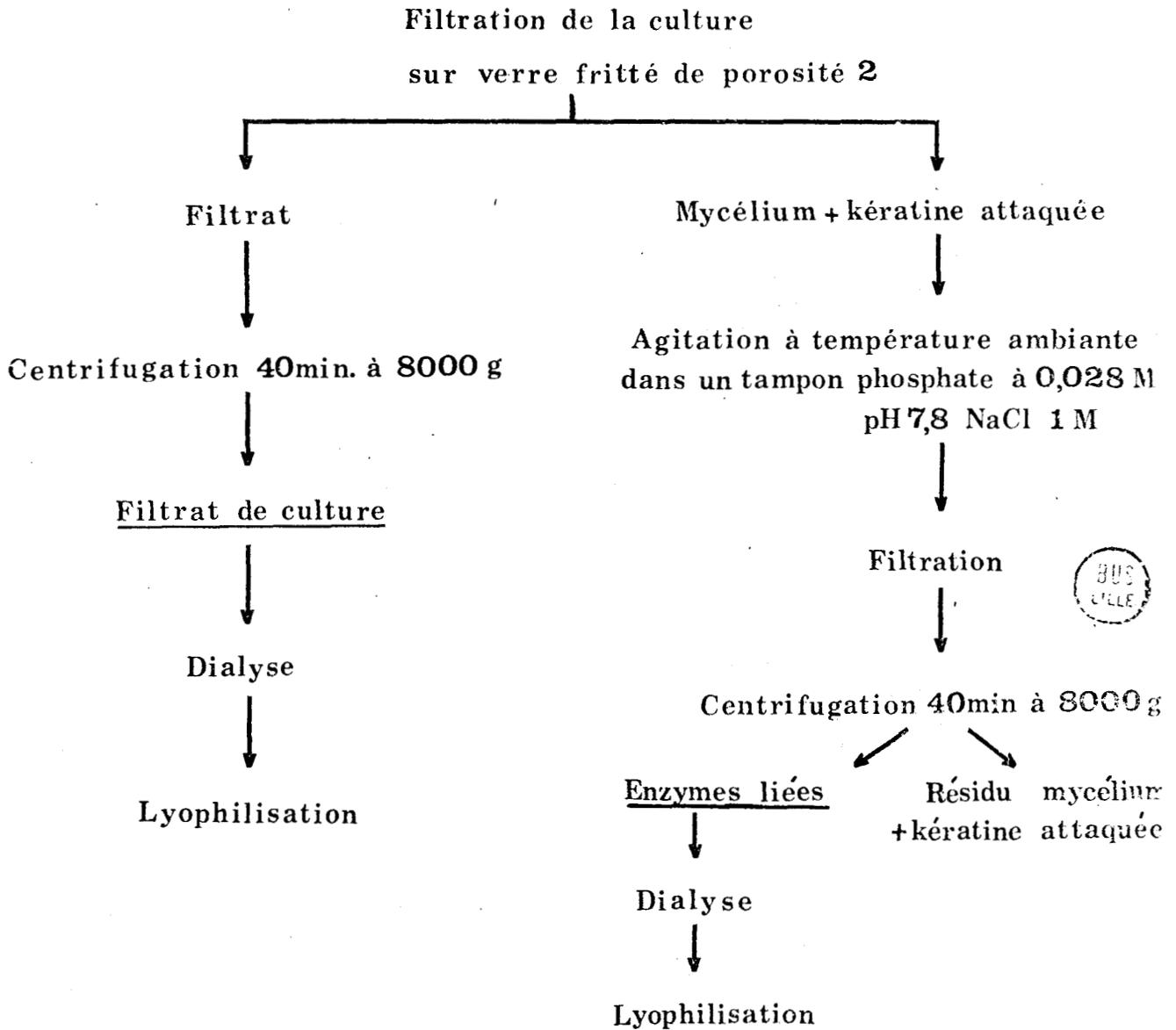
Le traitement de la culture est indiqué par le Tableau X.

Les 2 fractions de la culture : filtrat et enzymes liées sont dialysées 20 heures contre du tampon phosphate 0,001 M de pH 7,8 puis lyophilisées en présence de Sephadex G 150 et de glucose. Le glucose avait déjà été utilisé comme additif par beaucoup d'auteurs. Nous avons songé à ajouter du Sephadex, car les enzymes adsorbées sur Sephadex sont plus résistantes à la dénaturation que les enzymes en solution (MOSBACH)(53).

On récupère ainsi jusqu'à 95 p. 100 de l'activité protéolytique de départ en ce qui concerne la fraction "Enzymes liées". Il faut noter que la fraction "enzymes liées" conserve une grande partie de son activité si on dialyse contre de l'eau désionisée avant de lyophiliser, ce qui peut s'expliquer par la force ionique élevée de la solution de départ.

Le Tableau XI donne les résultats obtenus par différents traitements sur la fraction "enzymes liées".

En ce qui concerne le filtrat de culture, le même traitement (dialyse contre du tampon 0,001 M, pH 7,8, suivie de la lyophilisation) permet de récupérer également 95 p. 100 de l'activité protéolytique initiale.



PREPARATION DES EXTRAITS DE CULTURE LYOPHILISES

RECUPERATION DE L'ACTIVITE DES ENZYMES LIEES
APRES DIALYSE ET LYOPHILISATION

Solution essayée	Activité (en %) (★)
Solution "enzymes liées" de départ	100
Dialyse de 20 heures contre du phosphate 0,001 M + lyophilisation avec additifs	95
Dialyse de 20 heures contre du phosphate 0,001 M + lyophilisation ordinaire	85
Dialyse de 20 heures contre de l'eau désionisée + lyophili- sation avec additifs	80

(★) On a fixé arbitrairement à 100 p. 100 l'activité totale de la solution avant lyophilisation.

TABLEAU XI



Il faut noter cependant que pour les solutions d'enzymes liées, la perte d'activité au cours de la lyophilisation varie d'une culture à l'autre : les rendements enregistrés sur 5 cultures réalisées dans des conditions identiques (substrat, temps de culture) ont varié de 55 p. 100 à 95 p. 100. Le rendement est cependant toujours supérieur dans le cas où on lyophilise avec des additifs.

Le Tableau XII donne les rendements en activité selon le mode de lyophilisation et les valeurs d'activités spécifiques pour la solution d'enzymes liées issue d'une culture ayant les caractéristiques suivantes :

- Nombre de fioles de culture : 8
- Substrat : cheveux coupés en bouts de 2 à 10 mm
- Durée de la culture : 35 jours
- Observations microscopiques : nombreuses perforations du cheveu.

La conservation de l'activité peut s'expliquer par une absorption (ou adsorption) de l'enzyme sur les grains de Sephadex, ce qui limiterait ou empêcherait la dénaturation. Cette absorption serait facilitée par le glucose car sa présence paraît indispensable à la protection de l'enzyme.

Il convient de noter que CLERIVET (36) a essayé, sans enregistrer de résultats positifs, l'addition de glucose dans les solutions d'enzymes liées obtenues à partir de culture de Trichophyton verrucosum se développant sur laine.

COMPORTEMENT D'UNE SOLUTION D'ENZYMES LIÉES A LA
LYOPHILISATION

Solution obtenue	Contenu protéique	Activité protéolytique totale (**) (en p.100)	Activité protéolytique spécifique (en U.P./mg)
Après dialyse	10,10 mg	100	163
Après lyophilisation ordinaire	8,00 mg	71	146
Après lyophilisation avec Sephadex G 150	7,55 mg	67	145
Après lyophilisation avec glucose + Sephadex G 150	7,65 mg	72	155

(*) d'après le dosage de LOWRY

(**) On a fixé à 100 p. 100 l'activité protéolytique de toute la solution d'enzymes liées après dialyse.

TABLEAU XII



La dénaturation des enzymes liées au cours de la lyophilisation se manifeste par la baisse de l'activité spécifique (comme le montrent les résultats précédents) et aussi par un comportement différent vis-à-vis des effecteurs, comme l'indiquent les résultats suivants (Tableau XIII).

Les effecteurs utilisés pour cette détermination sont l'inhibiteur trypsique du soja, le chlorure cuivrique (CuCl_2) et le chlorure ferrique ; ces deux derniers étant connus pour inhiber la kératinase I isolée par YU et coll. (51) à partir des filtrats de cultures de Trichophyton mentagrophytes.

ACTION DES EFFECTEURS SUR UNE SOLUTION D'ENZYMES LIEES
APRES DIALYSE ET LYOPHILISATION

Solution essayée	Act. protéolytique (sans effecteur)	En présence d'inhibiteur du soja	En présence de CuCl_2 0,001 <u>M</u>	En présence de FeCl_3 0,001 <u>M</u>
Après dialyse	100 %	56 %	0 %	0 %
Après lyophilisation ordinaire	100 %	97 %	2 %	59 %
Après lyophilisation avec Sephadex G 150	100 %	100 %	8 %	77 %
Après lyophilisation avec Sephadex G 150 + Glucose	100 %	96 %	9 %	87 %

TABLEAU XIII

En ce qui concerne les filtrats de culture, il est apparu au cours des cultures successives que l'activité globale était conservée au cours de la lyophilisation dans la mesure où la dialyse se faisait contre le tampon phosphate 0,001 M et où sa durée n'excédait pas 20 heures.

Des résultats exposés dans ce Chapitre, il apparaît que la chromatographie sur DEAE-cellulose des filtrats de culture permet d'obtenir une fraction (F_3) ayant une activité protéolytique spécifique de 40 U.P./mg, c'est-à-dire 5 fois supérieure à celle du filtrat de départ. Cependant cette valeur est nettement inférieure à celle obtenue pour la solution des enzymes liées obtenues en plaçant l'ensemble mycélium-fibre dans un milieu hypertonique (NaCl 1 M). En effet, pour cette solution nous obtenons une activité spécifique de 163 U.P./mg (Tableau XII).

Les enzymes liées par le simple fait qu'elles sont extraites au niveau de l'ensemble mycélium-fibre apparaissent comme les agents directs de la kératinolyse. C'est pour cette raison que nous avons entrepris leur étude en vue d'établir leur pouvoir protéolytique et plus précisément la nature des liaisons peptidiques qu'elles peuvent rompre.

Par ailleurs, du fait de la conservation de l'activité au cours de la lyophilisation effectuée dans des conditions définies, nous avons obtenu des extraits suffisamment concentrés et actifs pour faire des mesures d'activité kératinolytique.

CHAPITRE VI

ACTIVITE KERATINOLYTIQUE EN FONCTION
DU PH

La possibilité d'obtenir après lyophilisation des enzymes actives nous a permis de mesurer l'activité kératinolytique.

Nous utilisons du poil de Cobaye (race HARTLEY) préalablement délipidé à l'éther de pétrole par extraction continue dans un appareil de Soxhlet pendant 24 heures. Le poil (50 mg) est mis en contact avec la préparation enzymatique dans 5 ml de tampon pendant 1 heure à 40°C, on sépare le liquide par filtration et on mesure la densité optique à 278 nm ; cette densité optique, corrigée de la somme de deux témoins (poil dans le tampon et préparation enzymatique dans le tampon) est convertie en activité kératinolytique selon la définition de YU (51). Une unité d'activité kératinolytique (U.K.) correspond à une densité optique à 278 nm de 0,100. L'activité kératinolytique spécifique qui est l'activité pour un mg de protéine s'exprimera en U.K./mg.

La Figure 12 nous présente deux courbes : une courbe d'activité kératinolytique spécifique en fonction du pH établie pour un filtrat de culture où les deux groupes enzymatiques ϵ_1 et ϵ_2 sont présentes et une courbe d'activité protéolytique en fonction du pH établi pour une fraction ϵ_1 obtenue par électrophorèse en film liquide à partir d'un filtrat de culture. On remarque que les deux courbes ont deux maxima communs : pH 7,4 et pH 8,0. Cependant, le maximum absolu d'activité kératinolytique s'observe pour pH 6,8 et correspond à une activité de 22,8 U.K./mg. Cette valeur est plus faible que celle obtenue par YU et coll. (54) avec la kératinase I isolée du filtrat de culture de Trichophyton mentagrophytes (34,0 U.K./mg).

Par ailleurs, les acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse du poil de Cobaye sont les mêmes pour les valeurs de pH suivantes : 6,8 ; 7,4 ; 8,2 et 9,0. Ces derniers résultats d'une part, et les profils d'activité en fonction du pH d'autre part, militent en faveur de l'existence d'isoenzymes.

ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ET KERATINOLYTIQUE
EN FONCTION du pH

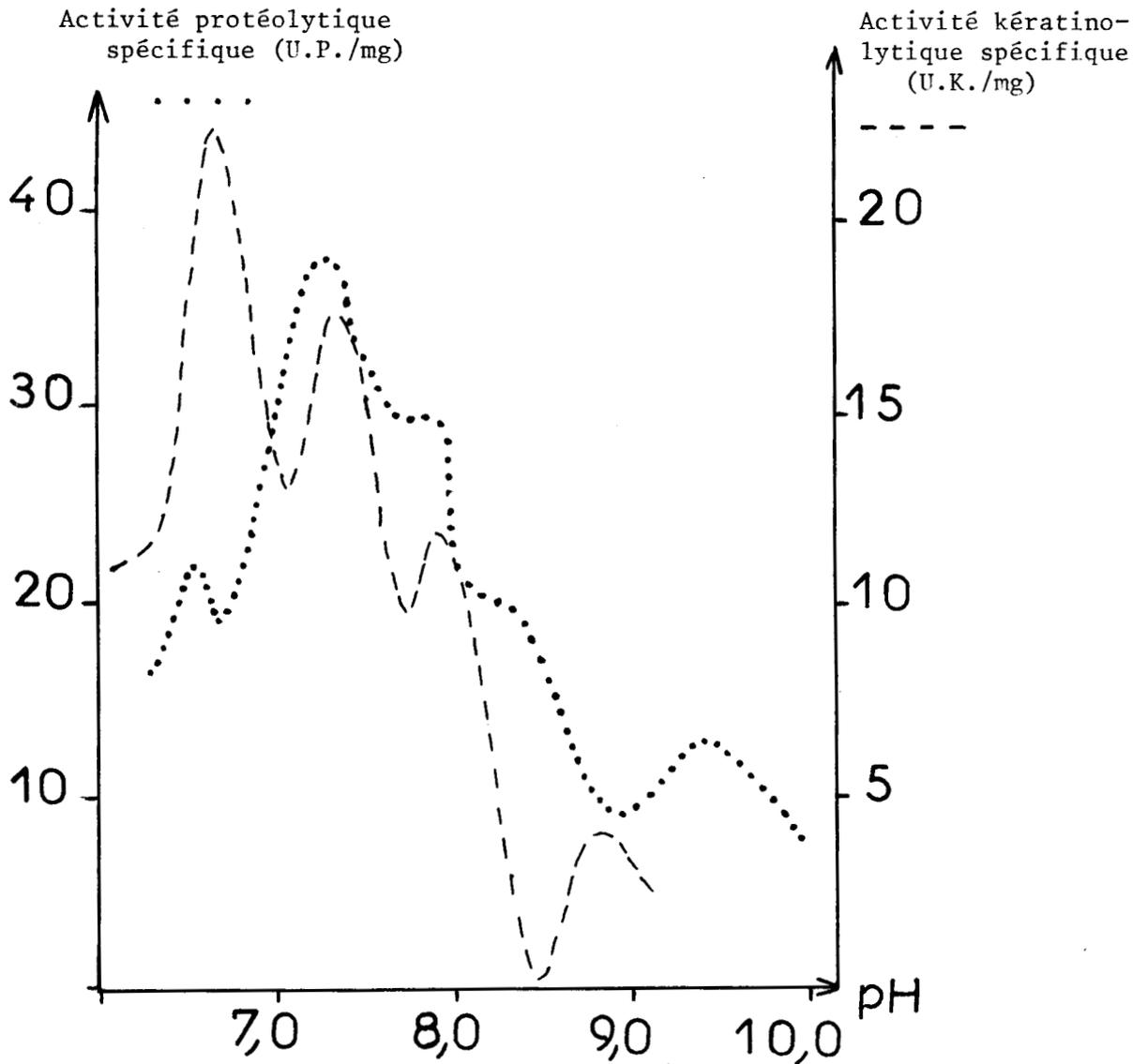


Figure 12



CHAPITRE VII

ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES
ISOLEES

Cette étude a pu être réalisée en utilisant deux protéines dont la séquence a été déterminée au laboratoire de Biochimie : l'histone riche en glyco-colle et en arginine (GAR-histone) du thymus de Porc (SAUTIERE et ses collaborateurs (55) et le peptide N-terminal de la myoglobine de Boeuf obtenu après coupure au bromure de cyanogène (HAN, DAUTREVAUX et leurs collaborateurs (56) .

a) Protocole expérimental

L'hydrolyse enzymatique est réalisée de la façon suivante : 100 mg de substrat sont mis en solution dans 18 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,4 et on ajoute 6 ml de solution enzymatique qui, d'après dosage par la méthode de LOWRY, représentent 1 mg de protéine et on laisse incuber 2 heures à 40°C.

L'hydrolyse est arrêtée par addition d'acide formique en quantité suffisante pour ajuster le pH à 3. La solution est ensuite évaporée à sec puis reprise par 2 ml d'acide acétique à 20 p. 100 et cette solution de peptides est chromatographiée sur une colonne de résine "Chromobeads P" équilibrée en tampon pyridine-acide formique pH 2,9 et maintenue à 60°C.

L'élution des différents peptides est réalisée par un double gradient linéaire en molarité de pyridine allant de 0,1 M à 2 M et linéaire en pH de 2,9 à 5,0, puis par un tampon 2 M en pyridine de pH 5,0.

La détection des peptides dans l'éluat de la colonne est assurée par la réaction à la ninhydrine. La réaction de SAKAGUCHI permet en outre de situer les peptides à arginine et la réaction de PAULY, les peptides contenant de l'histidine ou de la tyrosine.

Les Figures 13 et 14 représentent les profils d'élution des hydrolysats obtenus par action des enzymes liées de K. ajelloi respectivement sur la GAR-histone de thymus de Porc et sur le peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf.

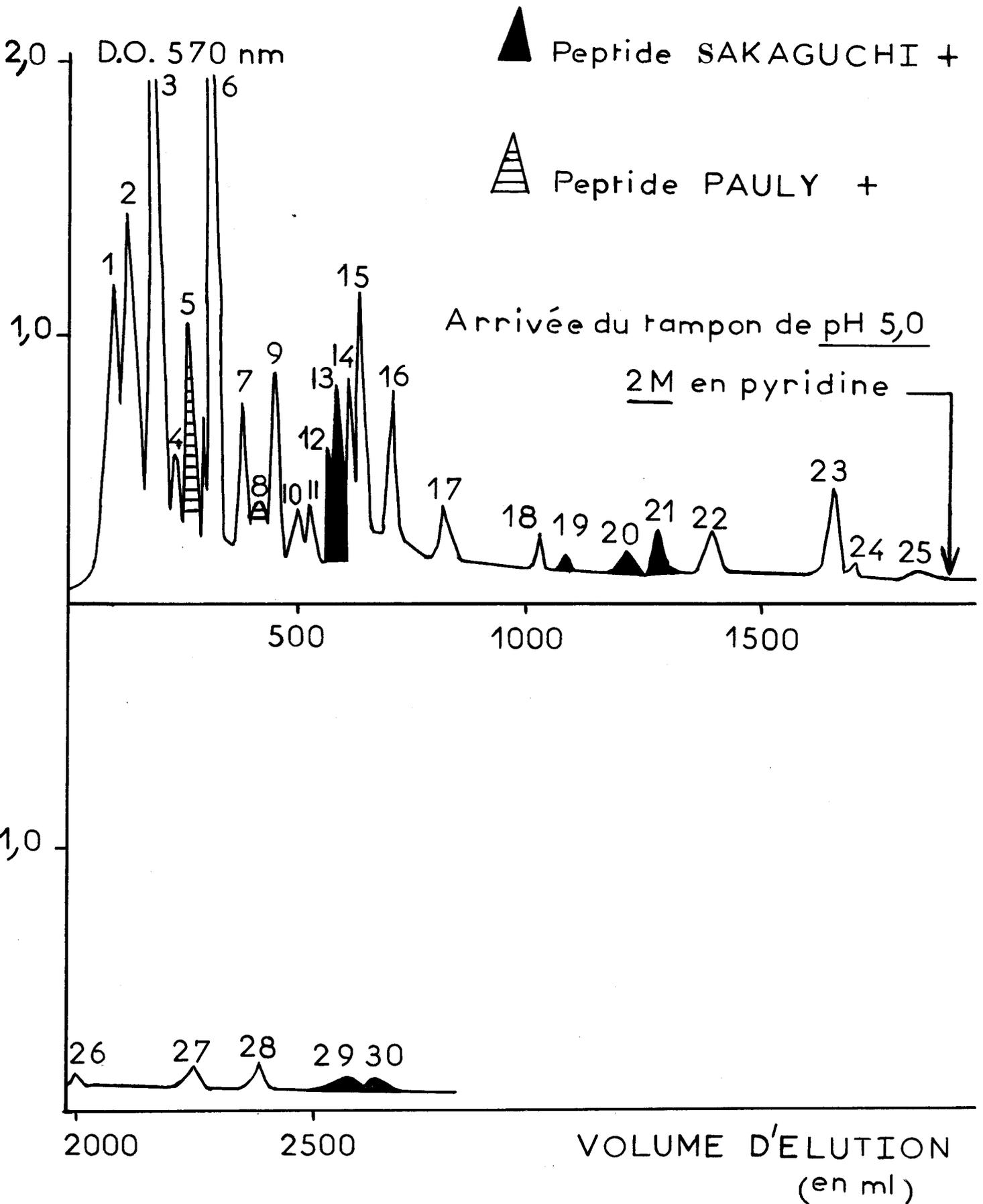


Figure 13

CHROMATOGRAPHIE SUR "CHROMOBEADS P"
DE L'HYDROLYSAT DE LA G.A.R. HISTONE DE PORC
PAR LES ENZYMES LIEES DE K. AJELLO



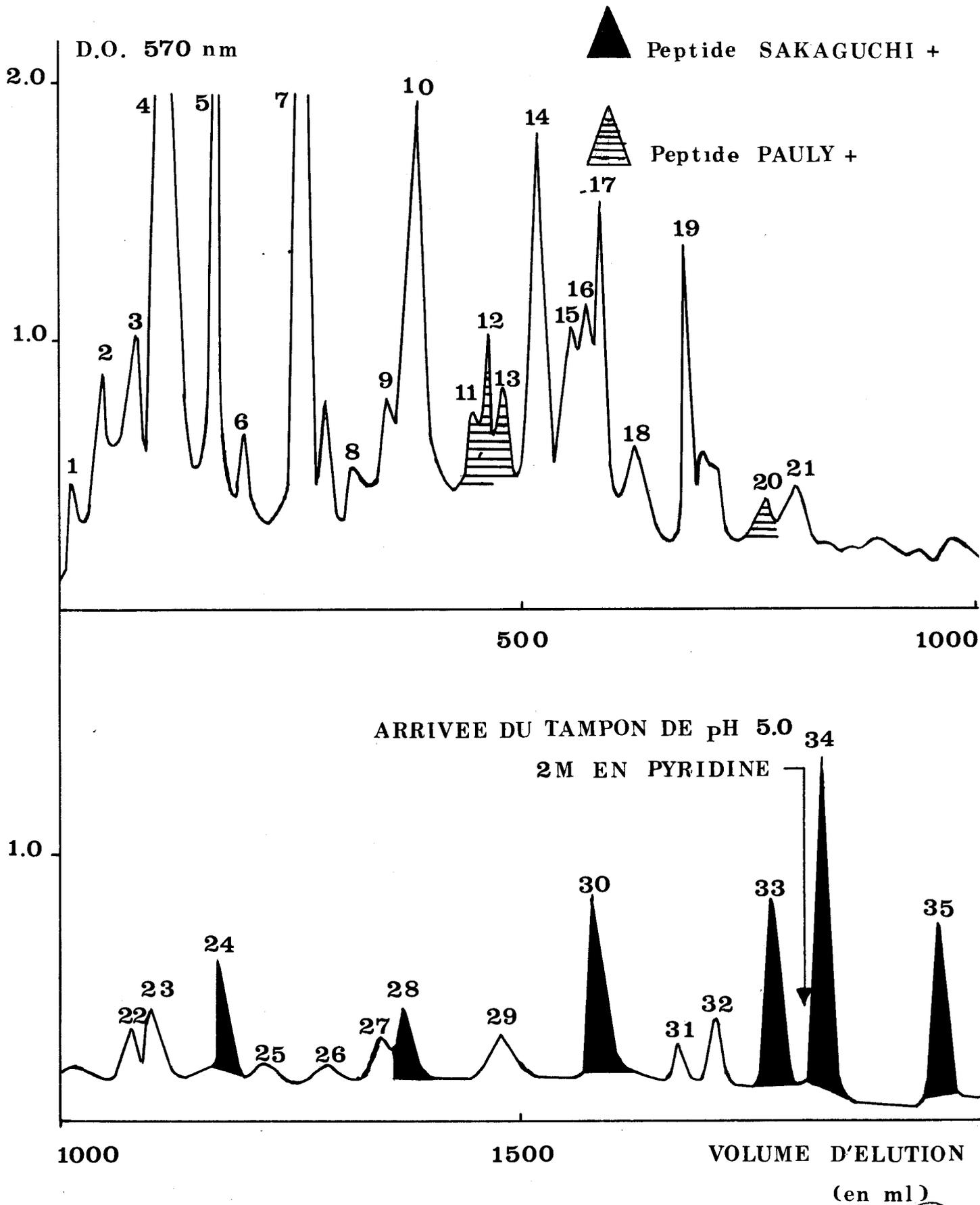


Figure 14

CHROMATOGRAPHIE SUR "CHROMOBEADS P" DE L'HYDROLYSAT
DU PEPTIDE N-TERMINAL DE MYOGLOBINE DE BOEUF PAR
LES ENZYMES LIEES DE K. AJELLO



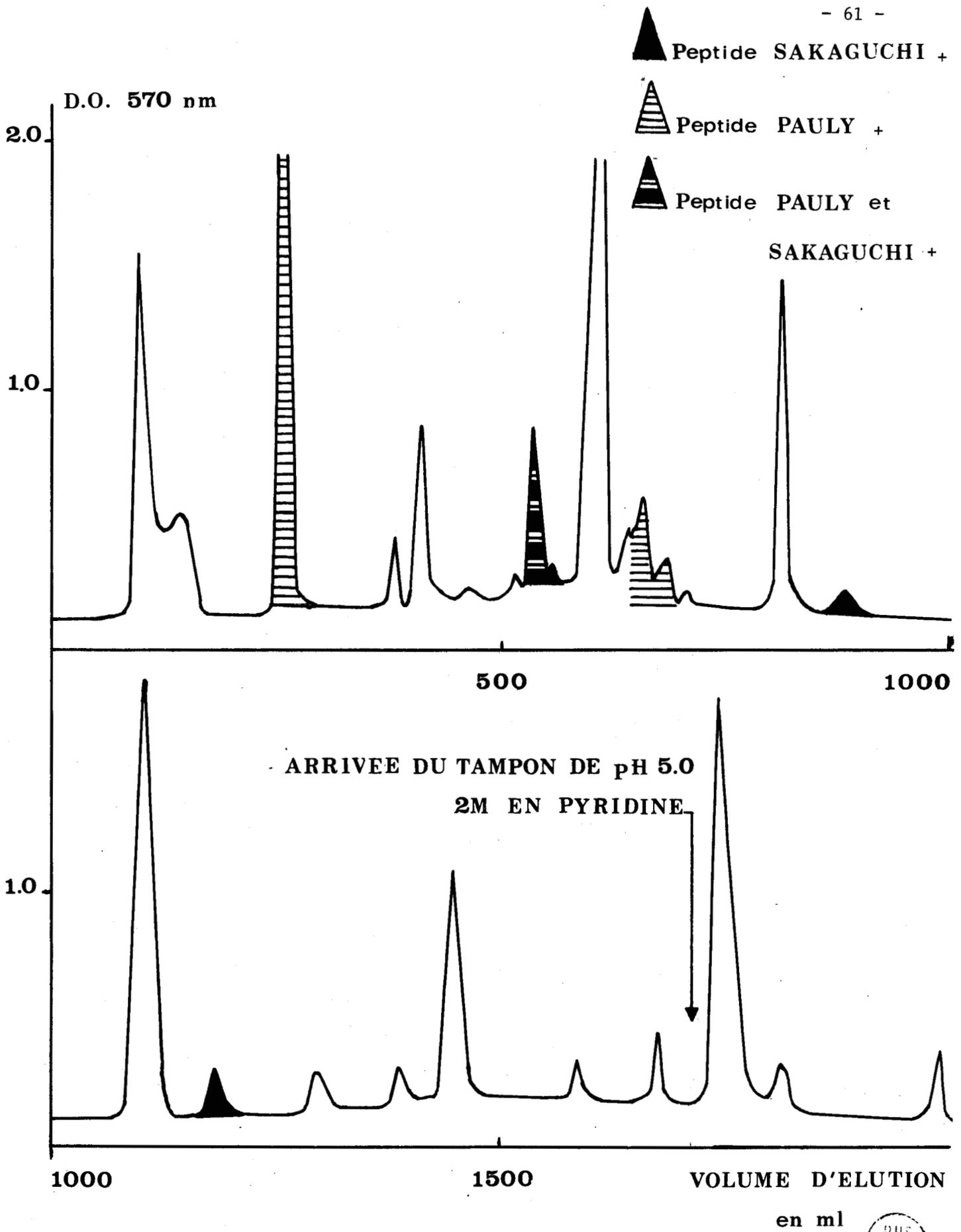


Figure 15

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DE L HYDROLYSAT
TRYPSIQUE DU PEPTIDE N TERMINAL DE MYOGLOBINE
DE BOEUF



A titre de comparaison, la figure 15 nous montre le profil obtenu avec l'hydrolysate trypsique du peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf.

Sur chaque peptide obtenu après chromatographie d'échange d'ion, un contrôle de pureté est effectué par une électrochromatographie sur papier. Si plusieurs taches sont observées après coloration à la ninhydrine on effectue la purification par chromatographie sur papier ou par électrophorèse sur papier.

Les peptides purifiés ainsi obtenus sont évaporés à sec ; leur composition en amino-acides est déterminée après hydrolyse acide, ce qui permet dans la plupart des cas de situer le peptide dans la séquence de la protéine. Quand plusieurs éventualités sont possibles, l'ambiguïté est levée par la détermination de l'acide aminé en position N-terminale par la méthode de "dansylation". La technique de "dansylation" employée est celle décrite par GRAY et HARTLEY (57), les chromatographies des dansylaminoacides obtenus sont réalisées sur feuilles de polyamide (voir appendice technique).

b) Résultats

1°) Etude avec la GAR-histone

Dans le cas de la G.A.R. histone nous obtenons, après chromatographie d'échange d'ions sur "Chromobeads P", 30 fractions peptidiques (numérotées de 1 à 30 par ordre d'élution - voir Figure 13) dont la plupart nécessitent une purification.

Le Tableau XIV donne la composition en amino-acides des différents peptides obtenus après purification ainsi que leur position dans la séquence de la protéine.

Il apparaît que l'hydrolyse a été très poussée, car nous obtenons beaucoup de petits peptides et beaucoup d'acides aminés libres : thréonine, valine, phénylalanine, tyrosine, glycolle, lysine, arginine. Les peptides obtenus permettent de localiser les coupures des liaisons peptidiques comme le montre le Tableau XV.

Parmi les peptides obtenus citons les cas particuliers suivants :

NATURE DES PEPTIDES OBTENUS APRES HYDROLYSE DE LA GAR-HISTONE
DE THYMUS DE PORC PAR LES ENZYMES LIEES DE K. AJELLOI.

PEPTIDE	COMPOSITION EN AMINO-ACIDES	SEQUENCE
1-a	Glu	Glutamique libre
1-b	Thr, Ser	Thréonine et Sérine libres
2-a	Gly, Ala	Gly (14) - Ala
2-b	Val	Valine libre
3	Ile, Leu	Leu (49) - Ile
4	Phe	Phénylalanine libre
5-a	Tyr	Tyrosine libre
5-b	Asp, Val ₂ , Tyr	Asp (85) - Val-Val-Tyr
6-a	Ala, Leu	Leu (37) - Ala (**)
6-b	Ala, Ile	Ala (33) - Ile
7-a	Gly	Glycocolle libre
7-b	Val, Leu	Val (21) - Leu ou Val (57) - Leu
8	Thr, Glu, Ala, Tyr, Lys, His	Tyr (72) - Thr-Glu-His-Ala-Lys
9	Lys	Lysine libre
12	Asp ₂ , Arg	Asp (23) - Asp - Asn
13-a	Asp ₂ , Glu, Ile, Arg	Arg (23) - Asp - Asn - Ile - Gln
13-b	Thr, Pro, Ala, Lys	Thr (30) - Lys - Pro - Ala
15	Thr, Pro, Lys	Thr (30) - Lys - Pro
16	Pro, Lys	Lys (31) - Pro
19	Ala, Ile, Arg	Ala (33) - Ile - Arg
20	Ile, Arg	Ile (34) - Arg
21	Ser, Gly ₅ , Lys ₂ , Arg	AcSer (1)-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly
22	Gly ₂ , Lys	Gly (4) - Lys - Gly ou (**) Gly (6) - Gly - Lys ou Gly (7) - Lys - Gly ou Gly (11) - Lys - Gly
29	Ile, Arg ₂	Ile (34) - Arg - Arg
30	Arg	Arginine libre

(**) Séquence déterminée par dansylation

TABLEAU XIV



PEPTIDES OBTENUS APRES HYDROLYSE DE LA G.A.R. HISTONE DE THYMUS DE PORC LIAISONS PEPTIDIQUES COUPEES

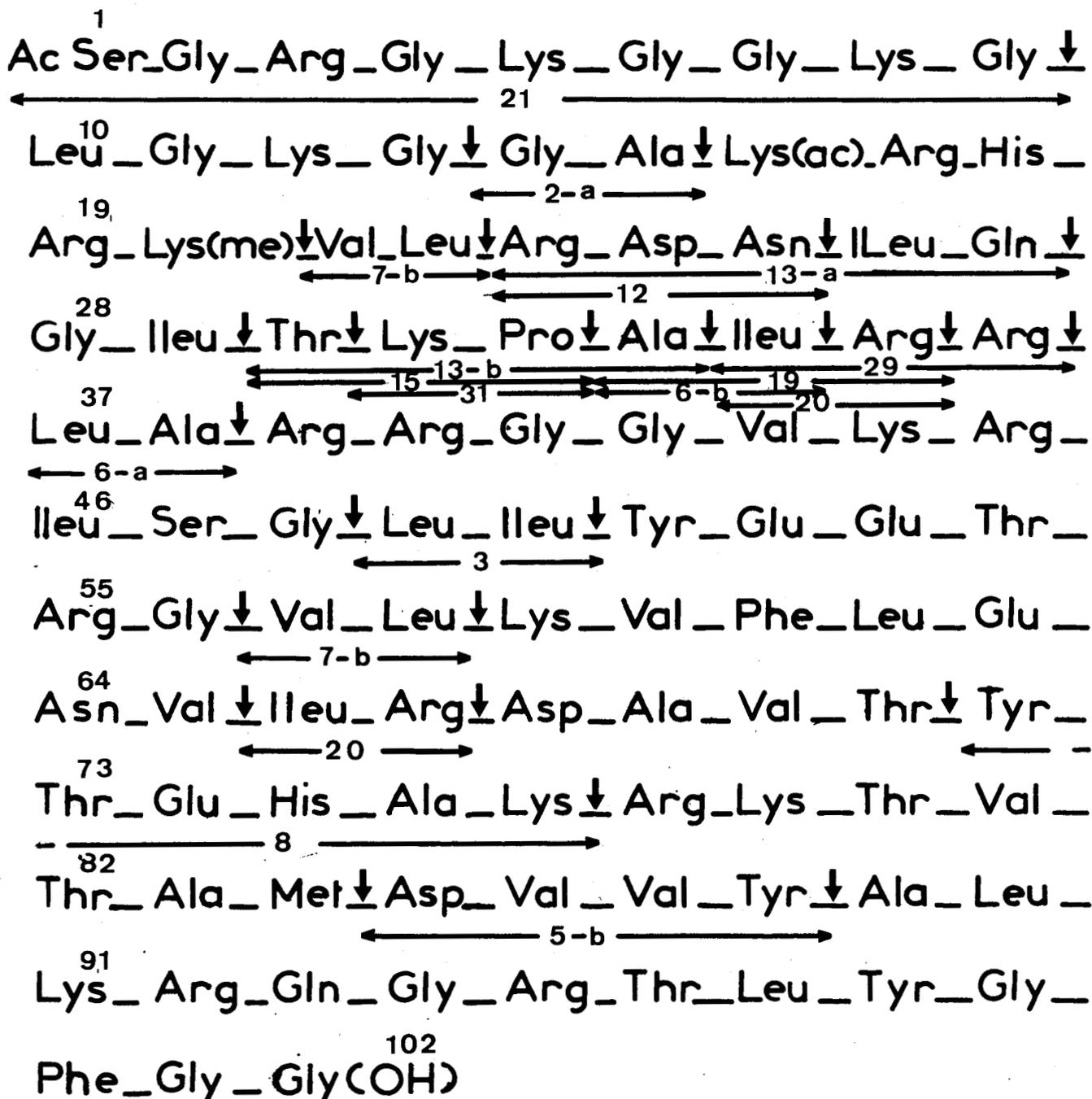


TABLEAU XV



Les flèches indiquent les liaisons peptidiques rompues

Les peptides obtenus sont soulignés d'un trait plein. Le

numéro placé sur ce trait est celui du tableau XIV

Cas du peptide 7-b : Val-Leu peut se placer en position 21-22 ou en position 57-58.

Cas du peptide 20 : Ile-Arg peut se placer en position 34-35 ou en position 66-67.

Cas du peptide 6-a : de par sa composition en acides aminés, Ala, Leu, il peut se situer en 37-38 (Leu-Ala) ou en 89-90 (Ala-Leu). La méthode de dansylation permet de déterminer que, pour ce peptide, l'acide aminé en position N-terminale est la leucine ce qui lève l'indétermination et place le peptide 6-a en position 37-38.

Cas du peptide 22 : Gly₂, Lys

Pour ce peptide, nous avons pu déterminer que l'acide aminé en position N-terminale est le glycofolle. Cependant ce résultat ne permet pas de placer de façon certaine ce peptide : en effet, 4 positions restent possibles : en 4-5-6 ; en 6-7-8 ; en 7-8-9 ou encore en 11-12-13.

2°) Etude avec le peptide N-terminal de myoglobine

En ce qui concerne le peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf nous obtenons, après chromatographie d'échange d'ions 35 peptides (voir Figure 14).

Le Tableau XVI donne les compositions en amino-acides des différents peptides obtenus après purification et leur position dans la séquence de la protéine. Ce tableau fait apparaître également une hydrolyse très poussée, qui va jusqu'au stade des acides aminés. Nous obtenons les acides aminés libres suivants : leucine, phénylalanine, acide glutamique, lysine. Parmi les peptides obtenus, citons les cas particuliers suivants :

Peptide 8-a : nous avons admis que ce peptide contenait le Trp7 car sa composition en acides aminés autres que le tryptophane, le place sans ambiguïté à l'extrémité N-terminale du peptide étudié ; en effet, le seul résidu de sérine est en position 3.

Peptide 8-b : il peut se placer en 10-11 ou en 28-29

Peptide 15 : lorsque l'on détermine la composition en amino-acides, on voit apparaître de l'homosérine sur le chromatogramme (en épaulement de l'acide glutamique), ce qui indique que le peptide 15 est bien en position

NATURE DES PEPTIDES OBTENUS APRES HYDROLYSE DU PEPTIDE N-TERMINAL
DE MYOGLOBINE DE BOEUF PAR LES ENZYMES LIEES DE
K. ajelloi

PEPTIDE	COMPOSITION EN AMINO-ACIDES	SEQUENCE
2-a	Asp, Ser, Gly	Ser(3) - Asp - Gly
2-b	Thr, Glu	Thr(51) - Glu
4	Leu	Leucine libre
5	Phe	Phénylalanine libre
6	Glu	Glutamique libre
7	Asp, Phe	Phe(43) - Asp
8-a	Asp, Ser, Glu ₂ , Gly ₂ , Leu	Gly(1)-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln
8-b	Val-Leu	Val(10)-Leu ou Val(28)-Leu
9	Glu, Leu	Leu(40)-Glu
10	Lys	Lysine libre
11-a	Leu, Phe	Leu(32)-Phe
11-b	Thr, Glu, Pro, Gly, His	Gly(35)-His-Pro-Glu-Thr
12	Thr ₂ , Glu, Pro, Gly, Leu, His	Thr(34)-Gly-His-Pro-Glu-Thr-Leu
13	Asp, Ala ₂ , Glu, Gly ₃ , Val, Lys, His	Gly(15)-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly
14	Glu, Lys	Glu(41)-Lys
15	Thr, Glu ₂ , Ala, Lys	Lys(50)-Thr-Glu-Ala-Glu-Met (*)
17	Asp, Phe, Lys	Phe(43)-Asp-Lys (**)
19	Glu, Phe, Lys	Glu(41)-Lys-Phe
20	Asp, Thr, Glu ₂ , Pro, Gly, Leu, Phe, Lys, His	Gly(35)-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp
24	Ile, Arg	Ile(30)-Arg
28-a	Ile, Leu, Arg	Ile(30)-Arg-Leu
28-b	Ile, Leu ₂ , Arg	Leu(29)-Ile-Arg-Leu
30	Lys, His	Lys(47)-His
33	Leu, His, Lys	Lys(47)-His-Leu (**)
34	Phe, Lys, His	Phe(46)-Lys-His
35	Leu, Phe, Lys, His	Phe(46)-Lys-His-Leu

(*) Homosérine

(**) dansyl

TABLEAU XVI

PEPTIDES OBTENUS APRES HYDROLYSE DU
PEPTIDE N-TERMINAL (BrCN) DE
MYOGLOBINE DE BOEUF
LIAISONS PEPTIDIQUES COUPEES

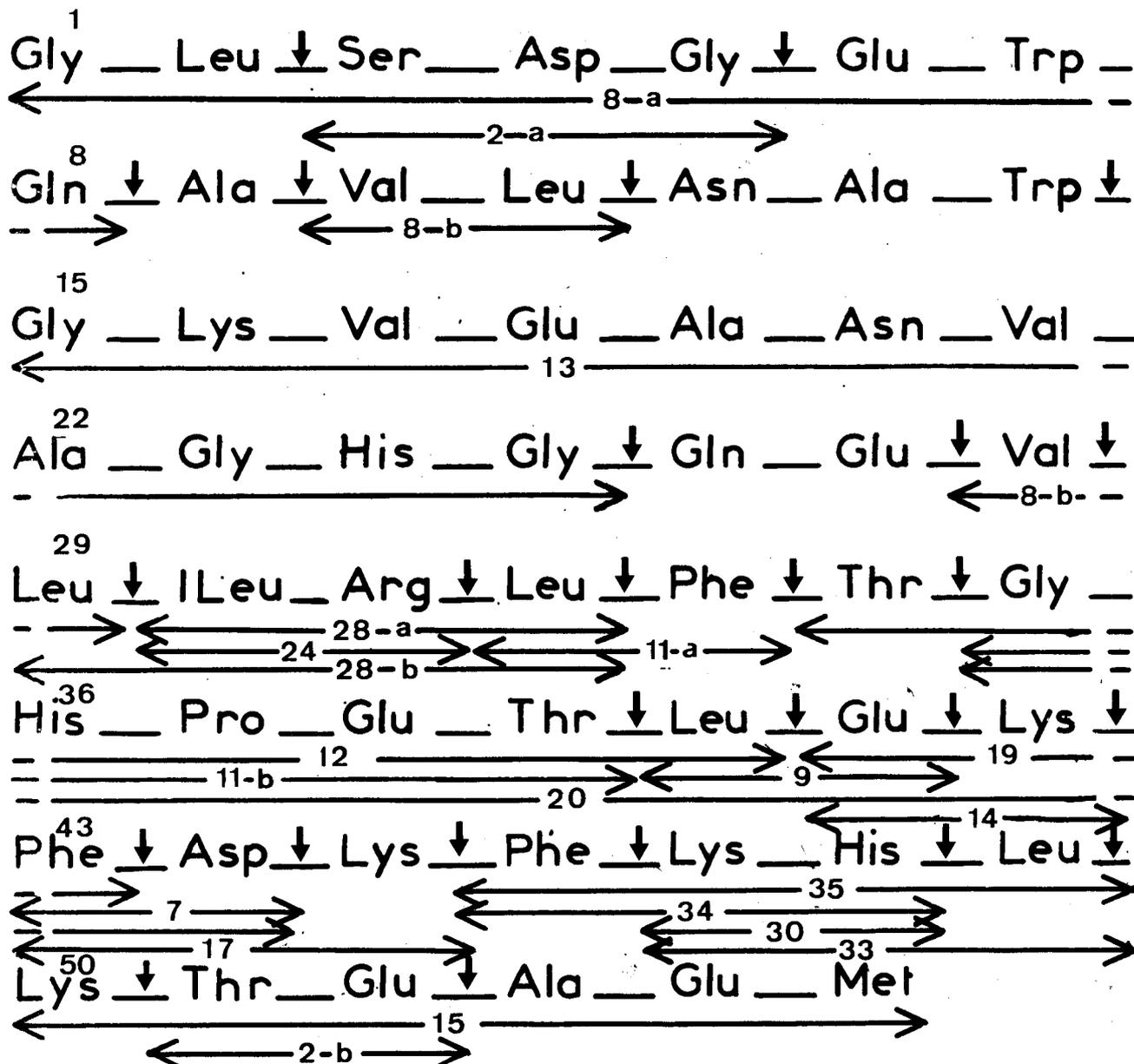


TABLEAU XVII

Les flèches indiquent les liaisons peptidiques rompues



Les peptides obtenus sont soulignés d'un trait plein. Le numéro placé sur ce trait est celui du tableau XVI

C-terminale. En effet, le résidu de méthionine 55 de la myoglobine native se transforme en homosérine au cours de la coupure au bromure de cyanogène.

Peptide 17 et peptide 33 : la dansylation a été nécessaire pour pouvoir les placer dans la séquence.

3°) Conclusion

Si nous observons l'ensemble des coupures déterminées sur les deux substrats utilisés, on remarque des coupures tryptiques, chymotryptiques, des coupures de type "thermolysine" et des coupures ne se rangeant pas dans ces catégories.

Le Tableau XVIII nous présente l'ensemble des coupures observées en les groupant selon leur nature.

En résumé, parmi les coupures observées, on peut faire les remarques suivantes :

1) On observe beaucoup de coupures de liaisons peptidiques où est engagé le groupement carboxylique ou le groupement aminé des leucines.

2) On trouve des coupures communes aux deux substrats : Arg-Leu et Leu-Lys.

3) Les coupures Gly-Leu et Ala-Val que nous observons au cours de notre étude sont également observées par YU et ses collaborateurs sur des peptides synthétiques hydrolysés par la kératinase qu'ils ont isolée des cultures de Trichophyton mentagrophytes. Cette kératinase qui hydrolyse poil, caséine, collagène, élastine, fibrine, gélatine, hémoglobine, insuline, ovalbumine et 47 peptides et amides a la particularité de couper la liaison Ala-Val mais de ne pas couper Val-Ala. En ce qui concerne l'hydrolyse du peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf par les enzymes liées de K. ajelloi, on observe que la liaison Ala(9)-Val(10) est coupée et que Val(21)-Ala(22) n'est pas coupée.

Il apparaît donc une certaine analogie entre les enzymes sécrétées par ces deux dermatophytes.

Par ailleurs, la possibilité, pour les enzymes étudiées de libérer des acides aminés lors de l'hydrolyse des protéines non fibreuses (histone, myoglobine) apparaît également lorsque l'attaque enzymatique porte sur le poil de Cobaye ; dans ce cas, on obtient les acides aminés suivants à l'état libre : valine, isoleucine, phénylalanine, arginine et surtout tyrosine et leucine.

LIAISONS PEPTIDIQUES COUPEES PAR LES ENZYMES
LIEES DE K. ajelloi

	COUPURES OBSERVEES SUR LA G.A.R. HISTONE DU THYMUS DE PORC	COUPURES OBSERVEES SUR LE PEPTIDE N-TERMINAL DE MYOGLOBINE DE BOEUF
COUPURES TRYPSIQUES	Lys(méthyl)-Val Arg - Arg Arg - Leu (*)	Arg - Leu (*) Lys - Phe Lys - Thr
COUPURES CHYMOTRYPSIQUES	Phe - Thr Phe - Asp Phe - Lys	Tyr - Ala
COUPURES DE TYPE "THERMOLYSINE"	Gly - Leu (**) Asn - Ile Ala - Ile Gly - Leu Gly - Val Val - Ile	Ala - Val (**) Glu - Val Val - Leu Leu - Ile Thr - Leu His - Leu
AUTRES TYPES DE COUPURES	Gly - Gly Ala - Lys (acetyl) Leu - Arg Gln - Gly Ile - Thr Pro - Ala Ile - Arg Ala - Arg Ile - Tyr Leu - Lys (*) Thr - Tyr Met - Asp	Leu - Ser Glu - Ala Gly - Glu Gln - Ala Leu - Asn Trp - Gly Gly - Gln Leu - Phe Thr - Gly Leu - Glu Glu - Lys Asp - Lys Leu - Lys

(*) Coupure observée sur les deux substrats

(**) Coupure observée par YU et coll. (54) après hydrolyse de peptides synthétiques par la kératinase I extraite des cultures de Trichophyton mentagrophytes

TABLEAU XVIII



CHAPITRE VIII

PURIFICATION DES EXTRAITS LYOPHILISES

Après avoir défini des conditions opératoires permettant de lyophiliser les extraits de culture en gardant une part importante de l'activité, nous avons étudié le comportement des extraits lyophilisés sur DEAE-cellulose.

a) Protocole opératoire

Les enzymes lyophilisées (enzymes du filtrat de culture ou enzymes liées) sont remises en solution dans du tampon phosphate 0,001 M et dialysées 24 heures contre ce même tampon. On fait passer la solution obtenue sur une colonne de DEAE-cellulose (*) équilibrée dans du tampon phosphate 0,028 M de pH 7,0. Le fait d'équilibrer la solution à chromatographier dans un tampon de force ionique plus faible assure une meilleure fixation des enzymes d'une part et des pigments d'autre part.

La fraction des protéines non retenues lors du passage (fraction A) est obtenue en rinçant la colonne, après pénétration de la solution déposée, par un volume de tampon 0,001 M de pH 7,8 égal au volume mort de la colonne. Les fractions B, C, D et E sont obtenues ensuite de la même manière en déplaçant le volume mort respectivement par du tampon phosphate 0,028 M de pH 7,0 ; par NaCl 0,5 M dans ce tampon et enfin 2 fois de suite par NaCl 1 M dans le tampon phosphate 0,028 M de pH 7,0. Sur chacune des fractions A, B, C, D et E, nous avons mesuré l'activité protéolytique spécifique et l'activité kératinolytique spécifique et nous avons effectué sur chaque une électrophorèse en gélose pour caractériser le contenu protéique par la coloration à l'Amidoschwarz et l'activité protéolytique selon la technique de KAMINSKI et BUSHUK (voir appendice technique). En outre, nous avons établi la composition en acides aminés de ces différentes fractions.

(*) Les dimensions de la colonne de DEAE-cellulose (DE 32 WHATMAN) sont les suivantes : diamètre interne : 1,9 cm ; hauteur de résine 9 cm

b) Résultats

b₁) Activités

Les Tableaux XIX et XX rassemblent les valeurs d'activité protéolytique et kératinolytique obtenues pour les fractions A, B, C, D, E issues d'extraits lyophilisés d'une culture de K.ajelloi s'étant développée 60 jours sur cheveux. Pour les enzymes du filtrat de culture, comme pour les enzymes liées, c'est la fraction A (non retenue) qui a la plus forte activité protéolytique spécifique. En particulier, dans le cas des enzymes liées, on obtient pour la fraction A, une activité protéolytique spécifique 6 fois plus forte que celle de la solution avant passage sur la colonne de DEAE-cellulose. Cette valeur : 1.040 U.P./mg est à rapprocher de la valeur de 1.050 U.P./mg obtenue par SEKINE (58) pour une protéase neutre extraite des cultures d'Aspergillus sojae et purifiée par gel-filtration sur Sephadex G 100 et par passage sur hydroxyapatite ; on remarque en outre que dans le cas des enzymes liées, la fraction dont l'activité protéolytique est la plus élevée a une activité kératinolytique nulle et que la fraction d'activité kératinolytique maximale (226 U.K./mg) a une activité protéolytique relativement faible. Ceci semble indiquer qu'il existe à côté des protéases très actives une enzyme plus spécifique des kératines. Dans le cas du filtrat, les activités sont nettement plus faibles et les maxima d'activité tant protéolytique que kératinolytique correspondent à la même fraction (A).

b₂) Electrophorèses

La Figure 16 présente les électrophorégrammes obtenus à partir des différentes solutions citées dans les Tableaux XIX et XX. Ces solutions sont au préalable concentrées par évaporation sous vide à la température du laboratoire à l'aide d'un évaporateur "Evapomix". Les électrophorèses réalisées à pH 8,2 ont donné les résultats suivants : pour les solutions "avant DEAE-cellulose" l'Amidoschwarz met en évidence une bande ayant migré légèrement vers la cathode. On retrouve également une bande ayant légèrement migré vers la cathode pour la solution A issue des enzymes liées, et pour les solutions A, B, C issues du filtrat de culture. Quant à l'activité protéolytique, elle se localise, pour toutes les fractions étudiées, de part et d'autre du dépôt et en plus sur une

ELECTROPHOREGRAMMES * DES FRACTIONS OBTENUES EN DEAE-CELLULOSE			
A PARTIR DES EXTRAITS DE CULTURE LYOPHILISES			
FILTRAT DE CULTURE		ENZYMES LIEES	
Protéinogramme	Enzymogramme	Protéinogramme	Enzymogramme
Solution avant DEAE		Solution avant DEAE	
Solution A		Solution A	
Solution B		Solution B	
Solution C		Solution C	
Solution D		Solution D	
Solution E			

BUS
LILLE

(*) Durée de migration : 90 minutes - Champ électrique : 6 volts/cm
 Pour chaque électrophorèse de la figure, le pôle (+) est au-dessus.

Figure 16

ACTIVITES PROTEOLYTIQUE ET KERATINOLYTIQUE DES
FRACTIONS A, B, C, D, E DES ENZYMES DU FILTRAT DE CULTURE
de K. ajelloi

NATURE DE LA SOLUTION	CONTENU PROTEIQUE TOTAL(★) (en mg)	ACTIVITE PROTEOLYTIQUE TOTALE en U.P.	ACTIVITE PROTEOLYTIQUE SPECIFIQUE en U.P./mg	ACTIVITE KERATINOLYTIQUE SPECIFIQUE en U.K./mg
Filtrat avant DEAE-cellulose	19,90	1.330	67	2,0
Solution A (non retenue)	3,97	503	<u>126</u>	<u>13,4</u>
Solution B	3,50	229	65	0,9
Solution C	3,12	170	54	0,9
Solution D	3,37	150	47	0,7
Solution E	5,80	209	3	1,3

(★) Estimé par dosage par la méthode de LOWRY.

TABLEAU XIX



ACTIVITES PROTEOLYTIQUE ET KERATINOLYTIQUE DES FRACTIONS
A, B, C, D et E DES ENZYMES LIEES de K. ajelloi

NATURE DE LA SOLUTION	CONTENU PROTEIQUE TOTAL* (en mg)	ACTIVITE PROTEOLYTIQUE TOTALE en U.P.	ACTIVITE PROTEOLYTIQUE SPECIFIQUE en U.P./mg	ACTIVITE KERATINOLYTIQUE SPECIFIQUE en U.K./mg
Solution d'enzymes liées avant DEAE-cellulose	3,43	608	177	31,2
Solution A (non retenue)	0,20	208	<u>1040</u>	0
Solution B	0,30	71	236	96
Solution C	0,33	49	148	<u>226</u>
Solution D	0,50	165	330	61
Solution E	0,85	44	49	26

(*) Estimé par dosage par la méthode de LOWRY

TABLEAU XX



bande ayant migré nettement vers l'anode pour la fraction E issue du filtrat et pour les fractions A, B, C et D issues des enzymes liées.

b₃) Composition en amino-acides

La composition en amino-acides des extraits de cultures lyophilisés puis redialysés, et de leurs fractions obtenues en DEAE-cellulose a été déterminée après hydrolyse acide classique (HCl 5,6 N ; 24 heures sous vide).

Les résultats exprimés en résidus d' amino-acides pour 100 résidus sont rassemblés dans les Tableaux XXI et XXII. Nous n'avons pas trouvé de tryptophane dans toutes ces fractions, que ce soit par la méthode de SPIES et CHAMBERS (59) ou par les méthodes de MATSUBARA et SASAKI (60) d'une part et de LIU et CHANG (61) d'autre part. Ces deux dernières méthodes consistent à hydrolyser la protéine en milieu acide selon le procédé classique, mais en évitant la destruction du tryptophane au cours de l'hydrolyse respectivement par addition d'acide thioglycolique et de tryptamine. On remarque que les compositions des fractions A, B, C, D et E issues du filtrat sont très différentes les unes des autres. Quant aux fractions A, B, C, D et E issues des enzymes liées, leurs compositions sont assez proches.

Il faut noter qu'aucune des fractions issues du filtrat de culture ne s'apparente, par sa composition en amino-acides à la kératinase I isolée par YU et ses collaborateurs (54) à partir des filtrats de culture de Trichophyton mentagrophytes cultivé sur laine.

Par contre, la fraction A obtenue à partir des enzymes liées a une composition en acides aminés voisine de celle de la kératinase I de T. mentagrophytes (les seules différences notables concernent l'acide glutamique, l'arginine et le tryptophane). De même la fraction C, qui a une très forte activité kératinolytique, a une composition en acides aminés voisine de celle de la kératinase I (les seules différences notables concernent l'acide aspartique, l'acide glutamique et le tryptophane).

En résumé, la chromatographie sur DEAE-cellulose, dans les conditions décrites permet d'obtenir des fractions d'activités protéolytique et kératinolytique élevées, notamment en ce qui concerne les fractions

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES EN
DEAE-CELLULOSE A PARTIR D'UN FILTRAT DE CULTURE LYOPHILISE (en résidus
pour 100 résidus

	FILTRAT AVANT DEAE-CELLULOSE	SOLUTION A	SOLUTION B	SOLUTION C	SOLUTION D	SOLUTION E
ASP	8,70	0,81	6,85	6,87	8,88	11,18
THR	8,63	3,20	11,74	12,72	11,10	6,59
SER	8,98	5,33	14,89	8,94	10,11	11,28
GLU	9,99	7,07	6,69	7,30	8,79	14,87
PRO	12,12	19,51	10,33	13,20	13,45	19,30
GLY	10,57	16,47	13,80	10,64	9,92	11,11
ALA	6,22	11,11	8,03	8,32	6,65	2,89
CYS ($\frac{1}{2}$)	3,42	-	-	0,74	1,67	3,52
VAL	6,36	6,03	4,08	5,40	6,49	5,02
MET	1,28	1,50	-	1,56	1,38	0,29
ILE	2,10	2,88	2,17	2,69	2,63	1,50
LEU	3,44	4,84	2,91	4,99	3,68	1,78
TYR	4,57	13,06	10,45	6,73	5,13	2,21
PHE	1,68	-	-	2,37	1,55	0,57
LYS	5,88	3,22	5,68	2,96	4,56	3,80
HIS	2,41	1,79	2,36	2,25	1,61	1,67
ARG	3,70	3,06	traces	2,31	2,43	2,31

TABLEAU XXI

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES DIFFERENTES FRACTIONS
OBTENUES EN DEAE-CELLULOSE A PARTIR DES ENZYMES LIEES LYOPHILISEES
(en résidus pour 100 résidus)

	ENZYMES LIEES AVANT DEAE	SOLUTION A	SOLUTION B	SOLUTION C	SOLUTION D	SOLUTION E	KERATINASE I (*)
ASP	11,25	11,36	8,72	8,38	9,55	11,33	12,9
THR	9,45	7,92	9,53	7,80	7,26	6,15	7,6
SER	9,25	8,23	9,82	7,27	7,11	11,28	8,2
GLU	8,15	8,16	5,01	8,91	10,04	10,86	5,0
PRO	7,82	5,94	6,41	6,34	7,01	8,42	4,5
GLY	11,35	12,50	15,70	11,01	10,87	13,89	11,0
ALA	7,77	10,21	9,87	10,94	10,98	6,88	10,5
CYS1/2	2,81			traces	traces	2,63	1,3
VAL	6,60	4,57	5,78	6,52	6,04	6,80	5,6
MET	1,33	-	2,04	1,92	1,12	-	1,6
ILE	3,02	3,20	2,96	3,78	3,27	2,56	4,2
LEU	3,58	4,88	4,58	6,81	6,89	4,09	5,2
TYR	2,22	5,18	2,01	3,42	4,43	1,87	3,9
PHE	4,96	2,36	4,00	3,19	3,82	1,73	2,9
LYS	4,13	4,20	6,02	4,92	4,88	5,03	4,8
HIS	2,43	2,52	2,34	2,52	1,96	2,91	2,4
ARG	3,63	8,76	4,97	4,74	4,82	3,53	5,5
TRP							2,0

(*) Isolée par YU et ses collaborateurs (54), des cultures de Trichophyton mentagrophytes.

TABLEAU XXII



obtenues à partir des enzymes liées. En effet, la fraction A a une activité protéolytique spécifique de 1040 U.P./mg et la fraction C a une activité kératinolytique spécifique de 226 U.K./mg, valeur 5 fois supérieure à celle publiée pour la kératinase I de T. mentagrophytes (34,0 U.K./mg)..

Ces fortes valeurs d'activité spécifique indiquent une purification notable des extraits de culture. Cependant, les électrophorèses réalisées sur les fractions obtenues montrent qu'elles sont encore hétérogènes.

DISCUSSION

L'attaque, in vitro, des kératines par les dermatophytes se manifeste au point de vue microscopique par la désintégration de la fibre : dispersion des cellules corticales de laine, destruction de la structure cuticulaire, perforations du cheveu. A ce sujet, citons les travaux de VANBREUSEGHEM (62, 63) ; RAUBITSCHKE (64) ; ZIEGLER et BÖHME (41) ; ENGLISH (65) ; BENEDEK (66) ; THURNER (67) ; KUNERT (68) ; RAGOT (29) ; CLERIVET (36).

Par ailleurs, la kératinolyse a été démontrée du point de vue biochimique par MOSCHETTO, RAGOT et BISERTE (1) dans le cas des cultures de Kératinomyces ajelloi sur laine.

Les hypothèses formulées pour expliquer la kératinolyse sont nombreuses :

1°) Désintégration mécanique

RAUBITSCHKE (69) pense que la fibre serait désintégrée par la poussée due à l'envahissement de la matrice non fibrillaire par le champignon. Cette hypothèse est en désaccord avec les résultats de RAGOT qui constate que K. ajelloi ne pénètre pas la fibre de laine et avec les travaux de microscopie électronique de MERCER et VERMA (70) qui montrent que les perforations faites par Trichophyton mentagrophytes dans le cheveu ont un diamètre nettement supérieur à celui des filaments.

2°) Réduction enzymatique des ponts disulfure puis digestion de la kératine réduite.

Un tel mécanisme a été décrit par LINDERSTRØM-LANG et DUSPIVA (71) dans le cas de la digestion de la laine dans l'intestin moyen de la larve de Tineola bisselliella (la mite) ; le pH du milieu est 10 et le potentiel d'oxydo-réduction de - 250 mV est compatible avec la réduction des ponts disulfure. De plus, POWNING et IRZYKIEWICZ (72) ont mis en évidence une cystine réductase, dans l'intestin moyen de la mite. La réduction des ponts disulfure apparaît comme l'étape déterminante de la kératinolyse, car GODDART et MICHAELIS (5) ont montré que la laine réduite était hydrolysée de façon importante par les protéases classiques : trypsine, chymotrypsine, pepsine, papaïne.

Ce mécanisme semble encore effectif dans le cas d'un actinomycète, Streptomyces fradiae, comme l'ont montré NOVAL et NICKERSON (50) : en effet, il y a accumulation de thiols dans les cultures de S. fradiae sur laine. Cependant, lorsque la kératinase isolée par NICKERSON et coll. (73) attaque la laine, in vitro, il n'y a pas de libération de thiols dans milieu réactionnel. Une étude plus approfondie de NICKERSON et DURAND (74) a montré que cette enzyme hydrolyse seulement le polypeptide poly-L-lysine et agit sans cofacteur dialysable, contrairement aux réductases connues. Ce mécanisme avec réduction préalable des ponts disulfure, ne semble pas pouvoir s'appliquer aux dermatophytes. En effet, CHESTERS et MATHISON (26) ne trouvent dans les filtrats de K. ajelloi, que de faibles quantités de thiols et constatent en outre que le potentiel d'oxydo-réduction est trop élevé pour permettre la réduction des ponts disulfure.

3°) Alcalinisation du milieu

CHESTERS et MATHISON (26) ; McQUADE (75) pensent que la possibilité d'alcaliniser le milieu par désamination est lié au pouvoir kératinolytique. Si CREWETHER (22) a montré que le traitement alcalin rend les kératines plus sensibles aux protéases, l'alcalinisation n'est pas nécessaire à la kératinolyse puisque nous obtenons une kératinolyse en employant un milieu tamponné à pH 7,0 par les phosphates et que KUNERT (30) observe sur des cultures de Microsporum gypseum de 15 jours une destruction de 50 % du cheveu dans un milieu minéral tamponné à pH 7,5 par les phosphates.

4°) Hydrolyse enzymatique sans réduction préalable

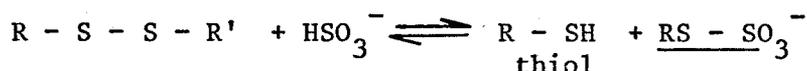
D'après ZIEGLER et RICHTER (46), la kératinolyse serait due à l'action synergique d'une série d'enzymes dont l'une, plus spécifique, rendrait la kératine attaquable par les autres. YU et ses collaborateurs (47, 51, 52, 54) isolent des cultures de Trichophyton mentagrophytes trois kératinases : la kératinase I obtenue à partir des filtrats de culture et les kératinases II et III isolées de la fraction "enzymes liées". Ces 3 kératinases se différencient par leur taille moléculaire et leurs déterminants antigéniques.

La kératinase I est capable, en 9 heures et à 37°C, de

"digérer" complètement la médulla du poil de Cobaye et d'en fissurer le cortex.

5°) Sulfitolyse

KUNERT (76) met en évidence, au niveau des perforations déterminées par Microsporum gypseum des composés de type R - S - SO₃⁻ par le test histochimique de BRACCO et CURTI (77). La présence de ces esters thiosulfuriques R - S - SO₃⁻ indique une rupture des ponts disulfure par sulfitolyse, selon la réaction suivante, décrite par SWAN (78)



Cette réaction explique également la présence de thiols constatée dans les filtrats de culture par WEARY et coll. (79)(80) ; par CHATTAWAY et coll. (81) et par KUNERT (82).

KUNERT, cependant, ne peut pas mettre en évidence la présence des ions sulfites dans les filtrats de culture, ce qui peut s'expliquer par une réaction secondaire. Par ailleurs, les ions sulfites doivent nécessairement se former à partir du soufre kératinique puisque le milieu minéral n'en contient pas. Il y a donc une transformation des ponts disulfure : ce qui revient à supprimer la structure kératinique et ce qui rend possible la digestion de la kératine ainsi transformée par des protéases classiques. En effet, GODDARD et MICHAELIS (5) ont montré que la kératine réduite et la kératine réduite puis réoxydée sont hydrolysées de façon importante par les protéases telles que trypsine, chymotrypsine, pepsine, papaïne.

Le mécanisme de formation des ions sulfate, généralement trouvés dans le filtrat des cultures des dermatophytes, implique la formation intermédiaire des ions sulfites (voir Chapitre II) ; la sulfitolyse est donc possible dans un second temps de la kératinolyse, mais il semble que l'hypothèse de ZIEGLER et RICHTER faisant état de l'action synergique d'une série d'enzymes dont l'une serait plus spécifique des kératines soit la plus satisfaisante.

L'étude électrophorétique réalisée pour des temps de culture différents (voir Chapitre IV) montre que le groupe ε₁ s'apparente

à cette enzyme plus spécifique. On retrouve d'ailleurs une activité de type ϵ_1 sur les enzymogrammes effectués sur les fractions les plus actives obtenues à partir des enzymes liées lyophilisées.

Nous n'avons pas isolé de fraction pure en électrophorèse en gélose ; cependant, nous obtenons d'une part une fraction d'activité protéolytique spécifique élevée (1040 U.P./mg) et d'autre part une fraction d'activité kératinolytique très élevée (226 U.K./mg), alors que les kératinases I, II et III isolées par YU et coll. ont respectivement des activités kératinolytiques spécifiques de 34,0 ; 36,4 et 39,4 U.K./mg. Aucune de ces trois kératinases n'est homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Si on compare la kératinase I de Trichophyton mentagrophytes et les enzymes liées de K. ajelloi, on constate que les fractions A et C obtenues en chromatographie sur DEAE-cellulose, à partir des enzymes liées, ont des compositions en acides aminés voisines de celle de la kératinase I (voir Tableau XXII). Cette similitude entre enzymes extraites du filtrat de culture et enzymes liées peut s'expliquer par l'âge différent des cultures (12 jours pour les cultures de T. mentagrophytes et 60 jours pour celles de K. ajelloi).

La comparaison peut se faire également au sujet des coupures des liaisons peptidiques déterminées d'une part par la kératinase I de T. mentagrophytes sur des peptides synthétiques et d'autre part par les enzymes liées de K. ajelloi sur des protéines.

Il apparaît les points communs suivants : la liaison Ala-Val est coupée ; la liaison Val-Ala n'est pas coupée ; il existe de très nombreuses coupures de liaisons peptidiques où est engagé le groupement carboxylique ou aminé des leucines ; on constate une libération importante d'acides aminés libres et ceci, que l'attaque porte sur des substrats non fibrillaires ou sur des poils.

Les très nombreuses coupures observées, tant pour les enzymes que nous avons étudiées, que pour celles étudiées par YU et coll. indiquent qu'il s'agit en fait de plusieurs entités actives qu'il serait intéressant de dissocier afin de déterminer leur rôle respectif dans la kératinolyse.

RESUME

Nous avons étudié la kératinolyse déterminée par le dermatophyte Kératinomyces ajelloi sur la laine et le cheveu ainsi que les enzymes synthétisées par le champignon au cours de son développement sur ces kératines.

Une étude comparative des S-carboxyméthyl kératines (SCMK) extraites de la laine ou du cheveu nous a montré que l'on retrouvait les deux mêmes principaux constituants protéiques : les SCMK-A pauvres en soufre et les SCMK-B riches en soufre par rapport aux SCMK de départ. Cette étude nous a permis également d'isoler, à partir des SCMK de cheveu, une fraction protéique analogue à une protéine isolée de la laine par SWART et ses collaborateurs et dont la séquence est connue.

L'examen microscopique des fibres de laine ou de cheveu sur lesquelles K. ajelloi s'est développé montre nettement une désorganisation de la fibre : dispersion des cellules corticales dans le cas de la laine, destruction de la structure cuticulaire et perforations dans le cas du cheveu.

Une étude antérieure de MOSCHETTO, RAGOT et BISERTE avait montré que les constituants protéiques des SCMK extraites de laine attaquée étaient différents de ceux issus de la laine vierge.

Nous avons donc étudié les sécrétions enzymatiques de K. ajelloi afin d'expliquer la kératinolyse.

Nous avons, dans un premier temps, abordé l'étude des enzymes contenues dans le filtrat de culture et dans le broyat mycélien et ceci pour une série de cultures de durée variable. Nous avons pu mettre en évidence deux groupes de protéases. Leur ordre d'apparition et leur importance relative suggère que le champignon synthétise d'abord l'une d'entre elles (ϵ_2) qui s'attaque aux ciments de la kératine puis l'autre (ϵ_1) susceptible d'hydrolyser les kératines fortement réticulées en les rendant assimilables pour le champignon ou attaquables par l'autre enzyme (ϵ_2).

Nous avons aussi étudié les enzymes liées à l'ensemble constitué par le mycélium et les fibres, selon un protocole établi par YU. De cette façon, on peut obtenir les enzymes dans un faible volume et les lyophiliser en conservant une grande partie de leur activité. Ces enzymes apparaissent comme des agents directs de la kératinolyse.

Nous avons étudié les coupures de liaisons peptidiques que ces enzymes pouvaient déterminer sur des protéines de structure connue ; les coupures très nombreuses parmi lesquelles on retrouve des coupures de type tryptique, chymotryptique ou comparables à celles provoquées par la thermolysine apparentent ces enzymes à la kératinase I isolée par YU et coll. à partir des filtrats de cultures de Trichophyton mentagrophytes sur la laine. On peut donc penser que des dermatophytes voisins sécrètent des enzymes analogues lorsqu'ils croissent sur des milieux kératiniques.

La purification essentiellement fondée sur la chromatographie sur DEAE-cellulose nous a permis d'isoler une fraction d'activité protéolytique très élevée (1040 U.P./mg) et une fraction d'activité kératino-lytique très élevée (226 U.K./mg), c'est-à-dire 5 fois plus forte que celle mesurée par YU pour la kératinase du T. mentagrophytes. Le fait que ces deux fractions soient distinctes semble confirmer notre hypothèse initiale concernant l'existence d'une enzyme plus spécifique des kératines fortement réticulées.

BIBLIOGRAPHIE

AUTEURS	REFERENCES	PAGES
ALEXANDER P. et EHRLAND C. <u>Nature</u> , 1950, <u>166</u> , 396	4	3
ASCHAN-ÅBERG K. et THYRESSON N. <u>Acta Derm. Venereol.</u> (Stockholm) 1964, <u>44</u> , 429	23	17
BENEDEK T. <u>Mycopathol. Mycol. Applic.</u> 1963, <u>21</u> , 179	66	80
BISERTE G. et PIGACHE P. <u>Bull. Soc. Chim. Biol.</u> 1954, <u>36</u> , 159	21	17
BÖHME H. et ZIEGLER H. <u>Mycopathologia</u> , 1969, <u>38</u> , 247	24	17
BRACCO M. et CURTI D.C. <u>Biologia Latina</u> , 1953, <u>6</u> , 412	77	82
CHATTAWAY F.W., ELLIS D.A. et BARLOW A.J.E. <u>J. Invest. Derm.</u> , 1963, <u>41</u> , 31	81	82
CHESTERS C.G.C. et MATHISON G.E. <u>Sabouraudia</u> , 1963, <u>2</u> , 225	26	17, 24, 81
CHOPRA S.L. <u>Indian J. Chem.</u> , 1964, <u>2</u> , 78	34	19
CLERIVET A. Thèse de Doctorat de spécialité en mycologie, Toulouse n° 1164, 1971	36	19, 46, 53, 80
CREWETHER W.G. <u>Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.</u> <u>Aust. C.</u> , 1955, 227 -256	22	17, 81

CREWETHER W.G. et DOWLING L.M. <u>J. Text. Inst.</u> , 1960, <u>51</u> , T 775	12	6
DISCHE Z. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1947, <u>167</u> , 189	43	26
ELLEMAN T.C. <u>Nature</u> (New Biology), 1971, <u>234</u> , 148	19	14
ELLEMAN T.C. et DOPHEIDE T.A. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1972, <u>247</u> , 3900	20	14
ENGLISH M.P. <u>Sabouraudia</u> , 1963, <u>2</u> , 115	65	80
FRITSCH P. <u>Mykosen</u> , 1967, <u>10</u> , 105	25	17
FROMAGEOT C., CHATAGNER F. et BERGERET B. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1948, <u>2</u> , 294	38	21
GILLESPIE J.M. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> 1958, <u>27</u> , 225	6	3
GILLESPIE J.M. <u>Aust. J. Biol. Sci.</u> , 1960, <u>13</u> , 81	7	3
GILLESPIE J.M. <u>Aust. J. Biol. Sci.</u> , 1962, <u>15</u> , 572	9	5, 12
GILLESPIE J.M. <u>Aust. J. Biol. Sci.</u> , 1963, <u>16</u> , 241	10	5
GILLESPIE J.M., HAYLETT T. et LINDLEY H. <u>Biochem. J.</u> , 1968, <u>110</u> , 193	18	8, 12
GODDARD D.R. et MICHAELIS L. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1934, <u>106</u> , 605	5	3, 80, 82



GRAY W.R. et HARTLEY B.S. <u>Biochem. J.</u> , 1963, <u>89</u> , 59p	57	62
HAN K.K., DAUTREVAUX M., CHAILA X. et BISERTE G. <u>Europ. J. Biochem.</u> , 1970, <u>16</u> , 465	56	58
HAYLETT T. et SWART L.S. <u>Text. Res. J.</u> , 1969, <u>39</u> , 917	14	7, 14
HAYLETT T., SWART L.S. et PARRIS D. <u>Biochem. J.</u> , 1971, <u>123</u> , 191	15	7, 14
KUNERT J. <u>Československá Dermatologie</u> 1967, <u>42</u> , 33	68	80
KUNERT J. <u>Mykosen</u> , 1968, <u>11</u> , 153	82	82
KUNERT J. <u>Derm. Mschr</u> , 1970, <u>156</u> , 951	32	18
KUNERT J. <u>Derm. Mschr</u> , 1970, <u>156</u> , 1035	30	17, 81
KUNERT J. Referáty Z. členské schůze konané dne, 16, Září, 1970	33	18
KUNERT J. <u>Mykosen</u> , 1972, <u>15</u> , 59	42	24
KUNERT J. <u>Sabouraudia</u> , 1972, <u>10</u> , 6	76	82
KUNERT J. <u>Experientia</u> , 1972, <u>28</u> , 1025	35	19, 21
LINDENSTRØM-LANG K. et DUSPIVA F. <u>C.R. Trav. Lab. Carlsberg</u> (Ser. Chim.) 1936, <u>21</u> , 53	71	80
LIU T.Y. et CHANG Y.H. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1971, <u>246</u> , 2842	61	75



Mc QUADE A.B. <u>Dermatologica</u> , 1964, <u>128</u> , 249	75	81
MATSUBARA H. et SASAKI R.M. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> 1969, <u>35</u> , 175	60	75
MERCER E.H. et VERMA B.S. <u>Arch. Dermatol.</u> , 1963, <u>87</u> , 357	70	80
MOSBACH K. <u>Scientific American</u> , 1971, <u>224</u> , 26	53	48
MOSCHETTO Y. Thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques, Faculté des Sciences de LILLE, 1966, n° 139	17	8, 9
MOSCHETTO Y., RAGOT J., et BISERTE G. <u>Bull. Soc. Chim. Biol.</u> , 1968, <u>50</u> , 751	1	1, 18, 33, 80
NARAHASHI Y., SHIBUYA K. et YANAGITA M. <u>J. Biochem. (Japan)</u> , 1968, <u>64</u> , 427	49	43
NEUHAUS O.W. et LETZRING M. <u>Anal. Chem.</u> , 1957, <u>29</u> , 1230	44	26
NICKERSON W.J., NOVAL J.J. et ROBISON R.S. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1963, <u>77</u> , 73	73	81
NICKERSON W.J. et DURAND S.C. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> 1963, <u>77</u> , 87	74	81
NOVAL J.J. et NICKERSON W.J. <u>J. Bacter.</u> , 1959, <u>77</u> , 251	50	46, 81
O'DONNELL I.J., THOMPSON E.O.P. et INGLIS A.S. <u>Aust. J. Biol. Sci.</u> , 1962, <u>15</u> , 732	8	5



PIRIE N.W. <u>Biochem. J.</u> , 1934, <u>28</u> , 305	37	21
POWNING R.F. et IRZYKIEWICZ H. <u>Aust. J. Biol. Sci.</u> , 1960, <u>13</u> , 59	72	80
RAGOT J. <u>C.R. Acad. Sci.</u> (Paris), série D, 1966, <u>262</u> , 412	27	17
RAGOT J. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, Faculté des Sciences, Toulouse, 1968, n° 315, page 9	29	44, 80
RAUBITSCHKE F. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1957, <u>29</u> , 161	64	80
RAUBITSCHKE F. <u>Sabouraudia</u> , 1961, <u>1</u> , 87	69	80
ROGERS R.E., HIRSCHMANN D.J. et HUMFELD H. <u>Proc. Soc. Exp. Biol.</u> , 1940, <u>45</u> , 729	28	17
RUFFIN P., ANDRIEU S., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. <u>C.R. Acad. Sci.</u> (Paris), série D, 1971, <u>272</u> , 1908	45	31
SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. <u>Biochimie</u> , 1971, <u>53</u> , 711	55	58
SEKINE H. <u>Agric. Biol. Chem.</u> , 1972, <u>36</u> , 198	58	72
SMITH A.L. et HARRIS M. <u>J. Res. National Bureau of Standards</u> 1937, <u>18</u> , 623	2	3
SODA K., NOVOGRODSKY A. et MEISTER A. <u>Biochemistry</u> , 1964, <u>3</u> , 1450	39	22



SPIES J.R. et CHAMBERS D.C. <u>Anal. Chem.</u> , 1949, <u>21</u> , 1249	59	75
STAHL W.H., Mc QUE B., MANDELS G.R. et SIU R.G.H. <u>Text. Res. J.</u> , 1950, <u>20</u> , 570	40	24
SWAN J.M. <u>Nature</u> , 1957, <u>180</u> , 643	78	82
SWART L.S., HAYLETT T. et JOUBERT F.J. <u>Text. Res. J.</u> , 1969, <u>39</u> , 912	13	14
SWART L.S. et HAYLETT T. <u>Biochem. J.</u> , 1971, <u>123</u> , 201	16	7, 14
THURNER J. <u>Arch. Klin. Experim. Dermatol.</u> , 1966, <u>225</u> , 49	67	80
TOENNIES G. et HOMILLER R.P. <u>J. Amer. Chem. Soc.</u> , 1942, <u>64</u> , 3054	3	3
URIEL J. <u>Nature</u> , 1960, <u>188</u> , 853	48	41
VANBREUSEGHEM R. <u>C.R. Soc. Biol.</u> , 1949, <u>143</u> , 1302	62	80
VANBREUSEGHEM R. <u>Mycologia</u> , 1952, <u>44</u> , 176	63	80
WARD W. et LUNDGREN H.P. <u>Adv. Protein Chem.</u> (Acad. Press) 1954, <u>9</u> , 243	11	6
WEARY P.E., CANDY C.M. et CAWLEY E.P. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1965, <u>44</u> , 300	79	82
WEARY P.E. et CANDY C.M. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1967, <u>48</u> , 240	80	82
YU R.J., HARMON S.R. et BLANK F. <u>J. Bacter.</u> , 1968, <u>96</u> , 1435	47	41, 81



YU R.J., HARMON S.R. et BLANK F. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1969, <u>53</u> , 166	51	46, 53, 56, 81
YU R.J., HARMON S.R., WACHTER P.K. et BLANK F. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , 1969, <u>135</u> , 363	54	56, 69, 75, 77, 81
YU R.J., HARMON S.R., GRAPPEL S.F. et BLANK F. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1971, <u>56</u> , 27	52	48, 81
ZIEGLER H. et BÖHME H. <u>Derm. Wschr.</u> , 1963, <u>148</u> , 429	41	24, 80
ZIEGLER H. et RICHTER K. <u>Derm. Wschr.</u> , 1965, <u>151</u> , 744	46	36, 81
ZIEGLER H. Referáty Z. ^v clenske ^o schúze konané dne, 16, Zari, 1970	31	18, 26



APPENDICE TECHNIQUE

A - EXTRACTIONS DES KERATINES

La solubilisation partielle des kératines a été effectuée selon la technique de GODDARD et MICHAELIS (T 1) modifiée par GILLESPIE (T 2) (T 3).

2 g de laine ou de cheveu dégraissés ou lavés sont mis en suspension à température ambiante dans 150 ml de tampon 0,01 M Tris et 0,001 M en EDTA. L'extraction se fait sous légère agitation et en atmosphère d'azote par le thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 10,5 à 11. Après un temps de contact de 20 heures entre la solution et la kératine, on bloque les groupements thiols formés par l'addition de 7 g d'acide mono-iodo-acétique. Le blocage est total après 40 minutes. Les carboxyméthyl kératines sont alors séparées de la kératine résiduelle par filtration, dialysées contre de l'eau déionisée puis lyophilisées.

B - TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT

La souche de Kératinomyces ajelloi est conservée sur grains de blé. Huit à dix jours avant l'ensemencement on prélève l'efflorescence blanchâtre d'un grain de la couche supérieure et on la met sur milieu de SABOURAUD (glucose brut 2 %, peptone 1 %, gélose 2 %). Une petite partie de cette pré-culture sert d'inoculum pour les cultures sur kératines que l'on réalise dans des fioles de Jouan ou des boîtes de Roux.

Le milieu de culture utilisé est tamponné à pH 7,0 par les phosphates ; il contient par litre de solution

$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,497 g
$\text{K}_2\text{H PO}_4$	2 ,486 g
$\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2), \text{H}_2\text{O}$	0,252 g
MgCl_2	0,050 g
$\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016 g
ZnCl_2	0,010 g

Dans chaque fiole de culture on met 100 ml du milieu de culture et 500 mg de kératine.

La stérilisation se fait de deux façons différentes :

1°) La kératine, dégraissée au Soxhlet par l'éther de pétrole, est mise en contact, pendant 1 heure, avec de l'alcool éthylique à 95°C, puis rincée rapidement à l'eau distillée stérile, elle est ensuite transvasée dans le milieu de culture en présence d'un pool d'antibiotiques constitué de pénicilline (20 unités/ml) et de streptomycine (40 unités/ml).

2°) La kératine au sortir du Soxhlet est déposée dans le milieu de culture sur antibiotiques et non encore stérilisée. L'ensemble est stérilisé par la vapeur d'eau à l'autoclave à 110°C, pendant 20 minutes.

C - DOSAGE DES SULFATES

Le contenu en sulfate des filtrats de culture est déterminé selon la méthode turbidimétrique de CHOPRA (T 4).

1°) Réactifs utilisés

a) Réactif gélatine/chlorure de baryum

Dissoudre 2 g de gélatine Bacto Difco dans 400 ml d'eau distillée à 60°-70°C. Laisser une nuit à + 4°C. Ajouter ensuite 2 g de BaCl₂. Attendre 2 à 3 heures avant l'emploi.

b) Acide trichloracétique à 3 % dans l'eau

2°) Réaction

Mélanger :

100 µl de solution à doser

1,9 ml de A.T.C.A. à 3 %

0,5 ml de réactif gélatine/chlorure de baryum

Laisser 10 à 20 minutes à la température du laboratoire.

Lire la densité optique à 360 nm avec pour témoin le mélange ATCA/gélatine/chlorure de baryum.

On effectue également la réaction avec des solutions de K₂SO₄ dont les concentrations varient de 0,125 mg/ml à 2 mg/ml, ce qui permet de construire la courbe de densité optique à 360 nm en fonction de la concentration en sulfates et d'en déduire la concentration de la solution à doser.

D₁ - CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX G 200

Le gel de Sephadex G 200 est préparé de la façon suivante : les grains de Sephadex sont mis à gonfler dans l'eau, à raison de 40 ml d'eau par gramme de Sephadex et on laisse en contact 3 jours sous faible agitation. A plusieurs reprises, on laisse décanter le gel et on enlève les fines particules se trouvant à la surface. Après gonflement, le gel est mis en suspension dans le tampon désiré, puis on remplit la colonne en une seule fois, le tuyau d'écoulement étant fermé. Ensuite, on fait couler la colonne jusqu'à ce que le niveau du gel soit exactement au sommet de la colonne qui est alors fermée.

Avant chaque chromatographie la colonne est équilibrée avec le tampon pendant 48 heures, le débit du tampon étant celui utilisé pour les chromatographies.

Les produits lyophilisés, chromatographiés sur la colonne, sont dissous dans le même tampon, le résidu insoluble est éliminé par centrifugation.

Les chromatographies de filtration ont été effectuées dans le sens ascendant.

L'effluent de la colonne est fractionné à l'aide d'un collecteur GILSON, équipé d'un absorptiomètre UV comportant un filtre 280 nm permettant de mesurer la transmission à cette longueur d'onde.

D₂ - CHROMATOGRAPHIES SUR DEAE-cellulose

Nous avons utilisé deux variétés de DEAE-cellulose WHATMAN : la DE 22 et la DE 32 (les particules de DE 32 sont plus petites que celles de DE 22).

Traitement de la DEAE-cellulose

1°) La résine sèche est mise en suspension dans une solution d'HCl 0,5 N (dans les proportions de 15 ml de solution par g de résine) pendant une heure sous agitation modérée.

2°) Quand la suspension est décantée, on enlève les particules qui surnagent, on filtre sur un verre fritté n° 2, puis on rince à l'eau jusqu'à obtenir pH 4 ; on remet alors en suspension et sous agitation pendant une heure dans une solution de soude 0,5 M.

3°) On filtre à nouveau sur verre fritté n° 2 et on rince avec de l'eau jusqu'à pH 8.

4°) On met en suspension la résine dans le tampon choisi pour la chromatographie et on remplit la colonne.

5°) On fait passer le tampon sur la colonne jusqu'à ce que l'effluent ait le même pH et la même force ionique que le tampon choisi. On peut alors faire le dépôt. Toutes les chromatographies sur DEAE-cellulose ont été faites dans le sens descendant.

E - ULTRAFILTRATION

Les ultrafiltrations sont réalisées dans un ultrafiltreur DIAFLO équipé d'une membrane UM₂, la pression d'azote utilisée est de 3 atmosphères. Cette méthode donne des résultats très variables et a été abandonnée.

F - ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE à HAUT VOLTAGE

Les électrophorèses sont réalisées selon la technique de HANNIG (T 5) dans les conditions utilisées par MOSCHETTO (T 6). L'appareil utilisé est un ELPHOR VAP n° 1 (BENDER et HOBEIN).

Les conditions opératoires retenues sont les suivantes :

- Différence de potentiel : 2200 volts
- Intensité : 160 mA
- Température : + 5°C
- Tampon de la chambre : acide citrique 0,008 M
Tris 0,08 M - pH 8,6
- Tampon des électrodes : acide citrique 0,0256 M ;
Tris 0,24 M - pH 8,6

L'appareil permet de recueillir 48 fractions réparties de l'anode à la cathode sur lesquelles on peut effectuer différents dosages.

G₁ - DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY (T 7)

Le dosage des protéines des différentes préparations est effectué selon la méthode de LOWRY et coll. en utilisant une chaîne automatique de dosage TECHNICON.

Avant le dosage des solutions inconnues, on effectue un étalonnage avec une gamme de solutions de sérumalbumine bovine. Chaque résultat porté dans le texte est la moyenne de 3 dosages et ce résultat est exprimé en équivalent sérumalbumine.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

1°) Réactif de FOLIN : réactif MERCK dilué au 1/20e avec de l'eau distillée.

2°) Tampon bicarbonate : on prépare

une solution A : NaH CO ₃	84 g dans 500 ml d'eau
et une solution B : NaOH	45 g dans 300 ml d'eau

On mélange les solutions A et B et on complète à un litre avec de l'eau.

3°) Solution cuivrique : on mélange en égales proportions, au moment de l'emploi, une solution de CuSO₄ à 2 g par litre et une solution à 4 g par litre de tartrate double de potassium et de sodium. Le dosage est précis si l'échantillon contient de 20 à 100 µg de protéines par ml. De plus, l'échantillon doit être en solution légèrement acide pour éviter d'éventuels précipités dans les bobines de réactions. Le schéma du montage est indiqué sur la Figure F1.

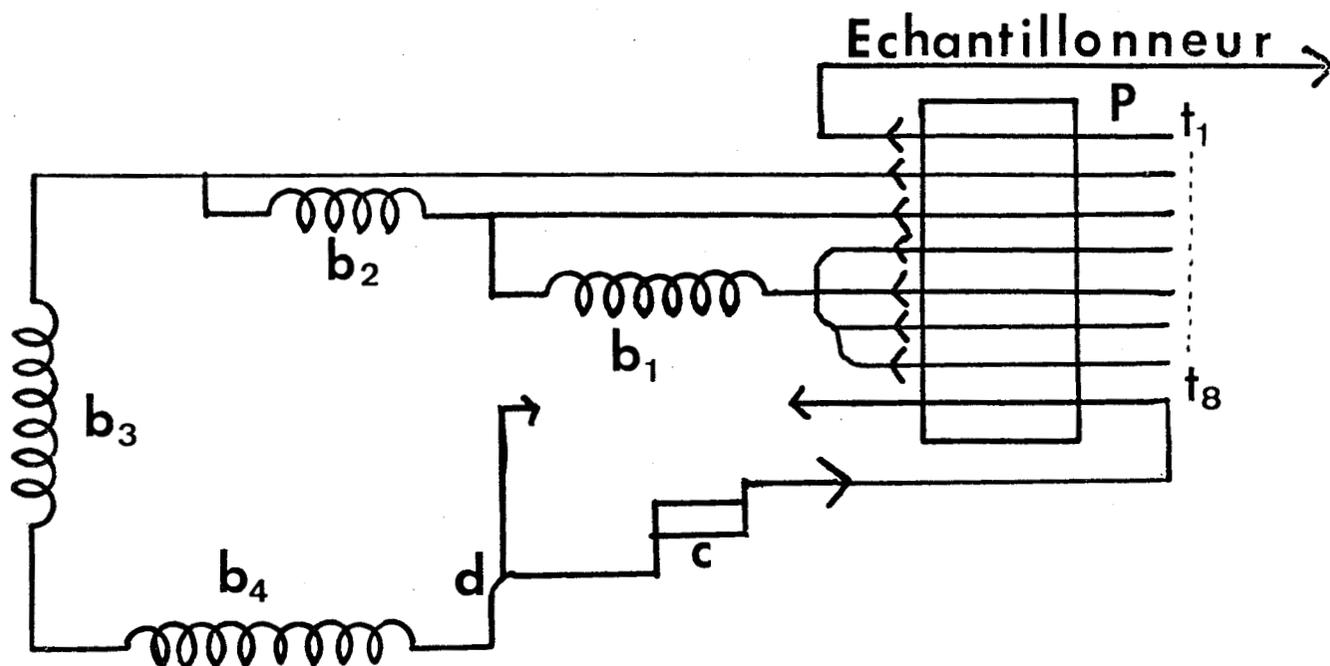
G₂ - DOSAGE DU "CONTENU EN TYROSINE"

La méthode et le déroulement du dosage dérivent du dosage de LOWRY.

La différence essentielle est le remplacement de la solution cuivrique par une solution d'EDTA à 1 % dans l'eau ; de ce fait, la réactivité des solutions sera uniquement due au contenu en tyrosine et en tryptophane de l'échantillon ; la réactivité due à la liaison peptidique étant supprimée.

Avant le dosage des solutions inconnues, on étalonne avec une gamme de tyrosine.

Dosage de LOWRY



P Pompe Technicon

b₁, b₂ Bobines de mélange

b₃, b₄ Bobines de réaction

d Débulleur

c Colorimètre à 660 nm

t₁	Eau	2ml / mn
t₂	Folin	1,20 ml / mn
t₃	Tampon	1,60 ml / mn
t₄	Eau	1,60ml / mn

t₅	Air	0,80 ml / mn
t₆	Solution de Cu ⁺⁺	0,60 ml / mn
t₇	Echantillon	0,32 ml / mn
t₈	Retour	2,00 ml / mn

Figure F₁

H - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

La méthode utilisée est celle de DISCHE (T 8) légèrement modifiée. Le carbazol donne avec les acides uroniques en milieu sulfurique et à chaud, une coloration violacée spécifique.

Réactifs :

- Acide sulfurique concentré exempt de substances oxydantes
- Solution de carbazol à 0,1 % dans l'éthanol absolu.

Mode opératoire :

Mettre 0,5 ml de la solution à doser et 3 ml d' H_2SO_4 pur (R.P.) dans un tube vissé. Bien agiter et mettre 20 minutes au bain-marie à 100°C. Refroidir dans l'eau glacée. Ajouter 0,1 ml de la solution de carbazol dans le tube puis remettre 10 minutes au bain-marie à 100°C. Refroidir dans l'eau glacée puis lire de suite la densité optique à 535 nm.

A chaque série de dosages on effectue également la réaction sur une gamme étalon de glucurono-lactone (de 12,5 g/ml à 200 g/ml), ce qui permet de construire la courbe de densité optique à 535 nm en fonction de la concentration en acides uroniques.

I - DOSAGE DES OSAMINES

Ce dosage est effectué selon la méthode de NEUHAUS et LETZRING (T 9).

Réactifs : les réactifs utilisés sont préparés juste avant le dosage ; ce sont :

1°) Réactifs à l'acétyl acétone

- | | |
|-------------------------------|-------|
| - Tampon carbonate de pH 10,2 | 10 ml |
| - Acétyl acétone | 94 ml |

Le tampon carbonate utilisé contient 15 g de bicarbonate de sodium et 172 g de carbonate de sodium par litre.

2°) Réactif d'Ehrlich

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - Para-diméthylaminobenzaldéhyde | 400 mg |
| - HCl concentré | 1,5 ml |
| - Alcool isoamylique | 13,5 ml |

Les différentes phases du dosage sont les suivantes :

a) Hydrolyse :

L'échantillon qui doit correspondre à 1 ou 2 mg d'osamines est placé dans un tube à hydrolyse. On ajoute 2 ml d'HCl 4 N ; le tube est alors fermé sous vide et porté 4 heures à 105°C.

b) Elimination de l'acide chlorhydrique

L'hydrolysate est dilué 4 fois avec de l'eau distillée, évaporé à sec à l'aide d'un évapomix, repris une première fois avec de l'eau, évaporé à nouveau et enfin repris par 16 ml d'eau.

c) Formation des chromogènes

4 ml d'échantillon sont ajoutés à 1 ml de réactif à l'acétyl acétone dans un tube que l'on bouche et le mélange est porté à 100°C au bain-marie pendant 20 minutes. Ensuite, on refroidit et on introduit 4 ml d'alcool isoamylique afin d'extraire les chromogènes. Après agitation et centrifugation on prélève 4 ml de la phase surnageante.

d) Condensation avec le réactif d'Ehrlich

Aux 4 ml précédents, on ajoute 1 ml de réactif d'Ehrlich. On agite puis on laisse à l'obscurité pendant 10 à 15 minutes : temps au bout duquel on mesure la densité optique à 530 nm avec de l'alcool isoamylique dans la cuve de référence.

Les opérations correspondant aux phases c et d sont effectuées parallèlement sur une gamme de solution de glucosamine dont les concentrations varient de 12,5 g/ml à 200 g/ml ; cette gamme permet de construire la courbe de D.O. à 530 nm en fonction de la concentration en osamines. La concentration des solutions inconnues sera obtenue par interpolation.

J - ANALYSE DES ACIDES AMINES

Les hydrolysats de protéines sont faits dans l'acide chlorhydrique 5,6 N à 110°C en tube scellé sous vide pendant 24 heures. L'hydrolysate est ensuite dilué avec de l'eau deionisée de telle sorte que la solution ait un titre en HCl inférieur à 0,08 N, puis lyophilisé.

Le lyophilisat est ensuite repris par du tampon citrate de sodium 0,2 M en sodium de pH 2,2.

Le dosage des amino-acides est effectué sur une chaîne TECHNICON

selon la technique de SPACKMAN, STEIN et MOORE (T 10) modifiée par PIEZ et MORRIS (T 11) et adaptée au Technicon par DAUTREVAUX (T 12).

Pour l'étude en amino-acides des peptides nous remplaçons la lyophilisation par l'évaporation sous vide. La solution à évaporer est agitée et chauffée à 30°C ; le montage comporte en outre un piège froid. Du fait de la rapidité de l'opération, l'estérification de l'acide glutamique par la sérine constatée lors de concentrations par dessiccation est très faible, comme l'ont montré IKAWA et SNELL (T 13).

Pour étudier la composition en amino-acides des peptides, nous avons utilisé l'analyseur automatique JEOL 5 AH.

Nous avons essayé de déterminer la présence du tryptophane dans les extraits purifiés avec l'analyseur automatique d'acides aminés après hydrolyse acide.

En ce qui concerne le tryptophane, la réaction de SPIES et CHAMBERS est négative avec les extraits lyophilisés purifiés.

Cependant, comme la limite de sensibilité de cette méthode se situe aux environs de 20 nanomoles, nous avons essayé de déterminer la présence du tryptophane par la méthode de MATSUBARA et SASAKI (T 14) qui, selon BARTH et coll. (T 15) est celle qui donne les meilleurs résultats.

Cette méthode consiste essentiellement à éviter la destruction du tryptophane lors de l'hydrolyse acide en ajoutant 20 à 40 μ l d'acide thioglycolique 11 M par ml d'acide chlorhydrique 5,6 M. La récupération varie de 80 à 85 % lorsque l'on soumet le tryptophane seul à l'hydrolyse acide.

Le dosage du tryptophane se fait en même temps que celui des autres acides aminés basiques et des osamines avec l'analyseur automatique JEOL 5 AH, dans les conditions suivantes :

Hauteur de résine : 30 cm (résine JEOL LCR 1) équilibrée dans du tampon citrate 0,2 M en Na⁺, pH 4,25 - Débit du tampon 73 ml/heure.

Programme de l'analyse : tampon citrate de pH 4,25 0,2 M en Na⁺ pendant 25 minutes, puis tampon citrate de pH 5,28, 0,35 M en Na⁺. Pour cette

analyse la colonne est maintenue à 47°C pendant 30 minutes, puis à 60°C jusqu'à la fin de l'analyse. La Figure F₂ représente l'élution obtenue avec ce programme de travail pour les acides aminés basiques, les osamines et le tryptophane.

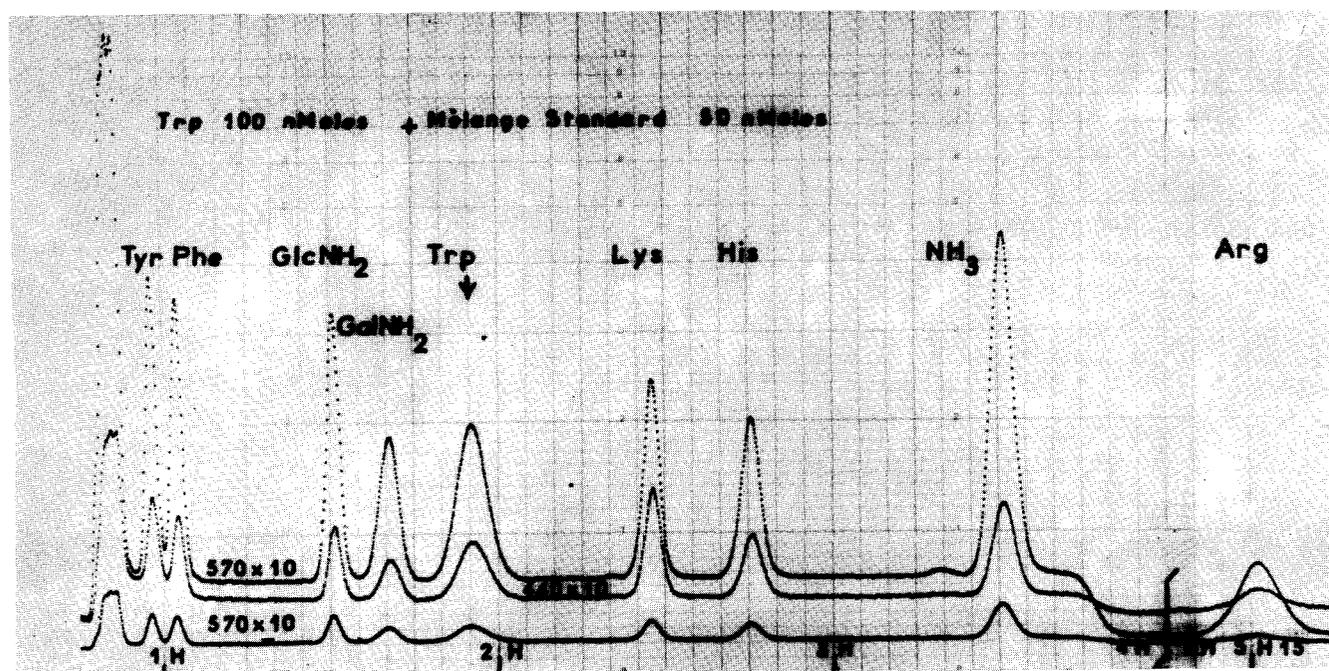


Figure F₂

K - HYDROLYSES ENZYMATIQUES - ANALYSES DES PRODUITS DE DIGESTION

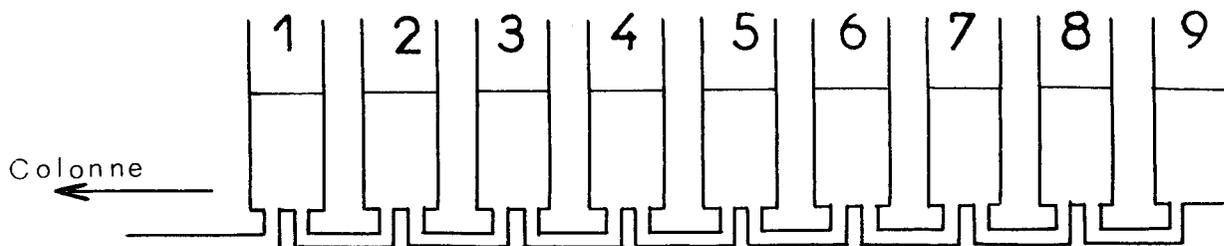
a) Hydrolyse : les hydrolyses des protéines par les enzymes liées ont été faites selon le protocole suivant : 100 mg de substrat (histone riche en glycolle et en arginine, ou fragment N-terminal de myoglobine) sont mis en solution dans 18 ml de tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4. On ajoute 6 ml de solution enzymatique qui, après dosage, représentent 1 mg de protéine. On laisse incuber pendant 2 heures à 40°C ; l'hydrolyse est alors stoppée par ajustement à pH 3 par de l'acide formique.

b) Séparation des peptides obtenus par chromatographie

La solution obtenue est évaporée à sec puis reprise par 2 ml d'acide acétique à 20 % et déposée sur une colonne de résine Technicon Chromobeads P, équilibrée en tampon pyridine-acide formique à pH 2,9 et maintenue à 60°C. Les dimensions de la colonne sont les suivantes : 140 cm de hauteur, 0,635 de diamètre intérieur.

L'élution des différents peptides est réalisée par un double gradient linéaire en pyridine allant de 0,1 M à 2 M et linéaire en pH de 2,9 à 5,0, puis par un tampon 2 M en pyridine pH 5,0 seul.

Le gradient d'éluion est obtenu à l'aide d'un vase à gradient à 9 chambres de 200 ml chacune montées comme l'indique le schéma suivant



La composition des chambres est la suivante :

CHAMBRE n°	Volume de tampon 1	Volume de tampon 2	Volume de tampon 3	Volume de tampon 4	Molarité en pyridine
1	200				0,1
2	150	50			0,2
3	100	100			0,3
4	50	150			0,4
5		200			0,5
6		200			0,5
7		100	100		0,75
8			200		1
9				200	2

Tampon 1 : Pyridine, acide formique pH 2,90 0,1 M en pyridine dont la composition est la suivante :

- 16 ml de pyridine redistillée sur baryte
- 40 ml d'acide formique R.P.
- eau distillée : 1500 ml

on ajuste le pH à 2,90 et on complète à 2 litres avec de l'eau

Tampon 2 : Pyridine, acide acétique pH 5,00 0,5 M en pyridine obtenu en diluant le tampon 4.

Tampon 3 : Pyridine, acide acétique pH 5,00 1 M en pyridine obtenu en diluant le tampon 4.

Tampon 4 : Pyridine, acide acétique pH 5,0 2 M en pyridine dont la composition est la suivante :

- Pyridine redistillée 322,5 ml
- acide acétique 200 ml
- eau 1300 ml

On amène le pH à 5,0 et on complète à 2 litres avec de l'eau.

Après passage du gradient, on termine l'élution par le tampon 4.

Le débit utilisé au cours de l'élution est de 33 ml/heure et on collecte 6 tubes à l'heure.

Sur chaque tube on repère la présence de peptides par la réaction à la ninhydrine : celle des peptides à arginine par la réaction de SAKAGUCHI ; celle des peptides à histidine (et à tyrosine) par la réaction de Pauly.

Ces trois réactions sont réalisées de façon automatique sur une chaîne de dosage automatique Technicon.

Réaction à la ninhydrine

Préparation de la solution de ninhydrine. La solution fabriquée conservée et utilisée sous azote est obtenue en mélangeant les solutions A et B

Solution A	- ninhydrine	60 g
	- Hydrindantine	1,5 g
	- Méthylcellosolve	500 ml
Solution B	- Méthylcellosolve	2150 ml
	- eau distillée	2000 ml
	- Tampon acétate de sodium 4 M, pH 5,51	350 ml

Le tampon acétate 4 M de pH 5,51 a la composition suivante :

- CH ₃ COONa, 3 H ₂ O	2720 g
- acide acétique	500 ml
- eau distillée	pour faire 5 litres

Réaction de Sakaguchi

Réactifs utilisés :

1°) Solution aqueuse de N-bromosuccinimide à 3 g/litre

2°) Solution de 8 hydroxyquinoléine, préparée extemporanément en mélangeant :

- 20 ml d'une solution à 1 % de 8 hydroxyquinoléine dans le méthanol
- 364 ml de soude 8 M
- 626 ml d'eau distillée

Réaction de Pauly

Réactifs utilisés :

Acide sulfanilique 0,5 % dans HCl 0,5 N

Carbonate de sodium 2 M

Nitrite de sodium à 0,35 %, préparé extemporanément

Les Figures F3, F4, F5 indiquent les montages automatiques utilisés respectivement pour les réactions à la ninhydrine, de Sakaguchi et de Pauly.

c) Electrochromatographies des peptides (Figure F6-A)

c₁) Electrophorèses : elles sont faites sur feuilles de papier Whatman 3 MM (46 x 57 cm)

L'électrophorèse, faite dans un appareil GILSON DW, est effectuée sous une tension de 2200 volts pendant 90 minutes, en présence de 2 µl d'un témoin latéral de 3 acides aminés : acide aspartique, tyrosine, arginine ; le tampon utilisé a pour pH 3,6 ; sa composition est la suivante :

- Pyridine	10 ml
- acide acétique	100 ml
- eau	2890 ml

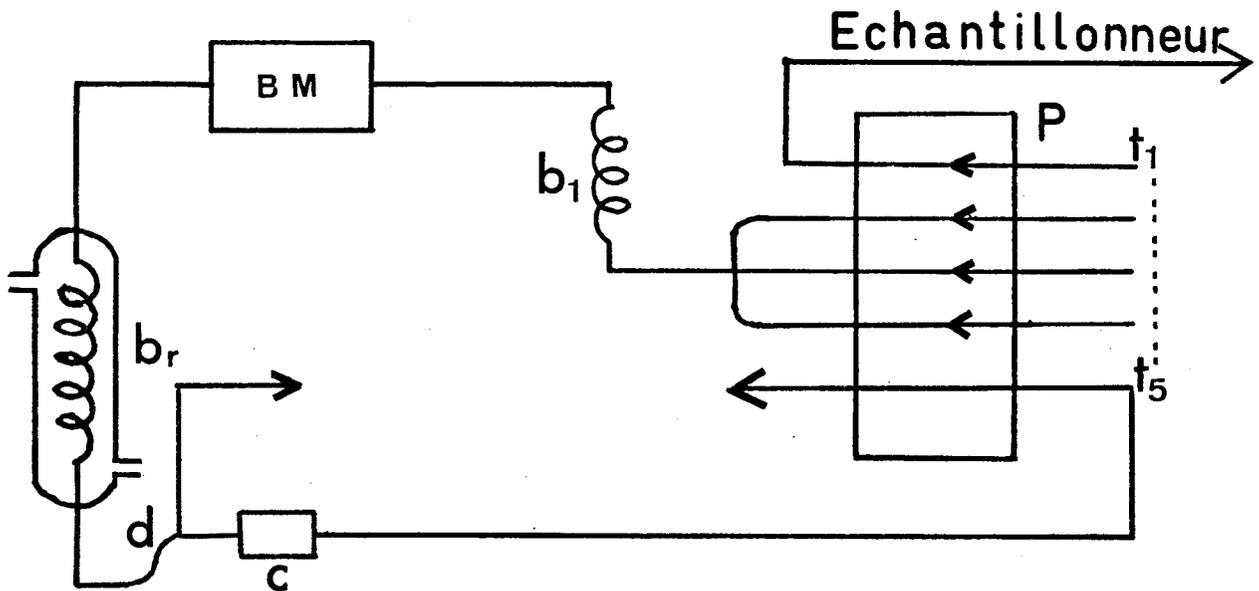
A la fin de l'électrophorèse, on sèche la feuille, on découpe la bande correspondant aux témoins ; la révélation à la ninhydrine des acides aminés permet de contrôler que l'électrophorèse s'est déroulée dans de bonnes conditions.

c₂) Chromatographie

La chromatographie descendante s'effectue après dépôt de 1 l de rouge de phénol servant à visualiser le front du solvant ; la feuille est mise à saturer dans la cuve contenant du solvant dans une capsule pendant 5 à 6 heures, puis on met le solvant dans le godet et on laisse migrer pendant 15 à 16 heures.

Le solvant utilisé est le suivant : n-butanol, pyridine, acide acétique, eau (15 : 10 : 3 : 12) (vol/vol)

Réaction à la ninhydrine



P Pompe Technicon

BM Bain Marie 95°C

b_r Bobine de refroidissement

b₁ Bobine de mélange

d Débulleur

C Colorimètre à 570 nm

t₁ Eau

t₄ Ninhydrine 0,56 ml/ml

t₂ Echantillon 0,60 ml/mn

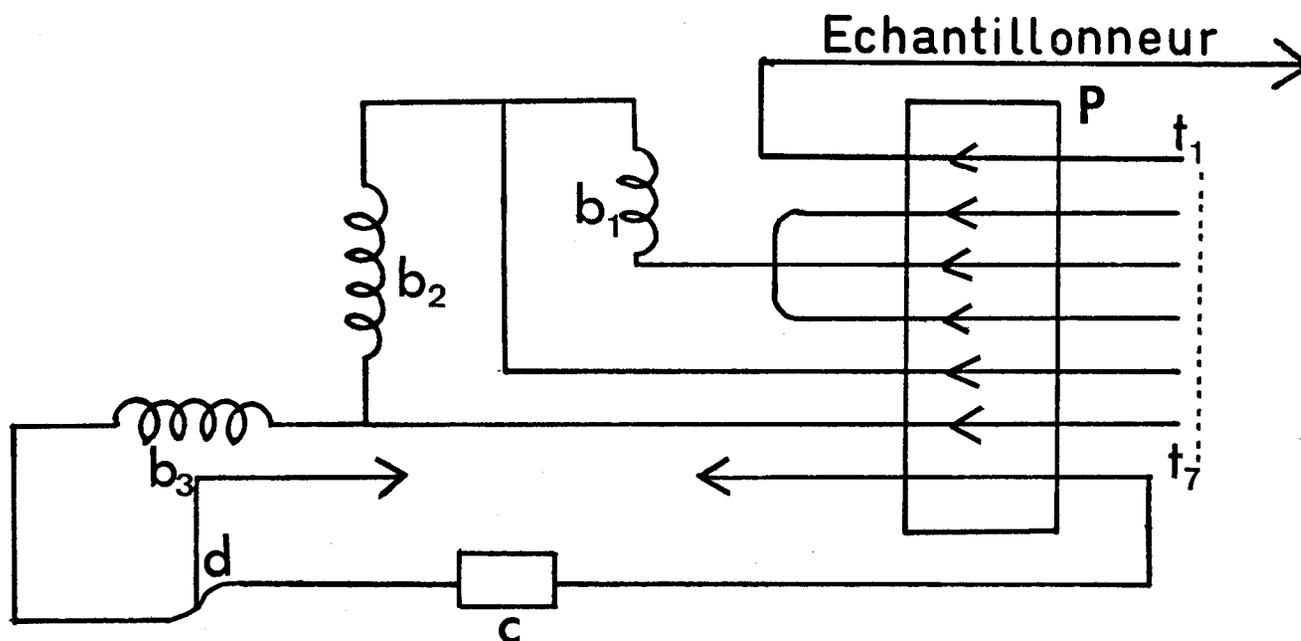
t₅ Retour 1,06 ml/ml

t₃ Azote 0,32 ml/mn



Figure F₃

Réaction de SAKAGUCHI



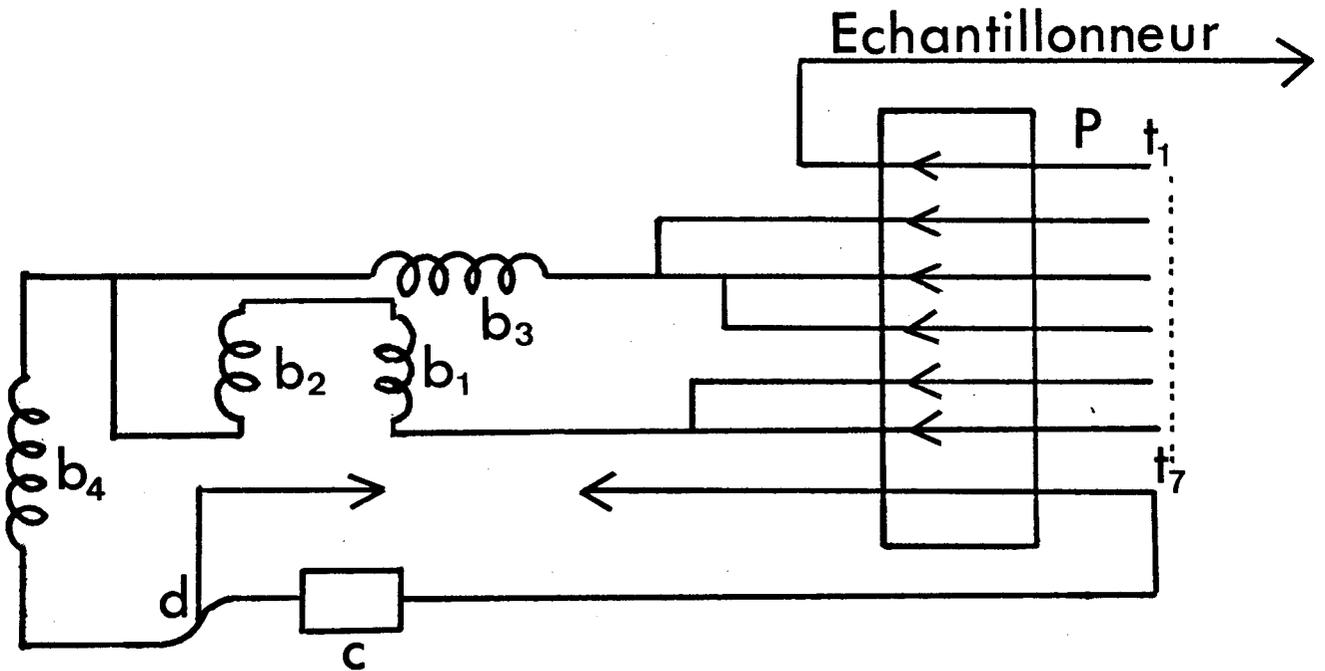
- P** Pompe Technicon
b₁, b₂, b₃ Bobines de mélange
d Débulleur
c Colorimètre à 505 nm

t₁	Eau		t₅	Hydroxyquinoléine	0,80 ml/mn
t₂	Eau	0,32 ml/mn	t₆	N.-bromosuccinimide	0,42 ml/mn
t₃	Air	0,42 ml/mn	t₇	Retour	1,20 ml/mn
t₄	Echantillon	0,32 ml/mn			



Figure F₄

Réaction de PAULY



P Pompe Technicon

b₁, b₂, b₃ Bobines de mélange

d Débulleur

c Colorimètre à 505 nm

t₁	Eau		t₅	NaNO ₃	0,80 ml/mn
t₂	Air	0,42 ml/mn	t₆	Acide sulfanilique	0,80 ml/mn
t₃	Echantillon	0,32 ml/mn	t₇	Retour	2,00 ml/mn
t₄	Na ₂ CO ₃	2,00 ml/mn			



Figure F₅

Après la chromatographie, la feuille est de nouveau séchée et on procède à la coloration des peptides par la réaction à la ninhydrine, de la façon suivante :

1°) On chauffe la feuille pendant 30 minutes à 90°C pour éliminer toute trace de solvant ou d'ammoniac.

2°) On immerge la feuille dans le réactif ninhydrine-cadmium

3°) On replace la feuille dans l'étuve dont la température est descendue à 40°C et on chauffe à nouveau jusqu'à 100°C ; les produits réactifs donnent des colorations stables qui sont roses ou jaunes.

Réactif ninhydrine-cadmium

Ninhydrine	10 g
Acétone	1000 ml
Acétate de cadmium	1 g
Acide acétique	50 ml
Eau	100 ml

On dissout la ninhydrine dans l'acétone et l'acétate de cadmium dans l'acide acétique. Après dissolution de l'acétate on ajoute l'eau et on mélange les deux solutions.

d) Purification des peptides (Figure F6-B)

Selon la position des taches, la purification des peptides a été effectuée, soit en électrophorèse, soit en chromatographie. Le dépôt se fait le long d'une ligne perpendiculaire à la direction de migration. Après migration, on révèle une bande de chaque côté du dépôt (voir schéma) ; les bandes transversales correspondant à la présence de peptides sont éluées par l'acide acétique R.P. dilué au dixième avec de l'eau déionisée.

L - DETERMINATION DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DES PEPTIDES PAR LA METHODE AU CHLORURE DE "DANSYL" (chlorure de l'acide 1-diméthyl amino naphthalène 5-sulfonique)

Cette méthode a été décrite par GRAY et HARTLEY (T 16).

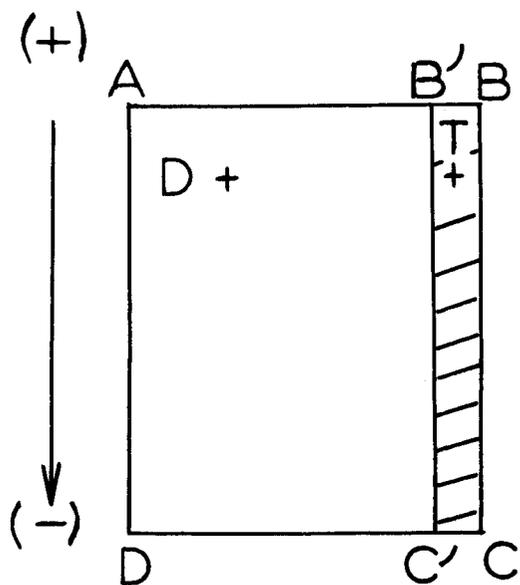
La technique utilisée est celle de WOODS et WANG (T 17).

La solution de peptide (1 à 2 nanomoles dans 10 µl d'eau), placée dans un tube en verre spécial,* est évaporée à sec. On ajoute 10 µl

(*) Tube de 5 mm de diamètre interne et de 7 cm de hauteur.

A - ELECTROCHROMATOGRAPHIE

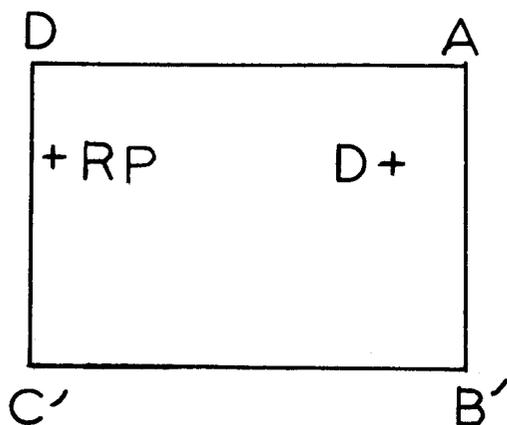
a) Electrophorèse pH 3,6



D = dépôt du mélange de peptides
T = dépôt du mélange témoin d'acides aminés

Les cotes sont les suivantes (en cm)
pour D : 13 et 10
pour T : 2 et 10

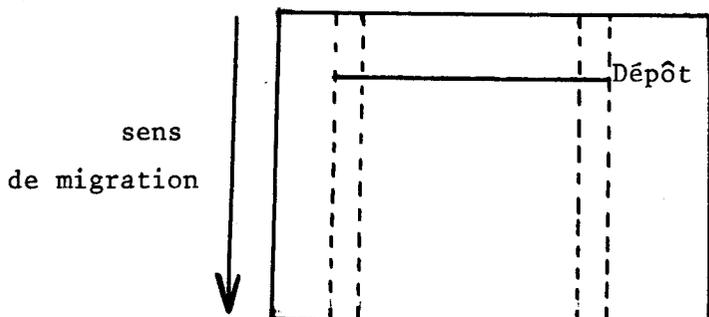
b) Chromatographie



RP = rouge de phénol

B - PURIFICATION DES PEPTIDES

(par électrophorèse ou par chromatographie)



Les bandes limitées par les traits pointillés sont découpées après migration et révélées à la ninhydrine.



Figure F₆

d'une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et 20 μ l d'une solution acétonique de chlorure de dansyl à 1 mg/ml. Le tube est bouché et on laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant une heure à 37°C.

Les produits de la réaction sont évaporés à sec à 55°C sur P_2O_5 et sous vide. On introduit ensuite dans le tube de réaction 50 μ l d'acide chlorhydrique 6 N, on scelle et porte à 105°C pendant 15 heures. L'hydrolysate est ensuite séché au dessiccateur, à température ambiante, en présence de pastilles de soude.

Le produit sec obtenu, qui comprend le dansylaminoacide correspondant à l'acide amino en position N-terminale, les autres amino-acides et des produits de transformation du chlorure de dansyl en excès est repris par 25 μ l du mélange acide acétique-acétone (2 : 3). 2 μ l de cette solution sont déposés sur une feuille de polyamide (*) de forme carrée (5 x 5 cm).

On effectue une chromatographie bidimensionnelle dans le système suivant :

1ère dimension : acide formique à 1,5 % dans l'eau

2ème dimension : benzène, acide acétique (9/1)

Les taches de dansyl-amino-acides sont localisées par fluorescence à 340 nm.

Dans une deuxième opération, on fait une étude en plaçant sur une face la même solution que précédemment et sur l'autre le dansyl-amino-acide qui a été identifié au cours du premier essai.

M - ELECTROPHORESES ET ENZYMOGRAMMES

a) Electrophorèse sur agarose

Le support d'électrophorèse est constitué par de l'agarose coulée sur des lames de microscope (76 x 26 mm).

(*) Schleicher et Schüll, TLC Ready Pastic cheets F1700 Micro-Polyamide.

La solution d'agarose est une solution à 0,9 % faite dans du tampon véronal de pH 8,2 (*) portée à l'ébullition. Trois ml de cette solution sont coulés sur chaque lame. Lorsque l'agarose est durcie, on creuse une gouttière qui contiendra la solution protéique à étudier.

De façon classique, l'électrophorèse dure 3 heures et la lame d'agarose est placée dans un champ électrique de 3 volts/cm. Les protéines sont ensuite fixées par immersion, pendant 3 heures au minimum, dans un mélange acide acétique/eau/éthanol (5 : 45 : 45). La gélose est ensuite séchée et on colore pendant 5 minutes avec l'Amidoschwarz en solution à 1 % dans le solvant méthanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5).

Le colorant en excès est enlevé par son solvant.

b) Enzymogramme (selon la technique de URIEL (T 18))

On prépare 2 lames par produit ; on soumet les deux lames à l'électrophorèse ; sur l'une on effectue la coloration comme précédemment décrit, sur l'autre on effectue l'enzymogramme de la façon suivante :

On recouvre la lame d'un papier filtre imbibé d'une solution d'hémoglobine à 0,25 p. 100 et on laisse en contact 1/4 d'heure en atmosphère humide, ce qui permet à l'hémoglobine de diffuser dans la gélose. Ensuite, on enlève le papier et on met à incuber une heure à 37°C en atmosphère humide puis on reprend la technique utilisée pour les protéinogrammes ordinaires, fixation, coloration, lavage pour éliminer le colorant en excès.

La bande d'enzymes apparaît décolorée sur un fond continu coloré par l'Amidoschwarz.

Pour les enzymogrammes, nous avons également utilisé la technique de KAMINSKI et BUSHUK (T 19) qui consiste à ajouter le substrat de l'enzyme dans le gel. Le protocole opératoire est alors le suivant :

(*) Tampon véronal de pH 8,2 : véronal sodé : 79,3 g ; HCl N 115 ml ;
eau distillée qsp 5 litres.

1°) Dans l'agarose, dissous à chaud dans le tampon d'électrophorèse, on ajoute une solution de caséine à 0,3 p. 100 dans la proportion de 1 ml de solution de caséine pour 3 ml de solution d'agarose, puis le gel est coulé et l'électrophorèse est réalisée de la même façon que précédemment.

2°) Après électrophorèse, il suffit de mettre à incuber en atmosphère humide avant de révéler la caséine à l'Amidoschwarz.

N - MESURE DE L'ACTIVITE CASEINOLYTIQUE

Nous mesurons les activités protéolytiques sur une solution à 2 %, tamponnée par les phosphates à pH 7,4, de caséine préparée selon HAMMARSTEN.

Dans un tube à hémolyse en pyrex pouvant contenir 5 ml, on met

- 0,5 ml de solution à essayer
- 2,5 ml de solution de tampon phosphate 0,025 M, pH 7,4
- 1 ml de solution de caséine

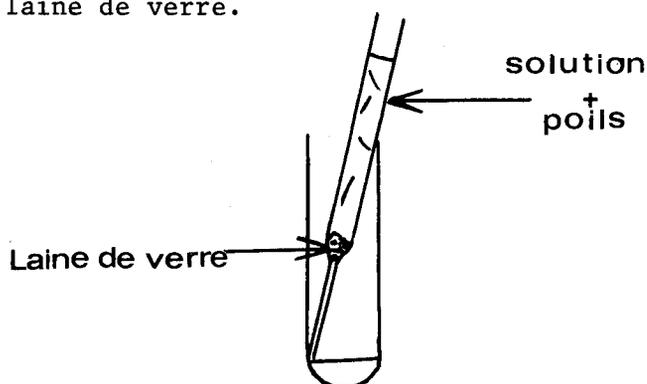
On homogénéise, puis on porte au bain-marie à 40°C pendant une heure ; on arrête alors la réaction, on ajoute 0,5 ml d'acide trichloracétique à 45 % pour précipiter la caséine non hydrolysée. Après centrifugation du précipité, on réalise sur le surnageant la réaction de Lowry si on veut seulement repérer des fractions enzymatiquement actives, ou le "contenu en tyrosine" si on veut mesurer l'activité protéolytique spécifique d'une fraction caractéristique.

Pour le dosage de l'activité protéolytique spécifique d'un produit déterminé, on prépare un témoin qui contient les mêmes éléments que le tube de mesure, mais dans lequel on ajoute l'acide trichloracétique avant l'incubation.

O - MESURE DE L'ACTIVITE KERATINOLYTIQUE

La technique utilisée est celle décrite par NOVAL et NICKERSON (T 20) modifiée par YU et coll. (T 21).
50mgde poils de cobaye non autoclavés sont mis en suspension dans 4 ml de tampon puis on ajoute la solution à doser. On laisse une heure à

à 37°C. Ensuite, on arrête la réaction en plongeant dans l'eau glacée et on filtre en utilisant une pipette Pasteur munie d'un bouchon en laine de verre.



Puis on lit la densité optique à 278 nm du filtrat ainsi obtenu. Pour chaque essai nous préparons deux solutions témoins : une solution de tampon contenant 50 mg de poils et une solution de tampon contenant la même quantité d'enzyme que le tube de mesure, mais ne contenant pas de poils.

On obtient la densité optique corrigée en déduisant de la valeur obtenue pour le tube de mesure la somme des valeurs obtenues pour chacune des deux solutions témoins.

L'unité d'activité kératinolytique (U.K.) sera définie par la solution enzymatique qui, dans les conditions de l'essai décrit ci-dessus, donnera une densité optique corrigée de 0,100.

L'activité kératinolytique (U.K./mg) est l'activité kératinolytique d'un mg d'enzyme.

P - MESURE DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION

Les protéines dont on veut mesurer les coefficients de sédimentation sont mises en solution dans un tampon approprié qui contient en plus du chlorure de sodium (0,1 M en NaCl) pour assurer la neutralité électrique dans la cellule de centrifugation. Les solutions sont dialysées 15 heures contre le même tampon sous agitation dans un Erlenmeyer bouché. Les centrifugations sont faites dans une ultracentrifugeuse Beckman modèle E. Nous avons utilisé une cellule standard de 12 mm d'épaisseur. Le dispositif optique utilisé est le système Schlieren qui fournit les différentes courbes $\frac{dn}{dx} = f(x)$ au cours du temps, n étant l'indice de réfraction et x la distance de la zone frontière à l'axe de rotation.

Dépouillement des clichés

Rappelons que le coefficient de sédimentation est défini par la vitesse linéaire du déplacement des particules ramenée au champ unité

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{w^2 x}$$

Nous avons dépouillé les clichés en utilisant la méthode graphique intégrale.

La forme intégrée de l'équation définissant le coefficient de sédimentation étant

$$\log/x/ = sw^2t + \text{constante}$$

La pente de la courbe $\log/x/ = f(t)$ est une mesure de sw^2 ; on peut en déduire la valeur de s_{app} .

La valeur de s dépendant de la concentration en macromolécules, il est nécessaire de mesurer s_{app} pour plusieurs concentrations et d'extrapoler à concentration nulle la courbe $\frac{1}{s_{app}} = f(\text{concentration})$, ce qui permet d'obtenir la valeur de S°_{app} .

La sédimentation se faisant dans un milieu de viscosité propre au tampon employé, il faut de plus ramener les valeurs aux conditions standard (eau, 20°C).

Si D est le coefficient de viscosité du tampon à la température T ,

Si $S_{20,w}$ est le coefficient de viscosité de l'eau à 20°C,

Si ρ_t est la masse volumique du tampon à la température T ,

Si $\rho_{20,w}$ est la masse volumique de l'eau à 20°C,

Si V est le volume spécifique partiel de la protéine en solution,

la valeur de $S^{\circ}_{20,w}$ se déduit de S° par la relation :

$$S^{\circ}_{20} = s^{\circ}_{app} \cdot \frac{D_T}{D_{20,w}} \cdot \frac{1 - V \cdot \rho_{20,w}}{1 - V \cdot \rho_t}$$

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

AUTEURS	REFERENCE	PAGES
BARTH G., BUNNENBERG E., et DJERASSI C. <u>Anal. Biochem.</u> , 1972, <u>48</u> , 471	T 15	9-t
CHOPRA S.L. <u>Indian J. Chem.</u> , 1964, <u>2</u> , 78	T 4	2-t
DAUTREVAUX M. <u>Bull. Soc. Chim. Biol.</u> , 1962, <u>44</u> , 1105	T 12	9-t
DISCHE Z. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1947, <u>167</u> , 189	T 8	7-t
GILLESPIE J.M. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1958, <u>27</u> , 225	T 2	1-t
GILLESPIE J.M. <u>Austr. J. Biol. Sci.</u> , 1960, <u>13</u> , 81	T 3	1-t
GODDARD D.R. et MICHAELIS L. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1934, <u>106</u> , 605	T 1	1-t
GRAY W.R. et HARTLEY B.S. <u>Biochem. J.</u> , 1963, <u>89</u> , 59p	T 16	17-t
HANNIG K.J. <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , 1964, <u>338</u> , 221	T 5	4-t
IKAWA M. et SNELL E.E. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1961, <u>236</u> , 1955	T 13	9-t
KAMINSKI E. et BUSHUK W. <u>Can. J. Biochem.</u> , 1968, <u>46</u> , 1317	T 19	20-t



LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. <u>J. Biol. Chem.</u> , 1951, <u>193</u> , 265	T 7	4-t
MATSUBARA H. et SASAKI R.M. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> , 1969, <u>35</u> , 175	T 14	9-t
MOSCHETTO Y. Communication personnelle	T 6	4-t
NEUHAUS O.W. et LETZRING M. <u>Anal. Chem.</u> , 1957, <u>29</u> , 1230	T 9	7-t
NOVAL J.J. et NICKERSON W.J. <u>J. Bacter.</u> , 1959, <u>77</u> , 251	T 20	21-t
PIEZ R.A. et MORRIS L. <u>Anal. Biochem.</u> , 1960, <u>1</u> , 187	T 11	9-t
SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S. <u>Anal. Biochem.</u> , 1958, <u>30</u> , 1190	T 10	9-t
URIEL J. <u>Nature</u> , 1960, <u>188</u> , 853	T 18	20-t
WOOD K.R. et WANG K.T. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1967, <u>133</u> , 369	T 17	17-t
YU R.J., HARMON S.R. et BLANK F. <u>J. Invest. Dermatol.</u> , 1969, <u>53</u> , 166	T 21	21-t

