

50376
1974
126

Numéro d'ordre : 455

50376
1974
126

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M É M O I R E

présenté à l'Université de Lille I

pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE 3^e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Nicole HOUDRET-DOLLET

**ETUDE COMPARATIVE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES
DES NEURAMINIDASES DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE
ET DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS**



Membres du Jury : M. J. MONTREUIL, Président

M^{lle} G. SPIK, Rapporteur

MM. G. BISERTE,

P. ROUSSEL

Présenté le 23 Avril 1974

A la mémoire de Monsieur le Professeur HAVÉZ
à qui nous devons l'orientation de ce travail.

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Recherches n°16 sur la Biochimie des Protéines de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Directeur : Professeur Paul BOULANGER) sous la direction de Messieurs les Professeurs G. BISERTE et P. ROUSSEL.

Avec l'aide financière de la Haute
Autorité de la Communauté Européenne du
Charbon et de l'Acier

(Contrat : 62 44 00/3/064)

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : PROPRIETES GENERALES DES NEURAMINIDASES

	Pages
Introduction	1
Historique	2
I REPARTITION	4
II PURIFICATION DES NEURAMINIDASES	
A - Neuraminidases virales	4
B - Neuraminidases bactériennes	8
C - Neuraminidases tissulaires	8
III CONSTANTESPHYSICO-CHIMIQUES DES NEURAMI- NIDASES	10
IV PROPRIETES DES NEURAMINIDASES	
A - pH optimum d'action et affinité pour les substrats.	10
B - Spécificité d'action de l'enzyme	14
C - Action des effecteurs	17
V HETEROGENEITE DES NEURAMINIDASES	19
VI CONCLUSIONS	19

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION PERSONNELLE

PARTIE A : MATERIEL ET METHODES

I	METHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE	
	A - Méthode de SVENNERHOLM au résorcinol	22
	B - Méthode d'AMINOFF à l'acide 2-thio- barbiturique	22^
II	DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	
	A - Activités des neuraminidases	22
	B - Dosage des glycosidases à l'aide d'hétéro- sides de synthèse	24
	C - Dosage de l' α - $\frac{1,2}{5}$ -L-fucosidase	24
	D - Dosage de l'activité protéasique	25
III	PREPARATION DE LA NEURAMINIDASE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE	
	A - Culture de <u>Diplococcus pneumoniae</u>	25
	B - Fractionnement par le sulfate d'ammonium	27
	C - "Batch absorption" sur DEAE-cellulose	27
	D - Chromatographie sur colonne de CM-cellulose	27
IV	PREPARATION DE LA NEURAMINIDASE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	
	A - Culture de <u>Clostridium perfringens</u>	28
	B - Fractionnement au sulfate d'ammonium	28
	C - Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 75	30
	D - Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 200	30

...

V	PREPARATION DES MUCINES RICHES EN ACIDE SIALIQUE	Pages
	A - Mucines de mucoviscidose	30
	B - Mucines intestinales de porc	30
	C - Mucine de <u>Collocalia</u>	30

PARTIE B : RESULTATS

I	PURIFICATION DES NEURAMINIDASES	
	A - Neuraminidase de <u>Diplococcus pneumoniae</u>	35
	B - Neuraminidase de <u>Clostridium perfringens</u>	38
	C - Conclusions	41
II	DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES	41
III	CARACTERES ANTIGENIQUES	
	A - Analyse de l'immunsérum anti-NDP	43
	B - Neutralisation de l'activité de neuraminidase au cours de différentes étapes de fractionnement par l'immunsérum anti-NDP	46
	C - Détermination de la nature de l'antigène	46
	D - Conclusions	48
IV	PROPRIETES ENZYMATIQUES	
	A - pH optimum d'action	48
	B - Action de la température	52
	C - Affinité pour les substrats	52
	D - Action des effecteurs	61
	E - Spécificité de l'enzyme	64

	Pages
V DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES	78
RESUME DES TRAVAUX	84
BIBLIOGRAPHIE	85

- INTRODUCTION -

On connaît le comportement des mucus bronchiques soumis à l'action de différents agents "mucolytiques" (1, 2, 3) : sous l'action de réducteurs tels que la cystéine, d'enzymes protéolytiques tels que la trypsine ou la pronase, ou de glycosidases comme la neuraminidase de Vibrio cholerae, la viscosité des expectorations diminue.

En raison de cette propriété, certains de ces agents "fluidifiants" ont été utilisés en thérapeutique dans le traitement de certaines hypersécrétions bronchiques dues à une bronchite chronique ou à la mucoviscidose. Parmi ces agents, on peut citer : la trypsine, la chymotrypsine, l'alphachymotrypsine, la cystéine et ses dérivés, l'acétylcystéine, la carboxyméthylcystéine (4, 5).

On pourrait de la même façon envisager l'activité thérapeutique de la neuraminidase puisque ses propriétés fluidifiantes ont été démontrées in vitro. Il est cependant nécessaire de disposer de quantités importantes d'enzyme avant d'entreprendre des essais cliniques. La sensibilité des mucines bronchiques au traitement par la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae étant connue (6) nous avons pensé qu'il serait intéressant de préparer préférentiellement cette neuraminidase bactérienne. D'autre part, nous disposons au laboratoire de cultures de Clostridium perfringens d'un type différent de celui des enzymes de Clostridium perfringens commercialisés.

Nous avons donc essayé de mettre au point des protocoles simples appliqués à la purification de ces deux enzymes. Puis nous avons comparé les propriétés enzymatiques des deux neuraminidases obtenues.

PREMIERE PARTIE

PROPRIETES GENERALES DES NEURAMINIDASES

- HISTORIQUE -

HIRST en 1942 (7) puis BURNET et al. (8) en 1946 font l'observation suivante : les virus de l'Influenza sont rapidement adsorbés sur les globules rouges à 4°C puis sont élués spontanément quand la température augmente : les globules ne sont plus alors agglutinés par de nouveaux virus de l'Influenza car il y a eu destruction du site récepteur des globules rouges.

A la même époque, un enzyme ayant ce pouvoir de destruction du site récepteur cellulaire est caractérisé par BURNET et al. (9) dans Clostridium welchii et par MAC CREA (10) dans Vibrio cholerae. En raison de cette propriété, BURNET et STONE (11) appellent cet enzyme "Receptor Destroying Enzyme" ou RDE.

L'hypothèse de la nature osidique des récepteurs cellulaires est due à HIRST (12) qui note la destruction des récepteurs cellulaires traités par le periodate. Puis en 1948, MAC CREA (13) et DE BURG et al. (14) isolent des fractions glycoprotéiniques qui inhibent l'hémagglutination par les virus. Enfin en 1949, GOTTSCHALK et LIND (15) mettent en évidence l'action du RDE sur les "mucoprotéines".

L'étude de cet enzyme connaît alors un essor rapide puisqu'il est caractérisé en 1956 par GOTTSCHALK (16) comme une glycosidase, en 1957 comme une O-glycosidase (17) et en 1958 par KUHN et BROSSMER (18) comme une α -O-glycosidase.

Parallèlement, FAILLARD en 1957 (19) isole l'acide N-Acetyl neuraminique sous forme cristalline comme produit de l'action du RDE sur les "mucoprotéines". C'est alors que GOTTSCHALK (20) appelle neuraminidase (EC. 3. 2. 1. 18) cette α -glycosidase hydrolysant la liaison α -cetosidique de l'acide N Acetyl neuraminique combiné (Figure n°1).

Depuis on a caractérisé, isolé et étudié les propriétés des neuraminidases de nombreux virus, bactéries et tissus animaux.

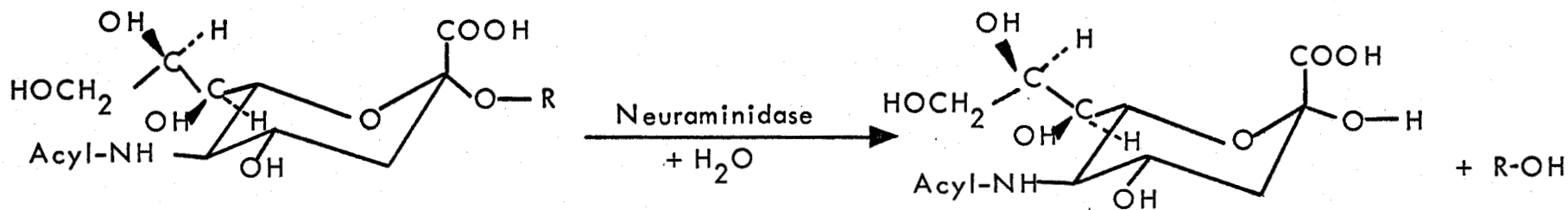


FIGURE N°1

ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR UN DERIVE SIALYLE



I REPARTITION DES NEURAMINIDASES. -

Les neuraminidases sont extrêmement répandues. On les trouve dans les virus, les bactéries, les vertébrés, mais jusqu'à présent on ne les a pas identifiées dans les plantes.

La répartition des neuraminidases dans différents types de virus (myxovirus et paramyxovirus) est rassemblée dans le Tableau I : une étude en microscopie électronique, montre que les neuraminidases virales sont situées dans les spicules de virion (26). La synthèse des neuraminidases virales est sous le contrôle du génome viral, comme l'indiquent les différences dans l'antigénicité de l'enzyme de différents virus propagés sur le même hôte (27).

On a détecté également une activité de neuraminidase dans différentes bactéries (Tableau II) : les neuraminidases bactériennes sont souvent induites comme cela a été démontré pour les enzymes de Vibrio cholerae (42) Diplococcus pneumoniae (43) et Pasteurella multocida (44) induites par la N-acetylmannosamine, l'acide sialique libre ou combiné. Elles peuvent être uniquement intracellulaires ou bien extra cellulaires, présentes dans les filtrats des milieux de culture.

Dans le Tableau III nous avons fait figurer la répartition des neuraminidases chez les animaux : au niveau cellulaire, la neuraminidase est associée aux lysozymes (55). Les différences de propriétés des neuraminidases solubles et des neuraminidases associées aux lysozymes indiquent la présence de deux types différents d'enzymes dans le cerveau (56) et le foie de rat (57).

II PURIFICATION DES NEURAMINIDASES. -

A - Neuraminidases virales :

En 1966, LAVER et KILBOURNE (58) dissocient l'activité hemagglutinante du virus et l'activité de neuraminidase. Ils montrent que ce sont des molécules différentes contrôlées par des sites génétiques différents. LAVER et VALENTINE (59) séparent ces deux activités par traitement des virus de l'Influenza A par le dodecyl sulfate de sodium (S.D.S.). La neuraminidase est alors purifiée par électrophorèse sur acétate de cellulose.

SOURCES	REFERENCES
<p><u>Myxovirus</u> :</p> <p>Influenza A</p> <p>Influenza B</p> <p>Influenza C</p>	<p>SETO, HICKEY et RASMUSSEN (21)</p> <p>SETO, HICKEY et RASMUSSEN (21)</p> <p>APOSTOLOV, FLEWETT et KENDAL (22)</p>
<p><u>Paramyxovirus</u> :</p> <p>Virus de la maladie de Newcastle</p> <p>Virus ourlien</p> <p>Para-influenza 1</p> <p>Para-influenza 2</p> <p>Para-influenza 3</p>	<p>SETO, HICKEY et RASMUSSEN (21)</p> <p>KUHN et BROSSMER (23)</p> <p>NEURATH (24)</p> <p>DRZENIEK, BÖGEL et ROTT(25)</p> <p>DRZENIEK, SETO et ROTT (25)*</p>

TABLEAU 1

REPARTITION DE LA NEURAMINIDASE DANS LES VIRUS



SOURCES	REFERENCES
Vibrio cholerae	ZILLIKEN, WERNER, SILVER et GYÖRGY (28)
Corynebacterium diphtheriae	WARREN et SPEARING (29)
Clostridium perfringens	POPENOE et DREW (30)
Clostridium tertium	HOWE, Mc LENNAN, MANDL et KABAT (31)
Clostridium sordelli	WHITE et MELLANBY (32)
Clostridium septicum	GADALLA, COLLEE et BARR (33)
Diplococcus pneumoniae	HEIMER et MEYER (34)
Streptococcus, souche a	LAURELL (35)
Streptococcus de type sérologique K, M, F ou A	HAYANO et TANAKA (36)
Streptococcus de type sérologique A, B, C, G ou L	HAYANO et TANAKA (36)
Streptococcus E	PINTER, HAYASHI et BAHN (37)
Pasteurella multocida	SCHARMANN, DRZENIEK et BLOBEL (38)
Pasteurella haemolytica	SCHARMANN, DRZENIEK et BLOBEL (38)
Pasteurella pseudotuberculosis	LAURELL (39)
Lactobacillus bifidus (souche E)	SHILO (40)
Pseudomonas fluorescens	SHILO (40)
Pseudomonas stuzeri	SHILO (40)
Pseudomonas aeruginosa	SHILO (40)
Streptomyces albus	MYHILL et COOK (41)



TABLEAU II

REPARTITION DE LA NEURAMINIDASE DANS LES BACTERIES

<u>SOURCES</u>		<u>REFERENCES</u>
- Plasma	: Homme	WARREN et SPEARING (45)
	: Boeuf	WARREN et SPEARING (45)
- Plaquettes et érythrocytes	: Boeuf	GIELEN, ETZRODT et UHLENBRUCK (46)
- Glandes mammaires	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
- Foie	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
- Intestin grêle	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
- Mucus intestinal	: Homme	GIELEN et HARPPRECHT (48)
- Testicules	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
- Rate	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
- Rein	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (48)
	: Porc	TUPPY et PALESE (49)
- Cerveau	: Rat	CARUBELLI, TRUCO et CAPUTTO (47)
	: Homme	MORGAN et LAURELL (50)
	: Cobaye	MORGAN et LAURELL (50)
	: Boeuf	MORGAN et LAURELL (50)
	: Lapin	TETTAMENTI, PRETI, DI DONATO et MARCONI (51)
	: Souris	KELLY et GREIFF(52)
	: Porc	ZAMBOTTI, TETTAMANTI et BERRA (53)
: Veau	LEIBOVITZ et GATT (54)	

TABLEAU III

REPARTITION DES NEURAMINIDASES CHEZ LES VERTEBRES



Il est possible aussi de libérer la neuraminidase des virus de l'Influenza par protéolyse enzymatique à l'aide de la trypsine (60) de la chymotrypsine (61) de la pronase (62) et de la caséinase (63). La neuraminidase du virus de la maladie de Newcastle est obtenue par traitement des virus par le butanol et les enzymes protéolytiques suivi d'une chromatographie sur colonne de Sephadex G 75 ou G 200 (64).

B - Les neuraminidases bactériennes :

Les neuraminidases bactériennes sont purifiées facilement quand l'enzyme n'est pas un composant structural de la cellule bactérienne. Ainsi, la neuraminidase présente dans le filtrat de culture de Vibrio cholerae est obtenue sous forme cristallisée. La principale étape de purification est une adsorption spécifique de l'enzyme sur des globules rouges (65).

Les méthodes de fractionnement par le sulfate d'ammonium sont fréquemment utilisées, associées à la chromatographie sur échangeurs d'ions (66, 67) ou à la chromatographie de gel filtration (68, 69, 70).

Récemment, une méthode de purification des neuraminidases de Vibrio cholerae, Clostridium perfringens et du virus de l'Influenza par chromatographie d'affinité a été mise au point par CUATRECASAS et ILLIANO (71). Cette méthode fait appel à une adsorption sélective des neuraminidases sur un inhibiteur spécifique de l'enzyme, l'acide N-(p.aminophenyl)oxamique, lié à un tripeptide gly-gly-tyr, lui-même fixé sur l'agarose (Figure n°2). L'enzyme est désorbé par un tampon NaHCO_3 0,1 M de pH = 9,1. La simplicité et l'efficacité de ce procédé en ont fait une méthode d'avenir.

C - Neuraminidases tissulaires :

Elles sont généralement extraites par des méthodes faisant appel au fractionnement cellulaire. Ainsi la neuraminidase lysosomale des glandes mammaires de rat est obtenue par centrifugation différentielle en gradient de sucrose (72).

Agarose

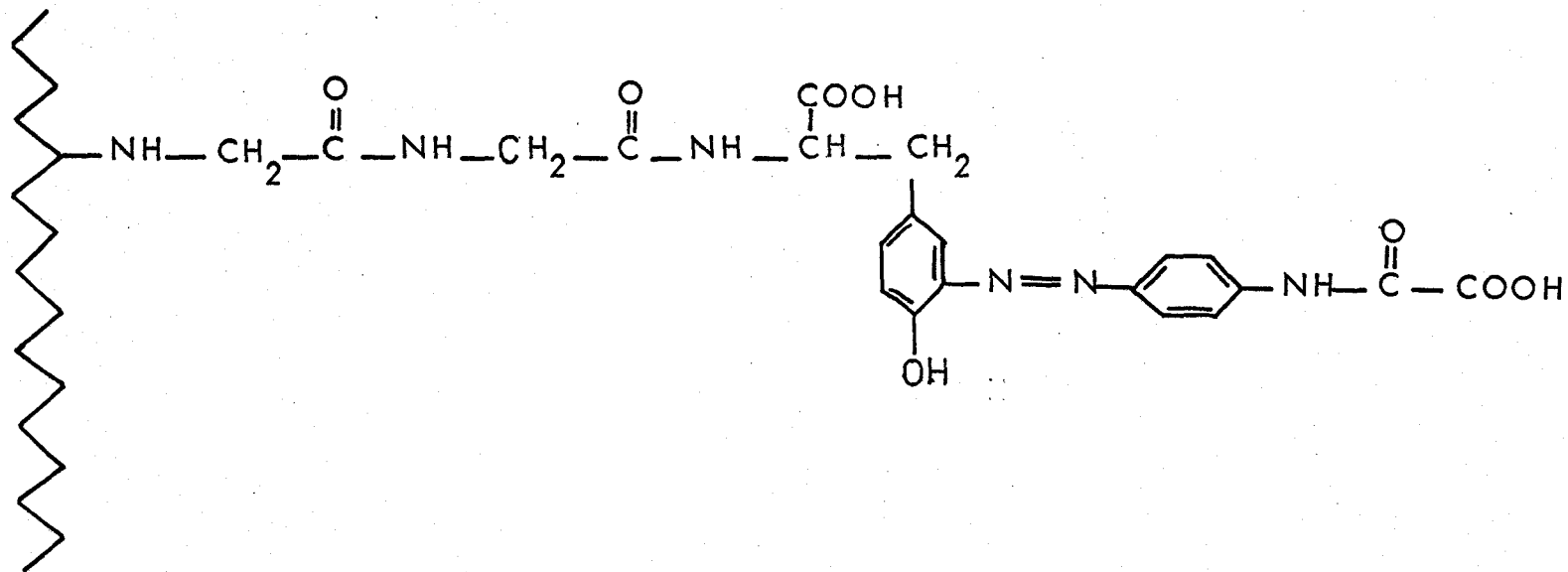


Figure n° 2

AFFINITE DE LA NEURAMINIDASE POUR L'ACIDE N-(P. AMINOPHENYL) OXAMIQUE

LIE A L'AGAROSE-Gly - Gly - Tyr.(CUATRE CASAS) (71)



III CONSTANTES PHYSICOCHEMIQUES DES NEURAMINIDASES. -

Nous avons rassemblé dans le Tableau IV, les valeurs de constantes de sédimentation et de poids moléculaires trouvées pour des neuraminidases d'origines diverses. Il est à remarquer que généralement les neuraminidases bactériennes ont une constante de sédimentation inférieure à celle des neuraminidases virales.

IV PROPRIETES DES NEURAMINIDASES. -

A - pH optimum d'action et affinité pour les substrats :

Les pH optimum d'action de quelques neuraminidases virales, bactériennes et tissulaires sont rassemblés dans le Tableau V. Le pH optimum des neuraminidases varie entre pH = 3,5 et pH = 7,0. Il dépend du substrat utilisé et du degré de purification de l'enzyme (97).

A l'exception d'un pH optimum très bas de 3,5 pour la neuraminidase de Streptomyces albus, toutes les autres neuraminidases bactériennes ont un pH optimum voisin de 4,5 - 6,0. Elles agissent à des pH plus acides que les neuraminidases virales.

Les neuraminidases de vertébrés ont un pH optimum compris entre 4 et 5.

Les constantes de Michaelis vis à vis de divers substrats sont également reportées dans le Tableau V. Elles varient selon la nature du substrat hydrolysé : par exemple, la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae présente une affinité plus grande pour l'a₁ glycoprotéine acide que pour le neuraminyl lactose, la constante de Michaelis peut varier de $2 \cdot 10^{-4}$ à $3 \cdot 10^{-3}$ M selon l'origine de la neuraminidase utilisée.

Sources	Constante de sédimentation	Poids moléculaire	Références
Virus de l'Influenza A	8,0 - 10 S	240.000	KENDAL, BIDDLE et BELYAVIN(73)
Virus de l'Influenza B	9,0 S	200.000	WRIGLEY, SKEHEL, CHARLWOOD et BRAND (74)
Virus de la maladie de Newcastle	7,8 S		DRZENIEK (75)
Vibrio cholerae	5,3 - 5,5 S	90.000	PYE et CURTAIN (76) SETO, HICKEY et RASMUSSEN(77)
Clostridium perfringens	4,6 S	56.000	BALKE et DRZENIEK (78)
Streptomyces albus		40-45.000	MYHILL et COOK (79)
Diplococcus pneumoniae		70.000	STAHL et O'TOOLE (80)

TABLEAU IV

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE QUELQUES NEURAMINIDASES



Sources	Substrat hydrolysé	pH optimum	Constante de Michaelis	Références
<u>Virus :</u>				
Influenza A/PR8	neuraminyl - lactose	7,0	1×10^{-3}	RAFELSON, SCHNEIR et WILSON (81)
Influenza A ₂ /JAP/305/57	neuraminyl - lactose	6,5	2×10^{-4}	SCHNEIR et RAFELSON (82)
Influenza B/Lee	neuraminyl - lactose	6,8	2×10^{-4}	MATHIEU, COLOBERT, O'CREACH et FONTANGES (83)
Influenza WSN	neuraminyl - lactose	6,0	3×10^{-3}	GREGORIADES (84)
Peste aviaire	neuraminyl - lactose	6,0	4×10^{-4}	DRZENIEK, SETO et ROTT (85)
maladie de Newcastle	neuraminyl - lactose	6,0	5×10^{-4}	DRZENIEK (86)
<u>Bactéries :</u>				
Vibrio cholerae	neuraminyl - lactose	5,6	1×10^{-3}	ADA, FRENCH et LIND (87)
Clostridium perfringens	neuraminyl - lactose	4,5	2×10^{-3}	CASSIDY, JOURDIAN et ROSEMAN (88)
Diplococcus pneumoniae	neuraminyl - lactose	6,5	2×10^{-3}	HUGHES et JEANLOZ (89)
	orosomucoïde	6,5	$3,5 \times 10^{-4}$	
Streptococcus groupe K	neuraminyl - lactose	5,5	9×10^{-4}	HAYANO et TANAKA (90)
Pasteurella multocida	neuraminyl - lactose	6,0	2×10^{-4}	SCHARMANN, DRZENIEK et BLOBEL (91)
Streptomyces albus	neuraminyl - lactose	3,5	$4,5 \times 10^{-4}$	MYHILL et COOK (92)

Tableau V

VARIATIONS DU pH OPTIMUM D'ACTION ET DE LA CONSTANTE
DE MICHAELIS DES NEURAMINIDASES



Sources	Substrat hydrolysé	pH optimum	Constante de Michaelis	Références
<u>Tissus :</u>				
Cerveau de Lapin	gangliosides GD1a	4,1	$4,8 \cdot 10^{-6}$	TETTAMENTI, PRETI, DI DONATO et MARCONI (93)
Leucocytes humains	neuraminyl - lactose	4,0	$5,6 \cdot 10^{-4}$	YEH, TULSIANI et CARUBELLI (94)
Glandes mammaires de rat :				
-enzyme soluble	neuraminyl - lactose	5,8	$1,75 \cdot 10^{-3}$	TULSIANI et CARUBELLI (95)
-enzyme lysosomal	neuraminyl - lactose	4,4	$5,5 \cdot 10^{-4}$	TULSIANI et CARUBELLI (95)
Foie et rein de rat	neuraminyl - lactose	4,4	$2 \cdot 10^{-3}$	MAHADEVAN, NDUAGUBA et TAPPEL (96)
	ovomucofide de dindon	4,0		

Tableau VI

VARIATIONS DU pH OPTIMUM D'ACTION ET DE LA CONSTANTE

DE MICHAELIS DES NEURAMINIDASES



B - Spécificité d'action de l'enzyme :

1° Influence de l'anométrie de l'atome de carbone n°2 de l'acide N-acétyl neuraminique :

MEINDL et TUPPY (98, 99) ont synthétisé les cétosides α et β de l'acide N-acétyl neuraminique et ont montré que seul l'acide N-acétyl neuraminique lié sous la forme α est hydrolysé par les neuraminidases virales et de Vibrio cholerae.

Ainsi le cytidine 5' monophospho-acide-N-acétyl neuraminique (CMP-NANA) dans lequel l'atome de carbone n°2 de l'acide N-acétyl neuraminique est en configuration β (100) n'est pas sensible à l'action des neuraminidases.

2° Influence du type de la liaison glycosidique :

Jusqu'à présent, 4 types de liaisons différentes de l'acide neuraminique sont connus : une liaison $\xrightarrow{2,3}$ dans le N-acétyl neuraminosyl α $\xrightarrow{2,3}$ lactose, une liaison $\xrightarrow{2,6}$ dans le N acétyl neuraminosyl α $\xrightarrow{2,6}$ lactose, une liaison $\xrightarrow{2,8}$ dans le disialyllactose N-acétyl neuraminosyl - α $\xrightarrow{2,8}$ N acétyl neuraminosyl α $\xrightarrow{2,3}$ lactose et dans certains gangliosides et une liaison $\xrightarrow{2,4}$ qu'on rencontre dans l' α_1 -glycoprotéine acide ainsi que les autres types de liaison.

DRZENIEK (101) a montré que la neuraminidase de Vibrio cholerae hydrolyse les liaisons $\xrightarrow{2,6}$ et $\xrightarrow{2,3}$ alors que les neuraminidases du virus de la maladie de Newcastle ("Newcastle Disease Virus" : NDV) du virus de la Peste aviaire ("Fool Plague Virus" FPV) et de l'Influenza hydrolysent les liaisons $\xrightarrow{2,6}$ de l'acide sialique beaucoup plus lentement que les liaisons $\xrightarrow{2,3}$.

D'autre part, la neuraminidase NDV n'hydrolyse pas la liaison du disialyllactose contrairement à la neuraminidase FPV.

La neuraminidase de Clostridium perfringens hydrolyse les liaisons $\xrightarrow{2,3}$ et $\xrightarrow{2,6}$ puisqu'elle hydrolyse totalement le neuraminyl-lactose de lait de vache formé essentiellement du 3' neuraminyl-lactose et celui du lait de femme qui contient les 2 isomères 3' et 6' (102).

3°) Influence de la substitution de l'acide neuraminique :

- α - N-substitution

Les neuraminidases de Vibrio cholerae et du virus de l'Influenza hydrolysent plus lentement les benzyl α cetosides des acides N glycolyl et N propionyl neuraminiques que ceux des acides N acétyl neuraminique. Mais quand le groupement substituant est très important tels les groupements butyryl-, benzoyl-, ou benzyloxy- carbonyl-, les acides neuraminiques sont résistants à l'action des neuraminidases (103-104).

- β - O-substitution

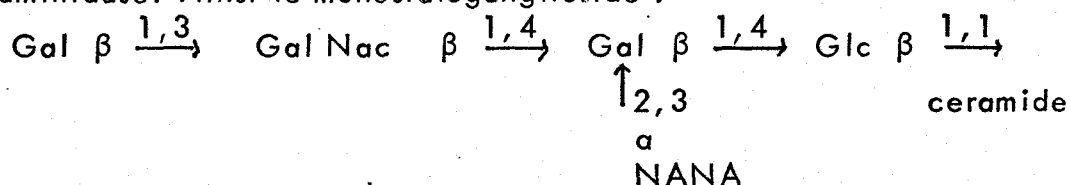
Dans les glycoprotéines, les groupements hydroxyl des carbones 4, 7, 8 de l'acide neuraminique sont souvent substitués par des groupements Acetyl, glycolyl ou methyl (Tableau VII).

La libération des acides O-acétyl neuraminiques est retardée par la présence dans la même molécule d'acide N-acétyl et N-glycolyl neuraminique qui sont préférentiellement hydrolysés. Après hydrolyse des acides N-acyl neuraminiques, les acides O-acétyl neuraminiques sont facilement libérés de la glycoprotéine (120).

D'autre part, SCHAUER et FAILLARD (121) caractérisent dans la glycoprotéine sous maxillaire du cheval, outre l'acide N,O₄ diacetyl neuraminique, l'acide N,O_{4,7} (ou 8 ou 9) triacetyl neuraminique. Ces acides ne sont pas libérés par les neuraminidases de Vibrio cholerae et de Clostridium perfringens, à cause de l'encombrement stérique provoqué par la présence du substituant sur la carbone 4 ; après élimination des groupements acétyl par hydrolyse alcaline douce, l'acide N-acétyl neuraminique est libéré par les deux neuraminidases bactériennes (125)

4°) Influence de l'environnement de la liaison :

Parfois un encombrement stérique gêne l'action de la neuraminidase. Ainsi le monosialoganglioside :



est résistant à la neuraminidase de Vibrio cholerae (123) à cause de l'encombrement provoqué par le disaccharide lié au carbone 4 du galactose.

ACIDES NEURAMINIQUES	SOURCES
N-acétyl-	largement répandu dans le règne animal.
N-glycolyl-	largement répandu dans le règne animal
N, O ₄ -diacétyl	glande sous maxillaire de cheval (105) mucine de <u>Collocalia</u> (106-107)
N, O ₇ -diacétyl	glande sous maxillaire de boeuf (108)
N, O ₈ -diacétyl-	glande sous maxillaire de boeuf cerveau de poisson (109-110)
N, O ₇₋₈ -triacétyl	glande sous maxillaire de boeuf (111)
N, O ₇ -tétracétyl	glande sous maxillaire de boeuf (112)
N-glycolyl-O ₄ -acétyl	membranes des erythrocytes de cheval sérum et glycoprotéine de la glande sous-maxillaire de cheval (113-114)
N-glycolyl-O ₈ -acétyl	glande sous maxillaire de boeuf (115)
N-acétyl-O ₄ -glycolyl	glande sous maxillaire de cheval (116)
N-glycolyl-O ₈ -méthyl	étoile de mer <u>Asterias Forbesi</u> (117)
N-(O-acétylglycolyl)-4-méthyl- 4,9-dideoxy-	membrane d'oeuf d'oursin (118)

Tableau VII

REPARTITION DES DIFFERENTS TYPES D'ACIDESIALIQUE

(d'après SCHAUER) (119)



(115) (116) : Résultats non publiés.

C- Action des effecteurs :

1°) Action des différents ions :

Les cations bivalents ont un effet variable selon l'origine de la neuraminidase (Tableau VIII): l'ion Mg^{++} est sans effet sur les neuraminidases étudiées ici, alors que l'ion Ca^{++} à la concentration de 2 mM diminue l'activité de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae de 20 p. 100. On observe également une inhibition de 90 p. 100 de l'activité de l'enzyme des glandes mammaires de rat par Zn^{++} . L'ion Mn^{++} est légèrement activateur de l'enzyme de Streptomyces albus et à la concentration de 2 mM diminue de 40 p. 100 l'activité de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae. L'ion Hg^{++} inhibe totalement l'enzyme de Diplococcus pneumoniae et des glandes mammaires de rat et partiellement la neuraminidase de leucocytes humains.

L'addition d'EDTA entraîne une inhibition de 50 p. 100 de l'activité des neuraminidases de virus Influenza (129) et de Corynebacterium diphtheriae (130). Les enzymes de Diplococcus pneumoniae et de Streptomyces albus sont légèrement inhibés par l'EDTA.

2°) Action des dérivés de l'acide sialique :

- L'acide N-acétyl neuraminique inhibe de manière compétitive les neuraminidases de Vibrio cholerae (131) et de l'Influenza (132) mais l'esterification du groupement carboxylique de l'acide N-acétyl neuraminique, entraîne la disparition du pouvoir inhibiteur (133).

- De même, les composés ayant un acide N-acétyl neuraminique lié en $\alpha \xrightarrow{2,6}$ inhibent de façon compétitive la neuraminidase du virus de la maladie de Newcastle.

- MEINDL et TUPPY (134) ont synthétisé un 2-deoxy-2,3 dehydro acide sialique qui inhibe compétitivement la neuraminidase de Vibrio cholerae ($K_i = 1 \times 10^{-5}$ M) et du virus de l'Influenza ($K_i = 5,3 \times 10^{-6}$ M). Il faut remarquer que les différents types de virus de l'Influenza ne sont pas inhibés au même degré (135).

Nature des ions	Streptomyces albus (1)		Diplococcus pneumoniae (2)		Leucocytes humains (3)		Glandes mammaires de rat (4)		Foie et rein de rat (5)	
	concentration des ions mM	% d'activité résiduelle	concentration des ions mM	% d'activité résiduelle	concentration des ions mM	% d'activité résiduelle	concentration des ions mM	% d'activité résiduelle	concentration des ions mM	% d'activité résiduelle
Mg ⁺⁺	10	94	2	100	1	100		100		N.D.
Ca ⁺⁺	10	90	2	80	1	100		90	12,5	90
Zn ⁺⁺		N.D. [⊗]		N.D.	1	100		10	1	100
Mn ⁺⁺	10	103	2	61		N.D.		N.D.	1	100
Co ⁺⁺	10	97	2	N.D.		N.D.		N.D.	1	70
Hg ⁺⁺		N.D.		0	1	75		5		N.D.
EDTA	10	84	20	87		N.D.		N.D.	1	100

(1) MYHILL et COOK (124) ⊗ non déterminé (N.D.)
 (2) HUGHES et JEANLOZ (125)
 (3) YEH, TULSIANI et CARUBELLI (126)
 (4) TULSIANI et CARUBELLI (127)
 (5) MAHADEVAN, NDUAGUBA et TAPPEL (128)



TABLEAU VIII

ACTION DE DIFFERENTS IONS SUR LES NEURAMINIDASES

V HETEROGENEITE DES NEURAMINIDASES. -

Des neuraminidases de même origine peuvent avoir la même activité, la même spécificité et présenter différentes formes caractérisées par des méthodes d'électrophorèse ou d'isoélectrofocalisation :

Ainsi, la neuraminidase isolée du virus de l'Influenza A₂/Aichi/68 et B/Mass/66 se montre hétérogène en isoélectrofocalisation (136).

De même, WEBSTER (137) observe en électrophorèse en gel de polyacrylamide deux sous unités de poids moléculaire identique dans des préparations purifiées de neuraminidase du virus de l'Influenza A₂/R₁/5⁺.

L'existence d'isoenzymes de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae a été mise en évidence par TANENBAUM et al. (138, 139):

En effet, la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est séparée par chromatographie d'échange ionique en 4 groupes d'isoenzymes dont chacun est hétérogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide.

VI CONCLUSIONS. -

Les neuraminidases connues actuellement présentent selon leur origine une grande diversité dans leurs propriétés : on observe ainsi des variations importantes des masses moléculaires, des pH optimum d'action et des affinités très différentes pour un même substrat.

Nous avons remarqué également un nombre considérable de méthodes de préparation généralement complexes, dues bien souvent à la présence simultanée d'autres glycosidases aux propriétés physicochimiques peu différentes.

D'autre part, les résultats obtenus sur la spécificité d'action des neuraminidases isolées sont encore peu nombreux, tous les enzymes ayant été généralement étudiés à l'aide de substrats naturels dont la structure n'est pas toujours connue.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION PERSONNELLE

PARTIE A :

MATERIEL ET METHODES

Nous exposerons successivement le principe des méthodes de caractérisation des différentes activités enzymatiques rencontrées, les protocoles employés pour la préparation des deux neuraminidases et la préparation de substrats riches en acide sialique.

I METHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE. -

Nous nous bornerons à donner le principe de ces méthodes, les techniques seront décrites p. T₂.

A - Méthode de SVENNERHOLM (140) au resorcinol :

Les acides sialiques, sous l'action du resorcinol, en milieu chlorhydrique et en présence de sels cuivriques ou ferriques, donnent une coloration bleu violacé extractible par l'alcool isoamylique. Le mécanisme de la réaction n'est pas encore connu.

Dosés par cette méthode, les différents acides sialiques possèdent des absorbances molaires variables ; il est donc important de préciser la composition de la solution témoin lors de l'expression des résultats.

B - Méthode d'AMINOFF (141) à l'acide 2-thiobarbiturique :

Les acides neuraminiques donnent par oxydation périodique de l'acide formyl pyruvique (Figure n°3) qui se combine avec l'acide 2-thiobarbiturique pour donner une coloration rose.

Les différents acides sialiques dosés par la méthode d'AMINOFF ont des coefficients d'extinction molaire variables. Il faut donc préciser la composition de la solution témoin lors de l'expression des résultats. Dans cette méthode les oses ne produisent pas de coloration appréciable ; c'est pourquoi elle semble préférable à la méthode de SVENNERHOLM (142) au resorcinol, cette dernière permettant de doser à la fois l'acide sialique libre et l'acide sialique combiné.

II DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES. -

A - Activité des neuraminidases :

1°) Estimation de la neuraminidase purifiée au cours des différentes étapes de purification :

L'activité de neuraminidase est estimée par hydrolyse

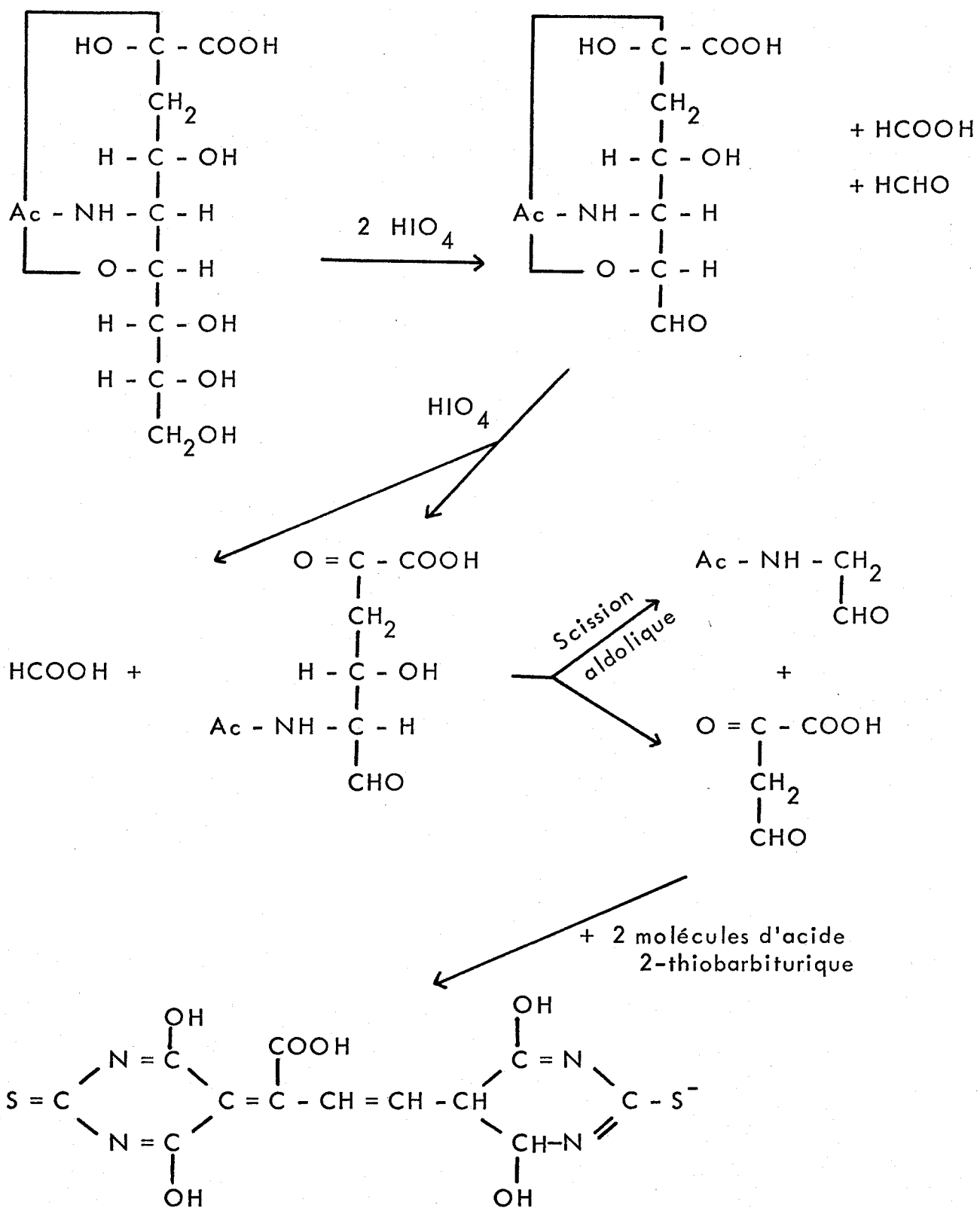


FIGURE N° 3

OXYDATION DE L'ACIDE N-ACETYL NEURAMINIQUE .
FORMATION DU CHROMOGENE ET DU CHROMOPHORE
DE LA REACTION A L'ACIDE 2-THIOBARBITURIQUE

(H. TUPPY et A. GOTTSCHALK) (143)



de glycopeptides bronchiques obtenus à partir d'un mélange de mucus bronchiques de différents sujets, réalisée dans les conditions décrites p. T₆, et dosage de l'acide sialique libéré.

Les résultats sont exprimés en unités correspondant au nombre de nanomoles d'acide N-acétyl neuraminique libérées en une minute à 37°C.

2°) Détermination de l'activité des neuraminidases purifiées :

Nous avons estimé qu'il était préférable de déterminer l'activité des neuraminidases purifiées sur un substrat dont la teneur en acide sialique est moins sujette à des variations et c'est pourquoi nous avons choisi l'orosomucoïde.

L'hydrolyse de l'orosomucoïde est effectuée dans les conditions décrites p. T₈.

L'expression des résultats se fait comme précédemment.

B - Dosage des glycosidases à l'aide d'hétérosides de synthèse :

La β -galactosidase et la β N-acétyl glucosaminidase ont été recherchées en utilisant des substrats synthétiques : les paranitrophényl-glycosides (CALBIOCHEM) correspondant aux activités recherchées selon la méthode décrite par FINDLAY et al. (144).

L'hydrolyse de ces substrats est effectuée dans les conditions décrites p. T₈.

Les activités enzymatiques sont exprimées en unités correspondant au nombre de nanomoles de paranitrophenol libérées par minute à 37°C.

C - Dosage de l' α $\frac{1,2}{\rightarrow}$ L-fucosidase :

AMINOFF (145) a décrit la présence d'une α $\frac{1,2}{\rightarrow}$ L-fucosidase dans les cultures de Clostridium perfringens qui n'hydrolyse pas les hétérosides de synthèse en raison de son étroite spécificité.

En conséquence, l'activité de l' α $\frac{1,2}{\rightarrow}$ L-fucosidase est estimée par hydrolyse de glycopeptides de liquide de kyste ovarien à activité de groupe sanguin H⁺ réalisée dans les conditions décrites p. T₁₀ et dosage du fucose libéré.

L'activité enzymatique est exprimée en unités correspondant au nombre de nanomoles de fucoose libéré en une minute à 37°C.

D - Dosage de l'activité protéasique :

L'activité protéasique est déterminée par une hydrolyse d'hémoglobine dénaturée selon la méthode d'ANSON (146), avec une gamme de tyrosine.

L'unité protéolytique est la quantité d'enzyme qui, incubée pendant 10 minutes à 25°C avec de l'hémoglobine dénaturée, libère l'équivalent de 1 µg de tyrosine par mg de protéines.

III PREPARATION DE LA NEURAMINIDASE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE.

Le protocole de purification de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae décrit par HUGHES et JEANLOZ (147) est rappelé dans la Figure n°5.

Le protocole de préparation que nous avons suivi est voisin de celui décrit par ces auteurs.

A - Culture de Diplococcus pneumoniae :

La culture de Diplococcus pneumoniae, type 1 (ATCC 6301) est effectuée dans les conditions les plus favorables à une production optimale de neuraminidase et que nous avons précédemment déterminées (148). Le germe estensemencé sur un milieu de culture dont la composition est la suivante :

- NaCl	5 p. 1000
- peptone SC (DIFCO)	1 p. 100
- extrait de levure	3 p. 1000
- phosphate bipotassique	1 p. 1000
- extrait de viande (DIFCO)	3 p. 1000

3 litres de milieu sontensemencés, additionnés de broyat de cerveau de mouton et ajustés à pH = 8,0 puis sont incubés à 37°C pendant 30 heures sans agitation en aérobie.

La culture de Diplococcus pneumoniae est alors centrifugée à 800 g pendant 5 heures pour éliminer les cellules bactériennes.

Toutes les étapes de purification sont effectuées à + 4°C.

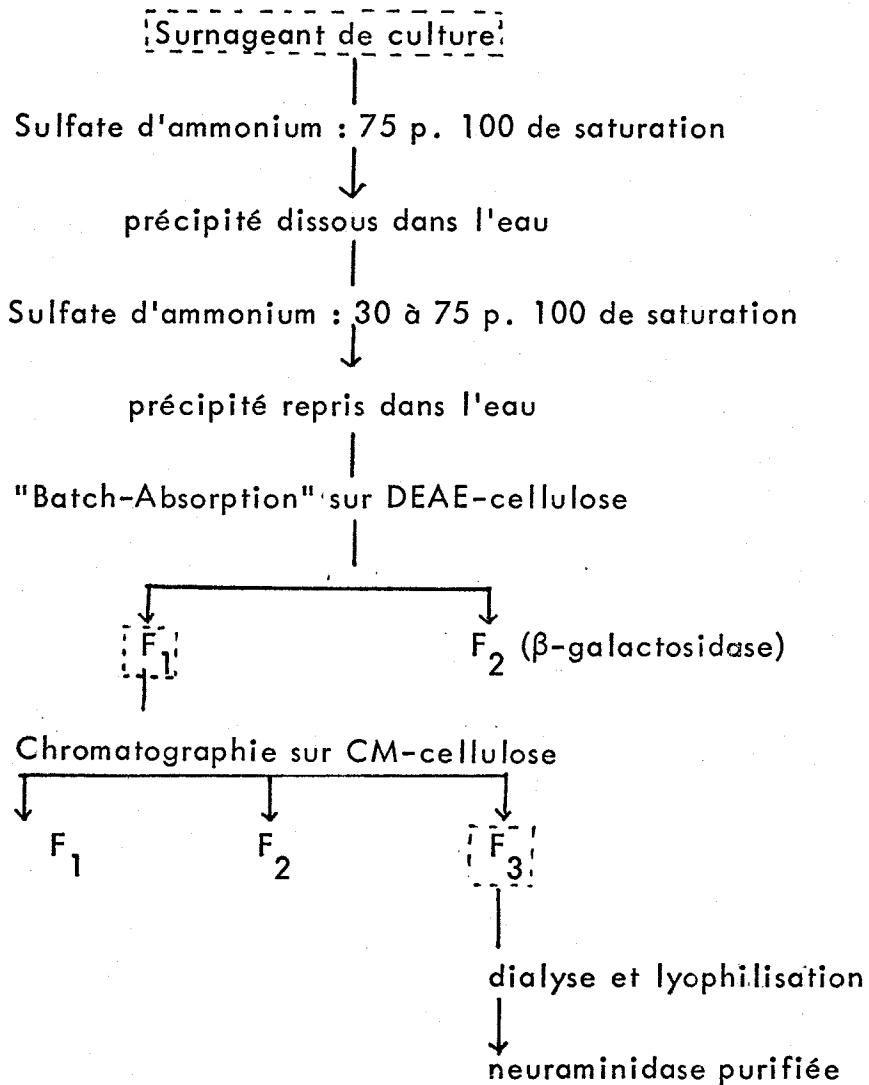


Figure n°5

PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE

(d'après HUGHES et JEANLOZ) (147)



B - Fractionnement par le sulfate d'ammonium :

2800 ml de surnageant de culture obtenus après centrifugation sont alors précipités par le sulfate d'ammonium à 75 p. 100 de saturation pendant 20 heures à +4°C. Le précipité obtenu est centrifugé pendant 40 minutes à 8 000 g puis repris par un volume minimum d'eau distillée et dialysé pendant 3 jours contre de l'eau. On pratique alors une seconde précipitation au sulfate d'ammonium. La concentration finale en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est amenée à 30 p. 100 de saturation. Après 15 heures de contact à + 4°C, le précipité obtenu est centrifugé et éliminé. La concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est alors amenée à 70 p. 100 de saturation et le mélange est abandonné 15 heures à + 4°C. Après centrifugation, on obtient ainsi la fraction précipitant entre 30 et 70 p. 100 de saturation au sulfate d'ammonium qui est reprise par l'eau, dialysée et lyophilisée. Nous obtenons dans ces conditions 2,2 g de préparation brute des exoenzymes de Diplococcus pneumoniae type I.

C - "Batch absorption" sur DEAE-cellulose :

La purification est alors poursuivie par batch absorption sur DEAE-cellulose.

8 g de la préparation brute d'exoenzymes de Diplococcus pneumoniae contenant 7 g de protéines dosées par la méthode de LOWRY (150) avec une gamme de sérum albumine bovine sont mis en solution dans 700 ml de tampon phosphate de Na 0,01 M ajusté à pH 7,6.

Cette solution est agitée avec 60 g de DEAE-cellulose (WHATMAN DE 11) équilibrée dans ce même tampon pendant 30 minutes. On recueille par filtration sur verre fritté n°3 une fraction F_1 non fixée sur la DEAE-cellulose. Celle-ci est alors éluée par 700 ml de tampon phosphate de Na 0,05 M ajusté à pH = 7,6 puis par 700 ml de tampon phosphate de Na 0,1 M ajusté à pH = 6,8 ce qui permet d'isoler les fractions F_2 et F_3 .

D - Chromatographie sur colonne de Carboxy Méthylcellulose :

La purification est achevée par chromatographie d'échange ionique sur colonne de CM-cellulose.

300 mg de la fraction F_2 sont déposés sur une colonne (2,5 x 35 cm) de CM-cellulose (WHATMAN CM 32) équilibrée en tampon phosphate-citrate 0,04 M de pH 6,5 (1 litre d'une solution de phosphate de sodium disodique 0,04 M

est ajusté à pH = 6,5 par une solution d'acide citrique 0,04 M). La colonne est lavée par 300 ml du même tampon et l'élution est poursuivie par un gradient linéaire de molarité croissante en phosphate-citrate 0,04 M à 0,3 M. La neuraminidase est déterminée par hydrolyse des glycopeptides bronchiques et dosage de l'acide sialique libéré. Les fractions riches en enzymes sont rassemblées et concentrées par filtration sur membrane non cellulosique retenant les poids moléculaires supérieurs à 1 000 (AMICON U M 2).

La neuraminidase concentrée est conservée congelée à - 20°C. Les différentes étapes de fractionnement sont rassemblées dans la Figure n°6.

IV PREPARATION DE LA NEURAMINIDASE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS. -

A - Culture de Clostridium perfringens : *

La culture de Clostridium perfringens type 33-4 A est effectuée dans les conditions préconisées par AMINOFF (151) pour la préparation de l' α 1,2-L-fucosidase.

Clostridium perfringens estensemencé sur un milieu de culture dont la composition est la suivante :

- poudre de milieu Todd-Hewitt	35 g
- $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	4,72 g
- H_2O distillée	q.s.p. 1 litre.

Le milieuensemencé est incubé pendant 72 heures à 37°C sans agitation et en anaérobiose.

La culture de Clostridium perfringens est débarassée des cellules bactériennes par centrifugation à 16 000 g pendant 20 minutes à 4°C.

Le fractionnement est alors effectué à + 4°C.

B - Fractionnement au sulfate d'ammonium :

Un litre de surnageant de culture obtenu après centrifugation est précipité au sulfate d'ammonium à 80 p. 100 de saturation pendant une nuit à + 4°C. Le précipité obtenu est centrifugé pendant 30 minutes à 12 000 g/minute puis repris dans 50 cc de tampon phosphate de K 0,01 M, KCl 0,025 M ajusté à pH = 7,0. Il constitue la fraction brute des exoenzymes de Clostridium perfringens type 33-4 A.

* Nous remercions Monsieur le Professeur MARTIN qui a permis d'obtenir ces cultures.

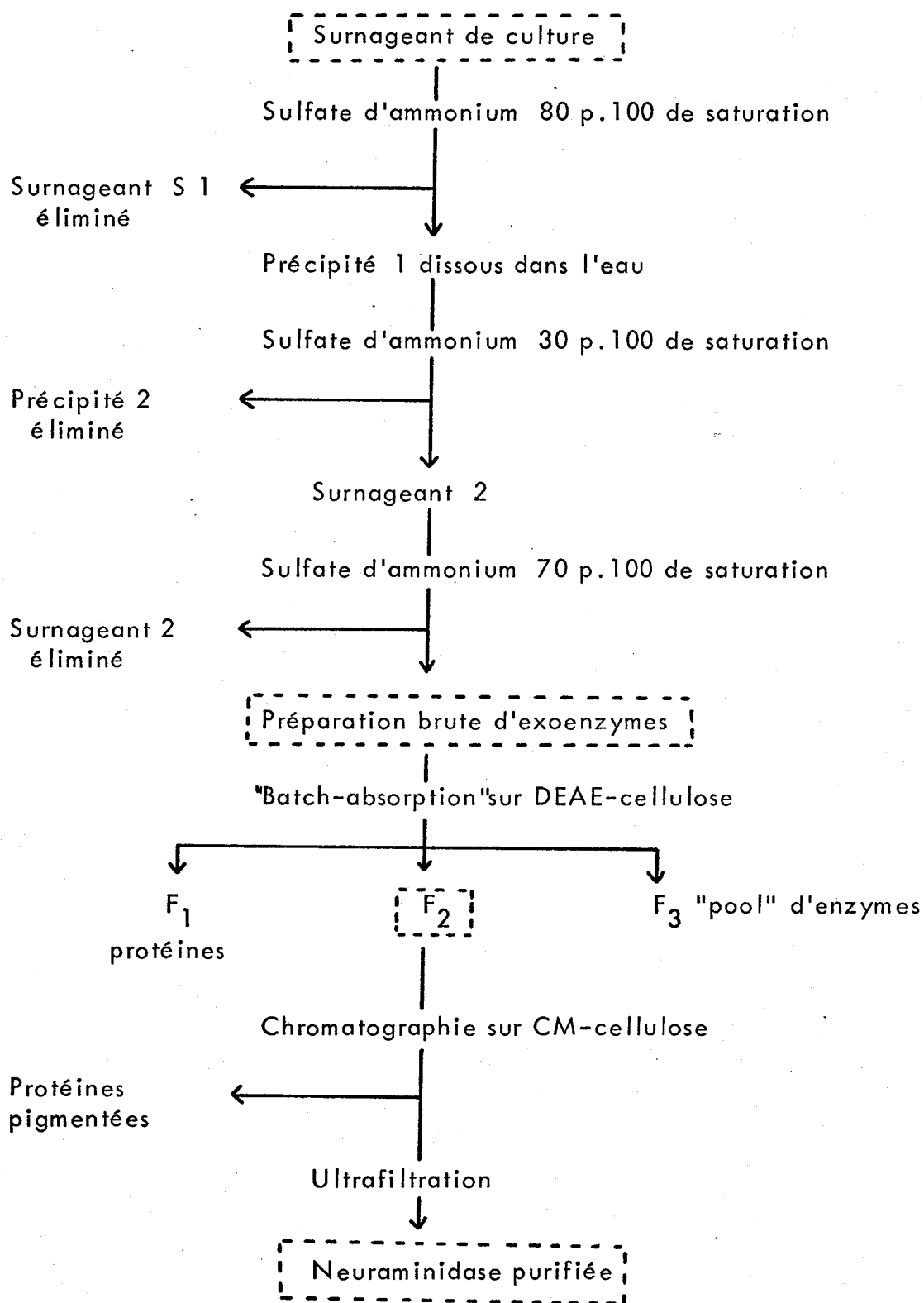


FIGURE N° 6

FRACTIONNEMENT DE LA NEURAMINIDASE
EXTRAITE D'UNE CULTURE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE
(Modification du protocole de C. HUGHES et R.W. JEANLOZ) (152)



La purification est alors poursuivie par deux temps successifs de chromatographie de gel filtration.

C- Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 75 :

8 ml de la préparation brute sont déposés sur une colonne de Sephadex G 75 (3 x 75 cm) équilibrée en tampon phosphate de K 0,01 M, KCl 0,025 M ajusté à pH = 7,0. L'éluion est poursuivie dans ce même tampon. Les fractions riches en neuraminidase sont rassemblées et concentrées à 20 cc sur membrane (AMICON U M 2).

D- Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 200 :

10 ml de la fraction obtenue à l'étape précédente sont déposés sur une colonne de Sephadex G 200 (3 x 100 cm) équilibrée en tampon Tris 0,01 M NaCl 0,05 M, dithiothreitol 0,1 mM de pH = 8,0. L'éluion est réalisée dans le même tampon. Les fractions riches en neuraminidase sont concentrées à 30 cc sur membrane AMICON UM 2. La neuraminidase concentrée est conservée congelée.

Les différentes étapes de purification de la neuraminidase de Clostridium perfringens sont rassemblées dans la Figure n°7.

V PREPARATION DES MUCINES RICHES EN ACIDE SIALIQUE. -

A - Mucines de mucoviscidose :

Elles ont été préparées selon le protocole décrit par ROUSSEL et al. (153).

B - Mucines intestinales de porc :

Elles ont été préparées selon le protocole décrit par DEGAND et al. (154).

C - Mucine de Collocalia :

La mucine de Collocalia, ainsi appelée par HOWE et al. (155) est extraite de la substance de colmatage des nids sécrétée par des hirondelles, du genre Collocalia, qu'on trouve principalement dans les régions du Sud-Est de l'Asie et les îles des océans Pacifique et Indien. Cette substance, sécrétée par les glandes

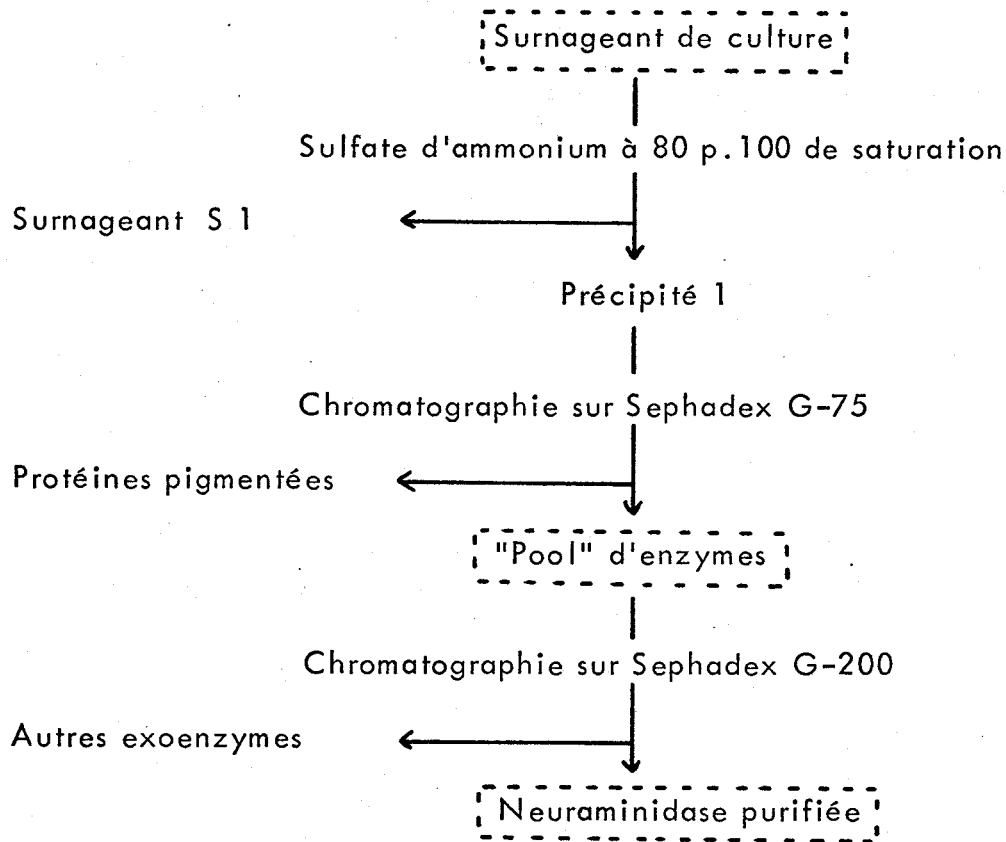


FIGURE N°7

FRACTIONNEMENT DE LA NEURAMINIDASE
EXTRAITE D'UNE CULTURE DE
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TYPE 33-4A



salivaires, est sous contrôle endocrinien : le maximum d'activité sécrétoire se situe pendant les périodes de reproduction et de couvaison.

A cause de sa teneur en acide sialique, cette mucine est souvent utilisée comme substrat d'étude des neuraminidases.

1°) Extraction :

La sialomucine est extraite de "nids d'hirondelles" selon le protocole décrit par HOWE et al. (156).

65 g de "nids d'hirondelles" sont écrasés dans un mortier et mis en suspension dans l'eau à la concentration finale de 3 g pour 100 ml d'eau. La suspension est placée à 60°C pendant 3 heures puis agitée pendant une nuit à +4°C. Après centrifugation, on recommence la même opération deux fois avec le culot.

Les surnageants sont alors rassemblés dialysés et lyophilisés. La préparation obtenue se révèle hétérogène en électrophorèse (Figure n°8) :

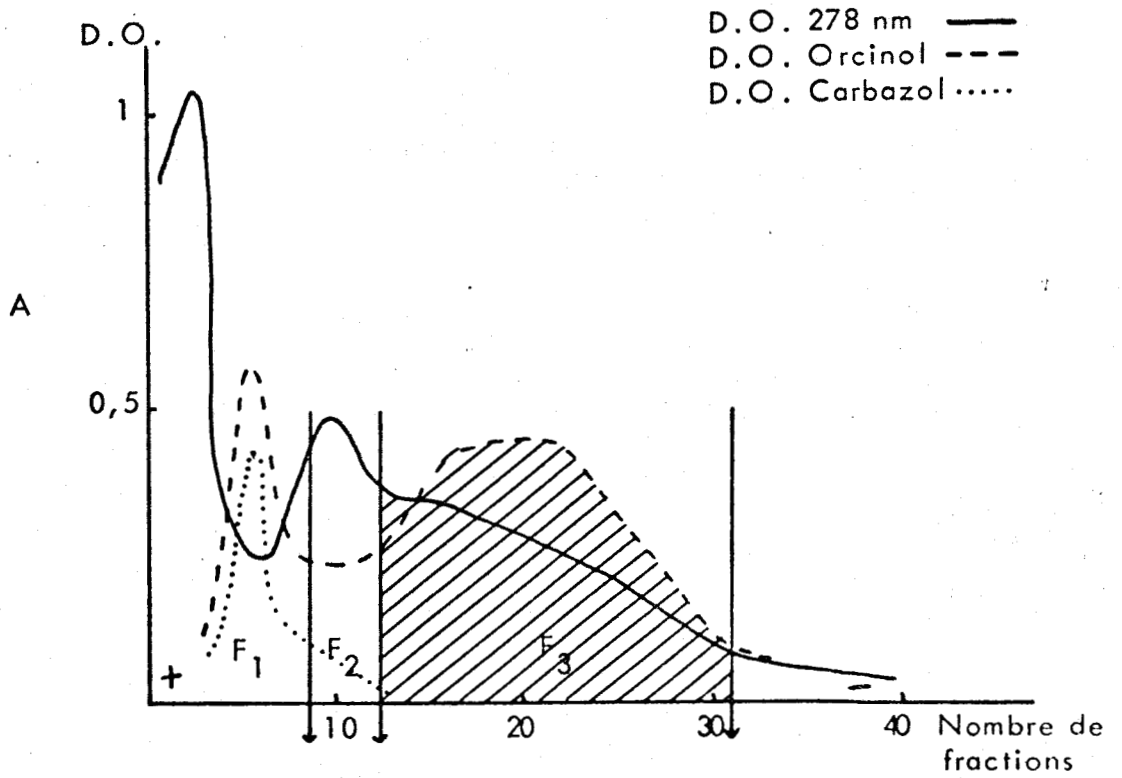
Elle présente une bande révélée par l'Amidoschwarz (A.S.) le réactif de Schiff après oxydation periodique (P.A.S) et le bleu de Toluidine (B.T.). Une autre bande de migration plus anodique est révélée uniquement par le bleu de Toluidine. Nous avons alors purifié la préparation de sialomucine par électrophorèse préparative en film liquide (Figure n°8).

2°) Electrophorèse préparative :

Les conditions utilisées sont décrites p. T₁₉.

Le diagramme obtenu (Figure n°8) permet de séparer une fraction très acide répartie dans les 9 premiers tubes révélée par l'orcinol sulfurique (157) et par le réactif au carbazol (158) et une fraction plus importante répartie du 10e au 30e tube uniquement révélée par l'orcinol sulfurique.

Après dialyse et lyophilisation, cette deuxième fraction se présente en électrophorèse en agarose sous forme d'une zone homogène révélée par l'Amidoschwarz, le réactif de Schiff après oxydation periodique et le bleu de Toluidine.



MUCINE DE COLLOCALIA
NATIVE

MUCINE DE COLLOCALIA
APRES ELECTROPHORESE PRE-
PARATIVE EN FILM LIQUIDE
A PH 8,6

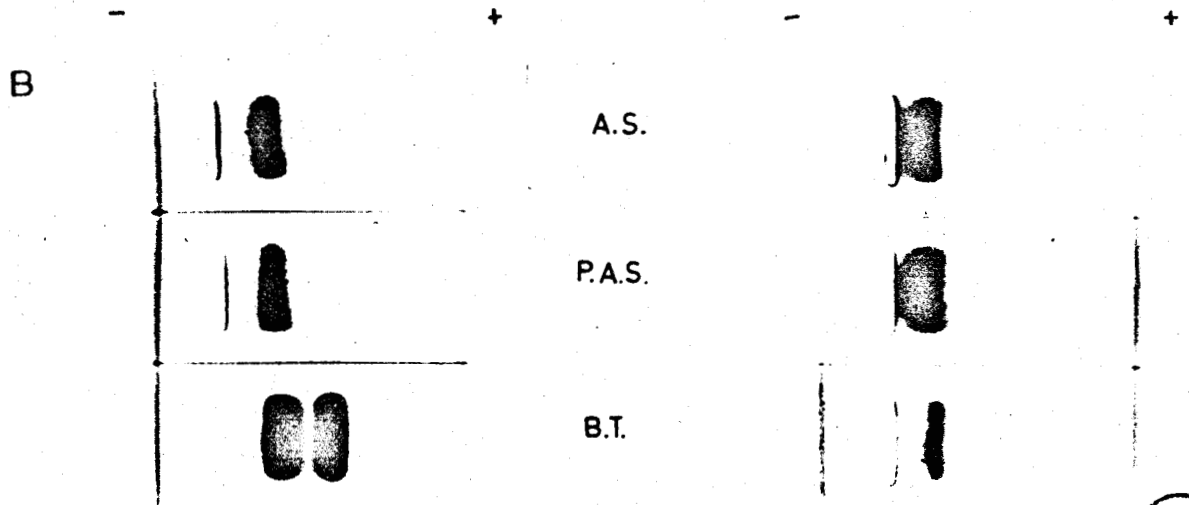


FIGURE N° 8

PURIFICATION DE LA SIALOMUCINE DE COLLOCALIA

A : Electrophorèse préparative en film liquide à pH 8,6
B : Electrophorèse en gel d'agarose à pH 8,2



PARTIE B :

RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être classés en trois chapitres :

- 1 - Purification des neuraminidases de Diplococcus pneumoniae et de Clostridium perfringens.
- 2 - Propriétés physico-chimiques et antigéniques de ces deux enzymes.
- 3 - Propriétés enzymatiques des neuraminidases.

I PURIFICATION DES NEURAMINIDASES . -

A - Neuraminidase de Diplococcus pneumoniae :

Nous avons recherché la présence de différentes activités enzymatiques dans la préparation brute d'exoenzymes obtenue après extraction par le sulfate d'ammonium : les résultats montrent l'absence d'arylsulfatase, d' α et de β L-fucosidase. Diplococcus pneumoniae type I synthétise une neuraminidase, une N-acetyl- β -D-glucosaminidase, une β -D-galactosidase. On détecte également une trace d' α -galactosidase et de protéase (Tableau IX).

L'étape de "batch absorption" sur DEAE-cellulose (Figure n°9) nous permet de recueillir une fraction non retenue qui est riche en protéines et sans activité enzymatique. Une deuxième fraction est éluée par le tampon phosphate de Na 0,05 M de pH = 7,6, riche en neuraminidase et presque totalement débarrassée des autres glycosidases (Tableau IX). Elle sera utilisée dans l'étape de purification suivante sur C M-cellulose. Enfin, une troisième fraction est éluée par le tampon phosphate de Na 0,1 M, NaCl 0,2 M de pH = 6,8 ; elle contient les trois activités enzymatiques principales présentes dans la préparation de départ, mais surtout la N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (Tableau IX).

L'étape de purification sur C M-cellulose (Figure n°9) permet d'éliminer un pic important de coloration brune et absorbant aussi fortement à 278 nm qui n'est pas fixé sur la colonne. La neuraminidase est éluée sous forme d'un pic homogène dans la deuxième moitié du gradient.

La neuraminidase obtenue de cette façon n'est plus contaminée par la présence d'autres activités enzymatiques (l'activité protéasique n'est plus décelable après les deux étapes de purification). Elle présente une activité spéci-

Etapes de purification	Activités spécifiques				Rendement pondéral/ protéines %	Rendement pondéral/ neuraminidase %
	neuraminidase	N Acetyl- β -D-glucosaminidase	β -galactosidase	protéase		
relargage au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,10	1,60	0,30	14	100	100
fraction F ₁ de DEAE cellulose	0	0	0,20	non décelable	33,20	0
fraction F ₂ de DEAE cellulose	6,20	0,20	0,30	id.	14,07	28,14
fraction F ₃ de DEAE cellulose	4,30	10,10	1,90	id.	9,43	18,95
fraction F ₂ de après CM ₂ cellulose	1230	0	0	id.	0,07	25,87

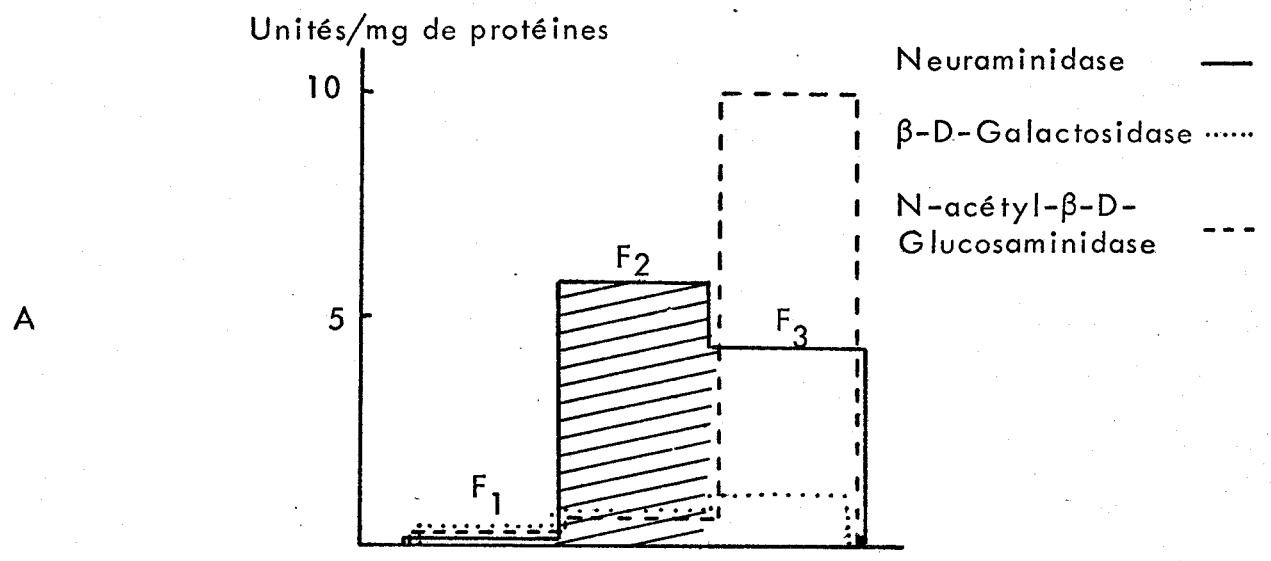
⌘ exprimé en % de la teneur en protéines ou de l'activité de la préparation obtenue par fractionnement au sulfate d'ammonium

TABLEAU IX

PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



"Batch absorption" sur DEAE-Cellulose



Chromatographie sur CM-Cellulose

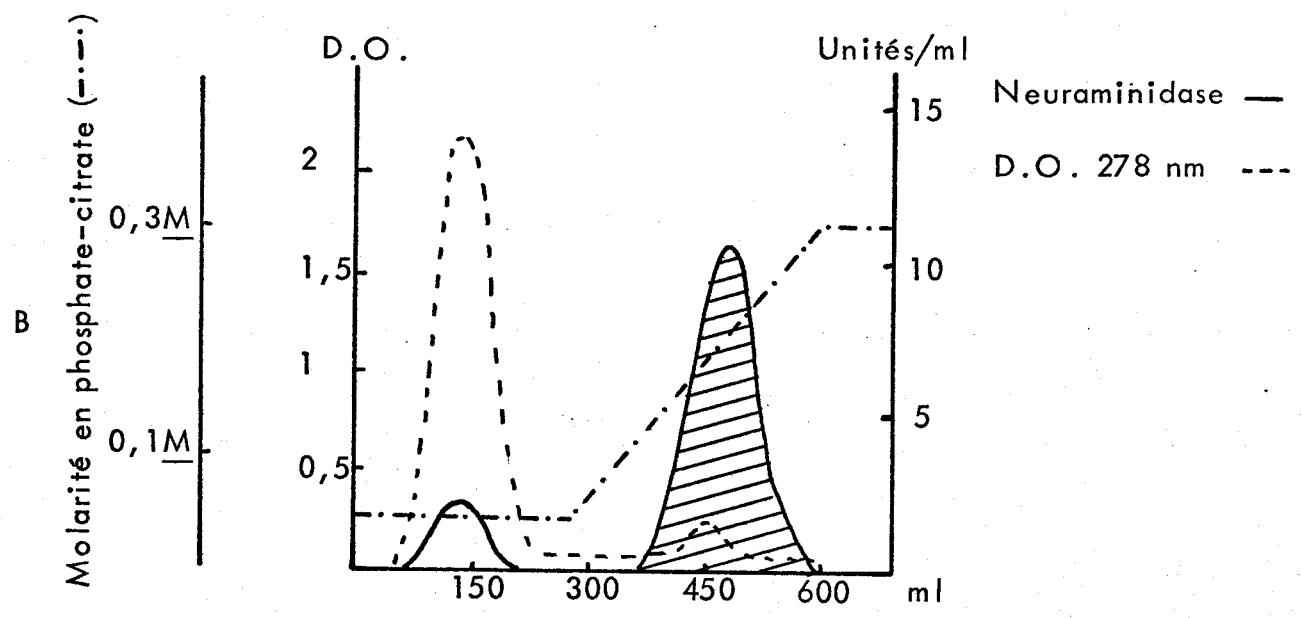


FIGURE N° 9

PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE
DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



fique de 1 200 unités/mg (Tableau IX). Elle a donc été purifiée 400 fois, conformément aux résultats de HUGHES et JEANLOZ (159).

La neuraminidase non purifiée que nous obtenons après fractionnement par le sulfate d'ammonium et "batch absorption" sur DEAE-cellulose est conservée sous forme lyophilisée à + 4°C sans perte sensible d'activité enzymatique.

Par contre, la neuraminidase purifiée perd 90 p. 100 de son activité lorsqu'on la lyophilise. Nous la conservons donc en solution congelée à - 20°C à la concentration de 200 U/ml. Les congélations et décongélations répétées entraînent également une perte d'activité progressive.

B - Neuraminidase de Clostridium perfringens :

Les activités enzymatiques obtenues aux différentes étapes de purification de la préparation d'enzymes extraite du surnageant de culture de Clostridium perfringens sont rassemblées dans le Tableau X. Nous retrouvons une activité importante de neuraminidase, d' α -^{1,2}L-fucosidase, de β -galactosidase, quelques traces de N-acétyl- β -glucosaminidase et de protéase.

L'étape de chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 75 en tampon phosphate de K 0,01 M, KCl 0,025 M de pH = 7,0 (Figure n°10) permet de séparer un "pool" de glycosidases éluées avec le volume mort de la colonne d'une importante fraction de coloration brune et absorbant aussi à 278 nm retardée sur la colonne.

La fraction exclue est ensuite concentrée et soumise à une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 200 en tampon Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,05 M dithiothreitol 0,1 mM de pH = 8,0 (Figure n°10).

La neuraminidase est retardée et est éluée en même temps qu'une forme d' α -L-fucosidase. Elle présente une activité spécifique de 146 unités/mg de protéines (Tableau X). Elle est purifiée 13 fois.

L'activité spécifique de l'enzyme purifié est très inférieure à celle obtenue par CASSIDY et al. (160) pour la souche de Clostridium perfringens (ATCC 10543) mais il n'a pas été possible de reproduire avec la souche 33-4 A le protocole de purification de ces auteurs. Lors d'essais préliminaires nous avons utilisé le protocole proposé par CASSIDY (161) mais nous n'avons pas réussi à éluer la neuraminidase de la colonne de DEAE cellulose.

L'enzyme de Clostridium perfringens est conservé en solution congelée à - 20°C à la concentration finale de 80 unités/ml.

Comme l'enzyme de Diplococcus pneumoniae, il perd son acti-

Etapes de purification	Activités spécifiques					Rendement pondéral/protéines ⌘	Rendement pondéral/neuraminidase ⌘
	neuraminidase	N Acetyl-β-D-glucosaminidase	β-D-galactosidase	α-L-fucosidase	protéase		
relargage au (NH ₄) ₂ SO ₄	11,3	0,8	2,3	5	53	100	100
"pool" d'enzymes après Sephadex G 75	40	1,6	4	16	non décelable	26,04	89,12
fraction de neuraminidase après Sephadex G 200	146,5	0	1	4	id.	5,69	73,8

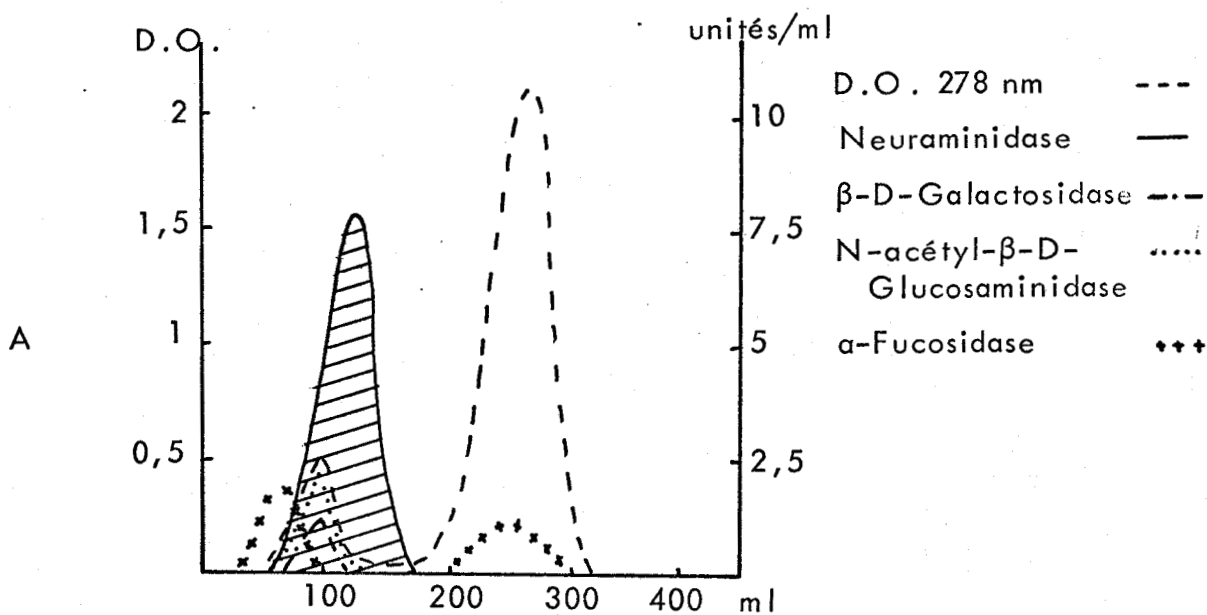
⌘ exprimé en % de la teneur en protéines ou de l'activité de la préparation obtenue par fractionnement au sulfate d'ammonium

TABLEAU X

PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS



CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-75



CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-200

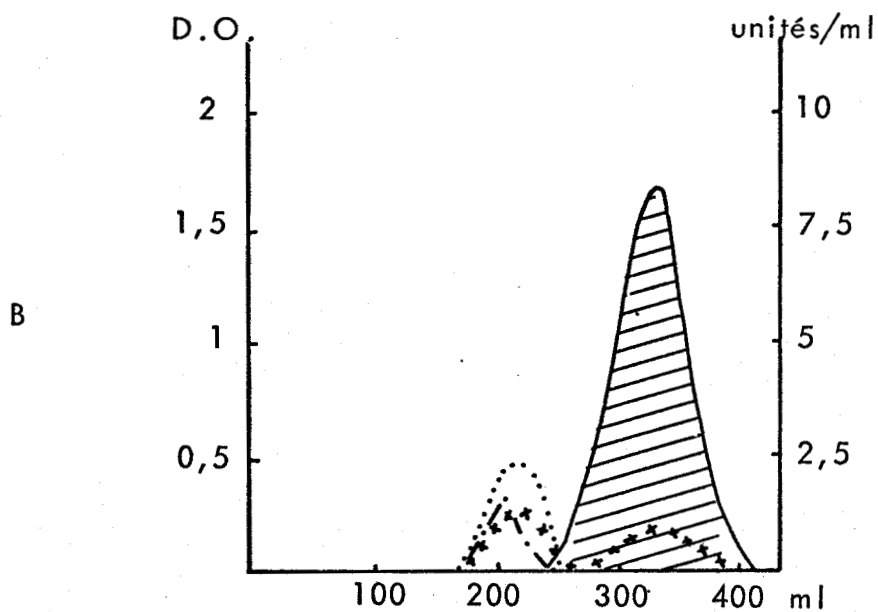


FIGURE N° 10

PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE
DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS



tivité par congélations et décongélations répétées.

C - Conclusions :

Nous avons démontré que 2 à 3 étapes de purification suffisent pour obtenir la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae. Le pourcentage d'activité retrouvée pour la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est de l'ordre de 21 p. 100 et la purification est de l'ordre de 400. Le rendement ainsi obtenu est inférieur à celui obtenu par HUGHES et JEANLOZ (162) (de l'ordre de 30 p. 100). Par contre, le degré de purification est identique. Nous avons donc, par un protocole de purification simplifié, obtenu des résultats comparables.

La neuraminidase de Clostridium perfringens est purifiée 13 fois avec un rendement de 78 p. 100. Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux de CASSIDY et al. (163) (rendement : 22 p. 100 et purification : 5 500 fois). Ceci s'explique peut-être de deux façons :

1°) les conditions de culture ne sont pas forcément adaptées à la production de neuraminidase pour ce type de Clostridium perfringens.

2°) la neuraminidase produite n'est peut être pas identique à la neuraminidase préparée par CASSIDY et al. (164).

D'autre part, nous avons noté l'instabilité croissante des deux enzymes en fonction du degré de pureté, expliquée par la faible teneur protéique des solutions enzymatiques purifiées.

II DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES. -

L'isoélectrofocalisation des deux neuraminidases est réalisée dans les conditions décrites p. T₂₀. Après élimination du glycérol, la recherche de l'activité enzymatique est effectuée en utilisant les glycopeptides d'origine bronchique comme substrat. Les résultats obtenus sont exprimés dans la Figure n°11. La neuraminidase de Clostridium perfringens apparaît homogène et se stabilise dans une zone de pH = 5,5 alors que la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae présente deux formes se stabilisant dans deux zones de pH = 4,2 et pH = 3,7.

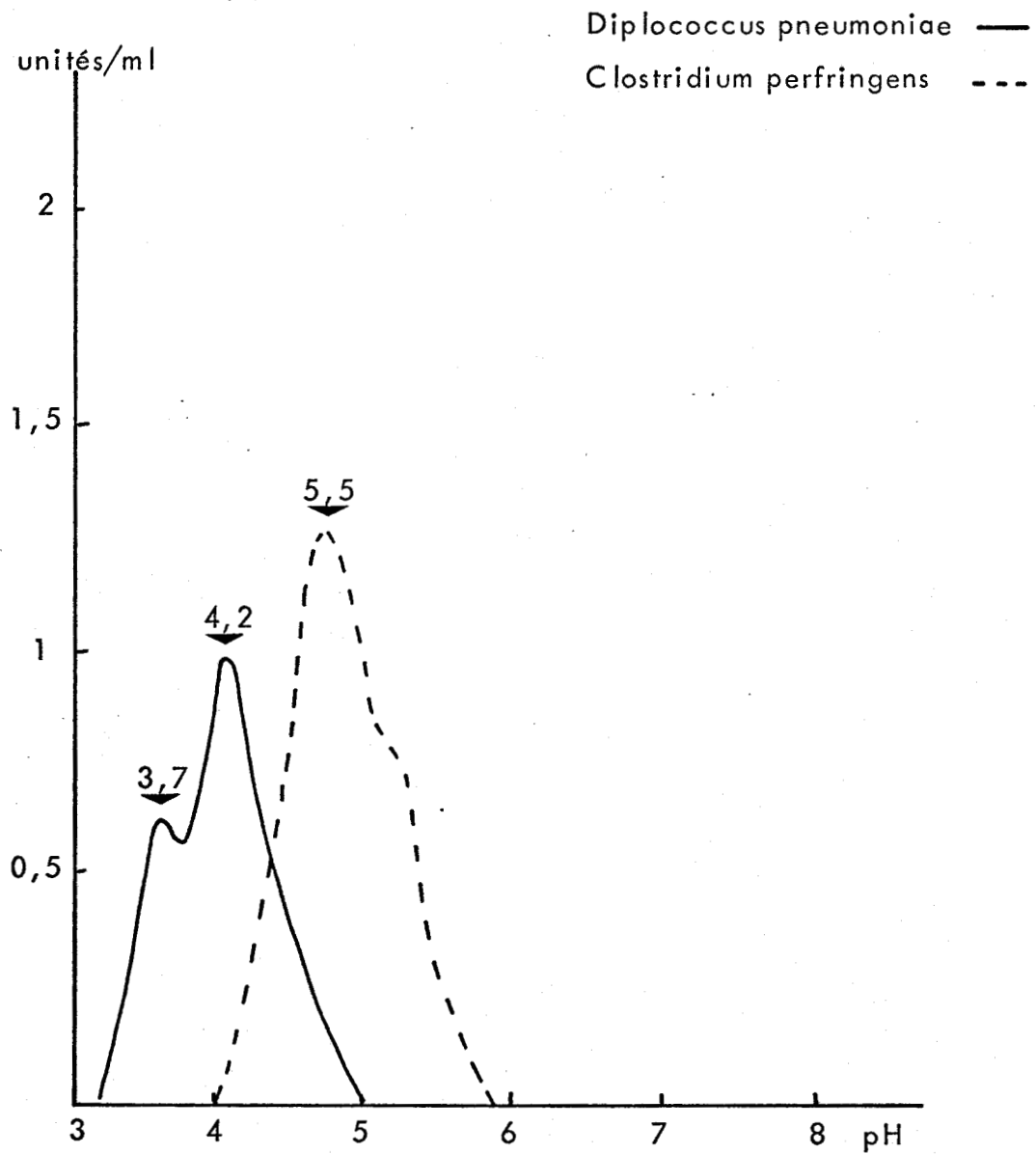


FIGURE N°11

ETUDE DES NEURAMINIDASES
DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE
ET DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
EN ISOELECTROFOCALISATION



Le point isoélectrique de la neuraminidase de Clostridium perfringens, souche 33-4A, est voisin de celui déterminé par NEURATH et al. (165) pour une neuraminidase de Clostridium dont les auteurs n'ont pas précisé la souche. L'enzyme de Clostridium perfringens, souche 33-4A, et l'enzyme de Clostridium perfringens étudié par ces auteurs se présentent en isoélectrofocalisation sous forme d'un pic homogène.

Par cette même méthode, NEURATH et al. (166) ont montré l'hétérogénéité des neuraminidases des virus de l'Influenza A₂/Aichi/68 et B/mass/66 et l'homogénéité de la neuraminidase de Vibrio cholerae.

L'isoelectrofocalisation apporte une confirmation à l'hétérogénéité de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae. TANENBAUM et al. (167) ont en effet déjà mis en évidence plusieurs formes de neuraminidases de Diplococcus pneumoniae séparées par chromatographie d'échange ionique (Tableau XI).

La méthode d'isoélectrofocalisation que nous avons utilisée étant seulement une méthode analytique, il n'a malheureusement pas été possible d'isoler les deux formes enzymatiques et de caractériser chacune d'elles.

III CARACTERES ANTIGENIQUES. -

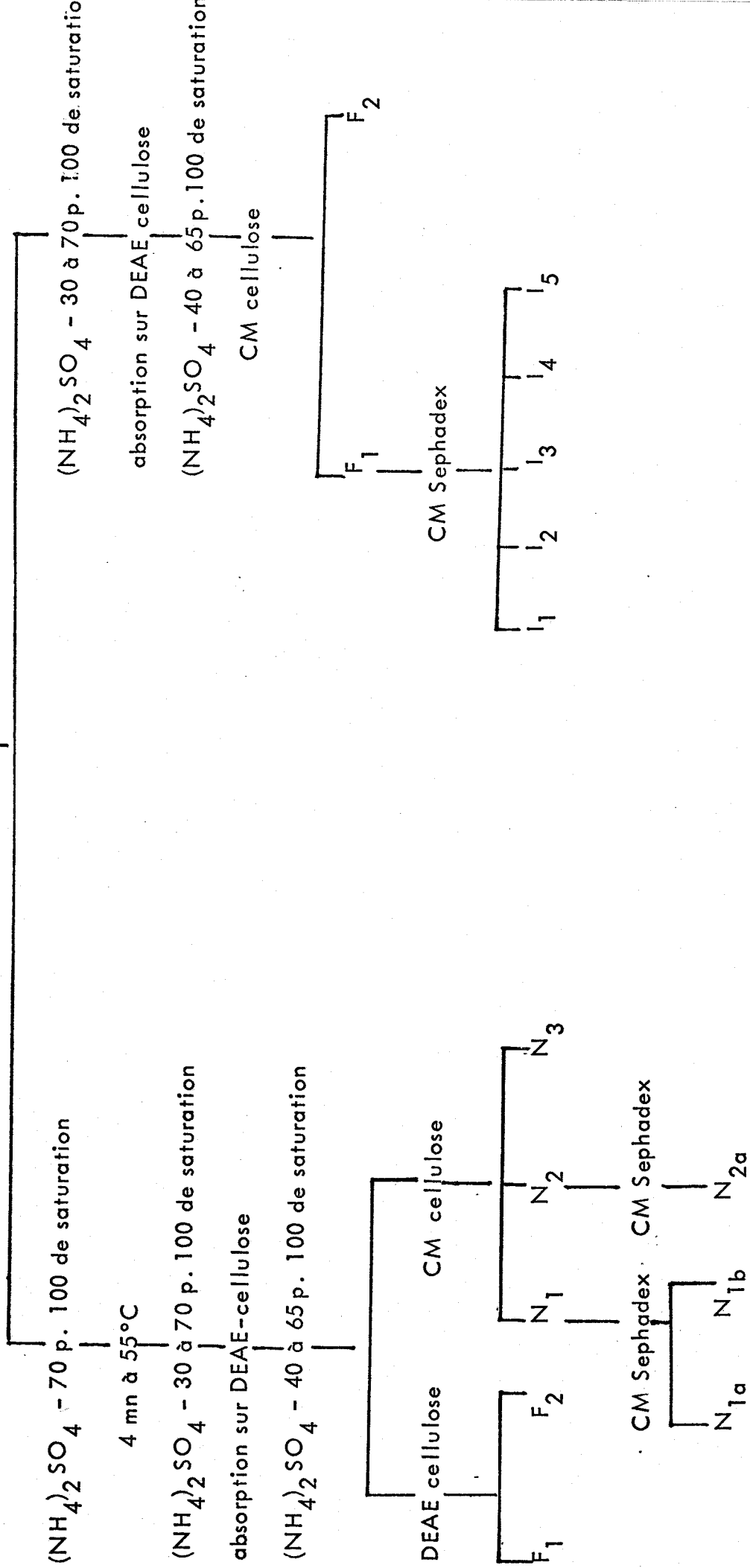
LEE et HOWE (169) mettent en évidence l'antigénicité de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae de la façon suivante : des immunsérums sont réalisés chez le lapin et le cheval à l'aide de Diplococcus pneumoniae entiers type I, III, VII, XIV. Ces immunsérums neutralisent l'activité enzymatique, et les auteurs en concluent que la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae représente un groupe antigénique.

C'est pourquoi nous avons réalisé chez le lapin un immunsérum à l'aide de la préparation brute d'exoenzymes de Diplococcus pneumoniae (immunsérum anti-NDP).

A - Analyse de l'immunsérum anti-NDP :

Par la méthode de double diffusion d'OUCHTERLONY (170) (Figure n°12) on note que l'immunsérum obtenu révèle la préparation enrichie en neuraminidase de Clostridium perfringens et les fractions F₂ et F₃ de DEAE-cellulose de Diplococcus pneumoniae. Il existe un raccordement des arcs obtenus à l'aide

Culture de Diplococcus pneumoniae



BUS
LILLE

TABLEAU XI

SEPARATION DES ISOENZYMES DE LA NEURAMINIDASE DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE

(d'après TANENBAUM et al. (1968)).

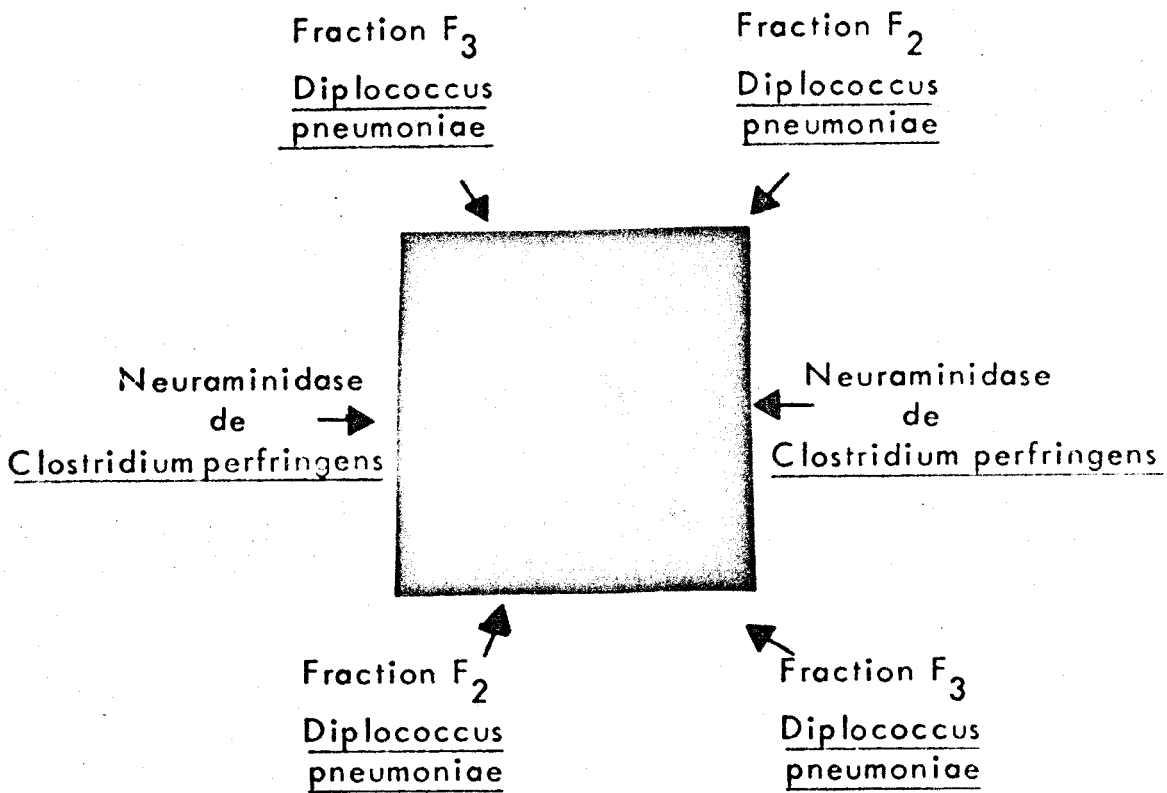


FIGURE N°12

ANALYSE DE L'IMMUNSERUM

ANTI - NDP



de l'immunsérum à partir de ces 3 fractions.

En immunoélectrophorèse bidimensionnelle (Figure n°13), l'immunsérum anti-NDP en présence des fractions F₂ et F₃ de DEAE cellulose révèle une surface de précipitation comparable à celle qu'on obtient en présence de la neuraminidase de Clostridium perfringens. Par contre, la fraction enzymatique de Diplococcus pneumoniae purifiée par passage sur carboxyméthylcellulose n'est plus révélée par cet immunsérum, contrairement à la fraction protéique de couleur brune F₁, éliminée au cours de cette dernière étape de purification et qui donne une courbe de précipitation comparable à celle obtenue avec la préparation purifiée de Clostridium perfringens.

B - Neutralisation de l'activité de neuraminidase au cours des différentes étapes de fractionnement par l'immunsérum anti-NDP :

Nous avons essayé de neutraliser l'action des deux neuraminidases par l'immunsérum antineuraminidase de Diplococcus pneumoniae (anti-NDP) préparé à partir de la préparation brute d'exoenzymes de Diplococcus pneumoniae.

L'immunsérum est mis en contact avec chacune des deux neuraminidases bactériennes (la neuraminidase de Clostridium perfringens purifiée, la fraction F₂ de Diplococcus pneumoniae partiellement purifiée sur DEAE-cellulose, la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae purifiée sur CM-cellulose).

Après élimination du complexe antigène-anticorps formé, on retrouve 40 p. 100 de l'activité de la neuraminidase de Clostridium perfringens, 70 p. 100 de l'activité de la neuraminidase F₂ de Diplococcus pneumoniae et 87 p. 100 de l'enzyme de Diplococcus pneumoniae au stade final de purification.

Il semble donc que la neuraminidase de Clostridium perfringens et l'enzyme de Diplococcus pneumoniae au stade de la DEAE-cellulose soient partiellement précipités ou inactivés par l'immunsérum anti-extrait brut de Diplococcus pneumoniae.

C - Détermination de la nature de l'antigène :

Les résultats de l'étude immunoélectrophorétique bidimensionnelle montrent que l'antigène n'est pas lié à l'activité enzymatique. Afin de préciser la nature de cet antigène, nous avons mis en présence l'immunsérum et Diplococcus pneumoniae. Après addition d'un sérum anti-immunoglobulines de lapin fluorescent, l'observation en microscopie de fluorescence de Diplococcus pneumoniae ne permet

IS anti-NDP

A

↑₂
Neuraminidase de
Cl. perfringens →₁

IS anti-NDP

B

↑₂
Fraction F2 de
C.M. cellulose →₁

FIGURE N°13

ANALYSE DE L'IMMUNSERUM
ANTI-NDP



pas de révéler le complexe antigène-anticorps.

Par contre, la même expérience réalisée avec Clostridium perfringens montre une fluorescence bien marquée à la périphérie des batonnets de Clostridium perfringens (Figure n°14).

D - Conclusions :

Ces différentes études nous ont amené aux conclusions suivantes : l'activité de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est associée jusqu'au stade de purification partielle sur DEAE-cellulose à des déterminants antigéniques révélés par l'immunsérum préparé puisqu'on note une diminution de l'activité enzymatique de la fraction F₂ après contact avec l'immunsérum. Cette perte d'activité est beaucoup moins sensible (13 p. 100) quand la neuraminidase est hautement purifiée.

- L'étude immunoélectrophorétique bidimensionnelle montre que la fraction antigénique révélée par l'immunsérum ne correspond pas à l'activité enzymatique puisque l'enzyme au stade final de purification n'est pas révélé. L'antigène est donc un déterminant associé à l'activité de neuraminidase jusqu'au stade de purification sur DEAE-cellulose. L'antigène est ensuite dissocié de la neuraminidase par chromatographie sur CM-cellulose.

- L'étude réalisée par immunofluorescence à partir de l'immunsérum préparé, permet de révéler les cellules bactériennes de Clostridium perfringens. Ceci laisse supposer que cet antigène est un composant structural de la membrane cellulaire de Clostridium perfringens. Le résultat négatif obtenu avec Diplococcus pneumoniae laisse penser que cet antigène ne se trouve probablement pas à la partie externe de la paroi de Diplococcus pneumoniae.

IV PROPRIETES ENZYMATIQUES. -

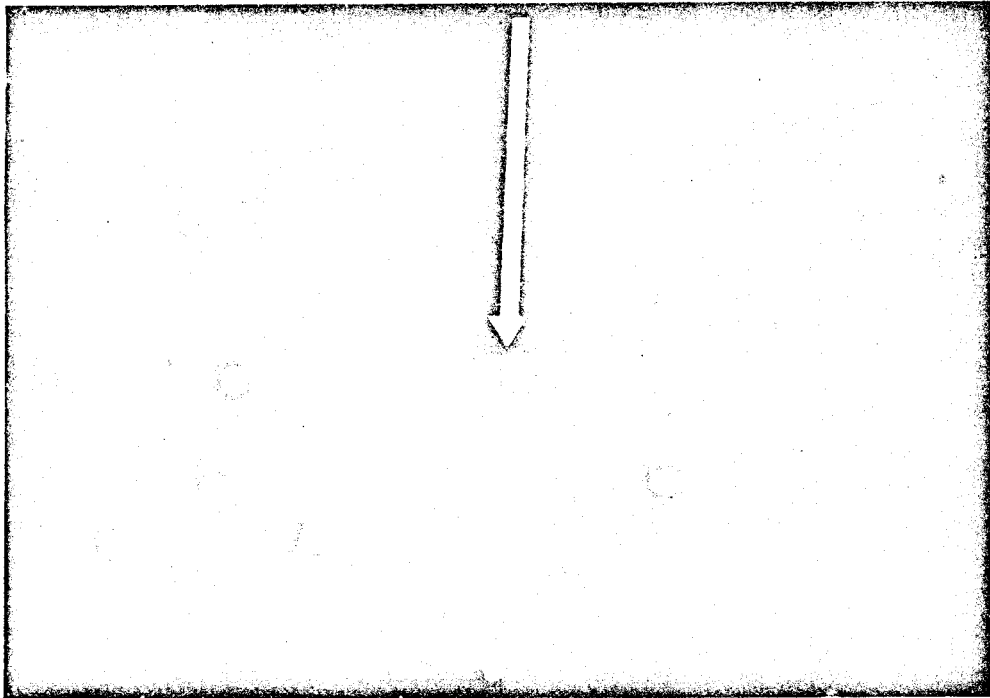
A - pH optimum d'action :

Ces pH optima ont été déterminés sur des glycopeptides d'origine bronchique contenant 7 p. 100 d'acide sialique.

Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées dans les conditions habituelles en présence de solution tampon de pH variable.

L'action du pH sur l'activité enzymatique a été étudiée à l'aide d'un tampon phosphate-citrate de sodium 0,1 M et d'un tampon acétate de sodium

Clostridium perfringens



—
15,7 μ

FIGURE N°14

MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE IMMUNSERUM-
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS PAR IMMUNOFLUORESCENCE



0,1 M les résultats obtenus sont illustrés par la Figure n°15.

On peut faire les remarques suivantes :

Le pH optimum de la neuraminidase de Clostridium perfringens est de 4,5 en tampon phosphate-citrate et de 5,0 en tampon acétate.

Le pH optimum de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est de 5,7 en tampon phosphate-citrate et 5,2 en tampon acétate.

B - Action de la température :

Nous avons fait agir les neuraminidases sur les glycopeptides d'origine bronchique et sur la mucine de Collocalia à des températures variables afin de déterminer leur température optimale d'action. La Figure n°16 indique les résultats obtenus :

- la neuraminidase de Clostridium perfringens présente un maximum à 37°C et possède une activité importante entre 30 et 45°. Elle est totalement détruite à 70°C.

- la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est stable entre 30° et 40°.

Par la suite, toutes les hydrolyses seront réalisées à 37°C.

C - Affinité pour les substrats :

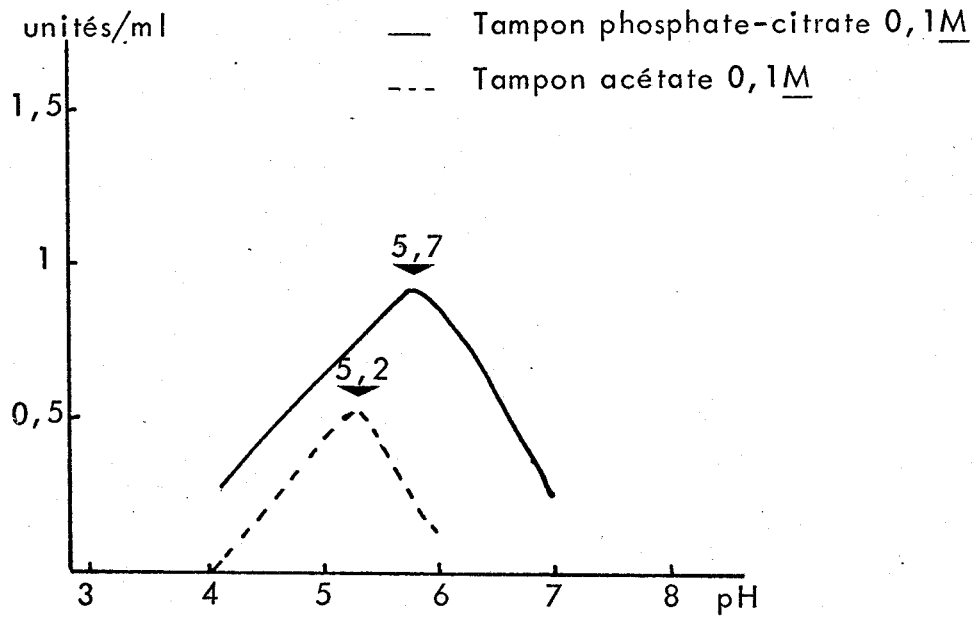
1°) Affinité pour les glycopeptides d'origine bronchique :

Avant de déterminer les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, nous avons défini les facteurs constants de la réaction enzymatique : la dilution de l'enzyme et le temps d'hydrolyse pour une préparation enzymatique donnée.

a) Dilution de l'enzyme :

Nous avons déterminé l'activité enzymatique d'une préparation de neuraminidases en fonction de la dilution de l'enzyme en effectuant l'hydrolyse des glycopeptides bronchiques contenant 7 p. 100 d'acide sialique à la concentration constante de 10 mg/ml par des dilutions croissantes d'enzyme pendant 1 heure à 37°C.

DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

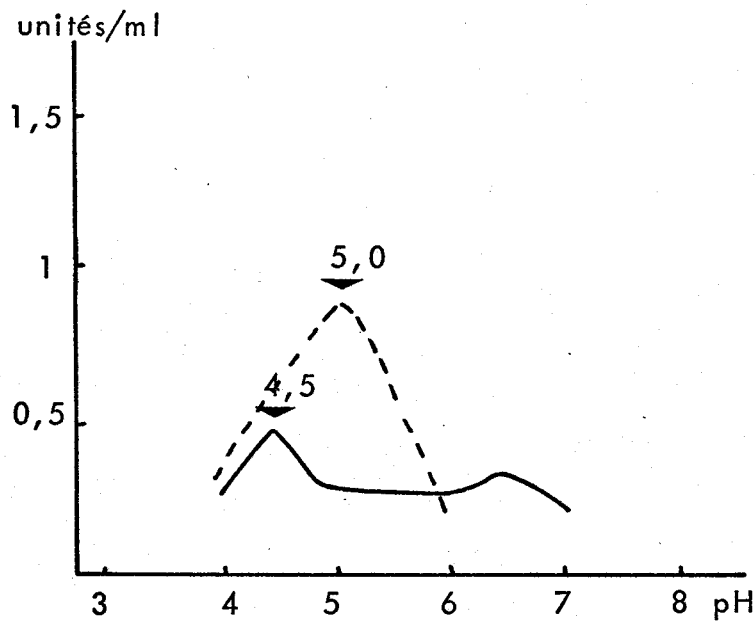
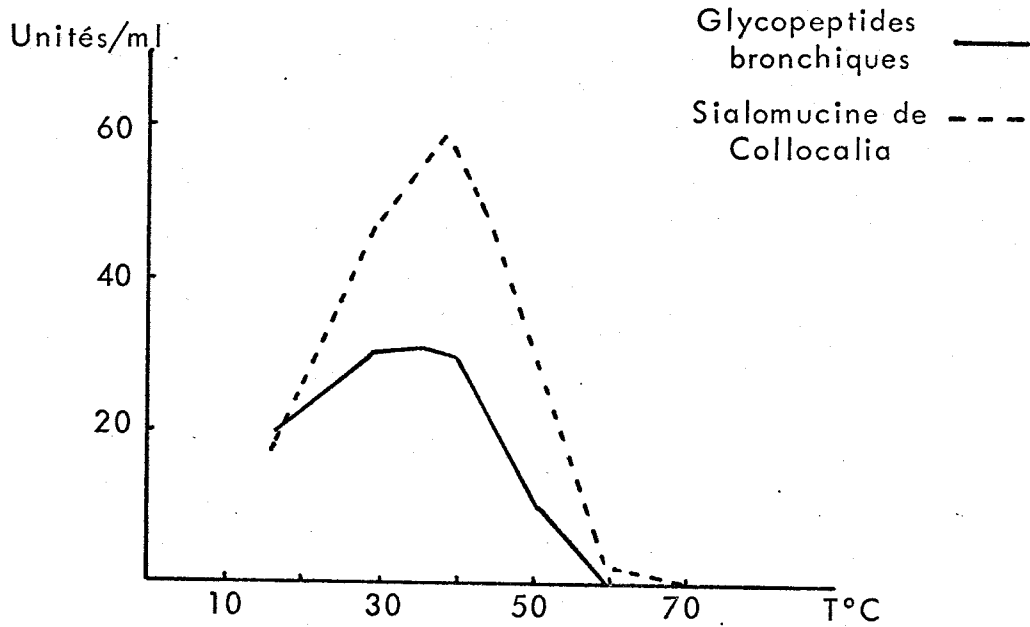


FIGURE N° 15

DETERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTIVITE DES NEURAMINIDASES



DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

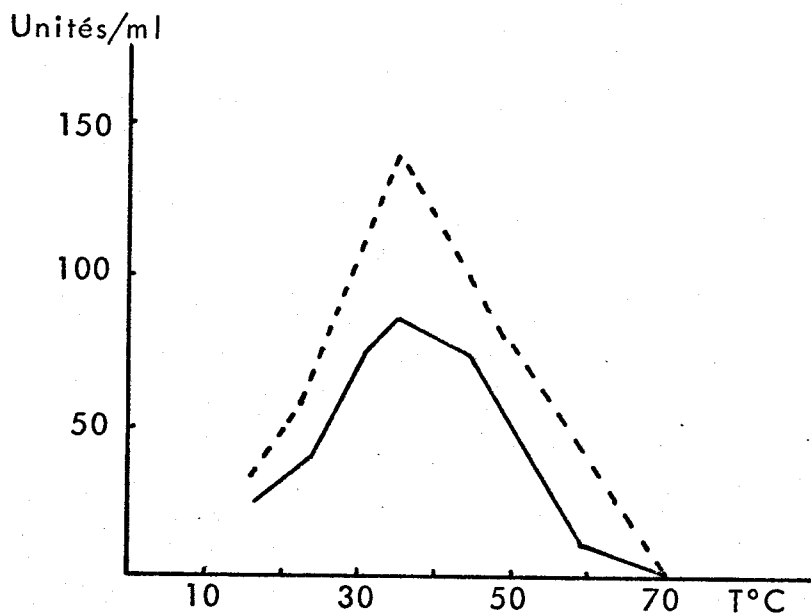


FIGURE N°16

DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE
D'ACTION DES NEURAMINIDASES



Nous avons alors choisi sur la courbe représentant l'activité enzymatique en fonction du logarithme de la concentration en enzyme (Figure n°17), la concentration pour laquelle l'activité enzymatique atteint une valeur constante. Cette concentration est de 1/8 pour l'enzyme de Clostridium perfringens et de 1/20 pour l'enzyme de Diplococcus pneumoniae.

b) Temps d'hydrolyse :

Pour la concentration enzymatique choisie précédemment nous avons alors déterminé le temps d'hydrolyse pour lequel la libération d'acide sialique est parfaitement linéaire en fonction du temps.

Sur la Figure n°18, nous indiquons le nombre de nanomoles d'acide sialique libéré des glycopeptides bronchiques à la concentration de 10 mg/ml en fonction du temps d'hydrolyse. Nous avons constaté que pour les deux préparations enzymatiques, les quantités d'acide sialique libéré sont rigoureusement alignées pour 5 mn et 15 minutes d'hydrolyse. Nous avons donc choisi 15 mn comme temps d'incubation.

c) Détermination de la constante d'affinité :

Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées avec une préparation de neuraminidase de Clostridium perfringens diluée au 1/8 ou avec une préparation de neuraminidase de Diplococcus pneumoniae diluée au 1/20 sur un substrat en concentration variable pendant 15 mn à 37°C.

Nous indiquons sur la Figure n°19 les variations de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en substrat selon la représentation de LINEWEAVER et BURK (171). A partir de cette courbe on peut facilement calculer la constante de Michaelis de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae pour les glycopeptides d'origine bronchique :

$$K_m = 0,35 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

et de la neuraminidase de Clostridium perfringens pour ces mêmes glycopeptides :

$$K_m = 0,44 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

2°) Affinité pour la sialomucine de Collocalia :

Un protocole indentique à celui utilisé précédemment

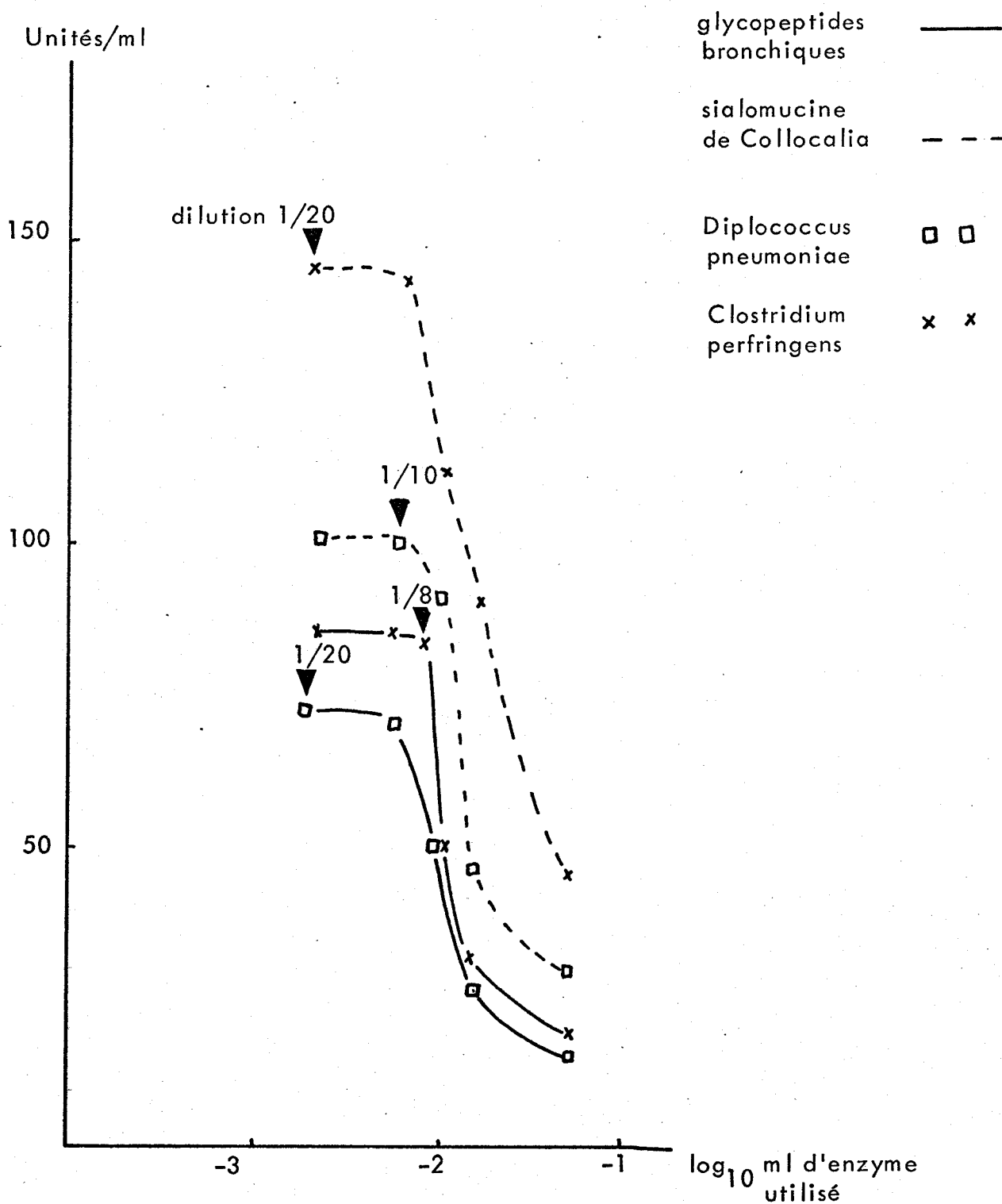


FIGURE N°17

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

A - Détermination de la dilution de l'enzyme



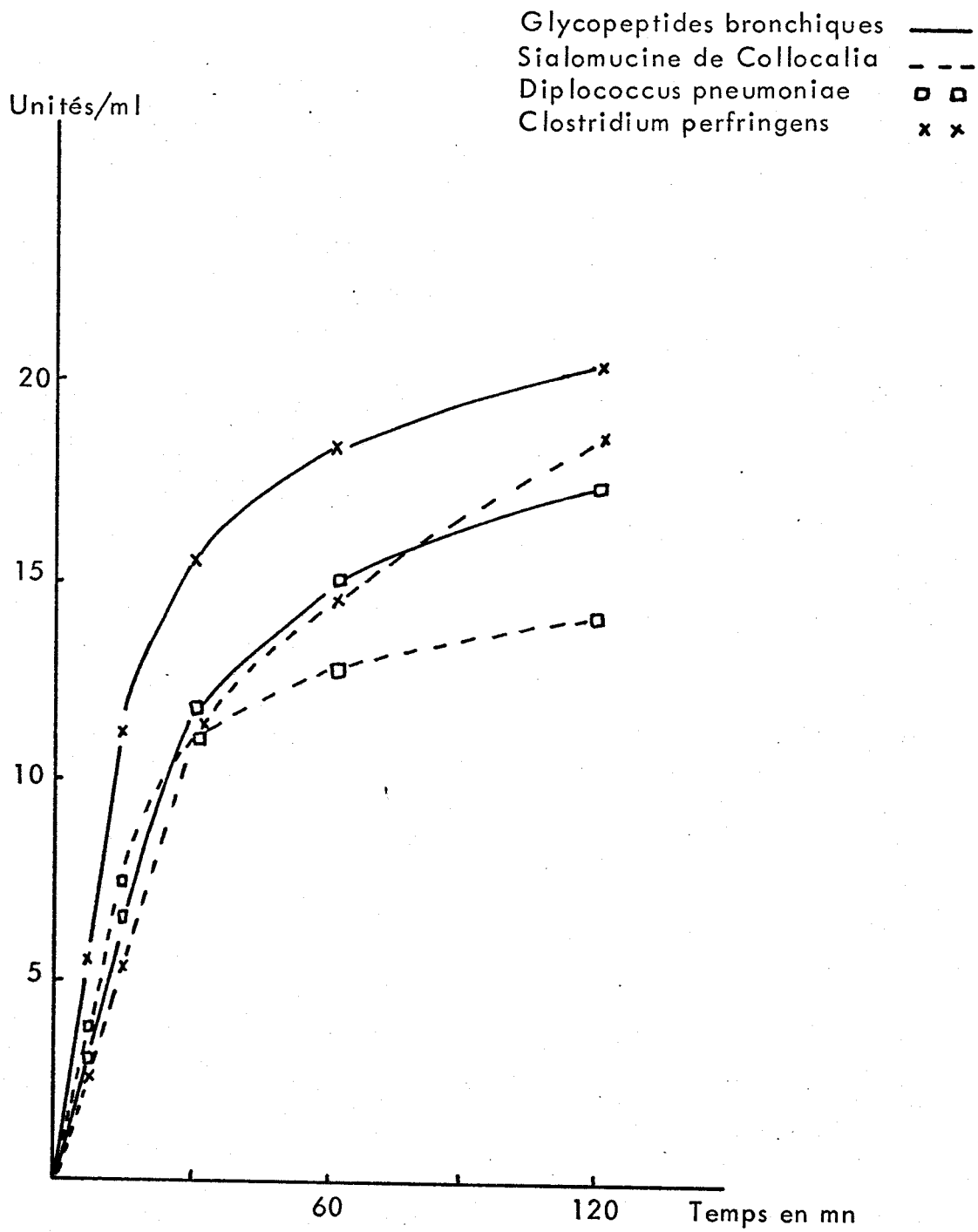


FIGURE N°18

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

B - Détermination du temps d'hydrolyse



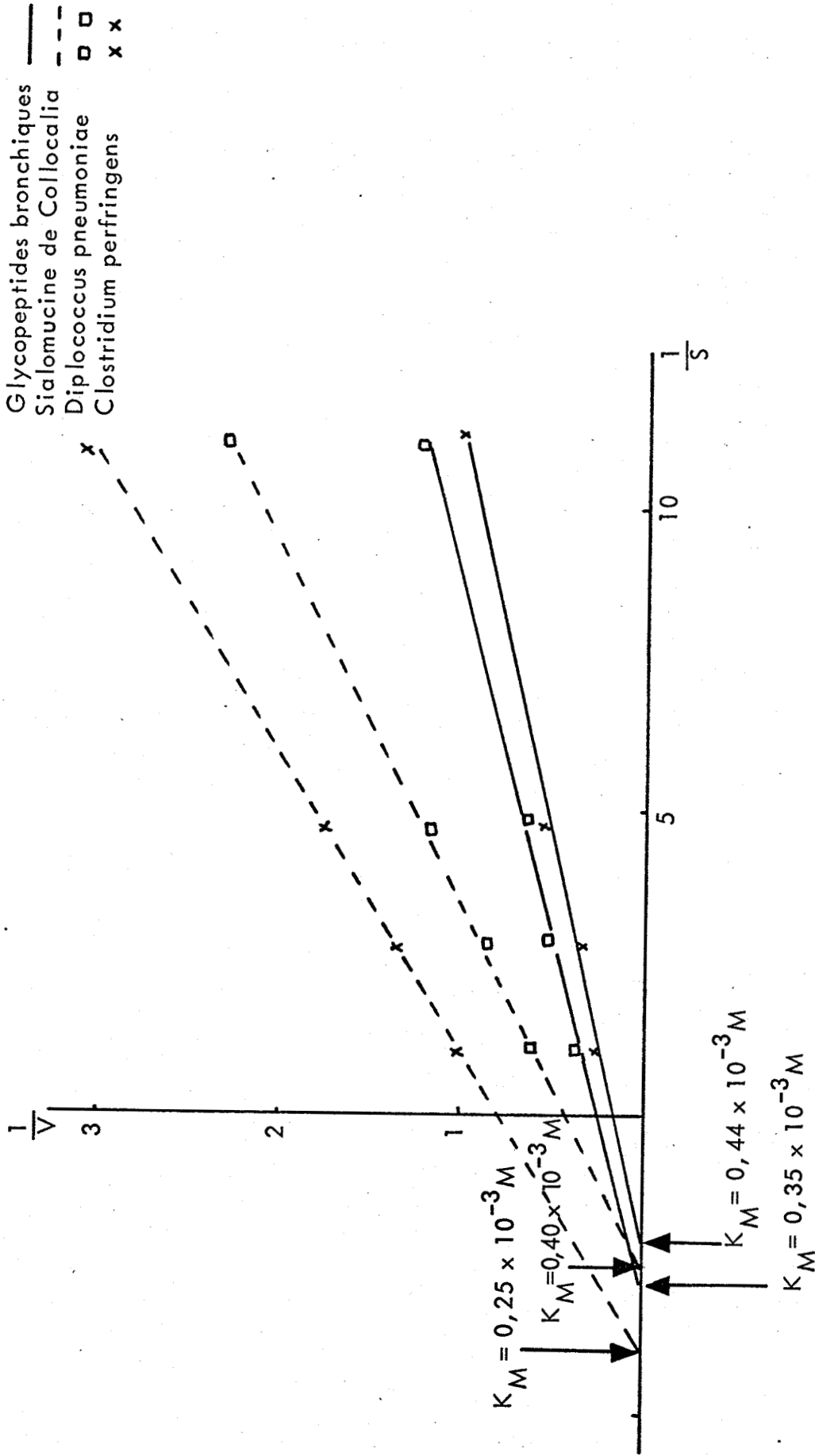


FIGURE N° 19

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

C - Détermination de la constante d'affinité



(Figures n°17 et n°18) nous a permis de préciser les conditions requises pour déterminer les variations de la vitesse initiale.

C'est ainsi qu'il faut hydrolyser la sialomucine de Collocalia pendant 15 minutes avec la neuraminidase de Clostridium perfringens diluée 10 fois et la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae diluée 5 fois.

La Figure n°19 illustre les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat. A partir de cette courbe nous avons calculé la constante de Michaelis de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae pour la sialomucine de Collocalia :

$$K_m = 0,40 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

et de la neuraminidase de Clostridium perfringens pour cette sialomucine :

$$K_m = 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

3°) Affinité pour le dilactominyllacto-N-tétraose :

Toujours en suivant le même protocole (Figures n°20 et n°21) nous avons choisi les conditions suivantes pour déterminer les variations de la vitesse initiale :

Le dilactominyllacto-N-tétraose est hydrolysé pendant 15 minutes avec l'enzyme de Clostridium perfringens dilué 10 fois ou l'enzyme de Diplococcus pneumoniae dilué 8 fois.

La courbe représentant les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en dilactaminyllacto-N-tétraose (Figure n°22) permet de déterminer la constante de Michaelis de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae pour ce substrat :

$$K_m = 2,22 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

et de la neuraminidase de Clostridium perfringens pour ce même substrat :

$$K_m = 1,66 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

4°) Affinité pour les glycopeptides d'orosomucoïde :

Les glycopeptides d'orosomucoïde sont hydrolysés pendant 15 minutes avec la neuraminidase de Clostridium perfringens diluée 10 fois ou avec l'enzyme de Diplococcus pneumoniae dilué 8 fois (Figures n°20 et n°21).

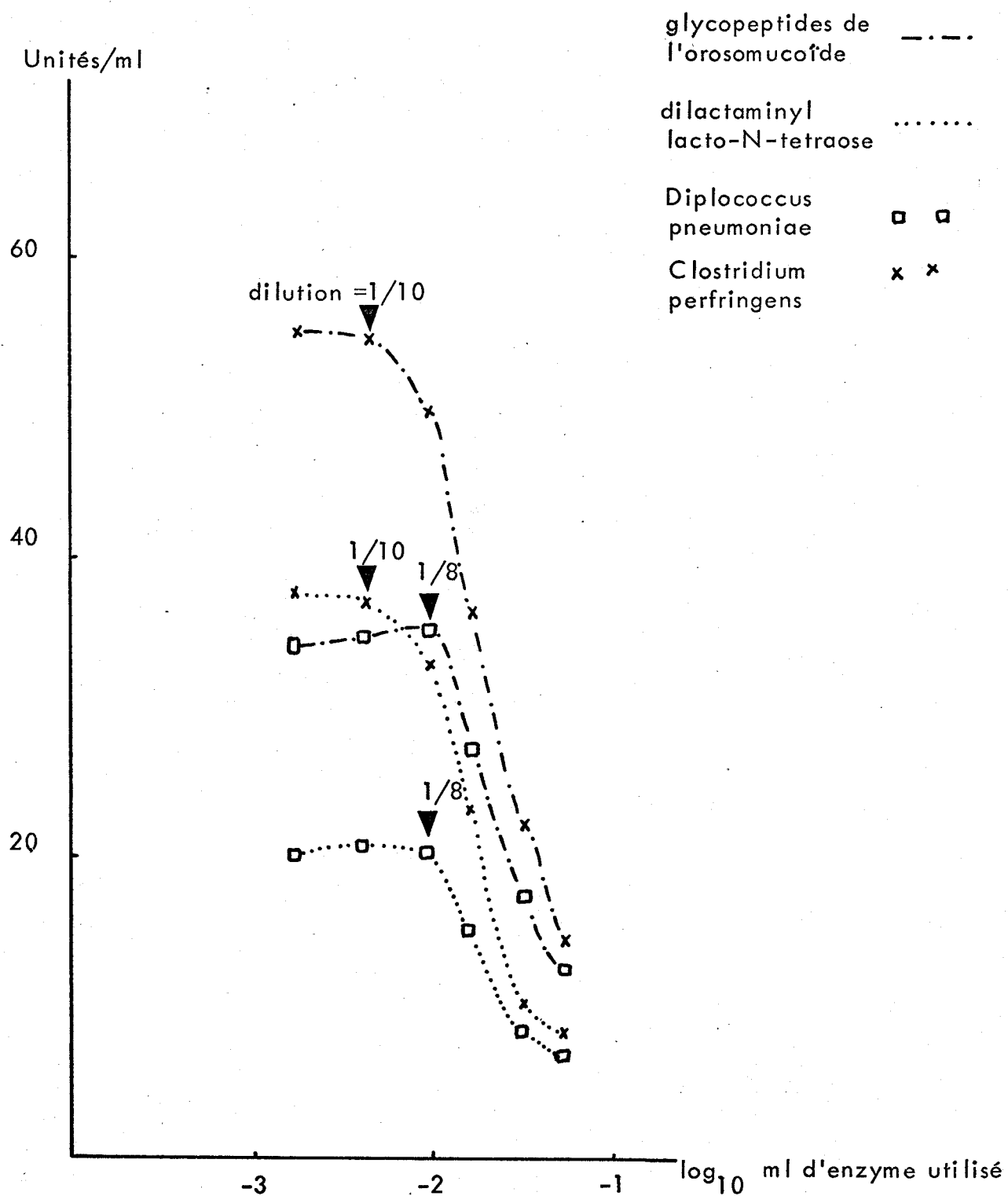


FIGURE N°20



AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

A - Détermination de la dilution de l'enzyme

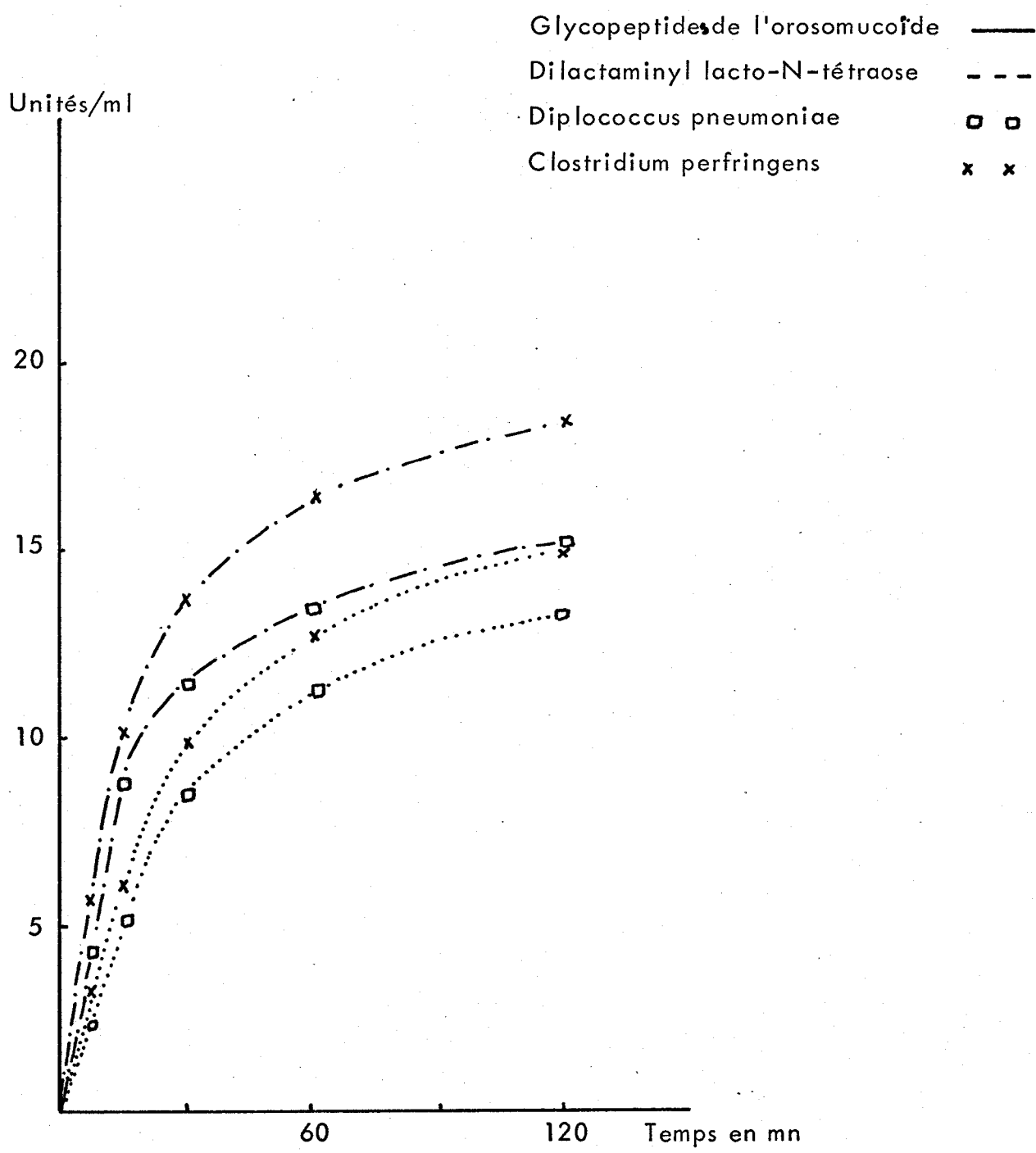


FIGURE N° 21

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

B - Détermination du temps d'hydrolyse



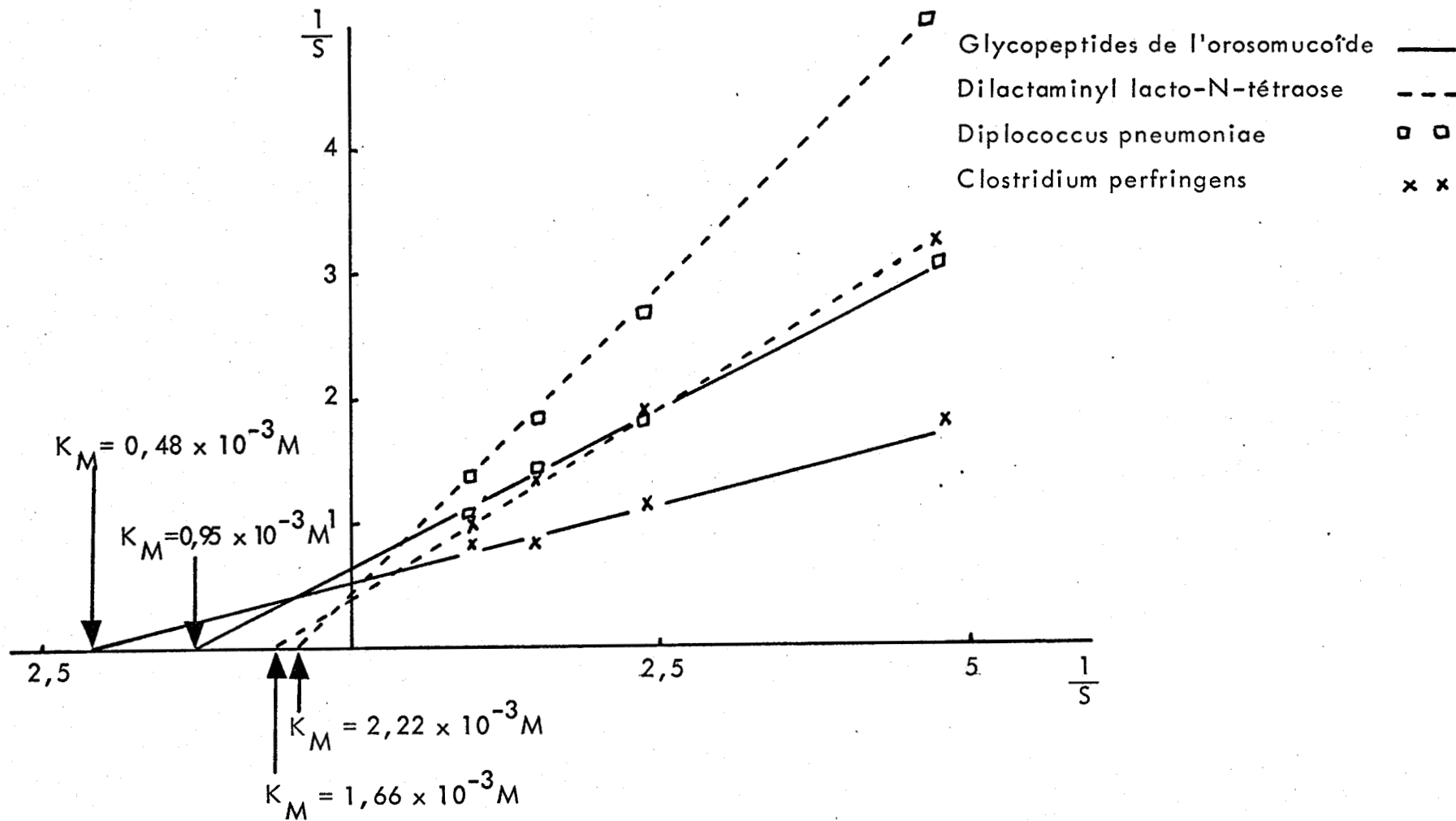


FIGURE N° 22

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR LES SUBSTRATS NATURELS

C - Détermination de la constante d'affinité



Les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (Figure n°22) permettent de déterminer la constante de Michaelis de l'enzyme de Diplococcus pneumoniae pour les glycopeptides d'orosomucoïde:

$$K_m = 0,95.10^{-3} \text{ M}$$

et de la neuraminidase de Clostridium perfringens pour ce substrat:

$$K_m = 0,48.10^{-3} \text{ M}$$

5°) Conclusions :

Les résultats obtenus (Tableau XII) permettent de conclure que :

- la neuraminidase de Clostridium perfringens possède une affinité pour les substrats naturels étudiés plus grande que l'enzyme de Diplococcus pneumoniae, sauf dans le cas des glycopeptides bronchiques pour lequel on note des résultats inverses.

- les constantes d'affinité varient avec l'origine de l'enzyme et la nature du substrat hydrolysé.

D - Action des effecteurs :

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées dans les conditions suivantes : à 100 μl de solution enzymatique on ajoute 200 μl du tampon adéquat et 100 μl de solution de substrat contenant les effecteurs.

L'hydrolyse est alors effectuée dans les conditions habituelles

L'influence des différents effecteurs sur les hydrolyses enzymatiques est analysée dans le Tableau XIII.

Les deux enzymes sont inhibés par le chlorure mercurique à la concentration finale de 2 mM, choisie par HUGHES et JEANLOZ (172).

Les autres cations influencent différemment l'action des deux neuraminidases :

les chlorures de manganèse, calcium, sodium et le mercaptoéthano ont une action inhibitrice plus importante pour la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae. A l'inverse les sels de zinc, magnésium, potassium ainsi que l'EDTA à la concentration finale de 20 mM et le Rivanol, étudié en raison de son utilisation dans la préparation de certains glycopeptides bronchiques, présentent une inhibition

Substrats	Constante de Michaelis K_m (en moles)	
	<u>Clostridium perfringens</u>	<u>Diplococcus pneumoniae</u>
Glycopeptides bronchiques	$0,44 \cdot 10^{-3}$	$0,35 \cdot 10^{-3}$
Dilactaminyllacto-N-tétraose	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$2,22 \cdot 10^{-3}$
Mucine de <u>Collocalia</u>	$0,25 \cdot 10^{-3}$	$0,40 \cdot 10^{-3}$
Glycopeptides de l'orosomu-cofde	$0,48 \cdot 10^{-3}$	$0,95 \cdot 10^{-3}$

TABLEAU XII

AFFINITE DES NEURAMINIDASES POUR DIFFERENTS SUBSTRATS NATURELS



Composé	Concentration finale en mM	Activité de la N.D.P. par rapport au témoin en %	Activité de la N.C.P. par rapport au témoin en %
HgCl ₂	2	0	3
MnCl ₂	2	44	97
CaCl ₂	2	80	76
ZnCl ₂	2	85	72
MgCl ₂	2	90	68
NaCl	2	71	81
KCl	2	94	85
E.D.T.A.	2	100	100
E.D.T.A.	20	150	68
Rivanol	2	100	36
Mercaptoéthanol	2	67	86
Cystéine	2	88	81

TABLEAU XIII

EFFET DE DIVERS COMPOSES SUR LES NEURAMINIDASES DE DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE (N.D.P.) ET DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (N.C.P.)



supérieure pour la neuraminidase de Clostridium perfringens.

Il faut remarquer que l'EDTA à la concentration faible de 2mM est sans action sur les deux enzymes alors qu'à une concentration 10 fois supérieure, il joue un rôle d'activateur pour la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae et d'inhibiteur pour la neuraminidase de Clostridium perfringens.

Nos résultats sont en accord avec ceux de HUGHES et JEANLOZ (173). Une divergence apparaît cependant quant au rôle activateur de l'EDTA à la concentration de 20 mM. L'influence des différents cations n'avait pas été étudiée sur la neuraminidase de Clostridium perfringens.

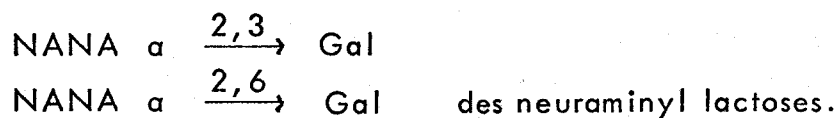
E - Spécificité de l'enzyme :

Afin de préciser la spécificité d'action des deux neuraminidases isolées, nous les avons fait agir sur des osides de structure connue puis sur des substrats naturels riches en acide sialique.

1°) Les neuraminyl-lactoses :

Nous avons à notre disposition un mélange de neuraminyl-lactoses dans lesquels l'acide N-acétyl-neuraminique est lié au galactose par une liaison $\alpha \xrightarrow{2,3}$ ou $\alpha \xrightarrow{2,6}$ et une préparation commercialisée de neuraminyl-lactose de colostrum bovin (CALBIOCHEM) contenant ces deux isomères mais avec une majorité de 3' neuraminyl-lactose. Leurs schémas de structure sont indiqués sur la Figure n°23.

Par hydrolyse enzymatique nous avons constaté la libération totale de l'acide sialique combiné des neuraminyl-lactoses. Les deux neuraminidases hydrolysent totalement les liaisons :



2°) Le dilactaminyllacto N-tetraose :

Cet oside* contient un acide N-acétyl-neuraminique lié en $\alpha \xrightarrow{2,3}$ au galactose et un acide N-acétyl-neuraminique lié en $\alpha \xrightarrow{2,6}$ à la N-acétyl-glucosamine. Son schéma de structure est indiqué sur la Figure n°24.

* Nous remercions Monsieur L. GRIMMONPREZ qui nous a aimablement fourni cet oside.

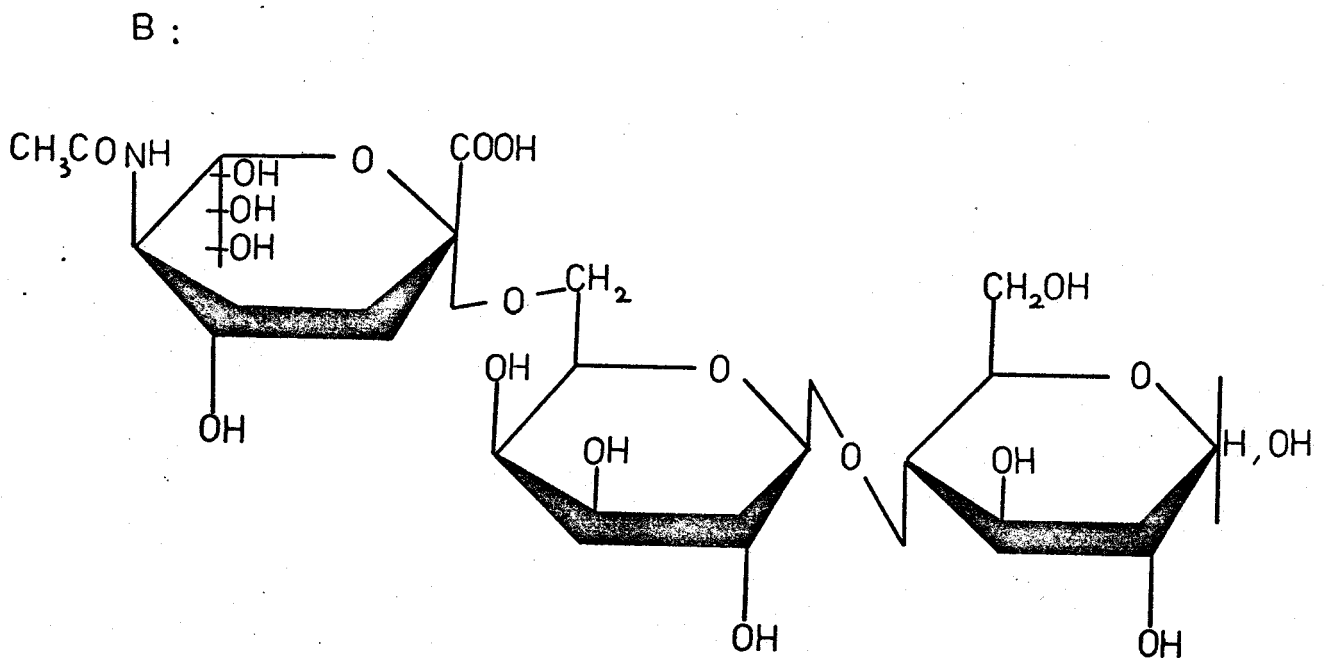
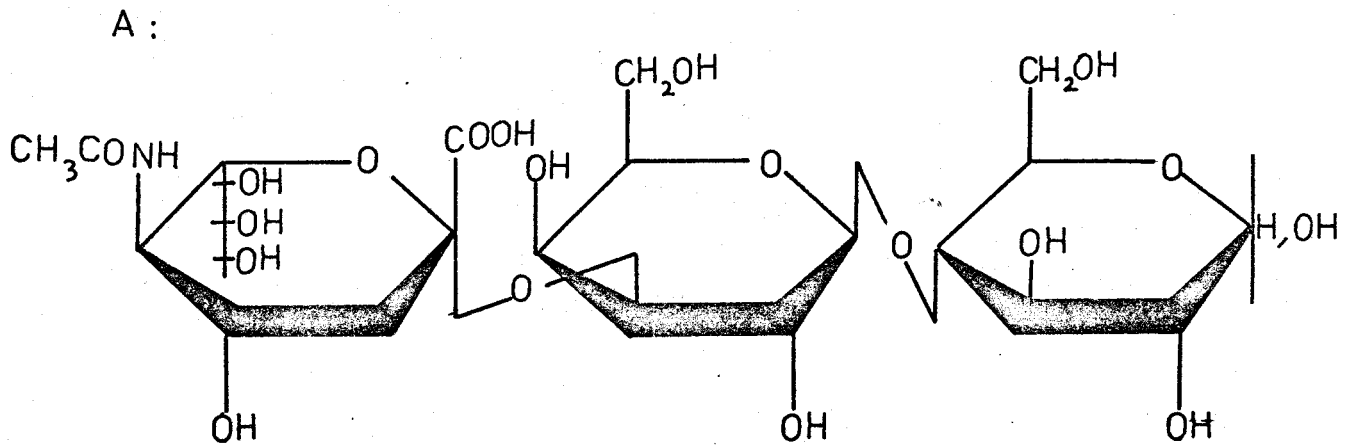


FIGURE N°23

OSIDE 1 : A : N-acetylneuraminosyl α $\xrightarrow{2,3}$ galactopyranosyl
 β $\xrightarrow{1,4}$ glucopyranose.

B : N-acetylneuraminosyl α $\xrightarrow{2,6}$ galactopyranosyl
 β $\xrightarrow{1,4}$ glucopyranose



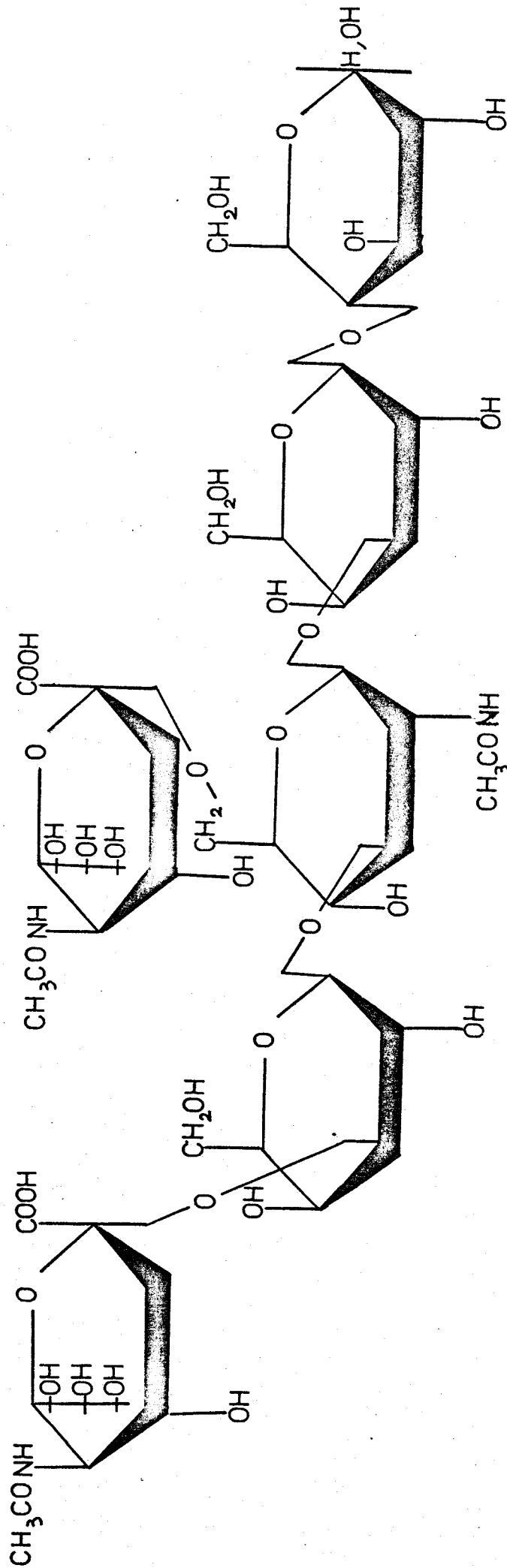


FIGURE N° 24

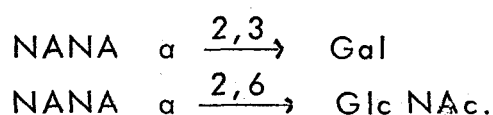
OSIDE 2 : N-acetylneuraminosyl α 2,3 \rightarrow galactopyranosyl β 1,3 \rightarrow
(N-acetylneuraminosyl α 2,6 \rightarrow) N-acetylglucopyranosyl β 1,3 \rightarrow
galactopyranosyl β 1,4 \rightarrow glucopyranose



(L. GIMMONPREZ et al.) (175)

Après avoir déterminé le pourcentage d'acide sialique combiné par hydrolyse en milieu sulfurique 0,1 N pendant 30 minutes à 80°C, nous avons fait agir les deux neuraminidases dans les solutions tampons appropriées pendant 24 heures à 37°C. Par dosage de l'acide sialique libéré par la méthode d'AMINOFF (174), nous avons constaté la libération totale de l'acide sialique combiné.

Nous avons conclu que les deux neuraminidases agissent sur les liaisons :



Pour commencer l'étude du comportement des préparations enzymatiques sur différents substrats naturels de poids moléculaire plus élevé, nous avons voulu vérifier les résultats de HUGHES et JEANLOZ (176) et de CASSIDY et al. (177) concernant l'hydrolyse de l' α_1 -glycoprotéine acide.

3°) α_1 -glycoprotéine acide :

L' α_1 -glycoprotéine acide préparée selon le protocole que nous avons décrit p. T₇ contient 11 p. 100 d'acide sialique, constitué uniquement d'acide N-acétyl-neuraminique (EYLAR et JEANLOZ) (178).

Cet acide N-acétyl neuraminique est lié à des résidus de galactose par des liaisons $\alpha \xrightarrow{2,3}$, $\alpha \xrightarrow{2,6}$, et $\alpha \xrightarrow{2,4}$ (JEANLOZ) (179)

Dans les conditions optimales d'hydrolyse utilisées, les deux neuraminidases bactériennes libèrent la totalité de l'acide N-acétyl-neuraminique (Tableau XIV).

4°) Mucine sous-maxillaire de mouton :

Une préparation de mucine sous-maxillaire de mouton contenant 17 p. 100 d'acide sialique nous a été aimablement fournie par le Docteur FOX.

Le groupement glycanique de la mucine sous-maxillaire de mouton (O.S.M.) est constitué du disaccharide : N-acetyl neuraminosyl $\alpha \xrightarrow{2,6}$ N-Acetylgalactosaminide (180).

Environ 800 disaccharides sont distribués le long de la chaîne peptidique, branchés tous les 6 amino acides.

Substrat hydrolysé	Pourcentage d'acide sialique libéré	
	<u>Diplococcus pneumoniae</u>	<u>Clostridium perfringens</u>
Orosomucoïde	100	100
O.S.M.	85	76
Mucine de <u>Collocalia</u>	100	100
Glycopeptides bronchiques	56	44
Mucine de mucoviscidose	74	94
Mucine intestinale de porc	10	33
Gangliosides	94	75

TABLEAU XIV

ACTION COMPARATIVE DES DEUX NEURAMINIDASES SUR DIFFERENTS SUBSTRATS



TULSIANI et CARUBELLI (181) avec une neuraminidase lysosomale de glandes mammaires de rat ne libèrent que 5,13 p. 100 et 4,77 p. 100 de l'acide sialique selon qu'ils utilisent la fraction légère ou la fraction lourde.

Par contre, GOTTSCHALK et al. (182) libèrent 80 p. 100 de l'acide N acetyl neuraminique de l'OSM par action de la neuraminidase de Vibrio cholerae.

ARONSON et DE DUVE (183) obtiennent une libération identique avec une neuraminidase lysosomale extraite de foie de rat.

Nous obtenons des résultats comparables à ceux de ces auteurs puisque toujours dans des conditions optimales d'hydrolyse, la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae libère 85 p. 100 de l'acide N-acetyl-neuraminique et la neuraminidase de Clostridium perfringens en libère 76,5 p. 100 (Tableau XIV).

5° Mucine de Collocalia :

La mucine de Collocalia est assez souvent utilisée comme substrat d'étude des neuraminidases en raison de sa richesse en acide sialique. Elle est facilement extraite de "nids d'hirondelles" par l'eau (HOWE et al.) (184) mais les essais de purification par diverses méthodes ont été sans succès (BIDDLE et BELYAVIN) (185).

KATHAN et WEEKS (185) ont déterminé la composition chimique de la mucine de Collocalia extraite par l'eau. Nous l'avons comparée à celle que nous avons déterminée pour la mucine de Collocalia purifiée par électrophorèse préparative en film liquide. (Tableau XV) : - les compositions en acides aminés sont assez voisines. On note cependant l'enrichissement de notre préparation en thréonine et proline. - les compositions en oses sont plus différentes : notre préparation moins riche en acide sialique, contient davantage d'osamines et d'hexoses. On constate l'absence de fucose.

En outre, après mesure du pouvoir rotatoire, ces auteurs ont défini l'acide sialique de la mucine de Collocalia comme de l'acide N, O₄-diacetyl-neuraminique ; la liaison glycosidique impliquant cet acide sialique est résistante et la neuraminidase de Vibrio cholerae est sensible à la neuraminidase du virus de l'Influenza A₂.

Par ailleurs, PEPPER (187) a montré que les liaisons glycosidiques de l'acide N, O₄ diacetyl-neuraminique du serum de cheval étaient

	selon * KATHAN et WEEKS (189)	-F ₃ - * (électrophorèse préparative)	F ₃ **
Asp	20,6	20,2	2,3
Thr	21,0	31,0	3,1
Ser	30,4	38,0	3,3
Glu	21,2	20,6	2,6
Pro	25,2	34,9	3,4
Gly	19,2	18,6	1,0
Ala	11,8	9,3	0,6
Val	20	25,4	2,5
Met	0,4	-	-
Ileu	7,3	6,8	0,7
Leu	15,6	15,1	1,7
Tyr	6,2	10,3	1,7
Phe	9,0	8,9	1,3
Lys	7,3	6,8	0,8
His	5,2	5,6	0,7
Arg	12,8	11,4	1,8
Cys	3,8	4,4	0,4
Fucose	4,2	0	0
Mannose	} 93,8	6,6	1,1
Galactose		122,1	20,8
Glucose		traces	-
N-Ac-galactosamine	} 63,7	46,9	8,5
N-Ac-glucosamine		49,4	9,0
Acide sialique	27,8	21,0	6,5

* Résultats exprimés en μ moles/100 mg

** Résultats exprimés en pourcentage du poids sec

TABLEAU XV

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MUCINE DE

COLLOCALIA



résistantes à la neuraminidase de Vibrio cholerae ; SCHAUER et FAILLARD (188) ont précisé que l'acide N,O₄-diacetyl-neuraminique de la mucine sous maxillaire de cheval n'était pas libéré par les neuraminidases de Vibrio cholerae et de Clostridium perfringens.

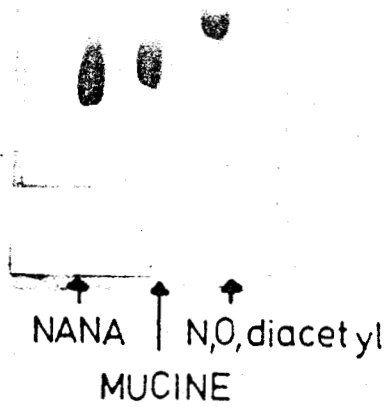
Comme CASSIDY et al. (190) libèrent 97 p. 100 de l'acide sialique de la mucine de Collocalia avec l'enzyme de Clostridium perfringens nous avons cherché à préciser la nature de l'acide sialique libéré de la mucine de Collocalia par notre préparation d'enzyme de Clostridium perfringens.

Après hydrolyse pendant 24 heures à 37°C de la mucine de Collocalia purifiée par la neuraminidase de Clostridium perfringens, l'hydrolysate est filtré sur colonne de Sephadex G 15 (2 x 160 cm) équilibrée en eau distillée. L'acide sialique libre retenu sur la colonne est élué plus tardivement que la mucine désialisée. Après lyophilisation, l'acide sialique est déposé sur colonne de Dowex AG 2 x 8 (1 x 26 cm) équilibrée en eau distillée. Après lavage de la colonne, l'acide sialique est élué par un gradient linéaire de molarité croissante en acide formique (0 à 2 N). L'acide sialique est alors caractérisé selon le protocole de GRANZER (191); l'acide sialique est étudié par chromatographie sur gel de silice dans le solvant Propanol/H₂O (7/3) en présence de témoins d'acide N-acétyl neuraminique et d'acide N,O₄-di-acétyl neuraminique[⊗]. La révélation par le réactif à l'orcinol trichloracétique (192) et l'anisidine (193) montre que cet acide sialique est composé essentiellement d'acide N-acétyl neuraminique. On révèle également une tache moins importante que nous n'avons pas identifiée (Figure n°25).

En chromatographie sur papier Whatman n°1 dans le système solvant de SVENNERHOLM (194) : butanol-propanol-acide chlorhydrique 0,1 N (1/2/1), après 18 heures de développement, et révélation par l'orcinol trichloracétique (194), l'acide sialique apparaît essentiellement sous forme d'acide N-acétyl-neuraminique (Figure n°25).

⊗ Nous remercions le Docteur SCHAUER qui nous a fait don d'acide N,O₄-diacétylneuraminique.

PrOH / H₂O
7 3
gel de silice 1 heure
anisidine



BuOH / PrOH / HCl 0,1N
1 2 1
W.n°1 18 heures
orcinol trichloracetique

N,O, diacetyl

NANA

MUCINE

FIGURE N° 25



IDENTIFICATION DE L'ACIDE SIALIQUE DE LA MUCINE
DE COLLOCALIA

6°) Mucine intestinale de porc :

La sensibilité de l'acide N-glycolyl neuraminique des mucines sous-maxillaires de porc à la neuraminidase de Clostridium perfringens est connue : CARLSON (195) et AMINOFF et al (196) obtiennent une libération de 95 p. 100 de l'acide N-glycolylneuraminique par hydrolyse enzymatique.

En conséquence, nous avons recherché la sensibilité des mucines intestinales de porc aux neuraminidases bactériennes que nous avons isolées.

La présence d'acide N-glycolyl neuraminique dans la structure des mucines intestinales de porc a été mise en évidence par DEGAND et al. (197). Pour des mucines obtenues par précipitation à pH = 2,3, le rapport NGNA est de 0,73. Ces mucines contiennent 2,6 p. 100 d'acide sialique (résultat NANA exprimé en acide N-acétyl neuraminique). Mais, le pourcentage de libération par hydrolyse enzymatique est faible : 33 p. 100 par la neuraminidase de Clostridium perfringens et 10 p. 100 par la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae (Tableau XIII).

7°) Glycopeptides bronchiques et mucines de mucoviscidose :

La nature et la liaison de l'acide sialique des glycopeptides bronchiques et des mucines de mucoviscidose contenant respectivement 6,5 et 7,2 p. 100 d'acide sialique ne sont pas encore connues. Il nous a cependant semblé intéressant d'étudier l'action des 2 préparations de neuraminidases sur ces 2 substrats (Tableau XIII).

8°) Gangliosides :

Les gangliosides sont des sphingolipides composés de ceramide et d'oses pouvant comporter hexoses, methylpentoses, osamines et acide N-acetyl-neuraminique.

De nombreux auteurs ont tenté d'hydrolyser les différents types de gangliosides et ont montré leur résistance à l'action des neuraminidases :

- les gangliosides GM_2 (Figures n° 26 et n°27) isolés de cerveaux d'enfants atteints de la maladie de Tay-Sachs ont été particulièrement étudiés : par KOLODNY et al. (198) qui libèrent l'acide sialique par une neurami-

nidase d'intestin de rat, par TALLMAN et BRADY (199) qui les utilisent comme substrat d'étude au cours de la purification d'une neuraminidase de coeur de rat.

WENGER et WARDELL (200) montrent l'activation de la neuraminidase de Clostridium perfringens (SIGMA, Type VI) par les sels de bile pour l'hydrolyse de ces gangliosides.

- HEIJLMAN et ROUKEMA (201) libèrent 40 p. 100 de l'acide sialique des gangliosides de cerveau de veau par hydrolyse par la neuraminidase isolée également de cerveau de veau. De ces mêmes gangliosides CASSIDY et al. (202) libèrent 40 p. 100 de l'acide sialique par action de la neuraminidase de Clostridium perfringens (ATCC 10543).

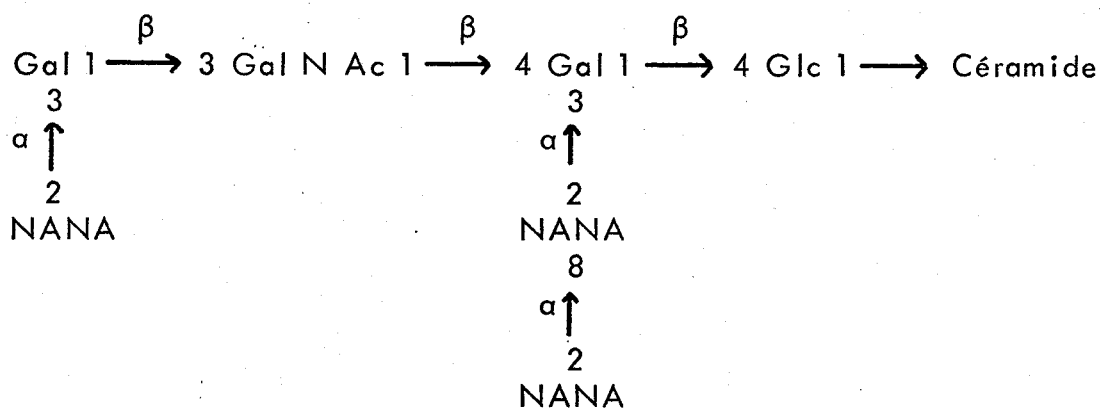
- MAHADEVAN et al. (203) ne libèrent que 20 p. 100 de l'acide sialique d'une préparation commerciale de gangliosides de cerveau de boeuf (Pierce Chemical Company) à l'aide d'une neuraminidase lysosomale de rein de rat.

- Les gangliosides de type II de cerveau de boeuf (SIGMA) sont peu sensibles à l'action de la neuraminidase de leucocytes (YEH et al. (204). Ils sont hydrolysés par la neuraminidase de Clostridium perfringens en présence de sels biliaires (WENGER et WARDELL) (205) alors que la neuraminidase de Vibrio cholerae se montre inactive (206).

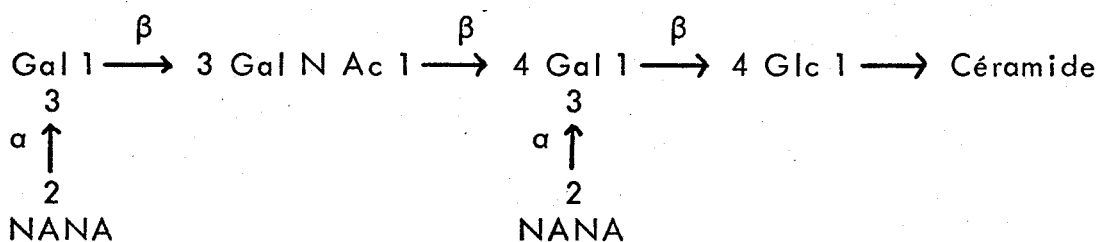
Enfin TETTAMENTI et al. (297) utilisent les gangliosides de type GD 1a (Figure n°26) comme substrat d'étude d'une neuraminidase de cerveau de lapin.

- Nous avons utilisé une préparation commerciale de gangliosides de cerveau de veau (SIGMA, G 2250) de type II obtenu selon le protocole décrit par TRAMS et al. (208) et contenant 12,3 p. 100 d'acide sialique. Dans les conditions optimales d'hydrolyse, les deux préparations de neuraminidase de Diplococcus pneumoniae et de Clostridium perfringens libèrent 94 p. 100 et 73 p. 100 de l'acide sialique (exprimé en acide N-acetyl neuraminique) des gangliosides de cerveau de veau mais nous ignorons la structure de ces gangliosides (Tableau XIV).

GANGLIOSIDES GT 1 :



GANGLIOSIDES GD 1 a :



GANGLIOSIDES GD 1 b :

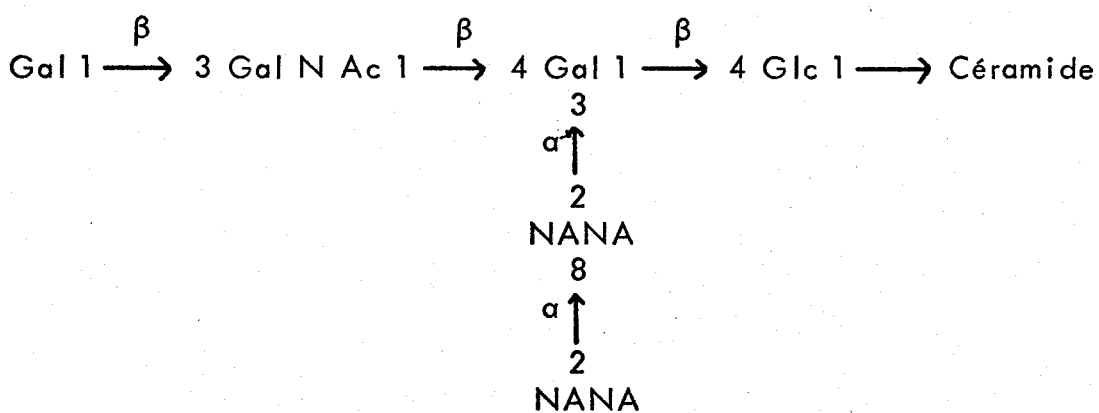
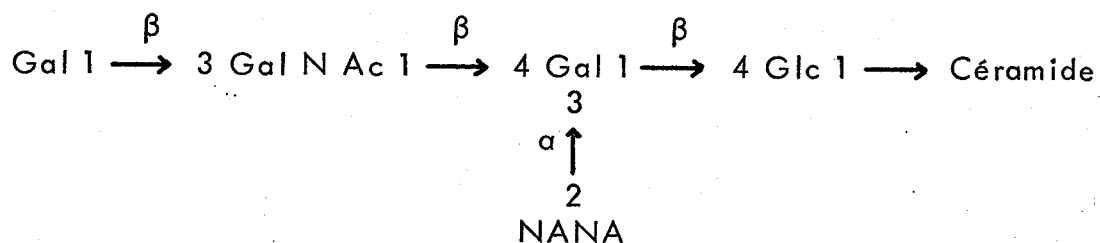


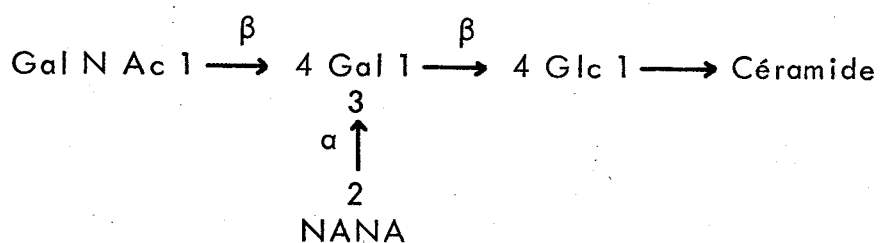
FIGURE N°26

STRUCTURE DE QUELQUES GANGLIOSIDES

GANGLIOSIDES GM 1 :



GANGLIOSIDES GM 2 (maladie de TAY-SACHS) :



GANGLIOSIDES GM 3 :

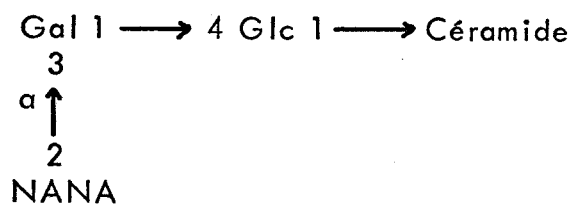


FIGURE N° 27

STRUCTURE DE QUELQUES GANGLIOSIDES

9°) Conclusions :

L'étude de la spécificité d'action des neuraminidases avait pour but de différencier les deux enzymes bactériens. Il semble pourtant difficile d'en tirer des conclusions dans ce sens.

Selon les résultats obtenus, notamment avec le dilactaminyllacto-N-tetraose, nous avons conclu que les deux neuraminidases présentaient une affinité importante pour les liaisons $\alpha, 2 \rightarrow 3$, $\alpha, 2 \rightarrow 6$. Il faut cependant y apporter la restriction suivante : l'hydrolyse de ces deux types de liaison a été effectuée sur de petits osides. Il n'intervient donc pas de problèmes d'environnement comme dans le cas de l'hydrolyse des substrats naturels.

Nous n'avons pu déterminer l'affinité des deux substrats pour la liaison $\alpha, 2 \rightarrow 8$, n'ayant pas disposé de substrats avec des liaisons $\alpha, 2 \rightarrow 8$ connues. Par contre, la libération complète de l'acide sialique de l'orosomucofide nous conduisit à penser que les enzymes que nous avons préparés sont actifs sur les liaisons $\alpha, 2 \rightarrow 4$ de l' α -glycoprotéine acide.

L'hydrolyse des substrats naturels ne permet pas de tirer de conclusions précises quant à la spécificité des enzymes et la nature des liaisons de l'acide sialique de ces substrats. En effet, il faut tenir compte de plusieurs facteurs :

- L'empêchement stérique qui intervient par exemple dans l'hydrolyse des gangliosides (substituant sur le carbone 4 du galactose auquel est lié l'acide N-acétylneuraminique).
- La taille de la molécule.
- Les conditions optimales d'hydrolyse qu'il faudrait redéfinir pour chaque substrat et chaque enzyme.

- DISCUSSIONS et CONCLUSIONS GENERALES -

La purification de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae est connue depuis les travaux de HUGHES et al. (209). Le protocole de ces auteurs comporte un fractionnement par le sulfate d'ammonium, une "absorption" sur DEAE-cellulose, un autre fractionnement par le sulfate d'ammonium et une chromatographie d'échange ionique sur CM-cellulose. Les modifications que nous avons apportées à la méthode portent :

1°) sur les conditions d'élution de la "batch absorption" sur DEAE-cellulose : l'élution de la DEAE-cellulose par un tampon phosphate 0,01 M permet l'élimination d'une importante fraction protéique sans activité enzymatique.

2°) sur les conditions d'élution de la chromatographie sur CM-cellulose, nous obtenons ainsi la neuraminidase en solution dans le tampon phosphate-citrate 0,1 M au pH optimum d'action 6,5. Le rendement et l'activité spécifique de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae n'ont pas été diminués par ces modifications

La neuraminidase de Clostridium perfringens, souche ATCC 10543, a été isolée et purifiée par CASSIDY et al. (210). Ce protocole fait appel à une chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 75 et à une chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose. La chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 75 appliquée à la culture de Clostridium perfringens, souche 33-4A permet l'élimination d'une fraction sans activité enzymatique. Par contre, nous n'avons pas pu reproduire de façon satisfaisante la chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose utilisée par les auteurs. D'autre part, nous avons constaté la présence de glycosidases contaminantes non signalées par les auteurs. Aussi, le protocole de purification que nous avons utilisé fait appel essentiellement à la chromatographie de gel filtration, sur Sephadex G 75 et sur Sephadex G 200. Toutefois, bien que le rendement obtenu soit satisfaisant, la neuraminidase de Clostridium perfringens préparée est de faible activité spécifique.

En effet, si nous comparons le titre enzymatique de nos préparations à celui d'autres neuraminidases commercialisées (Tableau XVI), déterminé sur l'a₁

Origine de la neuraminidase	Activité spécifique
Clostridium perfringens (SIGMA "type V")	313
Clostridium perfringens (SIGMA "type VI")	1011
Vibrio cholerae (BEHRINGWERKE)	2960
Diplococcus pneumoniae (préparation personnelle)	1230
Clostridium perfringens type 33-4 A (préparation personnelle)	146

TABLEAU XVI



glycoprotéine acide dans les conditions optimales de tampon et de pH de chaque type de neuraminidase, nous constatons que l'activité de l'enzyme de Diplococcus pneumoniae est inférieure à l'activité de la neuraminidase de Vibrio cholerae et comparable à l'activité de la neuraminidase de Clostridium perfringens SIGMA type VI alors que la neuraminidase de Clostridium perfringens, souche 33-4 A, que nous avons purifiée présente une activité inférieure à celle des enzymes commercialisés.

De l'étude comparative menée simultanément sur les deux préparations enzymatiques, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1 - Les deux neuraminidases ont un comportement différent en isoélectrofocalisation. La neuraminidase de Clostridium perfringens présente un point isoélectrique de 4,7 et apparaît homogène alors que l'enzyme de Diplococcus pneumoniae se présente sous deux formes dont les points isoélectriques sont de 4,2 et de 3,7. Ceci est à rapprocher des travaux de TANENBAUM et al. (211) qui mettent en évidence l'hétérogénéité de l'enzyme de Diplococcus pneumoniae en séparant plusieurs formes de neuraminidases par chromatographie d'échange ionique.

2 - L'étude d'un immunsérum préparé à l'aide d'une fraction brute des exoenzymes de Diplococcus pneumoniae n'a pas permis de retrouver le caractère antigénique de la neuraminidase établi par LEE et al. (212). En effet, l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle et l'immunodiffusion ont montré l'existence d'un complexe antigène-anticorps entre l'immunsérum et les deux préparations de neuraminidases bactériennes non purifiées. Ce complexe n'existant plus lorsque l'immunsérum est en présence de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae purifiée. Il apparaît que l'antigène a été dissocié de l'enzyme en cours de purification. D'autre part, l'immunofluorescence montre que l'antigène est commun aux deux souches bactériennes et fait partie de la paroi de Clostridium perfringens.

3 - L'étude des variations des activités enzymatiques en fonction du pH, de la température et des effecteurs permet de déterminer les conditions optimales d'action de chaque enzyme : cette étude réalisée à l'aide de glycopeptides bronchiques montre des conditions d'action peu différentes pour les deux enzymes bactériens : la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae a une activité optimale

en tampon phosphate-citrate 0,1 M ajusté à pH = 6,5 à 37°C : la neuraminidase de Clostridium perfringens a une activité optimale en tampon acétate de sodium 0,1 M ajusté à pH = 5,0 à 37°C. La présence d'ions spécifiques n'est nécessaire à aucun des deux enzymes bactériens. On note cependant un effet inhibiteur plus important des sels de manganèse, calcium, sodium et du mercapto-éthanol pour la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae

4 - L'analyse de la spécificité des deux préparations de neuraminidases permet de préciser les points suivants :

α - L'acide N-acétyl-neuraminique présent dans le neuraminyl-lactose, le dilactaminyllacto-N-tétraose, l'orosomucoïde, par exemple, est toujours facilement libéré.

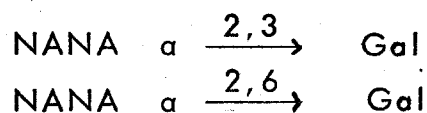
β - D'après KATHAN et al. (213) la mucine de Collocalia ne contenait que de l'acide N, O₄-diacétyl neuraminique. On sait que les liaisons de l'acide N, O₄-diacétyl neuraminique sont résistantes aux neuraminidases (214, 215). Or, l'acide sialique de la mucine de Collocalia est quantitativement libéré par les deux types de neuraminidases. Pour tenter d'expliquer cette contradiction, nous avons isolé et caractérisé à nouveau l'acide sialique de Collocalia et démontré qu'il s'agissait essentiellement d'acide N-acétyl-neuraminique.

α - L'acide N-glycolyl-neuraminique est présent dans les mucines intestinales de porc dans le rapport $\frac{NGNA}{NANA} = 0,73$

Nous avons vu que la libération de l'acide sialique n'était pas quantitative.

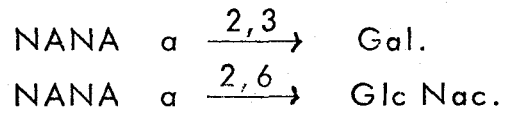
5 - L'ensemble des résultats fournis par l'hydrolyse de substrats riches en acide sialique nous amène aux conclusions suivantes quant à la spécificité de liaison :

α - L'hydrolyse totale des neuraminyl-lactoses montre la sensibilité des liaisons



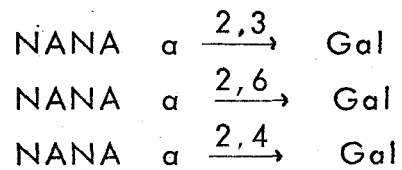
aux deux neuraminidases bactériennes.

β - L'affinité importante, principalement celle de Clostridium perfringens pour le dilactaminyl-lacto-N-tetraose et la libération quantitative de l'acide sialique de ce substrat montre la sensibilité des liaisons



aux neuraminidases bactériennes.

α - L'affinité des neuraminidases, surtout celle de Clostridium perfringens pour l'orosomucoïde et la libération complète de l'acide sialique de ce substrat montre la sensibilité des liaisons



de l'orosomucoïde aux deux préparations enzymatiques.

- Les neuraminidases de Diplococcus pneumoniae et de Clostridium perfringens libèrent respectivement 85 p. 100 et 76 p. 100 de l'acide N-acétyl neuraminique du disaccharide $\text{NANA } \alpha \xrightarrow{2,6} \text{ Gal Nac.}$ qui constitue le groupement glycanique de la mucine sous-maxillaire de mouton, montrant ainsi la sensibilité de cette liaison aux neuraminidases bactériennes.

- Enfin, l'action des neuraminidases sur les substrats naturels de structure inconnue tels que les glycopeptides bronchiques, les mucines de mucoviscidose ou les gangliosides que nous avons étudiés, est difficilement interprétable, car il faut tenir compte :

- de la présence de liaisons difficiles à hydrolyser.
- de l'existence d'une conformation spatiale telle que l'intervention des enzymes ne puisse avoir lieu.

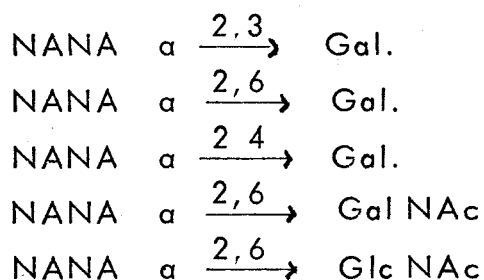
En résumé, le but de cette étude était de déterminer une spécificité étroite pour chaque enzyme. En fait, nous avons conclu :

- à une affinité élevée des deux enzymes pour l'acide

N-acétyl neuraminique.

- à une affinité plus importante de la neuraminidase de Clostridium perfringens pour l'acide sialique de la mucine intestinale de porc qui contient 42 p. 100 d'acide N-glycolyl-neuraminique.

- à la sensibilité des liaisons



aux deux neuraminidases bactériennes.

Enfin, l'étude de l'affinité des neuraminidases bactériennes pour quelques substrats naturels a montré la grande sensibilité des glycopeptides bronchiques à la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae.

Il apparaît donc raisonnable d'envisager l'application éventuelle de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae dans le traitement des hyper-sécrétions bronchiques. Toutefois, la sensibilité des mucus aux neuraminidases varie :

- pour un même type de sécrétion, d'un mucus à l'autre.

- s'il s'agit d'une hypersécrétion due à une bronchite chronique ou à la mucoviscidose et une étude plus approfondie de ces variations permettra peut être d'y apporter une explication.

RESUME DES TRAVAUX

Nous avons mis au point des protocoles commodes de purification de deux neuraminidases bactériennes isolées des cultures de Diplococcus pneumoniae et de Clostridium perfringens qui permettent d'obtenir des préparations de très bonne activité.

Toutefois, la purification de la neuraminidase de Clostridium perfringens est plus délicate à cause de son instabilité.

Nous avons précisé les principaux paramètres d'activité (pH, tampon, température, effecteurs) de ces deux enzymes.

L'étude de leur spécificité d'action montre que les deux enzymes ont une grande affinité pour l'acide N-acétylneuraminique, que l'enzyme de Clostridium perfringens a une affinité plus grande pour l'acide N-glycolylneuraminique. Enfin, les deux neuraminidases coupent indifféremment les liaisons $\text{NANA} \alpha \xrightarrow{2,3} \text{Gal}$, $\text{NANA} \alpha \xrightarrow{2,6} \text{Gal}$, $\text{NANA} \alpha \xrightarrow{2,4} \text{Gal}$, $\text{NANA} \alpha \xrightarrow{2,6} \text{Gal N Ac.}$, $\text{NANA} \alpha \xrightarrow{2,6} \text{Glc N Ac.}$ Elles ont été appliquées à l'étude des sialomucines bronchiques.

- BIBLIOGRAPHIE -

	Références	Pages
ADA G. L., FRENCH E. L. and LIND P. E. (1961)	(42)	p. 4
Purification and properties of neuraminidase from <u>Vibrio cholerae</u>	(87)	p. 12
<u>J. Gen. Microbiol.</u> , <u>24</u> , 409-421.		
AMINOFF D., (1961)	(141)	p. 22
Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.	(174)	p. 67
<u>Biochem. J.</u> , <u>81</u> , 384-392 .		
AMINOFF and FURUKAWA K. (1970)	(145)	p. 24
Enzymes that destroy blood group specificity.	(151)	p. 28
I - Purification and properties of α -L-fucosidase from <u>Clostridium perfringens</u> .		
<u>J. Biol. Chem.</u> , <u>245</u> , 1659-1669 .		
AMINOFF D. and MORROW M. P. (1970)	(146)	p. 73
Effect of sialidase on blood group of hog submaxillary glycoproteins.		
<u>FEBS Letters</u> , <u>8</u> , 353-358 .		
ANSON M. L. (1938)	(146)	p. 25
Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin.		
<u>J. Gen. Physiol.</u> , <u>22</u> , 79-89.		

	Références	Pages
APOSTOLOV K., FLEWETT T.H. and KENDAL A.P.(1970) The biology of large RNA viruses.	(22)	p. 5
BARRY R.D. and MAHY B.W.J. (Eds), Academic Press, New-York and London, p.3 .		
ARONSON N.H. and DE DUVE C. (1968) Digestive activity of lysosomes. II - The digestion of macromolecular carbohydrates by extracts of rat liver lysosomes. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>243</u> , 4564-4573 .	(183)	p. 69
BLAKE E. and DRZENIEK R. (1969) <u>Clostridium perfringens</u> neuraminidase. <u>Z. Naturforsch</u> , <u>24</u> , 599-603,	(78)	p. 11
BIDDLE F. and BELYAVIN G. (1963) The haemagglutination inhibitor in edible bird-nest ; its biological and physical properties. <u>J. Gen. Microbiol.</u> , <u>31</u> , 31-34 .	(185)	p. 69
BLIX G. and LINDBERG E. (1960) The sialic acids of Bovine and Equine submaxillary mucins. <u>Acta Chem. Scand.</u> , <u>14</u> . 1809-1814 .	(108) (111)	p. 16 p. 16
BLIX G., LINDBERG E., ODIN L. and WERNER I., (1956) On the presence of sialic acid in certain glycoprotein and in gangliosides. <u>Acta Soc. Med. Upsalien</u> , <u>61</u> , 1-25 .	(105)	p. 16
BOSCHMANT.A.C. and JACOBS J.,(1965) The influence of ethylenediaminetetraacetate on various neuraminidases. <u>Biochem. J.</u> , <u>342</u> , 532-541 .	(129)	p. 17

	Références	Pages
<p>BURNET F.M., Mc CREA J.F. and STONE J.D. (1946) Modification of human red cells by virus action. I - The receptor gradient for virus action in human red cells. <u>Brit. J. Exptl. Pathol.</u>, <u>27</u>, 228-235 .</p>	(8)(9)	p. 2
<p>BURNET F.M. and STONE J.D. (1947) The Receptor - Destroying Enzyme of <u>V. cholerae</u>. <u>Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.</u>, <u>25</u> 227-233.</p>	(11)	p. 2
<p>CARLSON D.M. (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. <u>J. Biol. Chem.</u>, <u>243</u>, 616-626 .</p>	(195)	p. 73
<p>CARUBELLI R., TRUCCO R.E. and CAPUTTO R. (1962) Neuraminidase activity in mammalian organs. <u>Biochim. Biophys. Acta</u>, <u>60</u>, 196-197.</p>	(72)	p. 8
<p>CASSIDY J.T., JOURDIAN G.W. and ROSEMAN S. (1965) The sialic acids. VI - Purification and properties of sialidase from <u>Clostridium perfringens</u>. <u>J. Biol. Chem.</u>, <u>240</u>, 3501-3506 .</p>	(68)(88) (102) (160)(161) (163)(164) (177)(190) (202)(210)	p.p. 8, 12 p. 14 p. 38 p. 41 p.p. 67,7 p.p. 74-7
<p>COMB D.G., WATSON B.R. and ROSEMAN S. (1966) The sialic acids. IX - Isolation of cytidine 5' -monophospho-N-acetyl neuraminic acid from <u>Escherichia Coli K 235</u> <u>J. Biol. Chem.</u>, <u>241</u>, 5637-5642 .</p>	(100)	p. 14

	Références	Pages
CUATRE CASAS P. and ILLIANO G., (1971) Purification of neuraminidases from <u>Vibrio cholerae</u> , <u>Clostridium perfringens</u> and <u>Influenza</u> virus by affinity chromatography. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> , <u>44</u> , 178-184 .	(71)	p. 8
DE BURGH P.M., YU P.C., HOWE C. and BOVARNICK M., (1948) Preparation from human red cells of a substance inhibiting virus hemagglutination. <u>J. Exptl. Med.</u> , <u>87</u> , 1-9 .	(14)	p. 2
DEGAND P., GAVERIAUX M. et HAVEZ R. (1972) Définition biochimique des sulfomucines et des sialomucines de l'intestin grêle de porc. <u>C.R. Soc. Biol.</u> , <u>166</u> , 622-627	(154) (197)	p. 30 p. 73
DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G., (1965) Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de l' α_2 -macroglobuline de porc. <u>Bull. Soc. Chim. - France</u> , <u>12</u> , 3506-3511	(157)	p. 32
DISCHE Z., (1947) A new specific color reaction of hexuronic acids. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>167</u> , 189-198 .	(158)	p. 32
DRZENIEK R., (1968) Habilitation Thesis, GIESSEN.	(75)	p. 11
DRZENIEK R., BÖGEL K. and ROTT R., (1967) On the classification of bovine <u>para influenza 3</u> viruses. <u>Virology</u> , <u>31</u> , 725-727 .	(25)	p. 5

	Références	Pages
DRZENIEK R. and GAUHE A., (1970) Differences in substrate specificity of myxovirus neuraminidases. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> , <u>38</u> , 651-656.	(101)	p. 14
DRZENIEK R., SETO J.T. and ROTT R., (1966) Characterization of neuraminidases from myxoviruses. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>128</u> , 547-558.	(25) [*] (64)	p. 5 p. 8
EYLAR E.H. and JEANLOZ R.W. (1962) Periodate oxydation of the α_1 acid glycoprotein of human plasma <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>237</u> , 1021-1025.	(178)	p. 67
FAILLARD H., (1957) Über die abspaltung von N-acetylneuraminisäure aus mucinen durch das "Receptor-Destroying-Enzyme" aus <u>Vibrio cholerae</u> . <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , <u>307</u> , 62-86.	(19)	p. 2
FAILLARD H., DO AMARAL C.F. and BLOHM M. (1969) Untersuchungen zur enzymatischen spezifität der neuraminidase und N-acyl-neuraminat-lyase in bezug auf die N-substitution. <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , <u>350</u> , 798-802.	(104)	p. 15
FINDLAY J., LEVY G.A. and MARSH C.A., (1958) Inhibition of glycosidases by aldonolactoses of corresponding configuration. 2 - Inhibitors of β -N-acetylglucosaminidase. <u>Biochem. J.</u> , <u>69</u> 467-476.	(144)	p. 24

	Références	Pages
<p>FRENCH E.L. and ADA G.L. (1959)</p> <p>Stimulation of the production of neuraminidase de <u>Vibrio cholerae</u> cultures by N-A-N-A and sialyl lactose</p> <p style="text-align: center;"><u>J. Gen. Microbiol.</u>, <u>21</u>, 550-560.</p>	(43)	p. 4
<p>GADALLA M.S.A., COLLEE T.G. and BARR W.A. (1968)</p> <p>The relation of the neuraminidase of <u>Clostridium septicum</u> to the hemagglutination and other soluble products of the organism. - Note on substrates for neuraminidase.</p> <p style="text-align: center;"><u>J. Pathol. Bacteriol.</u>, <u>96</u>, 169-185.</p>	(33)	p. 6
<p>GERNEZ-RIEUX C., BISERTE G., HAVEZ R., VOISIN C., ROUSSEL P. et DEGAND P. (1964)</p> <p>Etude de l'activité in vitro des différents agents réduisant la viscosité de l'expectoration.</p> <p style="text-align: center;"><u>Acta Tuberc. Pneum. Belgica</u>, <u>55</u>, 158-</p>	(1)	p. 1
<p>GIELEN W., ETZRODT J. and UHLENBRUCK G. (1969)</p> <p>Über eine Neuraminidase in den thrombozyten und erythrozyten der rinder.</p> <p style="text-align: center;"><u>Thromb. Diath. Haemorrhag.</u>, <u>22</u>, 203-207.</p>	(46)	p. 7
<p>GOTTSCHALK A., (1956)</p> <p>The linkage of sialic acid in mucoprotein</p> <p style="text-align: center;"><u>Biochim. Biophys. Acta</u>, <u>20</u>, 560-561 .</p>	(16)	p. 2
<p>GOTTSCHALK A., (1957)</p> <p>Neuraminidase : the specific enzyme of <u>Influenza virus</u> and <u>Vibrio cholerae</u></p> <p style="text-align: center;"><u>Biochim. Biophys. Acta</u>, <u>23</u>, 645-646 .</p>	(17)(20)	p. 2

	Références	Pages
GOTTSCHALK A., and FAZEKAS DE ST GROTH S. (1960) S tudies on mucoproteins. III - The accessibility to trypsin of the susceptible bonds in ovine submaxillary gland mucoprotein . <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>43</u> , 513-519.	(182)	p. 69
GOTTSCHALK A. and LIND P. E., (1949) Product of interaction between Influenza virus enzyme and ovomucin. <u>Nature</u> , <u>164</u> , 232-233 .	(15)	p. 2
GRAHAM E.R.B. and GOTTSCHALK A., (1960) Studies on mucoproteins. I - The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein . <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>38</u> , 513-523 .	(180)	p. 67
GRANZER E., (1962) Dünnschicht chromatographie von neuraminsäure derivaten <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , <u>328</u> , 277-279.	(191)	p. 71
GREGORIADES A., (1972) Isolation of neuraminidase from the WSN strain of <u>Influenza</u> virus. <u>Virology</u> , <u>49</u> , 333-336 .		
GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., (1970) Détermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de Femme : le dilactaminyllacto-N-tetraose. <u>Eur. J. Biochem.</u> , <u>13</u> , 484-492	(175)	p. 66

	Références	Pages
HAKOMORI S. and SAITO T., (1969) Isolation and characterization of a glycosphingolipid having a new sialic acid. <u>Biochemistry</u> , <u>8</u> , 5082-5088.	(113)	p. 16
HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G. (1967) Etude des structures fibrillaires de la sécrétion bronchique <u>Clin. Chim. Acta</u> , <u>17</u> , 281-295.	(5)	p. 1
HAYANO S. and TANAKA A., (1967) Streptococcal sialidase. I - Isolation and properties of sialidase produced by group K <u>Streptococcus</u> . <u>J. Bacteriol.</u> , <u>93</u> , 1753-1757.	(36) (90)	p. 6 p. 12
HAYANO S. and TANAKA A., (1969) Sialidase-like enzymes produced by group A, B, C, G and L <u>Streptococci</u> and by <u>Streptococcus sanguis</u> . <u>J. Bacteriol.</u> , <u>97</u> , 1328-1333.	(36) [*]	p. 6
HEIJLMAN J. and ROUKEMA P.A. (1972) The action of calf brain sialidase on gangliosides, sialoglycoproteins and sialoglycopeptides. <u>J. Neurochem.</u> , <u>19</u> , 2567-2575.	(201)	p. 74
HEIMER R. and MEYER K. (1956) Sialic acid of submaxillary mucoid. <u>Proc. Natl. Acad. Sci.</u> , U.S.A., <u>42</u> , 728-734.	(34)	p. 6
HIRST G.K., (1942) The quantitative determination of <u>Influenza</u> virus and antibodies by means of red cells agglutination. <u>J. Exptl. Med.</u> , 1942, <u>75</u> , 49-64.	(7)	p. 2

	Références	Pages
HIRST G.K. (1945) Ann. Rept. Intern. Health Div. Rockefeller Found, <u>50</u> , 339	(12)	p. 2
HORVAT A., TOUSTER O., (1968) On the lysozomal occurrence and the properties of the neuraminidase of rat liver and of Ehrlich ascite tumor cells <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>243</u> , 4380-4390.	(55)	p. 4
HOTTA K. and KUROKAWA.M., (1970) Isolation and identification of two sialic acids from the jelly coat of sea urchin eggs. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>245</u> , 6307-6311.	(118)	p. 16
HOUDRET N, (1971) Purification de la neuraminidase de <u>Diplococcus</u> <u>pneumoniae</u> D.E.A. mention Biochimie, Lille	(148)	p. 25
HOWE C., LEE L.T. and ROSE H.M. (1961) <u>Collocalia mucoïd</u> : a substrate for myx ovirus neuro- minidase. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , <u>95</u> , 512-520.	(155) (156) (184)	p. 30 p. 32 p. 69
HOWE C., Mac LENNAN J.D., MANDL J. and KABAT E.A. (1957) Enzymes of <u>Clostridium tertium</u> . Effects on blood groups and virus. <u>J. Bacteriol.</u> , <u>74</u> , 365-376.	(31)	p. 6

	Références	Pages
HUGHES R.C. and JEANLOZ R.W., (1964)	(66)(89)	p.p. 8,12
The extracellular glycosidases of <u>Diplococcus pneumoniae</u>	(125)(147)	p.p. 17,25
I - Purification and properties of a neuraminidase and a	(152)(159)	p.p. 29,38
β -galactosidase. Action on the α_1 -acid glycoprotein of	(162)(172)	p.p. 41,61
human plasma.	(172)(173)	p.p. 61,64
<u>Biochemistry</u> , 3, 1535-1543.	(176)(209)	p.p. 67,78
ISHIZUKA I., KLOPPENBURG M. and WIEGANDT H.,	(110)	p. 16
(1970)		
Characterization of gangliosides from fish brain.		
<u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 210, 299-305.		
JEANLOZ R.W., (1972)	(179)	p. 67
α_1 -acid glycoprotein		
in "Glycoproteins : their composition, structure and		
function".		
A. GOTTSCHALK (Ed.) p. 565-611		
KATHAN R.H. and WEEKS D.I., (1969)	(107)	p. 16
Structure studies of <u>Collocalia mucofd</u> - I - carbo-	(185)	p. 69
hydrate and amino acid composition.	(189)	p. 70
<u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , 134, 572-576.	(213)	p. 81
KELLY R.T. and GREIFF D., (1965)	(52)	p. 7
Neuraminidase and neuraminidase - labile substrates in		
experimental <u>Influenza virus encephalitis</u> .		
<u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 110, 548-553.		
KELLY R.T., GREIFF D. and FARMER S., (1966)	(43)	p. 4
Neuraminidase activity in <u>Diplococcus pneumoniae</u>		
<u>J. Bacteriol.</u> , 91, 601-603.		
KENDAL A.P., BIDDLE F. and BELY AVIN G., (1968)	(73)	p. 11
<u>Influenza virus neuraminidase and the viral surface</u> .		
<u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 165, 419-481.		

	Références	Pages
KLEVSTRAND R. and NORDAL A. (1950) Spraying reagent for paper chromatograms specific for ketoheptoses. <u>Acta. Chem. Scand.</u> , <u>4</u> , 1320	(192)	p. 71
KOLODNY E.H., KANFER J., QUIRK J.M. and BRADY R.O., (1971) Properties of a particle-bound enzyme from rat intes- tine that cleaves sialic acid from Tay-Sachs gangliosides <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>246</u> , 1426-1431.	(198)	p. 73
KUHN R. and BROSSMER R., (1958) Constitution of lactaminic acid lactose- α -ketosidase effect of viruses of the influenza group. <u>Angew. Chem.</u> , <u>70</u> , 25-26.	(18)(23)	p. 2
LAURELL A.B. (1959) Neuraminidase-like factors in cultures of pneumococci alpha-streptococci and <u>Pasteurella pseudotuberculosis</u> . <u>Acta Pathol. Microbiol. Scand.</u> , <u>47</u> , 182-190.	(35)(39)	p. 6
LAVAR W.G. and KILBOURNE E.D. (1966) Identification in a recombinant <u>Influenza</u> virus of struc- tural proteins derived from both parents. <u>Virology</u> , <u>30</u> , 403-501.	(58)	p. 4
LAVAR W.G. and VALENTINE R.C., (1969) Morphology of the isolated hemagglutinin and neuramini- dase subunits of <u>Influenza</u> virus. <u>Virology</u> , <u>38</u> , 105-119.	(26) (59)	p. 4 p. 4
LEE L.T. and HOWE C., (1965) Pneumococcal neuraminidase. <u>J. Bacteriol.</u> , <u>91</u> , 1418-1425.	(169) (212)	p. 43 p. 79

- | | Références | Pages |
|---|------------|-------|
| LEIBOWITZ Z. and GATT S. (1968)
Enzymatic hydrolysis of sphingo lipids
VII - Hydrolysis of gangliosides by a neuraminidase from calf brain.
<u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>152</u> , 136-143. | (54) | p. 7 |
| LIEBERMAN J., (1968)
Measurement of sputum viscosity in a cone plate viscosimeter II - An evaluation on mucolytic agents in vitro.
<u>Amer. Rev. Resp. Dis.</u> , <u>97</u> , 662-672 . | (2) | p. 1 |
| LINEWEAVER H. and BURK D. (1934)
The determination of enzyme dissociation constants.
<u>J. Ann. Chem., Soc.</u> , <u>56</u> , 658- | (171) | p. 53 |
| LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
<u>J. Biol. Chem.</u> , <u>193</u> , 265-275 . | (150) | p. 27 |
| Mc CREA J.F., (1947)
Modification of red-cell agglutinability by <u>C.L. Welchii</u> toxins.
<u>Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci.</u> , <u>25</u> , 127-136 . | (10) | p. 2 |
| Mc CREA J.F., (1948)
Mucins and mucoids in relation to <u>Influenza</u> virus action.
II - Isolation and characterization of the serum mucoid inhibitor of heated <u>Influenza</u> virus.
<u>Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci.</u> , <u>26</u> , 355-370 . | (13) | p. 2 |

	Références	Pages
MAHADEVAN S., NDUAGUBA J.C. and TAPPEL A.L. (1967)	(96) (128) (203)	p. 13 p. 17 p. 74
Sialidase of rat liver and kidney <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>242</u> , 4409-4413		
MATHIEU P., COLOBERT L., O'CREACH O. et FONTANGES R., (1961)	(83)	p. 12
Caractères de la cinétique d'hydrolyse de l'acide 3'lactose-lactaminique par <u>Myxovirus Influenza B</u> (souche LEE). <u>Ann. Inst. Pasteur</u> , <u>101</u> , 817-833		
MAYRON L.W., ROBERT B., WINZLER R.J. and RAFELSON JR M.E., (1961)	(60)	p. 8
Studies on the neuraminidase of <u>Influenza</u> virus. I - Separation and some properties of the enzyme from Asian and PR 8 strains. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , <u>92</u> , 473-483		
MEINDL P. and TUPPY H., Communication personnelle	(135)	p. 17
MEINDL P. and TUPPY H., (1965)	(135)	p. 17
Synthetic ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid (I) - Preparation of a series of hetosides susceptible to cleavage by neuraminidase (II). animeric n-amyl and n-hexyl ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid. <u>Monatsh. Chem.</u> , <u>96</u> , 816-827	(98)	p. 14
MEINDL P. and TUPPY H., (1966)	(99)	p. 14
Cleavage of synthetic sialic acid α -ketosides by neuro- minidase. <u>Monatsch. Chem.</u> , <u>97</u> , 990-999		

	Références	Pages
MEINDL P. and TUPPY H., (1967) Synthetic ketosides of N-acetyl-D neuraminic acid - III - Preparation of the phenyl α -ketoside of N-acetyl-D-neuraminic acid and its α -anomer. <u>Monatsch. Chem.</u> , <u>98</u> , 53-60	(103)	p. 15
MEINDL P. and TUPPY H., (1969) 2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids (I) Synthesis and properties of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acyl neuraminic acids and their methyl esters. <u>Monatsch. Chem.</u> , <u>100</u> , 1295-1306	(134)	p. 17
MOHR E., (1960) Inhibition of neuraminidase from <u>Vibrio cholerae</u> (V. comma). <u>Z. Naturforsch.</u> , <u>15</u> , 575-577	(133)	p. 17
MOHR E., and SCHRAMM G. (1960) Purification and characterization of the neuraminidase from <u>Vibrio cholerae</u> (V. comma) <u>Z. Naturforsch.</u> , <u>15</u> , 568-575	(131)	p. 17
MORGAN E.H. and LAURELL C.B. (1963) Neuraminidase in mammalian brain. <u>Nature</u> , <u>197</u> , 921-922	(50)	p. 7
MORIYAMA T. and BARKSDALE L., (1967) Neuraminidase of <u>corynebacterium diptherae</u> <u>J. Bacteriol.</u> , <u>94</u> , 1565-81	(130)	p. 17
MYHILL M.K. and COOK T.M., (1972) Extracellular neuraminidase of <u>Streptomyces albus</u> <u>Can. J. Microbiol.</u> , <u>18</u> , 1007-1014	(41) (67) (70) (79) (92)	p. 6 p. 8 p. 11, 12
	(124)	p. 17

	Références	Pages
NEURATH A.R., (1963) Effect of trypsin treatment on the hemolytic, hemagglutinins, neuraminidase and adenosinediphosphatase activities of Sendai virus. <u>Acta Virol.</u> , <u>7</u> , 490-497	(24)	p. 5
NEURATH A.R., HERTZELL R.W. and RUBIN B.A. (1970) Isoelectric focusing of neuraminidase. <u>Experientia</u> , <u>26</u> , 1210-1211	(136) (166)	p. 19 p. 43
OUCHTERLONY O., (1949) Antigen-Antibody <u>Acta Pathol. Microbiol. Scand.</u> , <u>26</u> , 507-515	(170)	p. 42
PALMER K.N.V. (1966) Sputums liquefiers. <u>Brit. J. Dis. Chest.</u> , <u>60</u> , 177-	(3)	p. 1
PEPPER D.S., (1968) The sialic acids of horse serum with special reference to their virus inhibitory properties. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>156</u> , 317-326	(187)	p. 69
PINTER J.K., HAYASHI J.A. and BAHN A.N. (1968) Extracellular Streptococcal neuraminidase. <u>J. Bacteriol.</u> , <u>95</u> , 1491-1492	(37)	p. 6
POPENOE E.A. and DREM R.M., (1957) The action of an enzyme of <u>Clostridium perfringens</u> on orosomucofd. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>228</u> , 673-683	(30)	p. 6



	Références	Pages
PRETI A., TETTAMANTI and DI DONATO S. (1968) Presenzanel cervellodi ratto di due neuraminidase aventi differenti localizzazione subcellulare. <u>Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.</u> , <u>44</u> , 1143-1147.	(56)	p. 4
PYE J. and CURTAIN C.C. (1961) Electrophoretic, Sedimentation and diffusion Behaviour of crystalline neuraminidase from <u>Vibrio cholerae</u> . <u>J. Gen. Microbiol.</u> , <u>24</u> , 423-425.	(65) (76)	p. 8 p. 11
RAFELSON M.E., GOLD S. and PRIEDE J., (1966) in "Methods in Enzymology" COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. (Eds); <u>8</u> , 677	(61)	p. 8
RAFELSON M.E. Jr., SCHNEIR M. and WILSON V.W. Jr., (1963) Studies on the neuraminidase of <u>Influenza</u> virus. II - Additional properties of the enzymes from the Asian and PR 8 strains. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , <u>103</u> , 424-430.	(81)	p. 11
RANDOUX A., BEERENS H., DUCHATELLE P. et HAVEZ R. (1968) Action de la neuraminidase de <u>Diplococcus pneumoniae</u> sur les glycoproteines du mucus bronchique. <u>Coll. Int. Path. Thorac.</u> , Lille	(6)	p. 1
REGINSTER M., (1965) Effects of pronase on <u>Influenza</u> virus. <u>Acta Virol.</u> , <u>9</u> , 470-470.	(62)	p. 8
REGINSTER M., (1966) Release of <u>Influenza</u> virus neuraminidase by caseinase C of <u>Streptomyces albus</u> G. <u>J. Gen. Microbiol.</u> , <u>42</u> , 323-331.	(63)	p. 8

	Références	Pages
ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P. and HAVEZ R. (1972) Isolement des mucines bronchiques sécrétées au cours de la mucoviscidose. <u>Clin. Chim. Acta</u> , <u>36</u> , 315-328.	(153)	p. 30
SCHARMANN A, DRZENIEK R. and BLOBEL H., (1970) Neuraminidase of <u>Pasteurella multocida</u> . <u>Infect. Immun.</u> , <u>1</u> , 319-320.	(38) (44) (91)	p. 6 p. 4 p. 12
SCHAUER R., (1970) Biosynthese von N-acetyl-O-acetyl neuraminsäuren, I, Inkorporation von (¹⁴ C) acetat in schnitte der unter kiefer speichelchüse. <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , <u>351</u> , 595-602.	(106) (112)	p. 16 p. 16
SCHAUER R. and FAILLARD D.H., (1968) Zur wirkungsspezifität der neuraminidase. Das verhalten isomerer N-O-diacetyl-neuraminsäüreglykoside bakterieller neuraminidase. <u>Hoppe Seyler's Physiol. Chem.</u> , <u>349</u> , 961-68.	(188)	p. 71
SCHAUER R., BUSCHER H.P. and FEIRREIRA DO AMARAL C. (199) (1973) Occurence, isolation and identification of sialic acids and their involvement in glycoprotein biosynthesis Colloque du CNRS sur les Glycoconjugués, Lille	(199)	p. 16
SCHNEIR M.L. and RAFELSON M.E. Jr, (1966) Isolation and characterization of two structural isomers of N-acetylneuraminyllactose from bovine colostrum. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>130</u> , 1-11.	(82)	p. 12
SCHOLTISSEK G., DRZENIEK R. and ROTT R, (1969) Myxoviruses in "the Biochemistry of Viruses". LEVY H.B. (Ed.), DEKKER M., New-York, London, 219-258.	(27)	p. 4

	Références	Pages
SETO J.T., HICKEY B.J. and RASMUSSEN A.F., Jr. (1969)	(21)	p. 5
Sialidase activity and related properties of <u>Influenza</u> A 2 viruses. <u>Virology</u> , <u>9</u> , 598-611.	(77)	p. 11
SHILO M., (1957)	(40)	p. 6
The breakdown of the lactose derivative by bacteria <u>Biochem. J.</u> , <u>66</u> , 48-49.		
STAHL E. and KALTENBACH U., (1961)	(193)	p. 71
Thin layer chromatography - VI - Trace analysis of sugar mixtures on layers of Kieselguhr G. <u>J. Chromatog.</u> , <u>5</u> , 531-535.		
STAHL W.L. and O'TOOLE R.D., (1972)	(80)	p. 11
Pneumococcal neuraminidase : purification and properties <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>268</u> , 480-487.		
SVENNERHOLM L., (1957)	(140) (142)	p. 22
Quantitative estimation of sialic acids - II - A colorimetric resorcinolhydrochloric acid method. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>24</u> , 604-611.		
SVENNERHOLM E. and SVENNERHOLM L., (1958)	(194)	p. 71
Quantitative paper partition chromatography of sialic acids. <u>Nature</u> , <u>181</u> , 1154-1155.		
TALLMAN J.F. and BRADY R.O., (1973)	(199)	p. 74
The purification and properties of a mammalian neuraminidase (sialidase) <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>293</u> , 434-443.		

	Références	Pages
TANENBAUM S.W., GULBINSKY J., KATZ M. and SUN S.C., (1970)	(138) (167)	p. 19 p. 43
Separation, purification and some properties of pneumococ- cal neuraminidase isoenzymes. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>198</u> , 242-254.	(211)	p. 79
TANENBAUM S.W. and SUN S.C., (1971)	(139)	p. 19
Some molecular properties of pneumococcal neuraminidase isoenzymes. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>229</u> , 824-828.		
TETTAMANTI G., PRETI A., DI DONATO S. and MARCONI M., (1968)	(51) (93)	p. 7 p. 13
Neuraminidase in the subcellular fractions of the rat brain <u>Rend. Ist. Lombardo Sci. Lettere, B.</u> , <u>102</u> , 292-320.	(297)	p. 74
TRAMS E. G. and LAUTER C. J., (1962)	(208)	p. 74
On the isolation and characterization of gangliosides <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>60</u> , 350-358.		
TULSIANI D.R.P. and CARUBELLI R., (1970)	(57) (97)	pp. 4, 10
Studies on the soluble and lysosomal neuraminidases of rat liver.	(95) (127)	p. 13 p. 17
<u>J. Biol. Chem.</u> , <u>245</u> , 1821-1827.	(181)	p. 69
TUPPY H. and GOTTSCHALK A., (1972)	(143)	p. 23
The structure of sialic acids and their quantitation. in "Glycoproteins, their composition, structure and function". GOTTSCHALK A., (Ed.), Chap. 4, 435		

	Références	Pages
TUPPY H. and PALESE P., (1968) Neuraminidase aus schweinsnieren reinigung und eigenschaften <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , <u>349</u> , 1169-1178.	(49)	p. 7
VERTIEV Y.V. and EZEPCHUK Y.V., (1972) Neuraminidase of <u>Corynebacterium diphteriae</u> . Isolation purification and some characteristics. <u>Folia Microbiol.</u> , <u>17</u> , 269-273 .	(69)	p. 8
WALOP J.N., BOSCHMAN T.A.C. and JACOBS J. (1960) Affinity of N-acetylneuraminic acid for <u>Influenza virus</u> neuraminidase. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>44</u> , 185-186 .	(132)	p. 17
WARREN L., (1964) N-glycolyl-8-O-methylneuraminic acid. A new from of sialic acid in the starfish <u>Asterias fobesi</u> <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>83</u> , 129-132 .	(117)	p. 16
WARREN L. and SPEARING C.W, (1960) Mammalian sialidase (neuraminidase) <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u> , <u>3</u> , 489-492 .	(45)	p. 7
WARREN L. and SPEARING C.W., (1963) Sialidase (neuraminidase) of <u>Corynebacterium diphteriae</u> <u>J. Bacteriol.</u> , <u>86</u> , 950-955 .	(29)	p. 6
WEBB W.R., (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl cysteine <u>J. Thorac. Cardio v. Surg.</u> , <u>44</u> , 330-343 .	(4)	p. 1

WEBSTER R. G., (1970) (137) p. 19
 Estimation of the molecular weights of the polypeptide chains from the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of Influenza viruses.
Virology, 40, 643-654.

WENGER D.A. and WARDELL S., (1973) (200) p. 74
 Action of neuraminidase (E.C.3.2.1. 18) from Clostridium (205) p. 74
perfringens on brain gangliosides in the presence of bile salts.
J. Neurochem., 20, 607-612.

WHITE A.B. and MELLANBY J., (1969) (32) p. 6
 The separation of neuraminidase activity from the other pathological activities of a culture filtrate of Clostridium
sordelli CN 3903
J. Gen. Microbiol., 56, 137-141.

WRIGLEY N.G., SKEHEL J.J., CHARLWOOD P.A. and (74) p. 11
 BRAND C.M., (1973)
 The size and shape of Influenza virus neuraminidase
Virology, 51, 525-529.

YEH A.K., TULSIANI D.R.P. and CARUBELLI R., (1971) (94) p. 13
 Neuraminidase activity in human leukocytes. (126) p. 17
J. Lab. Clin. Med., 78, 771-778. (204) p. 74

ZAMBOTTI V., TETTAMANTI F. and BERRA B., (1965) (53) p. 7
 Comparative study of brain gangliosides of the newborn pig by from different methods of preparation (I). Infrared spectra-
 of the gangliosides before and after purification.
Proc. Federation European Biochem. Soc. Vienna, A.

ZILLIKEN F., WERNER G.W., SILVER R.K. and
GYORGY P., (1957)

(28) p. 63

Studies of the enzymatic properties of Influenza viruses

I - The action of Influenza B virus and RDE on the hemag-
glutinin inhibitor of human meconium.

Virology, 3, 464-474.

APPENDICE TECHNIQUE

I DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE. -

A - Méthode de SVENNERHOLM (T₁) au resorcino! :

1) Réactifs :

Les réactifs utilisés sont les suivants :

1°) Réactif au resorcinol

- resorcino! (Eastman Organic Chemicals) 0,2g
- acide chlorhydrique concentré 80 ml
- solution aqueuse de sulfate de cuivre 0,1 M 0,25 ml
- eau bidistillée q.s.p. 100 ml

Le réactif est préparé 4 heures avant l'emploi. Il est stable pendant une semaine à 2°C.

2°) Alcool isoamylique (PROLABO)

2) Mode opératoire :

Dans des tubes à essai on introduit 2 ml de la solution à doser et 2 ml de réactif au resorcinol. Après agitation, on place les tubes au bain marie bouillant pendant 15 mn. Après refroidissement, la coloration est extraite par agitation énergique avec 5 ml d'alcool isoamylique. Puis les tubes sont maintenus pendant 15 minutes dans la glace fondante. On sépare alors la phase alcoolique par une centrifugation de 1 minute à 110 g/mn.

On prélève la phase supérieure et on mesure l'absorption spectrophotométrique à 450 et à 580 nanomètres, pour éliminer l'interférence des oses qui absorbent au voisinage de 450 nm (Figure n°1).

On peut éliminer l'interférence des oses en purifiant l'acide sialique par passage sur échangeur d'anions, ce qui rend la méthode plus complexe.

B - Méthode d'AMINOFF (T₃) à l'acide 2-thiobarbiturique :

1) Réactifs :

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- 1°) solution d'acide periodique 0,005 M dans l'acide sulfurique 0.1 N

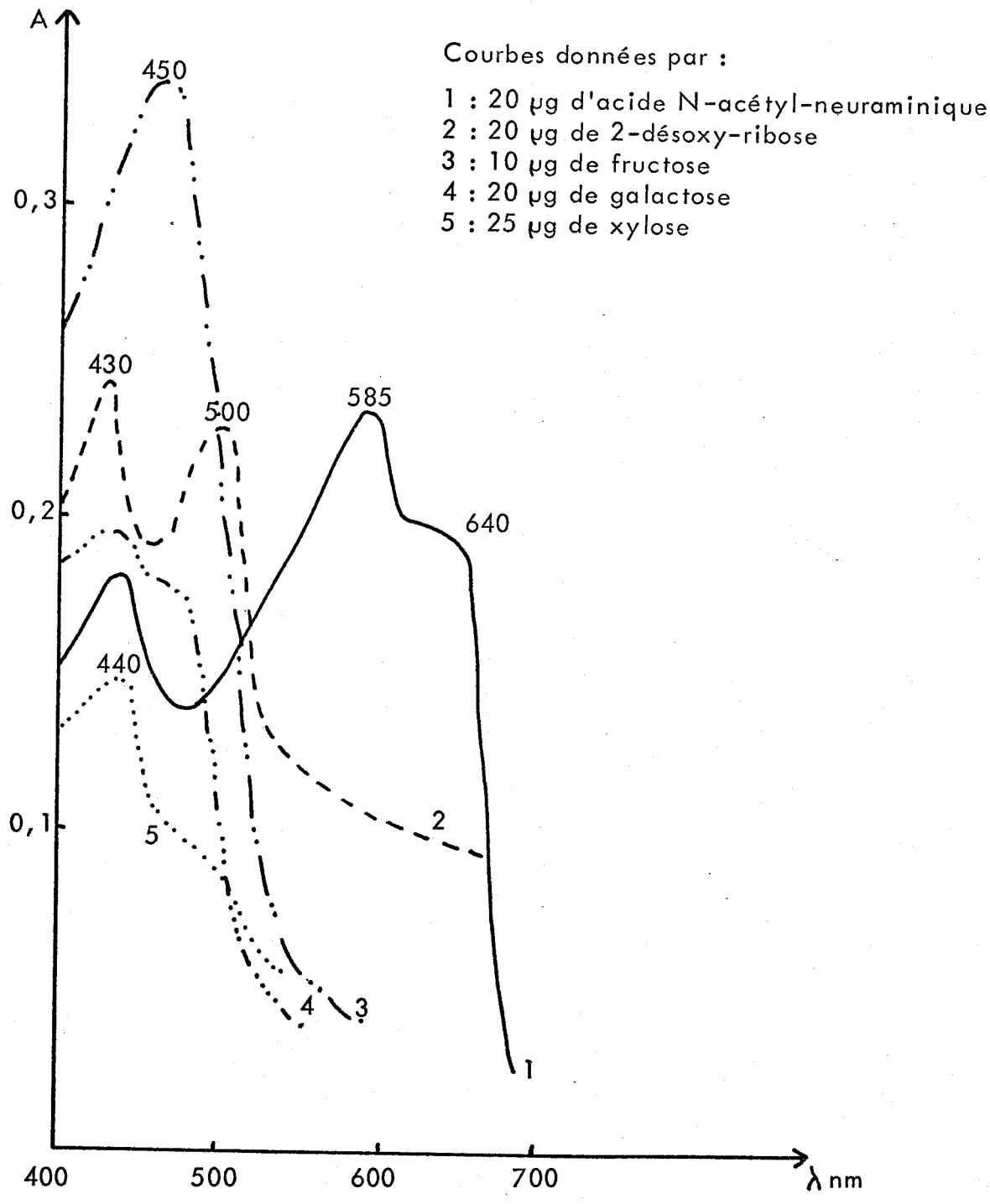


FIGURE N°1

Courbes d'absorption de la coloration donnée par l'acide N-acétyl-neuraminique, le 2-désoxy-ribose, le fructose, le galactose et le xylose avec le réactif au résorcinol chlorhydrique (J. MONTREUIL et G. SPIK) (T₂)



2°) solution d'arsenite de sodium à 2 g p. 100 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N. Le réactif est conservé à + 4°C.

3°) solution d'acide 2-thiobarbiturique 0,1 M ajustée à pH = 9,0 par la soude.

Le réactif est stable pendant un mois à 4°C et à l'obscurité.

4°) solution de n-butanol contenant 5 p. 100 (v/v) d'acide chlorhydrique concentré.

2) Mode opératoire :

Dans des tubes à essai, on introduit 0,4 ml de la solution à doser (5 à 40 p. 100 d'acide sialique) 0,1 ml d'acide sulfurique 0,5 N et 0,25 ml de la solution periodique. Après agitation, les tubes sont placés 30 minutes à 37°C. L'excès de periodate est éliminé par l'addition de 0,3 ml de la solution d'arsenite de sodium. Après disparition de la coloration jaune, on ajoute 2 ml de la solution d'acide 2-thiobarbiturique. On place les tubes au bain-marie bouillant pendant 7 mn 30. Ils sont alors refroidis dans la glace fondante et la coloration est extraite avec 5 ml de n-butanol chlorhydrique. La phase alcoolique est séparée par centrifugation et les mesures d'absorbances sont effectuées à 549 nm.

Dans cette méthode, les oses ne produisent pas de coloration appréciable (Figure n°2).

II DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES. -

A - Activité de neuraminidase :

1) Acide sialique :

L'acide sialique libéré par action de la neuraminidase est dosé selon la méthode d'AMINOFF (T₅) et les résultats sont exprimés par rapport à une solution témoin d'acide N-acétyl-neuraminique.

2) Estimation de la neuraminidase au cours des différentes étapes de purification :

a) Préparation du substrat :

L'activité de neuraminidase est estimée en hydrolysant des glycopeptides obtenus à partir d'un mélange de mucus bronchique de

Courbes données par :

- 1 : 50 μg d'acide N-acétyl-neuraminique
- 2 : 12,5 μg de 2-désoxy-ribose
- 3 : 25 μg de fucose
- 4 : 25 μg de galactose

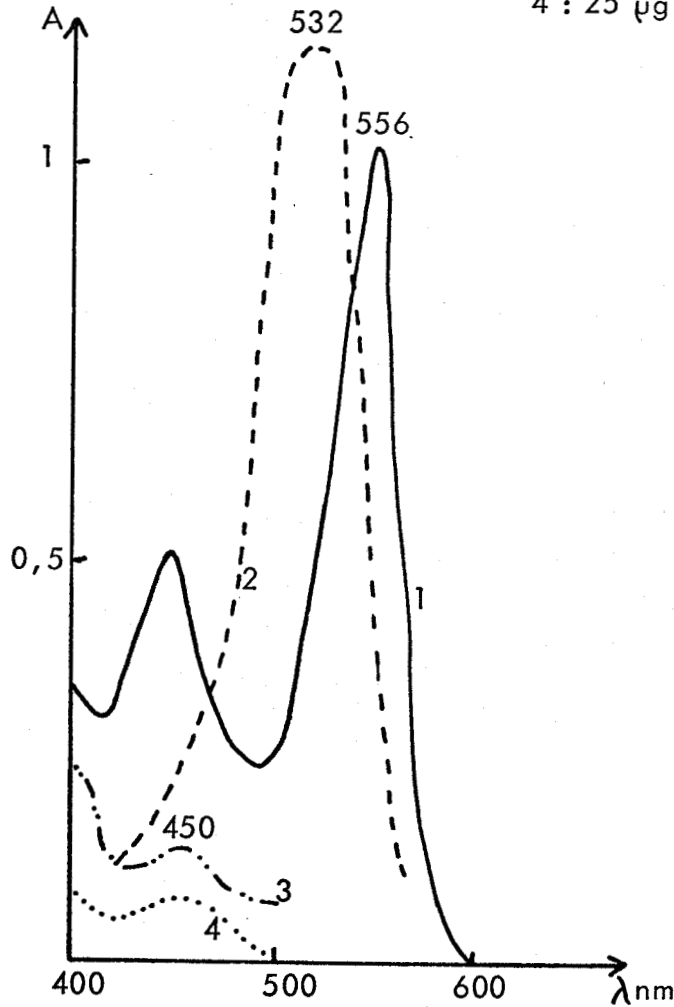


FIGURE N°2

Courbe d'absorption de la coloration donnée par l'acide N-acétyl-neuraminique, le 2-désoxy-ribose, le fucose et le galactose avec le réactif à l'acide periodique - acide thiobarbiturique.

(J. MONTREUIL et G. SPIK) (T₄)



différents sujets par protéolyse enzymatique selon le protocole décrit par LAMBLIN et al. (T₆). L'expectoration est congelée à -20°C aussitôt après son recueil. Après décongélation, on ajoute à chaque volume d'expectoration 3 volumes de solution de NaCl à 9g p. 1000. L'ensemble est mélangé, puis abandonné pendant une heure à la température du laboratoire. Une centrifugation de 20 minutes à 4000 g/minute permet de séparer une phase soluble qui est éliminée et un culot qui représente le mucus bronchique fibrillaire. On ajoute alors au mucus fibrillaire du tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH = 6,5 (1/10 du volume du mucus fibrillaire), du B.A.L. (ou 2,3 dimercaptopropanol) à raison de 0,1 ml pour 5 ml de mucus, et de la mercuripapafne (WORTHINGTON) à raison de 1 mg pour 100 ml de mucus fibrillaire. L'hydrolyse est effectuée pendant 48 heures à 37°C. A l'aide d'une solution d'acétate de Ca 1 M on amène alors la concentration du milieu à 0,01 M en acétate de Ca et on ajoute de la pronase à raison de 1 mg pour 4 ml de mucus fibrillaire. L'hydrolyse est poursuivie pendant 24 heures à 37°C.

Les produits restés insolubles sont éliminés par centrifugation et les glycopeptides bronchiques contenus dans le surnageant sont alors précipités par addition de 4 volumes d'alcool. Le mélange est laissé 24 heures à + 4° C et le précipité alcoolique est recueilli par une nouvelle centrifugation à 1 700 g/minute pendant 20 minutes, puis il est lyophilisé.

Ces glycopeptides contiennent généralement 60 à 80 microgrammes d'acide sialique combiné par mg. Cependant, il existe de grandes variations dans la teneur en acide sialique des différentes préparations de glycopeptides bronchiques et il est toujours nécessaire de déterminer la quantité d'acide sialique total après hydrolyse réalisée par l'acide sulfurique 0,1 N pendant 30 mn à 80°C. La quantité de substrat utilisé pour un dosage est de 1 mg.

b) Protocole opératoire :

Le mélange d'incubation est le suivant :

-solution de substrat à 10 mg/ml 0,1 ml

-tampon phosphate-citrate 0,1 M de pH = 6,5

dans le cas de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae (le tampon phosphate-citrate 0,1 M, de pH = 6,5 est préparé à l'aide d'une solution de phosphate disodique 0,1 M ajustée à pH = 6,5 par une solution d'acide citrique 0,1 M).

ou tampon acétate de sodium 0,1 M de pH = 5,0

dans le cas de la neuraminidase de Clostridium perfringens 0,2 ml

-solution d'enzyme dans le tampon de chromato-

graphie 0,1 ml

L'hydrolyse est effectuée pendant une heure à 37°C.

L'acide sialique libéré est dosé selon la méthode d'AMINOFF (T₇). Les valeurs obtenues sont corrigées par celles d'un blanc enzyme et d'un blanc substrat. Les résultats sont exprimés en unités correspondant au nombre de nanomoles d'acide N-acetyl neuraminique libérées en une minute à 37°C.

B - Détermination de l'activité des neuraminidases purifiées :

Nous avons estimé qu'il était préférable de déterminer l'activité des neuraminidases purifiées sur un substrat dont la teneur en acide sialique est moins sujette à des variations et c'est pourquoi nous avons choisi l'orosomucoïde.

a) Préparation du substrat :

Le sérum humain est d'abord fractionné selon la méthode de SCHULTZE et al. (T₈).

On prépare une solution de Rivanol (Lactate de 2-éthoxy-6,9-diamino acridine) à 2,5 g pour 100 ml de tampon phosphate 0,05 M, de pH = 8,0. On amène le sérum humain dilué au demi par une solution de NaCl à 8 p. 1000 à la concentration finale de 0,84 p. 100 en Rivanol. Le mélange est filtré et le Rivanol en excès dans le filtrat est éliminé par addition de NaCl à la concentration finale de 5 p. 100. Le filtrat est alors fractionné au sulfate d'ammonium. La fraction précipitée entre 45 et 100 p. 100 de saturation à pH = 3,8 est riche en orosomucoïde et en β-glycoprotéines que nous séparons par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de C M-cellulose selon le protocole décrit par BEZKOROVAINY et WINZLER (T₉) : 300 mg de la fraction obtenue précédemment sont déposés sur une colonne de CM-cellulose (3 x 20 cm) équilibrée en tampon acétate de Na 0,025 M, NaCl 0,029 M ajusté à pH = 4,1. L'orosomucoïde non retenu est élué par le tampon de lavage ; les β-glycoprotéines fixées sur la colonne sont éluées par le tampon phosphate de Na 0,05 M ajusté à pH = 7,3.

La préparation d'α₁-glycoprotéine acide obtenue contient 11 p. 100 d'acide sialique. La quantité de substrat utilisé pour un dosage est de 2,5 mg

b) Protocole opératoire :

Le mélange d'incubation est le suivant :

- solution de substrat à 25 mg/ml 0,1 ml
- tampon phosphate-citrate 0,1 M de pH = 6,5
(dans le cas de la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae)
ou tampon acétate 0,1 M de pH = 5,0 0,2 ml
(dans le cas de la neuraminidase de Clostridium perfringens)
- solution d'enzyme purifiée. 0,1 ml

L'hydrolyse est effectuée pendant 15 minutes à 37°C.

L'expression des résultats se fait comme précédemment.

B- Dosage des glycosidases à l'aide d'hétérosides de synthèse :

Ce dosage est effectué selon la méthode de FINDLAY et al.

(T₁₀). Le principe en est simple :

- l'hydrolyse enzymatique d'un paranitrophényl-oside libère du paranitrophénol incolore, qui en milieu basique, se tautomérise en forme quinonique colorée (Figure n°3). Le maximum d'absorption est situé à 400 nm. La densité optique à cette longueur d'onde permet donc d'apprécier la quantité de paranitrophénol libérée et d'en déduire l'activité enzymatique recherchée.

Les substrats suivants ont été utilisés :

- paranitrophényl α -D galactopyranoside.
- paranitrophényl β -D N acétyl glucosaminide

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- solution de substrat à 1 mg/ml : 0,2 ml
- solution d'enzyme : 0,1 ml
- tampon phosphate-citrate 0,1 M pH=6,5
ou acetate de Na 0,1 M, pH = 5,0 =0,1 ml

Après hydrolyse d'une heure à 37°C, on ajoute 0,4 ml d'une solution de carbonate de sodium 0,25 M afin d'arrêter la réaction enzymatique et de colorer le paranitrophénol libéré. La lecture se fait contre un blanc

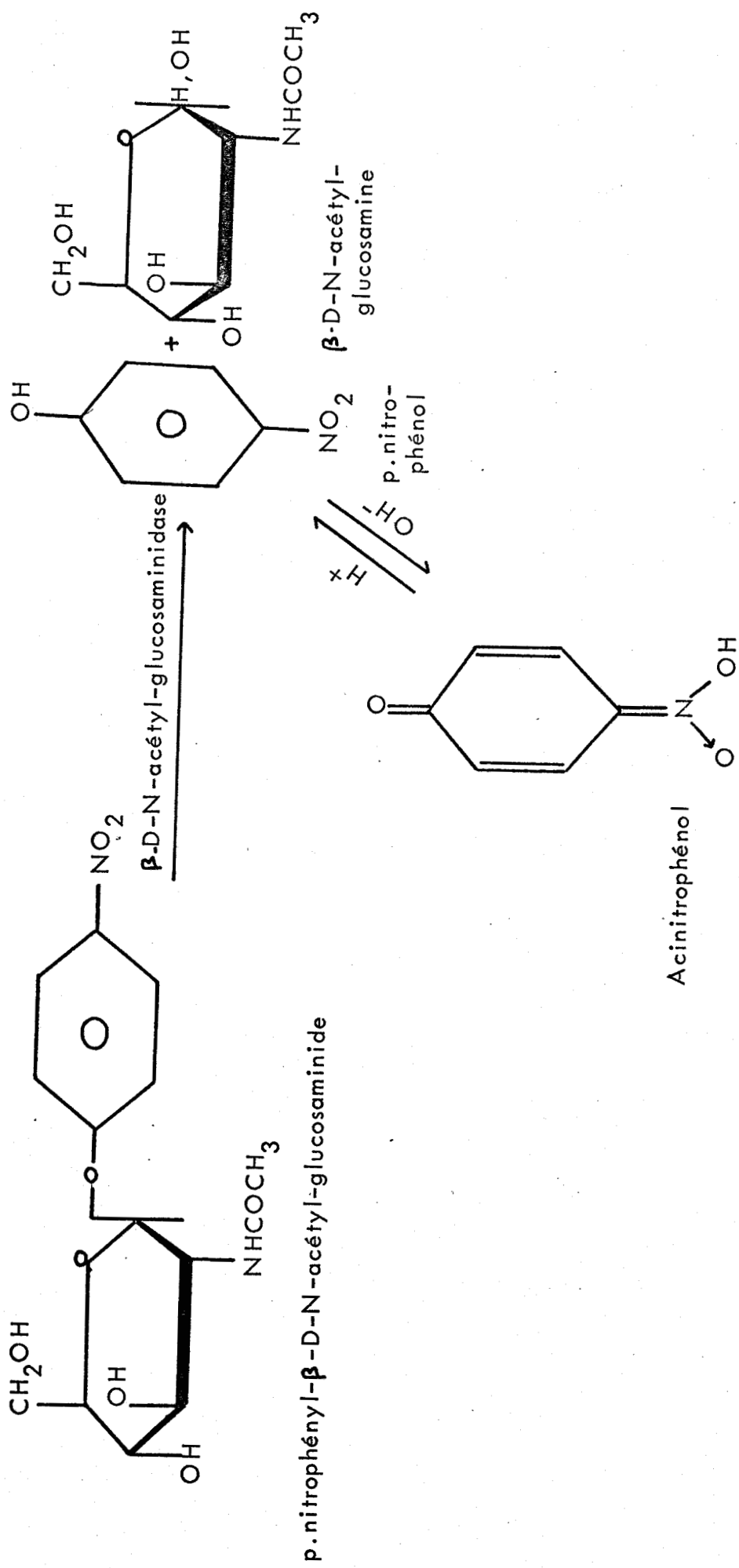


FIGURE N°3



substrat et les valeurs obtenues sont corrigées par un blanc enzyme.

C - Dosage de l' α 1,2 L-fucosidase :

Pour doser le fucose libéré par hydrolyse enzymatique, d'un substrat naturel en présence de fucose combiné et d'autres sucres, nous disposons de 2 méthodes :

1°) Dosage du fucose libre :

a) sous forme de fuculose :

Le fucose libre est transformé en fuculose (Figure n°4) sous l'action d'une isomèrase extraite d'une souche mutante d'Escherichia coli Ba 15 selon la méthode de GREEN et COHEN (T₁₁).

La réaction d'isomérisation du fucose en fuculose est favorisée par la présence de borate de Na dans le milieu. Elle est effectuée dans les conditions suivantes :

- 0,8 ml de solution à doser (1 à 50 µg de fucose)
- 0,1 ml de tampon borate de Na 0,2 M ajusté à pH = 8,0
- 0,1 ml de solution enzymatique.

L'incubation est effectuée pendant 30 minutes à 37°. La réaction est arrêtée par passage au bain-marie bouillant pendant 1 minute. Le fuculose est alors dosé par la méthode de dosage des ceto-hexoses à la cystéine-carbazole de DISCHE et BOREN FREUND (T₁₂).

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- solution de chlorhydrate de cystéine à 1,5 p. 100 préparée extemporanément.
- solution d'acide sulfurique dans l'eau (450 cc/150 cc).
- solution de carbazol à 1,2 p. 1000 dans l'alcool conservée à + 4°C.

On ajoute à 1 ml de la solution à doser (1 à 50 µg de fuculose) 0,2 ml de la solution de chlorhydrate de cystéine et 6 ml de la solution d'acide sulfurique. Après une vive agitation, on ajoute très rapidement 0,2 ml de la solution de carbazol. Après une nouvelle agitation, on abandonne le mélange

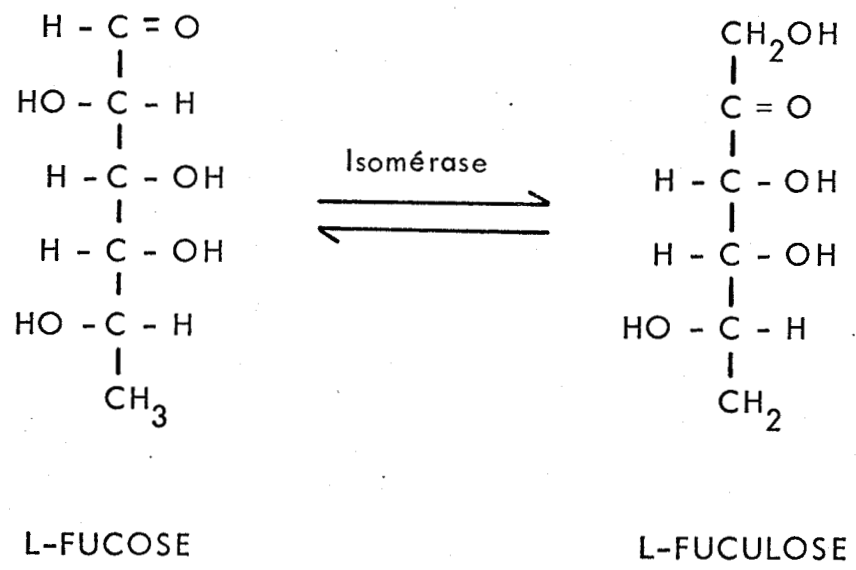


FIGURE N° 4

ACTION DE L'ISOMERASE D'E. COLI

TYPE B α 15 SUR LE FUCOSE



pendant deux heures à la température ambiante. Les mesures d'absorbance sont effectuées à 545 nm et les valeurs obtenues sont corrigées par celles d'un blanc d'enzyme.

Malheureusement, les hexoses (essentiellement le galactose et le fucose) liés au substrat peuvent être hydrolysés par l'addition de la solution sulfurique. Ils interfèrent alors dans le dosage des ceto-hexoses et en font une méthode peu fiable.

b) Par la méthode au semicarbazide de BHATTACHARYYA et al. (T₁₃) :

Ce dosage est effectué en cellule de CONWAY modifiée (Figure n°5). Le principe en est simple : l'acétaldéhyde obtenu par oxydation périodique du fucose libre est un produit volatil capté par le semicarbazide alors transformé en acétaldéhyde semicarbazone (Figure n°6) dont l'absorbance est maximale à 224 nm.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

1 - solution de NPX-tergitol à 0,25 p. 100

2 - solution de semicarbazide 0,0067 M dans un tampon phosphate de sodium (0,06 M NaH₂PO₄, 0,14 M, Na₂HPO₄) ajusté à pH 7,0.

3 - solution d'acide périodique préparée extemporanément de la façon suivante :

.acide périodique 0,5 M 10 ml

.glycocolle 0,6 M 10 ml

.NaOH 0,75 N 10 ml

ajustée à pH = 7,5 par la soude 0,75 N.

.H₂O q.s.p. 100 ml

On dépose dans la chambre externe et dans la chambre de réaction une goutte de solution NPX tergitol, qui est un agent mouillant. On ajoute dans la chambre externe 1,5 ml d'eau également répartis de façon à couvrir toute la surface de la chambre. On dépose alors 0,4 ml de la solution à doser (environ 0,2 µmoles de fucose libre) dans la chambre de réaction et 2,5 ml de la solution de semicarbazide dans la chambre. Puis rapidement on ajoute 2 ml de la solution périodique dans la chambre de réaction. La cellule de CONWAY est alors immédiatement fermée hermétiquement à

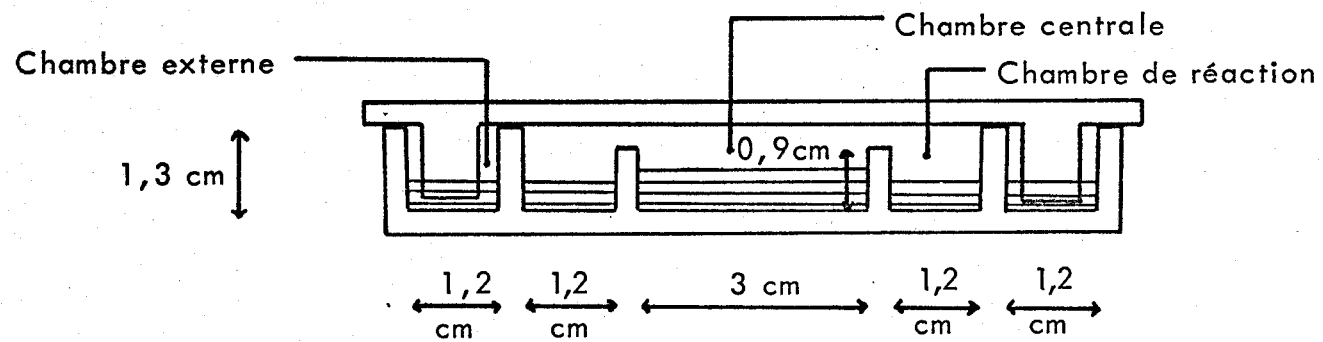


FIGURE N° 5

COUPE D'UNE CELLULE DE MICRODIFFUSION DE CONWAY

(Modification de OBRINK) (T₁₄)



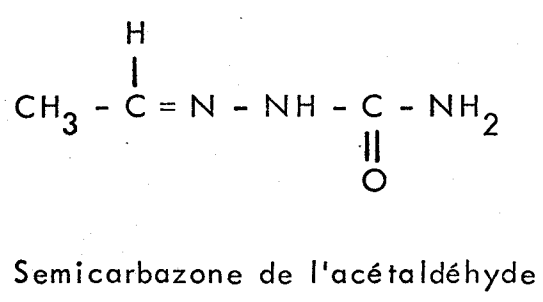
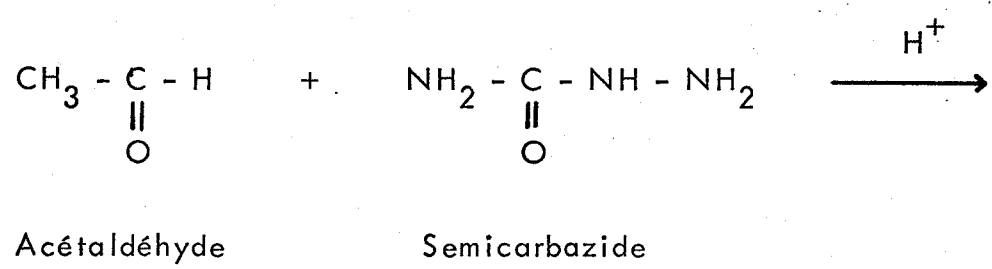


FIGURE N° 6

COMBINAISON DE L'ACETALDEHYDE ET DU SEMICARBAZIDE



l'aide d'un couvercle en plastique de façon à ce que la cellule reste imperméable à l'air. On agite doucement la cellule d'un mouvement horizontal et circulaire pour faciliter le mélange des réactifs de la chambre de réaction et on abandonne la cellule, à la température ambiante pendant 2 heures.

On prélève alors une partie aliquote de la chambre centrale et la lecture de l'absorption spectrophotométrique est effectuée à 224 nm.

Les résultats sont exprimés par rapport à une solution témoin de fucose traitée dans les mêmes conditions.

La formaldehyde, obtenue par oxydation périodique des autres sucres n'interfère pas dans ce dosage puisqu'elle est captée préférentiellement par le glyocolle. Le glyocolle capte l'acetaldehyde et le formaldehyde dans un rapport de 1 : 5.

Il semble donc qu'on ait là une méthode assez spécifique du dosage des methylpentoses en présence des sucres combinés.

Nous utiliserons cette seconde méthode pour déterminer l'activité spécifique de la fucosidase se trouvant dans les préparations de neuraminidase.

2°) Choix du substrat d'hydrolyse :

L'activité de l' α - $\xrightarrow{1,2}$ L-fucosidase est estimée en utilisant comme substrat d'hydrolyse des glycopeptides de liquide de kyste ovarien à activité de groupe sanguin H⁺ obtenus par protéolyse enzymatique de la manière suivante :

le liquide de kyste ovarien est précipité par addition de 4 volumes d'alcool. Le mélange est abandonné pendant 24 heures à + 4°C. et le précipité alcoolique est recueilli par une centrifugation à 1 700 g/minutes pendant 20 minutes puis dissous dans un volume minimum d'eau distillée et lyophilisé. Le liquide de kyste ovarien lyophilisé est ensuite dissous dans un tampon phosphate 0,01 M de pH = 6,5 pour obtenir une solution à 1 p. 100 (poids/volume). On ajoute du B.A.L. (ou 2-3 dimercaptopropanol) à raison de 0,01 ml pour 5 ml de solution et de la mercuripapaïne à raison de 0,1 ml pour

100 ml de solution tamponnée de liquide de kyste. L'hydrolyse est effectuée pendant 24 heures à 37°C. On ajoute alors une solution d'acétate de Ca M pour amener la concentration du milieu à 0,01 M en acétate de Ca. L'hydrolysate est ajusté à pH = 7,3 à l'aide d'une solution de Tris (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) saturée. On ajoute ensuite de la pronase à raison de 1 mg pour 4 ml. L'hydrolyse est poursuivie pendant 48 heures à 37°C. Les produits insolubles sont éliminés par centrifugation à 1 300 g/minute pendant 30 minutes et les glycopeptides sont précipités par addition de 3 volumes d'alcool. Le mélange est abandonné pendant 16 heures à + 4°C et le précipité est recueilli par une centrifugation à 1 700 g/minute pendant 20 minutes, dissous dans un volume minimum d'eau distillée et lyophilisé.

Ces glycopeptides contiennent entre 20 et 25 p. 100 de fucose, déterminé par la méthode de DISCHE (T₁₅).

3°) Protocole pour la détermination de l'activité d' α -L-fucosidase :

La réaction enzymatique a lieu à 37°C pendant 1 ou 2 heures.

Le mélange d'incubation est le suivant :

- solution de substrat à 5 mg/ml	0,3 ml
- solution d'enzyme	0,3 ml
- tampon sulfate d'ammonium 0,26 M pH = 6,0	0,1 ml
- tampon chlorure de calcium 0,26 M pH = 6,0	0,1 ml

Le fucose libéré est dosé préférentiellement par la méthode au semi-carbazide de BATTACHARYYA et al. (T₁₆) et les valeurs obtenues sont corrigées par celles d'un blanc enzyme et d'un blanc substrat.

V METHODES D'ETUDE ELECTROPHORETIQUE. -

A - Electrophorèse en agarose :

L'électrophorèse est pratiquée selon la microméthode sur lame décrite par SCHEIDEGGER (T₁₇). Le support utilisé est un gel semi-solide d'agarose à 0,9 p. 100 en tampon véronal sodé de pH = 8,2 et de force ionique

0,1. Les cuves d'électrophorèse sont des cuves à évaporation limitée permettant l'étude simultanée de 8 échantillons.

1°) Préparation des lames :

a) Tampon véronal de pH = 8,2

véronal sodé	79,3 g
HCl N	115 ml
eau distillée q.s.p.	5 000 ml

b) Gel d'agarose (l'Industrie Biologique Française S.A.) à 0,9 p. 100 :

1,8 g d'agarose sont dissous dans 200 ml de tampon véronal sodé de pH = 8,2. La solution est portée au bain-marie à 100°C pendant 20 minutes.

c) 3 ml d'agarose sont déposés sur une lame de verre de 75 x 25 mm. Après solidification du gel, une fente de 0,5 mm de largeur sur 20 mm de longueur est pratiquée à 23 mm de l'extrémité cathodique de la lame.

2°) Migration électrophorétique :

La migration électrophorétique s'effectue pendant une heure sous une tension de 20 volts aux extrémités de la lame.

3°) Révélation :

Nous avons adopté pour la révélation de nos diagrammes électrophorétiques 3 méthodes de coloration (T₁₈):

L'Amidoschwarz en solution alcoolique pour les protéines

La révélation par l'acide periodique-réactif de Schiff pour les glycoprotéines.

La coloration par le bleu de Toluidine pour les groupements acides.

B - Electrophorèse préparative en film liquide à haut voltage :

Elle est réalisée selon la technique de HANNIG (T₁₉) dans les conditions décrites par MOSCHETTO (T₂₀).

1°) Principe :

Cette méthode est fondée sur le fractionnement des protéines suivant leur point isoélectrique.

Entre deux plaques de verre formant une chambre rectangulaire on réalise un flux constant de tampon. Un champ électrique est établi perpendiculairement au sens d'écoulement. Le mélange à étudier est injecté au niveau de l'un des côtés de la chambre et est entraîné par le flux liquidien. La séparation des protéines est la résultante de l'influence combinée du champ électrique et de la vitesse d'écoulement du tampon.

Les protéines ainsi séparées se répartissent sur toute la largeur du front de déplacement liquidien et à la sortie de la chambre, sont recueillies en 48 fractions.

2°) Technique :

On utilise un appareil ELPHOR-VAP (Figure n°7). Le film liquide a 0,5 mm d'épaisseur et est constitué par une solution tampon située entre deux plaques de verre de 50 x 50 cm. La plaque supérieure est percée d'un certain nombre d'orifices pour l'injection du tampon et de la substance. L'ensemble est situé dans une chambre où circule de l'air froid de façon à maintenir constante la température du film (5°C). A la sortie de la chambre, le film est compartimenté en 48 fractions qui s'accumulent dans des godets situés en aval. A intervalles de temps réguliers, le liquide accumulé dans chaque godet est pompé et rassemblé dans 48 tubes situés dans le collecteur. La Figure n°7 montre que les électrodes sont séparées de la chambre par des membranes semi-perméables. Les compartiments à électrodes sont alimentés par un tampon qui est constamment renouvelé grâce à une pompe. Le tampon du film liquide dans la chambre est ainsi injecté à l'aide d'une pompe à débit constant réglable. L'intensité du courant peut être réglée de 0 à 200 mA et la tension de 0 à 2 500 volts. Les conditions expérimentales utilisées pour le fractionnement de la mucine de Collocalia sont les suivantes :

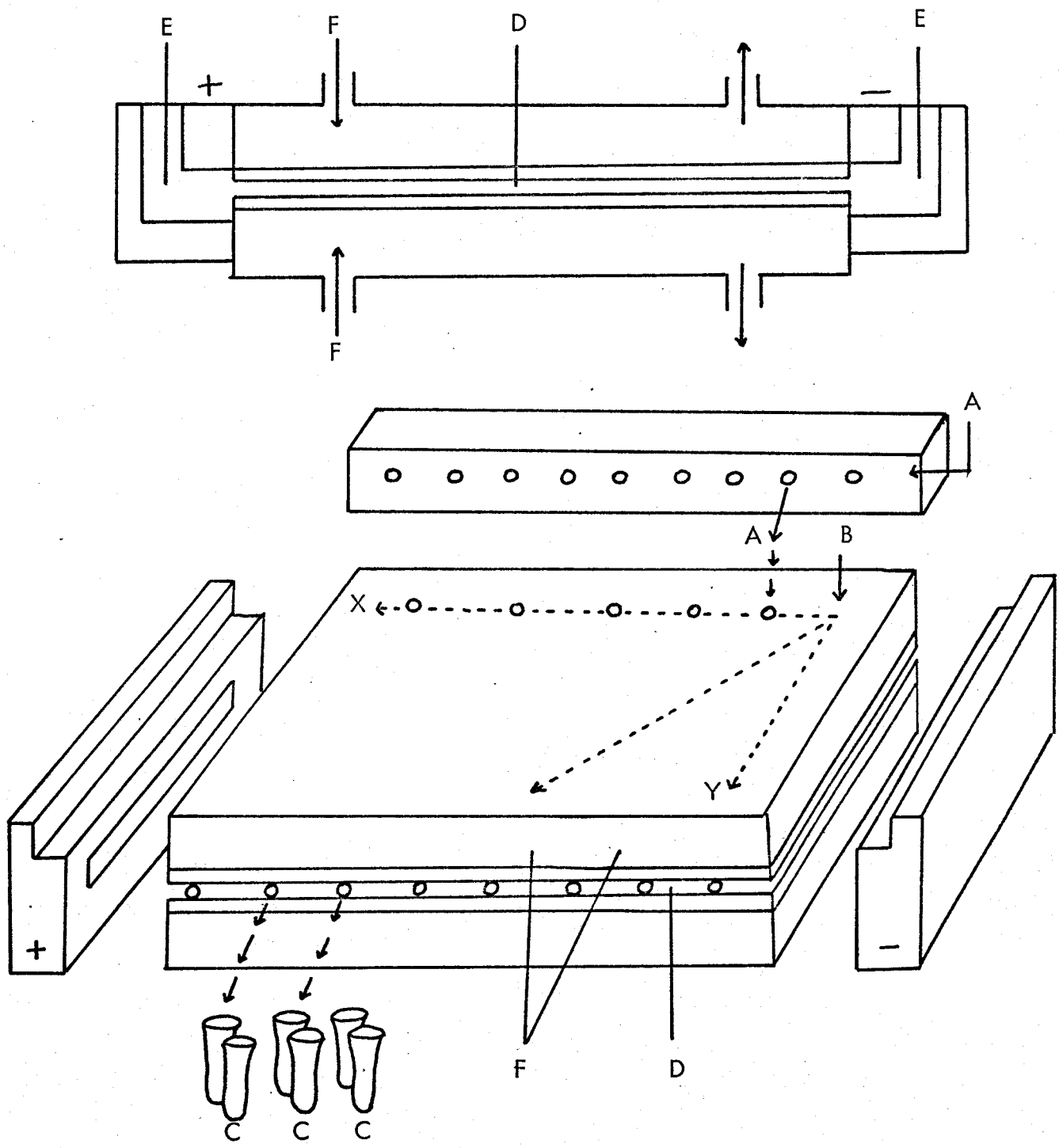


FIGURE N°7

Electrophorèse préparative en film liquide :

- A : injection du tampon dans la chambre d'électrophorèse.
- B : injection de la substance.
- C : collecteur de fractions.
- D : chambre d'électrophorèse.
- E : chambre d'électrodes.
- F : refroidissement.



- tampon de la chambre pH 8,6

Acide citrique 0,008 M

Tris 0,08 M

- tampon des électrodes pH 8,6

Acide citrique 0,0256 M

Tris 0,24 M.

La concentration de l'échantillon est de l'ordre de 10 mg/ml. 60 mg d'échantillon sont injectés dans la chambre à un débit de 2 ml/heure ; le point d'injection de la solution est placé au niveau du 38ème tube.

La numérotation se fait à partir de l'anode.

La vitesse d'injection dans la chambre est de 88 ml par heure, avec une tension de 1 900 volts, une intensité de 160 mA.

C - Isoélectrofocalisation :

1°) Principe :

L'isoélectrofocalisation permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (SVENSSON et VESTERBERG) (T₂₁). Nous l'avons appliquée à l'analyse des neuraminidases.

Le principe de cette méthode est illustré par la Figure n°8. On établit une différence de potentiel dans un système d'électrolytes, dans lequel le pH augmente de l'anode à la cathode.

Quand un mélange de protéines est ajouté au gradient de pH, les protéines vont acquérir des charges différentes en fonction de leur point isoélectrique ; chaque protéine migre vers la zone de pH correspondant à son point isoélectrique. La stabilisation de la colonne au cours de l'expérience est obtenue par un gradient de glycérol.

a) Gradient de pH :

Il est réalisé sous l'influence d'un champ électrique à l'aide d'un mélange d'acides aminés dicarboxyliques de bas poids moléculaire commercialisés sous le nom d'Ampholine (L.K.B.).

Au début de l'électrophorèse, le pH est constant puis au cours de l'expérience un gradient de pH se crée ; chaque aminoacide

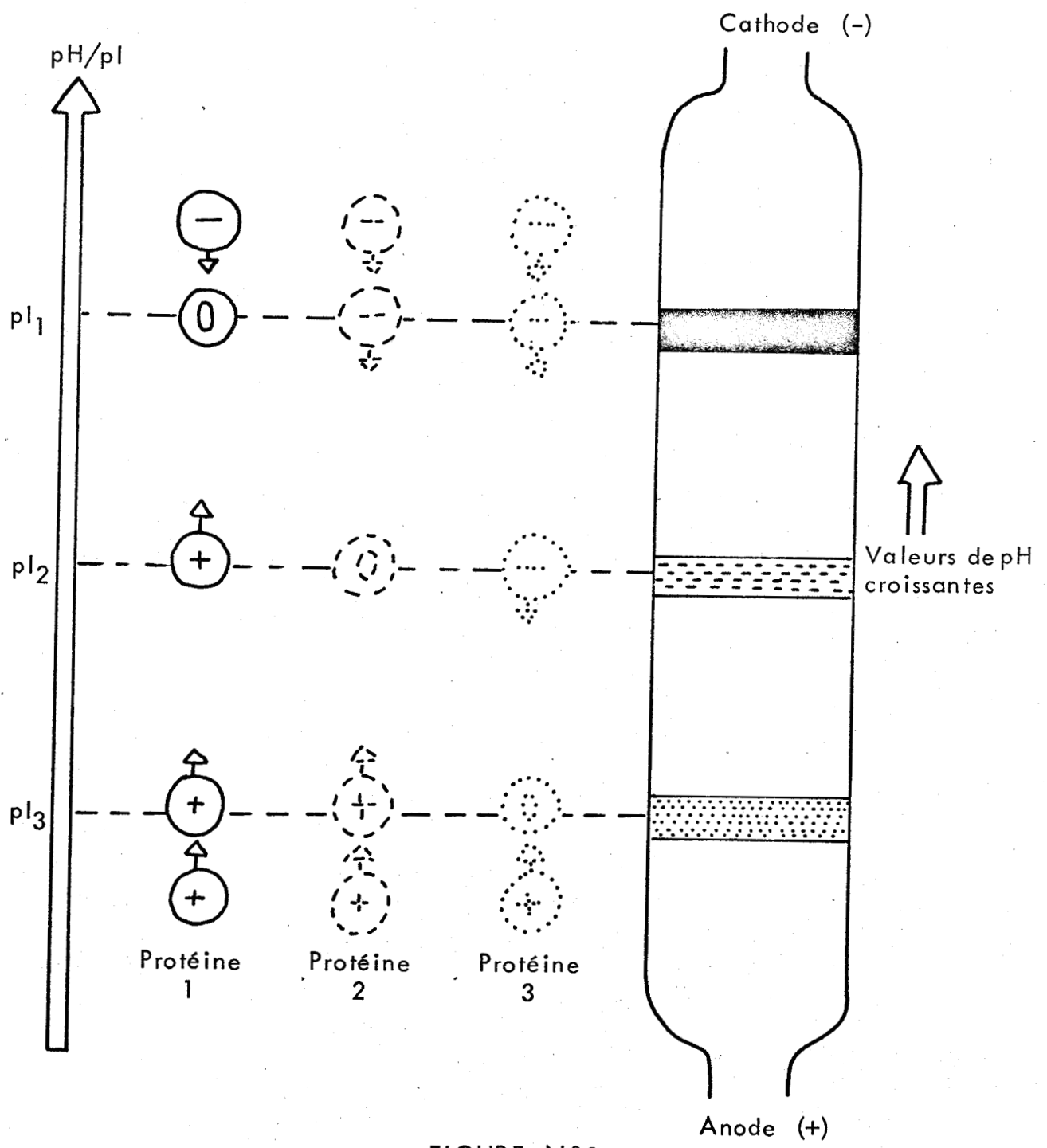


FIGURE N°8

Principe de l'isoélectrofocalisation



établit un pH correspondant au point isoélectrique où il est focalisé.

b) Solutions d'électrodes :

Pour protéger les solutions d'Ampholine de l'oxydation anodique et de la réduction cathodique, les électrodes sont entourées d'une solution spéciale, l'anode par une solution acide diluée et la cathode par une solution alcaline diluée.

Durant, l'électrolyse, l'acide et la base sont attirés vers leur électrode respective. A l'anode, l'acide donne à la solution d'Ampholine une charge positive et elle est repoussée de l'anode. A la cathode, la base rend la solution d'Ampholine négative et l'écarte de la cathode.

c) Gradient de densité :

Il permet de stabiliser les zones et d'éviter les convections thermiques.

Le gradient est obtenu en remplissant la colonne de fractions de densité décroissante. Il est préparé en mélangeant une solution légère comprenant Ampholine, eau distillée et une solution lourde contenant Ampholine et du glycérol à 50 p. 100. Leur mélange en proportions variables permettra de préparer le gradient de densité.

2°) Mode opératoire :

a) Matériel :

Nous utilisons la colonne L.K.B. 8 101 (110 ml) (Figure n°9) et les appareils à gradient correspondants L.K.B. 181 (Figure n°10).

La thermostatisation est obtenue par un appareil Colora réglé à + 4°C. La colonne est formée de 4 parties strictement concentriques ; de l'extérieur vers l'intérieur on trouve :

- 1 - un réfrigérant,
- 2 - un espace annulaire dans lequel s'effectue l'isoélectrofocalisation
- 3 - un réfrigérant.
- 4 - un espace cylindrique interne qui contient l'électrode centrale ; dans nos expériences, celle-ci a servi de cathode.

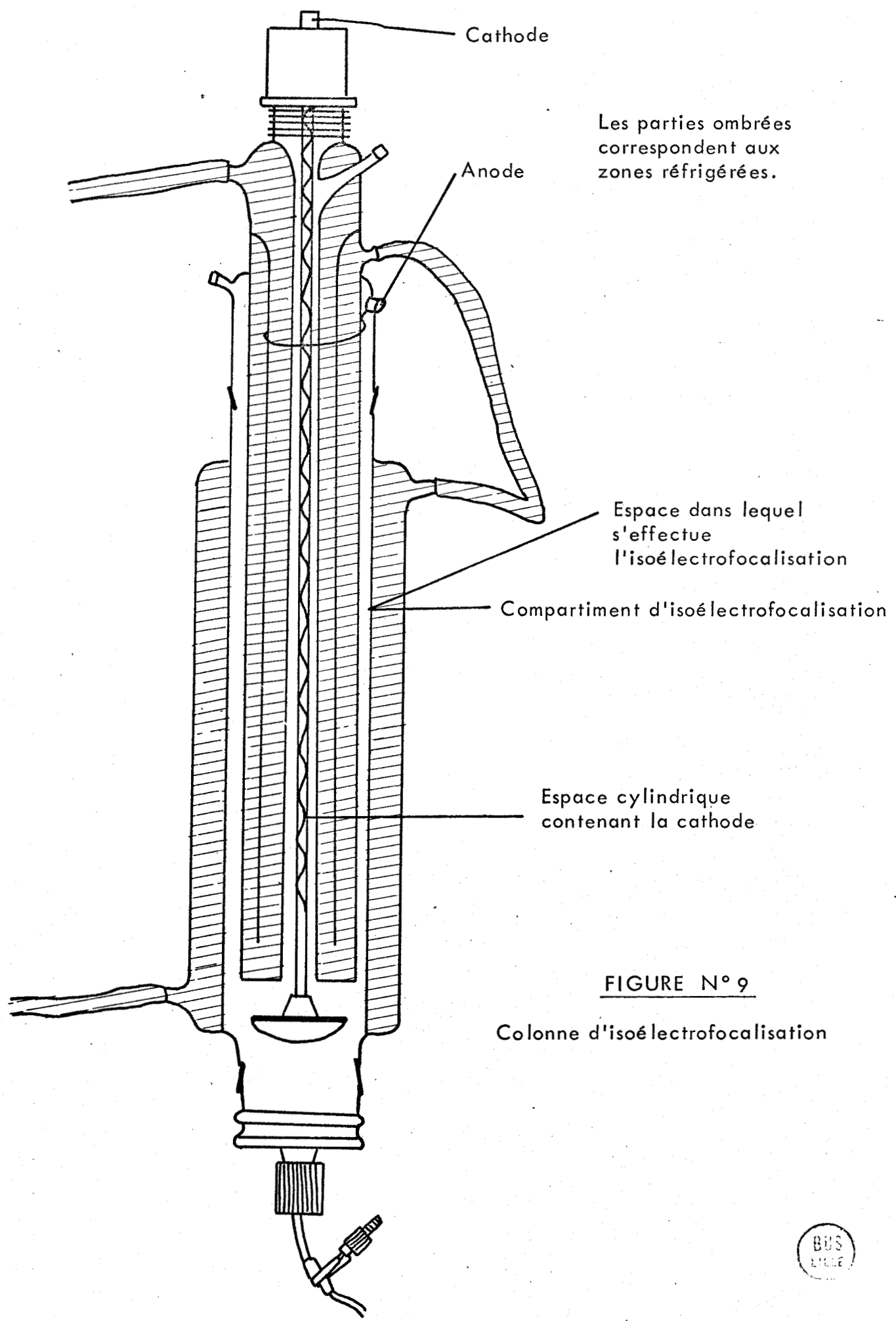


FIGURE N° 9

Colonne d'isoélectrofocalisation



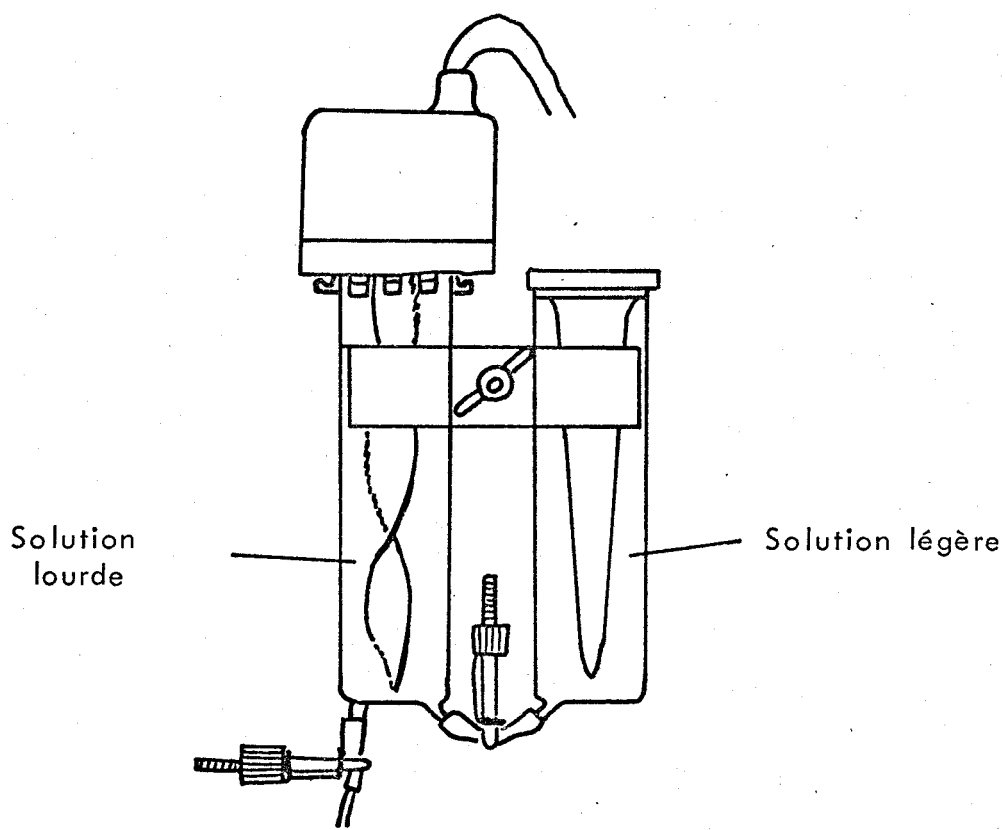


FIGURE N° 10

Gradient de densité de l'isoélectrofocalisation

L'espace annulaire contenant les Ampholytes et l'espace cylindrique central contenant le liquide de cathode communiquent par l'extrémité inférieure de la colonne. L'anode est située à l'extrémité supérieure de l'espace annulaire ; elle est formée d'une boucle à platine.

b) Solutions d'électrodes :

- solution de l'anode :

H ₂ SO ₄	0,1 ml
H ₂ O	10 ml

- solution de la cathode :

- Ethylène diamine	0,2 ml
- Glycérol à 50 %	20 ml

c) Gradient de pH et de densité (Figure n°10) :

- solution lourde :

solution d'Ampholine pH 3-10	2 ml
solution de glycérol à 50 %	58 ml

- solution légère :

solution d'Ampholine pH 3-10	1 ml
H ₂ O distillée	59 ml

La solution d'enzyme est mélangée dans toute la solution légère.

d) Mise en route de l'expérience :

On introduit d'abord par un catheter le liquide de cathode dans le réservoir central (Figure n°9) ; puis on remplit les chambres du gradient (LKB 8121) avec des solutions lourde et légère et on introduit le mélange dans la colonne.

On termine ensuite par le liquide d'anode. Les électrodes sont alors branchées. On établit une différence de potentiel de 500 volts pendant 20 heures puis de 700 volts pendant 12 heures.

Le contenu de la colonne est alors vidé en injectant de l'eau distillée par le haut à l'aide d'une pompe. On recueille

des fractions de 2 ml dont on détermine le pH.

e) Localisation de la neuraminidase :

Avant de déterminer l'activité de neuraminidase, il faut éliminer le glycérol qui interfère dans le dosage de l'acide sialique selon la méthode d'AMINOFF (T₂₂). Nous avons suivi la technique décrite par NEURATH et al. (T₂₃).

A chaque fraction recueillie, on ajoute 0,1 ml d'une solution d'immunoglobulines humaines (préparées par relargage au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,33 p. 100 de saturation). à 2 p. 100 dans un tampon phosphate 0,1 M ajusté à pH = 7,0 et 3 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. On laisse les fractions pendant une nuit à + 4°C. Le précipité contenant les immunoglobulines humaines et l'enzyme est séparé par centrifugation dissous dans 1 ml d'un tampon Tris-HCl 0,01 M ajusté à pH = 7,0. Chaque fraction est à nouveau précipitée par addition de 1 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Après une nouvelle centrifugation, le précipité est dissous dans 1 ml du tampon précédent. La détermination de l'activité de la neuraminidase est alors effectuée dans les conditions habituelles.

IV METHODES D'ETUDE IMMUNOLOGIQUE. -

A - Immunsérum :

1°) Préparation :

Un lapin a été immunisé selon le protocole décrit par HAVEZ, BONTE et MOSCHETTO (T₂₄).

On prépare une solution de zymosan avec 70 mg de zymosan dans 20 ml d'une solution de NaCl à 9 p. 1000. La suspension obtenue est portée à ébullition dans un bain-marie à 100° pendant 10 mn. La solution après centrifugation est conservée à + 4°C.

Le lapin reçoit 3 injections intraveineuses de 3 ml de la solution de zymosan pendant 3 jours consécutifs. 10 jours plus tard, l'immunisation commence par injection intramusculaire de 10 mg d'antigène (prépara-

tion brute des exoenzymes de Diplococcus pneumoniae) aux 13^e et 14^e jour, de 20 mg d'antigène aux 15^e et 16^e jours, de 50 mg d'antigène au 20^e jour. Le dernier jour l'antigène est additionné de 1 ml d'adjuvant de Freund. 40 jours après la première injection de zymosan, le lapin est sacrifié après vérification de la qualité de l'immunsérum.

2°) Spécificité des anticorps :

Afin de vérifier la spécificité des anticorps obtenus nous avons procédé à l'expérience suivante :

40 unités de neuraminidase de Diplococcus pneumoniae sont mises en contact avec 0,4 ml de l'immunsérum. Le mélange est abandonné pendant 12 heures à + 4°C. Après centrifugation, le complexe antigène-anticorps est éliminé ; nous recherchons l'activité de neuraminidase que nous comparons à l'activité d'une solution témoin de neuraminidase.

Une expérience similaire est effectuée avec la neuraminidase de Clostridium perfringens.

B - Immunoélectrophorèse bidimensionnelle :

1°) Principe :

Le principe de cette méthode (Figure n°11) incorporant les anticorps dans le support gélifié utilisé pour le fractionnement électrophorétique des protéines fut introduit par RESSLER (T₂₅).

Les protéines sont soumises à un premier fractionnement électrophorétique dans l'agarose puis à une 2^{ème} séparation électrophorétique effectuée dans un sens perpendiculaire à la première et cette fois dans de l'agarose contenant l'immunsérum, les précipités antigène-anticorps se manifestent sous la forme de courbes ou de pics.

2°) Techniques :

première dimension :

15 ml d'agarose à 1 p. 100 dans le tampon véronal sodé de pH = 8,6 de force ionique 0,02 sont coulés sur une plaque de verre de 100 x 90 x 15 mm. Après solidification, on réalise 4 godets de dépôts selon la technique employée pour l'électroimmunodiffusion. La plaque est placée dans une cuve à électrophorèse refroidie. Les dépôts sont effectués et une

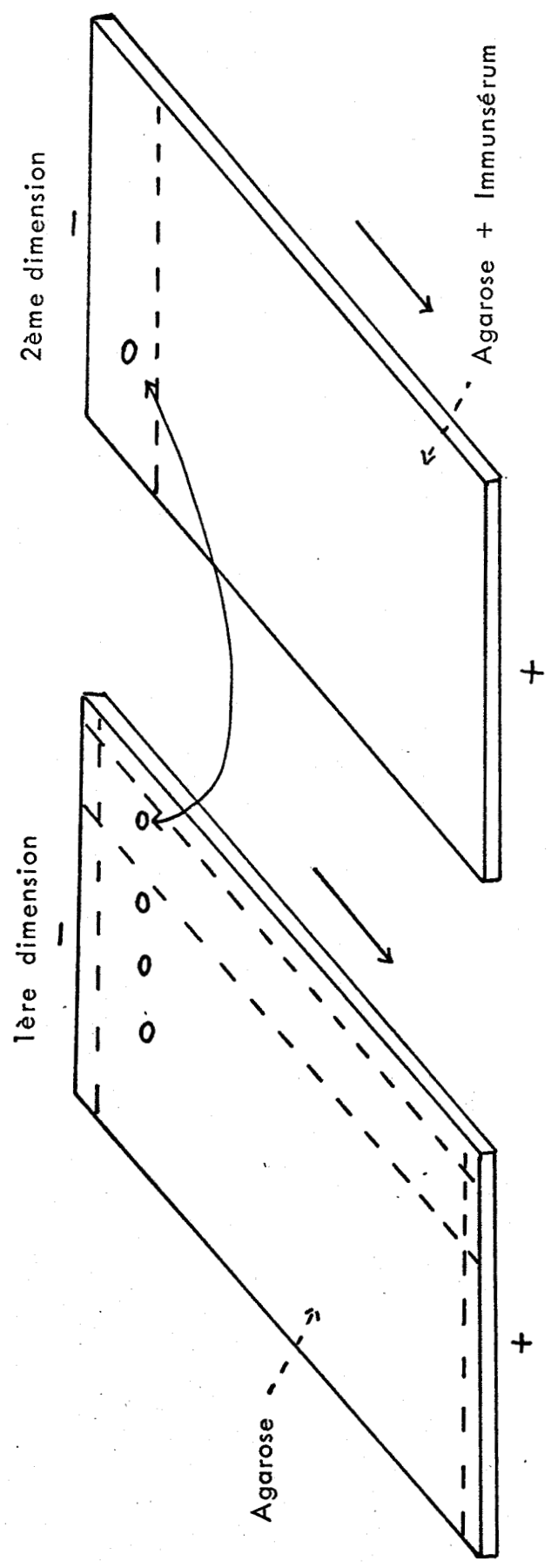


FIGURE N° 11

Immunoélectrophorèse bidimensionnelle

tension de 100 volts est appliquée aux extrémités de la lame pendant une heure.

La séparation est obtenue en une heure sous 100 volts

Transfert de la bande d'agarose :

Après la migration électrophorétique, la plaque est divisée en bandes de 2 cm de large sur 10 cm de long. Chaque bande est transférée sur le côté cathodique d'une plaque de verre de 100 x 1,5 mm.

Deuxième dimension :

11,5 ml du mélange agarose-immunsérum contenant 300 µl d'immunsérum sont coulés sur la surface restante de la plaque. Après gélification, la plaque est placée pendant une nuit dans la cuve d'électrophorèse refroidie à l'eau courante sous une tension de 30 volts.

Séchage et coloration :

Les courbes de précipitation sont colorées par le Bleu Coomassie.

- La solution de coloration est la suivante :

- Bleu Coomassie 5 g
- Ethanol 95 p. 100 450 ml
- Acide Acétique 100 ml
- Eau distillée 450 ml

- la plaque est placée dans le bain de coloration pendant 10 mn.

- la solution de décoloration est la suivante :

- Ethanol 95 p. 100 450 ml
- Acide acétique 100 ml
- Eau distillée 450 ml

- la plaque est placée dans 2 bains successifs de solution de décoloration jusqu'à transparence du fond.

- elle est ensuite séchée avec un papier filtre à l'air ambiant.

C - Immunofluorescence par méthode indirecte :

L'immunsérum préparé est abandonné pendant 30 minutes à 56°C puis mis en contact sur lame avec la souche bactérienne pendant 30 minutes à l'abri de l'air.

On lave alors par le sérum physiologique ajusté à pH = 7,6 par un tampon phosphate et on sèche avec un papier filtre.

On ajoute ensuite le sérum antiimmunoglobulines de lapin marqué par l'isothiocyanate et on laisse en contact 30 minutes à l'abri de l'air.

Après un nouveau lavage, on observe la lame au microscope avec un filtre d'excitation BG 12 (2,5 mm ZEISS) et un filtre de protection ZEISS 50.

Une lame témoin sans sérum fluorescent et une lame témoin sans l'immunsérum à étudier sont préparées et observées dans les mêmes conditions.

V DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES GLYCOPROTEINE

A - Composition en acides aminés :

Nous utilisons la méthode de SPACKMAN et al. (T₂₆) adaptée à l'autoanalyseur Technicon.

Les préparations sont soumises à une hydrolyse en tube scellé sous vide par HCl 5,6 M pendant 24 heures à 110°C. Les acides aminés sont alors séparés sur une colonne de 120 x 6,35 mm de Chromobeads A. L'élu-tion est réalisée selon les conditions décrites par DEGAND et al. (T₂₇) à l'aide d'un Varigrad comportant 9 compartiments. 3 tampons citrate trisodique 0,05 M de pH respectifs, 3,17, 3,80 et 5,0 sont admis dans les compartiments du va-rigrad : le premier tampon pH = 3,17 occupe les 4 premières chambres ; dans la cinquième chambre un mélange des tampons pH = 3,80 et 5,0 (dans le rapport 14/1) est enrichi en NaCl à la concentration finale 0,66 M ; la chambre 6 est occupée par un mélange des 3 tampons dans le rapport 6/9/60. Enfin, le tampon pH = 5,0 (dans les 3 derniers compartiments) assure l'élu-tion des acides aminés basiques.

L'élu-tion de la colonne est suivie par dosage à la ninhydrine sur autoanalyseur Technicon.

B - Composition glucidique :

Elle est déterminée par chromatographie en phase gazeuse

selon la méthode décrite par REINHOLD (T₂₉).

1°) Méthanolyse :

Elle est effectuée dans des tubes vissés à bouchon de Téflon en présence de 500 µl de méthanol HCl 0,5 N à 65°C pendant 16 heures. Puis on sèche sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

2°) N-acétylation et de -O-acétylation :

Les produits sont N-acétylés par addition de 100 µl d'anhydride acétique et de 100 µl de pyridine laissés 3 minutes à la température du laboratoire. On sèche sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

La de-O-acétylation est alors effectuée par une nouvelle étape de méthanolyse en une heure à 65°C. Le méthanol-HCl est alors évaporé sous courant d'azote.

3°) Silylation :

La silylation est réalisée par addition de 100 µl de sylon (Sylon HTP-SUPELCO, INC.). On laisse en contact pendant une heure à température ambiante. Puis on sèche sous courant d'azote à température ambiante. On ajoute alors 100 µl d'héptane et on attend 30 minutes avant l'injection de 1 à 2 µl de phase heptanique.

4°) Séparation par chromatographie en phase gazeuse :

La séparation des dérivés triméthylsilylés des méthylglycosides est effectuée sur colonne en acier inoxydable (180 x 0,3 cm) contenant des billes de verre G.L.C. 110 (120-140 mesh) imprégnées de 0,05 p. 100 d'OV 17 (SUPELCO, INC.). Le programme de température s'étend de 80°C à 220°C avec une augmentation de 8°C par minute.

Les surfaces des pics et les temps de rétention sont enregistrés automatiquement à l'aide d'un intégrateur digital (Infrotonics, SHAMON, Irlande.).

Le témoin standard interne utilisé est l'inositol.

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

AMINOFF D. (1961)

Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.

Biochem. J., 81, 384-392. (T₃), (T₅), (T₇), (T₂₂)

BEZKOROVAINY A. and WINZLER R.J. (1961)

Isolation and characterization of an acidic α_2 -glycoprotein

Biochim. Biophys. Acta, 49, 559-565. (T₉)

BHATTACHARYYA A.K. and AMINOFF D. (1966)

Estimation of free methyl pentoses in the presence of glycosidally bound sugar.

Anal. Biochem., 14, 278-289. (T₁₃), (T₁₆)

DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G. et HAVEZ R. (1973)

Purification et étude des mucines de kystes bronchogéniques

Biochim. Biophys. Acta, 320, 318-330. (T₂₇)

DISCHE Z. (1947)

A new specific color reaction of hexuronic acids.

J. Biol. Chem., 167, 189-198.

DISCHE Z. and BORENFREUND E. (1951)

A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses.

J. Biol. Chem., 192, 583-587. (T₁₂)

FINDLAY J., LEVY G.A. and MARSH C.A. (1958)

Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration.

2 - Inhibitors of β -N-acetylglucosaminidase.

Biochem. J., 69, 467-476. (T₁₀)

GREEN M. and COHEN S.S. (1956)

Enzymic conversion of L-fucose to L-fuculose

J. Biol. Chem., 219, 557-568

(T₁₁)

HANNIG K. (1964)

Eine neuerwicklung der trägerfreien kontinuierlichen elektroforese. Zur trennung hochmolekularer und grobdisperser teilchen.

Z. Physiol. Chem., 338, 211-227.

(T₁₉)

HAVEZ R., BONTE M. et MOSCHETTO Y. (1965)

Etude des protéines du sérum de cobaye. Définition électrophorétique et immunoélectrophorétique.

Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 223-238.

(T₂₄)

HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G. (1967)

Etude des structures fibrillaires de la sécrétion bronchique

Clin Chim. Acta, 17, 281-295.

(T₁₈)

LAMBLIN G., DEGAND P., ROUSSEL P., HAVEZ R., HARTEMANN G. et FILLIAT M. (1972).

Les glycopeptides du mucus bronchique fibrillaire dans la mucoviscidose.

Clin. Chim. Acta, 36, 329-340.

(T₆)

MONTREUIL J. et SPIK G. (1963)

Dosages colorimétriques des acides sialiques.

dans "Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux", monographie n°1, p. 116.

(T₂)

MONTREUIL J. et SPIK G. (1963)

Dosages colorimétriques des acides sialiques.

dans "Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux", monographie n°1 p. 126.

(T₄)

MOSCHETTO Y., (1966)

2ème Thèse de Sciences, Lille (T₂₀)

NEURATH A.R., HERTZELL R.W. and RUBIN B.A., (1970)

Isoelectric focusing of neuraminidase.

Experientia, 16, 1210-1211. (T₂₃)

O BRINK K., (1955)

A modified conway unit for microdiffusion analysis.

Biochem. J., 59, 134-136. (T₁₄)

REINHOLD V.N., (1972)

Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins.

Methods in Enz., 25, 244-249. (T₂₉)

RESSLER N., (1960)

Two-dimensional electrophoresis of protein antigens with an antibody containing buffer.

Clin. Chim. Acta, 5, 795-800. (T₂₅)

SCHEIDEGGER J.J., (1955)

A micromethod of immuno-electrophoresis

Int. Arch. Allergy, Basel, 7, 103-110. (T₁₇)

SCHULTZE M.E., HEIDE K. and HAUPT H., (1961)

Characterization of highly purified hemopexin.

Naturwissenschaften, 48, 696-697. (T₈)

SPACKMAN D.H., STEIN W.H. and MOORE S., (1958)

Automatic recording application for use in the chromatography of amino-acids

Anal. Chem., 30, 1190-1205. (T₂₆)

SVENNERHOLM L., (1957)

Quantitative estimation of sialic acids - II - A colorimetric resorcinol - hydrochloric acid method.

Biochim. Biophys. Acta, 24, 604-611. (T₁)

SVENSSON M. and VESTERBERG G. (1966)

Isoelectric fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. Further studies of the resolving power in connection with separation of myoglobins.

Acta. Chem. Scand., 20, 820

(T₂₁)

TABLE DES MATIERES

	Pages
I DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE. -	
A - Méthode de SVENNERHOLM au resorcinol.	(T ₂)
B - Méthode d'AMINOFF à l'acide 2-thiobarbiturique.	(T ₂)
II DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES. -	
A - Activité de neuraminidase.	(T ₄)
B - Dosage des glycosidases à l'aide d'hétérosides de synthèse.	(T ₈)
C - Dosage de l' α $\xrightarrow{1,2}$ L-fucosidase.	(T ₁₀)
III METHODES D'ETUDE ELECTROPHORETIQUE. -	
A - Electrophorèse en agarose.	(T ₁₆)
B - Electrophorèse préparative en film liquide à haut voltage.	(T ₁₈)
C - Isoélectrofocalisation	(T ₂₀)
IV METHODES D'ETUDE IMMUNOLOGIQUE. -	
A - Immunsérum.	(T ₂₆)
B - Immunoélectrophorèse bidimensionnelle.	(T ₂₇)
C - Immunofluorescence par méthode indirecte	(T ₃₀)
V DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES GLYCOPROTEINES. -	
A - Composition en acides aminés.	(T ₃₀)
B - Composition glucidique.	(T ₃₀)
BIBLIOGRAPHIE.	(T ₃₂)