50376
1974
49

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE

50376
1974
49

THESE

Pour l'obtention du Doctorat de 3è Cycle

(Mention Biochimie)

Présentée et Soutenue Publiquement

Le 5 Juin 1974

Par

Jean-Claude ROGEZ

Maître en-Biologie Humaine (Mention Biochimie)
Maître ès-Sciences Physiques (Mention Chimie)
Assistant de Chimie Biologique

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. LILLE
BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE

L-ASPARAGINASE DU FOIE DE COBAYE

Mise en évidence de deux activités enzymatiques distinctes

JURY: MMrs les Professeurs

J.MONTREUIL Président
P.BOULANGER
G.BISERTE
R.PLAQUET
G.SPIK

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Travail du Laboratoire de Biochimie (Pr R.PLAQUET)

UER de Médecine d'AMIENS

et de l'Unité INSERM n°16 (Pr P.BOULANGER)

A ma femme Irène,

Ton soutien a contribué à la réalisation de ce travail.
Ceci est le témoignage de notre amour.

A la mémoire de mon Père,

dont l'absence aujourd'hui m'est ressentie douloureusement.

A ma mère,

Ton amour et ton inlassable dévouement m'ont permis d'entreprendre ce travail.
Sois assurée chère Maman de mon éternelle reconnaissance et de ma profonde affection.

A ma Soeur et à mon Frère,

Avec toute mon affection.

A mes beaux-parents,

A toute ma famille,

A tous nos Amis.

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL
Professeur de Chimie Biologique
à l'Université des Sciences et Techniques
de LILLE I.

Nous vous sommes reconnaissant de l'honneur que vous nous faites en acceptant de bien vouloir présider notre Jury de Thèse.
Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement à la fois si riche et si précis.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur Roger PLAQUET
Professeur de Chimie Biologique
Biologiste des Hôpitaux
Chef de Service
Chevalier des Palmes Académiques

Vous nous avez fait le grand honneur de nous accueillir avec bienveillance dans votre service et de nous confier ce travail d'Enzymologie.
Nous sommes très reconnaissant des marques de sympathie que vous nous avez montrées, des encouragements et des conseils que vous n'avez cessés de nous prodiguer tout au long de ce travail. Vous ne nous avez ménagé ni votre temps, ni votre patience.
Soyez assuré de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Paul BOULANGER
Professeur de Biochimie Médicale
Biologiste des Hôpitaux
Directeur de l'Unité I.N.S.E.R.M. n° 16
sur la Biochimie des Protéines
Officier de la Légion d'Honneur
Officier de la Santé Publique
Commandeur des Palmes Académiques
Membre de l'Académie de Médecine
Docteur Honoris Causa de l'Université
Libre de Bruxelles.

Vous nous faites le très grand honneur
de bien vouloir juger ce travail.
Soyez assuré de notre respectueuse gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Gérard BISERTE
Professeur de Biochimie Pathologique
Directeur de l'Institut de Recherche
sur le Cancer de Lille
Chevalier de la Légion d'Honneur
Chevalier de l'Ordre du Mérite
Commandeur des Palmes Académiques

Vous nous avez toujours accueilli avec la plus haute bienveillance dans notre service où vous nous avez fait le grand honneur de bien vouloir nous guider et nous conseiller dans l'élaboration de ce travail et d'accepter de juger cette thèse.

Soyez assuré de notre profonde gratitude et de notre respectueuse admiration.

A Mademoiselle G. SPIK

Chef de Travaux de Chimie Biologique

de l'Université des Sciences et

Techniques de Lille I.

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Yves MOSCHETTO
Docteur ès-Sciences
Maître de Recherche à l'I.N.S.E.R.M.

Vous nous avez accueilli avec bienveillance dans votre service où nous avons pu réaliser grâce à votre haute compétence, nos électrophorèses en veine liquide.

Qu'il nous soit permis d'exprimer aujourd'hui notre vive reconnaissance et notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Alfred LORRIAUX
Professeur de Clinique Médicale
Médecin des Hôpitaux
Chef de Service
Officier des Palmes Académiques
Chevalier de l'Ordre du Mérite

Nous vous remercions de la confiance que vous avez bien voulue nous témoigner.

Soyez assuré de notre profonde gratitude et de notre respectueuse admiration.

Nous tenons à remercier chaleureusement,

Monsieur DESOEURBRUN qui nous a permis tout au long de ce travail de surmonter certaines difficultés grace à ses réalisations techniques.

Madame POLLEUX qui nous a permis la réalisation de cet ouvrage.

Tous nos amis du Laboratoire de Chimie Biologique qui nous ont sans cesse témoigné leur sympathie.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H.LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU	Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique

M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogique
MMe SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique

M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial

M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean-Louis	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. CROSNIER Yves	E.U.D.I.L.
M. COUTURIER Daniel	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

Mle DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
Mme EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique

Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie et Aménagement Spatial
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
M. SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

Ce travail a fait l'objet d'un compte-rendu à l'Académie des Sciences.*

- L-asparaginase du Foie de Cobaye : mise en évidence et séparation de deux activités enzymatiques, étude des caractères physico-chimiques.

Note de MM. Roger PLAQUET, Jean-Claude ROGEZ et Gérard BISERTE présentée par M. Jean ROCHE.

* C.R. Acad. Sc. Paris t. 273, p. 1051-1053 (20 septembre 1971).

- Guinea Pig Liver L-Asparaginase, Separation Purification and intracellulary localisation of two distinct enzymatic activities.

par Jean-Claude ROGEZ, Roger PLAQUET et Gérard BISERTE.

(à paraître : sera proposé à Biochemica Biophysica Acta - Enzymology.)

INTRODUCTION

Depuis que BROOME (1,2,3) a démontré que l'asparaginase du sérum de cobaye possède une activité antilymphome, de nombreux auteurs ont tenté dans un but thérapeutique d'isoler cette enzyme à partir de diverses sources bactériennes en particulier.

Les tentatives de purification d'enzymes d'origine animale sont plus rares, et nous citerons en particulier SULD et HERBUT (4,5) qui ont mis en évidence une L-asparaginase (L-asparagine amido-hydrolase E.C. 3. 5.1.1.) dans le foie de cobaye. Notre travail démontre qu'il existe en fait dans l'homogénat de Foie de Cobaye au moins deux activités asparaginasiques distinctes, séparables par chromatographie d'échanges d'ions, gel filtration, électrophorèse préparative en film liquide, sur bloc de Cellogel, sur gel de polyacrylamide et ultracentrifugation. Une purification des deux enzymes a été entreprise ainsi que leur localisation au sein de la cellule hépatique.

L'estimation des masses moléculaires des deux enzymes a été établie. L'une d'entre elles a un poids moléculaire plus bas que celui des enzymes analogues jusqu'à présent connues.

C H A P I T R E I

REVUE GENERALE

BIOCHIMIE DE LA L-ASPARAGINASE

PROPRIETES DU SYSTEME ASPARAGINASE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

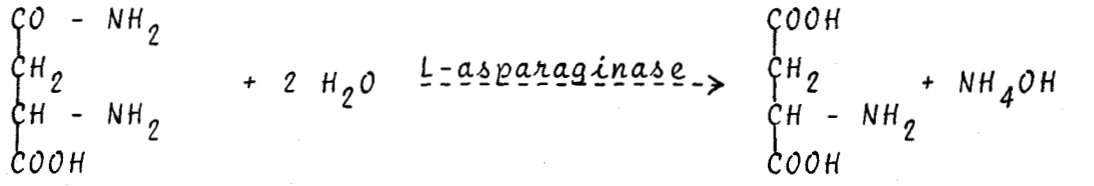
De nombreux travaux et revues (6 à 47*) ont été publiés sur la préparation et sur l'activité biologique de l'Asparaginase, tout d'abord chez les animaux, les bactéries, puis plus récemment chez l'homme.

Depuis les travaux de BROOME (48,49,50) à partir de 1961 démontrant que le pouvoir antilymphome de sérum de cobaye correspondait à la L-asparaginase, une étude approfondie a été entreprise par de nombreux auteurs, sur la recherche de sources de L-asparaginase, l'extraction et la purification de cette enzyme, et sur son activité biologique.

Les connaissances actuelles sur la biochimie et l'action physiologique de cette enzyme progressent rapidement, et nous proposons ci-dessous d'en résumer les principaux chapitres.

A) ACTION DE LA L-ASPARAGINASE.

Les asparaginases sont des enzymes très répandues. Elles existent dans les trois règnes. La L-asparaginase ou L-asparaginase amido-hydrolase (E.C. 3.5.1.1) est une enzyme qui hydrolyse la L-asparagine ou acide α amino succinamique en acide aspartique ou acide α amino succinique et en ammoniaque selon la réaction :



L-asparagine — Acide L-aspartique

*(6) LABOUREUR... (7) ADAMSON... (8) AINIS... (9) AZARKH... (10) BECKER... (11) BOVION... (12) BORELLA... (13) BOTTINGER... (14,15) BOYSE... (16) CAMPBELL... (17,18,19,20) DOLOWY... (21) ERIKSSON... (22) HILL... (23) HIRAMOTO... (24) KAUFFMANN... (25) KIM... (26) KISHI... (27) KREBS... (28,29,30,31) MASHBURN... (32) OETTGEN... (33) OHNUMA... (34,35) OLD... (36) PRAGER... (37) RAKIETEN... (38,39) ROBERTS... (40) SCHLESINGER... (41) SCHREK... (42) SEKWAK... (43) STEVENARD... (44,45) SULD et HERBUT... (46,47) YELLIN...

Lorsqu'on introduit de la L-asparaginase dans la circulation sanguine d'un animal ou d'un homme, cette enzyme provoque une diminution du taux de l'asparagine circulante. Devant ce déficit, les différents types de cellules (cellules normales, cellules tumorales sensibles, et les cellules tumorales résistantes) ont des comportements différents. Elles tendent notamment à augmenter la synthèse de l'asparagine en activant leurs systèmes asparagine synthétases de manière à rétablir à l'intérieur des cellules, un taux d'asparagine compatible avec les besoins cellulaires

Il résulte donc que l'on est conduit à envisager parallèlement le problème de l'asparagine synthétase, de l'asparagine, et de l'asparaginase.

B) REPARTITION ET LOCALISATION DES ASPARAGINASES.

Des asparaginases ont été mises en évidence dans le règne végétal par ZITTLE (51) et VARNER (52) notamment chez les champignons et les levures. On les rencontre également chez de nombreuses familles de bactéries en particulier chez Escherichia Coli (ROBERTS(53) ROBINSON (54) SCHWARTZ (55). L'activité L-asparaginasique chez les animaux paraît également fréquente. On l'a mise en évidence dans le sérum ou dans les tissus, du cheval, du cobaye, du poulet, du lapin, du rat, de la souris, des oiseaux et des poissons.

Si l'activité sérique ne se rencontre que chez le cobaye et quelques rongeurs (OLD 56) on la décèle chez les animaux précités dans de nombreux tissus : en particulier, le foie, les reins, le cerveau, la rate, le pancréas et les testicules.

C) MESURE DE L'ACTIVITE.

Elle se mesure selon la méthode de MEISTER (57) modifiée par MASHBURN (58,59) qui consiste à déterminer la quantité d'ammoniaque libérée par l'enzyme à partir de la L-asparagine à 37° C et au pH optimum d'action de l'enzyme.

L'unité internationale (U.I.) est la quantité d'enzyme qui libère en une minute une micromole d'ammoniaque à partir de la L-asparagine, dans les conditions ci-dessus.

D) PROPRIETES DES ASPARAGINASES.

Les principales propriétés décrites dans la bibliographie (60 à 89*) sont résumées dans le Tableau I.

Etant donné le caractère incomplet des travaux publiés, il est souvent difficile de comparer les différentes asparaginases entre-elles, seules sont indiquées dans le tableau celles qui ont été étudiées de façon précise et dont on connaît l'activité biologique.

La composition en acides aminés des asparaginases n'est pas encore connue exactement, il en est de même de leurs structures secondaires et tertiaires.

Les pH optima d'action des diverses asparaginases varient très largement puisqu'ils sont compris entre 6,6 et 11.

Certains auteurs ont tenté d'établir une corrélation entre ce facteur et l'activité biologique de l'enzyme. Mais jusqu'à maintenant aucun élément précis ne permet de retenir cette donnée.

Toutefois, on peut dire que ces asparaginases sont très différentes quand on compare notamment les pH optima d'action, l'activité en fonction de la température, les effecteurs (activateurs, inhibiteurs) le poids moléculaire, la solubilité, le Km et la spécificité.

*(60) ABOUMALIKOV... (61) ALTENBERN... (62) ASMAR...
(63) BECKER... (64) BEREZOV... (65) BROOME... (66) CAMPBELL...
(67) CEDAR... (68,69) DIN EL... (70) ERIKSSON... (71) ERRERA...
(72) EVSEEV... (73) GUHA... (74) HIRAMOTO... (75) JAVARAM...
(76) KIRCHEIMER... (77) LEAL... (78) LEE... (79) MARDASHEV...
(80) OTT... (81) ROBERTS... (82) ROWLEY... (83) SCHWARTZ...
(84,85) SULD et HERBUT... (86) TOWER... (87) VARNER...
(88) WARNER... (89) YELLIN...

TABLEAU I - Propriétés des asparaginases

Origine	Substrats	pH optimum	Activateurs	Inhibiteurs	Km	PM	Activité biologique (**)
Sérum de Cobaye. Fraction α-2-globuline ou β-1-globuline.	L-asparagine	> 11 pour certains auteurs généralement de 7,5 à 9,6.	Activée par sérum.	Zn - pCMB - organophosphate		138.000 210.000	+
Cerveau de Cobaye.	L-asparagine	> 11 pour certains auteurs généralement de 8,4 à 9,8.		Zn - pCMB - Mg - Co - Mn - EDTA - KCN			+
Sérum d'Agouti.	L-asparagine				$4,1 \times 10^{-5}$ M		±
Foie de Rat. a) b)	L-asparagine L-asparagine		PO_4 α-cétoacides				
Foie de Poulet.	L-asparagine					306.000	—
Pseudomonas.	L-glutamine D-asparagine L-asparagine L-glutamyl asparagine	6,6 avec phosphate. 8,2 avec véronal. 8,2	Ca - Mg - PO_4 - BO_3 - SO_4 et arséniate CN - SCN - NO_3 et véronal	CN - SCN - NO_3 - Cl - Br. I et sulfites Fe Mg	1×10^{-3} M	25.000	?
Serratia marcescens.	L-asparagine	8,6					+
Escherichia coli EC1 EC2	L-asparagine L-asparagine	≥ 8,4 Palier de 6 à 8,4 avec optimum peu marqué à 7.	Insensible aux acides α-céto et aux phosphates activée par sérum, acide oxaloacétique.		$2,3 \times 10^{-6}$ M	300.000 100.000 25.000	— +
Brucella abortus. a) b)	L-asparagine D-asparagine	8 6 → 8		pCMB - N-éthylmaléimide. Cystéine neutralise pCMB	$1,7 \times 10^{-1}$ M		
Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra. a) b)	L-asparagine L-asparagine	9 9,6	Pas de cofacteur Pas de cofacteur	pCMB (2) - KCN - Hydroxylamine - Arséniate - Cadmium - L-cystéine - L-cystéine - L-aspartate	$3,1 \times 10^{-3}$ M 20×10^{-6} M		— ?
Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv.	L-asparagine	9	Pas de cofacteur	pCMB (2) - KCN - Hydroxylamine - L-cystéine	$3,1 \times 10^{-6}$ M		—
Mycobacterium phlei.	L-asparagine	7		D-asparagine	5×10^{-6} M		?
Torula.	L-asparagine						—
Bacillus coagulans	L-asparagine						—
Erwinia aroideae (sphéroplaste).	L-asparagine						+
Erwinia carotovora.	L-asparagine						+

BUS LILLE

(**) L'activité biologique correspond généralement à l'activité antilymphome sur la souris.

.../...

E) L'ASPARAGINASE ET SES DIFFERENTES FORMES.

A partir de certaines souches d'E. Coli, il est possible d'obtenir deux asparaginases EC_1 et EC_2 ; ces deux asparaginases diffèrent d'une part par leur activité biologique, EC_1 étant inactive et EC_2 active, et d'autre part, par leurs propriétés physicochimiques (CAMPBELL (90) et CEDAR (91).

Il existe également deux types d'asparaginases de Pseudomonas : ce sont les asparaginases 1 et 2 sensibles ou non aux phosphates et aux acides α cétoniques (ERRERA (92) et GREENBERG (93).

Certains auteurs ont attribué une activité glutaminasique à l'asparaginase (DIN EL (94 et 95)). Il se peut en effet selon NEUMAN et coll. (96) que certaines cellules tumorales aient une double dépendance vis à vis de la glutamine et de l'asparagine. Il n'est pas exclu non plus que certaines cellules tumorales aient une dépendance spécifique vis à vis de la glutamine (GREENBERG (97)).

Toutefois, les activités glutaminasiques mises en évidence semblent dans la majorité des cas dues à des contaminations de l'asparagine par la glutaminase sauf pour l'asparaginase de Pseudomonas qui aurait 2 sites actifs différents (DIN EL (98 et 99).

F) ASPARAGINASE ET ETATS PATHOLOGIQUES :

On ne possède pas de données d'ensemble concernant les corrélations pouvant exister entre les teneurs en asparaginase des tissus, organes et humeurs et les états pathologiques ; il existe cependant certaines affections dans lesquelles l'asparaginase est diminuée et d'autres où elle est augmentée.

Elle semble toujours diminuer dans les états cancéreux (OHNUMA (100) et RAINA (101)). L'évolution de la glutaminase est souvent parallèle à celle de l'asparaginase. Parmi les travaux les plus intéressants on peut citer ceux de BEREZOV (102)

résumés dans le Tableau II confirmés par les résultats obtenus par ERRERA et GREENSTEIN (103) et ceux de MIZUHARA (104) KISHI et HARUNO (105 et 106). Selon VALOVICOVA, RASCANI, TURSKY, BROZMAN et coll. (107 à 112) l'asparaginase du cerveau et de la moelle épinière est augmentée dans l'encéphalomyélite allergique expérimentale du cobaye. Elle serait également augmentée d'après NAGAUMI (113) chez la souris infectée par le virus poliomyélitique.

G) ASPARAGINASE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE.

De nombreux auteurs ont essayé de déterminer les raisons de l'activité ou de la non activité thérapeutique des différentes asparaginases. BROOME (114 et 115) en comparant les asparaginases E. Coli et de sérum d'Agouti envisage trois causes principales pour expliquer les différences d'activité de ces enzymes :

1°) - Les diverses asparaginases ont des cinétiques d'action très différentes les plus actives étant celles qui ont le plus d'affinité pour le substrat et la plus grande vitesse de réaction aux concentrations physiologiques d'asparagine.

2°) - Les asparaginases diffèrent entre-elles par une plus ou moins grande fixation sur les tissus, par exemple, il se peut qu'une rétention hépatique importante permette une action plus longue et plus efficace (clearance diminuée).

3°) - Chez la souris l'implantation de cellules lymphomateuses 6 C_3HED est généralement associée au virus de RILEY (116) ce qui augmenterait dans des proportions importantes l'activité de l'asparaginase probablement en diminuant sa clearance.

H) PROPRIETES GENERALES ET METABOLISME DE L'ASPARAGINE.

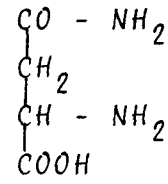
La L-asparagine ou acide L α amino succinamique a pour formule :

Tableau II - Activités - asparaginase et glutaminase de tissus normaux et pathologiques, d'après T.T. BEREZOV (*).

TISSUS NORMAUX	A partir de la glutamine	A partir de l'asparagine
Chez l'animal :		
- Foie de rat	4,62	11,33
- Foie de souris	7,40	15,07
- Muscle de rat	0,25	0,14
- Tissu conjonctif	0,12	0,00
- Testicule de lapin	3,25	9,41
Chez l'homme :		
- Muqueuse gastrique	8,96	6,28
- Glande mammaire	3,41	2,10
- Muqueuse rectale	5,12	3,06
- Foie	14,97	11,66
TISSUS PATHOLOGIQUES	**A partir de la glutamine**	**A partir de l'asparagine**
Chez l'animal :		
- Hépatome du rat	2,56	1,74
- Hépatome de la souris	5,40	1,15
- Rhabdomyoblastome	0,00	0,00
- Sarcome PVM	0,00	0,00
- Tumeur de Brown-Pearce	2,15	1,32
Chez l'homme		
- Cancer de l'estomac	3,75	1,22
- Cancer du sein	1,07	0,76
- Cancer du rectum	0,55	0,00
- Cancer du foie	7,24	4,86

(*) Résultats exprimés en différences d'ammoniaque libérée à partir, soit de la glutamine, soit de l'asparagine (par gramme de tissus - Chiffres moyens).

BUS LILLE



La forme commerciale la plus répandue est le monohydrate de l'asparagine :
$C_4H_8N_2O_3H_2O$.

Elle est soluble dans l'eau et les solutions acides ou alcalines, insolubles dans le méthanol, l'éthanol, l'éther, le benzène.

1) Répartition de l'asparagine.

Elle existe dans les trois règnes. Dans le monde animal qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail, elle semble être universellement répandue, des protozoaires aux mammifères. Toutefois, certains organes possèdent une teneur plus grande en asparagine : ce sont le rein, le foie, la rate, le cerveau. Nous pouvons également noter que ces organes sont les plus riches en asparaginase. Bien que très importante pour la compréhension de l'action biologique de l'asparaginase, la teneur des différents types de cellules en asparagine est mal connue.

2) Métabolisme de l'Asparagine.

α) Catabolisme.

Le métabolisme est résumé dans le Tableau III, qui renferme les voies métaboliques essentielles issues de l'Asparagine ;

Les voies situées au-dessus du trait pointillé sont celles qui correspondent, en principe, au monde animal, les autres voies n'ayant jusqu'ici été mises en évidence que chez les microorganismes.

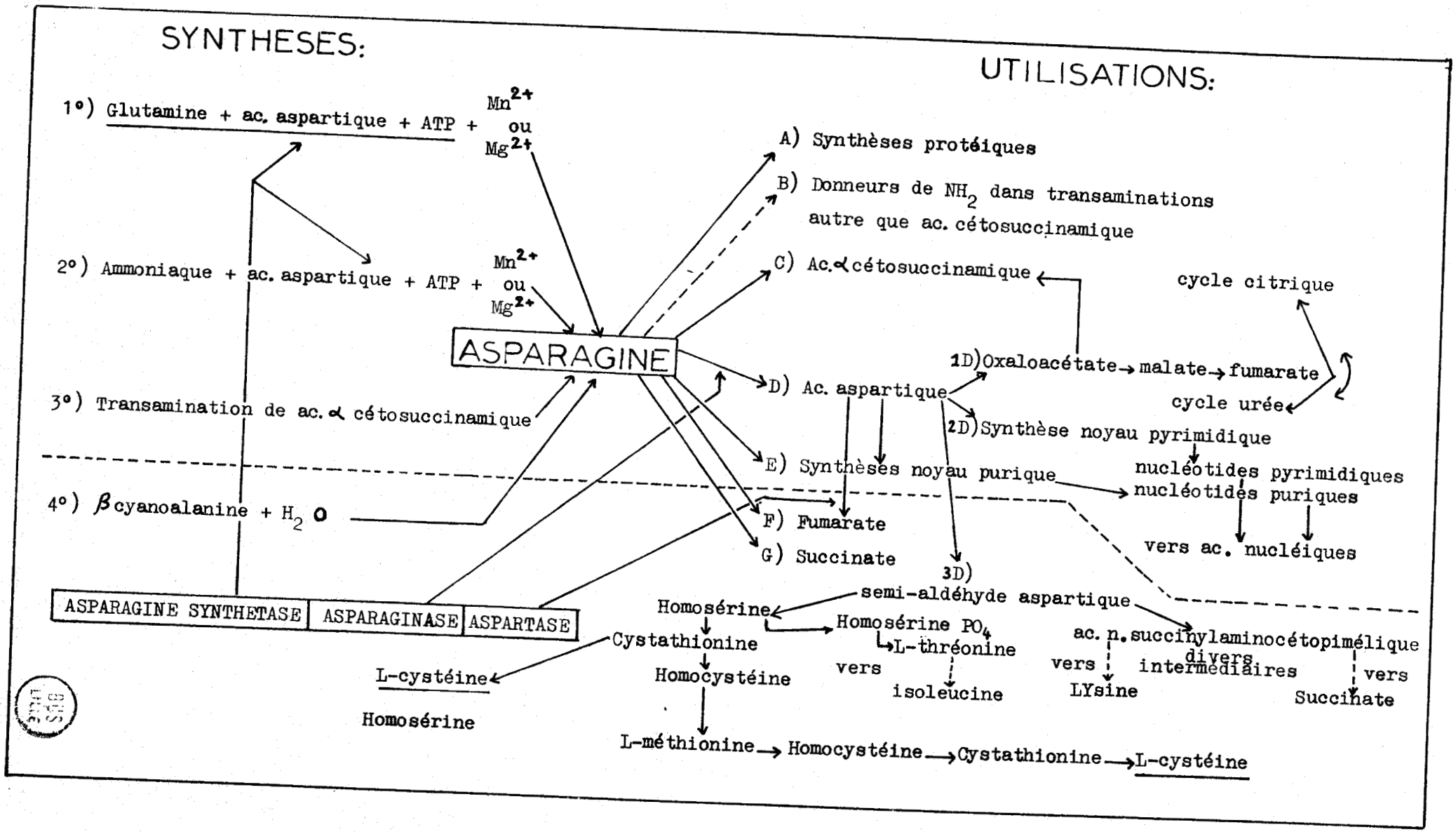


TABLEAU III : Métabolisme de l'asparagine

L'asparagine existante peut être utilisée de deux façons :
- une utilisation directe dans la synthèse des protéines
- des utilisations indirectes pouvant emprunter plusieurs voies, dont la principale semble être celle de l'acide aspartique, puisqu'elle peut conduire soit au cycle citrique et au cycle de l'urée, soit à la synthèse des noyaux puriques et pyrimidiques, étapes essentielles dans la synthèse des acides nucléiques.

Il résulte de ceci que, si pour une raison quelconque l'asparaginase tissulaire diminue ou n'existe plus, les voies métaboliques passant par l'acide aspartique disparaissent et provoquent des modifications métaboliques. Ainsi, il se pourrait qu'une plus grande quantité d'asparagine devienne disponible pour la synthèse des protéines. Ces conséquences métaboliques résultant de l'absence de l'asparaginase, telle qu'il peut en exister dans les tissus tumoraux sont résumées dans le tableau IV.

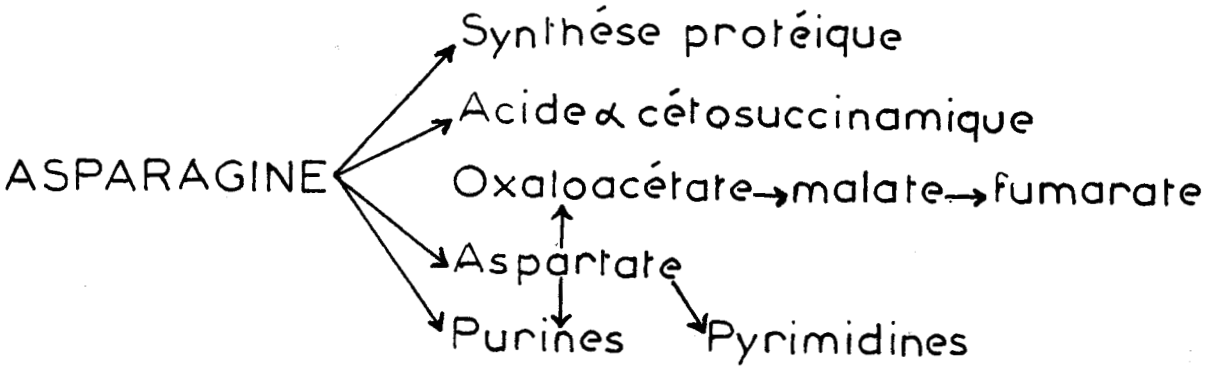
L'utilisation directe de l'asparagine pour la synthèse protéique a été mise en évidence par divers auteurs en particulier par HOROWITZ et coll. (117 et 118) et démontrée expérimentalement par BROOME et SCHWARTZ (119 et 120) KIDD et SOBIN (121) en utilisant de l'asparagine marquée.

Dans les utilisations indirectes de l'asparagine mis à part le rôle de l'acide aspartique dans le cycle citrique et le cycle de l'urée il intervient également dans la synthèse des noyaux puriques et pyrimidiques, comme l'a montré MEISTER (122) et s'effectuerait selon le Tableau V. Enfin, un rôle analogue à celui de la glutamine a été envisagé par plusieurs auteurs à propos de l'asparagine, dans les réactions de transamination sans que cela ait encore pu être démontré.

B) Synthèse de l'Asparagine.

Il existe également plusieurs systèmes possibles pour la synthèse de l'asparagine et sont regroupés dans le tableau VI.

DANS LES TISSUS NORMAUX



DANS LES TISSUS TUMORAUX

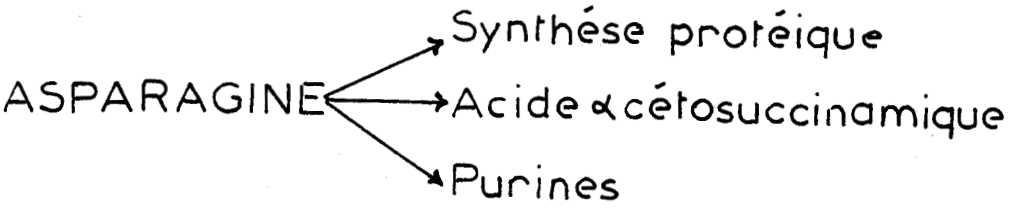
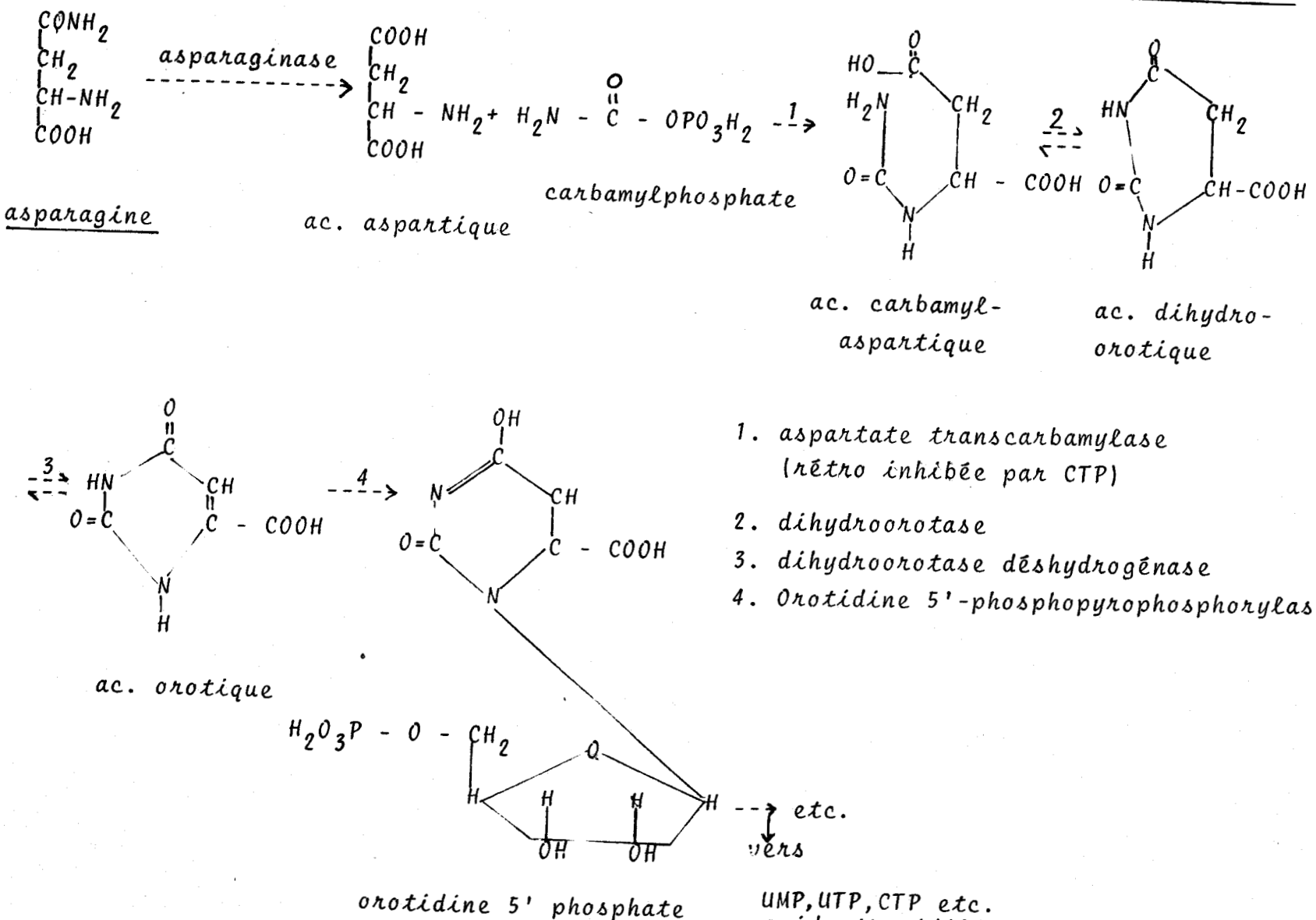


TABLEAU IV : Métabolisme de l'asparagine.

BUS LILLE

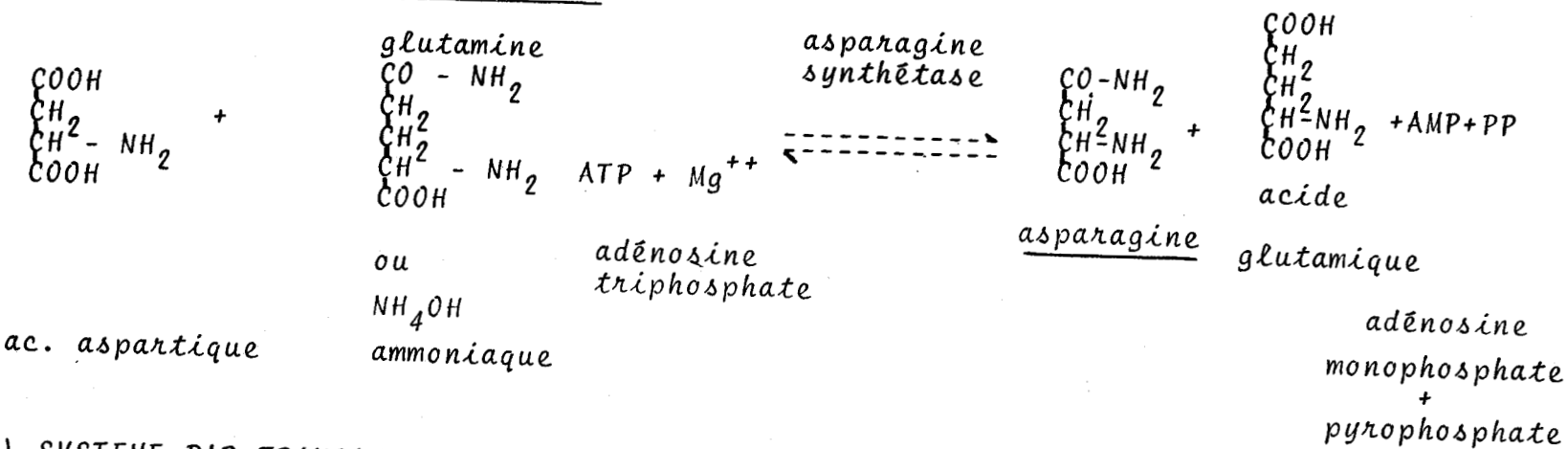
Tableau V - Synthèse du noyau pyrimidique (d'après MEISTER).



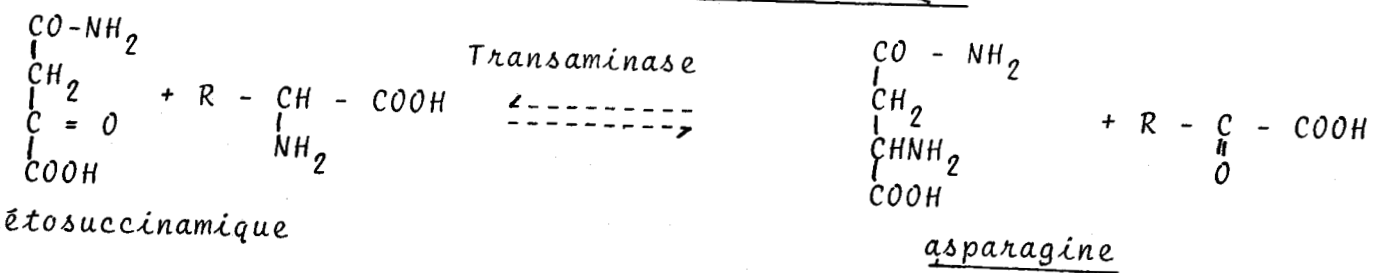
1. aspartate transcarbamylase (rétro inhibée par CTP)
2. dihydroorotase
3. dihydroorotase déshydrogénase
4. Orotidine 5'-phosphopyrophosphorylase

BDIC PARIS

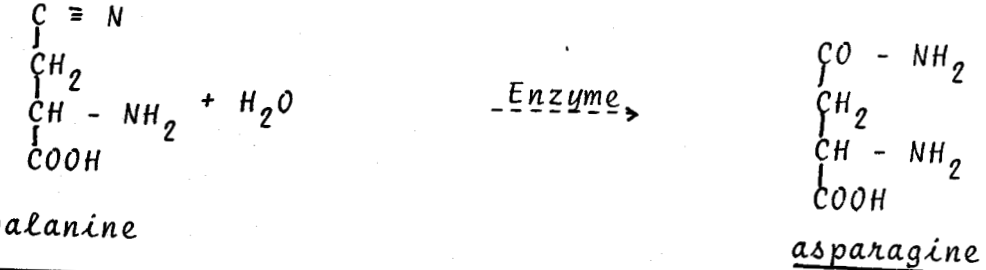
1°) SYSTEME ASPARAGINE SYNTHETASE



2°) SYSTEME PAR TRANSAMINATION DE L'ACIDE αCETOSUCCINAMIQUE



3°) SYSTEME CYANOALANINE (Chez les végétaux).



BUS LILLE

Tableau VI - Synthèse de l'asparagine.

- Le premier système permet la transformation directe de la cyanoalanine en asparagine. Toutefois, il n'a été signalé jusqu'à présent que chez les végétaux.

- Le deuxième système permet la synthèse de l'asparagine par transamination à partir de l'acide α cétosuccinique et d'un acide α aminé pour donner de l'asparagine et un acide α cétonique.

- Le système le plus important est certainement celui qui fait appel à l'asparagine synthétase.

Ce système existe sous deux variantes principales :

- acide aspartique + glutamine + ATP en présence de Mg^{++}
  -------> Asparagine + Acide glutamique + AMP + PP

- acide aspartique + ammoniaque + ATP en présence de Mg^{++}
  -------> Asparagine + H_2O + AMP + PP

Des systèmes asparagine synthétases (ASases) existent sous des formes voisines dans le monde animal. Ils sont soumis en outre à un certain nombre de facteurs et de mécanismes de régulation.

<u>Conclusion</u> :

Il est de plus en plus probable que l'asparaginase peut exister sous diverses formes correspondant probablement à des polymères ou à des agrégats d'une unité enzymatique de base ce qui a été confirmé notamment pour l'asparaginase d'E. Coli et qui pourrait expliquer les divergences de poids moléculaires, les activités spécifiques, et les différences d'activité biologique des asparaginases. En outre, il semble que son mécanisme d'action soit moins simple qu'on ne l'avait imaginé initialement et que son activité biologique dépende de plusieurs mécanismes agissant simultanément (P. LABOUREUR) (123).

T R A V A U X P E R S O N N E L S

L-ASPARAGINASES DU FOIE DE COBAYE

CHAPITRE II

Mise en évidence de deux activités enzymatiques distinctes.

I - METHODE DE DOSAGE SEMI-AUTOMATIQUE DE LA L-ASPARAGINASE.

La L-asparaginase (L-asparagine amido-hydrolase E.C. 3.5.1.1) hydrolyse la liaison amide de l'asparagine pour donner naissance à de l'acide aspartique et à de l'ammoniaque.

Dans le présent travail, nous avons choisi de doser l'activité asparaginasique en mesurant la quantité d'ammoniaque libérée, l'unité internationale (U.I.) d'activité sera définie comme :

- Le nombre de micromoles d'ammoniaque par ml libérées à partir de l'asparagine par minute à 37° C et au pH optimum d'action de l'enzyme.

L'activité spécifique de l'enzyme sera définie comme le nombre d'unités internationales (U.I.) par mg de protéines.

A/ - Dosage de l'Ammoniaque.

Après séparation par dialyse automatique, le dosage colorimétrique de l'ammoniaque par la réaction de Berthelot au phénol hypochlorite est réalisé à l'auto-analyseur Technicon selon une modification de la technique de GIRARD. (124).

a) Réactifs.

1) Eau bidistillée privée d'ammoniaque.

Elle peut être obtenue en redistillant sur quelques gouttes d'acide sulfurique en présence de rouge de méthyle, une eau distillée de bonne qualité. Elle sert à la préparation de tous les réactifs.

2) Solution de chlorure de sodium à 9 g. pour 1000 ml.

3) Solution de phénol sodique.

Phénol pur cristallisé (Prolabo)	25 g.
Soude pure R.P. en pastilles (Prolabo)	0,1 g.
Eau distillée privée d'ammoniaque q.s.p.	1000 mℓ

4) Solution de nitroprussiate de sodium.

. Solution mère : (conservation 1 mois en chambre froide)

- Nitroprussiate de sodium R.P. (Prolabo)	10 g.
- Eau distillée privée d'ammoniaque q.s.p.	50 mℓ
- Acide acétique R.P. cristallisable (Prolabo)	50 mℓ

Solution fille : (conservation : 1 semaine en chambre froide)

- Solution mère précédente	1 mℓ
- Eau distillée privée d'ammoniaque q.s.p.	200 mℓ

5) Solution tampon phosphate.

Phosphate disodique : 12 H_2O R.P. (Prolabo)	180 g.
Eau distillée privée d'ammoniaque q.s.p.	1000 mℓ
Soude pure R.P. en pastilles (Prolabo)	6 g.

6) Solution tamponnée d'hypochlorite (à préparer extemporanément)

Solution d'hypochlorite à 5° chlorométrique (Technicon)	8 mℓ
Solution tampon phosphate précédente q.s.p.	100 mℓ

La qualité de l'hypochlorite est très importante ; il faut se méfier et rejeter les solutions anciennes d'hypochlorite, surtout si elles ont séjourné à la lumière et même si leur degré chlorométrique est correct, car elles entraînent une perte de sensibilité qui peut être très importante. On peut également utiliser des solutions commerciales concentrées d'hypochlorite à 28° - 30° chlorométrique (B.L.B. par exemple) en les diluant convenablement au moment de l'emploi.

b) Schéma du montage du manifold Technicon.

Le schéma du montage de l'Auto-analyseur Technicon est décrit sur la Figure 1. Dans un local non contaminé par des vapeurs d'ammoniaque, il peut être utilisé directement. Cependant, nous préférons munir tous les flacons de réactifs, ainsi que les tubes d'entrée d'air, d'un piège commun à ammoniaque, constitué d'un flacon-laveur contenant de l'acide sulfurique en solution à 20 %. Cette préparation évite les irrégularités de ligne de base et permet une meilleure conservation des réactifs.

La lecture se fait à 625 nm grace à un colorimètre relié à un enregistreur. La cadence des dosages est de 60 à l'heure.

c) Solutions étalons d'ions ammonium.

L'étalonnage est effectué à l'aide d'une gamme de solutions aqueuses de sulfate neutre d'ammonium à 0,01, 0,025, 0,05, 0,125, 0,25, 0,5 et une micromole d'ions ammonium par millilitre.

L'absorption suit la loi de BEER LAMBERT pour des concentrations comprises entre 0 et 1 micromole d'ammoniaque par ml (Fig. 2 - Fig. 3). Au-delà de cette limite une dilution de la solution enzymatique est systématiquement faite.

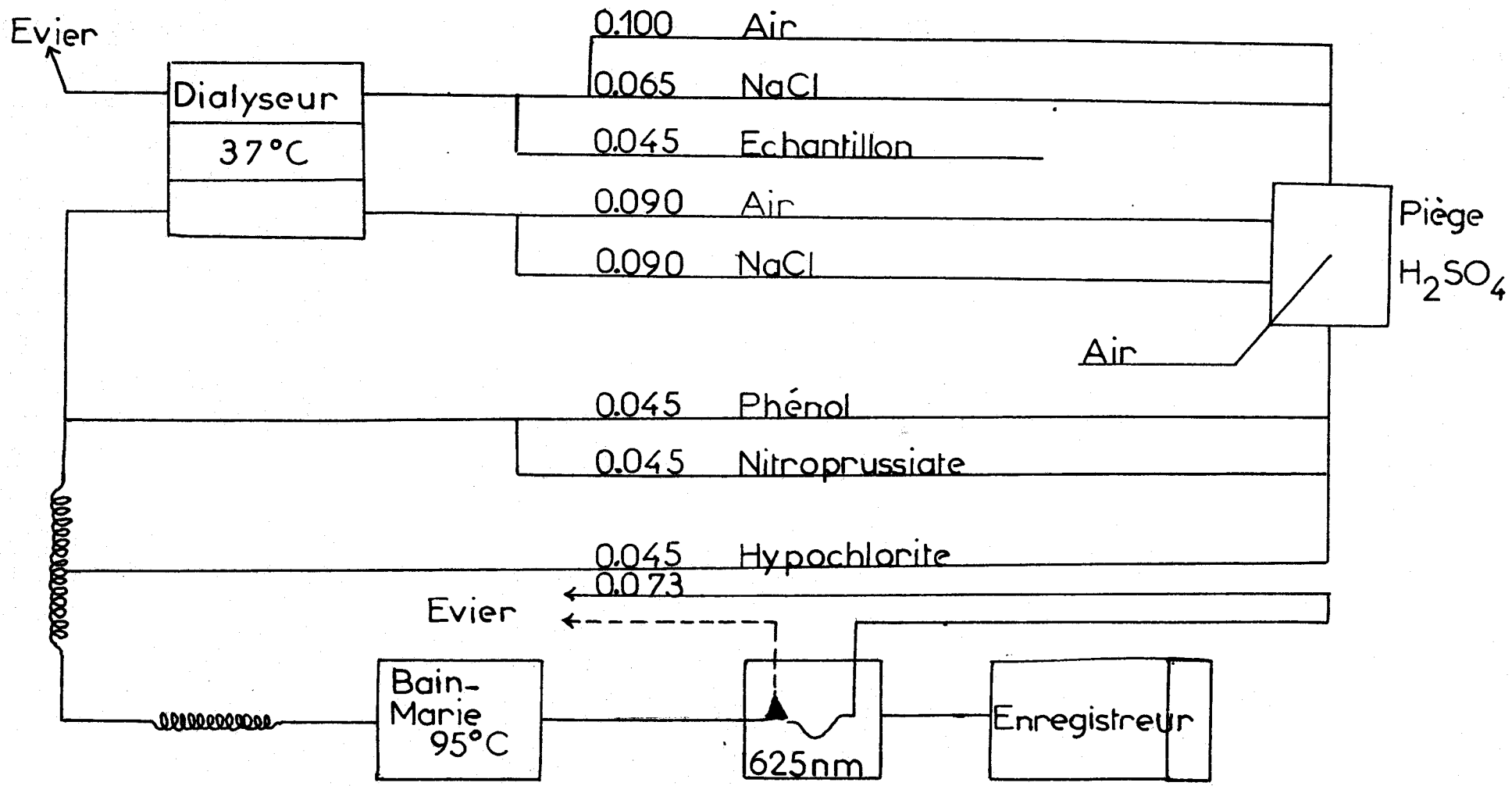


FIG:1 Schéma du montage de l'Auto-analyseur Technicon pour le dosage des ions ammonium par la réaction au phénol hypochlorite.

BUS LILLE

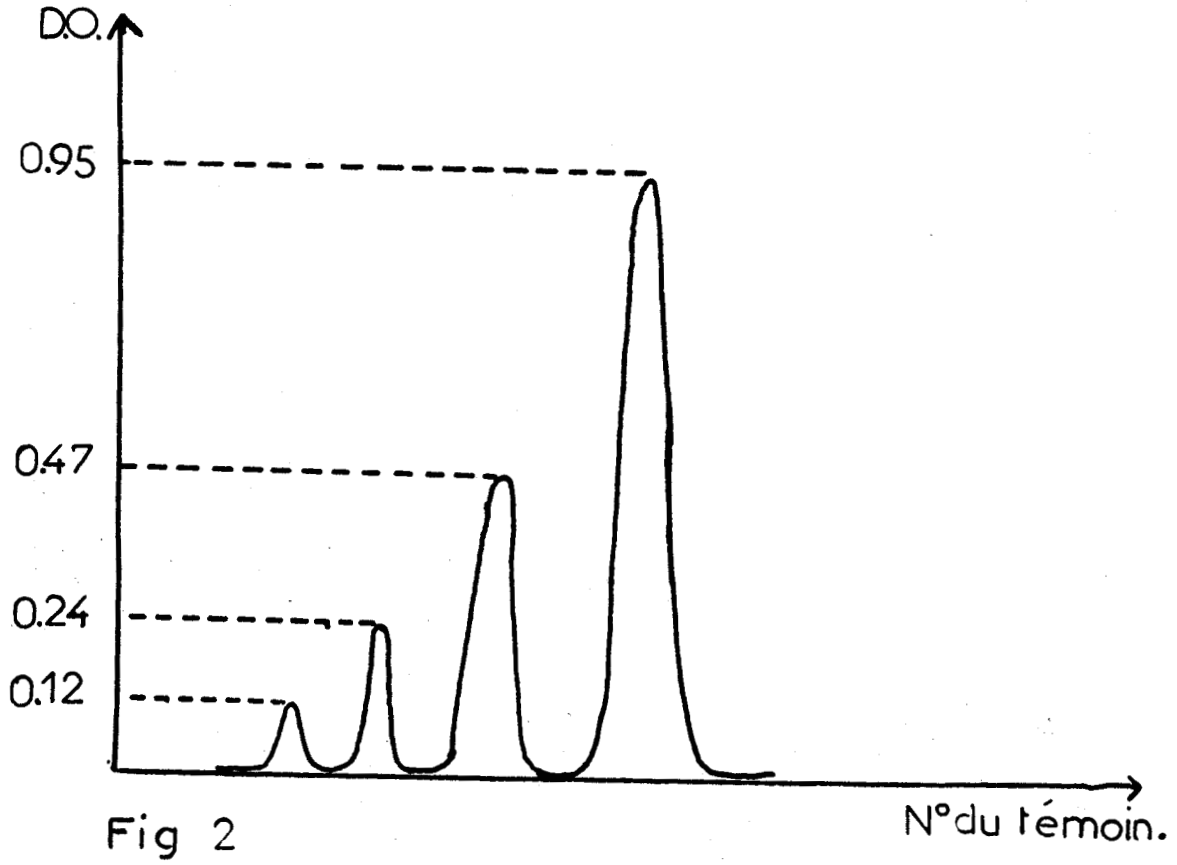
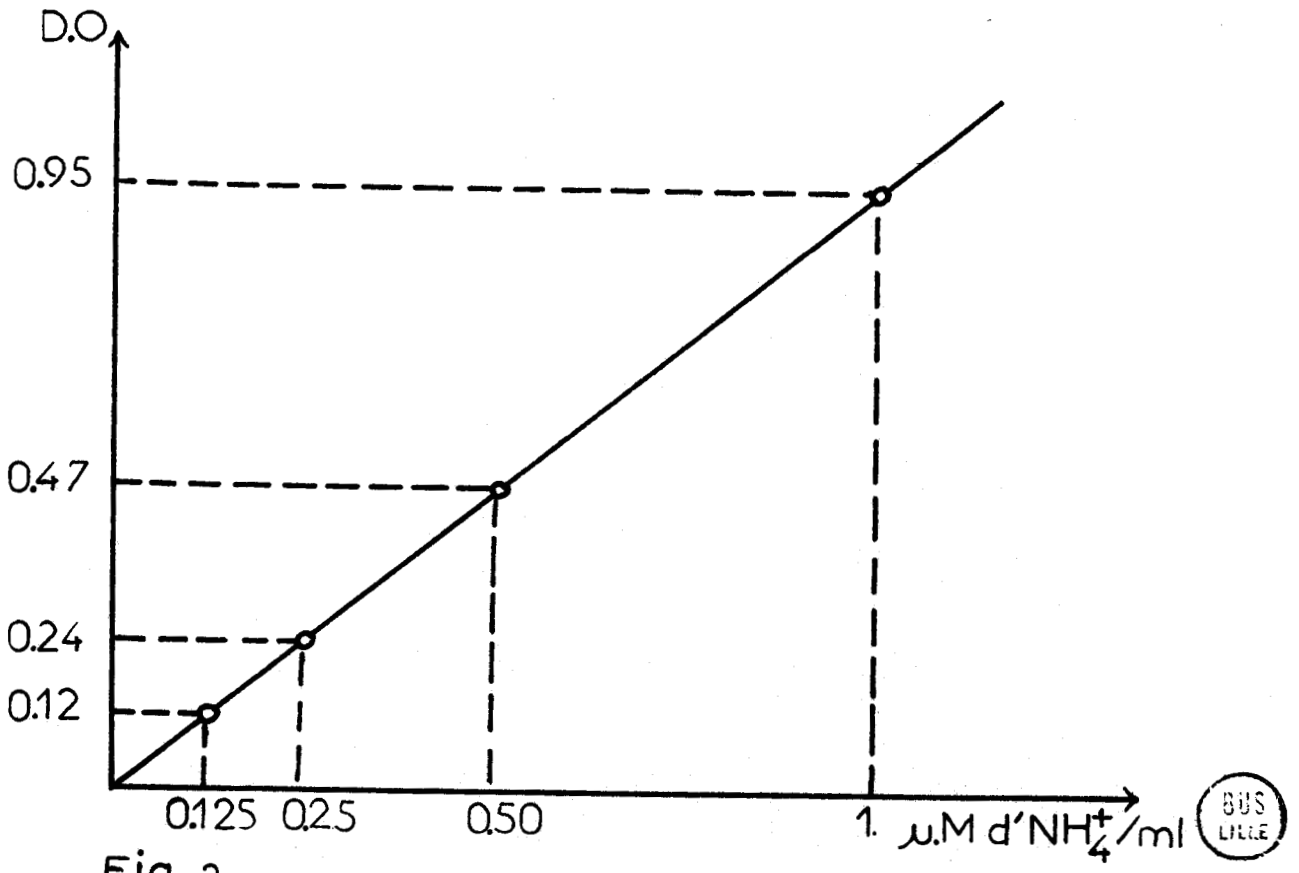


Fig 2

Diagramme des témoins d'ions NH_4^+ de différentes concentrations tracé par l'enregistreur de l'Auto-analyseur Technicon.



BUS LILLE

Fig 3

Courbe témoin obtenue à partir du diagramme en portant en ordonnée la densité optique d'un étalon et en abscisse la concentration en ions NH_4^+.

B/ REACTION ENZYMATIQUE

L'enzyme 0,1 ml est placée dans un tube à hémolyse contenant 1 ml de substrat tamponné constitué par :

- de l'asparagine 10 micromolaires
- du tampon borate 0,01 M de pH 9,2

Le tube est placé pendant 30 minutes dans un bain-marie à 37° C sous agitation constante.

Nous avons vérifié en prolongeant l'incubation de la solution enzyme-substrat et en dosant l'activité enzymatique toutes les 30 minutes que la quantité d'ammoniaque libérée était proportionnelle au temps d'incubation.

C/ ARRET DE LA REACTION ENZYMATIQUE.

Nous avons remarqué que les dérivés organomercuriels tels que le pCMB (parachloromercuribenzoate) ou le merphène inhibent l'enzyme. Nous avons choisi d'arrêter la réaction enzymatique par addition au tube d'incubation d'une goutte de solution saturée d'hydromerphène.

Cette solution est préparée par concentration d'une solution commerciale à 2 p. 1000, sous vide à 37° C au moyen de l'évaporateur rotatif jusqu'à l'apparition de cristaux blancs au fond du ballon, indiquant que la solution est saturée. La solution est filtrée et gardée en chambre froide à + 4° C. Nous avons vérifié l'arrêt total de la réaction enzymatique par l'expérience suivante :

- trois tubes à hémolyse A, B, C, contenant 1 ml d'asparagine en tampon Borate et 0,1 ml de la solution enzymatique sont incubés à 37° C. Au bout de 30 minutes, on dose l'activité enzymatique du tube A, soit D_A son activité.

Dans le tube B, on ajoute 0,1 ml d'une solution saturée d'hydromerphène et on procède à une nouvelle incubation de 30 minutes pour les tubes B et C après quoi leur activité respective D_B et D_C est immédiatement déterminée.
On constate que D_B est égale à D_A et que D_C est le double de approximativement de D_A. Ce qui démontre que l'arrêt de la

réaction enzymatique a été total pendant la deuxième période d'incubation de 30 minutes.

Parallèlement au dosage, un blanc sera effectué en ajoutant avant l'incubation 0,1 ml d'une solution saturée d'hydromerphène, l'activité enzymatique du blanc correspondant aux ions NH_4^+ existant initialement dans la solution et à l'auto-hydrolyse partielle de l'asparagine sera déduite de l'activité enzymatique totale du dosage.

Le schéma sera le suivant :

<u>Dosages</u> :

1 ml d'asparagine en Tampon borate + 0,1 ml solution enzymatique -------> Incubation 30 minutes puis 0,1 ml merphène, soit D_T la densité lue sur l'enregistreur.

<u>Blanc</u> :

1 ml d'asparagine en Tampon borate + 0,1 ml solution enzymatique + 0,1 ml merphène -------> Incubation 30 minutes soit D_0 la Densité Optique correspondante.

La densité réelle du dosage $D_r = D_T - D_0$. En reportant D_r sur la courbe d'étalonnage (Fig. 3) il lui correspond N micromoles d'NH_4^+.

L'activité finale étant calculée en U.I. soit en micromoles NH_4^+ par ml et par minute, de plus, l'enzyme étant diluée au 1/12ème (on a 0,1 ml de solution enzymatique pour un volume global de 1,2 ml) ; le nombre d'U.I. sera donné par la formule :

$$U.I. = \frac{N \times 12}{30}$$

II - DOSAGE DES PROTEINES.

Le dosage colorimétrique des protéines est effectué par la méthode de LOWRY (125) adaptée à l'autoanalyseur Technicon muni d'un filtre interférentiel à 625 nm.

A/ REACTIFS.*

B/ MONTAGE DU MANIFOLD TECHNICON.

Le schéma du Montage de l'auto-analyseur Technicon est décrit sur la Fig. 4.

La lecture se fait à 625 nm grace à un colorimètre relié à un enregistreur. La cadence des dosages est de 60 à l'heure.

C) SOLUTIONS ETALONS DE PROTEINES.

Une courbe témoin analogue à celle des ions ammonium est construite à partir d'une gamme de solutions étalons préparées par dilution d'une solution mère de protéines de titre connu (LAB-TROL).

L'absorption suit la loi de BEER LAMBERT pour des concentrations en protéines allant de 0 à 0,5 mg. Au-delà de cette concentration une dilution de la solution est systématiquement faite.

* Les détails pratiques de la méthode utilisée figurent dans l'appendice technique.

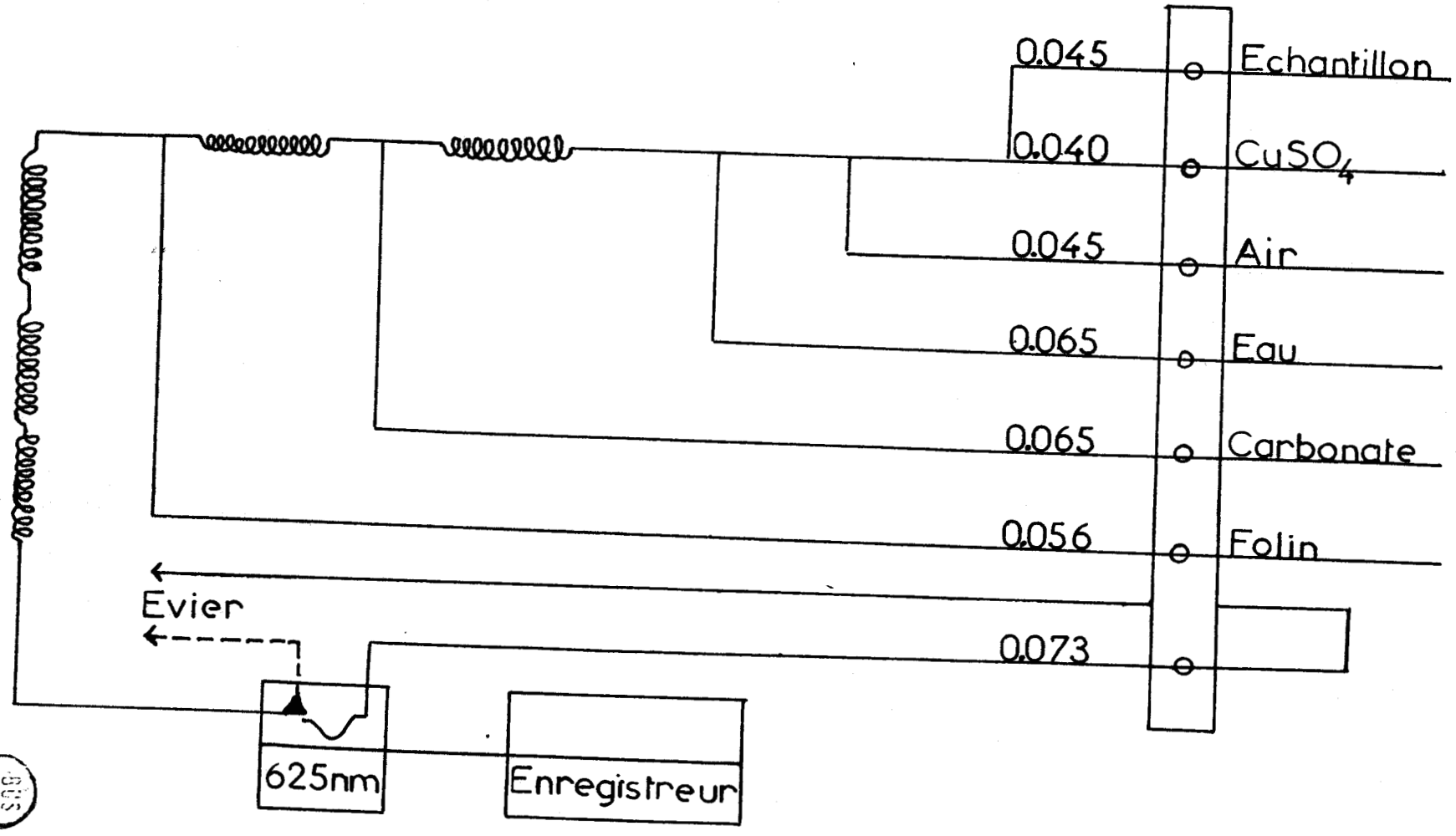


FIG:4 Schéma du montage de l'Auto-analyseur Technicon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY.

III - PREPARATION DE L'HOMOGENAT.

Les cobayes de race tricolore d'un poids de 300 à 400 g. environ sont anesthésiés au carbamate d'éthyle à 10 p. 100 à raison de 1 ml pour 100 g. de poids.

Pour éviter la contamination par l'asparaginase du sérum les cobayes sont exsanguinés sous anesthésie, puis perfusés par une solution chlorurée isotonique. Le foie est ensuite prélevé et plongé dans la glace puis broyé, soit à l'"Ultra-Turrax", soit à l'homogénéiseur "Virtis".

Le foie d'un poids de 20 g. environ est broyé à + 4° C dans une solution chlorurée puis l'homogénat est centrifugé à la même température à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes (Centrifugeuse réfrigérée BECKMAN J 21).

IV - PURIFICATION PARTIELLE DE L'HOMOGENAT.

a) Précipitation par l'acide.

Ayant constaté que l'homogénat précédent précipitait pour des pH inférieurs à 6, nous avons entrepris d'étudier systématiquement pour des pH allant de 6 à 4, la concentration en protéines et l'activité enzymatique du surnageant et du culot séparés par centrifugation à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes à 4° C.

L'homogénat est ajusté au pH désiré par addition de solution d'HCl N, puis 0,1 N. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que l'activité enzymatique était maximale dans le surnageant pour un pH de 5,6 et qu'au-dessous de pH 4, elle devenait nulle ; en outre, que la concentration en protéines du surnageant diminuait avec le pH. Nous avons choisi un pH de 5,6 afin que l'activité spécifique du surnageant soit maximale.

L'examen du Tableau VII montre qu'au cours de cette opération la concentration du surnageant en protéines diminue fortement, ce qui justifie l'intérêt de cette étape. Cependant elle s'accompagne d'une diminution de l'activité enzymatique totale d'environ 30 p. 100 par suite de la dénaturation partielle de l'enzyme au contact de l'acide. Enfin, une faible partie de l'enzyme reste dans le culot après centrifugation de l'homogénat précipité.

b) Précipitation par les sels neutres.

Différents auteurs ont utilisé les sels neutres pour précipiter les protéines par les techniques de relargage. Le surnageant obtenu en a) est additionné de sulfate de sodium en solution à 30 p. 100 à raison de 12 ml de solution saline pour 10 ml d'extrait (SULD et HERBUT (126)), sous agitation magnétique douce, puis la solution est laissée au repos pendant une demi-heure à la température du laboratoire.

On recueille le précipité par centrifugation à 14 000 tours/minute pendant 15 minutes à 20° C. Le précipité est ensuite dissous dans un tampon phosphate de sodium 0,02M de pH 7,35. La solution obtenue peut alors servir pour des étapes ultérieures.

Etape	Volume total en ml	Protéines totales en mg	Activité totale en U.I.	Activité spécifique en U.I./mg de Protéines	Facteur de Purification	Rendement
Homogénat brut	60	1200	78	0,065	1	100 %
Précipitation à pH 5,6	55	440	56	0,13	2	70 %
Précipitation par SO_4Na_2 30 %	10	70	56	0,80	12,5	70 %

Tableau VII : Purification partielle de l'homogénat de foie de cobaye.

Le couplage dela précipitation à pH 5,6 et du relargage par le sulfate de sodium permet d'obtenir avec un bon rendement une solution enzymatique enrichie 12,5 fois.

BIBLIOTHEQUE

V - PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES PERMETTANT DE METTRE EN EVIDENCE DEUX ACTIVITES ASPARAGINASIQUES DISTINCTES.

Introduction.

Parmi les techniques (Sephadex, DEAE, Hydroxylapatite, ultracentrifugation) utilisées par les auteurs pour purifier la L-asparaginase provenant de différentes sources, certaines (l'hydroxylapatite et l'ultracentrifugation) se sont révélées décevantes dans le cas du foie de cobaye ; d'autres nous ont permis d'obtenir des résultats intéressants (DEAE, Sephadex, Electrophorèse préparative, en veine liquide sur bloc de cellogel, et sur polyacrylamide) et notamment d'identifier deux pics d'activité asparaginasique distincts.

Nous présentons ci-dessous les premiers résultats obtenus avec ces différentes techniques.

Pour l'ensemble de ce travail, nous avons utilisé un homogénat de foie ayant subi une purification partielle dont la préparation a été décrite aux paragraphes III et IV.

A/ CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGES D'IONS.

Nous avons utilisé un échangeur anionique : la DE 52 (diéthyl-amino-éthyl-cellulose) Whatman.

1) Préparation de l'échangeur.

La DEAE cellulose se présente sous forme humide. Elle est d'abord mise progressivement en suspension sous agitation manuelle douce dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M de pH 7,35 (SULD et HERBUT 127).

On procède ensuite à une équilibration d'ions par lavages et décantations successifs au moyen du tampon précédent. L'opération demande 10 litres de tampon environ.

La DEAE est ensuite soigneusement dégazée à la trompe à vide et introduite dans une colonne 1,5 x 52 cm, surmontée d'une entonnoir, le tout placé à la température de + 4° C ; on laisse tasser la colonne 48 heures à écoulement libre. Puis elle est ajustée au niveau choisi.

2) Chromatographie de l'homogénat de foie de cobaye.

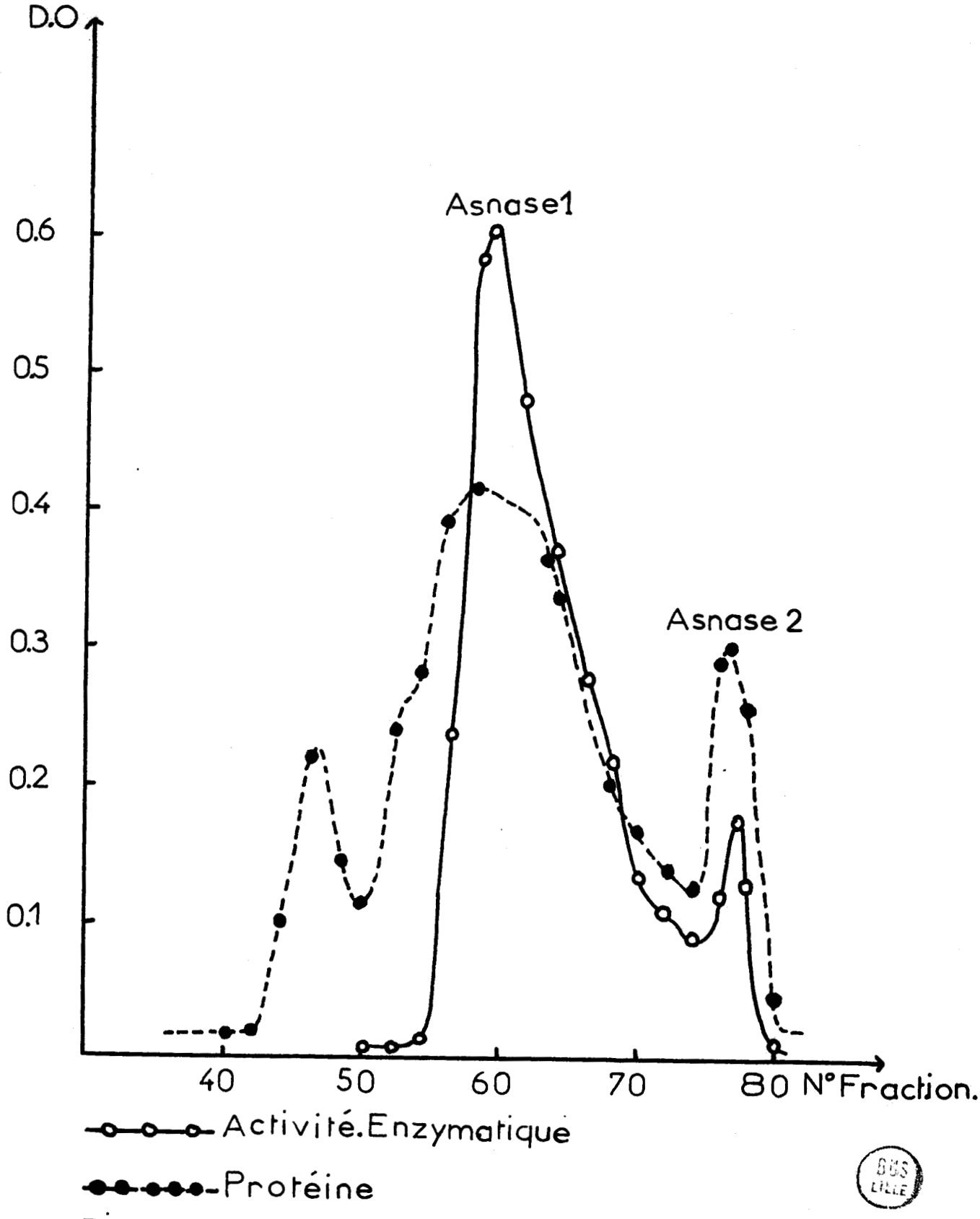
2 ml d'homogénat sont introduits au sommet de la colonne à l'aide d'une seringue. On fait pénétrer et on lave les parois avec 2 volumes de tampon d'élution.

Le bas de colonne est relié à une pompe péristaltique. L'élution, se fait par un gradient de tampon constitué par :

- 138 ml de tampon phosphate disodique 0,02 M, pH 7,35 0,5 M en NaCl.
- 225 ml de tampon phosphate pH 7,35 (SULD et HERBUT 128)

Ces deux tampons sont placés dans deux fioles coniques identiques reliées entre-elles par un siphon, une agitation magnétique assure le mélange des solutions. La vitesse d'élution est de 6 ml/heure et les fractions collectées ont un volume de 4,5 ml.

Dans une première étape, nous avons déposé l'homogénat seul. On observe deux pics d'activité distincts (Fig. 5) que nous appelons Asparaginases I et II dans l'ordre respectif de leur élution.



BUS LILLE

FIG 5 Chromatographie sur "DEAE Cellulose" de l'asparaginase de foie de cobaye (colonne 1,8 × 52 cm) équilibrée par un tampon phosphate de sodium 0,02 M, pH 7,35, et éluée par un gradient de NaCl 0,5 M. Les opérations sont effectuées à + 4° C à la vitesse de 6 ml/Heure et les fractions collectées ont un volume de 4,5 ml.

Dans une deuxième étape nous avons déposé l'homogénat + 2 ml de sérum de cobaye. Outre les deux pics correspondant aux asparaginases I et II du foie, nous voyons apparaître un troisième pic correspondant à l'asparaginase du sérum (Fig; 6).

Dans une troisième étape, nous avons déposé sur l'échangeur d'ions 1 ml de sérum de cobaye seul : 1 seul pic d'activité était alors décelé (Fig. 7) et permettait de localiser l'asparaginase de sérum sur le diagramme précédent, éliminant ainsi l'hypothèse que l'asparaginase II pouvait résulter d'une contamination de la I par l'asparaginase du sérum.

Nous avons remarqué que l'addition de sérum de cobaye aux asparaginases du foie, accélérait l'élution des protéines, permettant ainsi d'obtenir pour l'asparaginase I une meilleure activité spécifique.

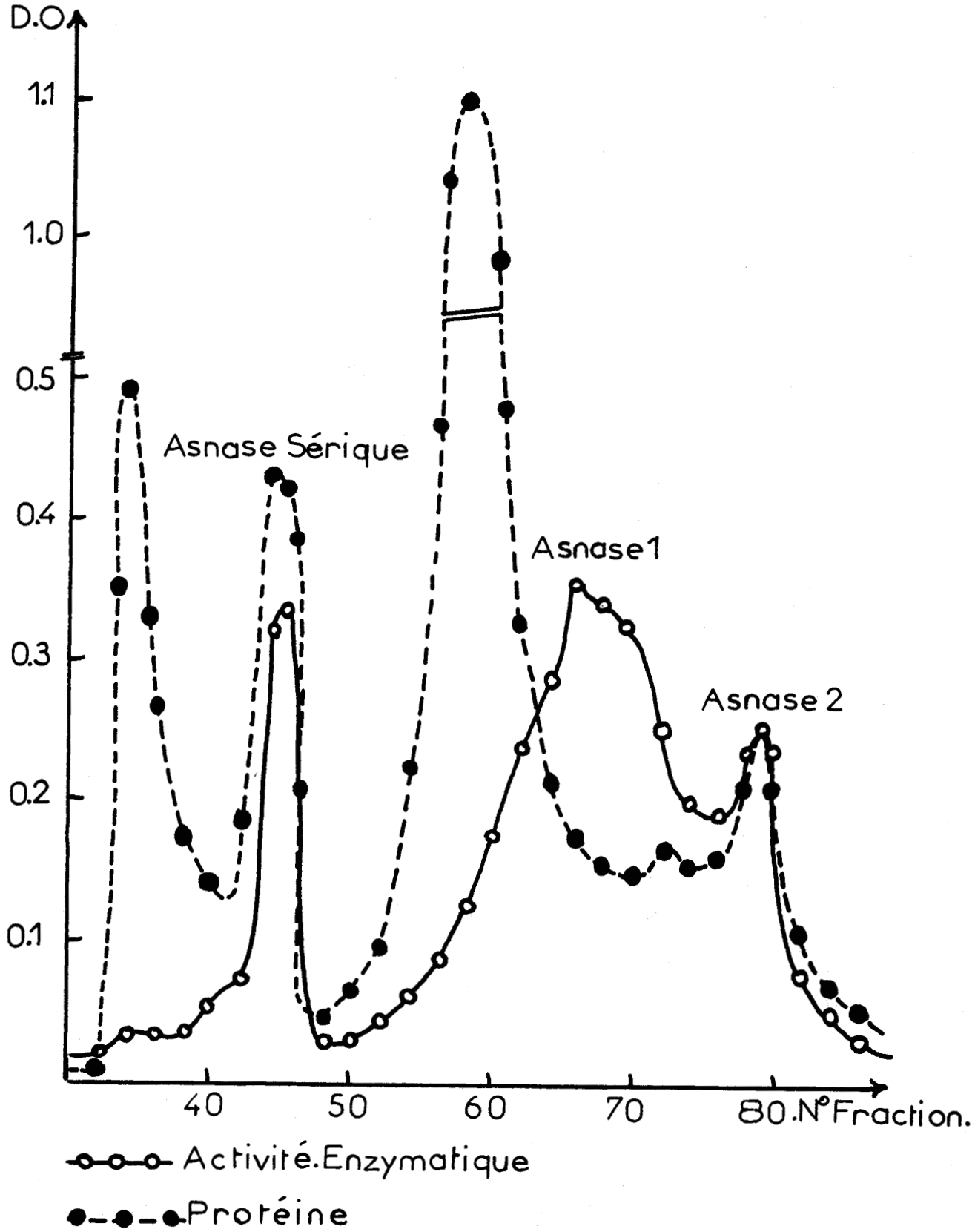


FIG 6 Chromatographie sur "DEAE Cellulose" d'un mélange des asparaginases de foie et de sérum de cobaye (colonne de 1,8 × 52 cm)(équilibrée par un tampon phosphate de sodium 0,02 M, pH 7,35 et éluée par un gradient de NaCl 0,5 M). Les opérations sont effectuées à + 4° C à la vitesse de 6 ml/Heure et les fractions collectées ont un volume de 4,5 ml.

BUS LILLE

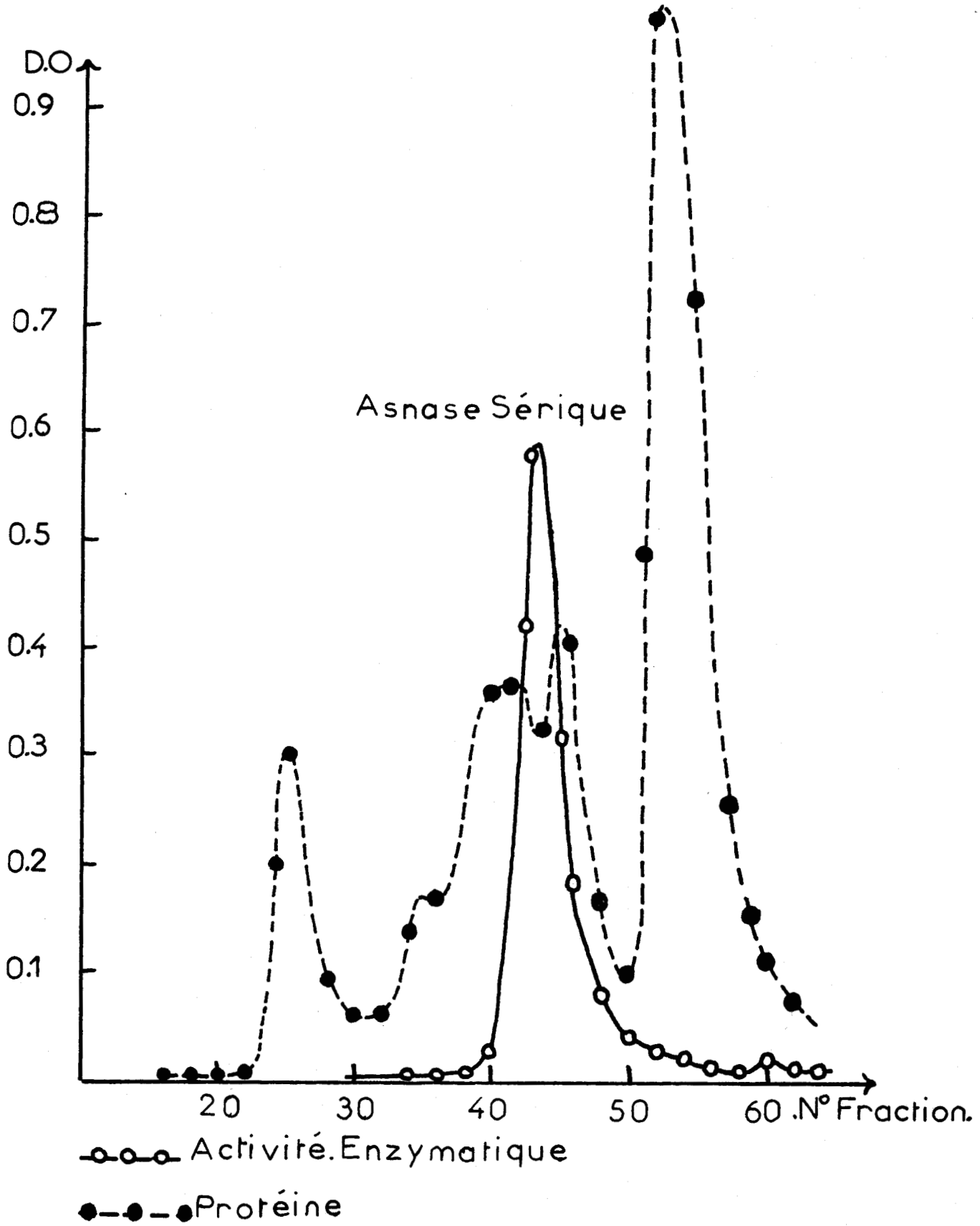


FIG 7 Chromatographie sur "DEAE Cellulose" de l'asparaginase de sérum de cobaye (colonne de 1,8 × 52 cm équilibrée par un tampon phosphate de sodium 0,02 M, pH 7,35 et éluée par un gradient de NaCl 0,5 M). Les opérations sont effectuées à +4° C à la vitesse de 6 ml/Heure et les fractions collectées ont un volume de 4,5 ml.

BUS LILLE

B/ CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE : Gel filtration

1) Préparation du gel.

Nous avons utilisé un Sephadex G 200 (40-120 microns) (Pharmacia Fine Chemicals) 10 g. de gel sont versés lentement sous agitation manuelle douce dans 3 litres de solution de chlorure de sodium 0,02 M.

Le gel est ensuite mis à gonfler à + 4° C, la solution saline étant journellement renouvelée. Au bout de 72 heures environ, le gel est dégazé à la trompe à vide et placé dans une colonne de verre (1 cm x 60 cm) remplie d'une solution de NaCl 0,02 M dégazée. La colonne est tassée 48 heures d'abord à écoulement libre puis à écoulement lent : 4 à 5 gouttes/minute.

2) Chromatographie de l'homogénat.

2 ml d'homogénat identique à celui placé sur l'échangeur d'ions sont introduits à l'aide d'une seringue en haut de la colonne. L'élution est réalisée avec une solution de chlorure de sodium 0,02 M ; la vitesse d'écoulement est de 9,2 ml/heure ; les fractions collectées ont un volume de 2,3 ml. Tous les travaux sont conduits à la température de + 4° C. Le dosage de l'activité enzymatique sur chaque fraction, nous a permis de mettre en évidence deux activités distinctes nettement séparées entre-elles. (Fig. 8).

3) Relations entre la chromatographie d'échange d'ions et la gel filtration.

Nous avons pu déterminer, en repassant sur gel de Sephadex chacun des pics séparés sur DEAE, que le premier pic de DEAE correspondait au poids moléculaire le plus

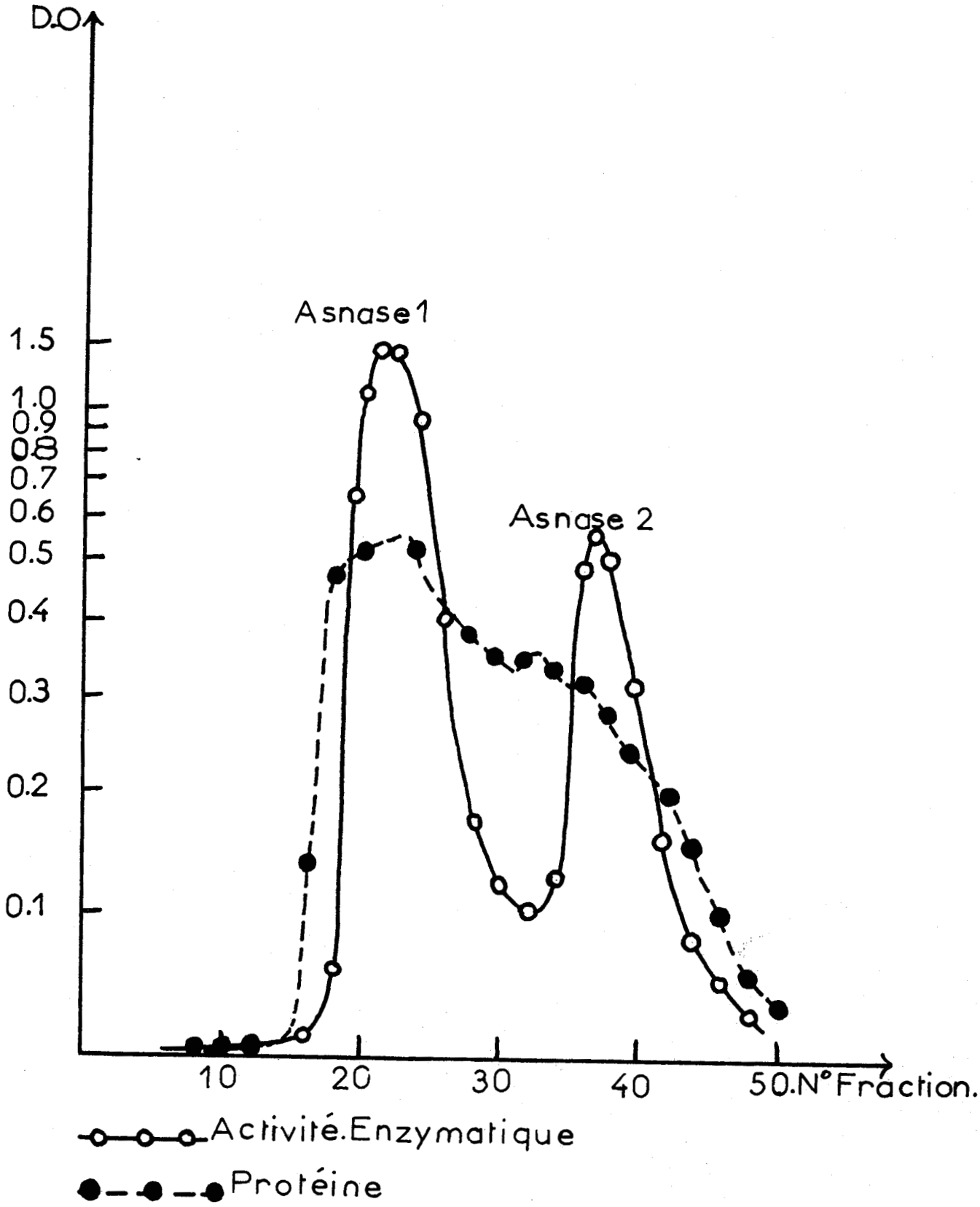


FIG 8

Chromatographie de gel filtration de l'asparaginase de foie de cobaye sur une colonne de "Sephadex G 200" (1 cm x 60 cm) équilibrée à + 4° C par une solution de NaCl 0,02 M et éluée avec la même solution (vitesse de 9,2 ml/Heure). Les fractions collectées ont un volume de 2,3 ml.

BUS LILLE

élevé en gel filtration, et que le 2ème pic de DEAE au poids moléculaire le plus faible. Ainsi, l'ordre d'élution des asparaginases I et II est le même en chromatographie sur DEAE et en gel filtration.

4) Identification des deux activités enzymatiques I et II séparées par gel filtration à deux activités asparaginasiques I et II.

- Avant de poursuivre l'expérimentation, nous avons vérifié que l'action des deux activités enzymatiques séparées par gel filtration sur des solutions de L-asparagine tamponnées libérait non seulement de l'ammoniac mais aussi de l'acide L-aspartique et que nos activités enzymatiques catalysaient bien la réaction.

$$2\ H_2O + \text{L-asparagine} \longrightarrow \text{Acide L-aspartique} + NH_4OH$$

- Dans une première étape, nous avons séparé à partir d'un homogénat partiellement purifié, les deux activités enzymatiques distinctes par gel filtration suivant le protocole décrit précédemment, puis nous avons rassemblé les fractions correspondant aux pics 1 et 2.

- Dans une deuxième étape, cinq tubes à hémolyse sont préparés de la manière suivante :

Tube 1 : 1 ml d'une solution à 2 mg/ml de L-asparagine + 1 ml d'une solution à 2 mg/ml d'acide L-aspartique.

Tube 2 : 1 ml d'une solution à 1 mg/ml de L-asparagine + 0,2 ml de solution enzymatique 1, puis incubation 2 heures à 37° C, et enfin arrêt de la réaction par 1 goutte de solution saturée d'hydromerphène.

Tube 3 : 1 mℓ d'une solution à 1 mg/mℓ de L-asparagine + 0,2 mℓ de solution enzymatique I + 1 goutte de solution saturée d'hydromerphène, puis incubation 2 heures à 37° C.

Tube 4 : 1 mℓ d'une solution de L-asparagine à 1 mg/mℓ + 0,2 mℓ de solution enzymatique II, puis incubation 2 heures à 37° C, enfin arrêt de la réaction par 1 goutte d'hydromerphène.

Tube 5 : 1 mℓ d'une solution de L-asparagine à 1 mg/mℓ + 0,2 mℓ de solution enzymatique II + 1 goutte d'hydromerphène puis incubation 2 heures à 37° C.

Le tube 1 est un témoin interne de L-asparagine et d'acide L-aspartique.

Les tubes 3 et 5 correspondent respectivement au blanc ou au temps zéro des réactions enzymatiques effectuées dans les tubes 2 et 4.

Dans une troisième étape, nous avons déposé sur un papier Whatman n° 3, 3,50 microlitres de chacune de ces solutions.
(Les 50 microlitres de L-asparagine déposés comme témoin interne correspondent à la quantité de L-asparagine initialement présente dans chacun des autres tubes).

- Ces solutions sont soumises à une électrophorèse à pH 3,9 dans une cuve en toit.*

* Les détails pratiques de la méthode figurent dans l'appendice technique.

Sur l'électrophorégramme révélé (Fig. 9) les positions (1 à 5) correspondent aux numéros des tubes décrits précédemment.

La ligne de taches inférieure , correspond à la position de l'acide L-aspartique : la ligne supérieure à celle de la L-asparagine.

- La position 1 est occupée par les témoins internes de la L-asparagine et d'acide L-aspartique.
- Les taches de L-asparagine en position 2 et 4 ont fortement diminué alors que de l'acide L-aspartique est apparu.

Par contre, les taches de L-asparagine en position 3 et 5 sont restées sensiblement égales, au témoin ; seule une petite partie due à l'auto-hydrolyse spontanée de l'amide a disparu.

Les activités enzymatiques I et II séparées par gel filtration catalysent donc une réaction d'hydrolyse, de la L-asparagine pour donner naissance à de l'ammoniaque et à de l'acide L-aspartique. Ce sont donc des asparaginases ou dans la nomenclature internationale des L-asparagine amido-hydrolases E.C. 3.5.1.1.

5- <u>Application de la gel filtration : Estimation des masses moléculaires des deux asparaginases du foie de cobaye</u>.

En étalonnant dans des conditions expérimentales identiques (vitesse d'élution, temps de fractionnement) la colonne de Sephadex G 200, nous avons pu estimer la masse moléculaire des deux asparaginases.

Nous avons utilisé comme étalons :

- des immunoglobulines G P.M. 150 000
- de la sérum albumine P.M. 67 000
- de la trypsine 3 fois cristallisée P.M. 25 000
- de l'inhibiteur trypsique du soja P.M. 21 500

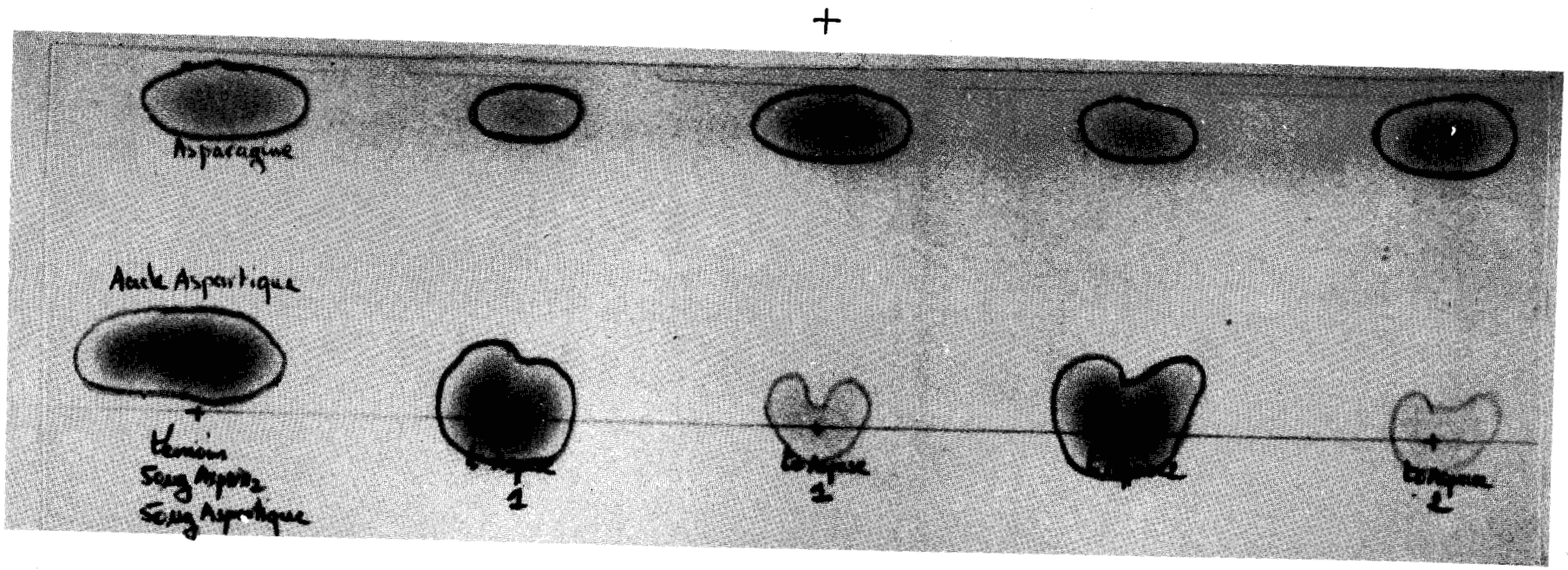


FIG:9 Electrophorèse à pH 3,9 :

1: de témoins internes d'asparagine et d'acide aspartique.

2: de la solution asparagine + asparaginase1 après 1 heure d'incubation à 37°C.

3: des produits libéres par l'autohydrolyse de l'asparagine.

4: de la solution asparagine + asparaginase 2 après 1 heure d'incubation à 37° C.

5: des produits libéres par l'autohydrolyse de l'asparagine.

Nous avons passé dans un premier temps l'homogénat de foie, puis les étalons un par un, puis de nouveau, l'homogénat de foie ; afin de vérifier le bon fonctionnement de la colonne en fin d'expérience.

Nous avons dosé les protéines par la méthode de LOWRY (130) et l'activité enzymatique par la méthode au phénolhypochlorite (GIRARD 131).

Le diagramme obtenu (Fig. 10) nous a permis une estimation des masses moléculaires, en portant sur un graphique en abscisse la fraction correspondant au maximum de concentration des produits et en ordonnée, le logarithme des masses moléculaires correspondantes (Fig. 11).

On peut attribuer un poids moléculaire voisin de 150 000 ± 25 000 à l'enzyme I et de 21 500 ± 2000 à l'enzyme II. L'erreur attribuée à chaque poids correspond à plus ou moins une fraction de part et d'autre du maximum de concentration pour chaque pic.

Nous avons déposé sur cette même colonne un sérum de cobaye après repérage du pic d'activité, et en reportant sur la droite d'étalonnage, nous avons attribué un poids moléculaire de 125 000 ± 20 000 à l'asparaginase du sérum de cobaye ce qui correspond au poids moléculaire indiqué dans la littérature. (TOBIAS O. YELLIN) - Thèse de Doctorat - University of Delaware pH D (1966).

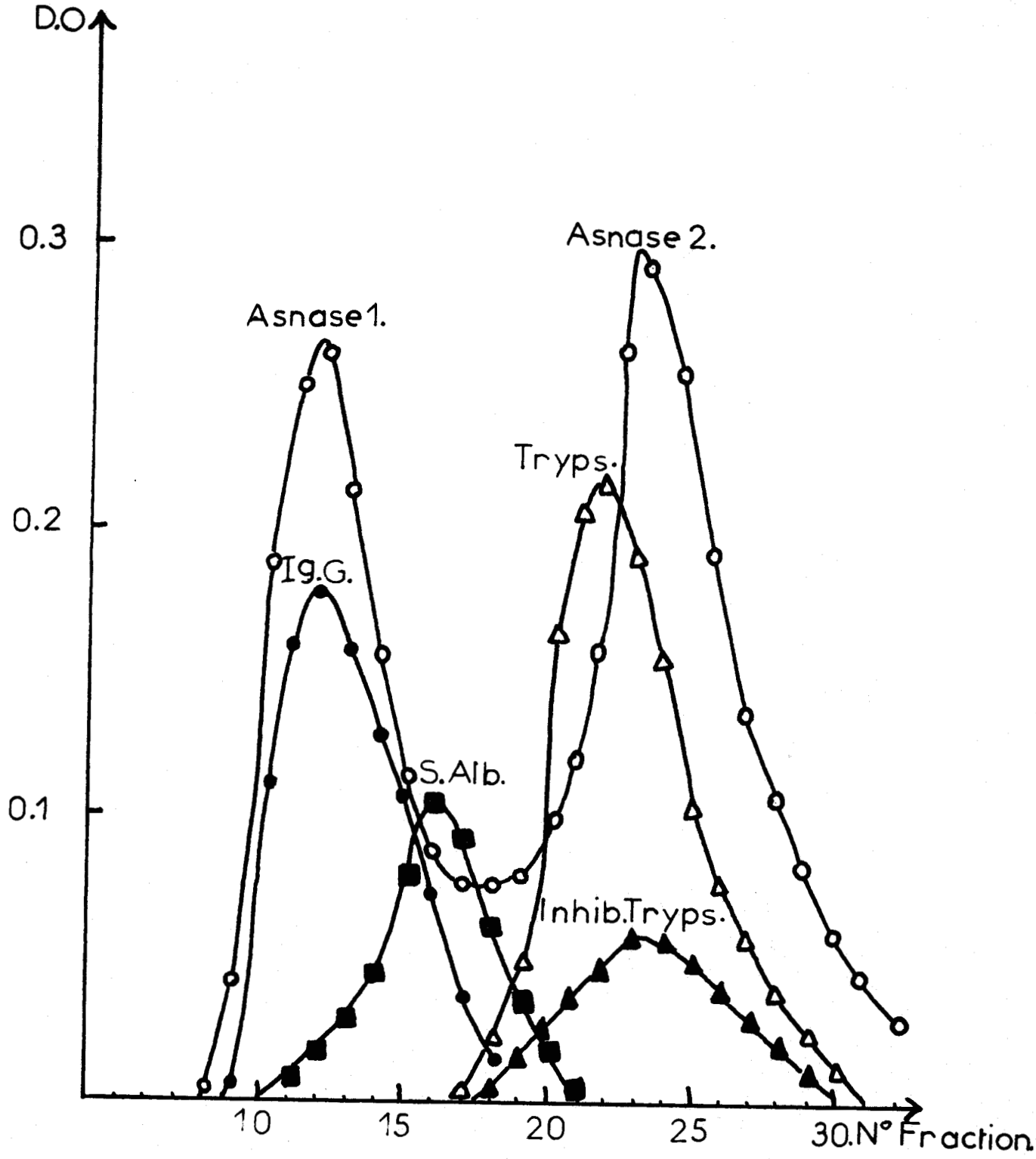


FIG 10 Chromatographies de gel filtration successives de l'asparaginase de foie de cobaye (—o—o—o—) et des témoins suivants : Immunoglobuline G (—●—●—●—●—), Sérum Albumine (—■—■—■—), Trypsine (—△—△—△—), et inhibiteur trypsique du soja (—▲—▲—▲—) sur une colonne de "Sephadex G 200" (1 × 60 cm) équilibrée à + 4° C par une solution de NaCl 0,02 M et éluée avec la même solution (vitesse de 9,2 ml/Heure). Les fractions collectées ont un volume de 2,3 ml.

BUS LILLE

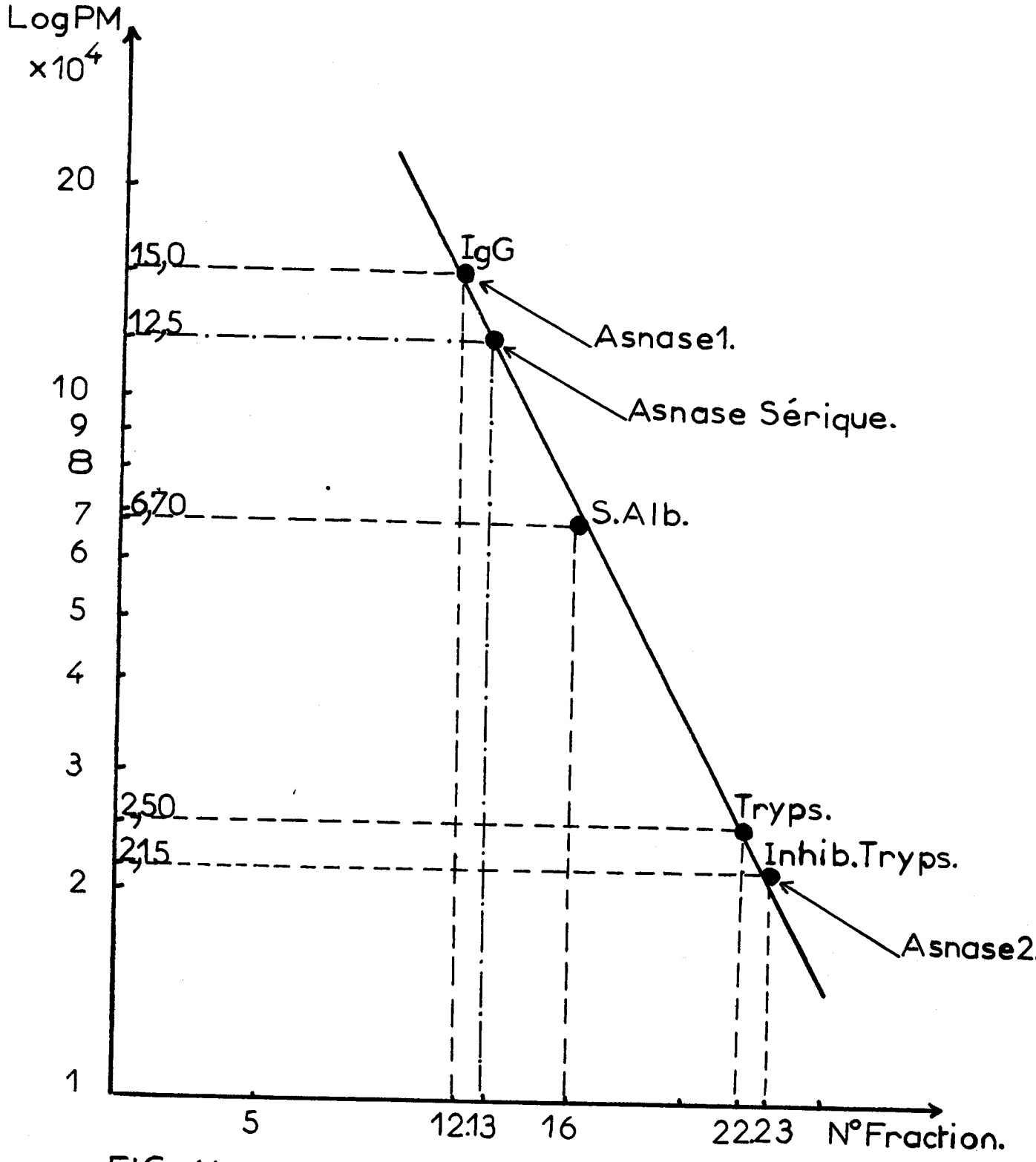


FIG 11 Evaluation du poids moléculaire des asparaginases I et II du foie de cobaye en portant sur l'ordonnée d'un système d'axes orthonormés, le logarithme des Poids Moléculaires et sur l'abscisse, le numéro de la fraction du maximum de concentration des témoins correspondants déterminé lors de la gel filtration. (Fig. 10)

BUS LILLE

C/ ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE DE L'HOMOGENAT.

1) Matériel utilisé :

L'appareil utilisé est un Elphor Vap.

Le tampon d'électrode est constitué par de l'acide citrique 0,0256 M et du Tris 0,24 M. Son pH est de 8,6.

Le tampon de chambre est constitué par :

- 500 mℓ d'une solution A contenant de l'acide borique 0,1 M dans KCℓ 0,1 M.
- 120 mℓ d'une solution B contenant de la soude 0,1 N
- 4380 mℓ d'eau distillée.

Le pH de ce tampon est de 8,6 et sa conductivité est de 1100 Ω .

2) Conditions techniques.

5 mℓ de l'homogénat sont injectés à la vitesse de 2 mℓ/heure dans la chambre maintenue à + 5° C pendant toute l'opération. La vitesse d'injection du tampon dans la chambre est de 100 mℓ/heure, la différence de potentiel appliquée aux électrodes est de 1900 volts, l'intensité de 100 mA.

3) Résultats.

Après avoir dosé la concentrationen protéine et l'activité enzymatique de chaque fraction, nous avons mis en évidence deux pics d'activité distincts (Fig. 12).

Les fractions correspondant à ces activités ont été rassemblées et reconcentrées jusqu'à 2 mℓ environ par

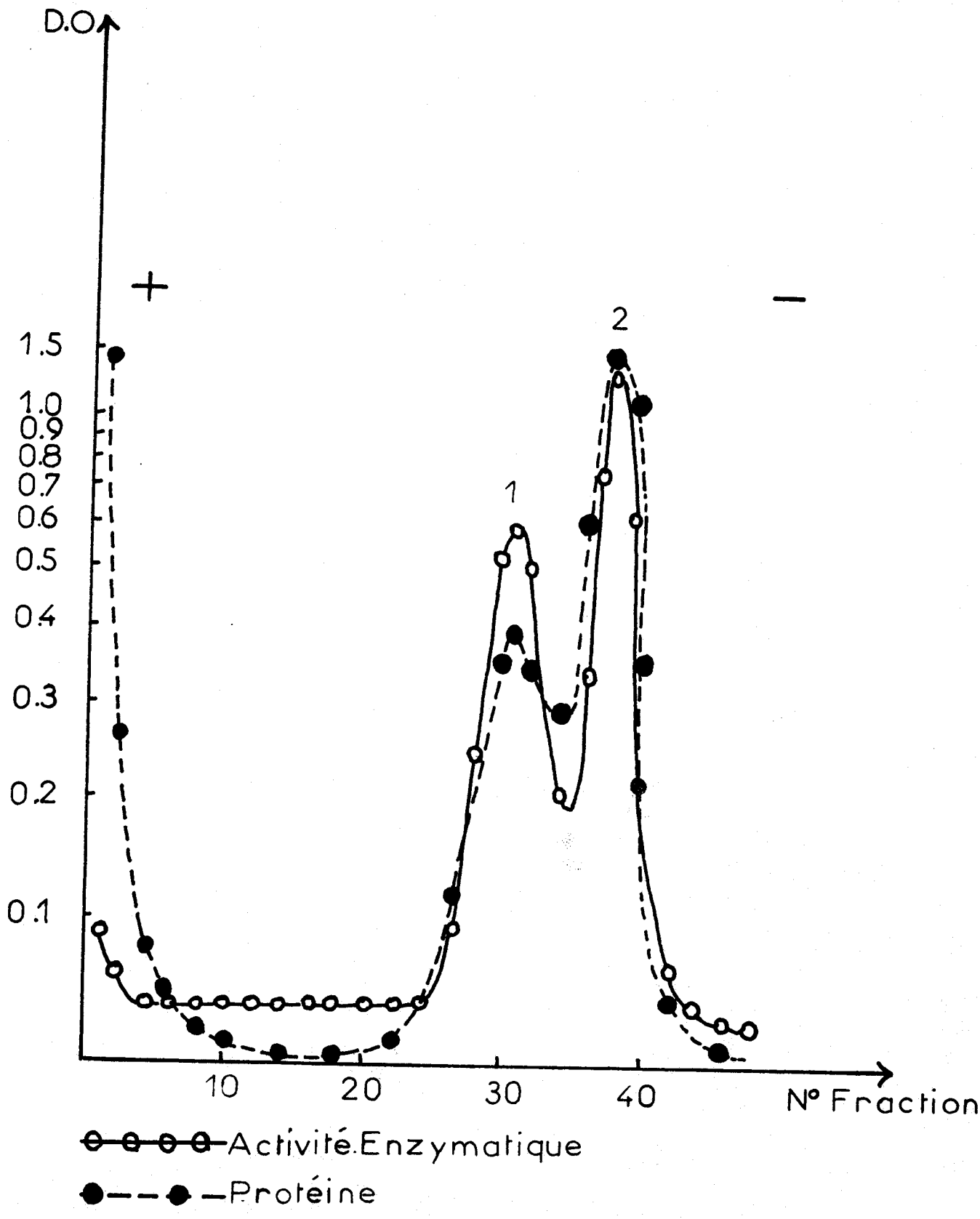


FIG 12 Electrophorèse préparative (Elphor-Vap) d'un homogénat de foie de cobaye.

BUS LILLE

dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000 (SCHUCHARDT) à + 4° C et déposées séparément sur une colonne de Sephadex G 200. Le premier pic de l'électrophorèse conduit à un mélange d'Asparaginase I et d'Asparaginase II (Fig. 14). La présence d'Asparaginase II peut s'expliquer par la contamination du pic I del'électrophorèse par le pic II.

Le deuxième pic conduit à l'Asparaginase II nettement majoritaire (Fig. 13).

D/ ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.

1) Matériel et Technique utilisés.*

2) Découpage du bloc.

Sur l'autre moitié correspondante, rassemblée côte à côte avec la moitié colorée, on effectue un découpage avec une lame de rasoir, en tenant compte de la position des bandes de protéine révélées. Ces bandes sont ensuite éluées par simple compression du gel dans une seringue de notre fabrication.

Le volume recueilli est de l'ordre de 1,7 ml à 2 ml par bande compressée.

3) Mesure de l'activité enzymatique de l'éluat.

L'activité enzymatique est dosée sur chaque fraction par la réaction au phénol hypochlorite décrite précédemment. 100 microlitres de l'éluat sont incubés avec un ml d'asparagine boratée pendant 30 minutes à 37° C. Parallèlement un blanc est effectué en remplaçant les 100 microlitres de l'éluat précédent par celui issu de la compression d'une bande provenant de la partie anodique du bloc.

* Le matériel et la technique utilisés sont décrits dans l'appendice technique.

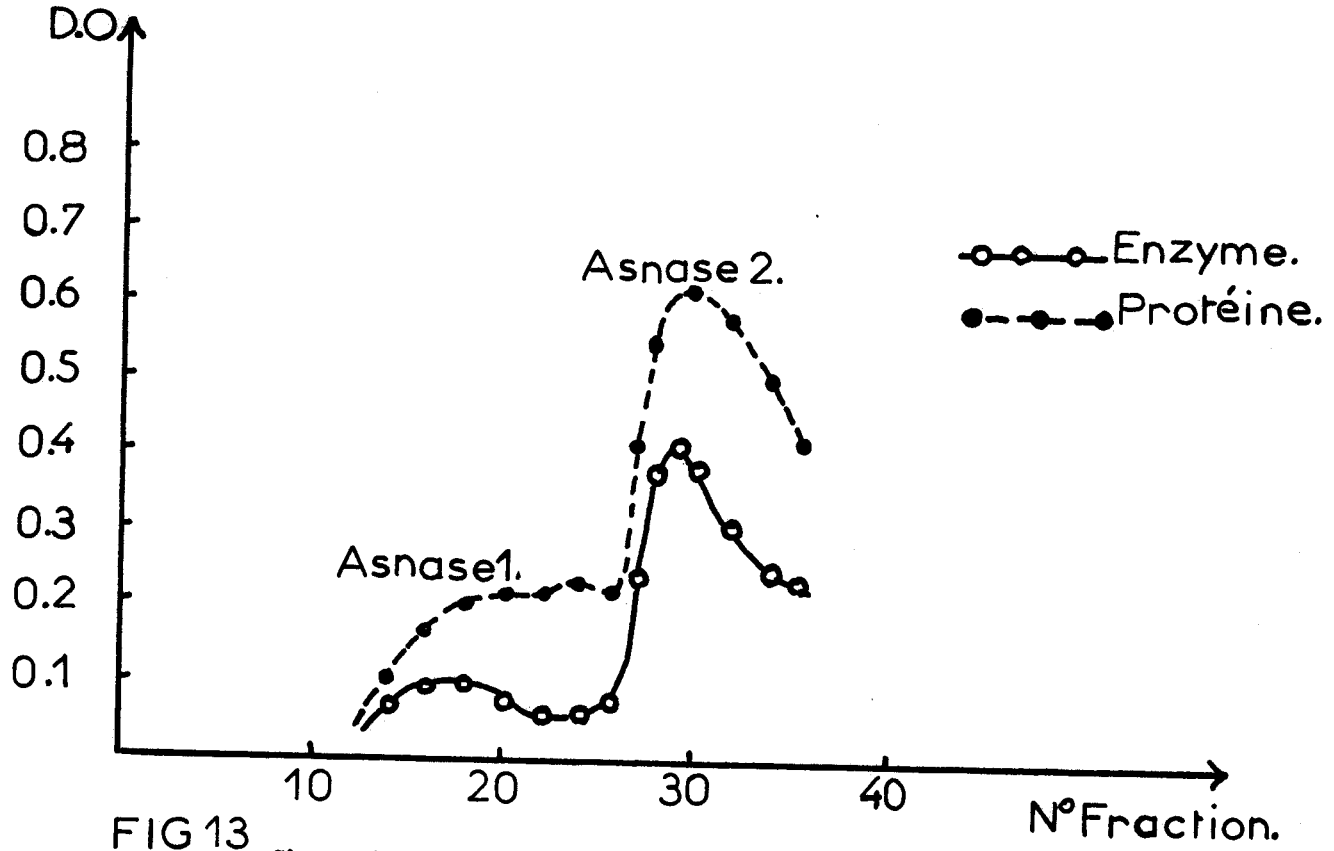


FIG 13 Chromatographie de gel filtration sur une colonne de "Sephadex G 200" des fractions correspondant au pic II de l'électrophorèse préparative

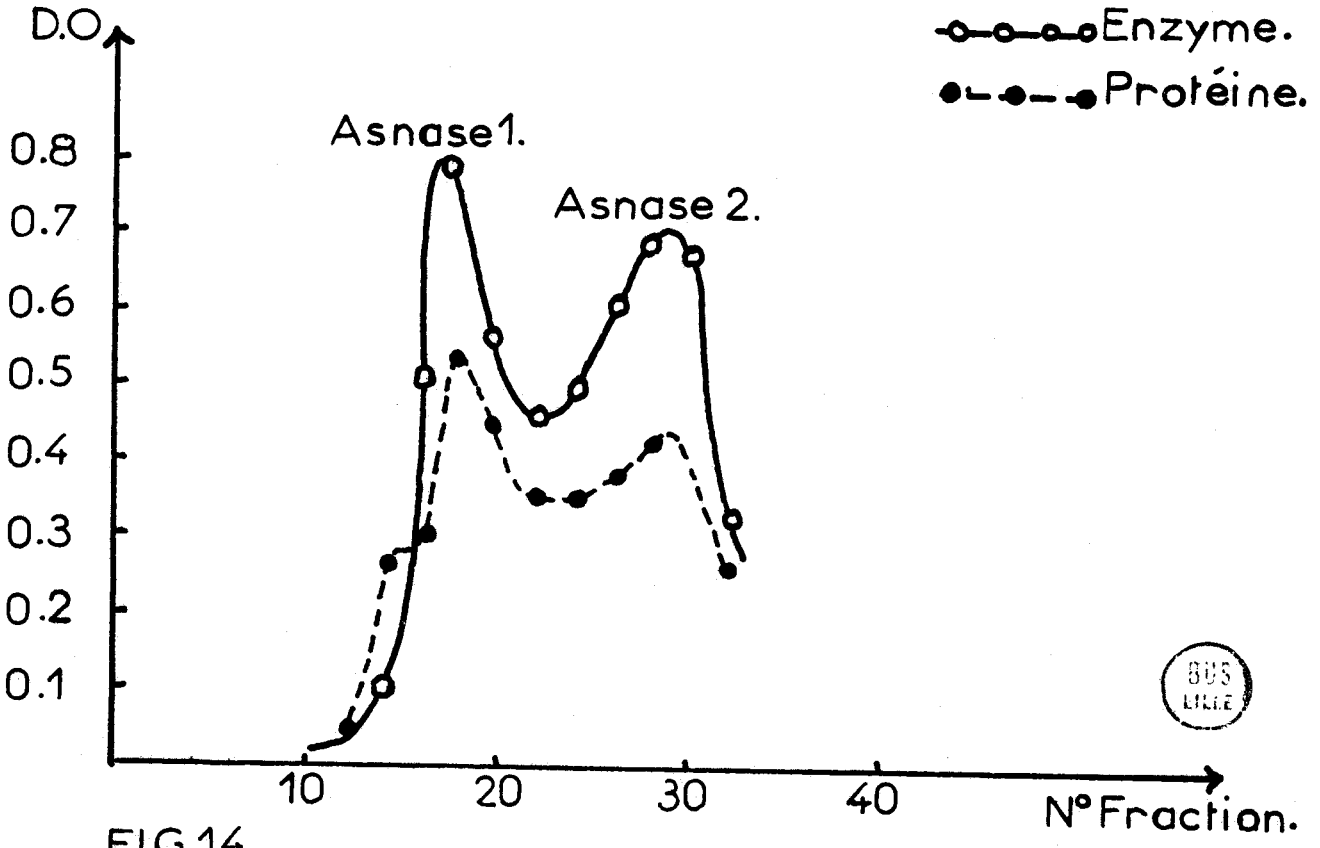


FIG 14 Chromatographie de gel filtration sur une colonne de "Sephadex G 200" des fractions correspondant au pic I de l'électrophorèse préparative

BUS LILLE

4) Mesure de la concentration en protéines de l'éluat.

La concentration en protéines de chaque fraction est déterminée par la réaction de LOWRY décrite précédemment.

5) Résultats.

Il nous a paru préférable de soumettre à l'électrophorèse préparative sur un bloc de cellogel, non pas un homogénat partiellement purifié contenant les deux activités enzymatiques mais chaque activité enzymatique séparée :

- soit par une gel filtration sur Sephadex G 200.
- soit par l'isolement de la phase cytoplasmique par ultracentrifugation à 105 000 g.

a. Résultats pour l'Asparaginase I.

- L'Asparaginase I a été séparée de l'Asparaginase II par ultracentrifugation à 105 000 g dans un milieu sérum physiologique 0,25 M en saccharose, permettant l'isolement du cytosol. Celui-ci est ensuite soumis à une purification partielle analogue à celle décrite dans le tableau VII.

La Figure 15 a représente la migration électrophorétique sur bloc de cellogel de ce cytosol partiellement purifié après révélation à l'Amidoschwarz.

La Figure 15 b nous montre le découpage réalisé sur l'autre moitié du bloc, et la Figure 15 c, la distribution de l'activité enzymatique de ces différentes bandes découpées et éluées par compression.

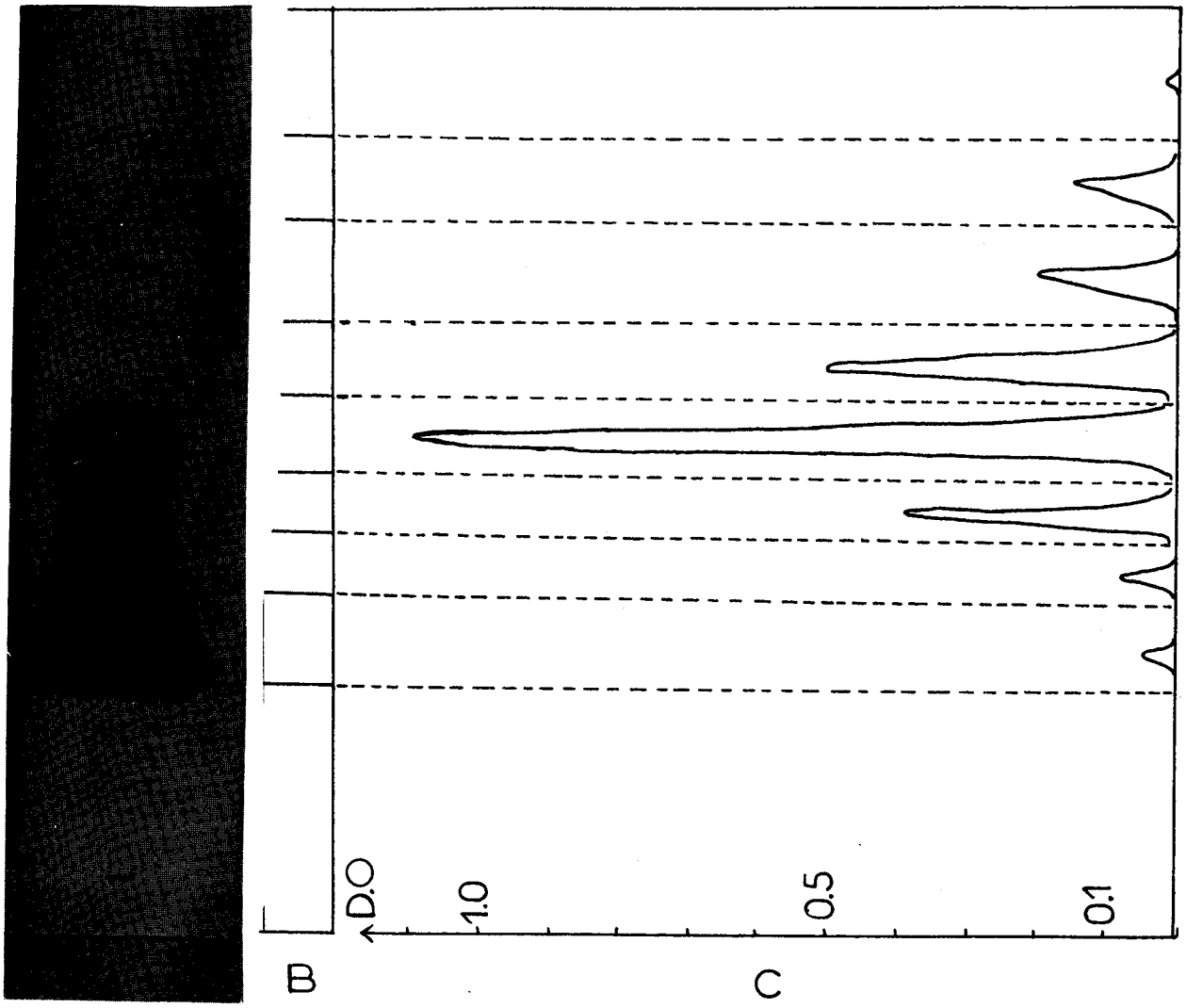


FIG:15

A: Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel de l'asparaginase 1.

B: Découpage réalisé sur le bloc.

C: Distribution de l'activité enzymatique.

BUS LILLE

Le diagramme d'activité enzymatique nous indique que le maximum d'activité se situe dans la zone 4 avec une dégradation progressive de part et d'autre de cette zone. Cette zone 4 correspond sur la Fig. 15 a à une bande fortement colorée qui devrait en principe correspondre à l'emplacement de la presque totalité de l'asparaginase I du foie de cobaye.

L'étalement de l'activité pourrait être due à la fixation d'une partie de celle-ci sur des protéines migrant moins vite ou plus vite que l'enzyme elle-même.

b. Résultats pour l'Asparaginase II.

L'Asparaginase II a été séparée de l'Asparaginase I par gel filtration sur Sephadex G 200 par la technique décrite précédemment. Les fractions collectées correspondant à l'activité enzymatique II ont été rassemblées, reconcentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000, et déposées sur bloc de cellogel.

Les conditions électrophorétiques sont les mêmes que celles utilisées pour l'asparaginase I, à savoir :

- Durée 6 heures : 25 mA/bloc sous une tension continue de 250 volts environ.

La Figure 16 a représente la migration électrophorétique sur bloc de cellogel de la solution d'asparaginase II après révélation à l'Amidoschwarz.

La Figure 16 b nous montre le découpage réalisé sur l'autre moitié du bloc, et la Figure 16 c la distribution enzymatique de ces différentes bandes découpées et éluées par compression.

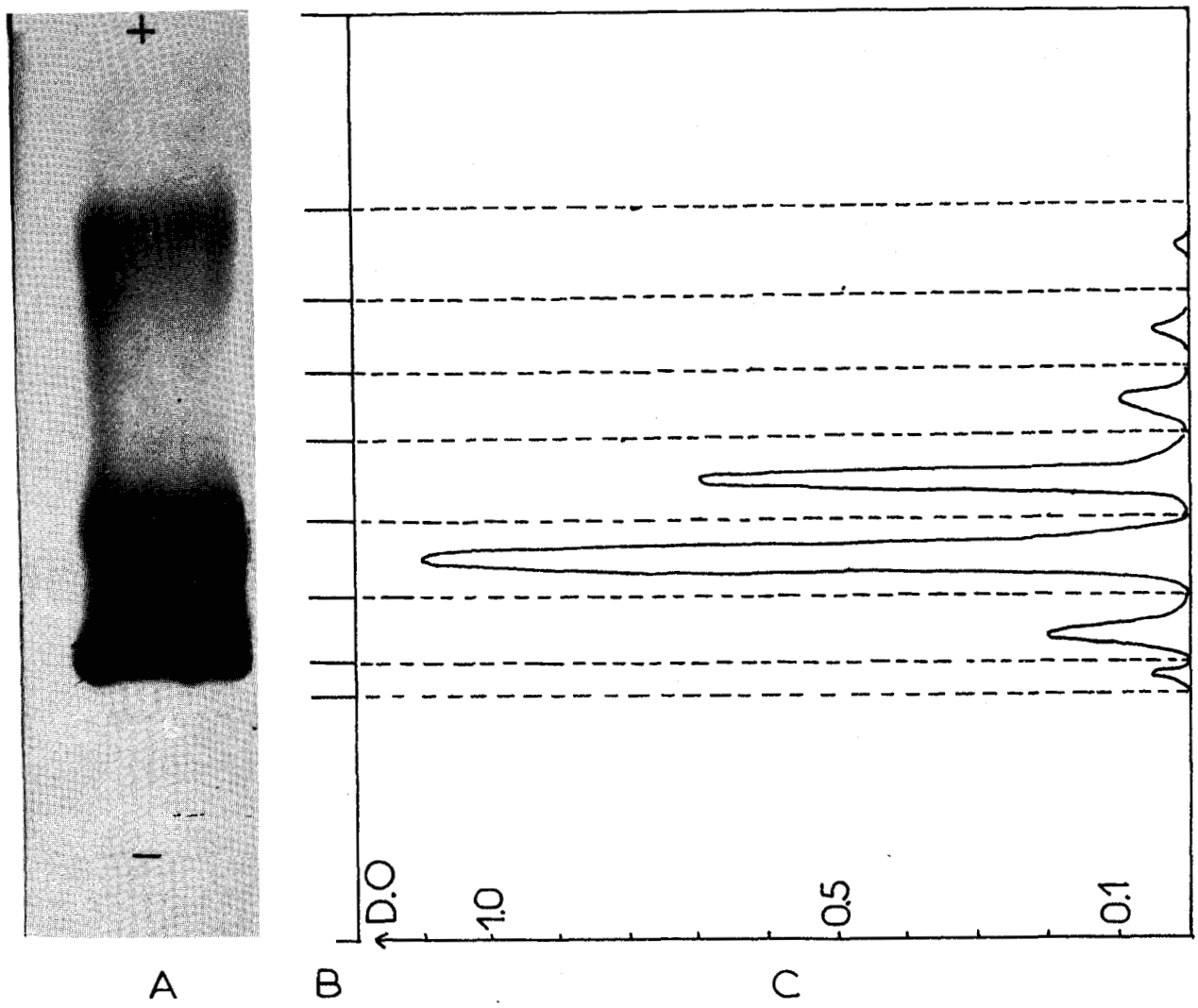


FIG:16

A: Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel de l'asparaginase 2.

B: Découpage réalisé sur le bloc.

C: Distribution de l'activité enzymatique.

BUS LIEGE

Le diagramme d'activité enzymatique nous indique que le maximum d'activité se situe dans la zone 3 avec une dégradation progressive de l'activité de part et d'autre de cette zone. En comparant les Figures 15 et 16 nous remarquons que l'Asparaginase II migre moins vite vers l'anode que l'Asparaginase I, ce qui rejoint les résultats trouvés pour l'électrophorèse en veine liquide (Fig. 12, 13 et 14). Cependant, l'électrophorèse préparative en bloc de cellogel sur un homogénat contenant les deux activités enzymatiques même partiellement purifié, semble très difficile à exploiter pour une bonne séparation de ces deux asparaginases en raison de l'interpénétration plus ou moins grande des activités due à l'effet de traînée que l'on constate après la migration et à la petite distance qui sépare les deux bandes d'asparaginase I et d'asparaginase II.

Par contre, nous l'avons utilisée sur chaque enzyme séparément comme une étape de purification intéressante et pratique, même si les rendements trouvés ne sont pas toujours excellents.

E/ ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR BANDES DE CELLOGEL.

1) Matériel et technique utilisés.*

2) Découpage et élution des bandes de cellogel.

La technique utilisée est analogue à celle employée pour les blocs de cellogel et permet de reconnaître sur des bandes bien individualisées, l'emplacement de l'enzyme en mesurant l'activité enzymatique de l'éluat obtenu.

*Le matériel et la technique utilisés sont décrits dans l'appendice technique.

3) Résultats.

Nous avons utilisé cette technique à des fins purement analytiques : elle nous a permis de vérifier non seulement la pureté des produits obtenus après chaque étape de purification mais aussi l'activité ou la non-activité de bandes bien individualisées sur l'électrophorégramme.

F/ ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

1) Matériel et technique utilisés.*

2) Electrophorèse préparative de l'homogénat partiellement purifié sur la grosse colonne PD2/320.

Toutes les manipulations se font en chambre froide à + 4° C.

Après avoir placé un parafilm au bas de la colonne un gel de séparation à 10 % de réticulation est d'abord coulé, sa composition est la suivante :

- 1,5 ml de A
- 3 ml de CN
- 1,5 ml d'eau bidistillée
- 6 ml de G.

Le volume total du gel est de 12 ml, sa hauteur dans la colonne est de 3,5 cm.

Après polymérisation et au-dessus du 1er gel, on coule le gel de l'échantillon qui, dans ce cas, sert également de gel de tassement. Sa composition est :

- 0,66 ml de B
- 1,97 ml de DN

*Le matériel et la technique utilisés sont décrits dans l'appendice technique.

- 1,31 mℓ de E
- 6,55 mℓ d'échantillon
- 5 gouttes de J.

La polymérisation complète de ce gel photosensible qui utilise la riboflavine comme initiateur, nécessite l'intervention d'une source lumineuse provenant d'un tube au néon.

Une fois celle-ci complètement terminée (on retourne délicatement la colonne pour s'en assurer), on enlève le parafilm du bas de colonne puis on remplit les compartiments anodiques et cathodiques avec un tampon constitué par :

- 1 part de tampon Tris
- 9 parts d'eau bidistillée

Son pH est de 8,5.

Le tampon d'élution :

- 1 part de A
- 7 parts d'eau.

de pH 8,5 acheminera les protéines après leur migration vers le collecteur de fractions.

L'intensité constante délivrée aux électrodes est de 10 mA.

La vitesse d'élution lente au début sera amenée à 3 mℓ/minute dès l'élution de l'indicateur coloré. On recueille 70 fractions dont le volume est de 3 mℓ environ. La durée totale de l'électrophorèse est de 15 heures environ.

3) Résultats.

L'activité enzymatique de chaque fraction ainsi que leur concentration en protéines sont représentées sur la Fig. 17. Deux pics d'activité enzymatique sont mis en évidence. La concentration en protéines des fractions actives est faible surtout en ce qui concerne le premier pic d'activité asparaginasique. Les fractions 40 à 62 rassemblées et reconcentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000, sont redéposées sur la moyenne colonne PD2/150.

4) Electrophorèse préparative des fractions 40 à 62 sur la moyenne colonne PD2/150.

Le gel de séparation à 7 % de réticulation est d'abord coulé, il est composé de :

- 0,6 mℓ de A
- 0,84 mℓ de CN
- 1 mℓ d'eau bidistillée
- 2,4 mℓ de G.

Son volume au total est de 4,8 mℓ pour une hauteur de 2 cm environ.

Après polymérisation de ce gel, nous coulons le gel de tassement comprenant :

- 0,3 mℓ de B
- 0,6 mℓ de DN
- 0,3 mℓ de E
- 1,2 mℓ d'eau bidistillée.

Son volume est de 2,4 mℓ pour une hauteur de 1 cm environ.

La polymérisation complète se fait à la lumière d'un tube au néon.

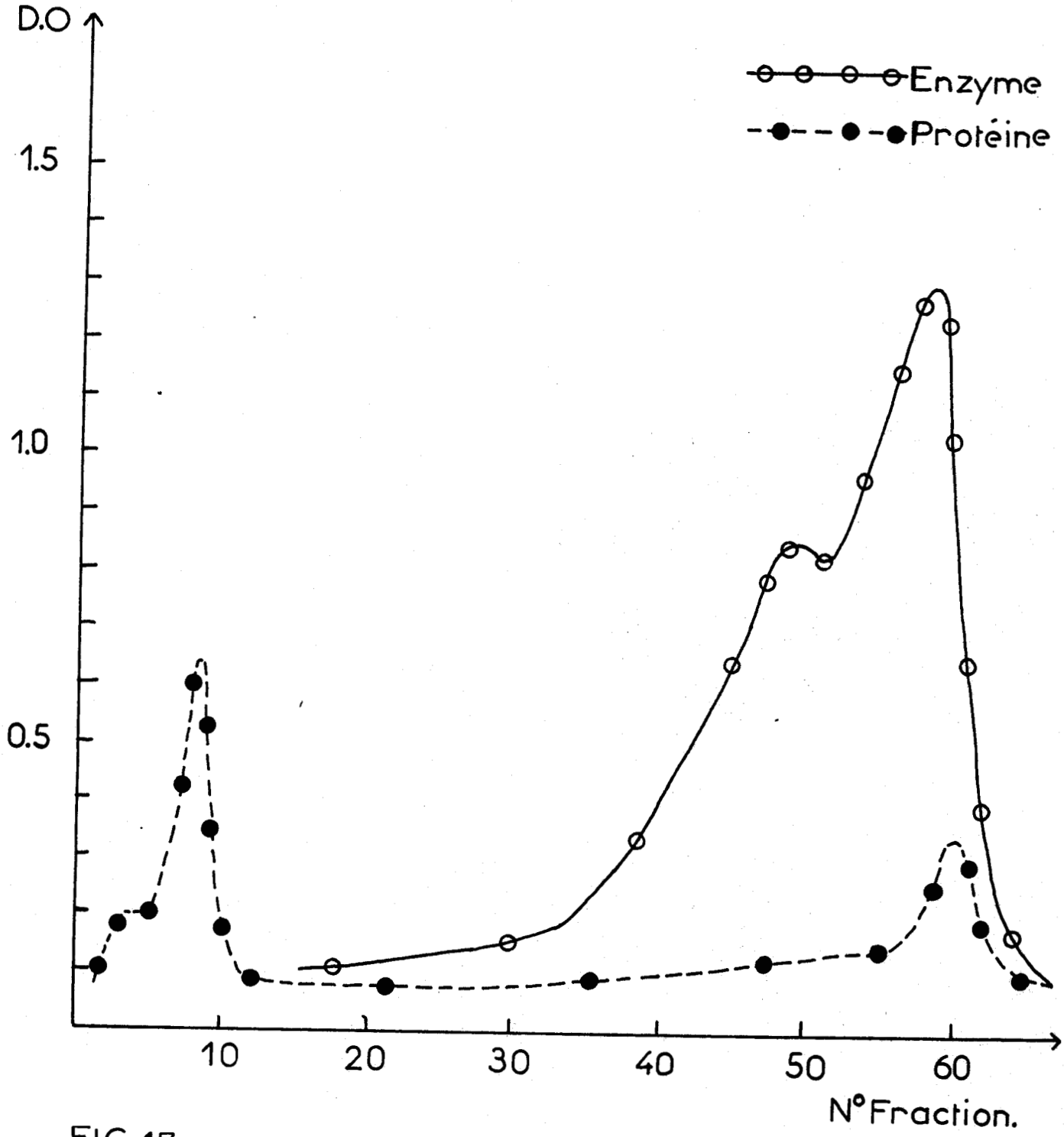


FIG:17 Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide de l'homogénat de foie de cobaye (colonne PD2/320).

BUS LILLE

Le troisième gel ou gel d'échantillon est ensuite introduit dans la colonne en mélangeant :

- 0,3 ml de B
- 0,6 ml de DN
- 0,3 ml de E
- 1,2 ml d'échantillon
- 3 gouttes de J.

Son volume est de 2,4 ml pour une hauteur de 1 cm environ.

La polymérisation se fait à la lumière d'un tube au néon.

Les tampons, l'intensité du courant sont identiques à ceux utilisés pour la colonne PD2/320, seule la vitesse d'élution est plus lente (1 à 2 ml à la minute).

5) Résultats.

La Figure 18 représente l'activité enzymatique et la concentration en protéinesde chacune des 100 fractions recueillies. Là encore deux pics d'activité peu séparés et faibles sont mis en évidence. La concentration en protéines très faible se trouve pratiquement à la limite de la sensibilité de la réaction de LOWRY (132). Nous n'avons pu pour cette raison, reconnaître l'emplacement de chacune des activités enzymatiques par gel filtration sur Sephadex G 200 par exemple. Par contre, les fractions 60 à 84 ont été rassemblées, reconcentrées, et déposées sur une bande de Cellogel. L'électrophorèse analytique sur ce support a montré l'existence de deux bandes bien séparées entre-elles et présentant une activité asparaginasique (Fig. 32 a).

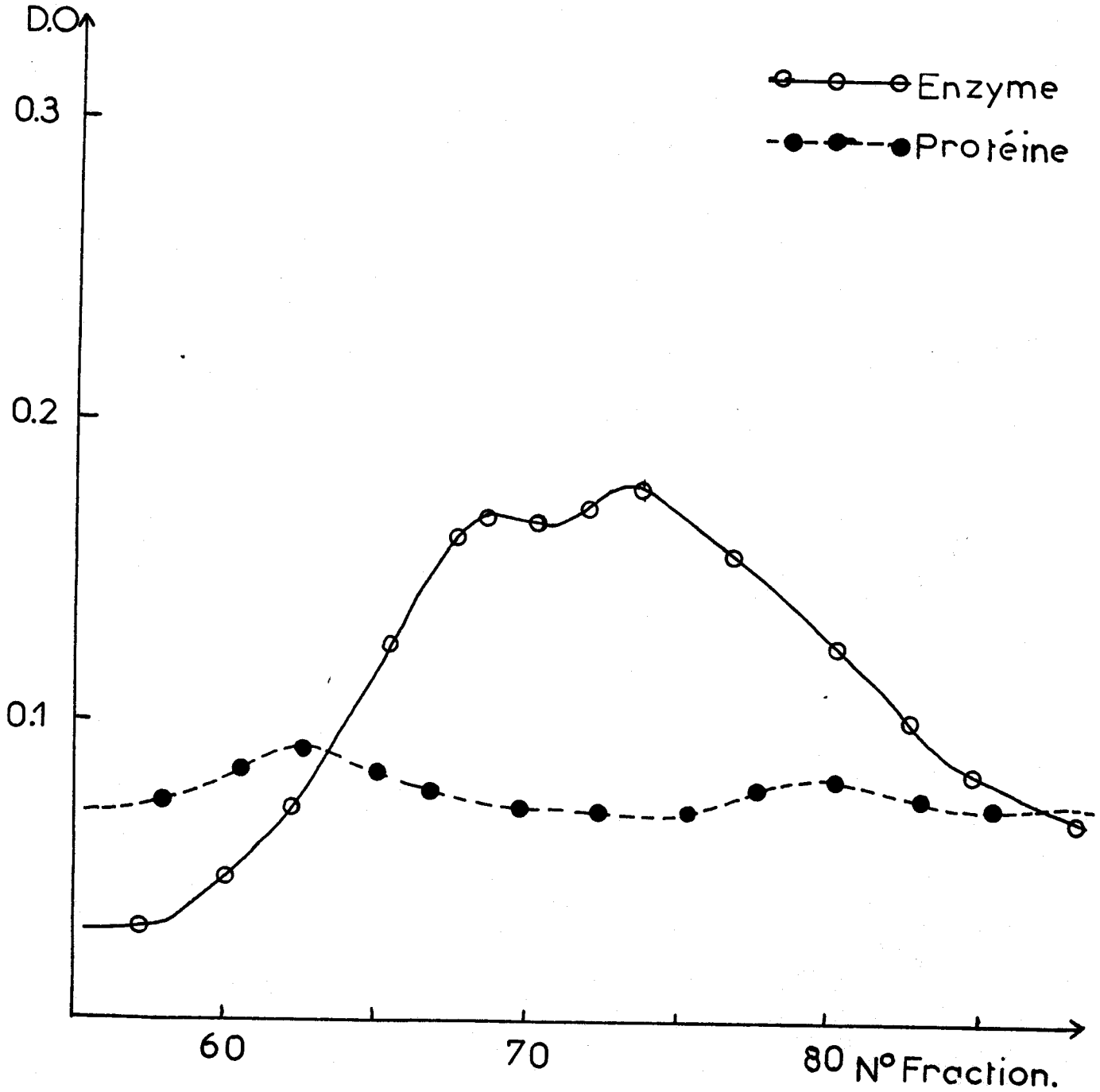


FIG:18 Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide des fractions 40 à 62 (Fig 17) sur colonne PD2/150.

BUS LILLE

G/ ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Le principe est identique à celui de l'électrophorèse préparative sauf qu'il n'y a généralement pas d'élution de protéines. Nous avons employé cette technique uniquement pour contrôler le degré de pureté des fractions après les différentes étapes de la purification des deux activités enzymatiques.

Les gels sont à 5 % d'acrylamide, l'intensité constante est de 15 mA par tube. Le tampon d'électrode est identique à celui utilisé dans l'électrophorèse préparative. La durée de l'électrophorèse est de 40 minutes environ.

Les gels colorés à l'Amidoschwarz sont décolorés par passage du courant électrique suivant la technique préconisée par le constructeur CANALCO.

Comme pour les blocs ou les bandes de Cellogel, nous avons dans certains cas découpé le gel de polyacrylamide en tronçons de façon à pouvoir localiser l'activité en les incubant avec une solution d'asparagine tamponnée à 37° C.

H/ ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE EN GRADIENT DE SUCROSE.

1) Matériel utilisé.

Nous avons utilisé une centrifugeuse BECKMAN $L_3$50 équipée d'un rotor SW 41 Ti à godets mobiles.

2) Préparation du gradient de sucrose.

Deux solutions de sucrose FLUKA "puriss", l'une à 5 p. 100, l'autre à 20 p. 100 sont préparées et disposées dans un appareil à gradient constitué par deux chambres rigoureusement identiques, reliées entre-elles par un canal fermé par un robinet.

La solution à 20 p. 100 est déposée dans la chambre extérieure ; le robinet est ouvert de façon à remplir le canal, puis on dépose dans la chambre intérieure la solution à 5 p. 100, le robinet ayant été préalablement fermé. Les volumes de deux solutions de sucrose V1 et V2 sont tels que si d1 et d2 sont les densités des solutions, la relation $v_1 d_1 = v_2 d_2$ soit vérifiée. Une agitation magnétique douce est maintenue dans la chambre de mélange contenant la solution à 20 p. 100. Le canal de sortie est raccordé au moyen d'un tube de polyéthylène PE 60 Technicon à une pompe péristaltique dont le débit est réglé à 12 ml/30 minutes. Le gradient est ensuite laissé quelques heures au repos. Toutes les opérations sont menées en chambre froide à + 4° C.

3) Contrôle de la linéarité du gradient.

Le gradient établi est fractionné de la manière suivante :
une aiguille creuse reliée à une pompe péristaltique par un tube PE 60, est enfoncée lentement et parallèlement aux parois du tube de cellulose jusqu'à ce qu'elle bute au fond du tube ; la pompe est alors mise en route et reliée à un collecteur de fractions. Le débit est de 0,35 ml/minute. Les fractions au nombre de 40 ont un volume de 0,35 ml.

Ces fractions sont ensuite placées sur le prisme, d'un réfractomètre d'Abbe, la lecture se fait directement sur une échelle saccharimétrique et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de saccharose.
En portant sur un système d'axes, en abscisse le numéro de la fraction et en ordonnée le pourcentage de saccharose de celle-ci, nous avons pu vérifier la linéarité du gradient de sucrose ainsi obtenu (Fig. 19).

Le pourcentage de saccharose diminuant linéairement du fond vers la surface du tube.

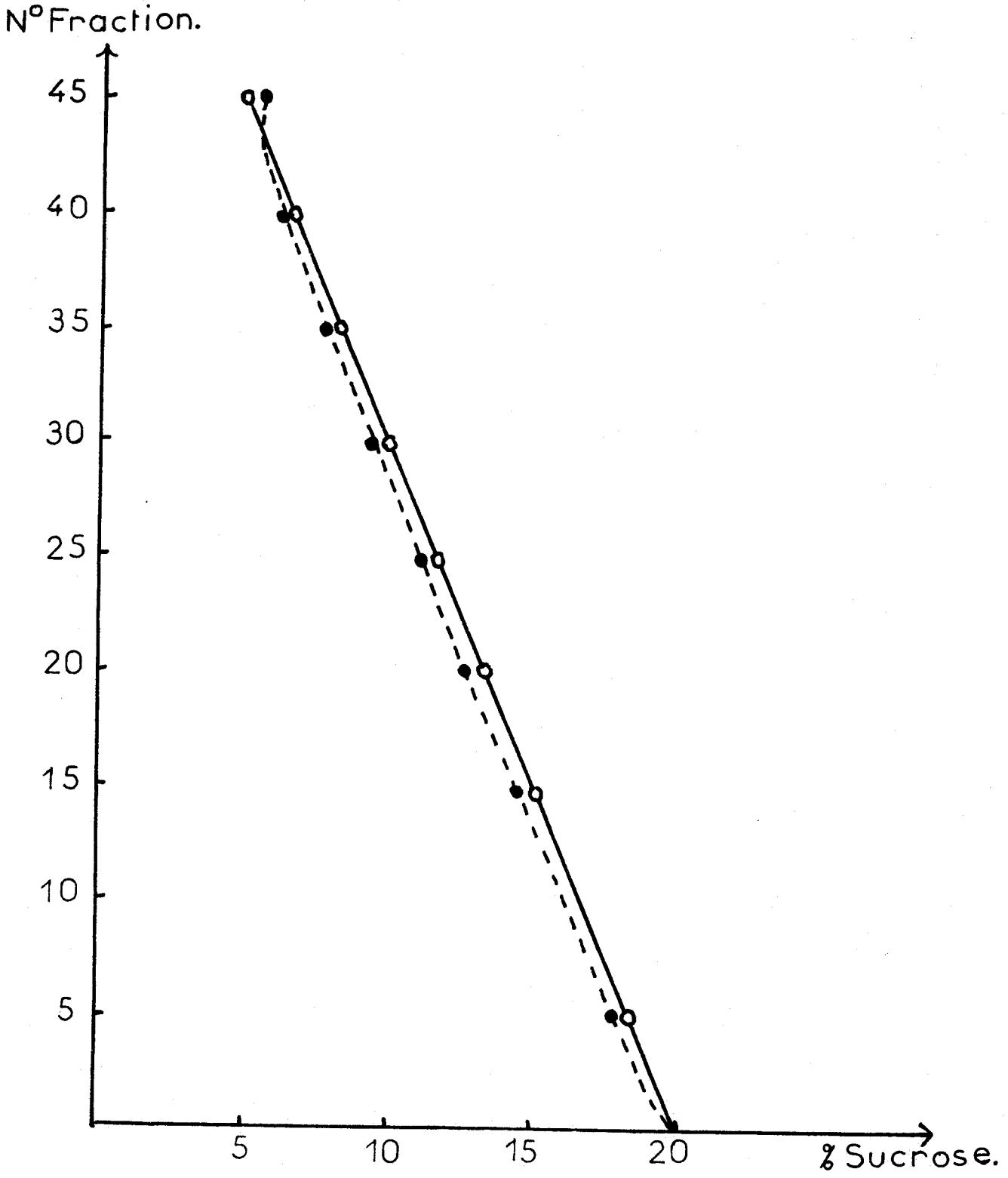


FIG 19 Vérification de la linéarité d'un gradient de sucrose 5-20 p. 100.

BUS LILLE

4) Ultracentrifugation.

Sur un gradient ainsi préparé on dépose 0,2 ml d'homogénat contenant les deux enzymes à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'un tube PE 60. Les tubes sont ensuite équilibrés à 0,1g près, et déposés dans des pots de centrifugation que l'on fixe sur le rotor préréfroidi à + 4° C.

La température de la chambre du rotor est fixée à + 4° C. La centrifugation est effectuée à 41 000 tours/minute (286 000 g). La durée varie de 3 heures à 7 heures suivant les expériences. Le contenu de chaque tube est ensuite fractionné, et un aliquot est prélevé sur chaque fraction de manière à doser l'activité enzymatique et les protéines.

5) Résultats.

Les courbes obtenues (Fig. 20, 21, 22) présentent un seul pic d'activité que l'on a pu identifier comme étant l'enzyme I.

Le meilleur résultat est obtenu pour une centrifugation de 7 heures. L'activité spécifique de la fraction 19 (Fig. 22) s'élève à 1 ce qui représente par rapport à l'homogénat un facteur de purification de 30.

6) Discussion des résultats obtenus.

L'absence du pic d'activité de l'enzyme II sur le diagramme sera discutée dans le chapitre concernant le fractionnement cellulaire des hépatocytes. Toutefois, nous nous sommes aperçus que l'enzyme II séparée préalablement par gel filtration puis soumise à une ultracentrifugation analogue, a perdu toute activité après fractionnement du gradient et dosage des fractions récupérées. En reprenant une série d'expériences analogues à des vitesses progressivement décroissantes, nous nous sommes aperçus que l'enzyme II conservait son activité pour une accélération égale ou inférieure à 25 000 g.

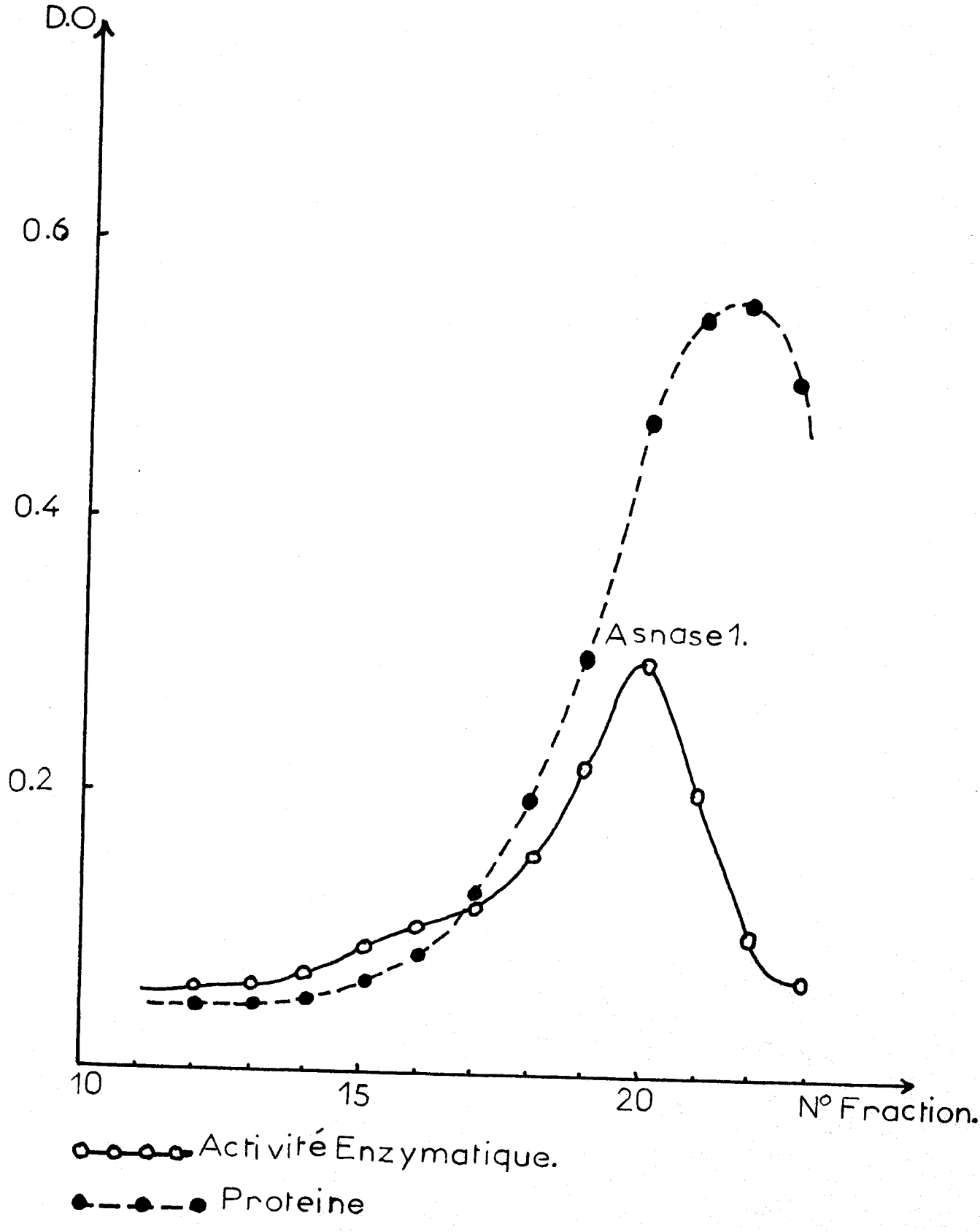
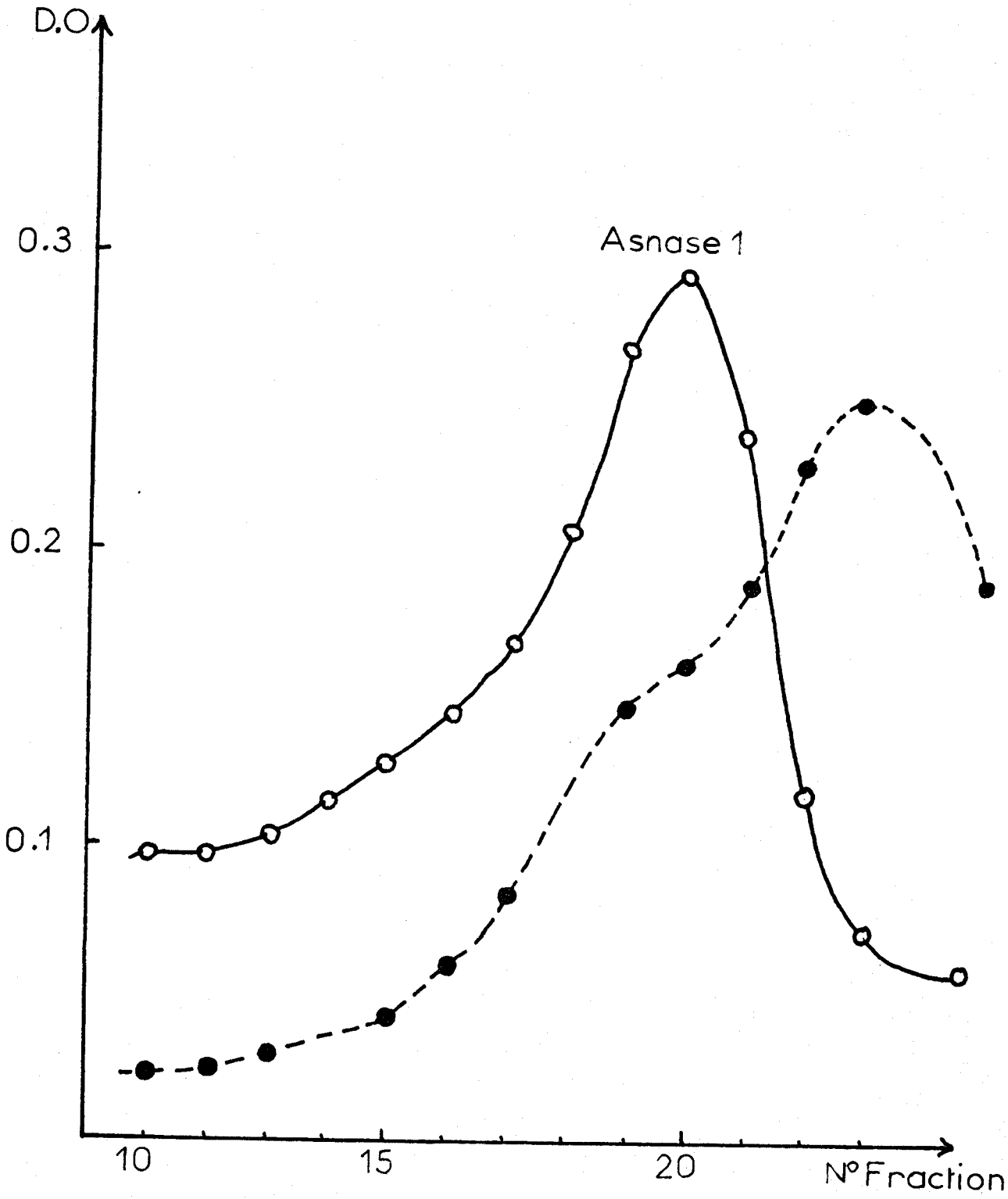


FIG 20 Ultracentrifugation préparative en gradient de sucrose 5-20 p.100 d'un homogénat de foie de cobaye. Température de centrifugation : + 4° C ; Vitesse : 41 000 tours/minute (286 000 g. pour le rotor SW 41 Ti) ; Durée : 3 Heures.

BUS LILLE



-o-o-o- Activité Enzymatique.

-●--● Protéine.

FIG 21 Ultracentrifugation préparative en gradient de sucrose 5-20 p.100 d'un homogénat de foie de cobaye. Température de centrifugation : + 4° C ; Vitesse : 41 000 tours/minute (286 000 g. pour le rotor SW 41 Ti) ; Durée : 5 Heures.

BUS LILLE

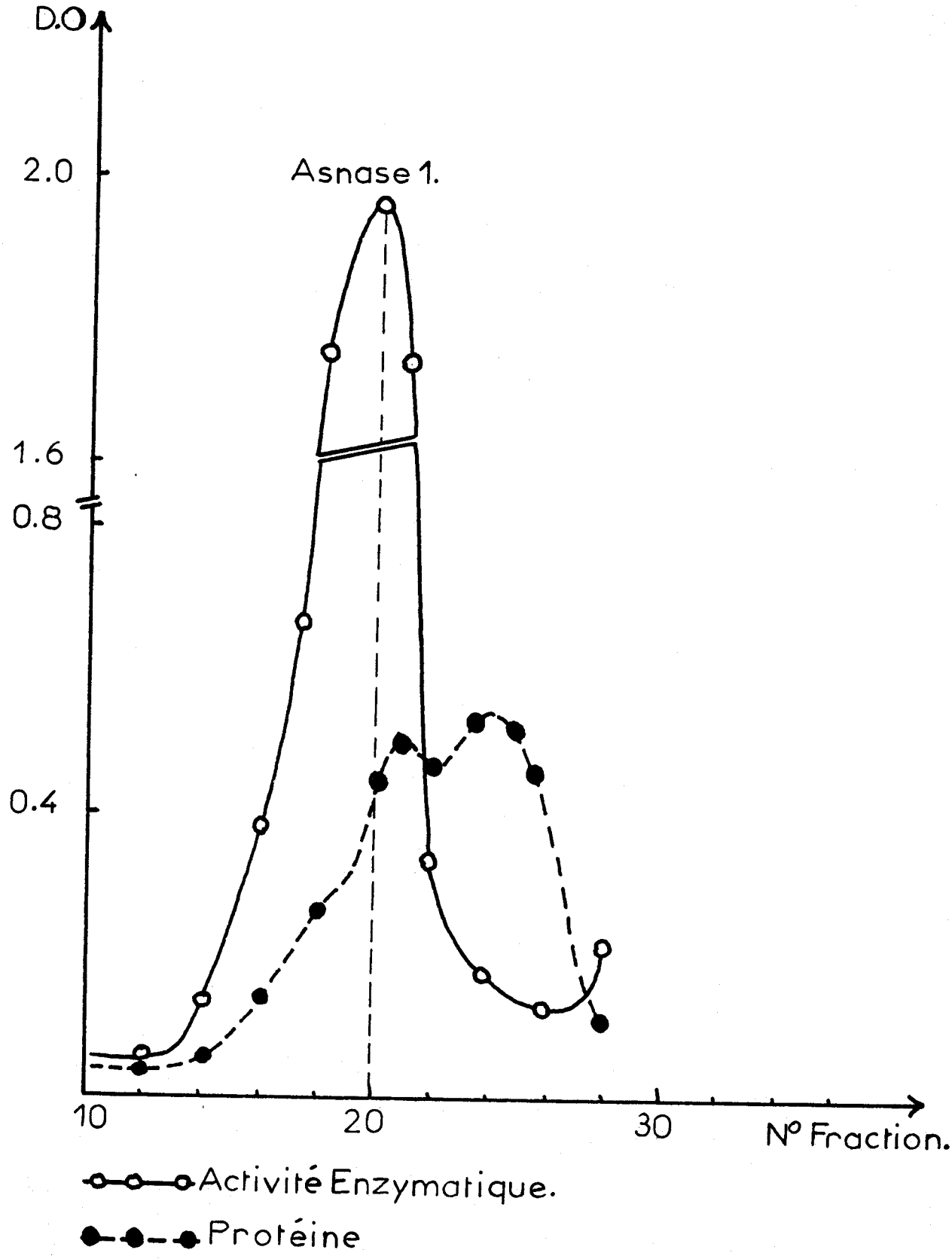


FIG 22 Ultracentrifugation préparative en gradient de sucrose 5-20 p.100 d'un homogénat de foie de cobaye. Température de centrifugation : + 4° C ; Vitesse : 41 000 tours/minute (286 000 g. pour le rotor SW 41 Ti) ; Durée : 7 Heures.

BUS LILLE

7) Applications. Vérifications du poids moléculaire de l'enzyme I.

Le poids moléculaire de l'enzyme I déterminé par gel filtration a été estimé à 150 000 ± 25 000. En soumettant à une centrifugation analogue et dans des conditions identiques, des témoins de poids connus :

- Immunoglobuline G
- Inhibiteur trypsique du soja (Fig. 23),

nous avons pu vérifier que les immunoglobulines G occupaient sur le diagramme une zone correspondant à celle qu'occupe l'enzyme I (Fig. 22,23) ce qui nous a permis de confirmer le poids moléculaire déterminé par gel filtration.

Conclusion.

La plupart des procédés physico-chimiques que nous venons de décrire nous ont permis de mettre en évidence deux activités enzymatiques possédant :

- des poids moléculaires différents
- des mobilités électrophorétiques différentes
- des comportements différents vis à vis notamment de l'accélération.
- les deux activités enzymatiques, que nous avons appelées Asparaginase I et Asparaginase II, sont donc vraisemblablement des activités distinctes, que nous allons maintenant essayer de localiser à l'intérieur de l'hépatocyte.

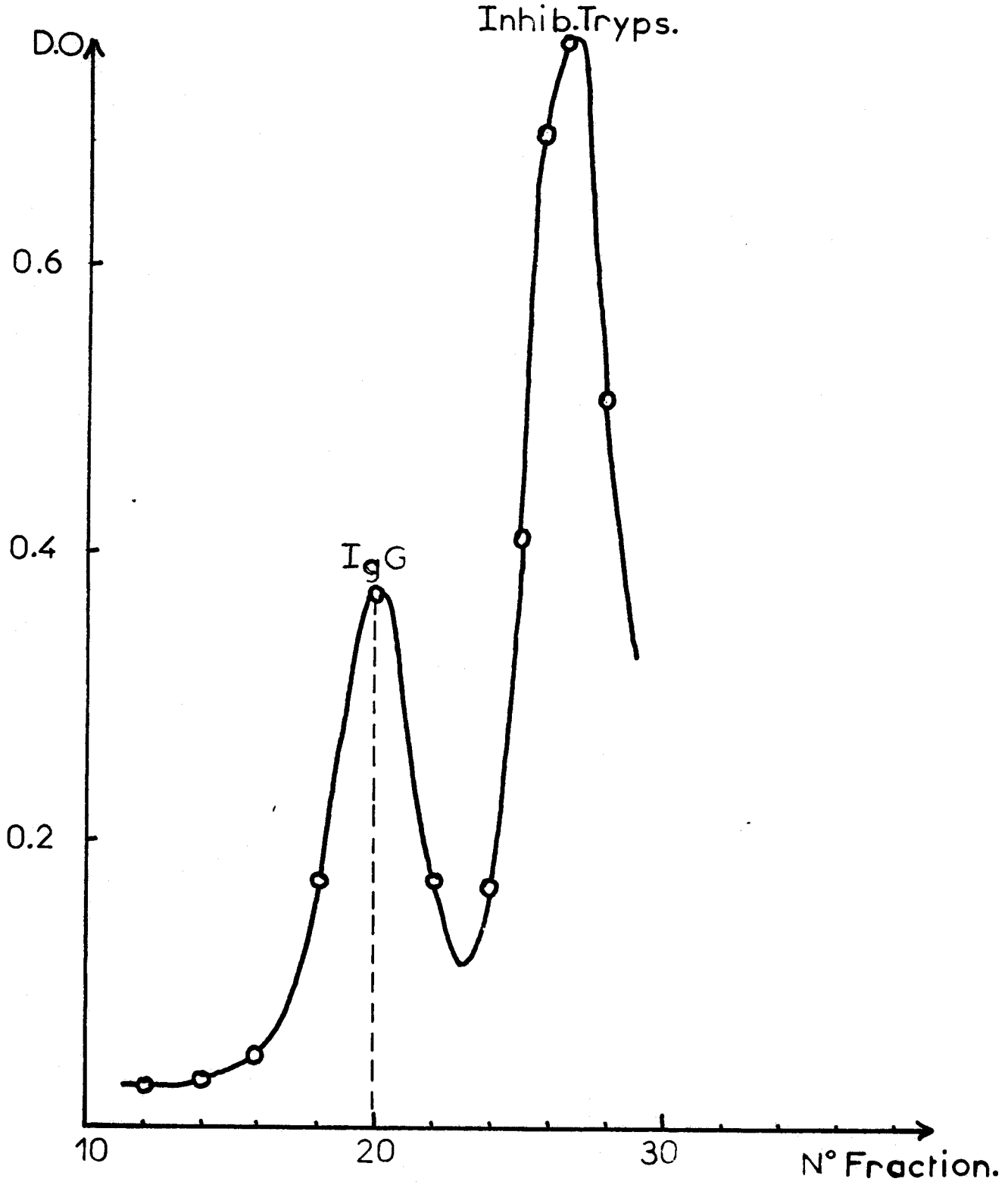


FIG 23 Ultracentrifugation préparative en gradient de sucrose 5-20 p.100 d'un mélange d'Immunoglobuline G et d'Inhibiteur Trypsique du soja. Température de centrifugation : + 4° C ; Vitesse : 41000 tours/minute (286 000 g. pour le rotor SW 41 Ti) ; Durée : 7 H.

BCS LILLE

C H A P I T R E I I I

ESSAIS DE LOCALISATION DE CES DEUX ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LA CELLULE HEPATIQUE

I - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DE L'HOMOGENAT DE FOIE DE COBAYE.

A/ PREPARATION DE L'HOMOGENAT.

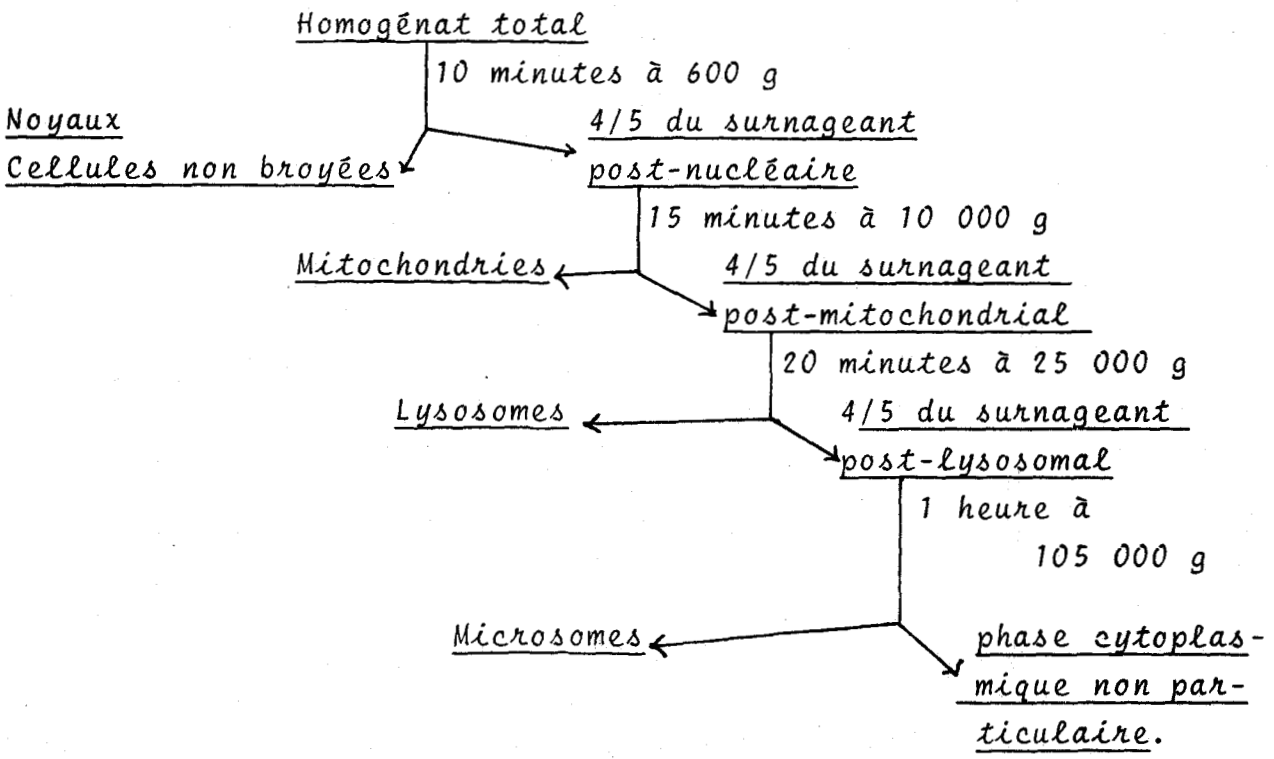
Le foie pesant 17,5 g. est prélevé sur le cobaye selon la technique décrite précédemment. Il est finement haché au scalpel, puis introduit dans un broyeur de POTTER-ELVEJEM contenant une solution physiologique 0,25 M en saccharose.

Le broyage est effectué à + 4° C.

B/ FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DE L'HOMOGENAT.

Nous avons utilisé une ultracentrifugeuse BECKMAN $L_3$50 munie d'un rotor SW 41 Ti à godets mobiles, thermostatée à + 4° C. Toutes les opérations de remplissage, de pesée et de transvasement des tubes en nitrate de cellulose sont effectuées en chambre froide à + 4° C.

L'homogénat est fractionné selon la méthode de APPELMANS (133).



Après avoir soutiré à la pipette les 4/5 supérieurs du surnageant les fractions sédimentées sont relavées 3 fois dans la solution de broyage, et recentrifugées autant de fois à l'accélération choisie.

Un aliquot de chaque fraction est prélevé et examiné en microscopie électronique (Fig. 24) afin de s'assurer de l'intégrité des structures et du degré de pureté de chaque fraction obtenue. Le reste est repris dans 3 ml de sérum physiologique et broyé à l'homogénéiseur VIRTIS, de façon à détruire les structures. Sur chaque homogénat on dose ensuite l'activité enzymatique en l'incubant à 37° C pendant 30 minutes avec 1 ml d'asparagine tamponnée.

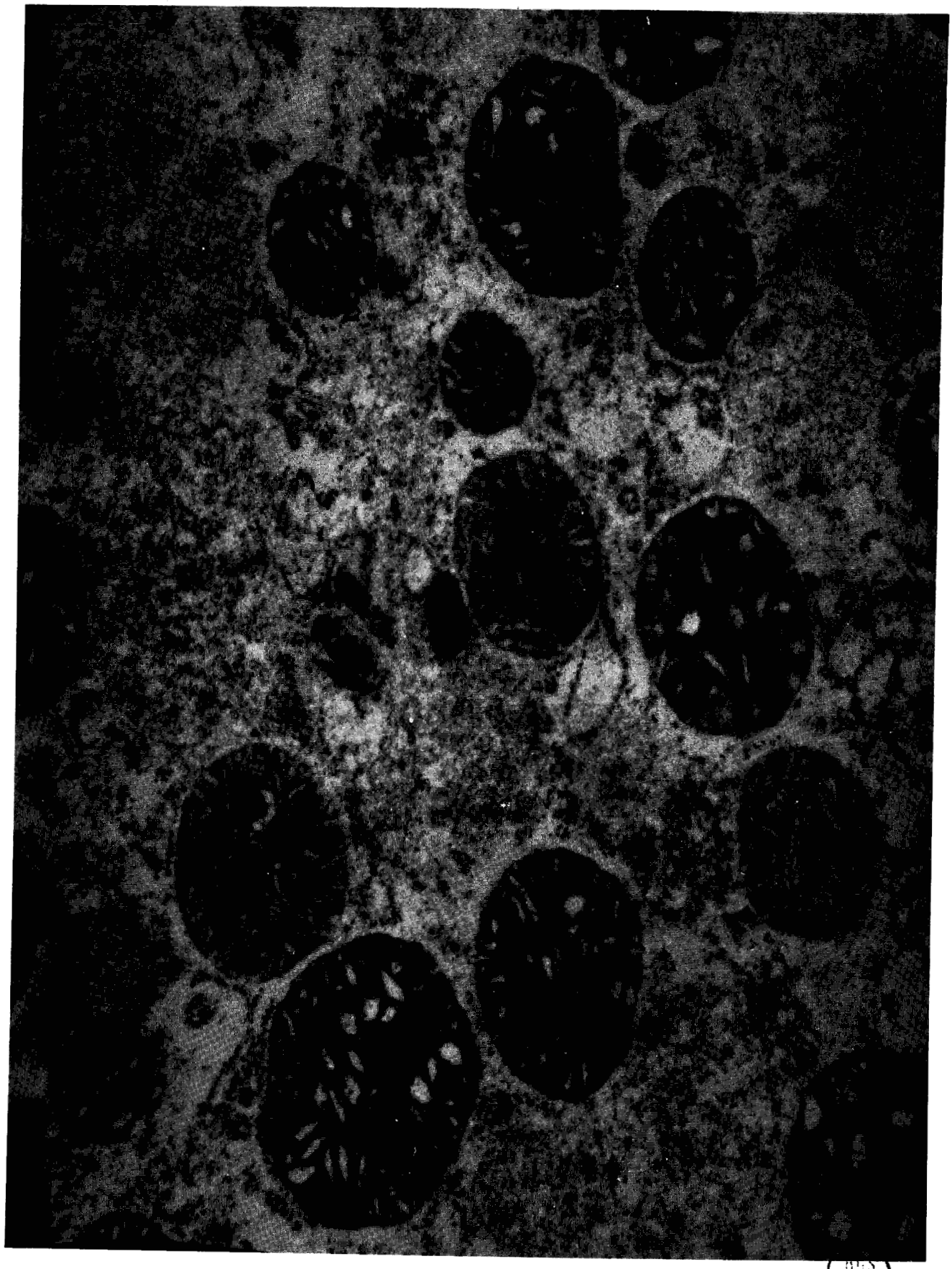
1) Résultats.

La Figure 25 représente l'activité asparaginasique des différentes structures cellulaires et du cytosol.

Mise à part celle normale des cellules non broyées, nous pouvons constater une activité mitochondriale et cytoplasmique.

C/ ETUDE DES STRUCTURES PARTICULAIRES ET DU CYTOSOL.

Afin de préciser si de l'Asparaginase I ou II est présente dans l'une ou l'autre des deux phases, nous avons entrepris un autre fractionnement cellulaire, permettant de séparer en un seul culot toutes les phases particulaires de la phase aparticulaire (Cytosol). Sur les deux fractions et après avoir remis en suspension et homogénéisé le culot, nous avons entrepris une purification primaire, puis une gel filtration sur Sephadex G 200. Le schéma des opérations successives faites lors de cette étude est le suivant :



BCS LILLE

FIG: 24

Microscopie électronique de la phase mitochondriale.

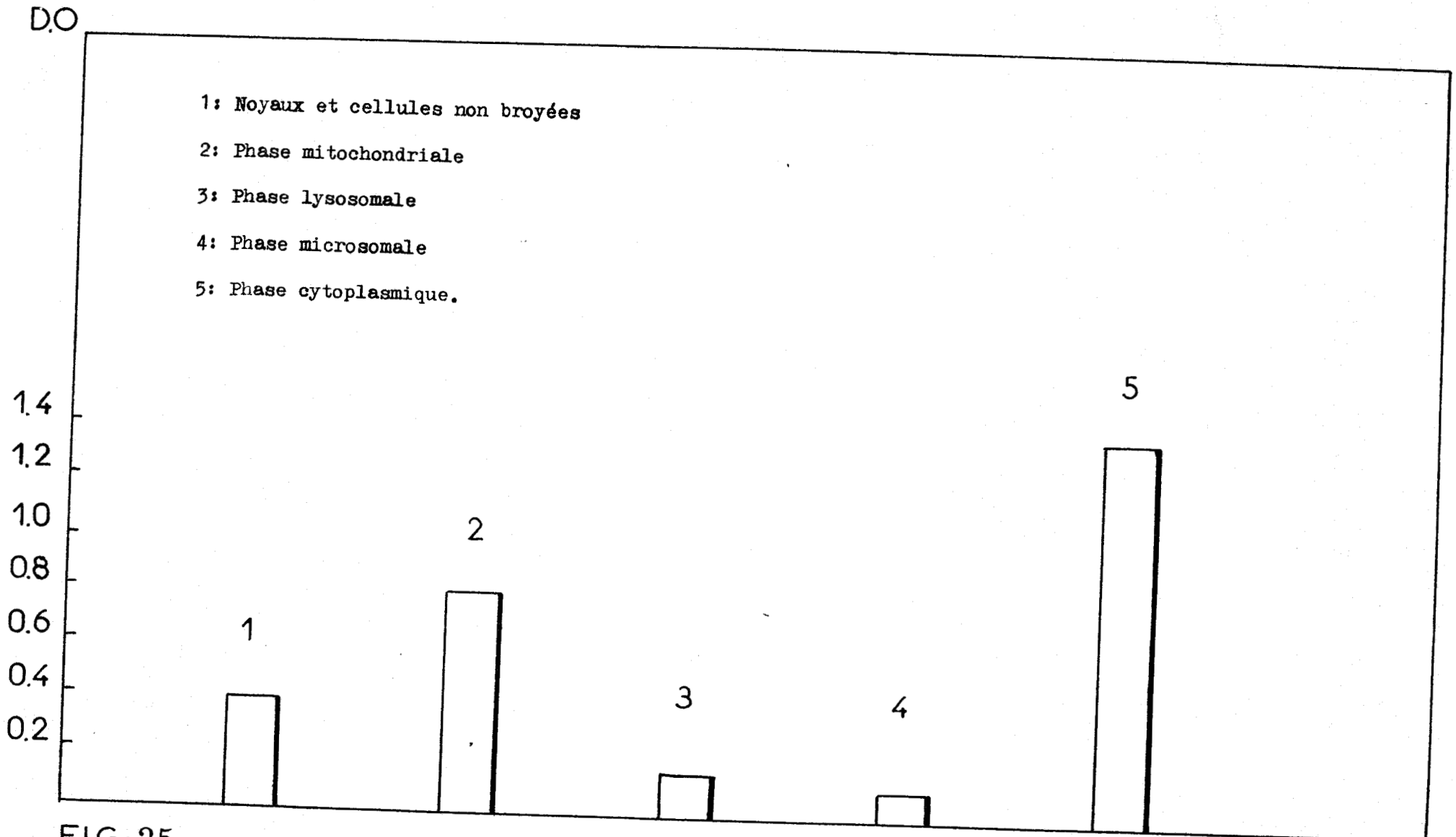


FIG: 25

Distribution de l'activité asparaginasique dans les différents organites de la cellule hépatique du cobaye séparés par fractionnement cellulaire selon la méthode d'APPELMANS.

BUS LILLE

17 g. de foie frais dans 70 ml d'une solution de sérum physiologique 0,25 M en saccharose

Broyage au Potter-Elvejem

Homogénat

Centrifugation 600 g pendant 10 minutes

Cellules non broyées
noyaux
(culot rejeté)

Surnageant post-mitochondrial

Centrifugation 105 000 g pendant 1 heure

Phases particulaires
(mitochondries, lysosomes, microsomes)

Suspension reprise avec un volume identique au cytosol de sérum physiologique et broyée à l'ultra-turrax

Homogénat

amené à pH 5,6 par HCl 0,1 N

Centrifugation 14 000 t pendant 10 minutes

(culot) (Rejeté)

Surnageant

précipitation par Na_2SO_4 30 %

Centrifugation 20 000t pendant 10 minutes

Culot

(surnageant) (rejeté)

repris dans 5 cm3 de tampon phosphate pH 7,35

Gel filtration sur Sephadex G 200 sur les fractions collectées

- dosage de l'activité
- dosage des protéines

Fig. 26

Cytosol

amené à pH 5,6 par HCl 0,1 N

Centrifugation 14 000 tours 10 mn avec une J 21 (Beckman)

(culot) (rejeté)

Surnageant

Précipitation par Na_2SO_4 30 %

Centrifugation 20 000 t pendant 10 minutes avec une J 21 (BECKMAN).

Culot

(surnageant rejeté)

repris dans 5 cm3 de tampon phosphate pH 7,35

gel filtration sur Sephadex G200

sur les fractions collectées

- dosage de l'activité
- dosage des protéines

Fig. 27

1) Résultats.

La Figure 27 représente l'activité asparaginasique du cytosol après gel filtration sur Sephadex G 200 ; un seul pic correspondant à l'Asparaginase I est décelé.

Comme l'activité asparaginasique I est nulle ou infime dans l'ensemble des phases particulaires (Fig. 26), on peut donc conclure que dans la cellule hépatique de cobaye, l'enzyme I semble localisée au cytosol.

La Figure 26 représente l'activité relative des asparaginases I et II de l'ensemble des structures particulaires de l'hépatocyte après gel filtration sur Sephadex G 200. Si l'asparaginase II est majoritaire, l'activité minime retrouvée ne correspond pas et de loin à la totalité de son activité présente dans l'homogénat de foie de cobaye, en prenant comme référence l'activité asparaginasique I trouvée dans le cytosol (Fig. 27) et le rapport activité de Enzyme I/activité de Enzyme II constaté dans les différentes gel filtrations sur Sephadex G 200 effectuées au cours du travail. (Fig. 10).

D/ CHROMATOGRAPHIE PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 DE L'HOMOGENAT TOTAL, DU SURNAGEANT POST-MITOCHONDRIAL, POST-LYSOSOMAL, ET DU CYTOSOL.

Nous savons que l'homogénat complet avant le fractionnement cellulaire présente deux activités asparaginasiques. Il est donc intéressant de rechercher à quelle étape du fractionnement cellulaire l'activité de l'Enzyme II disparaît. Nous avons donc chromatographié par gel filtration et dans des conditions aussi identiques que possible :

- l'homogénat total
- surnageant post-mitochondrial (homogénat amputé des mitochondries)
- surnageant post-lysosomal (homogénat amputé des mitochondries et des lysosomes)
- la phase cytoplasmique (homogénat amputé des mitochondries lysosomes et microsomes).

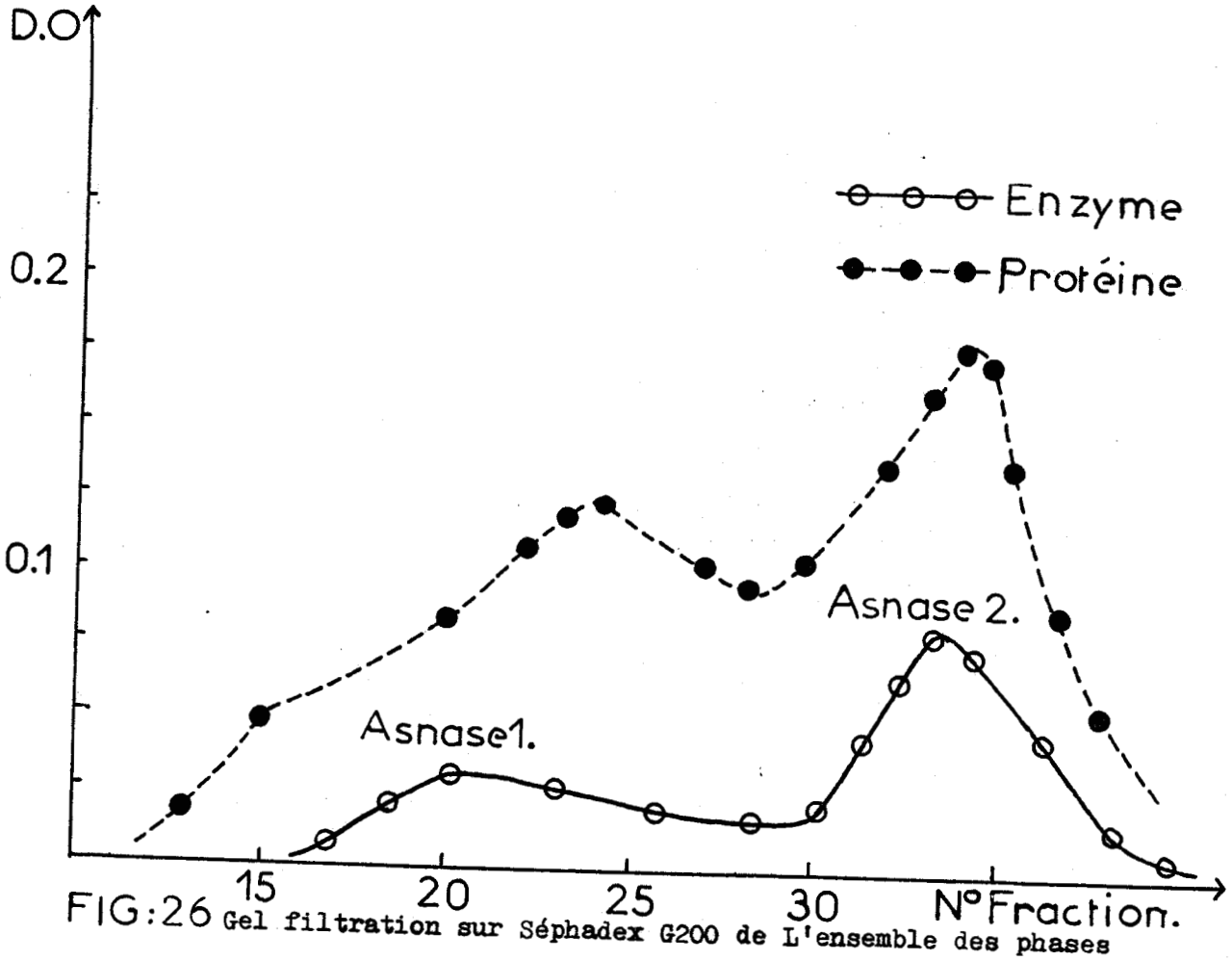


FIG:26 Gel filtration sur Séphadex G200 de L'ensemble des phases mitochondriales,lysosomales et microsomales.

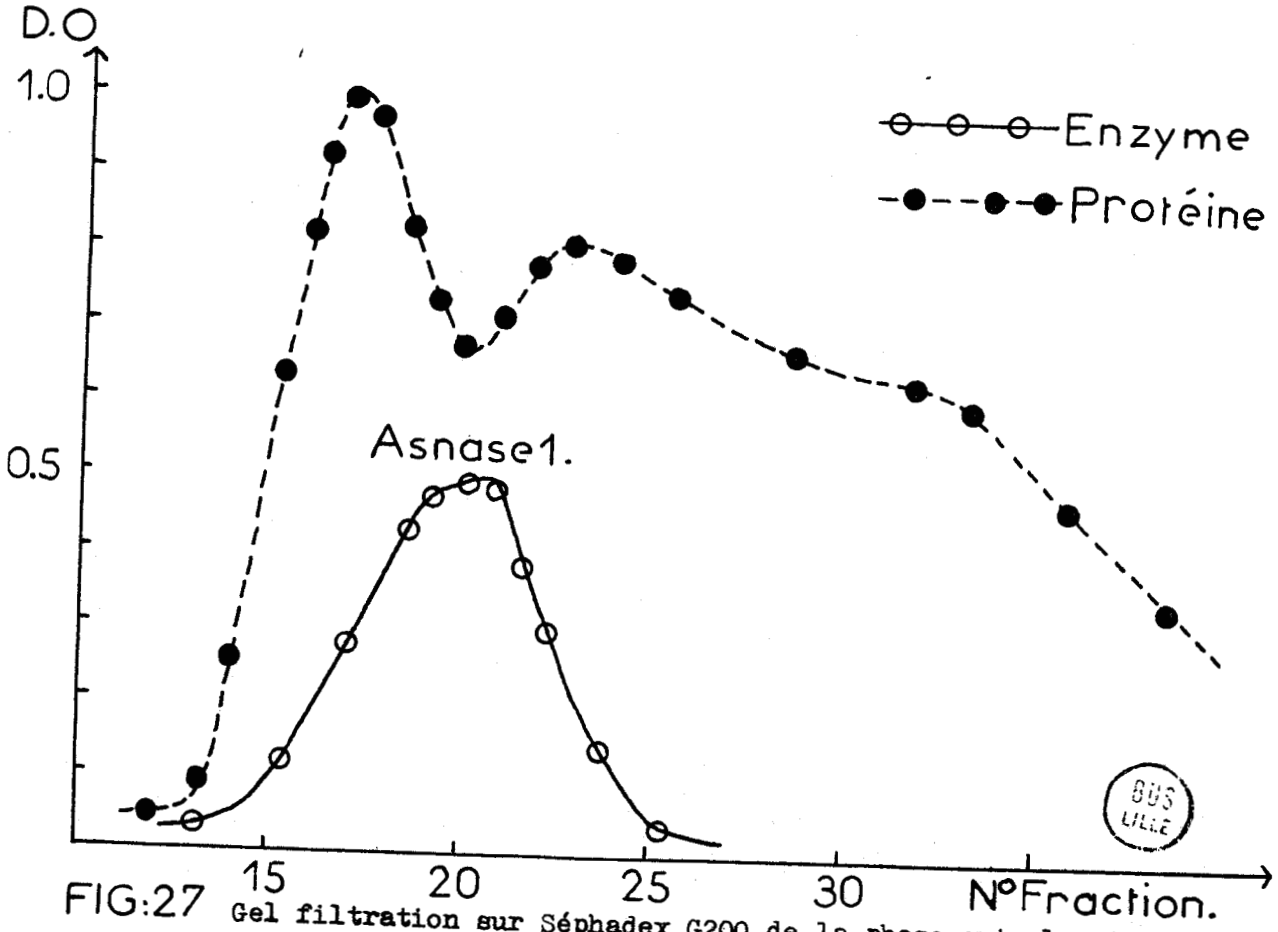


FIG:27 Gel filtration sur Séphadex G200 de la phase cytoplasmique.

BUS LILLE

1) Résultats.

L'activité enzymatique des fractions éluées dans chacun des cas est représentée sur la Fig. 28, la concentration en protéine sur la Fig. 29.

En ce qui concerne les activités asparaginasiques la I est présente dans chaque surnageant lorsque l'on passe de l'homogénat complet à la phase cytoplasmique seule. Ce qui confirme notre hypothèse précédente à savoir que l'Asparaginase I est bien d'origine cytoplasmique.

L'activité de l'Asparaginase II disparaît lors de la séparation microsomes-cytoplasme.
- Elle est encore présente dans le surnageant post-mitochondrial ce qui exclut l'hypothèse que la totalité de l'enzyme II soit d'origine mitochondriale comme nous l'avions déjà signalé à propos de la Fig. 26. Elle N'est pas non plus lysosomale. Donc par déduction, elle ne pourrait être que microsomale.

Deux faits expérimentaux nous ont pourtant permis de rejeter cette dernière hypothèse :
- Le premier est que l'activité asparaginasique des microsomes est très faible (Fig. 25) et ne peut en aucun cas correspondre à l'activité de l'Enzyme II.
- Le deuxième est que nous n'avons pu recréer son activité en réassociant la phase microsomale et la phase cytoplasmique ainsi séparées.

Nous avons donc pensé que l'activité enzymatique II pourrait être détruite irréversiblement lorsqu'on la soumet à une accélération de 105 000 g.

Pour tenter de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons soumis une solution asparaginasique II séparée de l'homogénat par gel filtration sur Sephadex G 200 à une ultracentrifugation pendant une heure à 105 000 g et nous nous

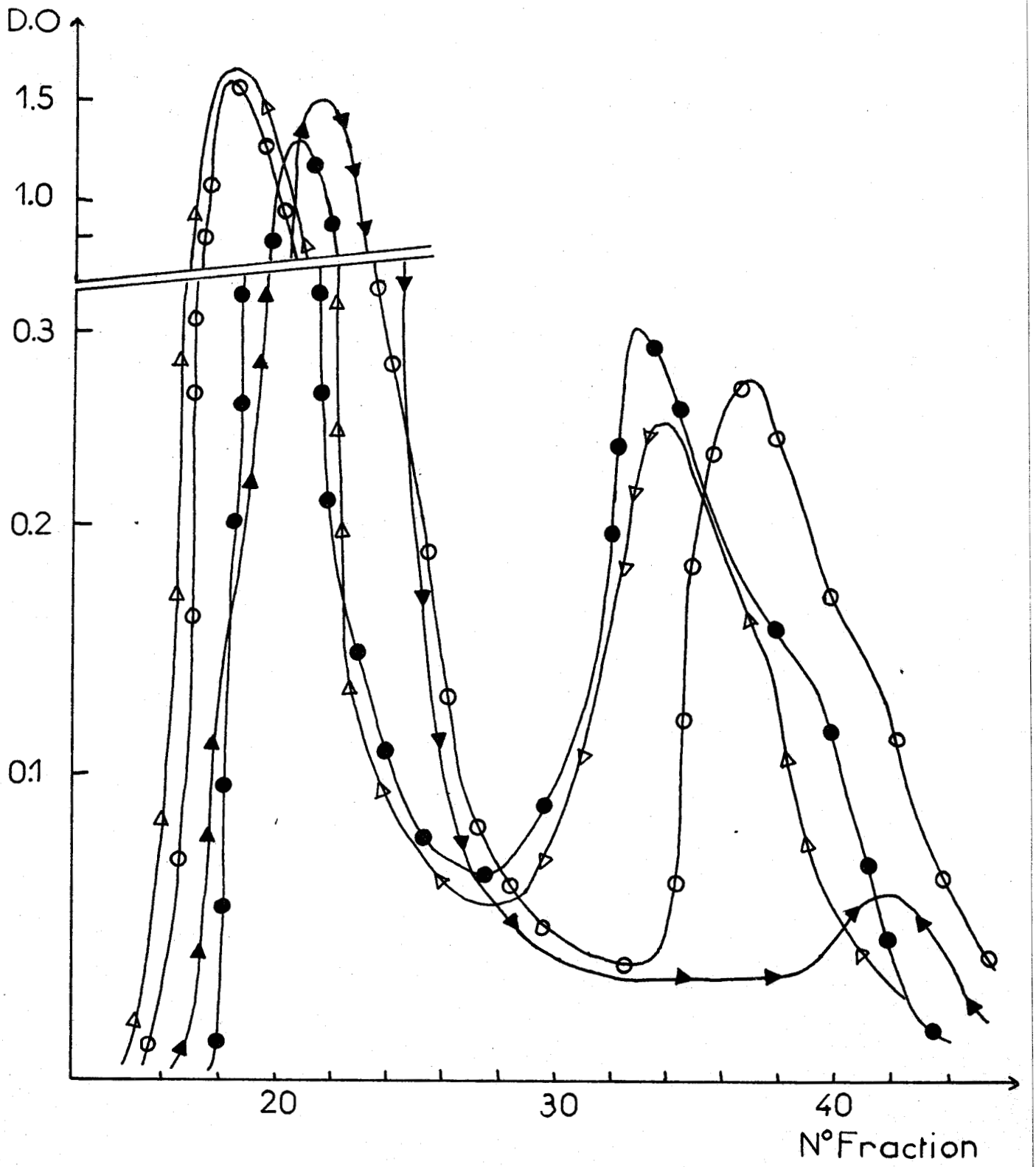


FIG:28 Activité enzymatique des fractions collectées lors de la chromatographie de gel filtration sur Séphadex G200 de:

l'homogénat du foie de cobaye (○ ○ ○)

du surnageant post-mitochondrial (● ● ●)

du surnageant post-lysosomal (△ △ △)

de la phase cytoplasmique (▲ ▲ ▲).

BUS LILLE

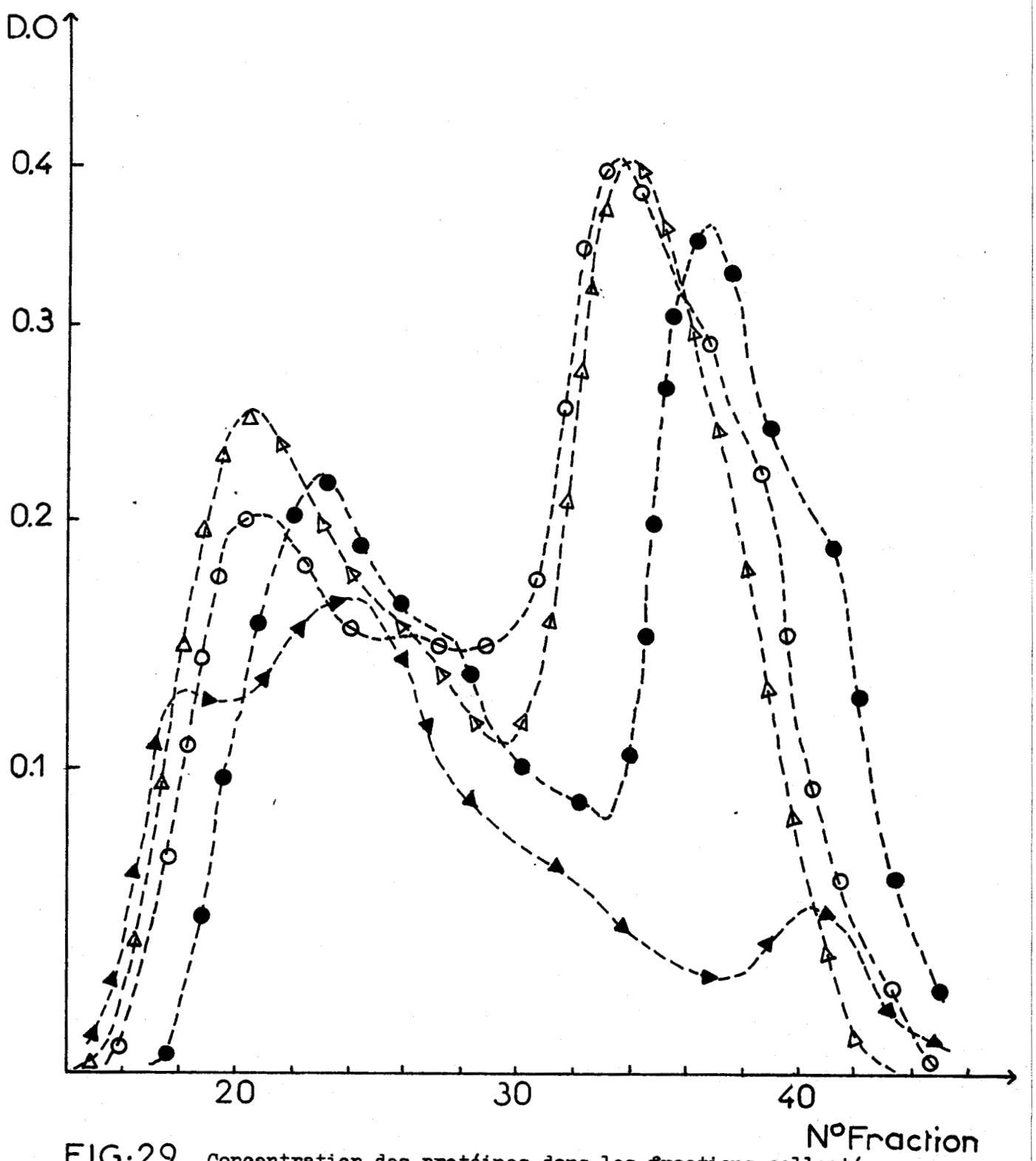


FIG:29 Concentration des protéines dans les fractions collectées lors de la chromatographie de gel filtration sur Séphadex G200 de :

l'homogénat du foie de cobaye (-○-○--○-)

du surnageant post-mitochondrial (-●--●--●-)

du surnageant post-lysosomal (-△-△--△-)

de la phase cytoplasmique (-▲-▲--▲-).

BUS LILLE

sommes aperçus en dosant l'activité avant et après les effets de l'accélération, que l'enzyme II avait perdu approximativement 96 % de son activité.

Ce fait confirme l'absence du pic II constaté après les ultracentrifugations en gradient de sucrose à 286 000 g de l'homogénat de foie de cobaye (Fig. 20,21, 22). Mais nous n'avons pu élucider le mécanisme d'action de l'accélération sur l'Enzyme II.

Conclusion.

Si la localisation cytoplasmique de l'Asparaginase I semble être acquise, celle de l'Asparaginase II pose de nombreux problèmes : mis à part les mitochondries qui contiennent une petite activité asparaginasique II, il semble que la majeure partie de celle-ci doit provenir du cytosol ; mais le fait qu'elle soit détruite après une accélération à 105 000 g., et que l'on n'a jamais jusqu'à maintenant pu la retrouver dans la phase cytoplasmique, laisse persister un doute sur sa localisation. Cependant, SULD et HERBUT, (134) en étudiant l'activité asparaginasique du foie de cobaye sur une préparation de l'homogénat comportant une centrifugation à 105 000 g. n'ont mis en évidence qu'une seule asparaginase que l'on peut identifier vraisemblablement à notre asparaginase I.

C H A P I T R E I V

ESSAIS DE PURIFICATION DES DEUX ACTIVITES ASPARAGINASIQUES DU FOIE DE COBAYE

I - ESSAIS DE PURIFICATION DES ASPARAGINASES I ET II DU FOIE DE COBAYE.

En partant d'un homogénat partiellement purifié par les étapes décrites dans le tableau VII. Nous avons essayé en combinant les diverses techniques mentionnées dans le premier chapitre de préparer une solution très enrichie d'Asparaginase I et d'Asparaginase II. Toutes les manipulations sont effectuées à une température de + 4° C.

De nombreux problèmes se sont posés, du fait de l'instabilité des préparations au fur et à mesure de leur enrichissement et de la petite quantité de matériel que nous pouvions traiter en une seule fois pour être compatible avec la capacité de séparation des procédés physico-chimiques utilisés.
Les nombreux essais réalisés pour établir la liste des techniques et l'ordre dans lesquelles nous devons les employer, nous ont suggéré que vu l'instabilité des activités enzymatiques, les étapes doivent être réalisées dans le minimum de temps, et leur nombre doit être le plus petit possible.

En outre, des essais de stabilisation de l'activité enzymatique par de la sérum albumine, ou un sérum humain normal se sont révélés insatisfaisants, de même que la combinaison de certaines techniques comme la chromatographie sur échangeurs d'ions (DEAE Cellulose) et la gel filtration sur Sephadex G 200.

C'est en tenant compte de tous ces critères que nous avons choisi les différentes étapes que nous allons maintenant décrire.

A/ PREPARATION D'UNE SOLUTION ENRICHIE EN ASPARAGINASE I.

1) Séparation de l'Enzyme I.

Pour séparer et éliminer l'enzyme II, nous nous sommes

servis des résultats acquis lors du fractionnement cellulaire en soumettant l'homogénat brut à une accélération de 105 000 g pendant 1 heure à + 4° C.

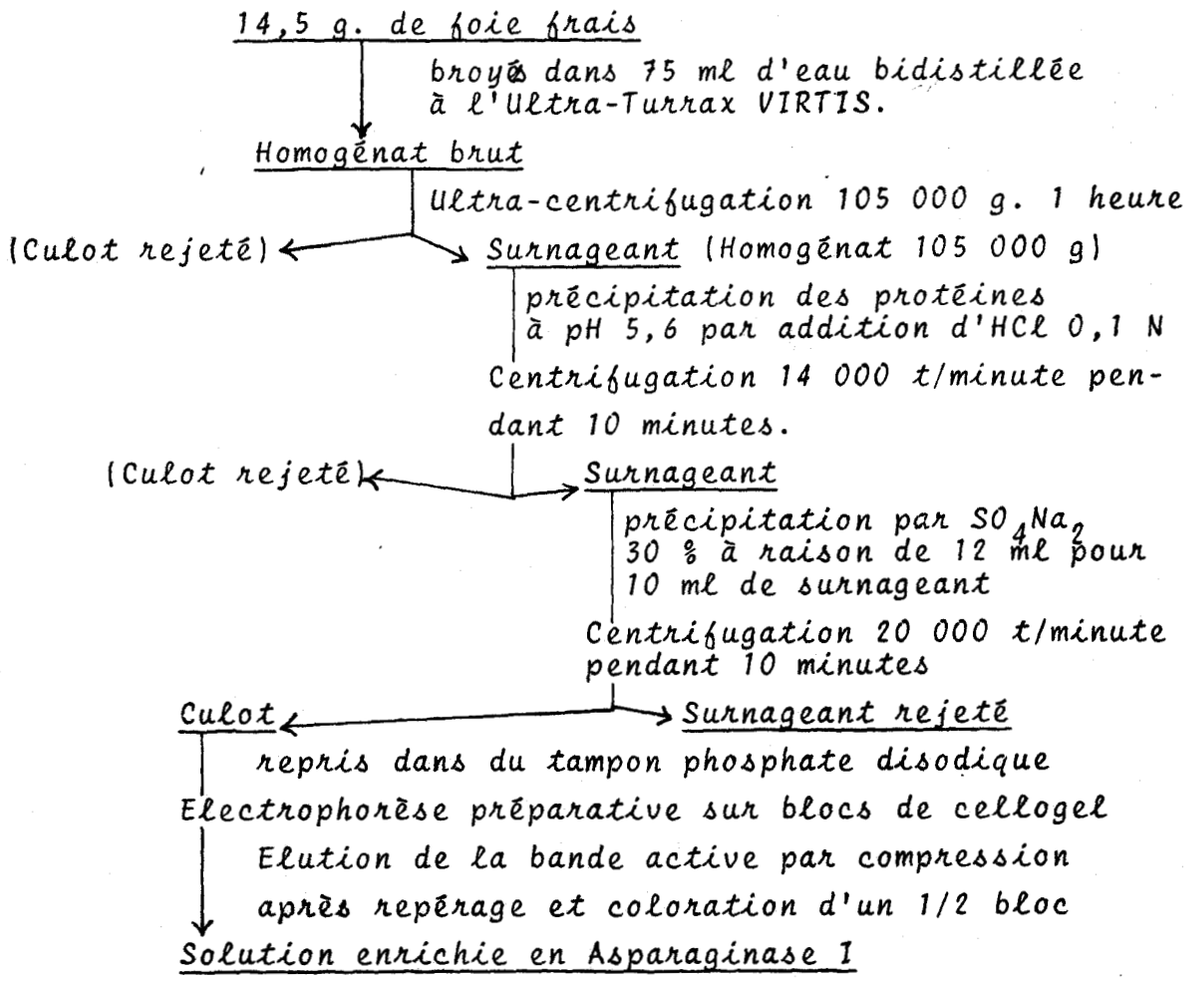
2) Les différentes étapes de la purification.

Nous avons réalisé successivement sur l'homogénat brut :

- une centrifugation à 105 000 g. pendant 1 heure
- une précipitation du surnageant par HCl 0,1 N à pH 5,6
- Une précipitation du surnageant obtenu par les sels neutres (Na_2SO_4 30 %).
- une électrophorèse préparative sur bloc de cellogel du culot repris dans du tampon phosphate disodique 0,02 M, pH 7,35.

Enfin, une électrophorèse analytique sur bande de cellogel, de la fraction active éluée du bloc.

3) Schéma détaillé des étapes :



4) Contrôle visuel du degré de pureté des solutions obtenues après chaque étape, par électrophorèse analytique sur bande de cellogel.

Un aliquot de 2 à 3 microlitres des solutions enzymatiques obtenues après chaque étape est prélevé et déposé sur une bande de Cellogel pour contrôler le degré de pureté et visualiser les protéines présentes après coloration des bandes à l'Amidoschwarz.

La Figure 30 représente ces bandes d'électrophorèse.

- La bande a correspond au surnageant de centrifugation à 105 000 g.
- La bande b au surnageant obtenu après précipitation à pH 5,6
- La bande c au culot redissous dans le tampon phosphate disodique après précipitation par les sels neutres.
- La bande d correspond à l'élution de la fraction active du bloc de cellogel après électrophorèse préparative.
- La bande e à l'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide de la solution finale déposée sur la bande d.

La solution enrichie présente une bande unique de protéine, et nous avons vérifié que seule l'élution de cette bande après découpage de la feuille de cellogel donne naissance à une solution enzymatique active. Le surnageant à 105 000 g. ne contenant au départ que de l'asparaginase I, cette bande unique de protéine active sur une solution d'asparagine tamponnée ne peut correspondre qu'à l'Enzyme I.

5) Résultats de la purification.

Les résultats des différents paramètres de la solution d'asparaginase I obtenue après chaque étape de la purification sont consignés dans le tableau VIII.

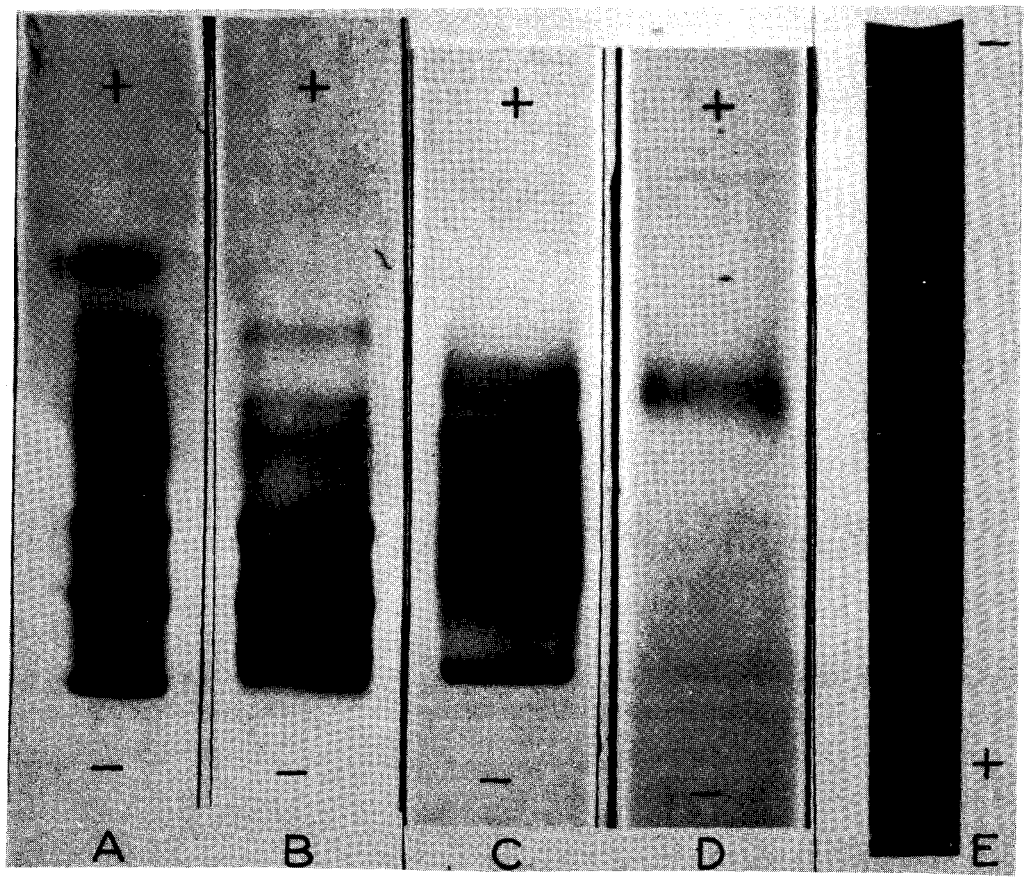


FIG 30 : Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel:

A: Du surnageant 105 000 g.

B: De la solution précédente après précipitation des protéines à pH 5,6 par HCl 0,1N.

C: De la solution précédente après relargage des protéines par les sels neutres.

D: De la solution précédente après électrophorèse préparative sur bloc de cellogel.

E: Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide de la solution finale.

BUS LILLE

Etapes	Volume total en ml	Protéine totale en mg	Activité totale en U.I.	Activité spécifique en U.I./mg de protéines	Rendement	Facteur de Purification
Homogénat brut	75	1687,5	207,5	12.10^{-2}	100	1
Homogénat 105 000 g	63	787,5	194	24.10^{-2}	93	2
Précipitation à pH 5,6 par HCl 0,1 N	60	510	138	27.10^{-2}	66	2,3
Relargage par les sels neutres (SO_4Na_2) 30 %	5	62,5	114	1,82	55	15
Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel	5	2	55	27,5	26	230

Tableau VIII : Résultats chiffrés des différents paramètres après chaque étape de la purification de l'Asparaginase I.

BHS LILLE

6) Conclusion.

Nous avons obtenu une solution d'Asparaginase I enrichie 230 fois par rapport à l'homogénat brut avec un rendement de 26 %. Si le facteur de purification et l'activité spécifique obtenus ne sont guère significatifs en raison de la baisse importante de l'activité au cours du temps, la bande unique de protéine présentant l'activité asparaginasique observée aussi bien après électrophorèse analytique sur feuille de Cellogel que sur gel de polyacrylamide, permet de penser que la préparation obtenue est beaucoup plus enrichie en Asparaginase I que ne le laissent prévoir les valeurs de l'activité spécifique, et du facteur de purification du Tableau VIII.

B/ PREPARATION D'UNE SOLUTION ENRICHIE EN ASPARAGINASE II.

1) Séparation de l'Enzyme II.

La seule méthode physico-chimique intéressante pour obtenir une bonne séparation des deux enzymes est la chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200. Elle permet d'éliminer pratiquement toute l'activité enzymatique I. Nous l'avons donc incorporée d'office parmi les étapes choisies pour la purification del'Asparaginase II, bien que le rendement de cette méthode soit médiocre dans ce cas.

2) Les différentes étapes de la purification.

Nous avons réalisé successivement sur l'homogénat brut :

- une précipitation des protéines à pH 5,6 par HCl 0,1 N.
- une précipitation des protéines du surnageant obtenu par les sels neutres (SO_4Na_2 30 %).
- une chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200 du culot repris dans du tampon phosphate disodique 0,02 M, pH 7,35.

- une électrophorèse préparative sur bloc de cellogel des fractions actives de la chromatographie rassemblées et reconcentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000.

- Enfin, une électrophorèse analytique sur bande de cellogel de la fraction active éluée du bloc.

3) Schéma détaillé des étapes.

37 g. de foie frais

↓ broyés dans 90 ml eau bidistillée à l'Ultra-Turrax VIRTIS

Homogénat brut

↓ précipitation des protéines à pH 5,6 par addition d'HCl 0,1 N

Centrifugation 14 000 tours/minute pendant 10 minutes.

(culot rejeté) ← ↓

Surnageant

↓ précipitation par SO_4Na_2 30 % à raison de 12 ml pour 10 ml de surnageant.

Centrifugation 20 000 tours/minute pendant 10 minutes.

Culot ← → (surnageant rejeté)

↓ repris dans du tampon phosphate disodique 0,02 M, pH 7,35

Chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200.

↓

Electrophorèse préparative sur blocs de cellogel.

↓ élution de la bande active par compression après repérage et coloration d'un 1/2 bloc

Solution enrichie en Asparaginase II

4) Contrôle visuel du degré de pureté des solutions obtenues après chaque étape, par électrophorèse analytique sur bande de cellogel.

Un aliquot de 2 à 3 microlitres des solutions enzymatiques obtenues après chaque étape est prélevé et déposé sur

une bande de cellogel pour contrôler le degré de pureté et visualiser les protéines présentes après coloration des bandes à l'Amidoschwarz.

La Figure 31 représente ces bandes d'électrophorèse.

- La bande a correspond à l'homogénat brut
- La bande b au surnageant obtenu après précipitation à pH 5,6
- La bande c au culot redissous dans le tampon phosphate disodique, après précipitation par les sels neutres.
- La bande d à la solution obtenue en rassemblant les fractions après gel filtration sur Sephadex G 200.

Nous n'avons pu obtenir une visualisation des protéines après la dernière étape, la sensibilité de l'électrophorèse n'étant pas suffisante pour la concentration en protéines de la solution finale.

5) Résultats de la purification.

Les résultats chiffrés des différents paramètres de la solution d'Asparaginase II obtenue après chaque étape de la purification sont indiqués dans le tableau IX.

6) Conclusion.

Nous avons obtenu une solution d'asparaginase II enrichie 40 fois par rapport à l'homogénat brut avec un rendement de 1,3 %. Ces résultats modestes n'ont pu être améliorés malgré tous nos efforts. La gel filtration utilisée pour l'asparaginase II diminue fortement le rendement (Tableau IX), ainsi que les autres paramètres, de plus elle amène une dilution importante de la solution, et la reconcentration provoque une perte d'activité très importante pour l'Enzyme II dont la stabilité est moins grande que l'Enzyme I.

La concentration en protéine trop faible de la

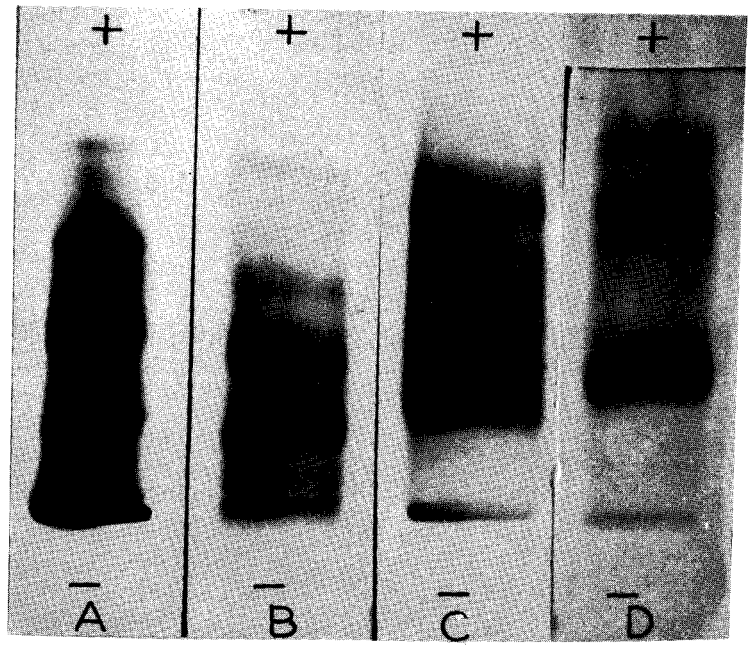


FIG 31: Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel:

A: De l'homogénat brut.

B: De la solution précédente après précipition des protéines à pH 5,6 par HCl 0,1 N.

C: De la solution précédente après relargage des protéines par les sels neutres.

D: De la solution précédente après gel filtration sur séphadex G 200.

BUS LILLE

Etapes	Volume total en ml	Protéines totales en mg	Activité totale en U.I.	Activité spécifique U.I./mg de protéine	Rendement en pourcentage	Facteur de purification
Homogénat brut	90	4636	633,6	13.10^{-2}	100	1
Purification par HCl 0,1 N à pH 5,6	80	1523	448	29.10^{-2}	70	2,2
Relargage par les sels neutres (SO_4Na_2) 30 %	15	152	348	2,3	54	17,5
Sephadex G 200 (gel filtration)	310	43,5	68,2	1,5	10,7	12,5
Electrophorèse préparative sur bloc de Cellogel	5	1,57	8,25	5,2	1,3	40

<u>Tableau IX</u> : Résultats chiffrés des différents paramètres après chaque étapes de la purification de l'Asparaginase II.

BUS LILLE

solution finale, ne nous a pas permis de révéler l'électrophorégramme. Nous avons donc essayé de trouver une méthode qui permettrait la suppression de la gel filtration.

C/ PREPARATION D'UNE SOLUTION ENRICHIE EN ASPARAGINASE I ET II.

1) Matériel et Méthode.

Nous avons utilisé l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide.

Les deux colonnes utilisées, les gels, et les tampons sont les mêmes que ceux décrits au chapitre premier.

Après une première électrophorèse del'homogénat brut sur la grosse colonne PD2/320 (Fig. 17) les fractions actives recueillies sont rassemblées reconcentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000 et redéposées sur la moyenne colonne PD2/150.

Après une deuxième électrophorèse (Fig. 19) les fractions actives recueillies, sont également rassemblées et reconcentrées.

Un aliquot de 2 à 3 microlitres est déposé sur une bande de cellogel et soumis à une électrophorèse analytique.

2) Résultats.

Après coloration des feuilles de cellogel à l'Amidoschwarz et décoloration, deux bandes de protéines sont nettement visibles (Fig. 32).

Les électrophorèses étant faites dans des conditions identiques, et étant très reproductibles, nous avons comparé

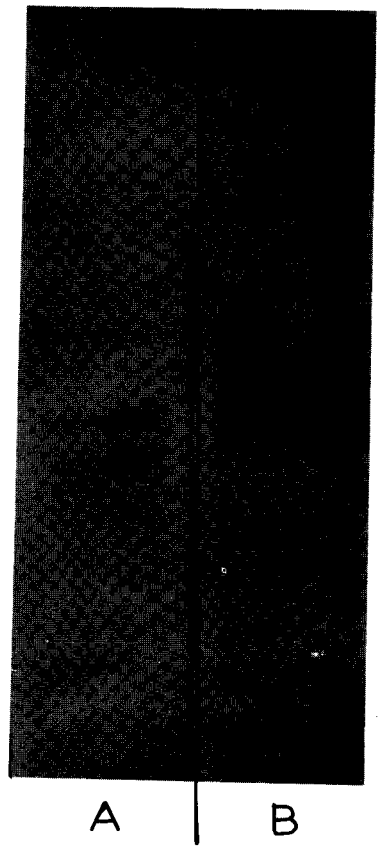


FIG 32 : Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel :

A : De la solution obtenue par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide.

B : De la solution d'asparaginase 1 servant de référence.

BUS-LILLE

avec l'électrophorèse de l'Asparaginase I (Fig. 32 b) obtenue précédemment (Fig. 30 e).

La bande supérieure correspond bien à l'Asparaginase I et comme nous avons démontré que seules les deux bandes après découpage et élution de la feuille de cellogel présentent une activité asparaginasique, nous pouvons penser que la bande inférieure est due à l'Asparaginase II qui migre par conséquent moins vite vers l'anode que l'enzyme I, ce qui correspond aux résultats obtenus par électrophorèse préparative en veine liquide (Elphor Vap) (Fig. 12) et par électrophorèse préparative sur bloc de cellogel (Fig. 15 et 16).

3) Conclusion.

Nous avons pu obtenir un électrophorégramme présentant deux bandes protéiques distinctes correspondant vraisemblablement à l'Asparagine I et II. Il nous fut impossible de séparer ultérieurement ces deux activités par gel filtration sur Sephadex G 200, à cause de la faible concentration en Enzyme.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons mis en évidence dans le foie de cobaye deux activités asparaginasiques distinctes séparées par :

- chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Cellulose
- chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200
- électrophorèse préparative en veine liquide (Elphor Vap)
- électrophorèse préparative sur bloc de cellogel
- électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide

et correspondant à des poids moléculaires différents :

- 150 000 ± 25 000 pour l'asparaginase I
- 21 500 ± 2000 pour l'asparaginase II

Si la localisation de l'enzyme II dans la cellule hépatique n'a pu être déterminée de façon certaine du fait de son inactivation à 105 000 g, l'asparaginase I par contre, est présente dans la phase cytoplasmique de la cellule.

De même la purification poussée del'asparaginase II nous a posé beaucoup plus de problèmes que celle de l'enzyme I, en raison de sa moindre stabilité à la congélation, à la concentration, et de la présence de protéines accompagnant le pic d'activité, difficilement séparables par les méthodes classiques que nous avons énumérées. Il en résulte que si nous avons pu obtenir une solution d'asparagine I dont l'activité spécifique s'élève à 27,5 et le facteur de purification à 230, pour l'enzyme II ces valeurs ne sont respectivement que de 1,3 et 40.

Ces deux activités asparaginasiques du foie de cobaye possèdent des poids moléculaires et des mobilités électrophorétiques différents.

La présence de deux activités asparaginasiques distinctes dans le foie de cobaye n'avait pas été relatée jusqu'à présent dans la littérature : en effet, H.M. SULD et P.A. HERBUT (135) n'avait isolé qu'une seule activité dans cet

organe sans en déterminer le poids moléculaire ni les propriétés physico-chimiques.

Il est possible que cette activité corresponde à l'une de celles que nous avons rencontrées. Cependant, ces auteurs opérant sur un surnageant 105 000 g, il est peu vraisemblable qu'il s'agisse de la L-asparaginase II qui nous l'avons montré s'inactive lorsqu'on la soumet à cette accélération.

Nous avons également démontré que les poids moléculaires, et les résultats de la chromatographie sur échangeur d'ions (DEAE Cellulose) des deux activités sont différents de ceux de l'enzyme sanguine.

Les poids moléculaires ne correspondent pas non plus à ceux des asparaginases d'E. Coli WHELAN et WRISTON (136) ont montré que les poids moléculaires de l'Asparaginase d'E. Coli variaient de :

BUS LILLE

- 139 000 pour l'enzyme en solution à 0,1 p. 100
- 225 000 pour l'enzyme en solution à 1 p. 100
- 64 000 pour l'enzyme en solution à 0,01 p. 100

et qu'il était possible en présence d'urée 8 M de guanidine 5 M d'obtenir des sous-unités de poids moléculaire 19 à 24 000. Ils ont suggéré que l'enzyme de poids moléculaire 255 000 était composé de 12 sous-unités dépaurvues d'activité enzymatique ; ces résultats ne concordent pas avec ceux de HO et MILIKIN (137), qui ont montré que l'enzyme d'E. Coli (poids moléculaire 130 000) était transformable en dimère (P.M. 270 000) et en tétramère (P.M. 520 000) et que le monomère était dissociable en sous-unités de poids moléculaire 32 500 dans le chlorhydrate de guanidine 4 M ou l'urée 7 M.

Il n'est pas question de comparer la structure de l'asparaginase de foie de cobaye, avec celle d'E. Coli : SULD et HERBUT (138) ont montré qu'elles sont antigéniquement

différentes. Mais par analogie, on peut se demander si les deux activités du foie de cobaye représentent des formes différentes d'un enzyme polymérique. Au cours de nos expériences, nous n'avons jamais mis en évidence jusqu'à présent la transformation de l'asparaginase I en II et vice-versa, et aucun argument expérimental ne milite en faveur de l'existence de sous-unités.

L'enzyme II bien que moins stable a une activité relativement importante, et rien ne permet de la comparer aux sous-unités de même poids moléculaire de l'asparaginase d'E. Coli qui sont inactives. Par ailleurs, nous avons montré que les deux activités du foie de cobaye étaient séparables par chromatographie sur échangeurs d'ions du type DEAE et par électrophorèse en veine liquide (Elphor-Vap). Ceci constitue un argument en faveur de points isoélectriques différents.

Naturellement, beaucoup de problèmes se posent et leur étude nécessite une expérimentation plus développée qui comprendra si la pureté des solutions enzymatiques le permet :

- une étude des propriétés physico-chimiques des deux enzymes isolées
- une détermination de la composition en amino acides
- une étude immunochimique
- une étude biologique sur l'activité antilymphome des deux activités séparées.

R E S U M E

Nous avons mis en évidence deux L-asparaginases (L-asparagine amido-hydrolase E.C. 3.5.1.1) du foie de cobaye par divers procédés physico-chimiques, parmi lesquels on peut citer : la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Cellulose, la gel filtration sur Sephadex G 200, l'électrophorèse préparative en veine liquide (Elphor Vap), l'électrophorèse sur blocs de cellogel, et sur gel de polyacrylamide. Une estimation des poids moléculaires a été effectuée : l'une des asparaginases a un poids moléculaire plus bas que celui des enzymes analogues connus. Par fractionnement cellulaire, nous avons pu localiser l'Asparaginase I de plus haut poids moléculaire dans la phase cytoplasmique. L'asparaginase II se trouvant en petite quantité dans les mitochondries, le reste de l'activité pouvant être vraisemblablement localisé au cytosol.

En groupant certains procédés de purification cités plus haut, nous avons pu obtenir des solutions enrichies d'Asparaginase I et II ne présentant plus qu'une seule bande de protéine en électrophorèse analytique sur cellogel et sur gel de polyacrylamide.

APPENDICE TECHNIQUE

I - DOSAGE DES PROTEINES.

Le dosage colorimétrique des protéines est effectué par la méthode de LOWRY (139) adaptée à l'autoanalyseur Technicon muni d'un filtre interférentiel à 625 nm.

A/ REACTIFS.

a) Solutions mères.

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU.

- Tungstate de Na 100 g.
- Molybdate de Na 25 g.
- Eau déminéralisée 700 ml

Après dissolution, nous ajoutons :

- Acide orthophosphorique à 85 % 50 ml
- Acide chlorhydrique pur 100 ml

La solution est soumise à l'ébullition à reflux pendant 10 heures, puis nous ajoutons :

- Sulfate de lithium 150 g.
- Eau déminéralisée 50 ml
- 10 à 15 gouttes de Brome jusqu'à décoloration partielle.

La solution obtenue est de nouveau portée à l'ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement, nous complétons à 2000 ml avec de l'eau déminéralisée, et nous filtrons.

2. Solution de carbonate.

- 84 g. de bicarbonate de Na ($NaHCO_3$) sont dissous dans 500 ml d'eau déminéralisée.
- 25 g. de soude R.P. sont dissous dans 300 ml d'eau déminéralisée.

Après refroidissement, nous mélangeons ces deux solutions, et nous complétons à 1000 ml avec de l'eau déminéralisée. La solution finale est gardée à l'obscurité.

3. Solution de tartrate double de potassium et de sodium.

- Tartrate de Sodium et de Potassium 8 g.
- Eau déminéralisée q.s.p..... 1000 ml

4. Solution de sulfate de cuivre.

- Sulfate de cuivre 2 g.
- Eau déminéralisée q.s.p. 1000 ml

b) Solutions de travail.

1. Solution de FOLIN-CIOCALTEU préparée extemporanément.

- Réactif de FOLIN 1 volume
- Eau déminéralisée 3 volumes

2. Solution cuproalcaline préparée extemporanément.

- Solution de tartrate double 1 volume
- Solution de sulfate de cuivre 1 volume

3. Solution de carbonate.

Solution mère filtrée avant l'emploi.

II - ELECTROPHORESE A pH 3,9.

La cuve à électro rhéo phorèse utilisée est une cuve en toit qui permet la mesure des mobilités selon MACHEBOEUF, DUBERT, REBEYROTTE.

Le tampon d'électrodes est constitué par :

- Acide acétique 40 mℓ
- Pyridine 12 mℓ
- H_2O distillée q.s.p. 2000 mℓ

Son pH est de 3,9.

La durée de l'électrophorèse est de 4 heures pour une tension de 450 volts. La migration terminée, la feuille est retirée, séchée puis pulvérisée par une solution de nynhydrine à 0,2 % dans du butanol saturé d'eau.

La révélation des taches se fait à l'étuve à 100° C.

III - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL

1) Matériel utilisé.

Les blocs de cellogel de 6 x 17 cm et 2,5 mm d'épaisseur nous ont été fourni par BIOMAT International - HAZEBROUK 59. La capacité de séparation est d'environ 0,5 mℓ/5 cm. Ils sont conservés dans du méthanol à 30 %. La cuve à électrophorèse est de type classique, elle est munie d'un portoir sur lequel sont déposés les blocs par l'intermédiaire d'une plaque de verre, d'une dimension analogue à ceux-ci. Le pont entre la solution tampon et le bloc est constitué par un talon de papier Whatman I.

Le tampon d'électrode est un tampon Véronal/HCl dont la composition est :

- Véronal sodique	17 g.
- HCl N	23,5 ml
- H_2O distillée q.s.p.	1000 ml

Son pH est de 8,4.

2) Technique.

Les blocs sortis du méthanol à 30 % sont séchés délicatement entre des feuilles de papier filtre, puis sont immergés dans le tampon pendant une durée pouvant varier de 2 heures à une nuit. L'excès de tampon est éliminé en pressant doucement la surface du bloc avec une feuille de papier filtre. Ils sont ensuite placés sur le portoir de la cuve à électrophorèse, et reliés aux solutions de tampon cathodique et anodique par l'intermédiaire d'un talon de papier Whatman I préalablement trempé dans le tampon.

La gouttière du dépôt est faite du côté cathodique, à l'aide d'un parallélipipède métallique muni d'un manche dont la surface de contact avec le gel est équivalente à celle de la gouttière pratiquée.

La profondeur est de 2 mm environ, sa longueur de 4,5 cm.

Elle se situe à 2,5 cm du bord cathodique du bloc. Pour avoir une bonne migration électrophorétique, la gouttière doit être la plus régulière possible dans toutes ses dimensions, il ne faut jamais craqueler le gel de part et d'autre de celle-ci, ni transpercer le gel en appuyant trop fort.

0,5 ml de la solution enzymatique sont déposés à l'aide d'une pipette Pasteur par fraction de 50 à 100 microlitres à la fois. Le temps nécessaire entre chaque fraction

déposée dépend du pouvoir absorbant du gel. Il faut éviter que la solution enzymatique ne déborde hors du godet de dépôt.

Le couvercle de la cuve étant fermé, l'intensité constante appliquée pour chaque bloc est de 25 mA pour une tension continue de l'ordre de 250 volts. La durée de la migration est de 6 heures.

Les blocs sont ensuite retirés puis coupés en deux longitudinalement avec une lame de rasoir.

a. Coloration et décoloration des blocs.

Une moitié du bloc est colorée à l'Amidoschwarz :

- 0,5 g. dans 50 ml de Méthanol
- 40 ml d'H_2O bidistillée
- 10 ml d'acide acétique

Le temps de coloration dure 15 minutes sous agitation manuelle intermittente.

La décoloration se fait par bains successifs dans un liquide de lavage dont la composition est :

- 100 ml d'acide acétique R.P.
- 900 ml de méthanol technique

Les blocs ainsi révélés sont conservés indéfiniment dans une solution d'acide acétique à 5 %.

IV - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR BANDES DE CELLOGEL.

1) Matériel utilisé.

Les bandes de cellogel 2,5 x 17 cm ainsi que la cuve à électrophorèse 2 PAC/5 et les applicateurs d'échantillon CHEMETRON sont distribués par BIOMAT International, HAZEBROUK 59. La capacité de séparation est de 3 microlitres/16 mm. Les bandes sont conservées dans du méthanol à 30 %.

Le tampon d'électrode utilisé est un tampon véronal dont la composition est la suivante :

- 8,24 g de véronal sodique.
- H_2O bidistillée q.s.p. 1000 ml.

Son pH est de 9,2.

2) Technique.

Les bandes sont pressées entre deux feuilles de papier filtre de façon à éliminer l'excès de méthanol puis sont immergées dans le tampon pendant 15 minutes. L'excès de tampon est enlevé de la même façon puis elles sont tendues sur le portoir de la cuve. La surface mate, seule pénétrable par les protéines est repérable grace à un angle coupé mis en bas à droite.

L'échantillon de 2 microlitres environ est déposé du côté cathodique à l'aide d'un applicateur constitué par deux fils métalliques tendus.

La durée de l'électrophorèse est de 75 minutes pour une tension continue constante de 200 volts.

a. Coloration et décoloration des bandes.

Les bandes sont plongées dans un bain d'Amidoschwarz pendant 15 minutes.

La décoloration se fait par 4 à 5 bains successifs de quelques minutes dans une solution constituée par :

- de l'acide acétique 100 ml
- du méthanol technique 900 ml

Les bandes peuvent être soit transparisées pour une évaluation quantitative des protéines par densitométrie, soit conservées indéfiniment à l'état humide dans une solution d'acide acétique à 5 %.

V - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

ORNSTEIN (140) et DAVIS (141) 1964.

1) Matériel utilisé.

L'appareil utilisé CANALCO se compose de trois colonnes interchangeables :

- PD2/320 pouvant recevoir au maximum 30 ml d'échantillon contenant 500mg de protéines.

- PD2/150 pouvant recevoir au maximum 14 ml d'échantillon contenant 200 mg de protéines

- PD2/70 pouvant recevoir au maximum 6 ml d'échantillon contenant 80 mg de protéines.

Nous n'avons utilisé dans le cadre de ce travail que les deux premières colonnes PD2/320 et PD2/150.

Les gels de forme annulaire sont refrigérés par l'intérieur et par l'extérieur de l'anneau avec une circulation d'eau à + 4° C. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant stabilisé en intensité.

2) Principe.

Trois types de gel sont utilisés et superposés dans les colonnes :

- un gel d'échantillon
- un gel de tassement, à bas pourcentage de réticulation (2 à 3 %)
- un gel de séparation, à haut pourcentage de réticulation (7 à 10 %)

Le gel d'échantillon sert à déposer de façon homogène un certain volume de solution enzymatique.

Dans le gel de tassement, toutes les protéines migrent strictement suivant leur mobilité électrophorétique sans effet du poids moléculaire et permet de rassembler dans une bande très tassée, des fractions concentrées sans espace entre-elles.

Dans le gel de séparation, les protéines migrent suivant leur mobilité électrophorétique et la taille des molécules. Le choix de la réticulation primordiale pour une bonne séparation de molécules protéiques ayant une mobilité et un poids moléculaire différents, nécessite denombreux essais.

Les protéines sont éluées à la sortie de la colonne par un tampon qui les achemine vers un collecteur de fractions.

L'existence de nombreux paramètres variables (choix des différents gels, des tampons, de la concentration des protéines à déposer, de la vitesse d'élution) font de cette méthode à priori intéressante pour la séparation des protéines, une technique très difficile à mettre en oeuvre pour obtenir des résultats corrects.

3) Composition des tampons et des solutions servant à la fabrication des gels.

Solution A		Solution B	
1 N HCl	48 ml	1 N HCl	48 ml
Tris	36,3 g.	Tris	5,98 g.
H_2O q.s.p.	100 ml	H_2O q.s.p.	100 ml
pH 8,8 à 9,0		pH 6,6 à 6,8	

Solution CN		Solution DN	
Prep/Cryl	40 g.	Prep/Cryl	14,0 g.
Bis	0,12 g.	Bis	0,25 g.
H_2O q.s.p.	100 ml	H_2O q.s.p.	100 ml

Solution E (catalyseur)		Solution G (catalyseur)	
Riboflavine	4,0 mg	Persulfate d'ammonium	0,14 g
H_2O q.s.p.	100 ml	H_2O q.s.p.	100 ml

Solution J (Indicateur coloré)	Tampon Tris	
Solution à 0,005 % de bleu de Bromophénol	Tris	3,0 g.
	Glycine	14,4 g.
	H_2O q.s.p.	1000 ml
	pH 8,2 à 8,4	

BUS LILLE

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

LES CHIFFRES ENTRE PARENTHESES QUI SUIVENT LES REFERENCES CORRESPONDENT A LEUR ORDRE D'APPARITION DANS LE TEXTE AVEC UN RENVOI DE PAGE.

ABOUMALIKOV A. K., NIKOLAEV A.Y. - *Biokhimiya*, 1967, 32, 859 (60, p. 6).

ADAMSON R.H., FABROS S. - *Proc. Amer. Ass. Cancer. Res. Atlantic City* N. J., 1968, n° 3 (7, p. 4).

AINIS J., KURTZ H.M., DRAMER P.I., WEIMER H.E., RYAN R.M., JAMESON E. - *Cancer Res.*, 1958, 18, 1309 (8, p. 4).

ALTENBERN R. A., HOUSENRIGHT R.D. - *Arch. Biochem.*, 1954, 49, 130 (61, p. 6).

APPELMANS F., WATTIAUX R., DE DUVE C.- *Biochem. J.*, 1955, 59, 438 (133, p. 72).

ASMAR El M.F.A. - *Univ. Microfilms Ordre* n° 65, 8432, 114 p et *Dissertation Abst.*, 1965, 26, n° 3, 1317 (62, p. 6).

AZARKH R.M., PASHKINA T.S.- *Dokl. Akad. Naud. S.S.R.R.*, 1962, 146, 704 (9, p. 4).

BECKER F.F., BROME J.D. - *Science*, 1967, 156, 1602 (10, p. 4 ; 63, p. 6).

BEREZOV T.T. - *Ukr. Biokhim. Zh.*, 1966, 38, n° 5, 484-489, (64, p. 6 ; 102, p. 8).

BOIRON M., JACQUILLAT C., WEIL M., TANZER J., BERNARD J. - *Press. Med.*, 1968, 76, 44, 2099 (11, p. 4).

BORELLA L., JOURNEY L. J., KIRAMOTO R. - *Cancer Res.* 1966, 26, 245, (12, p. 4).

BOTTINGER I.E. - Nord, Med., 1967, 78, 46, 1521 (13, p. 4).

BOYSE E.A., OLD L.J., SOCKERT E. - Nature (Lond.) 1965, 198, 800 (14, p. 4).

BOYSE E.A., OLD L.J., CAMPBELL H.A., MASHBURN L.T. - J. Exp. Med., 1967, 125, 17 (15, p. 4).

BROOME J.D. - Nature (Lond.) 1961, 191, 1114 (1, p. 2 ; 48, p. 4)

BROOME J.D. - J. Exp. Med., 1963, 118, 99 (2, p. 2 ; 49, p. 4).

BROOME J.D. - J. Exp. Med., 1963, 118, 121 (3, p. 2 ; 50, p. 4).

BROOME J.D. - J. Nat. Cancer Inst., 1965, 35, 967, (65, p. 6).

BROOME J.D. - Brit. J. Cancer, 1968, 23, n° 3, 595-602 (114, p. 9).

BROOME J.D. - Trans. N.Y. Acad. Sci., 1968, 30, n° 5, 690-704, (115, p. 9).

BROOME J.D., SCHWARTZ J.H.- Biochem. Biophys. Acta (Amst.), 1967, 138, n° 37, 637-639 (119, p. 13).

CAMPBELL J.A., MASHBURN L. T., BOYSE E.A., OLD L.J. - Biochemistry, 1967, 6, n° 3, 721-729 (16, p. 4 ; 66, p. 6 ; 90, p. 8).

CEDAR H., SCHWARTZ J.H. - J. Biol. Chem., 1967, 242, n° 16, 3753, (67, p. 6 ; 91, p. 8).

DAVIS B. J.- Ann.N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404 (141, p.110).

DIN ELM., RAMADAN A., ASMAR E.L. F., GREENBERG D. M. - Arch., Biochem., 1964, 108, 150-157 (69, p. 6 ; 95, p. 8 ; 99, p. 8).

DIN El M., RAMADAN A., ASMAR E.L.F., GREENBERG D.M. - Arch., Biochem., 1964, 108, n° 1, 143-149 (68, p. 6 ; 94, p. 8 ; 98, p. 8).

DOLOWY W.C., AMMERAAL R. - Nature (Lond.), 1967, 155, 329 (19, p. 4).

DOLOWY W. C., CORNET J., HENSON D., AMMERAAL R. - Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1966, 123, 133 (17, p. 4).

DOLOWY W. C., CORNET J., HENSON D., SELLIN M. - Cancer (Philad.), 1966, 19, 1813-1819 (18, p. 4).

DOLOWY W. C., SCHREK R., HENSON D., CORNET J., BROWN E. - Nature (Lond.), 1968, 218, 1028 (20, p. 4).

ERIKSSON K.E. - Acta Chem. Scand., 1967, 21, 9, 2573 (21, p. 4 ; 70, p. 6).

ERRERA M., GREENSTEIN J.P. - J. Nat. Cancer Inst., 1947, 7, 285-288 (71, p. 6 ; 92, p. 8 ; 103, p. 9).

EVSEEV L. P., NIKOLAEV A. Y., EREMENDO V.V., MARDASHEV S. R. - Biokhimiya, 1967, 32, N° 4, 873-875 (72, p. 6).

GIRARD M. L., ROUSSELET F., KOCH M. - Ann. Biol. Clin., 1963, 21, 557-572 (124, p. 20 ; 131, p. 44).

GREENBERG D. M., BLUMENTHAL G., RAMADAN M. A. - Cancer Res., 1964, 24, 957, (97, p. 8).

GREENBERG J. P., PRICE V.E. - J. Biol. Chem., 1949, 178, 695-705 (93, p. 8).

GUHA S. R., SAXINA R. P., GHATAK S. - J. Sci. Ind. Res., 1962, 216, 288-231, (73, p. 6).

HILL J. M., ROBERTS J., LOE B. E., KHAN A., Mac LELLAN A., HILL R. W. - J. Amer. Med. Ass., 1967, 202, 882 (22, p. 4).

HIRAMOTO R., TATE C., HAMLIN M. - Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 1966, 121, n° 2, 597-601 (23, p. 4 ; 74, p. 6).

HO P. K., MILIKIN E. B. - Biochem. Biophys. Acta, 1970, 206, 196-198 (137, p. 99).

HOROWITZ B., MADRAS B.K., MEISTER A., OLD L. J., BOYSE E. A.- Proč. Amer. Ass. Cancer Res., 1968, 9, 33 (118, p. 13).

HOROWITZ B., MADRAS B.K., MEISTER A., OLD L.J., BOYSE E.A., STOCKERT E. - Science, 1968, 160, 533 (117, p. 13).

JAYARAM H. N., KIDD J. G. - Proc. Soc. Exp. Biol (N.Y.) 1964, 91, (24, p. 4).

KIDD J.G., SOBIN L.H. - Cancer Res. 1966, 26, n° 2, 208-211, (121, p. 13).

KIM J.H., BOYSE E.A., OLD L.J., CAMPBELL H.A. - Biochem. Biophys. Acta (Amst.), 1968, 158, n° 3, 476-479 (25, p. 4).

KIRCHEIMER W.F., WIHTTAKER C.K. - Ann. Rev. Tuberc. 1954, 70, 720-721 (76, p. 6).

KISHI S., HARUNO K. - Chem.Ber., 1952, 85, 836-840 (26, p. 4 ; 105, p. 9).

KISHI S., HARUNO K. - Gann., 1952, 13, 421 (106, p. 9).

KREBS H. A. - Biochem. J., 1950, 47, 605 (27, p. 4).

LABOUREUR P. - Path. Biol., 1969, 17, n° 19-20, 885-908 (6, p. 4 ; 123, p. 17).

LEAL J.A., LILLY V.C., FALLEGLY M.E. - *Proc. W. Virginia Acad. Sci.*, 1967, 39, 95 (77, p. 6).

LEE M.B., BRIDGES J.M. - *Nature (Lond.)*, 1968, 217, 758-759, (78, p. 6).

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J. - *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265 (125, p. 27 ; 130, p. 44 ; 132, p. 60 ; 139, p. 104).

MARDASHEV S. R., NIKILAEV A.Y., EVSEEV L.P., EREMENKI V.V. - *Biokhimiya*, 1967, 32, n° 5, 1093 (79, p. 6).

MASHBURN L.T., WRISTON J.C. jr - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 12, 50 (28, p. 4 ; 59, p. 5).

MASHBURN L.T., WRISTON J.C. jr - *Arch. Biochem.* 1964, 105, (29, p. 4).

MASHBURN L.T., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A., OLD L.L. - *Proc. Soc. Exp. Biol (N.Y.)*, 1967, 124, 568 (30, p. 4).

MASHBURN L.T.- *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 1968, 9, 45, (31, p. 4).

MASHBURN L.T., BOYSE E.A., OLD L.J., CAMPBELL J.A. - *Biochemistry*, 1967, 6, n° 3, 721-729 (58, p. 5).

MEISTER A. - *Acad. Press.*, New-York, 1955, 2, 383 (57, p. 5).

MEISTER A. - *Biochemistry of amino acids* - Acad. Press. New York, 1965, 605 (122, p. 13).

MIZUHARA S. - *J. KinK. Genicol. Soc.* 1929, 12, 18 (104, p. 9).

NAGUMI H.- *Ann. Paediat. Jap.*, 1958, 4, 41 (113, p. 9).

NEUMAN R.E., MACCOY T.A. - *Science*, 1959, 124, 124 (96, p. 8).

OETTGEN R.E., OLD L.J., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A., PHILIPS F.S., CLARKSON B.D., TALLA L.L., LEPER R.D., SCHWARTZ M.K., KIM J.H.- Cancer Res., 1967, 27, 2616 (32, p. 4).

OHNUMA T., BERGEL F., BRAY R.C. - Biochem. J., 1967, 103, 238, (33, p. 4 ; 100, p. 8).

OLD L.J., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A. - Sci. Amer., 1968, 219, 34-40, (35, p. 4 ; 56, p. 5).

OLD L.J. , BOYSE E.A., CAMPBELL H.A., BRODEY R.S., FIDLET J., TELLIER J.G. - Lancet, 1967, 1, 447 (34, p. 4).

ORNSTEIN L. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321 (140, p. 110)

OTT J.L. - J. Bact., 1960, 80, 355 (80,p.6).

PRAGER M.D., ROBERTS J., BACHYNSKY N. - J. Immunol., 1967, 98, n° 15, 1045-1052 (36, p. 4).

RAINA P. N., RAMAKRISHNAN C.V. - Oncologia (Basel) 1964, 18, 9-13, (101, p. 8).

RAKIETEN N., GORDON B.S., SCHEIN P.S., DAVIS R., RALL D.P. - In Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1968, 59th annual Meeting Atlantic City (N.J.) n° 232 (37, p. 4).

RILEY V. - Nature (Lond.), 1968, 220, 1245 (116, p. 9).

ROBERTS J., PRAGER M.D., BACHYNSKY N. - Cancer Res., 1966, 26, 2213, (38, p. 4).

ROBERTS J., BURSON G. - J. Bact., 1968, 95, n° 6, 2117-2123 (39, p. 4 ; 53, p. 5 ; 81, p. 6).

ROBINSON R.S., BEK B. - Proc. Biochem. Dec. 1968, 24 International Fermentation Symposium, (54, p. 5).

ROWLEY B., WRISTON J.C. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28, N° 2, 160-165 (82, p. 6).

SCHLESINGER N., GROSSOWICZ N., LICHTENSTEIN N. - Experientia (Basel) 1969, 25, 14 (40, p. 4).

SCHREK R., DOLOWY V.C., AMMERAAL R.N. - Sciences, 1967, 155, 329 (41, p. 4).

SCHWARTZ J.N., REEVES J.Y., BROOME J.D. - Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 1966, 56, 1516 (55, p. 5 ; 83, p. 6 ; 120, p. 13).

SEKWAK K., JAMESON E., RYAN R.M., KURTZ H. M. - Cancer Res., 1961, 21, 44 (42, p. 4).

STEVENARD M., LAMONNIER M. - Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 1968, 13, n° 3, 229 (43, p. 4).

SULD H.M., HERBUT P.A. - J. Biol. Chem., 1965, 240, n° 5, 2234-2241, (44, p. 4 ; 84, p. 6 ; 126, p. 30 ; 127, p. 32 ; 128, p. 33 ; 134, p. 82).

SULD H.M., HERBUT P.A. - J. Biol. Chem., 1970, 245, n° 11, 2797-2808, (5, p. 2 ; 45, p. 4 ; 85, p. 6 ; 135, p. 98 ; 138, p. 99).

TOWER D.B., PETERS E.L., CURTIS W.C. - J.Biol. Chem., 1963, 238, 983-993, (86, p. 6).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - J. Neurochem., 1964, 11, n° 2, 99-108 (107, p. 9).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - Cas. Lěk. ces., 1964, 103, n° 15, 395-400 (108, p. 9).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - Bratisl. Lek. Listy, 1965, 45-1, n° 1, 3-10, (109, p. 9).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - Z. ges. exp. Med., 1966, 140, n° 3, 256-267, (110, p. 9).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - *Biologia (Bratislava)*, 1967, 22, N° 1, 39-44 (111, p. 9).

TURSKY T., VALOVICOVA E. - *Biologia (Bratislava)*, 1967, 22, n° 2, 114, (112, p. 9).

VARNER J.E. - Acad. Press, New York, 1960, 4, 243-244, (52, p. 5 ; 87, p. 6).

WARNER A. C. I. - *Aust. J. Biol. Sci.*, 1964, 17, 170-182 (88, p. 6).

WHELAN H.A., WRISTON J.C.jr - *Biochemistry*, 1969, 8, 2386 (136, p. 99).

YELLIN T.O., WRISTON J.C. jr - Science , 1966, 151, 998-999 (46, p. 4).

YELLIN T.O., WRISTON J.C. - *Biochemistry*, 1966, 5, N° 5, 1605-1612, (47, p. 4 ; 89, p. 6).

ZITTLE C.A. - Academic Press, New York, 1951, (51, P. 5).

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION.

CHAPITRE I 1

Revue générale : Biochimie de la L-asparaginase... 2

A) Action de la L-asparaginase 4

B) Répartition et localisation des asparaginases..... 5

C) Mesure de l'activité 5

D) Propriétés des asparaginases..... 6

E) L'asparaginase et ses différentes formes.... 8

F) Asparaginase et Etats pathologiques..... 8

G) Asparaginase et activité biologique 9

H) Propriétés générales et Métabolisme de l'Asparagine..... 9

1. Répartition de l'Asparagine 11

2. Métabolisme de l'Asparagine 11

α) Catabolisme 11

β) Synthèse de l'Asparagine..... 13

Conclusion..... 17

CHAPITRE II 18

TRAVAUX PERSONNELS : L-asparaginases du foie de cobaye..... 19

I) Méthode de dosage semi automatique de la L-asparaginase..... 20

A) Dosage de l'ammoniaque..... 20

a) Réactifs..... 20

b) Schéma de montage du manifold Technicon. 22

c) Solutions étalons d'ions ammonium..... 22

B) Réaction enzymatique..... 25

C) Arrêt de la réaction..... 25

II) Dosage des protéines..... 27

A) Réactifs 27

B) Montage du manifold Technicon 27

C) Solutions étalons de protéines 27

III) Préparation de l'homogénat 29

IV) Purification partielle de l'homogénat 29

a) Précipitation par l'acide..... 29
b) Précipitation par les sels neutres..... 30

V) Procédés physico-chimiques permettant de mettre en évidence deux activités asparaginasiques distinctes.

Introduction..... 32

A) Chromatographie d'échanges d'ions 32
1) Préparation de l'échangeur..... 32
2) Chromatographie de l'homogénat de foie. de cobaye..... 33

B) Chromatographie de tamisage moléculaire : gel filtration 38

1) Préparation du gel..... 38
2) Chromatographie de l'homogénat 38
3) Relations entre la chromatographie d'échange d'ions et la gel filtration..... 38
4) Identification des deux activités enzymatiques I et II séparées par gel filtration à deux activités asparaginasiques I et II..... 40
5) Application de la gel filtration : Estimation des masses moléculaires des deux asparaginases du foie de cobaye.... 42

C) Electrophorèse préparative en veine liquide de l'homogénat..... 47

1) Matériel utilisé 47
2) Conditions techniques 47
3) Résultats 47

D) Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel..... 49

1) Matériel et technique utilisés..... 49
2) Découpage des blocs..... 49
3) Mesure de l'activité enzymatique de l'éluat..... 49
4) Mesure de la concentration en protéines de l'éluat 51
5) Résultats 51
a) Pour l'Asparaginase I..... 51
b) Pour l'Asparaginase II..... 53

E) Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel..... 55

1) Matériel et technique utilisés..... 55
2) Découpage et élution des bandes de cellogel..... 55
3) Résultats..... 56

F) Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide..... 56

1) Matériel et technique utilisés..... 56
2) Electrophorèse préparative de l'homogénat partiellement purifié sur la grosse colonne PD2/320..... 56
3) Résultats..... 58
4) Electrophorèse préparative des fractions 40 à 62 sur la moyenne colonne PD2/150. 58
5 Résultats..... 60

G) Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide..... 62

H) Ultracentrifugation préparative en gradient de sucrose..... 62

1) Matériel utilisé..... 62
2) Préparation du gradient du sucrose..... 62
3) Contrôle de la linéarité du gradient.... 63

4) Ultra-centrifugation..... 65
5) Résultats..... 65
6) Discussion des résultats obtenus.. 65
7) Applications. Vérifications du poids moléculaire de l'Enzyme I..... 69

Conclusion..... 69

CHAPITRE III.

Essais de localisation de ces deux activités enzymatiques dans la cellule hépatique..... 71

I - Fractionnement cellulaire de l'homogénat de foie de cobaye..... 72

A) Préparation de l'homogénat..... 72
B) Fractionnement cellulaire de l'homogénat.. 72
1) Résultats..... 73

C) Etude des structures particulaires et du cytosol..... 73
1) Résultats..... 77

D) Chromatographie par gel filtration sur Sephadex G 200 de l'homogénat total, du surnageant post-mitochondrial, post-lysosomal et du cytosol..... 77

1) Résultats..... 79

Conclusion 82

CHAPITRE IV

Essais de purification des deux activités asparaginasiques du foie de cobaye..... 83

I - Essais de purification des asparaginases I et II du foie de cobaye..... 84

A) Préparation d'une solution enrichie en asparaginase I..... 84

1) Séparation de l'Enzyme I..... 84
2) Les différentes étapes de la purification..... 85
3) Schéma détaillé des étapes..... 85
4) Contrôle visuel du degré de pureté des solutions obtenues après chaque étape par électrophorèse analytique sur bande de cellogel..... 86
5) Résultats de la purification..... 86
6). Conclusion 89

B) Préparation d'une solution enrichie en asparaginase II..... 89

1) Séparation de l'Enzyme II..... 89
2) Les différentes étapes de la purification..... 89
3) Schéma détaillé des étapes..... 90
4) Contrôle visuel du degré de pureté des solutions obtenues après chaque étape par électrophorèse analytique sur bande de cellogel..... 90
5) Résultats de la purification..... 91
6) Conclusion..... 91

C) Préparation d'une solution enrichie en asparaginase I et II..... 94

1) Matériel et Méthode..... 94
2) Résultats..... 94
3) Conclusion..... 96

CONCLUSION GENERALE..... 98
Résumé 102
Appendice technique..... 104

I - Dosage des protéines..... 104
II - Electrophorèse à pH 3,9 106
III - Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel..... 106

IV - Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel 109

V - Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide 110

BIBLIOGRAPHIE 114

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE