

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

50376
1976
65

DE LILLE

50376
1976
65

THESE

Pour l'obtention du Doctorat de 3^e Cycle

Mention Biochimie

Présentée et Soutenue Publiquement

Le 30 Juin 1976

Par

Nelly LEDEME

Maître en Biologie Humaine (Mention Biochimie)

Maître ès Sciences Physiques (Mention Chimie)

Assistante de Chimie Biologique

L-LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU PANCREAS DE COBAYE

Purification Partielle

Etude de quelques propriétés physico-chimiques

JURY : MMrs les Professeurs J. MONTREUIL Président

G. BISERTE

M. DAUTREVAUX

R. PLAQUET

J. KREMBEL



Travail du Laboratoire de Biochimie (Pr R. PLAQUET)

UER de Médecine d'AMIENS

et de l'Institut de Recherches sur le Cancer et

Unité INSERM n°124 (Pr G. BISERTE)

A mes parents,

Qu'ils trouvent ici un témoignage de ma reconnaissance
et de mon affection.

A toute ma famille,

A mes 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.

Vous nous avez fait l'honneur de présider notre Jury de Thèse.

Au cours de nos études nous avons apprécié votre enseignement clair et attrayant.

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse admiration.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur PLAQUET
Professeur de Chimie Biologique
à l'U.E.R. de Médecine d'AMIENS
Biologiste des Hôpitaux
Chef de Service
Chevalier des Palmes Académiques

Vous nous avez accueillie avec beaucoup de bienveillance
dans votre service et confié ce travail.

Avec patience, vous nous avez guidée et aidée de vos
conseils permettant de mener à bien la réalisation de
cette thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde
gratitude et de vous assurer de notre respectueux
dévouement.

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 National

Commandeur des Palmes Académiques.

Vous nous avez toujours accueillie avec beaucoup de bienveillance dans votre service.

Nous vous remercions des conseils que vous nous avez prodigués.

Nous avons bénéficié au cours de nos études de votre enseignement dont nous avons apprécié la valeur.

Soyez assuré de notre vive admiration et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Michel DAUTREVAUX
Professeur de Biochimie Structurale et Comparée
à l'U.E.R. de Médecine de LILLE
Officier des Palmes Académiques

Vous nous avez fait le grand honneur de bien vouloir
juger cette thèse et d'en être le Rapporteur, nous
sommes très sensible à cette marque d'intérêt.

Nous avons bénéficié de votre enseignement au cours
de nos études en Biologie Humaine.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre grati-
tude et notre profond respect.

A Monsieur Jean KREMBEL

Maître de Conférences

à l'Université des Sciences et Techniques de
LILLE I.

Vous nous faites le grand honneur d'accepter de
juger ce travail.

Soyez assuré de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur DESOEURBRUN,

Votre collaboration technique, votre patience et
votre serviabilité nous ont été très précieuses,
nous vous en remercions sincèrement.

A Madame POLLEUX,

Votre concours a permis la réalisation de cet
ouvrage. Soyez assurée de notre reconnaissance.

01.10.1975

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE
DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT,
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART
WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale

M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	GLACET Charles	Chimie Organique
M.	GONTIER Gérard	Mécanique
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEITOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale

M.	BOILET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
Mle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBENEST Jean	Sciences Economiques

M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme	EVARD Michéline	Chimie Appliquée
M.	FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie
M.	FROELICH Daniel	Chimie Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M.	NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale

M.	PARSY Fernand	Mécanique
M.	PECQUE Marcel	Chimie Physique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	STEEN Jean-Pierre	Informatique
M.	THERY Pierre	Electronique
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	TREANTON Jean-René	Sociologie
M.	VANDORRE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILLETTE Michel	Mécanique
M.	WALLART Francis	Chimie
M.	WERNIER Georges	Informatique
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

CHAPITRE I

LES LEUCINE AMINOPEPTIDASES

(REVUE GENERALE BIBLIOGRAPHIQUE)

C'est en 1929 que LINDERSTRØM-LANG montra que l'érepsine extraite de la muqueuse intestinale du porc contenait une enzyme qui hydrolysait la leucylglycine et la leucyldiglycine (1).

En 1936, cette leucylpeptidase était partiellement purifiée par JOHNSON (2) (3) qui montrait que l'enzyme était activée par les ions manganèse et magnésium.

Quelques années plus tard SMITH et BERGMAN (4) (5) reprenaient les travaux précédents, ils étudièrent la spécificité de cette enzyme qui depuis prit le nom de leucine aminopeptidase. (Classification Internationale E.C. 3.4.11.1). Les auteurs justifièrent cette appellation en montrant que les leucyl peptides étaient hydrolysés tandis que les substrats N acétylés étaient résistants à l'hydrolyse enzymatique.

Dès lors, de nombreux travaux ont été réalisés sur la leucine aminopeptidase, les principaux étant ceux de SMITH (6) et de PFLEIDERER (7) sur le rein de porc, de SANDERS (8) sur le muscle de porc et ceux de l'équipe allemande de HANSON (9) sur le cristallin de bovin.

Une enzyme identique ou similaire à la leucine aminopeptidase de rein de porc et de la muqueuse intestinale semble avoir une large distribution chez les végétaux (10) microorganismes (11) et les tissus animaux : le poumon (12), le cerveau (13), le thymus (14), le muscle cardiaque (15) le muscle squelettique (16) (17), le rein, le plasma (18) (19) (20) (21).

(10) BERGER, J. and JOHNSON, M.J... (11) BERGER, J. and JOHNSON, M.J., and PETERSON, W.H... (12) DANNEBERG, A.M. and SMITH, E.L... (13) TALLAN, H.H., JONES, M.E. and FRUTON, J.S... (14) WEISS, B... (15) (16) SMITH, E.L... (17) JOSEPH, R.L. and SANDERS, W.J... (18) FRUTON, J.S... (19) FLEISHER, G.A., M. PANKOW and C. WARMKA... (20) FLEISHER, G.A.; HUGH, R.-BUTT... (21) FELLICETTI, D. ; GRUNDIG, G.A. and HANSON H.

La localisation de l'aminopeptidase dans les cellules de certains de ces tissus a été étudiée (22) (23) (24) (25). Certaines préparations partiellement purifiées montrent des aminopeptidases similaires à la leucine aminopeptidase quant à la spécificité du substrat mais qui diffèrent dans leur comportement en ce qui concerne la nécessité d'un ion métallique (26) (27).

I - EXTRACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE.

Les premiers essais de purification ont été faits par fractionnement chimique d'extraits de muqueuse intestinale de porc (28). Nous décrirons dans ce paragraphe les techniques d'extraction utilisées par SMITH et SPACKMAN (29), sur le rein de porc, nous citerons celles de HANSON sur le cristallin de bovin (30), de SANDERS (31) sur le muscle de porc.

1° - PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC SELON SMITH ET SPACKMAN (32).

L'auteur part d'une poudre acétonique obtenue à partir d'un homogénat de rein de porc. Cette poudre, reprise par de l'eau, est soumise à différents traitements :

- Précipitations par le sulfate d'ammonium.
- Précipitation par le chlorure de magnésium.
- Fractionnement par l'acétone.

Une électrophorèse sur papier en tampon véronal pH 8,5 en présence de chlorure de magnésium achève cette purification.

- (22) ROBINSON, D.S. ; BIRNBAUM, S.M... (23) PFLEIDERER, G.; WASCHMITT, E.D...
(24) (27) EMMELOT, P. and VISSER, A... (25) E. PATTERSON, K.; SHU-HSI-HSIAO...
(26) FRUTON, J.S. ; IRVING, G.W.Jr... (28) SMITH, E.L. and BERGMAN, M...

Cette méthode a été reprise dans ces grandes lignes par BRYCE et RABIN (33) pour leurs études sur la cinétique enzymatique de l'enzyme de rein de porc. Les principales étapes se trouvent résumées dans le Tableau II.

2°) - R. JOSEPH et W.J. SANDERS (34) par précipitation au sulfate d'ammonium, traitement par la chaleur et filtration sur gel de Sephadex G 100 ont obtenu à partir du muscle de porc une leucine aminopeptidase purifiée 110 fois. Les différentes étapes de l'enrichissement de la solution enzymatique sont résumées Tableau II.

3°) - PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE CRISTALLIN DE BOVIN SELON HANSON (35).

Par combinaison d'un traitement "zinc chaleur", HANSON a obtenu une solution enzymatique purifiée 100 fois susceptible de fournir par précipitation au sulfate d'ammonium des cristaux de leucine aminopeptidase, le stade final du processus de purification se faisant avec un rendement de 68 p. 100, comme l'indique le Tableau III.

TABLEAU I

Etape de Purification	Protéines totales mg	Unités	Rendement %
Extrait brut (à partir de 2400 g de rein)	293	2450	100
1) Poudre acétonique	45,3	1200	69
2) 1ère précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	11,6	1900	78
3) 2ème précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	4,17	1500	61
4) Précipitation avec MgCl_2	2,64	1430	58
5) Chaleur	1,32	1120	46
6) Fractionnement par acétone	0,105	720	29
7) Electrophorèse	0,023	320	14

EXTRAIT DE L'ARTICLE DE E. SMITH ET S. SPACKMAN SUR LA PURIFICATION
DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC (36).



TABLEAU II

Etapes	Protéines mg	Activité totale	Activité spécifique	Rendement %
1. Homogénat	47 500	3800	0,08	100
2. Précipitation par SO ₄ (NH ₄) ₂	25 800	4100	0,20	110
3. Traitement par la chaleur	820	1900	2,3	47
4. Colonne de Sephadex G 100	140	1330	9,2	33

EXTRACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE MUSCLE SQUELETTIQUE
DE PORC D'APRES R. JOSEPH et W.J. SANDERS (37)

TABLEAU III

Fraction	ml	Azote total	% de substrat hydrolysé en 20'	Purification	Rendement %
Homogénat brut	150	802,5	7,42	1	100
Traitement Zinc-Chaleur	122	7,93	8,61	96	95
Enzyme cristallisée	7,25	0,497	8,11	1172	68

PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU CRISTALLIN DE BOVIN
SELON HANSON (38).



II - DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

La détermination de l'activité enzymatique des différentes préparations de leucine aminopeptidase est effectuée sur des solutions de chlorhydrate de L-leucine amide ou sur des solutions de L-leucyl peptides (L-leucyl glycine, L-leucylglycyl glycine, L-leucyl valine, L-leucyl alanine).

L'hydrolyse du substrat est suivie différemment selon les auteurs : par titration avec de la potasse alcoolique d'après GRASSMAN et HEYDE (39) pour SMITH, par chromatographie sur papier pour HANSON (40) et au pH stat. pour RABIN et BRYCE (41) et JOSEPH et SANDERS (42). Certains chercheurs avaient suggéré l'emploi de substrats chromogènes comme la L-leucyl β naphthylamide ou la L-leucyl para nitro anilide, il est actuellement démontré que ces substrats sont faiblement hydrolysés par la leucine aminopeptidase (E.C.3:4:11:1) (43), les arylamidases (E.C. 3:4:11:2) ayant seules une activité appréciable sur ces chromogènes.

La séparation et la distinction de ces deux enzymes ont été effectuées, entre autres, sur des cellules tumorales d'ascite (44) et sur le duodénum humain (45).

WASCHSMITH et PFLEIDERER (46) ont isolé la fraction microsomale d'un homogénat de rein de porc, l'isolement s'effectue par une précipitation

(43) HILL, R.L. and SMITH, E.L... (44) E. PATTERSON, K. ; SHU-HSI-HSIAO...

(45) BEHAL, J.F. and GWYNNE, H.L...

à pH 5, suivie d'un traitement à la trypsine et au sulfate d'ammonium. L'enzyme ainsi obtenue est plus active sur les glycine, alanine et leucine p-nitro anilides que sur la leucine amide. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une relation entre l'aminopeptidase microsomale, à activité arylamidase prédominante, et la leucine aminopeptidase classique cytoplasmique (E.C. 3:4:11:1) (substrat spécifique L-leucine amide). Ils supposent que les deux activités appartiennent à une même protéine enzymatique. L'activité arylamidase engagée dans les microsomes, doit correspondre à la forme primitive native de la molécule, qui, après dénaturation partielle se transforme en enzyme cytoplasmique. Cependant, HANSON et ses collaborateurs ont noté des différences immunologiques et électrophorétiques pour les aminopeptidases microsomales et cytoplasmiques (47).

III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

Quelque soit leur origine (rein, muscle, cristallin de bovin) trois caractères principaux sont communs aux leucine aminopeptidases : leur spécificité vis-à-vis des substrats L-leucine amide et L-leucyl-peptides dont nous avons parlé précédemment, leur poids moléculaire élevé, et leur comportement vis-à-vis des cations métalliques.

1°/ - Le poids moléculaire.

Déterminé par ultracentrifugation par SMITH et SPACKMAN (48), par gel filtration sur Sephadex G 200 ou G 100 par PFLEIDERER et SANDERS (49) (50) le poids moléculaire attribué à la leucine aminopeptidase est de l'ordre de 300 000. Cette valeur est élevée comparée aux poids moléculaires des autres enzymes protéolytiques : trypsine et chymotrypsine 25 000, pepsine 35 000, carboxypeptidase 34 000 ...

Ce haut poids moléculaire laisse entrevoir la possibilité d'une constitution de l'enzyme en sous-unités. Certains auteurs ont étudié la structure quaternaire. KRETSCHMER et HANSON (51) utilisant une variété de techniques comprenant la chromatographie sur gel en présence de dodécyl sulfate de sodium, ont conclu que la molécule de l'enzyme du cristallin de bovin était constituée de 10 sous-unités d'un poids moléculaire de 32 600. D'autre part, MELIUS et MOSELEY (52) ont traité l'enzyme de rein de porc avec de la guanidine 6 M, les sous-unités obtenues par ultracentrifugation avaient un poids moléculaire de 63 500.

2°/ COMPORTEMENT DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE VIS-A-VIS DES IONS METALLIQUES.

De tous les travaux effectués jusqu'à présent sur les leucine aminopeptidases, il ressort que l'activité de l'enzyme est intimement liée à la présence d'ions bivalents Mg^{2+} et Mn^{2+} . SMITH et SPACKMAN (53) ont étudié en détail l'action de ces ions sur des préparations de leucine aminopeptidase hautement purifiées.

Les auteurs ont tout d'abord déterminé les conditions optimales de concentrations et de temps de pré-incubation de l'enzyme en présence des solutions ioniques. Comme le montrent les figures n° 1 et 2, les meilleurs résultats sont obtenus après 8 à 15 minutes de pré-incubation, à 40° C, de l'enzyme en présence de $MnCl_2$ 0,001 M ou de $MgCl_2$ 0,004 M.

Une exploration du pH optimum d'action de l'enzyme purifiée en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} a donné le profil suivant :

- en présence d'ions Mg^{2+} l'optimum d'action se situe vers pH 9,5 avec un épaulement en zone neutre.

- en présence d'ions Mn^{2+} il y a un léger décalage de l'optimum d'action aux environs de pH 9.

Les résultats sont traduits par les figures n° 3 et n° 4 .

Ces courbes, en fonction du pH du milieu et en milieu ioniques, obtenues par SMITH (54) pour le rein de porc, sont à rapprocher de celles de HANSON (55) tracées à partir du cristallin de bovin sur un homogénat brut et sur de l'enzyme cristallisée.

Pour l'homogénat brut de cristallin, les ions Mn^{2+} abaissent davantage le pH optimum (pH 8,9) que les ions Mg^{2+} (pH 9,7).

Cet effet des ions Mn^{2+} sur le pH optimum d'action est plus marqué avec de l'enzyme cristallisée comme l'indique le tracé expérimental, figure n° 5 .

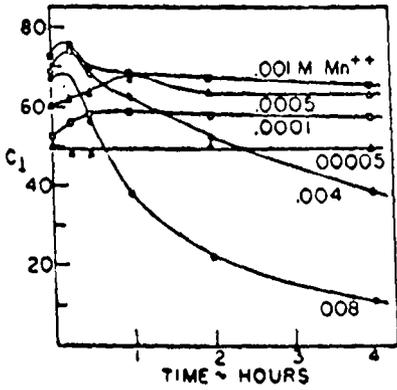


Fig. n° 1

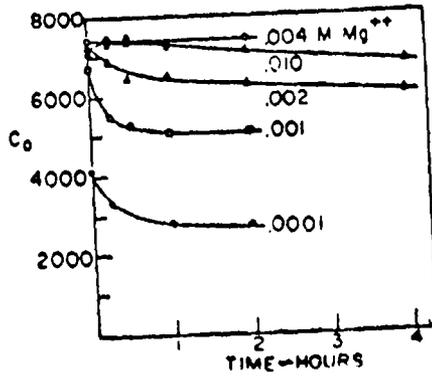


Fig. n° 2

ACTIVATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN CATIONS BIVALENTS Mn^{2+} et Mg^{2+} SELON SMITH (56).

L'activité enzymatique est donnée par les coefficients protéolytiques C_1 et C_0 définis à partir d'une cinétique d'hydrolyse du substrat L-leucine amide à la concentration de 0,05 M.

$C = K/E$ où :

K = constante d'hydrolyse en logarithme décimal

E = taux de protéines exprimé en mg d'azote protéique par ml de solution.



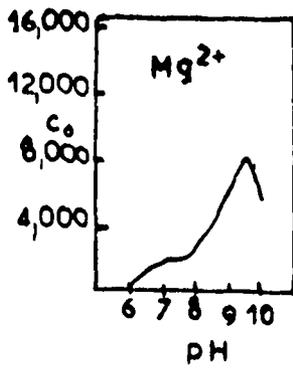


Fig. n° 3

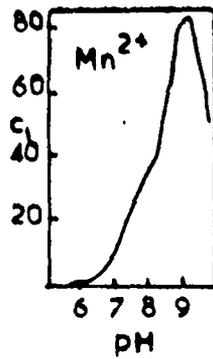


Fig. n° 4

ETUDE DU pH OPTIMUM D'ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC EN PRESENCE DE CATIONS BIVALENTS SELON SMITH ET SPACKMAN (57).

Les solutions enzymatiques sont pré-incubées 15 minutes à 40° C avec des solutions 0,004 M de Mg^{2+} et 0,001 M de Mn^{2+} .



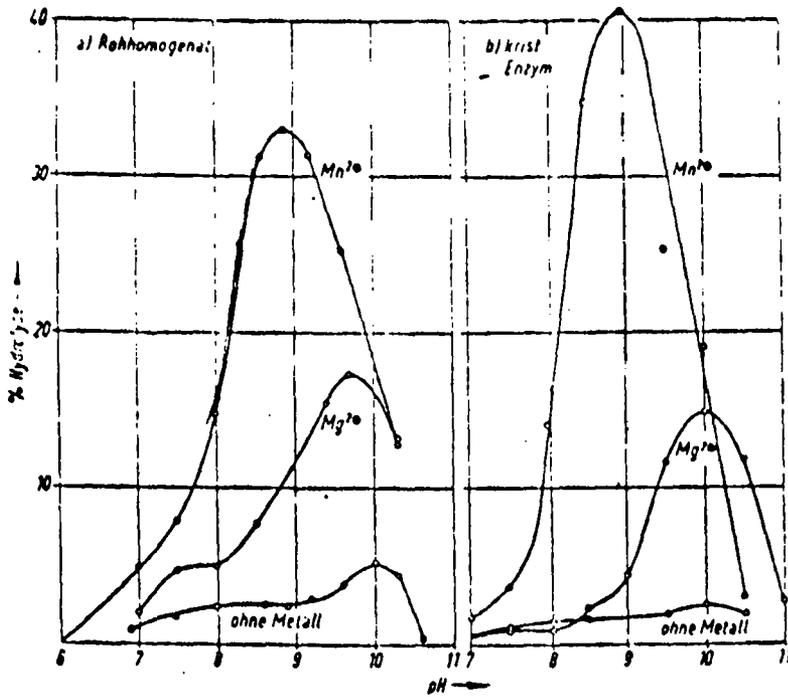


Fig. n° 5

ETUDE DU pH OPTIMUM D'ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE CRISTALLIN DE BOVIN EN PRESENCE D'IONS Mn^{2+} ET Mg^{2+} D'APRES HANSON (58).

a) sur un homogénat

b) sur de l'enzyme cristallisée

- L'homogénat est mis à pré-incuber 15 minutes à $37^{\circ} C$ en présence de solution 2 mM de Mn^{2+} et de solution 5 mM de Mg^{2+} .

- L'enzyme cristallisée est activée 20 minutes à $40^{\circ} C$ en présence de solution millimolaire en Mn^{2+} et Mg^{2+} .



CONCLUSION :

Les leucine aminopeptidases apparaissent comme des métallo-enzymes activées par les cations bivalents Mg^{2+} et Mn^{2+} , de pH optimum alcalin et de poids moléculaire élevé.

Les travaux décrits dans la littérature concernent notamment le cristallin de bovin, le rein et le muscle de porc, le foie de rat. Jusqu'à présent, les organes du cobaye et particulièrement le pancréas n'ont donné lieu à aucune étude connue.

Pour aborder ce problème, nous avons mis au point une technique de dosage de l'enzyme. Pour les étapes de purification nous avons utilisé différentes techniques.

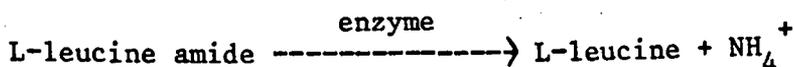
Certaines de ces techniques sont classiques et sont consignées dans l'appendice technique, d'autres ont nécessité des mises au point personnelles et sont décrites dans les chapitres suivants.

CHAPITRE II

METHODES PERSONNELLES DE DOSAGE

I - MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les leucine aminopeptidases étaient actives sur les substrats L-leucine amide et L-leucyl-peptides. L'hydrolyse des L-leucyl-peptides faisant appel à la technique de chromatographie sur papier, relativement longue, nous avons choisi d'étudier l'activité enzymatique des préparations de pancréas de cobaye sur une solution boratée de L-leucine amide. Ce substrat a été utilisé par SMITH (59) et SANDERS (60) pour les dosages de routine de la leucine aminopeptidase de rein et de muscle squelettique de porc. Au cours de la réaction de l'ammoniaque est libérée tandis que la L-leucine se forme.



L'ammoniaque est dosée par une méthode colorimétrique utilisant la réaction de BERTHELOT adaptée à l'Auto Analyseur Technicon par GIRARD (61) et modifiée par GENTIT (62). Les réactifs utilisés figurent dans l'appendice technique page 120. Le schéma de montage est donné page 19. (Fig. n° 6).

1°) - PREPARATION DE LA SOLUTION SUBSTRAT.

La concentration optimale en substrat nécessaire à la réaction enzymatique a été établie en fonction de deux facteurs.

a) Les solutions de L-leucine amide dans le borate de sodium donnent une réponse positive avec la réaction de BERTHELOT. Pour différentes concentrations en substrat essayées, l'hydrolyse "instantanée" de la L-leucine amide a donné les valeurs suivantes (ces valeurs étant exprimées en densité optique).

Solution de L-leucine amide en $\mu\text{M}/\text{ml}$	Densité Optique
60	0,5
30	0,3
15	0,17
10	0,12
7,5	0,09
5	0,07
3,7	0,05
2,5	0,04

Il est donc nécessaire de retrancher un témoin substrat pour chaque dosage effectué.

b) La valeur de la concentration en substrat doit se trouver dans la partie ascendante de la courbe étudiant l'activité enzymatique en fonction du taux de L-leucine amide présent dans le milieu réactionnel. Comme l'indique la figure n° 7, la valeur de $10\mu\text{M}/\text{ml}$ a été retenue, elle se situe dans la portion de droite du tracé expérimental juste avant le palier. De plus, l'hydrolyse "instantanée" d'une solution à $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de L-leucine amide produit au cours de la réaction de BERTHELOT une coloration dont la densité optique ne dépasse pas une valeur incompatible avec la sensibilité des dosages.

Compte-tenu de ces deux remarques, la solution substrat a été réalisée comme suit :

- 1,66 mg de chlorhydrate de L-leucine amide "leucine free" (Mann Research Inc.) pour 1 ml de tampon borate de sodium 0,01 M (borate de sodium $10\text{H}_2\text{O}$) soit une concentration de $10\mu\text{M}/\text{ml}$. La solution tampon borate-substrat a un pH de 8,8 et est préparée extemporanément.

2°/ - DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Le mode opératoire est indiqué dans le tableau ci-dessous :

Incubation à 37° C	H ₂ O	Substrat	Enzyme	Tampon borate
T _o = Témoin enzyme			0,1 ml	1 ml
T _s = Témoin substrat	0,1 ml	1 ml		
T = Dosage		1 ml	0,1 ml	

Activité enzymatique : $T - (T_o + T_s)$

3°/ - EXPRESSION DES RESULTATS.

Un étalonnage est effectué avant chaque série de dosages à l'aide d'une gamme étalon d'ions ammonium. Cette gamme est établie comme suit :

- Solution mère d'ions ammonium à 100 μ g d'ions NH₄⁺/ml.

Sulfate neutre d'ammonium pur et sec (R.P.)	0,3667 g
Acide sulfurique N/1	20 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

- Dilutions pour 100 ml :

Solutions mère ml	0,18	0,45	0,90	2,25	4,50	9	18
μ mole NH ₄ ⁺ /ml	0,010	0,025	0,05	0,125	0,25	0,5	1



Les densités optiques enregistrées lors des manipulations seront reportées sur une courbe d'étalonnage : densité optique en fonction des μM d'ions NH_4^+ /ml. (Figure n° 8).

L'activité enzymatique est exprimée en Unités Internationales correspondant au nombre de micromoles d'ions ammonium libérées par action de 1 ml de solution enzymatique sur le substrat L-leucine amide pendant 1 minute à 37° C, et à pH 8,8.

$$\frac{\mu\text{MNH}_4^+/\text{ml d'enzyme} / \text{minute d'incubation à } 37^\circ \text{ C à pH } 8,8}$$

4°/ - CONTROLE DE L'HYDROLYSE DU SUBSTRAT.

La production de leucine lors de la mise en incubation d'une solution de substrat L-leucine amide et de l'extrait enzymatique a été vérifiée par électrophorèse sur papier à pH 3,9 dont les conditions sont indiquées dans l'appendice technique, page 125.

Pour ce contrôle, nous avons utilisé une préparation enzymatique de pancréas obtenue après purification partielle sur colonne de DEAE-Cellulose et incubée en présence de substrat L-leucine amide à 10 μM /ml pendant 3 heures.

On peut constater qu'au cours de l'incubation la plus grande partie de la leucine amide est bien transformée en leucine. (Figure n° 9).

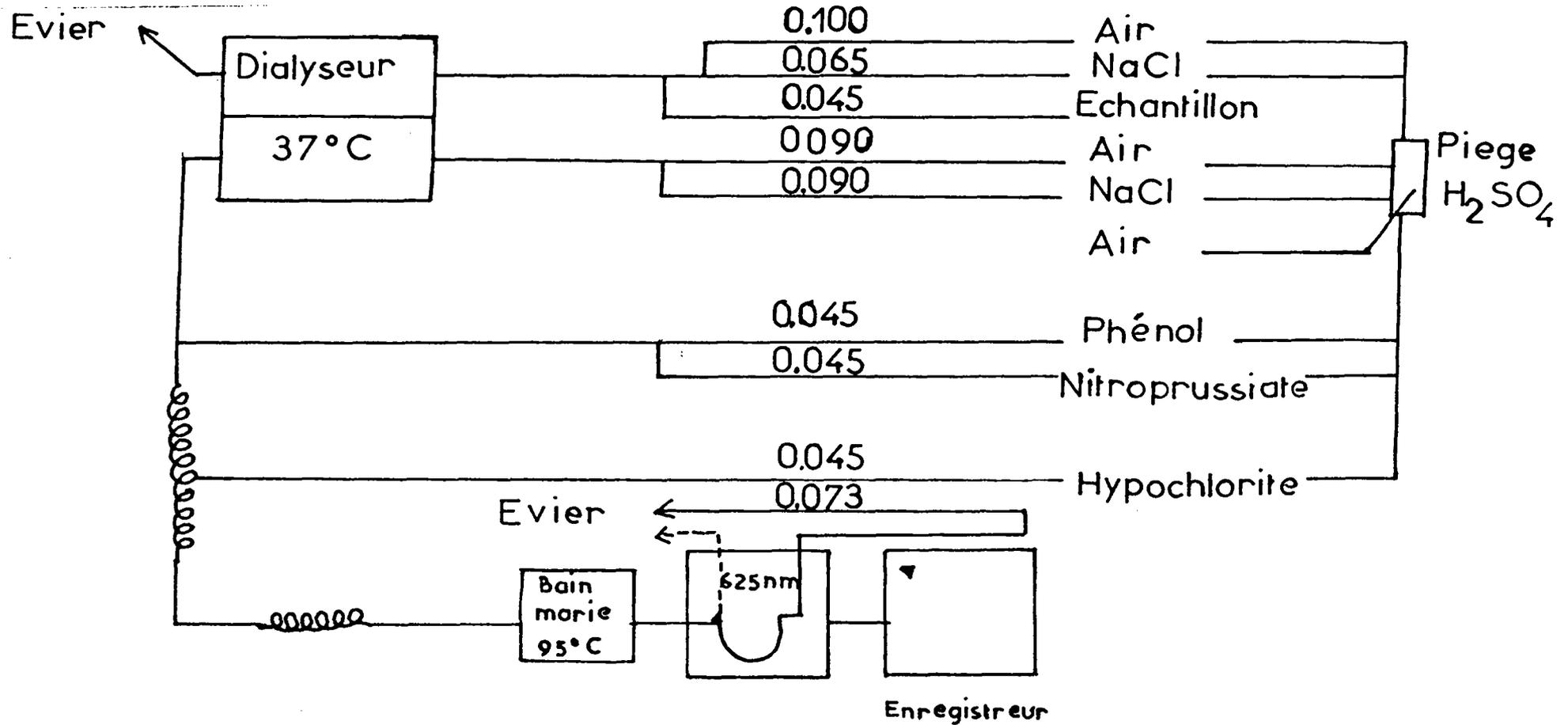


FIG. 6 : SCHEMA DU MANIFOLD TECHNICON pour le dosage colorimétrique de l'ammoniaque d'après la réaction de BERTHELOT au phénol-hypochlorite de sodium. (Le diamètre des tubes de pompe est exprimé en pouces).



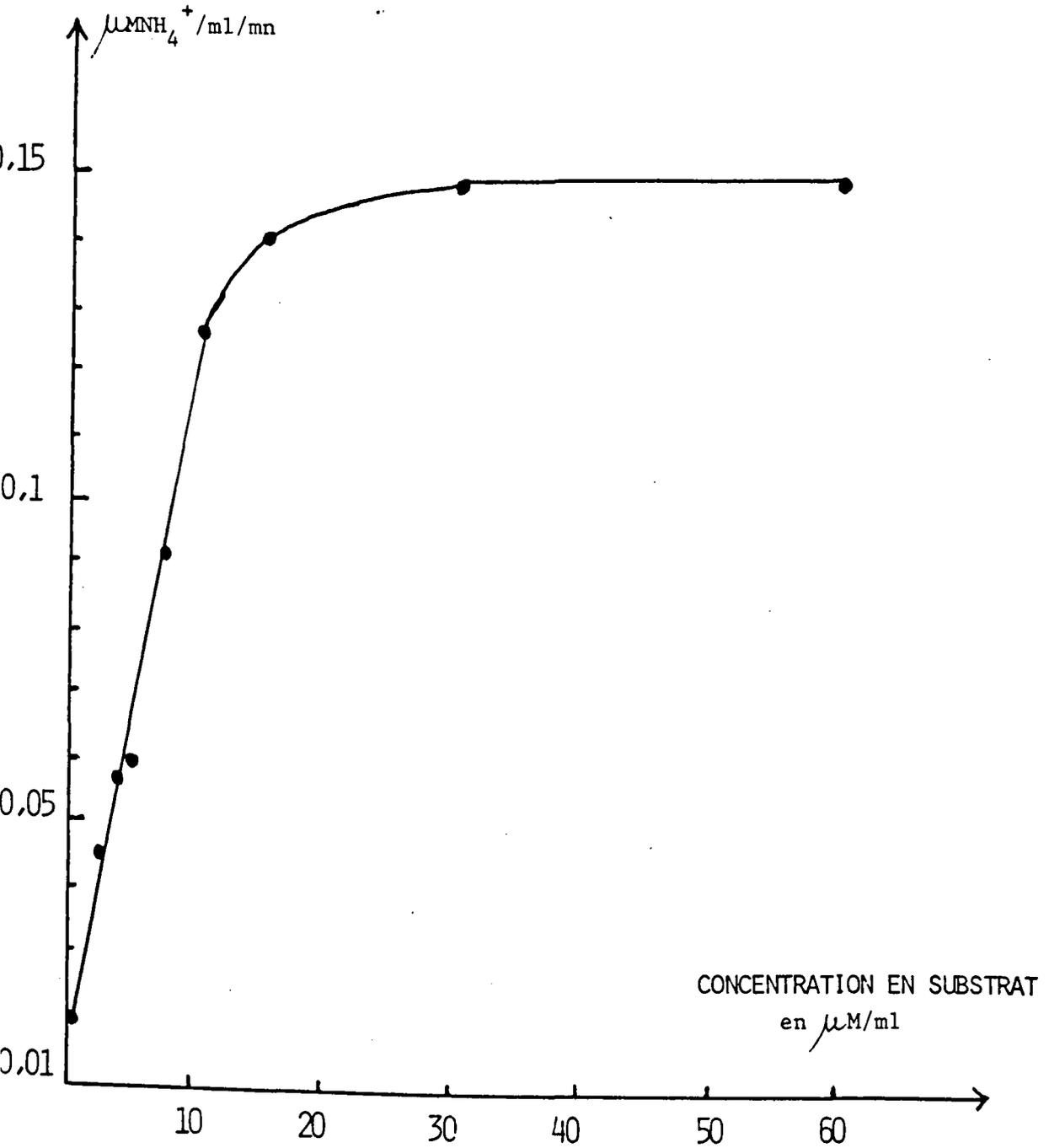


FIG. 7 : ETUDE DE LA VARIATION DE LA VITESSE DE LA REACTION ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

La réaction enzymatique est développée pendant 30 minutes à 37° C.



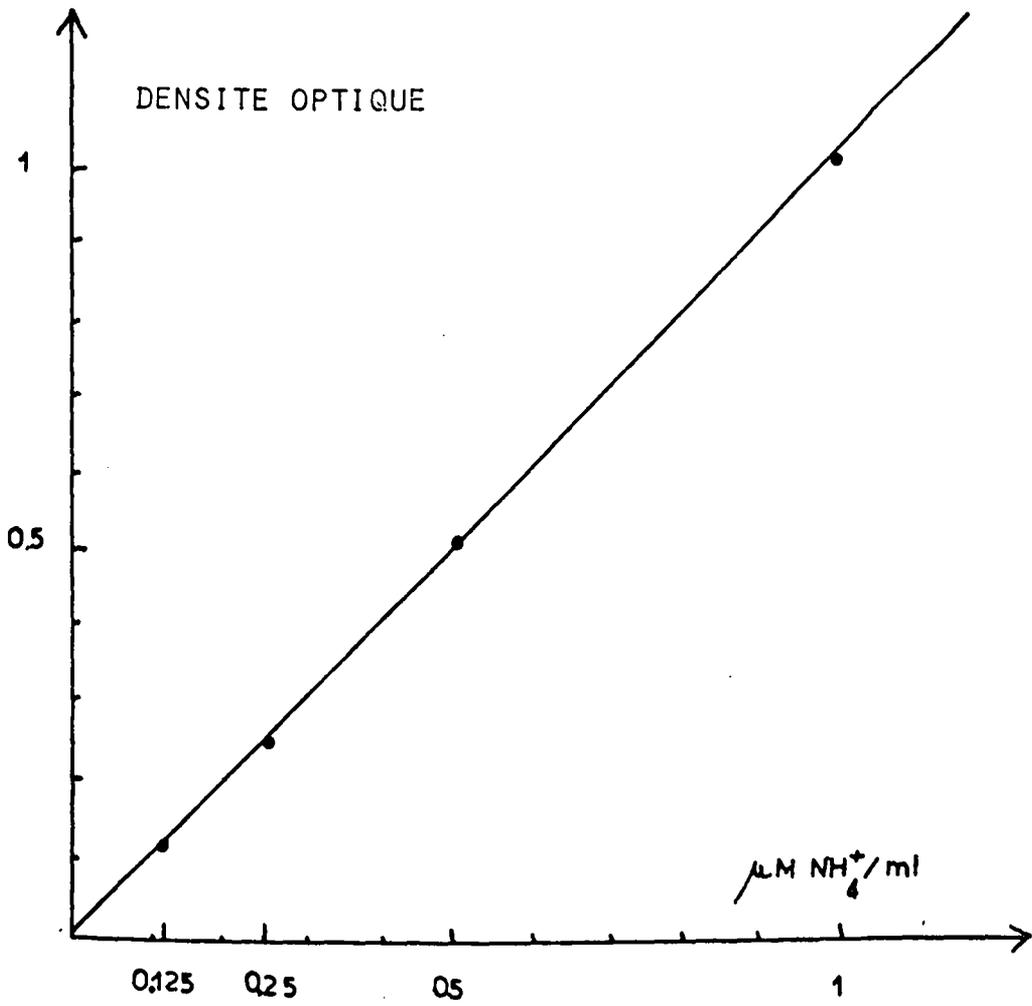
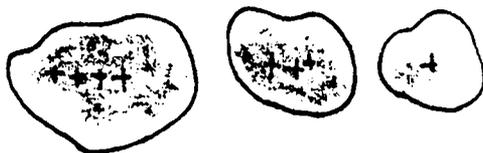


FIG. 8 : Courbe d'étalonnage d'ions NH_4^+ obtenue en portant sur l'axe des ordonnées la densité optique des étalons et sur l'axe des abscisses la concentration en ions NH_4^+ .

Leucinamide.



Leucine

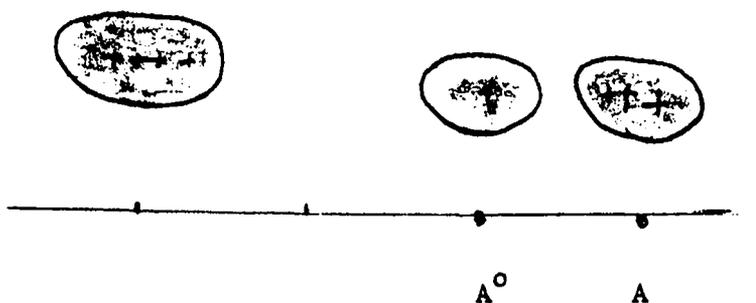


FIG. 9 : ELECTROPHORESE SUR PAPIER A pH 3,9 - Tampon pyridine/acide acétique/eau selon la technique de BISERTE et coll. (63).

A = dépôt de $50 \mu\text{l}$ d'un mélange enzyme-substrat* après incubation de 3 heures à 37°C .

A° = dépôt de $50 \mu\text{l}$ d'un mélange enzyme-substrat*, identique au précédent, sans incubation préalable.

*Le mélange enzyme-substrat se compose de la façon suivante : 0,5 ml d'une solution de L-leucine amide à $10 \mu\text{M/ml}$ et 0,1 ml d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.



II - MESURE DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE.

1) Dosage de l'azote protéique.

Le dosage de l'azote protéique a été réalisé selon la méthode de LOWRY (64) adaptée à l'auto-analyseur Technicon. Le schéma du montage et les réactifs utilisés sont consignés dans l'appendice technique, pages 122, 123, 124. La coloration bleue, donnée par les protéines dosées au réactif de FOLIN-CIOCALTEU, a été étalonnée à l'aide d'une solution commercialisée titrée en protéines (LAB-TROL)* à partir de laquelle nous avons effectué des solutions témoins à différentes concentrations allant de 0,05 à 1,2 mg de protéines par millilitre (Figure n° 10).

Le taux de l'azote protéique contenu dans les solutions enzymatiques est traduit en mg d'azote protéique par millilitre, par référence à la courbe d'étalonnage.

2) Résultats

L'activité spécifique est égale au rapport de l'activité enzymatique, exprimée en Unités Internationales, et du taux d'azote protéique. Dans les conditions expérimentales, elle sera exprimée en :

$\mu\text{M d'ions NH}_4^+ / \text{mg de Protéines} / \text{minute d'incubation à } 37^\circ \text{ C à pH } 8,8$

* DADE Division American Hospital Supply Corporation. MIAMI.

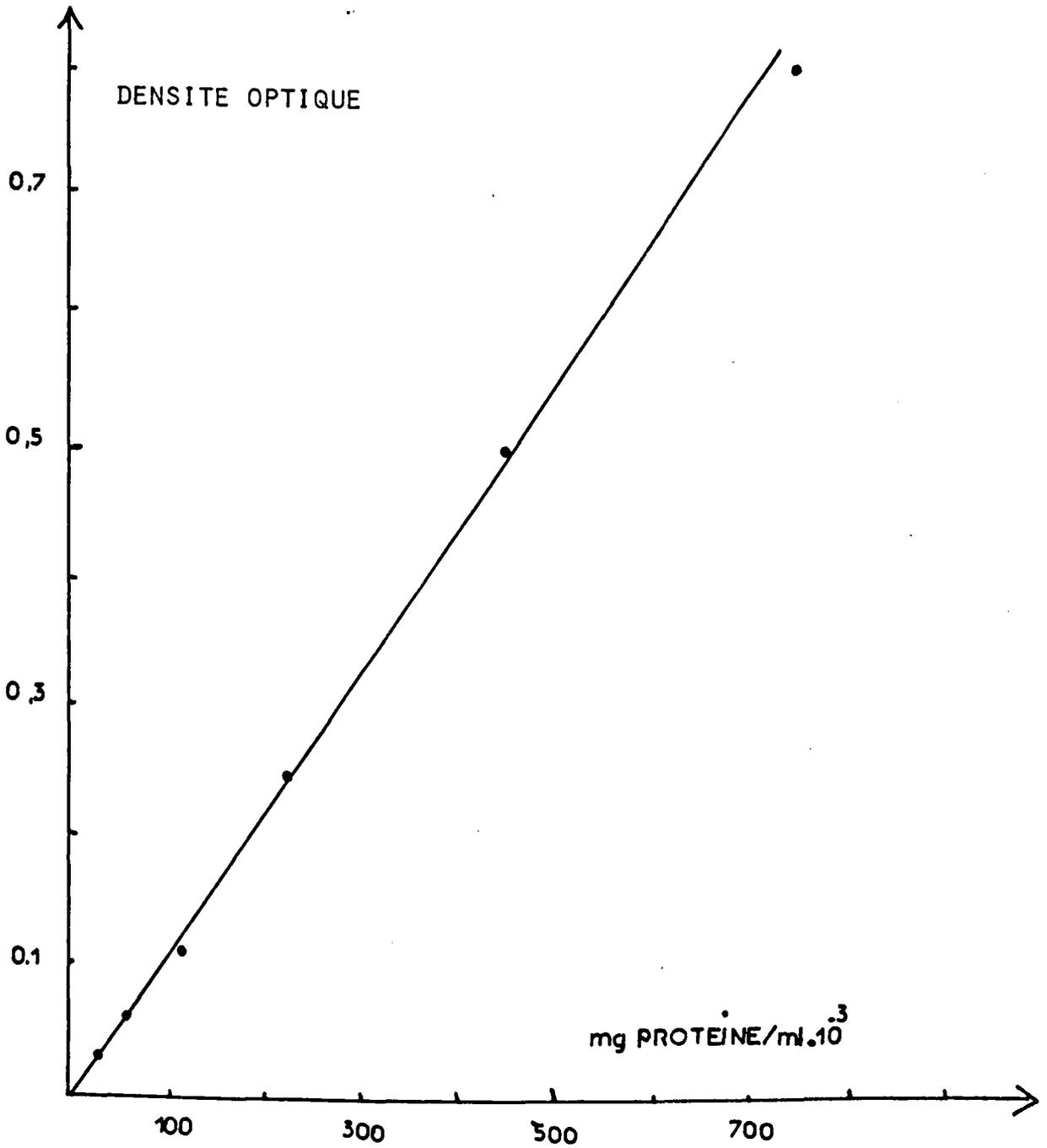


FIG. 10 : Courbe d'étalonnage par la méthode de LOWRY automatisée obtenue à partir d'une solution commerciale standardisée de protéines (LAB-TROL...)



CHAPITRE III

METHODES PERSONNELLES DE PURIFICATION

I - PREPARATION DE L'HOMOGENAT.

1°/ - PRELEVEMENT DU PANCREAS.

Les cobayes tricolores, mâles ou femelles de 300 à 350 g sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'une solution de carbamate d'éthyle à raison de 1 ml pour 100 grammes de poids. La solution de carbamate est préparée immédiatement avant l'usage dans du sérum physiologique (1 g de carbamate d'éthyle pour 10 ml).

Pour débarrasser les organes d'éventuels contaminants d'origine sanguine, on procède à une exsanguination par ponction carotidienne. Afin de compenser une hypovolémie trop rapidement mortelle, du sérum physiologique hépariné est injecté par intermittences dans l'une ou l'autre des carotides.

Le pancréas est prélevé aussitôt après la mort de l'animal, il est lavé par immersion dans une solution de chlorure de sodium isotonique.

Le tissu est, soit utilisé immédiatement, soit conservé au congélateur à - 20° C plusieurs semaines sans pour cela nuire à l'activité enzymatique.

Dans ce travail, aucune distinction de sexe n'a été faite, nous avons cependant noté que les cobayes non adultes fournissaient un matériel enzymatique peu actif.

2°/ - BROYAGE DU TISSU.

Les pancréas d'un poids moyen de 1,5 à 2 g sont d'abord débarrassés des tissus adipeux attenants.

L'homogénat est obtenu par un broyage d'une ou deux minutes à l'Ultra-Turrax dans du sérum physiologique. Le refroidissement est assuré par un mélange eau-glace.

II - ETUDE DU PH DE SOLUBILISATION DE L'ENZYME.

Pour ces essais, l'homogénat préparé comme il a été décrit dans le paragraphe précédent est amené à un volume de 50 ml par addition d'une solution de NaCl à 9 grammes pour 1000 ml, puis réparti dans des fioles d'Erlenmeyer. Chaque fraction est amenée à un pH déterminé avec :

- de la soude N/1 et N/10
- de l'acide chlorhydrique N/1 et N/10

Les additions sont faites sous agitation magnétique douce.

Les solutions sont ensuite centrifugées à 17 000 tours/minute pendant 15 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 4° C (Centrifugeuse BECKMAN J 21). Les surnageants sont prélevés, les culots repris dans un volume de sérum physiologique identique à celui des surnageants respectifs.

Nous déterminons pour chaque valeur de pH les activités spécifiques des surnageants et des culots de centrifugation.

Les résultats sont consignés dans le Tableau IV et représentés graphiquement par la courbe n° 11, en ce qui concerne les surnageants, l'examen du tableau et de la courbe indique des variations assez importantes. Ces irrégularités ayant été observées plusieurs fois au cours d'expériences successives nous nous demandons s'il faut les attribuer à la technique utilisée ou à l'interférence d'autres enzymes car nous travaillons ici sur un homogénat brut ; nous pouvons aussi supposer l'existence de différentes formes de l'enzyme hydrolysant la L-leucine amide.

Nous remarquons que l'activité enzymatique totale (activité du surnageant plus l'activité du culot) est très diminuée en milieu acide, proche

de l'homogénat brut entre pH 7,3 et 7,6 et supérieure à l'homogénat entre 7,9 et 9,7.

Pour les stades ultérieurs de la purification, nous avons retenu la valeur de pH 7,9 qui donne la meilleure activité spécifique pour le surnageant. Le facteur d'enrichissement de l'activité spécifique à ce pH est de 2,8 par rapport à l'homogénat.

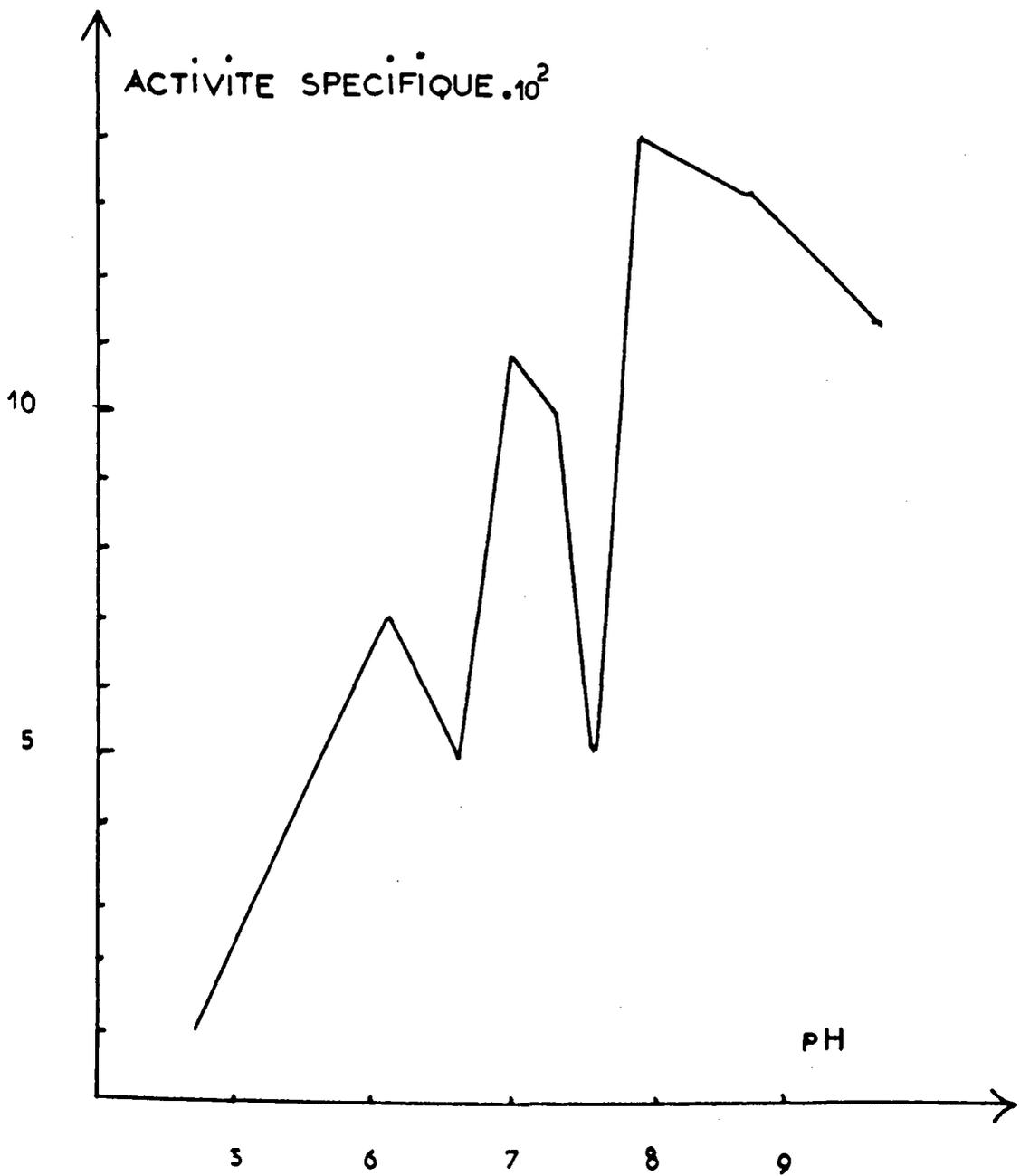


FIG. 11 : ACTIVITE SPECIFIQUE DES SURNAGEANTS D'HOMOGENAT DE PANCREAS DE COBAYE AMENE A DIFFERENTES VALEURS DE pH.



Tableau IV

		Activité $\mu\text{M NH}_4^+$ /ml/mm	Teneur en protéines mg/ml	Activité Spécifique μMNH_4^+ /mg prot/mn	Activité relative spécifique des surnageants
homogénat filtré		0,250	3,20	0,050	100
7,7	S	0,010	0,80	0,009	18
	C	0,015	1,20	0,008	
7,2	S	0,040	0,80	0,030	60
	C	0,070	1,60	0,032	
7,1	S	0,125	1,20	0,070	140
	C	0,010	0,70	0,010	
7,9	S	0,275	1,80	0,110	220
	C	0,010	0,40	0,018	
7,3	S	0,275	2,00	0,100	200
	C	0,010	0,40	0,018	
7,6	S	0,260	1,80	0,050	100
	C	0	0,20	0	
7,9	S	0,330	2	0,140	280
	C	0,010	0,20	0,036	
8,2	S	0,315	2,20	0,094	188
	C	0,010	0,20	0,036	
8,7	S	0,350	2,20	0,130	260
	C	0,010	0,20	0,036	
9,7	S	0,300	2,00	0,110	220
	C	0,010	0,20	0,036	

Surnageant
Culot



- ETUDE DU pH DE SOLUBILISATION DE L'ENZYME.

L'homogénat de pancréas est amené à différentes valeurs de pH, puis centrifugé. L'activité spécifique est déterminée sur chaque surnageant et sur chaque culot.

III - LOCALISATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU PANCREAS DE COBAYE DANS LA CELLULE.

Nous avons broyé un pancréas, prélevé immédiatement après la mort, dans une solution de saccharose 0,25 M, à l'aide d'un broyeur de POTTER-ELVEHJEM. L'homogénat a été mis à centrifuger pendant 1 heure à 105 000 g à + 4° C (Ultracentrifugeuse BECKMAN SPINCO L₃/50 - rotor Ti SW 41).

Le culot de centrifugation, broyé à l'Ultra-Turrax, est amené à un volume égal à celui du surnageant par addition de saccharose 0,25 M puis centrifugé 15 minutes à 17 000 tours/minute à 4° C.

Le dosage de l'activité enzymatique des deux surnageants de centrifugation a permis de localiser la quasi totalité de cette activité dans le surnageant de 105 000 g.

Cette localisation dans le surnageant de 105 000 g a été relatée dans la littérature pour la leucine aminopeptidase de cellules tumorales d'ascite (65), du cristallin de bovin et du rein de porc (66). Une localisation dans les membranes plasmatiques a été décrite pour le foie de rat (67).

(65) PATTERSON, E... (66) HANSON H., GLÄSSER D... (67) EMMELOT P. and VISSER A.

IV - ESSAIS DE PRECIPITATION PAR LES SELS NEUTRES.

Nous avons rejeté l'emploi de sulfate d'ammonium préconisé par SMITH (68) et SANDERS (69), pour éviter toute interférence dans la mesure de l'activité enzymatique déterminée par dosage de l'ammoniaque libérée à partir du substrat L-leucine amide : il aurait été nécessaire, en effet, de procéder à des opérations de dialyse prolongées, néfastes au métal-enzyme qu'est la leucine aminopeptidase.

Nous avons tenté d'appliquer la méthode de HANSON (70) en employant le sulfate de zinc suivi d'un traitement par la chaleur. Après essai de différentes concentrations aqueuses de sulfate de zinc, nous avons retenu la solution M/1000, ajoutée à l'homogénat de pancréas sous agitation magnétique douce, à température ambiante. La concentration finale en ions Zn^{2+} est de 0,25 mM. Le pH est maintenu entre 7,2 et 7,4 sur un premier échantillon et entre 7,8 et 7,9 sur un deuxième échantillon. Les activités spécifiques calculées sur les surnageants et les culots sont indiquées dans le Tableau V.

On remarque qu'à pH 7,8 le traitement n'améliore pas l'activité spécifique de l'extrait pancréatique. Par contre à pH 7,2 - 7,4, 50 p. 100 environ des protéines sont précipitées et l'activité spécifique du surnageant est incontestablement augmentée.

Nous avons également tenté de procéder à un relargage par le sulfate de sodium selon une technique proposée par SULD et HERBUT (71). Le sulfate anhydre est ajouté à l'homogénat à raison de 0,3 mg/ml. Les activités spécifiques des surnageants et des culots ont toujours été inférieures aux produits de départ.

TABLEAU V

Produit	μMNH_4^+ /ml	mg prot/ml	Activité Spécifique
Homogénat	0,35	4,2	0,056
I	S	2,2	0,079
	C	2,2	0,0056
II	S	2,6	0,056
	C	1,6	0,009

ESSAI DE PURIFICATION DES EXTRAITS PANCREATIQUES PAR TRAITEMENT AU SULFATE DE ZINC 0,25mM, d'après HANSON (72).

I = pH maintenu entre 7,2 et 7,4
II = pH maintenu entre 7,8 et 7,9

S = Surnageant
C = Culot



CONCLUSION SUR L'ACTION DES SELS MINERAUX SUR L'HOMOGENAT

PANCREATIQUE.

L'emploi de sulfate de sodium se montre impropre à l'enrichissement de la solution enzymatique. Les sels de zinc peuvent entraîner une perte de l'activité sauf à la concentration finale de 0,25 mM. Mais nous n'avons pas jugé les résultats suffisamment satisfaisants pour retenir ces procédés dans les différentes étapes de la purification.

V - ESSAIS DE PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CELLULOSE A ECHANGE D'IONS.

Nous avons utilisé de la DEAE-"Pré-Swollen" DE 52 Whatman. La résine est équilibrée à pH 7,9 par un tampon phosphate M/45.

La préparation et la mise en place du matériel chromatographique sont décrites dans l'appendice, page 126.

4 à 5 g de pancréas sont homogénéisés, amenés à pH 7,9, comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe précédent. Le surnageant de pH 7,9 qui représente environ 5 ml (soit 60 mg de protéines) est déposé au sommet de la colonne de DEAE-Cellulose.

L'élution de l'activité enzymatique se fait à l'aide d'un tampon phosphate M/45 pH 7,9 et d'une solution de chlorure de sodium 0,5 M, selon une technique utilisée par SULD et HERBUT (73). Les détails de l'élution sont indiqués, pages 127-128.

La chromatographie se déroule en chambre thermostatée à + 4° C.

RESULTATS

La courbe 12 donne le profil de la chromatographie. L'activité enzymatique est éluée en un pic unique entre les fractions 44 et 52 qui se situe dans une région relativement peu concentrée en protéines.

Les contaminants protéiques sont éliminés principalement en deux grands pics, l'un au début de la chromatographie, l'autre à la fin de l'élution après le passage de l'enzyme.

Les activités spécifiques des fractions à maximum d'activité enzymatique, figurent dans le tableau VI. L'examen de ce tableau nous montre que l'activité spécifique de l'extrait enzymatique passe de 0,098 à 0,540 pour la fraction 47 après le traitement chromatographique, ce qui représente environ un enrichissement de 5,5 fois par rapport au produit de départ.

Le rendement de la chromatographie sur DEAE-Cellulose est de l'ordre de 30 à 40 %.

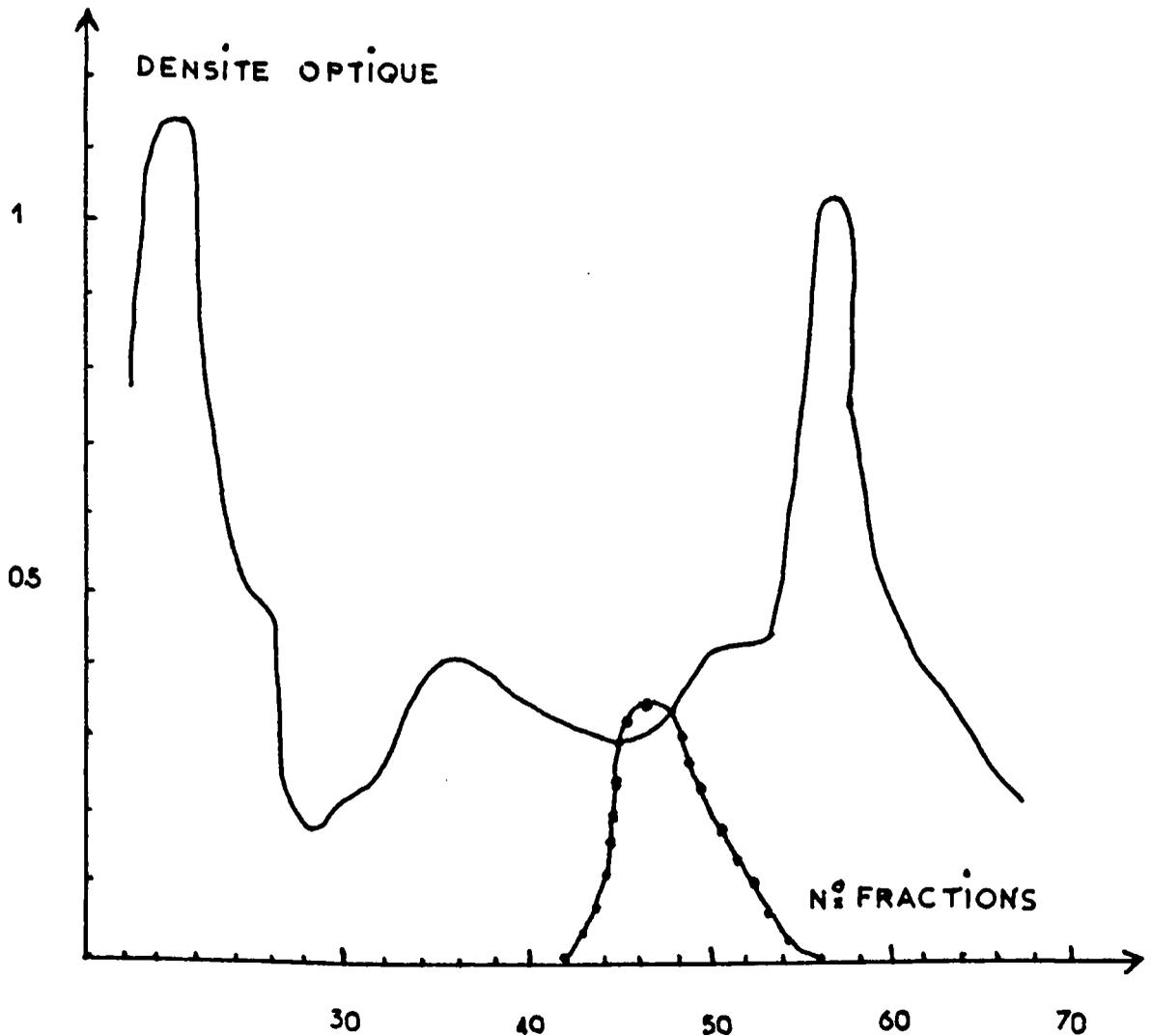


FIG. 12 : FRACTIONNEMENT D'UN HOMOGENAT DE PANCREAS DE COBAYE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE (15 x 3,5 cm). Les protéines sont éluées par un système tampon phosphate M/45, NaCl 0,5 M à pH 7,9. Les opérations sont effectuées à + 4° C. Les fractions recueillies ont un volume de 4 ml.

BHS
LILLE

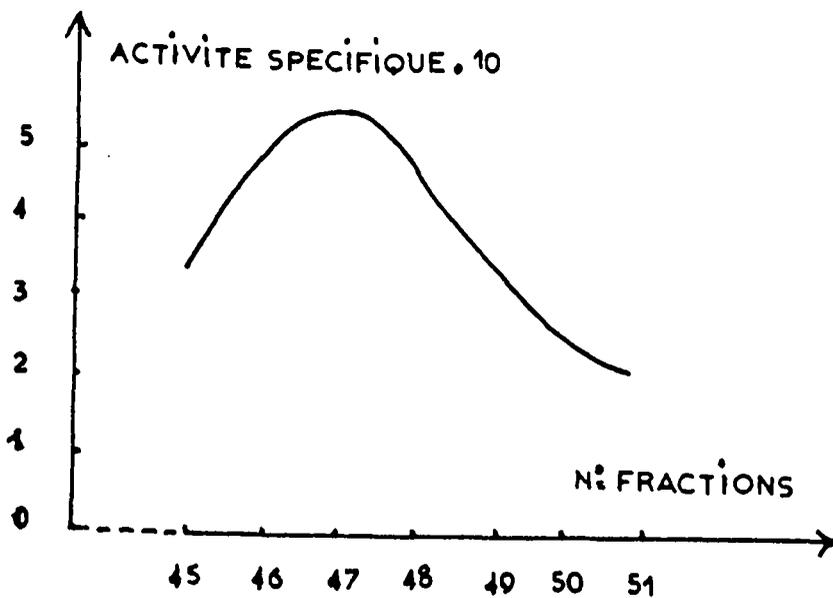
- Activité enzymatique exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.
- Azote protéique exprimé par la densité optique de la réaction de LOWRY.

TABLEAU VI

Produit	$\mu\text{M NH}_4^+$ /ml	mg de Protéine/ml	Activité Spécifique
Dépôt DEAE	2	13,7	<u>0,098</u>
Pic 45	0,200	0,22	0,340
46	0,300	0,23	0,490
47	0,360	0,23	0,540
48	0,310	0,25	0,470
49	0,260	0,28	0,350
50	0,200	0,31	0,240
51	0,160	0,32	0,190

Activités spécifiques des fractions à activité enzymatique maximale après chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose.

- REPRESENTATION GRAPHIQUE DU TABLEAU CI-DESSUS :



VI - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION D'UNE PREPARATION PURIFIEE SUR DEAE-CELLULOSE.

La solution enzymatique provenant des fractions actives obtenues par chromatographie sur échangeur d'ions, est concentrée par lyophilisation, puis soumise à une gel filtration sur Sephadex G 200 équilibré avec du tampon phosphate M/45 pH 7,9. (Les détails techniques de la gel filtration figurent dans l'appendice, page 129).

Le lyophilisat est repris dans 2 ml de tampon phosphate (la quantité de protéines déposée est de 4 mg). L'élution de la colonne de Sephadex se fait avec le même tampon. Le débit constant de la colonne (4 gouttes par minute) est assuré par une pompe péristaltique. Les fractions recueillies ont un volume de 1 ml.

Cette opération comme la précédente s'effectue en chambre froide à + 4° C.

RESULTATS.

La Figure 13 donne le profil d'élution de la colonne de gel filtration. Nous remarquons que l'activité enzymatique est recueillie au début de l'élution (fractions 19 à 24) ce qui laisse présager un poids moléculaire élevé, rapprochant la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye de celle du rein de porc (74) et du cristallin de bovin (75), qui toutes deux ont un poids moléculaire de l'ordre de 300 000, ce dernier ayant été déterminé par ultra-centrifugation.

Le pic de protéines est nettement retardé (fractions 26 à 34).

Le Tableau VII montre que la meilleure activité spécifique (7,5) est obtenue pour la fraction n° 21, ce qui correspond à un coefficient de purification de 76,5 fois par rapport à l'homogénat brut.

(74) SMITH E.L., SPACKMANN D.H... (75) HANSON H., GLÄBER D...

REMARQUES :

- Le rendement en enzyme de la chromatographie de DEAE-Cellulose était de l'ordre de 30 à 40%. Après l'étape de gel filtration, il tombe à 4 % environ par rapport à l'homogénat de départ. Nous avons pensé que la diminution importante de ce rendement était peut être due à une perte de cations bivalents de l'enzyme, c'est pourquoi, nous avons recueilli les différentes fractions des colonnes de DEAE-Cellulose et de Sephadex G 200 sur une solution de magnésium 5 mM. Le résultat obtenu n'amène aucune amélioration comme le montre le Tableau VIII. Les causes de cette chute de rendement ne sont pas évidentes ; nous pensons que l'adsorption de l'enzyme sur le gel de Sephadex G 200, pourrait intervenir, soit en fixant l'enzyme sur le support, soit en produisant son inactivation partielle.

- A l'issue de cette double purification un contrôle a été effectué en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7 p. 100 sur un homogénat amené à pH 7,9 et sur les produits partiellement purifiés sur colonnes de DEAE-Cellulose et de Sephadex G 200. Ce contrôle permet de suivre la diminution progressive des contaminants protéiques. Cependant, l'inhibition de l'enzyme de pancréas par le TEEMED nous interdit toute possibilité de localisation de l'activité (Figure n° 14).

- Le taux faible de protéines obtenu après le couplage DEAE-Cellulose-Sephadex G 200 rend difficile la mise en oeuvre d'étapes ultérieures de purification.

- La solution enzymatique ainsi préparée nous a cependant servi pour l'étude de quelques propriétés physiques de la leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye.

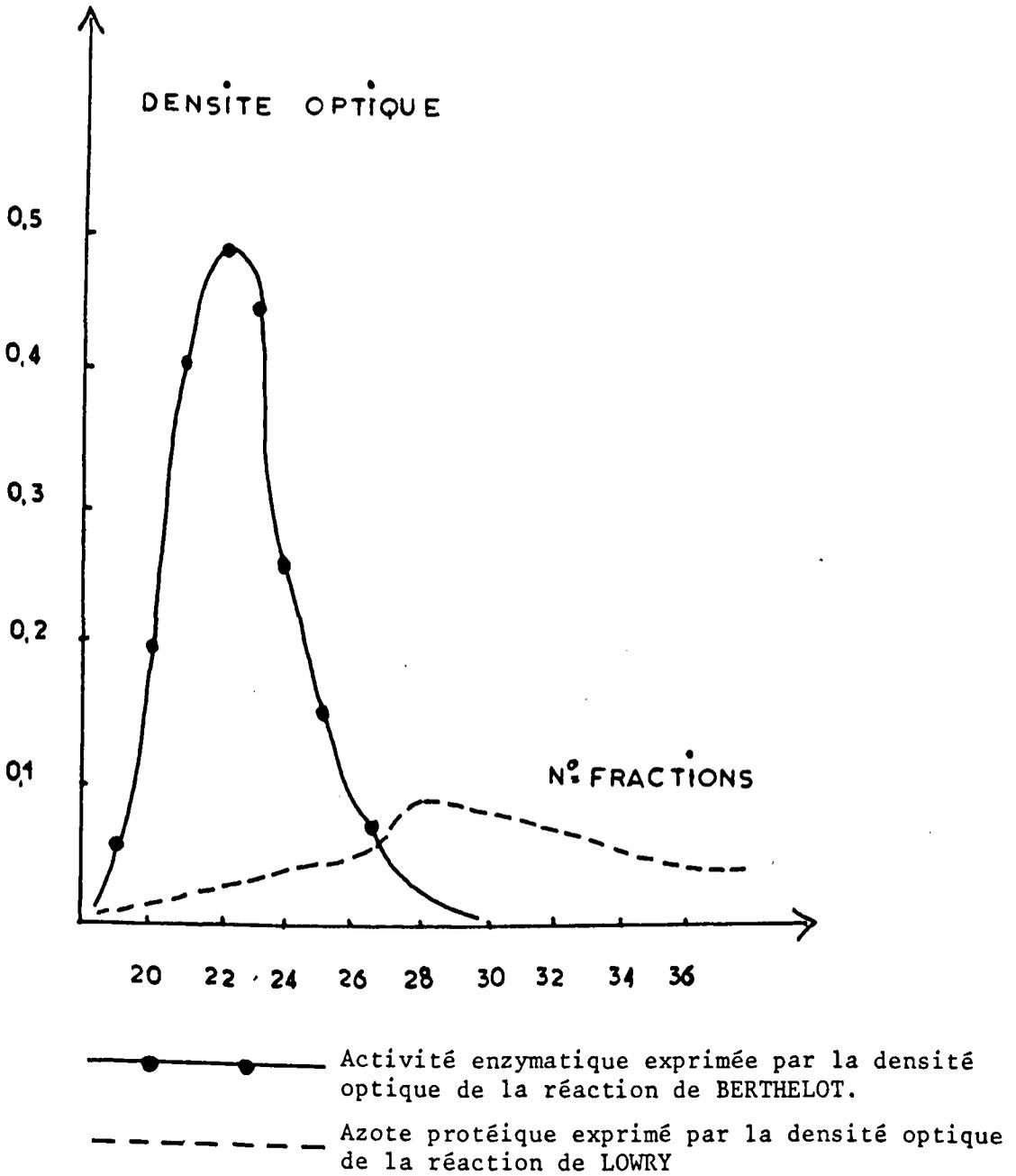


FIG. 13 : CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 200 DES FRACTIONS ACTIVES RASSEMBLEES OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE.

L'élution se fait par un tampon phosphate M/45, pH 7,9.

Les fractions recueillies ont un volume de 1 ml.

La gel filtration s'effectue à + 4° C.



TABLEAU VII

Fractions	$\mu\text{M NH}_4^+$ /ml	mg de protéine/ml	Activité Spécifique
19	0,06	0,05	2,49
20	0,18	0,010	3,70
<u>21</u>	0,36	0,010	<u>7,50</u>
22	0,45	0,025	3,70
23	0,41	0,030	2,80
24	0,26	0,040	1,50
25	0,15	0,040	0,67

CALCUL DES ACTIVITES SPECIFIQUES DES FRACTIONS OBTENUES PAR GEL FILTRATION. Nous remarquons qu'après cette opération, l'activité maximale (fraction n° 21) a été multipliée par 13,8 par rapport à celle recueillie après colonne de DEAE-Cellulose et 76,5 par rapport à l'homogénat amené à pH 7,9.

- REPRESENTATION GRAPHIQUE DU TABLEAU CI-DESSUS :

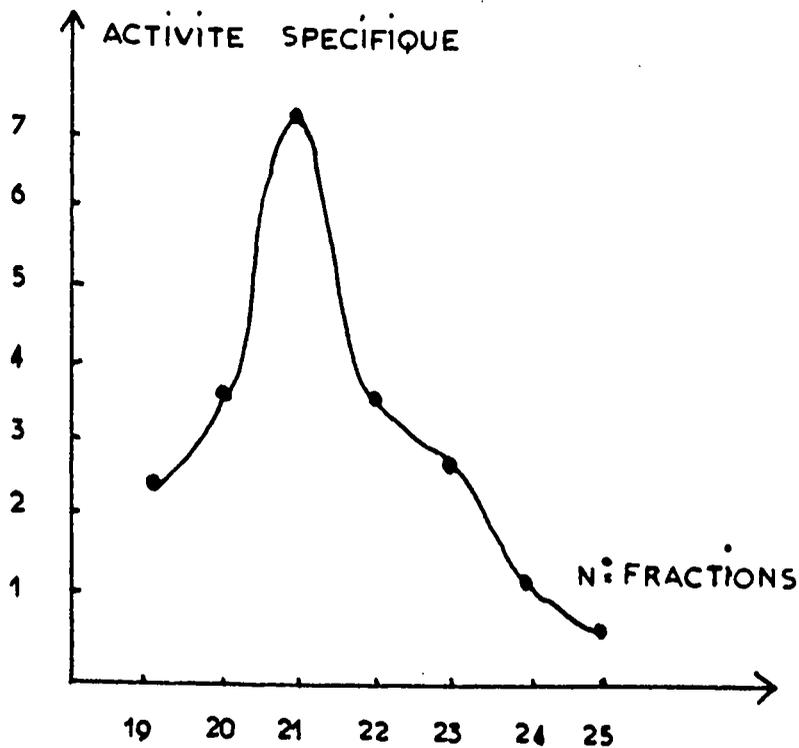


TABLEAU VIII

Tit	Activité $\mu\text{M NH}_4^+/\text{mn}$	Protéines mg/ml	Activité Spécifique	Rendement	Purification
nat	65,25	19,2	0,22	100	1
éant ,9	52,5	19	0,3	80	1,3
tions	29,88	0,27	3,1	45	14

	$\mu\text{M NH}_4^+/\text{ml/mn}$		
ons s G 200			
1	0,035	0,03	1,16
2	0,21	0,045	4,6
3	0,42	0,075	5,6
4	0,658	0,105	<u>6,2</u>
5	0,56	0,18	3
6	0,23	0,21	1,09
7	0,21	0,24	0,87
8	0,12	0,225	0,53
9	0,42	0,18	0,23

	$\mu\text{M NH}_4^+/\text{mn}$			
tions 0	2,28	0,14	2,7	3,5 12,2

RENDEMENT DU COUPLAGE CHROMATOGRAPHIQUE DEAE-CELLULOSE/SEPHADEX G 200.

Les fractions sont recueillies sur une solution de chlorure de magnésium 5 mM.



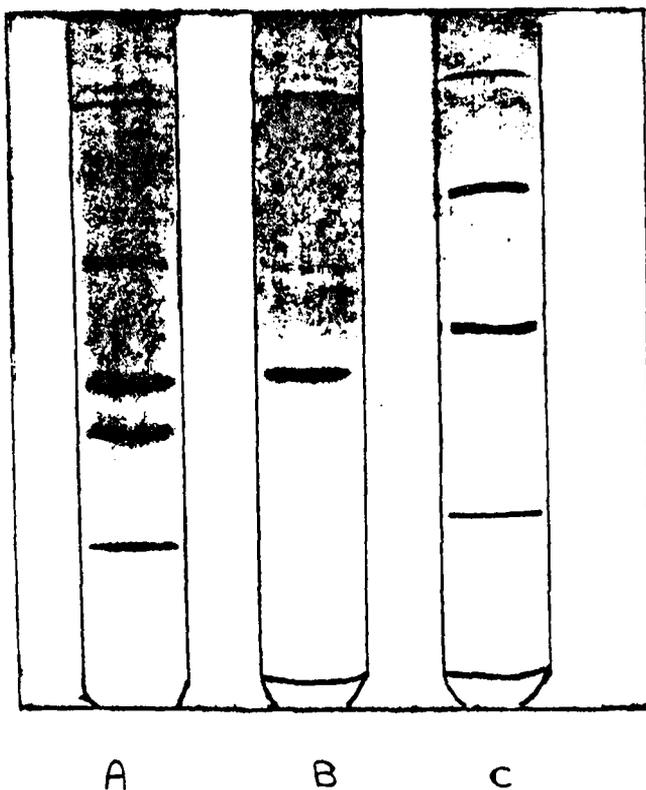


Figure n° 14 : CONTROLE ELECTROPHORETIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE A 7 p. 100.

- A = Homogénat de pancréas amené à pH 7,9
- B = Solution enzymatique après chromatographie sur DEAE-Cellulose
- C = Solution enzymatique après couplage DEAE-Cellulose et filtration sur Sephadex G 200.

* Pour l'emploi des gels de polyacrylamide, nous nous sommes inspirée de la Thèse de ROGEZ J.C. (76).

VII - UTILISATION DE L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOCS DE CELLOGEL.*

1° / - ETUDE ELECTROPHORETIQUE D'UN SURNAGEANT 105 000 g.

Le surnageant de 105 000 g obtenu comme il est décrit page 31 est ajusté à pH 7,9 par addition de soude N/10 sous agitation magnétique douce puis centrifugé pendant 15 minutes à 17 000 tours/minute, 2 ml de la solution sont ensuite déposés sur blocs de cellogel à raison de 0,5 ml par bloc.

a) Détermination de l'activité enzymatique et spécifique.

Après révélation d'un demi-bloc de cellogel à l'Amidoschwarz et décoloration, nous procédons au découpage de 7 fragments numérotés de 1 à 7 à partir de la cathode. Chaque fragment permet, après compression, la récupération de 2 à 3 ml de produit. L'activité des différentes fractions obtenues est dosée en présence de L-leucine amide à $10 \mu\text{M}/\text{ml}$. Parallèlement, les protéines sont déterminées par la méthode de LOWRY (77). Les résultats sont rassemblés dans le Tableau IX.

L'activité spécifique passe de 0,035, pour l'homogénat, à 0,73 pour la fraction n° 4 du bloc de cellogel ce qui correspond à un enrichissement de 20 fois. Le rendement de cette électrophorèse est cependant mauvais : inférieur à 1 p. 100.

b) Contrôle par électrophorèse sur feuilles d'acétate de cellulose.*

Les fractions 3,4 et 5 actives, du bloc de cellogel, sont concentrées séparément à quelques dizaines de microlitres par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000 et déposées sur feuilles d'acétate de cellulose.

* La technique d'utilisation se trouve dans l'appendice, pages 130 - 131.

La révélation des protéines d'une part, le découpage et la mise en incubation des feuilles non révélées d'autre part, nous ont permis de situer les bandes actives.

Le contrôle électrophorétique sur feuilles d'acétate de cellulose (Fig. 16) met en évidence plusieurs bandes de protéines. Il faut toutefois noter que l'activité enzymatique ne se retrouve que dans une seule zone située à la même distance du dépôt pour les trois fractions issues du bloc de cellogel. Il s'agit donc d'une même forme de l'enzyme : les fractions actives 3,4 et 5 découpées sur cellogel semblent en effet correspondre à une traînée de l'enzyme sur les blocs.

Le schéma des électrophorèses sur blocs de cellogel et sur feuilles d'acétate de cellulose et leur découpe sont indiqués, figures n° 15 et 16.

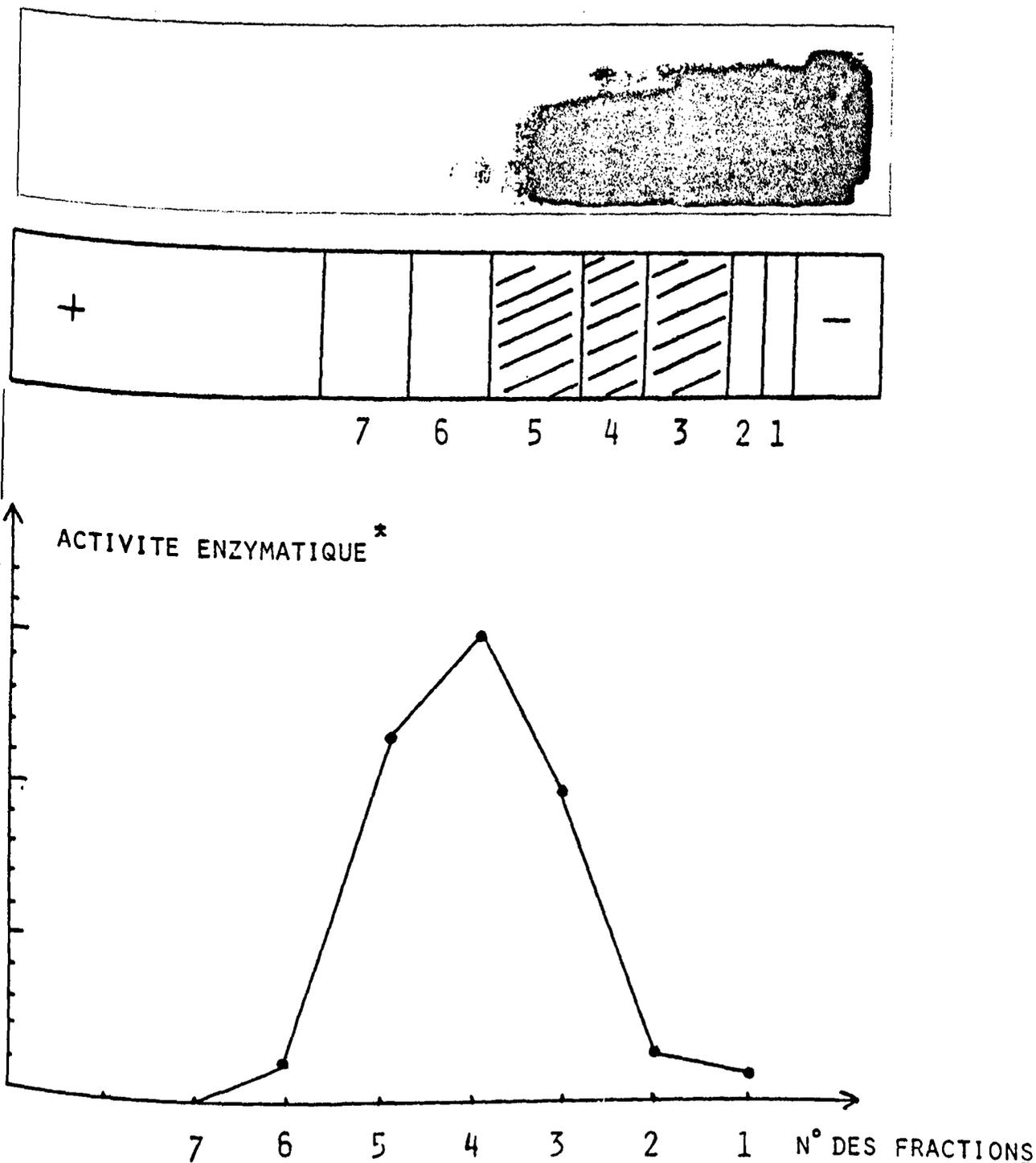
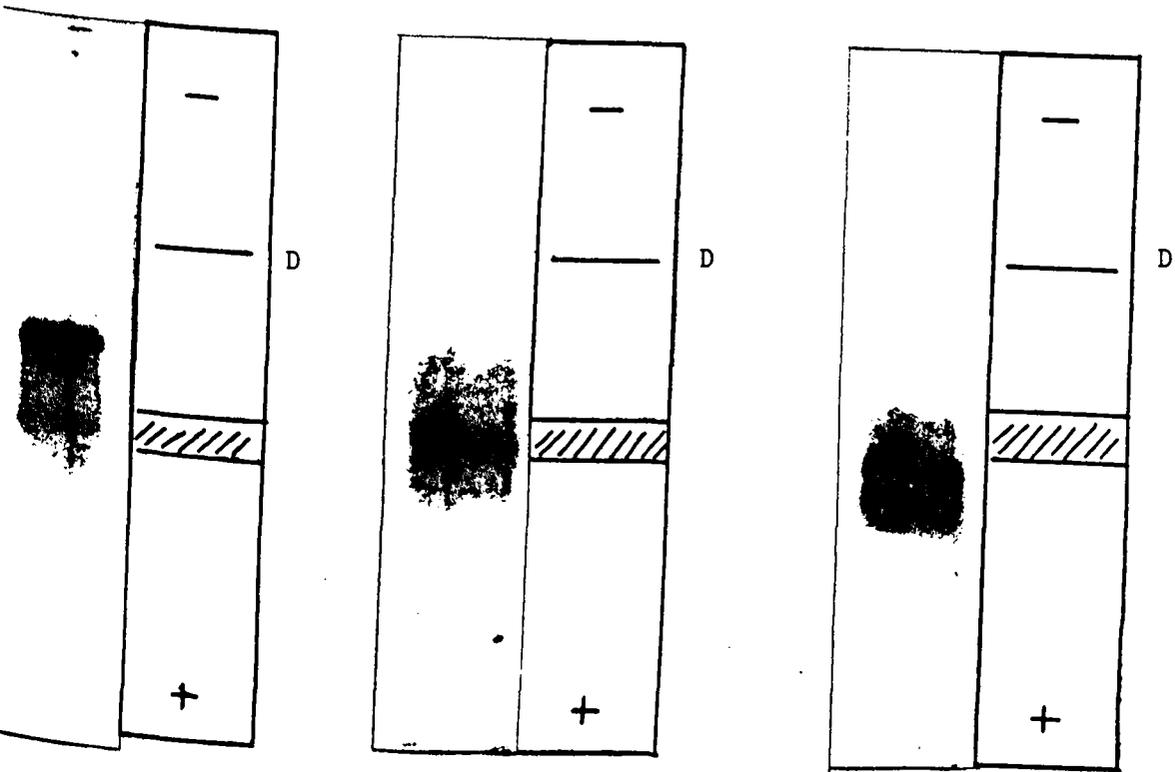


FIG. 15 : ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOCS DE CELLOGEL D'UN SURNAGEANT DE 105 000 g à pH 7,9. Les fractions où l'on met en évidence une activité enzymatique (3-4-5) sont hachurées.

* L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.

Bills
LILLE



FRACTION N° 3

FRACTION N° 4

FRACTION N° 5

16 : CONTROLE ELECTROPHORETIQUE SUR FEUILLES D'ACETATE DE CELLULOSE des fractions actives (3-4-5) obtenues par électrophorèse préalable sur bloc de cellogel (Fig. n° 15).

- L'activité enzymatique est repérée sur les schémas par une zone hachurée pour chaque électrophorèse ; elle se retrouve toujours à une même distance du point de dépôt (D).



TABLEAU IX

Produit	protéines mg/ml	Activité $\mu\text{M NH}_4^+$ /ml/mn	Activité spécifique	Purification
Homogénat	19	0,67	0,035	1
Surnageant 105 000 g	14	0,91	0,065	1,8
Surnageant pH 7,9	12	0,70	0,050	1,6
<u>Bloc Cellogel</u>				
Fraction 3	0,54	0,20	0,370	10
Fraction 4	0,45	0,33	0,730	20
Fraction 5	0,42	0,22	0,690	19

ETUDE DE LA PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU SURNAGEANT 105 000 g DE PANCREAS DE COBAYE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOCS DE CELLOGEL.

Remarque : L'ajustage à pH 7,9 au cours du processus de purification apporte habituellement une amélioration de l'activité spécifique. Ce n'est pas le cas dans l'expérience décrite ci-dessus que nous avons pourtant retenue car parmi les différents essais réalisés, c'est celui qui nous a apporté le meilleur résultat final.

2°/ - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOCS DE CELLOGEL D'UNE SOLUTION ENZYMATIQUE PARTIELLEMENT PURIFIEE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE.

La solution enzymatique obtenue par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose comme nous l'avons décrit dans le premier paragraphe de ce chapitre, page 35, est concentrée à l'aide de polyéthylène glycol 20 000 et soumise à une électrophorèse sur blocs de cellogel. Les conditions de dépôt, de révélation et de détermination des activités enzymatiques et spécifiques sont identiques aux précédentes.

Les résultats de l'électrophorèse sur bloc de cellogel (Tableau X) montrant ici deux zones actives : les fractions 3 et 4. Le facteur de purification : 11 fois par rapport à l'homogénat est moindre que précédemment, et cependant, le rendement reste très faible 0,4 et 0,9 p. 100.

CONTROLE PAR ELECTROPHORESE SUR FEUILLES D'ACETATE DE CELLULOSE.

Les fractions actives du bloc de cellogel, éluées et concentrées, sont déposées sur feuilles d'acétate de cellulose. L'activité enzymatique est déterminée comme précédemment. La fraction n° 3 du bloc donne, après électrophorèse sur acétate de cellulose une bande de protéines qui coïncide avec l'activité enzymatique comme l'indiquent les figures n° 17 - 18 tandis que la fraction 4 du bloc donne naissance à deux bandes protéiques dont l'une est active.

Notons également que l'activité enzymatique est unique sur feuilles d'acétate, elle se situe à la même distance de la zone de dépôt pour les deux contrôles. Cette distance de migration est la même que celle observée précédemment.

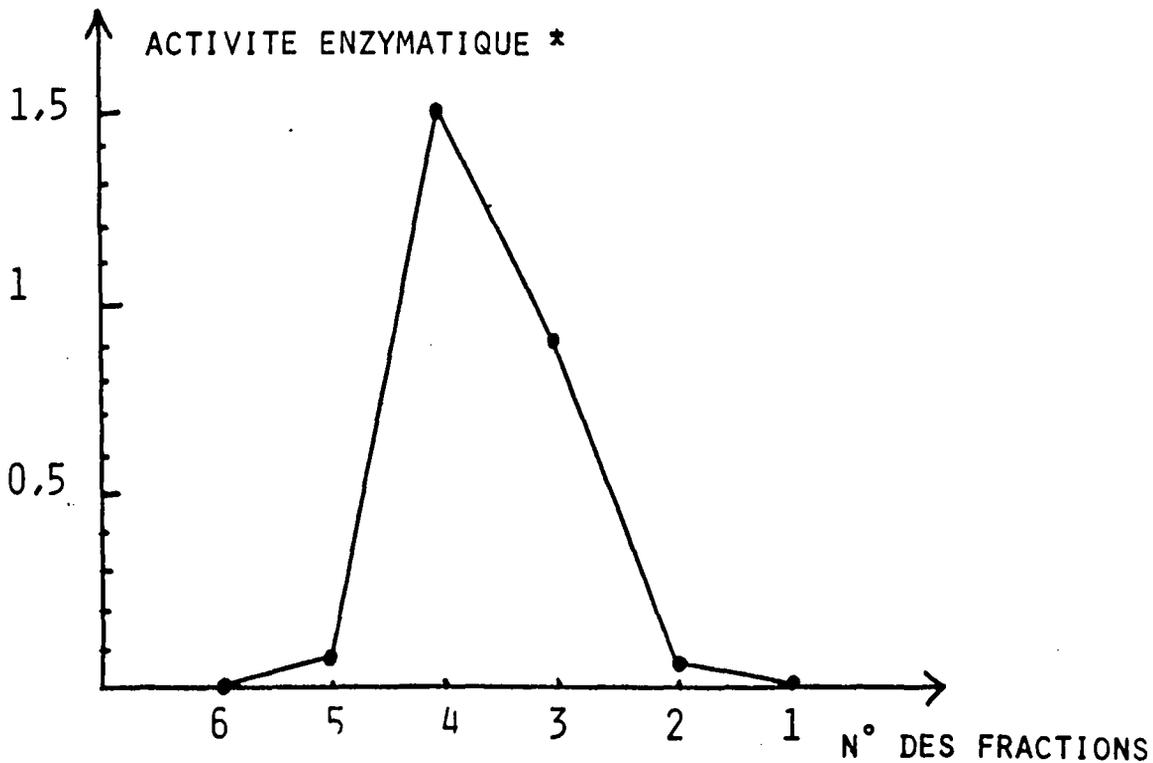
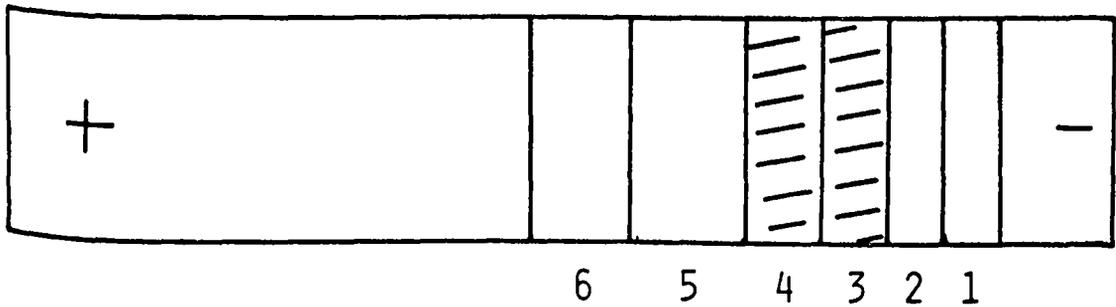
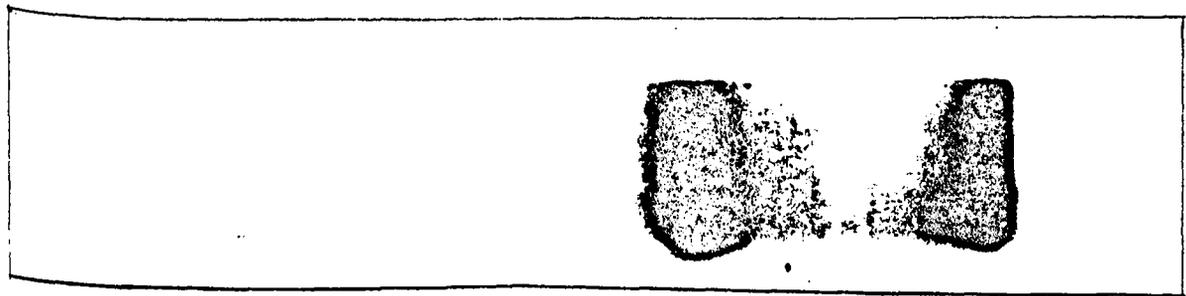
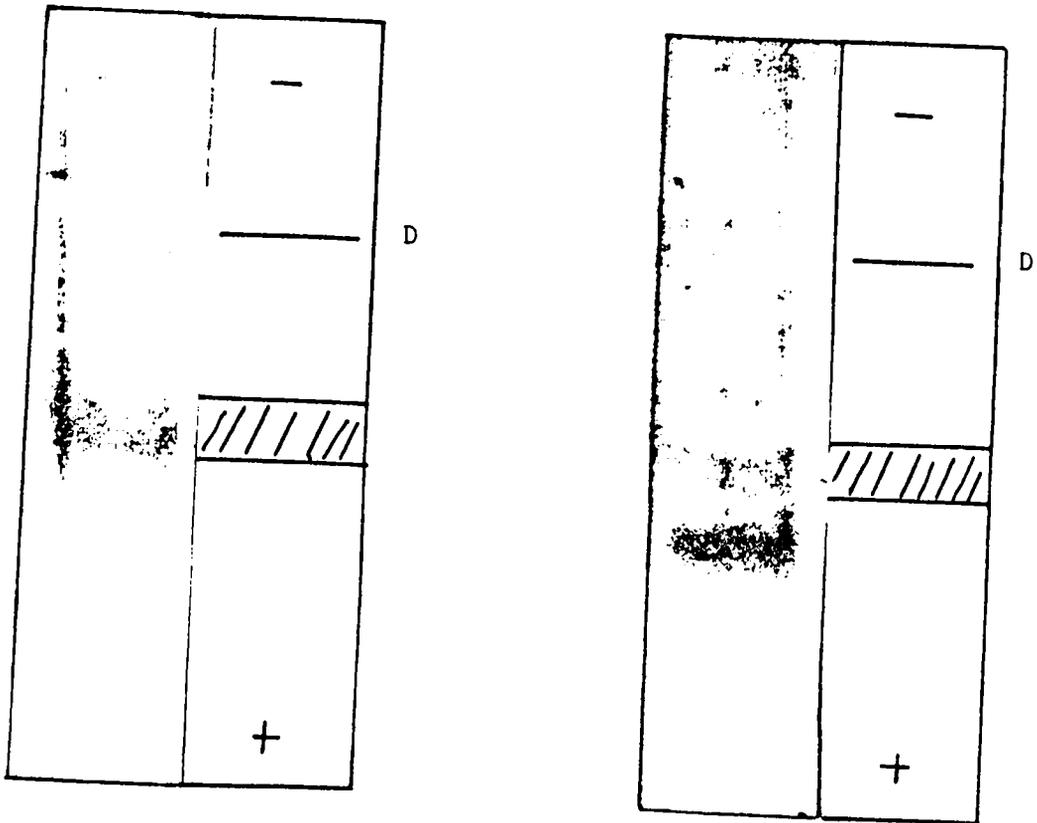


FIG. 17 : ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOCS DE CELLOGEL D'UNE SOLUTION ENZYMATIQUE PARTIELLEMENT PURIFIEE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE. BUS LILLE

Les fractions actives du bloc de cellogel se trouvent dans les zones hachurées.

* L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.



FRACTION N° 3

FRACTION N° 4

FIG. 18 : CONTROLE ELECTROPHORETIQUE SUR FEUILLES D'ACETATE DE CELLULOSE DES FRACTIONS ACTIVES (3 - 4) obtenues par electrophorese préalable sur blocs de cellogel (Fig. 17).

- L'activité enzymatique est repérée sur les schémas par une zone hachurée pour chaque électrophorèse ; elle se retrouve toujours à une même distance du point de dépôt (D).



TABLEAU X

Produit	Activité ⁺ totale ($\mu\text{M NH}_4$ /mn)	Activité spécifique	Purification	Rendement
Homogénat	70,6	0,24	1	100
Surnageant pH 7,9	54	0,28	1,16	76
∑ fractions de DEAE	15	1,40	5,8	22
Electrophorèse sur blocs de cellogel				
Fraction 3	0,25	2,64	11	0,43
Fraction 4	0,51	2,60	10,8	0,90

ACTIVITE DES FRACTIONS OBTENUES PAR ELECTROPHORESE SUR BLOCS
DE CELLOGEL APRES PASSAGE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE SUR COLONNE DE DEAE-
CELLULOSE.



CONCLUSION.

L'instabilité très grande de la solution enzymatique et les faibles rendements obtenus après l'électrophorèse sur blocs de cellogel nous ont fait abandonner cette méthode de purification. Cette expérimentation nous fournit cependant un produit enrichi comme l'atteste l'examen des Tableaux IX et X, et le contrôle sur acétate de cellulose. Malheureusement, la diminution du taux des protéines s'accompagne d'une baisse de l'activité enzymatique.

VIII - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.

La chromatographie d'affinité est une technique de purification relativement récente et pourtant largement utilisée depuis ces dernières années. Il nous a paru intéressant de l'appliquer à la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye d'autant plus que la littérature est assez discrète à ce sujet : des essais d'insolubilisation de la leucine aminopeptidase sur du Sephadex G 200 activé au bromure de cyanogène ont été réalisés et décrits par HANSON (78) (79) et une autre technique d'insolubilisation sur verre poreux a été mise au point par ANDREWS (80).

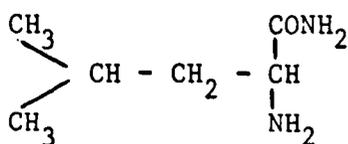
- METHODE PERSONNELLE DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.

1° / - CHROMATOGRAPHIE D'UN HOMOGENAT.

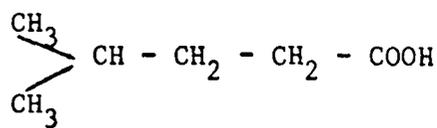
Nous avons utilisé une résine AH-Sépharose 4B (Pharmacia).

Cette résine possède des radicaux hexaméthylènamines donc des groupements NH₂ libres. Nous avons choisi de fixer sur le Sépharose "armé" un inhibiteur de la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye : l'acide isocaproïque (l'expérience d'inhibition figure dans le chapitre réservé à l'étude des propriétés physiques, pages 92 et 97). L'inhibition par cet acide avait déjà été signalée par SMITH (81).

L'acide isocaproïque est un acide ramifié présentant une analogie de structure avec la L-leucine amide.

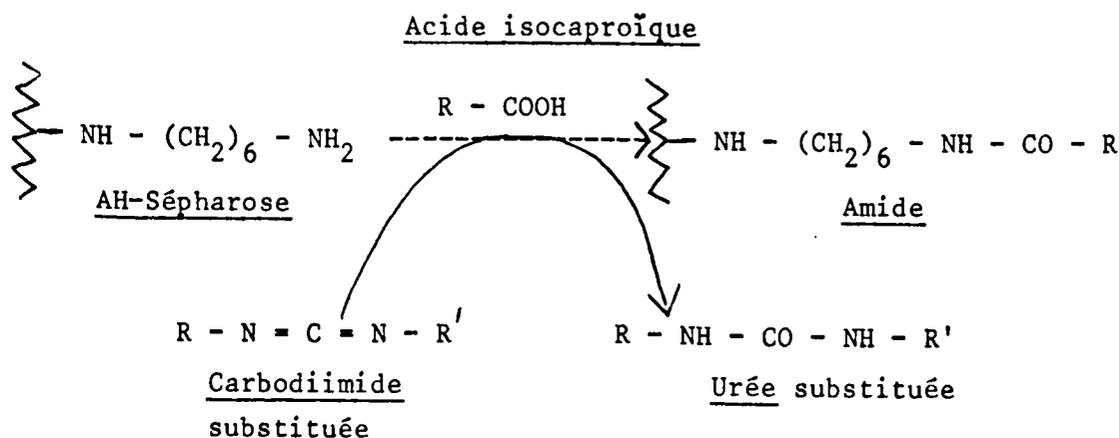


L-leucine amide



Acide isocaproïque

Le gel de Sépharose AH-4B est tout d'abord préparé comme il est indiqué dans le paragraphe réservé aux techniques, pages 133 - 134. Nous ajoutons ensuite le "ligand" à raison de $10\mu\text{M/ml}$ de gel gonflé (ce qui correspond à la capacité de la résine définie par le fabricant) en présence d'une carbodiimide soluble en milieu aqueux : le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide.



FIXATION DU LIGAND, l'acide isocaproïque, sur le Sépharose AH-4B

en présence de carbodiimide substituée hydrosoluble.

Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique douce à température ambiante pendant 24 heures. Nous obtenons alors un nouveau gel de AH-Sépharose, substitué par l'acide isocaproïque, qui est ensuite lavé alternativement par les tampons acide et basique décrits page 134.

Nous préparons enfin le gel définitif pour la chromatographie d'affinité par mise en suspension dans le tampon phosphate M/45, pH 7,9 précédemment employé dans différentes étapes de purification de la leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye.

Le gel est introduit dans la colonne (1 cm de diamètre), le tassement s'effectue par écoulement libre ; quelques heures suffisent, la hauteur de gel utilisé est de 8 cm.

DEPOT :

0,5 ml d'un homogénat de pancréas amené à pH 7,9 et centrifugé 15 minutes à 17 000 tours, sont déposés au sommet du gel (soit 9,8 mg de protéines). Le gel est rincé avec le tampon phosphate d'équilibrage. La totalité de l'enzyme est fixée sur la résine.

ELUTION :

Après de nombreux essais mettant en jeu, notamment, des variations de pH du tampon d'élution, nous sommes parvenue à "décrocher" l'activité enzymatique avec un tampon introduisant à la fois une variation de pH et de force ionique.

Nous avons utilisé trois tampons d'élution :

- tampon phosphate M/45 pH 7,9
- tampon borate M/20* pH 9,5
- tampon borate M/20 pH 9,5 + Mg²⁺ 50 mM

* Le tampon borate s'établit comme suit :

. Solution A : 50 ml

- Acide borique 0,1 M Prolabo
- KCl 0,1 M (Billault)

. Solution B :

- NaOH 0,1 N (Merck) q.s.p. pour obtenir pH 9,5
- Eau distillée q.s.p. 1000 ml

La composition du tampon phosphate est identique à celle que nous avons indiquée pour l'élution des colonnes de DEAE-Cellulose et de Sephadex G 200 (pages 35 et 39).

Les deux premiers tampons permettent le "décrochage" de protéines (40 ml de tampon phosphate pH 7,9 M/45 puis 130 ml de tampon borate M/20 pH 9,5), le dernier tampon élue l'activité enzymatique (soit 12 ml de tampon borate pH 9,5 M/20 + Mg^{2+} 50 mM).

La durée de l'élution est de 24 heures environ, elle a lieu à 4° C.

DOSAGE DES FRACTIONS RECUEILLIES.

Sur chacune des fractions nous effectuons un dosage des protéines et un dosage de l'activité enzymatique. L'activité est retrouvée au niveau des fractions 72, 73 et 74.

<u>N° de Fraction</u>	<u>Activité Spécifique</u>	<u>Purification</u>
72	2,5	82
73	1,05	34
74	0,37	12,5
72-73-74	0,54	18

Les taux de purification obtenus en une seule étape dépassent largement ceux que nous avons obtenus par d'autres techniques jusqu'à présent.

Nous recueillons 80 p. 100 de l'activité déposée. L'incubation du gel de Sépharose en présence de L-leucine amide après le développement de la chromatographie a confirmé ce pourcentage.

La courbe 19 donne le profil de la chromatographie d'affinité. Les protéines sont éliminées en début de colonne par le premier tampon

(Phosphate M/45 pH 7,9) et par le deuxième tampon d'élution (Borate M/20 pH 9,5). L'activité enzymatique se retrouve en un pic étroit après passage du troisième tampon (borate M/20 pH 9,5 magnésium 50 mM).

Cette activité est encore accompagnée d'une quantité de protéines non négligeable. Toutefois, on peut noter l'amorce d'un décalage entre la courbe d'élution des protéines et celle de l'enzyme. Dans l'espoir d'accentuer ce décalage, nous avons tenté de remplacer l'introduction brutale du troisième tampon par un gradient de 0 à 60 mM en ions Mg^{2+} . Malheureusement, cette expérience pourtant renouvelée plusieurs fois, ne nous a pas permis de déplacer l'enzyme, qui reste alors irréversiblement liée à son support.

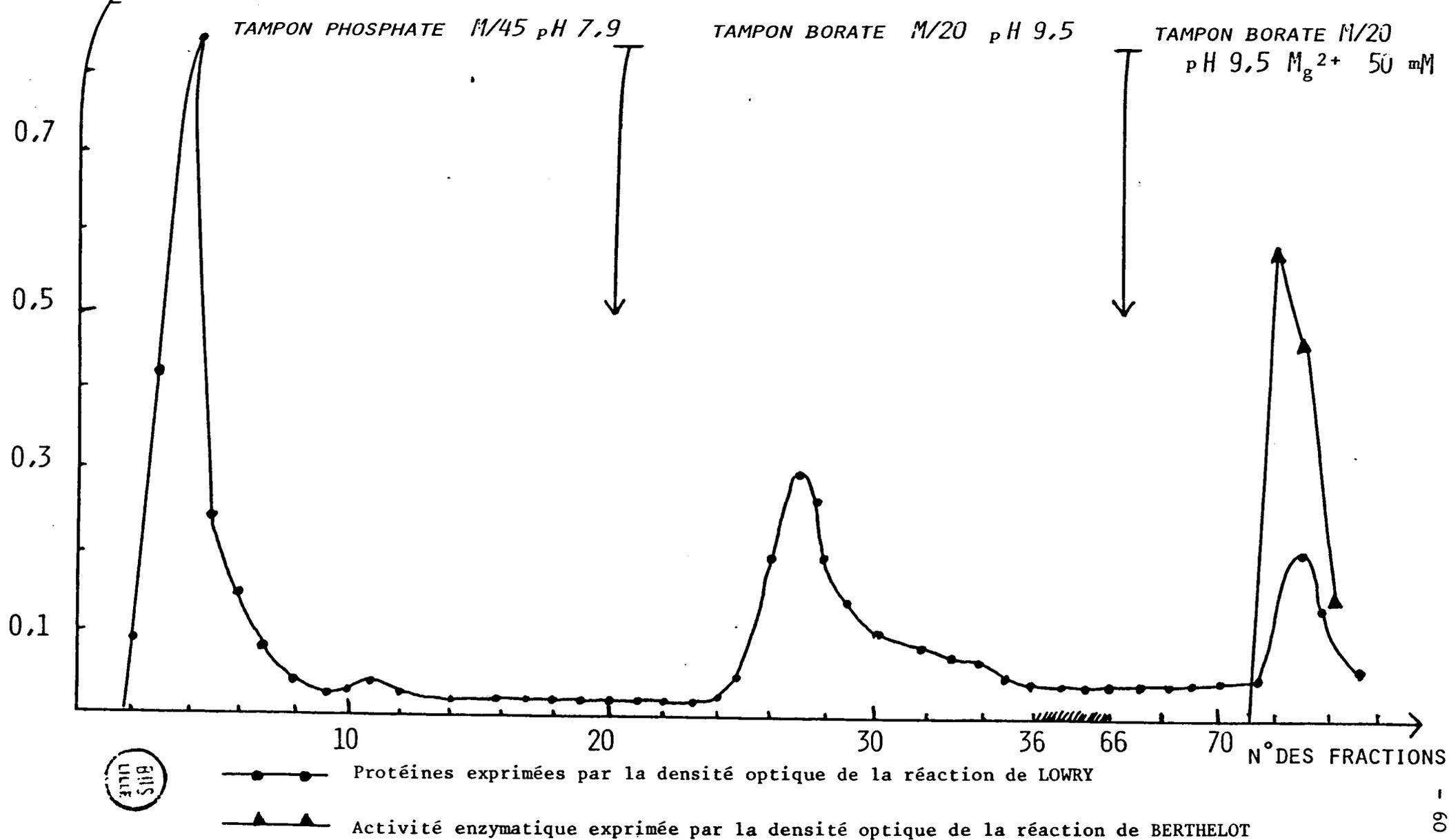


FIG. 19 : CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'AFFINITE (Sephacrose AH-4B - Acide isocaproïque) du surnageant obtenu par centrifugation d'un homogénat de pancréas de cobaye amené à pH 7,9.

2°/ - ESSAIS DE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE AVEC D'AUTRES
METHODES DE PURIFICATION.

a) Couplage gel filtration - chromatographie d'affinité.

1 ml d'homogénat amené à pH 7,9 est déposé sur une colonne de gel de Sephadex G 200 équilibré avec du tampon phosphate M/45, pH 7,9.

L'élution se fait avec le même tampon phosphate. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées au polyéthylène glycol 20 000. Le rendement de la filtration est de 15 p. 100.

Le produit est ensuite déposé sur un gel de Sepharose AH-4B couplé à de l'acide isocaproïque. La préparation du gel et l'élution sont identiques à celles décrites pages 56 et 57. La courbe 20 nous montre un profil de chromatographie identique à celui indiqué précédemment.

Nous recueillons 93 p. 100 de l'activité déposée sur la colonne d'affinité. Les résultats sont consignés dans le Tableau XI.

Notons que le taux de purification de l'ensemble des fractions actives (27) est supérieur à celui atteint par simple passage sur colonne d'affinité (18), page 58. Les fractions de 57 à 61 ramenées à quelques dizaines de microlitres ont été soumises à un contrôle électrophorétique. Nous obtenons 3 bandes de protéines dont une possède une activité enzymatique. Cette électrophorèse sur feuilles d'acétate de cellulose est présentée avec les autres contrôles de ce paragraphe (Figures n° 22, page 68).

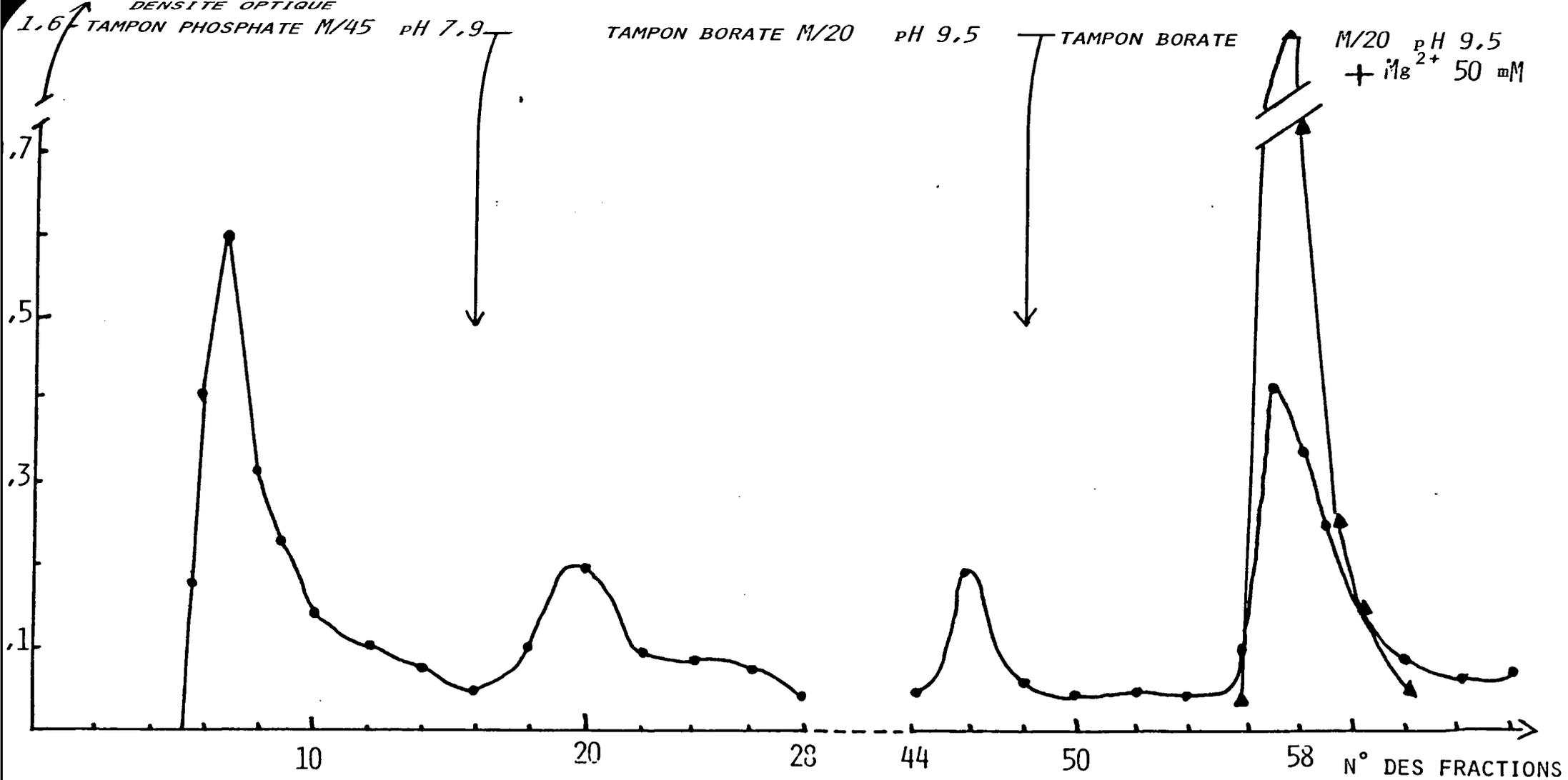
TABLEAU XI

	Activité totale μ M NH ₄ ⁺ /mn	Activité spécifique	Rendement	Taux de Purification
<u>Homogénat</u>	2,85	0,026	100	1
pH 7,9	2,1	0,048	73	1,8
Sephadex G 200	0,432	0,035	15	1,3
<u>Colonne d'Affinité</u>				
Fraction 57	0,42	1,18		45
Σ 57-61	0,39	0,726	13	27

PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE :

Par couplage d'une chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200 et d'une chromatographie d'affinité sur le complexe AH Sépharose 4B - Acide isocaproïque.





●—● Protéines exprimées par la densité optique de la réaction de LOWRY

▲—▲ Activité enzymatique exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT

FIG. 20 : CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE DE LA LEUCINE AMINO-PEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE APRES PURIFICATION PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.



b) Couplage DEAE-Cellulose/Chromatographie d'affinité sur Sépharose AH-4B-acide isocaproïque.

L'homogénat de pancréas amené à pH 7,9 est passé sur DEAE-Cellulose et élué par un système tampon phosphate M/45 pH 7,9 - NaCl 0,5 M (Voir page 35).

La solution enzymatique recueillie a été concentrée par du polyéthylène glycol 20 000 et déposée sur le complexe Sepharose AH-4B - acide isocaproïque. Nous utilisons les trois tampons successifs d'éluion de la chromatographie d'affinité.

L'examen de la courbe 21 nous montre qu'une proportion importante d'enzyme non fixée se retrouve en tête de l'éluion mélangée à des protéines.

Le reste de l'enzyme est fixé, et peut être élué : la fraction 32 présente un maximum d'activité enzymatique, et une activité spécifique de 1,62, soit un enrichissement de 40 fois par rapport à l'homogénat de départ.

Nous nous demandons si la non-fixation de la totalité de l'enzyme sur la colonne d'affinité après passage sur un échangeur d'ions, peut être due à un changement de conformation de la protéine enzymatique.

c) Couplage électrophorèse sur blocs de cellogel-chromatographie d'affinité sur Sépharose AH-4B - acide isocaproïque.

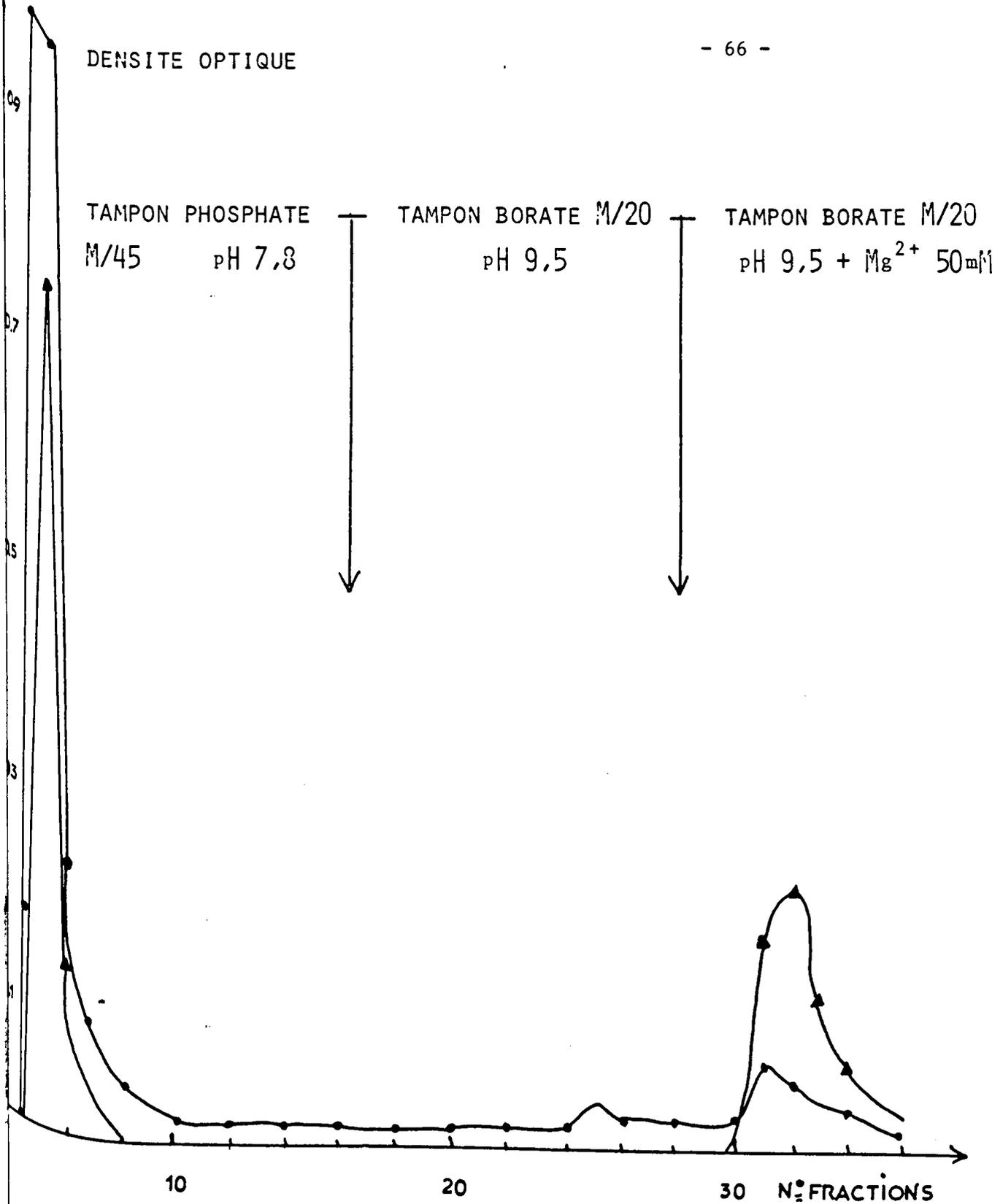
Nous utilisons pour l'électrophorèse sur blocs de cellogel un surnageant de 105 000 g amené à pH 7,9 (pages 45 - 46). L'activité enzymatique recueillie sur blocs de cellogel est concentrée puis déposée sur le gel de AH Sepharose substitué par l'acide isocaproïque.

L'activité enzymatique est éluée par le tampon borate M/20, pH 9,5 + Mg^{2+} 50 mM.

Les résultats sont consignés dans le Tableau XII.

Nous retrouvons ici les inconvénients, déjà cités, de l'électrophorèse sur blocs de cellogel, à savoir une chute brutale du rendement donc une perte de l'activité enzymatique.

DENSITE OPTIQUE



Protéines exprimées par la densité optique de la réaction de BERTHELOT

Activité enzymatique exprimée par la densité optique de la réaction de LOWRY.

G. 21 : CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE, D'UNE PREPARATION PARTIELLEMENT PURIFIEE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE, DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE, SUR SEPHAROSE AH-4B - ACIDE ISOCAPROÏQUE.



TABLEAU XII

Produit	Activité totale $\mu\text{M NH}_4^+$ / mn	Protéines mg/ml	Activité spécifique	Purification	Rendement
Surnageant 105 000 g	17,6	7	0,188	1	100
Surnageant de pH 7,9	19,3	6,4	0,26	1,3	109
Electrophorèse préparative sur blocs de cellogel	1,29	0,4	0,36	1,9	7,3
Colonne d'Affinité	0,324	0,075	0,72	3,8	1,8

PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE, par couplage d'une électrophorèse préparative sur blocs de cellogel et d'une chromatographie d'affinité sur le complexe AH Sepharose 4B-acide isocaproïque. (Nous retrouvons les mauvais rendements inhérents à l'électrophorèse sur blocs).



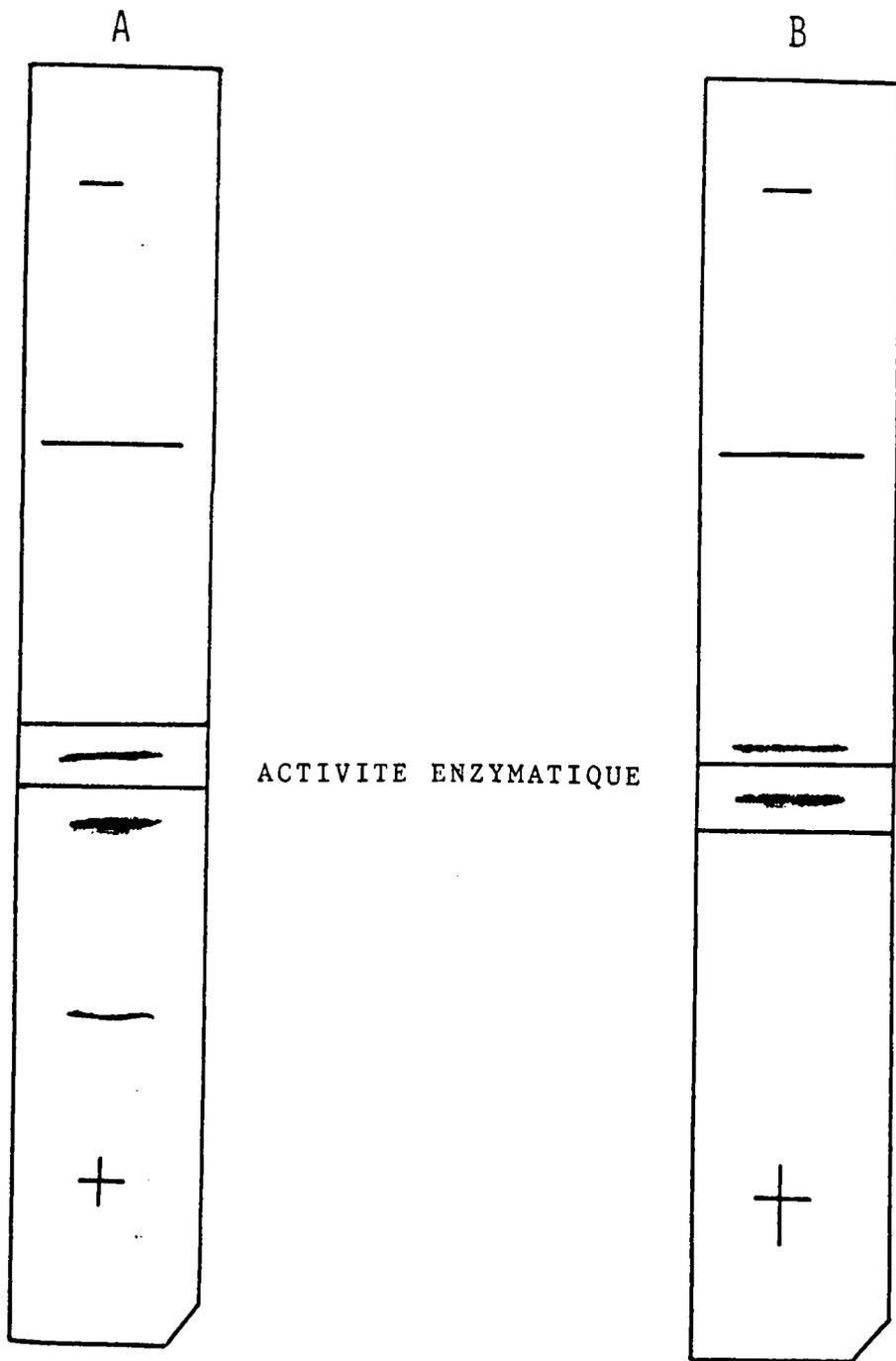


FIG. 22 : CONTROLE ELECTROPHORETIQUE SUR FEUILLES D'ACETATE DE CELLULOSE APRES CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHAROSE AH-4B-ACIDE ISOCAPROIQUE.

A : Couplage avec une gel filtration sur Sephadex G 200

B : Couplage avec une électrophorèse préparative sur blocs de cellogel.



d) Autres procédés de couplage.

α) Nous avons essayé les couplages inverses de ceux utilisés précédemment : la première étape de purification étant la chromatographie d'affinité. Le produit recueilli déposé sur Sephadex G 200 ou sur colonne de DEAE-Cellulose se désactive complètement. Compte-tenu de la forte adsorption attribuée au gel de Sephadex, nous avons utilisé un autre support de filtration, le Sépharose 6 B, sans pour cela obtenir une amélioration.

L'association de la chromatographie d'affinité avec les autres méthodes de purification n'est valable que si elle intervient en dernière étape.

Nous supposons qu'un complexe protéique indispensable à l'activité de l'enzyme a été éliminé au cours de la gel filtration ou de la chromatographie sur échangeur d'ions. Nous avons vérifié cette hypothèse en procédant à une chromatographie d'affinité suivie de gel filtration sur Sephadex G 200 en présence de sérum albumine. Les résultats obtenus montrent qu'une partie de l'activité enzymatique est alors retrouvée sans pour cela apporter une amélioration de la purification.

β) L'enzyme fixée sur Sépharose AH-4B couplé à de l'acide isocaproïque n'est pas éluée par le substrat L-leucine amide ni par une solution d'acide isocaproïque.

CONCLUSIONS.

Nous avons retenu le couplage gel filtration sur Sephadex G 200 et chromatographie sur le complexe AH-Sépharose 4B-acide isocaproïque pour lequel nous obtenons les meilleures activités spécifiques. Cependant, le comportement de l'enzyme après chromatographie d'affinité ne nous permet pas d'envisager favorablement une étape supplémentaire de purification.

CHAPITRE IV

PROPRIETES PHYSIQUES

Dans ce chapitre, nous décrivons l'étude de l'action de l'enzyme de Pancréas de cobaye sur un certain nombre d'amides et de peptides, son activité en présence d'effecteurs, son comportement en fonction de la température et du pH du milieu réactionnel, de la concentration en substrat L-leucine amide. Nous proposons également une estimation du poids moléculaire apparent en utilisant parallèlement la gel filtration sur Sephadex G 200 et l'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Pour l'étude de ces propriétés physiques, nous avons utilisé, sauf exception que nous signalerons, des préparations enzymatiques partiellement purifiées provenant d'un couplage de chromatographies de DEAE-Cellulose et de Sephadex G 200 ; mais pour les expériences réalisées en présence d'ions magnésium, nous avons fait appel à des préparations partiellement purifiées par couplage de chromatographie de gel filtration et de chromatographie d'affinité sur Sepharose AH-4B/ - acide isocaproïque.

I - SPECIFICITE DE L'ENZYME PANCREATIQUE.

A/ - ACTION SUR LES AMIDES.

Un certain nombre d'amides ont été utilisées comme substrat pour la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye. La concentration des différents substrats est identique à celle de la L-leucine amide des dosages à savoir $10 \mu\text{M/ml}$ de tampon borate de sodium à 1 p. 100. Cette action se trouve résumée dans le Tableau XIII. Il nous a paru intéressant de la comparer à celle citée par SMITH pour le rein de porc (Tableau XIV).

Nos résultats montrent que l'enzyme de pancréas n'a que peu d'action sur les solutions de substrats chromogènes dérivés de la leucine.

Une solution enzymatique partiellement purifiée sur colonne de Sepharose AH-4B - acide isocaproïque, n'hydrolyse pas le substrat classique des arylamidases (E.C. 3.4.11.2.) : la L-leucyl β naphtylamide (82). L'action sur la L-leucyl paranitro anilide est insignifiante, la vitesse relative d'hydrolyse est 90 fois plus petite que celle de la L-leucine amide.

Ces deux résultats nous permettent d'écartier la possibilité de toute contamination de nos préparations partiellement purifiées de leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye par une arylamidase (83).

B/ - ACTION SUR LES PEPTIDES.

Nous avons utilisé les dipeptides suivants : L-leucyl-glycine, L-histidyl-L-histidine, DL-alanyl-L-asparagine, Glycyl-L-proline et les tripeptides : L-leucyl-glycyl-glycine, glutathion.

Ces substrats sont à une concentration de $10 \mu\text{M/ml}$ de tampon borate à p. 100, ils sont incubés en présence de la solution enzymatique, soit sans ions magnésium, soit en présence d'ions magnésium pendant 2 heures à 37°C .

L'hydrolyse des différents substrats a été suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier Whatman I avec le mélange solvant butanol/acide acétique/eau. (Les conditions de chromatographie et de révélation se trouvent dans l'appendice technique, page 125). Nous présentons dans les pages suivantes les photographies de ces chromatogrammes.

(82) ARST H.E., MANNING R.T..... (83) HANSON H., GLÄSSER D.....

REMARQUES :

En utilisant des préparations de leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye partiellement purifiées, nous avons constaté que :

- La L-leucyl-glycine est totalement hydrolysée en présence d'ions Mg^{2+} , mais seulement partiellement hydrolysée en l'absence d'ions Mg^{2+} après 2 heures d'incubation à 37° C (Fig. n° 23).

- Dans les mêmes conditions en présence d'ions Mg^{2+} , la L-leucyl-diglycine est incomplètement hydrolysée. La distinction entre la glycine et le peptide glycyL-glycine, susceptibles de se former dans le milieu réactionnel a été possible en révélant le chromatogramme avec une solution saturée de ninhydrine dans le butanol (voir appendice page 125). L'acide aminé et le peptide apparaissent différemment colorés, ce qui nous permet de penser qu'au cours de l'hydrolyse, il se forme de la L-leucine et le peptide glycyL-glycine (Fig. n° 24).

- Le substrat glycine-L-proline (Fig. n° 25) n'est pas hydrolysé même en présence d'ions Mg^{2+} .

- La L-histidyl-L-histidine est partiellement hydrolysée ainsi que la DL-alanyl-L-asparagine. Pour ce dernier peptide, il faut toutefois tenir compte qu'en principe seule la forme L est hydrolysée (Fig. 26 et 27).

- Le glutathion est retrouvé intact après incubation avec l'enzyme de pancréas en présence d'ions Mg^{2+} (Fig. n° 28). Cette étude a été suivie en électrophorèse à pH 3,9 dont les détails techniques déjà cités se trouvent page 125.

CONCLUSION SUR L'ACTION SUR LES AMIDES ET LES PEPTIDES.

- En ce qui concerne l'activité sur les amides, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par SMITH (84) (Tableau XIV) est limitée, outre la L-leucine amide, à trois substrats L-tyrosinamide, L-phénylalaninamide et glycinamide. Pour ces trois substrats, nous constatons une certaine similitude d'action des leucine aminopeptidases de rein de porc et de pancréas de cobaye.

- La comparaison de l'activité peptidasique des enzymes de rein de porc et de pancréas de cobaye est limitée car nous ne disposons pas de résultats quantitatifs mais, pour les substrats étudiés, l'action des deux leucine aminopeptidases nous paraît offrir des spécificités voisines. L'activité peptidasique du rein de porc figure dans le Tableau XV. L'examen de ce tableau nous montre que les substrats L-leucyl-glycine et L-leucyl-glycyl-glycine sont hydrolysés au même degré en présence d'ions Mg^{2+} : le taux d'hydrolyse relative est de 70 p. 100 par rapport à la L-leucine amide. Nous avons noté pour l'enzyme de pancréas une hydrolyse totale de la L-leucyl-glycine et incomplète pour la L-leucyl-glycyl-glycine.

- La glycyl-L-proline n'est pas hydrolysée par la leucine aminopeptidase de rein de porc, il en est de même avec l'enzyme de pancréas de cobaye.

- Il n'est évidemment guère possible de comparer en toute rigueur l'action de la leucine aminopeptidase du rein de porc sur les substrats L-histidyl-glycine et L-alanyl-glycine à celle de la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye sur les substrats L-histidyl-L-histidine et DL-alanyl-L-asparagine. Notons toutefois que tous ces substrats sont partiellement hydrolysés.

- Par contre, le glutathion qui comporte une liaison γ glutamyl n'est pas modifié, ce qui confirme les notions classiquement admises.

TABLEAU XIII

Substrats	Vitesse Relative d'hydrolyse	Substrats	Vitesse Relative d'hydrolyse
L-leucine amide	100	L-leucine amide	100
L-tyrosinamide	3,5	L-glutamine	5
L-phénylalaninamide	7	Glycinamide	0
Oxamide	0	Acétamide	0
Propionamide	0	Butyramide	0
N-valéramide	0	L-asparagine	0
Benzamide	0	D-asparagine	0
Nicotinamide	0	DL-asparagine	0

ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE SUR D'AUTRES AMIDES.

- Les solutions de substrat, à une concentration de 10 μ M/ml de tampon borate de sodium à 1 p. 100, sont mises à incuber en présence d'une solution enzymatique partiellement purifiée provenant d'un couplage chromatographique DEAE-Cellulose-Sephadex G 200, décrit pages 35 et 39.

Le substrat L-leucine amide est pris comme référence.

TABLEAU XIV

Hydrolysis of Amino Acid Amides

The value for L-leucinamide is given as 100 and for the other amides as the relative rate

Substrate	Mn ⁺⁺ activation			Mg ⁺⁺ activation		
	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate
	γ per ml.			γ per ml.		
L-Leucinamide	0.082	14,000	100	0.163	6600	100
DL-Norleucinamide	0.082	14,200	101	0.163	7200	105
DL-Norvalinamide	0.082	11,800	84	0.163	7200	109
DL- α -Amino- η -butyramide	0.082	5,100	38	0.163	5100	77
L-Alaninamide	1.37	470	3.4	3.26	325	4.9
Glycinamide	1.64	18	0.13	3.26	7	0.10
L-Isoleucinamide	0.328	2,800	20	0.543	1120	17
L-Alloisoleucinamide	1.01	1,000	7.1			
L-Valinamide	0.328	2,400	17			
L-Tryptophanamide	0.328	3,400	24			
L-Phenylalaninamide	0.541	3,600	28	0.543	1140	17
L-Tyrosinamide	0.328	2,200	16			
L-Histidinamide	0.541	2,700	19	0.543	650	10
L-Lysinamide	1.37	1,000	7.1	3.26	800	12
L-Argininamide	1.01	1,000	7.1			
L-Isoglutamine	1.37	310	2.2			
L-Aspartic acid diamide	1.37	410	2.9	3.26	250	3.8
L-Serinamide	1.64	106	0.76			
L-Prolinamide	1.64	100	0.71			
Hydroxy L-prolinamide	1.64	80	0.57			
DL- α -Aminocaprylamide	0.082	10,500	75			
DL-Tertiary leucinamide	1.64	16	0.11			
α -Aminoisobutyramide	1.64	0	0			
D-Leucinamide	1.64	0	0	3.26	0	0



- ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU REIN DE PORC SUR LES AMIDES d'après SMITH. (85).

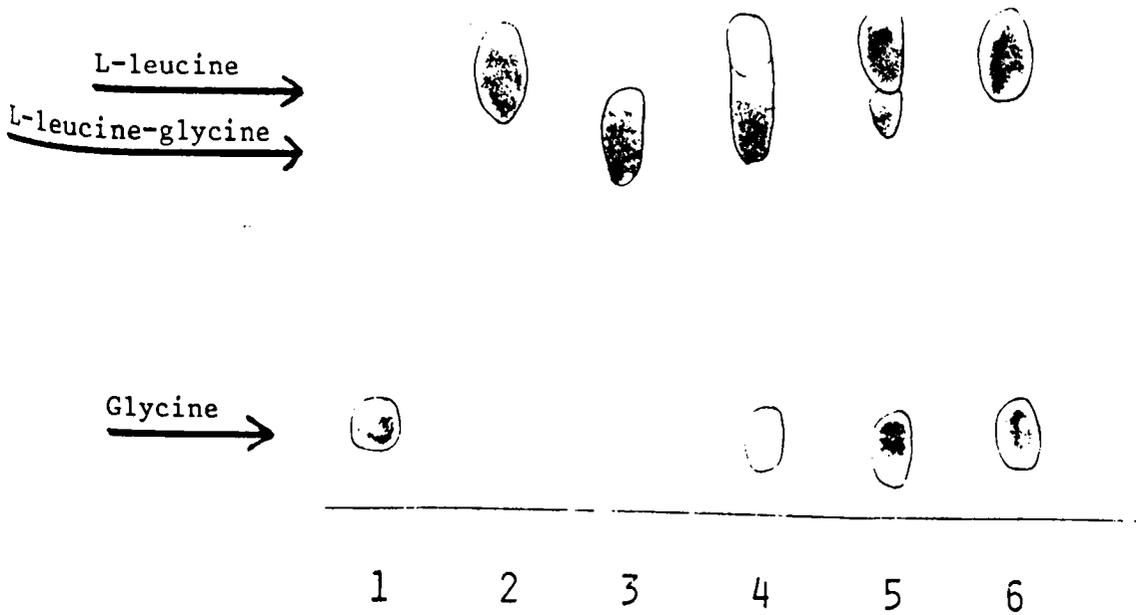


FIG. 23 : HYDROLYSE DU SUBSTRAT L-LEUCYL-GLYCINE par la leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier dans le solvant butanol/acide acétique/eau.

1-2-3 : Dépôts de $50\mu\text{l}$ des témoins suivants :
glycine (1), L-leucine (2), L-leucyl-glycine (3).

4 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme
substrat L-leucyl-glycyl-sans incubation

5 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme
substrat L-leucyl-glycine incubé 2 heures à 37°C .

6 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme
substrat L-leucyl-glycine incubé 2 heures à 37°C en présence d'ions Mg^{2+} .

* Le mélange enzyme substrat s'établit comme suit :
0,5 ml de substrat L-leucyl-glycine à $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de tampon borate à 1 p. 100.
0,1 ml d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.

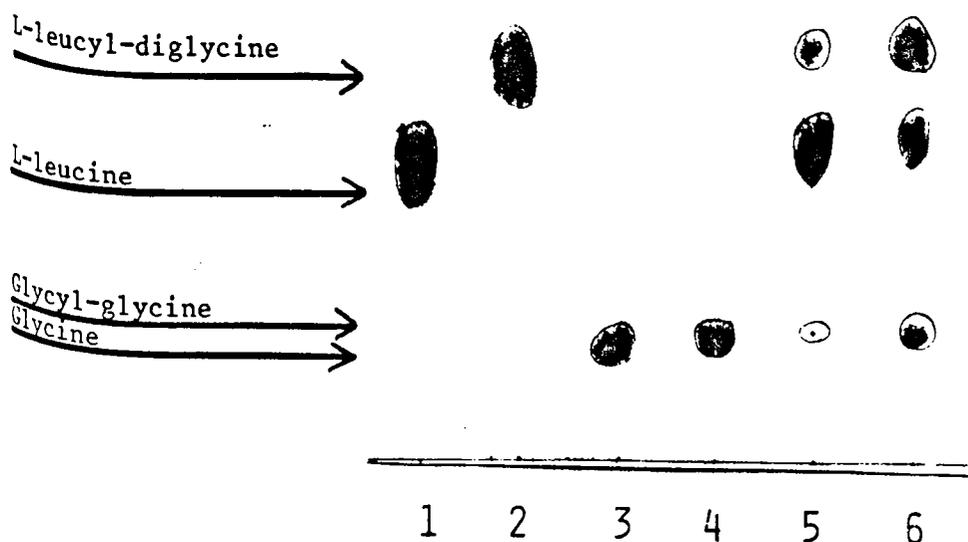


FIG. 24 : HYDROLYSE DU SUBSTRAT L-LEUCYL-GLYCYL-GLYCINE par la leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier dans le solvant butanol/acide acétique/eau.

1-2-3-4 : Dépôts de $50\mu\text{l}$ des témoins suivants :
L-leucyl-glycyl-glycine (1), L-leucine (2), Glycine (3), Glycyl-glycine (4) à une concentration de $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de tampon borate à 1 p. 100.

5 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat L-leucyl-diglycine renfermant des ions Mg^{2+} , sans incubation préalable.

6 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* identique au précédent, incubé 2 heures à 37°C .

* Le mélange enzyme substrat s'établit comme suit :
- 0,5 ml de substrat L-leucyl diglycine à $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de tampon borate à 1 p. 100.
- 0,1 ml d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.

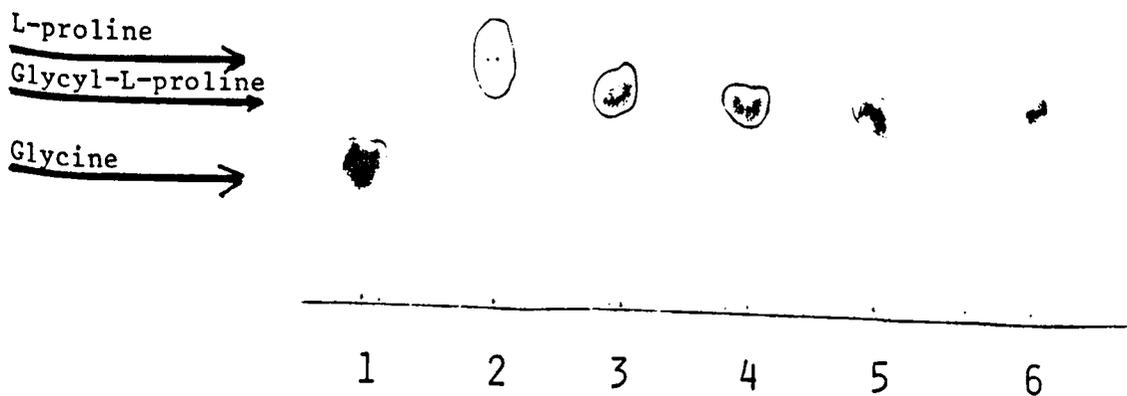


FIG. 25 : HYDROLYSE DE LA GLYCINE-L-PROLINE par la leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier dans le tampon borate butanol/acide acétique/eau.

1-2-3 : Dépôts de $50\mu\text{l}$ des témoins glycine (1), L-proline (2), Glycine-L-Proline (3) à une concentration de $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de tampon borate à 1 p. 100.

4 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange enzyme* substrat glycine-L-proline sans incubation.

5 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange*enzyme substrat glycine-L-proline incubé deux heures à 37°C .

6 : Dépôt d'un mélange* enzyme substrat glycine-L-proline contenant des ions Mg^{2+} incubé deux heures à 37°C .

* Le mélange enzyme substrat comprend :

- 0,5 ml de glycine-L-proline à $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de borate de sodium à 1 p. 100.
- 0,1 ml d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.

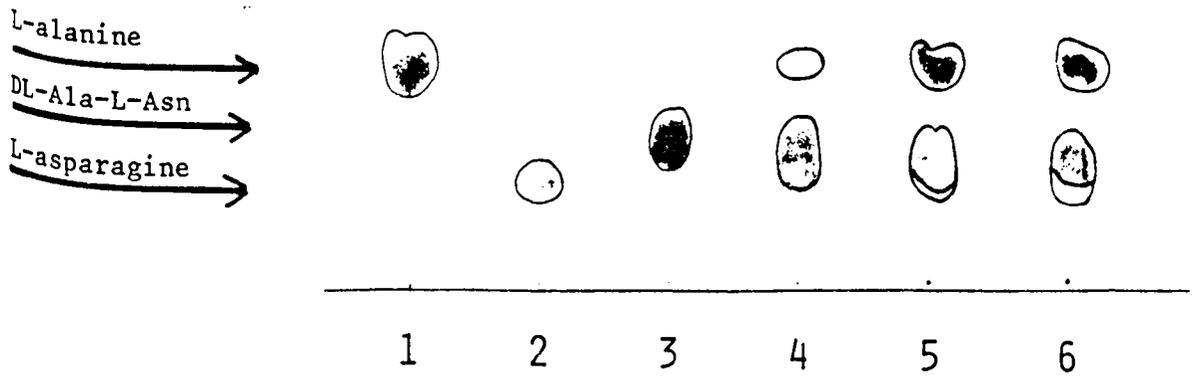


FIG. 26 : HYDROLYSE PAR LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE DU PEPTIDE DL-ALANYL-L-ASPARAGINE suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier dans le mélange solvant butanol/acide acétique/eau.

- 1-2-3 : Dépôts de $50\mu\text{l}$ des témoins L-alanine (1), L-asparagine (2), DL-alanyl-L-asparagine (3). Ces témoins sont à une concentration de $10\mu\text{M/ml}$ de tampon borate à 1 p. 100.
- 4 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat sans incubation préalable.
- 5 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat incubé 2 heures à 37°C .
- 6 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat renfermant des ions Mg^{2+} incubé 2 heures à 37°C .

* Le mélange enzyme substrat comprend :

- $0,5\text{ ml}$ de DL-alanyl-L-asparagine à $10\mu\text{M/ml}$ de borate de sodium à 1 p.100.
- $0,1\text{ ml}$ d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.

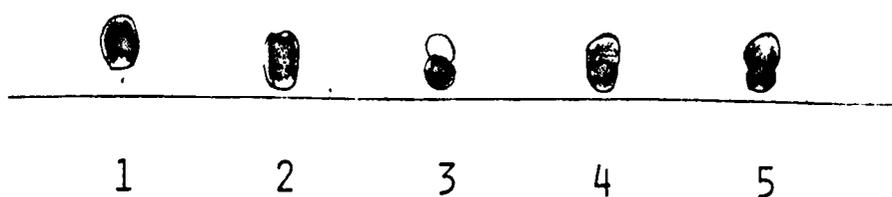


FIG. 27 : HYDROLYSE DE LA L-HISTIDYL-L-HISTIDINE PAR LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE suivie par chromatographie unidimensionnelle sur papier.

- 1-2 : Dépôts de $50\mu\text{l}$ des témoins L-histidine (1), L-histidyl-L-histidine(2)
- 3 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat L-histidyl-L-histidine sans incubation.
- 4 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat identique au précédent incubé 2 heures à 37°C .
- 5 : Dépôt de $50\mu\text{l}$ d'un mélange* enzyme substrat L-histidyl-L-histidine incubé 2 heures à 37°C en présence d'ions Mg^{2+} .

* Le mélange enzyme substrat comprend :

- 0,5 ml de L-histidyl-L-histidine à $10\mu\text{M}/\text{ml}$ de borate de sodium à 1 p.100
- 0,1 ml d'une solution enzymatique de pancréas de cobaye.

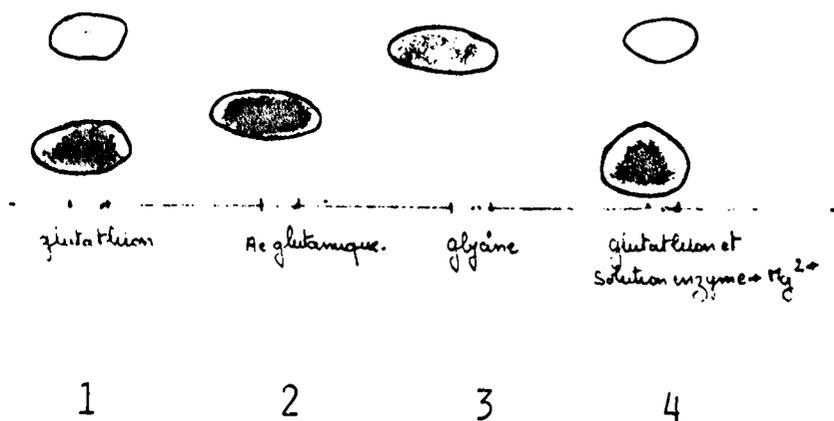


FIG. 28 : ETUDE ELECTROPHORETIQUE A pH 3,9 DE L'ACTION DE LA LEUCINE AMINO-PEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE SUR LE GLUTATHION.

1-2-3 : Dépôts de 50 μ l des témoins glutathion (1), acide glutamique (2) et glycine (3). Ces témoins sont à une concentration de 10 μ M/ml de tampon borate à 1 p. 100.

4 : Dépôt de 50 μ l d'un mélange* enzyme substrat incubé 2 heures à 37° C en présence d'ions Mg²⁺.

* Le mélange enzyme substrat se compose de :

- 0,5 ml de glutathion à 10 μ M/ml de borate de sodium à 1 p. 100.
- 0,1 ml de solution enzymatique de pancréas de cobaye.

Hydrolysis of Dipeptides

The relative rates are compared with the value of 100 for L-leucinamide as given in Table VI.

Substrate	Mn ⁺⁺ activation			Mg ⁺⁺ activation		
	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate
	<i>γ per ml.</i>			<i>γ per ml.</i>		
L-Leucyl-L-leucine	0.137	13,900	100	0.163	3500	53
L-Leucyl-D-leucine			0.7*			
L-Leucyl-L-isoleucine	0.137	8,900	64	0.163	3300	50
L-Leucyl-D-isoleucine	1.64	10	0.07	3.26	0	0
L-Leucyl-L-valine	0.137	7,400	53			
L-Leucyl-D-valine	1.64	40	0.29			
L-Leucyl-L-alanine	0.137	9,000	64			
L-Leucyl-D-alanine	1.37	340	2.4			
L-Leucylglycine	0.137	12,000	86	0.163	4700	71
L-Leucyl-L-phenylalanine	0.541	3,600	26	0.543	1160	18
L-Leucyl-D-phenylalanine	1.64	60	0.43	3.26	49	0.70
L-Leucyl-L-tyrosine	0.541	2,800	20			
L-Alanyl-L-leucine	0.137	13,000	93			
L-Alanylglycine	1.37	1,300	9.4			
L-Histidylglycine	0.137	5,600	40	0.163	580	9.0
Glycyl-L-leucine	0.274	1,100	10			
Glycylglycine	1.64	165	1.1			
Glycyl-L-tryptophan	1.64	260	1.8			
Glycyl-L-tyrosine	1.64	520	3.6			
Glycyl-L-proline	1.64	0	0			
L-Prolylglycine	1.64	330	2.4	3.26	70	1.1
Hydroxy-L-prolylglycine	1.01	320	2.3			
β-Alanyl-L-histidine	1.64	0	0			
D-Leucylglycine	1.64	0	0	3.26	0	
D-Leucyl-L-tyrosine	1.64	0	0			

* From the data of Smith, Spackman, and Polglase (7).

Action of Aminopeptidase on Various Types of Substrates

The relative rates are compared with the value of 100 for L-leucinamide as given in Tables VI and VII.

Substrate	Mn ⁺⁺ activation			Mg ⁺⁺ activation		
	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate	Enzyme concentration	C ₀	Relative rate
	<i>γ per ml.</i>			<i>γ per ml.</i>		
Glycyl-L-leucinamide	0.274	6,000	43	0.548	6,200	94
L-Leucyl-L-alaninamide	0.137	18,000	129	0.548	5,400	82
L-Leucyl-L-valinamide	0.137	14,300	102	0.163	3,900	58
L-Alanyl-L-leucinamide	0.137	26,000	186	0.082	12,300	186
L-Histidylglycylglycine	0.274	5,800	41			
Triglycine*	1.64	330	2.4			
L-Leucylglycylglycine	0.137	16,800	120	0.082	4,600	70
Diglycyl-DL-leucylglycine	1.64	450	3.2			
Carbobenzoylglycyl-L-phenylalanine	3.16	0	0			
Acetyl-L-tyrosinamide	3.16	0	0			
Benzoyl-L-argininamide	3.16	0	0			
Acetyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanine	3.16	0	0			

* When triglycine was assayed with 0.025 M Versene, the activity was completely inhibited.



TABEAU XV : EXTRAIT DE L'ARTICLE DE SMITH (86) SUR L'ACTIVITE PEPTIDASIQUE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC.

II - LES EFFECTEURS DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE.

A/ - LES ACTIVEURS.

Les leucine aminopeptidases (E.C. 3.4.11.1.) sont des métallo-enzymes activées notamment par les cations bivalents Mn^{2+} et Mg^{2+} , nous avons vérifié cette donnée sur une solution enzymatique partiellement purifiée provenant du couplage chromatographique DEAE-Cellulose-Sephadex G 200.

Il ressort de cette expérimentation que les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} produisent une augmentation importante de l'activité enzymatique, l'ion Co^{2+} a un effet plus modéré. Les résultats apparaissent ci-dessous : l'activité étant calculée par rapport à un témoin ne renfermant par d'ions, auquel nous donnons par définition la valeur 1.

<u>Ions</u>	<u>Vitesses Relatives d'hydrolyse</u>
Témoin	1
Mg^{2+}	5,75
Mn^{2+}	13,5
Co^{2+}	2,12

La technique opératoire est la suivante :

	L-leucine amide 10 μ M/ml de tampon borate	Solution ionique 200 μ M/ml de tampon borate	Tampon borate	Enzyme
Dosage	0,65 ml	0,35 ml		0,05 ml
Témoin	0,65 ml		0,35 ml	0,05 ml

L'ensemble est placé 30 minutes à 37° C.

Nous devons noter, pour des raisons pratiques, que les concentrations de 0,2 M en ions Mn^{2+} , Mg^{2+} et Co^{2+} en tampon borate à 1 p. 100 initialement utilisées provoquent la formation d'hydroxydes insolubles qui troublent les solutions et perturbent complètement les enregistrements en densité optique après quelques dosages. Pour les dosages en série, nous avons donc ramené la concentration ionique à 0,01 M.

Il nous a paru intéressant de reprendre en partie le processus expérimental de SMITH (87) et de HANSON (88) permettant de suivre l'action des cations Mg^{2+} et Mn^{2+} sur la leucine aminopeptidase en fonction du pH (voir pages 8 et 9).

SMITH (89) a utilisé pour cette étude une préparation enzymatique hautement purifiée de leucine aminopeptidase de rein de porc, HANSON (90) un homogénat et une enzyme cristallisée pour le cristallin de bovin.

Nous avons tracé des courbes comparables à partir d'un homogénat de pancréas, car la solution enzymatique partiellement purifiée par chromatographies sur DEAE-Cellulose et Sephadex G 200 est recueillie en quantité trop peu importante pour la réalisation d'une telle expérimentation.

a) Influence du temps de pré-incubation de l'enzyme en présence de solutions ioniques.

Différents temps de pré-incubation de l'enzyme à 37° C en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} 0,01 M en solution dans le tampon borate de sodium à l p. 100 ont été essayés. La courbe 29 tracée en étudiant le taux d'hydrolyse d'une solution de L-leucine amide par l'enzyme pré-incubée montre une inactivation partielle en fonction du temps de pré-incubation à 37° C. Nous avons retenu pour les expériences suivantes le temps de 15 minutes qui, parmi les temps étudiés, apporte le minimum de dénaturation thermique aussi bien pour les ions Mn^{2+} que pour les ions Mg^{2+} .

b) Influence des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} sur l'activité enzymatique d'un homogénat de pancréas en fonction du pH.

L'homogénat de pancréas a été amené à différentes valeurs de pH par addition de soude ou d'acide chlorhydrique, il a été ensuite soumis à une pré-incubation de 15 minutes à 37° C en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} 0,01 M dans le tampon borate à l p. 100, puis à une incubation de 30 minutes à 37° C avec le substrat L-leucine amide.

Les courbes obtenues (Fig. n° 30) montrent chacune deux optima vers les valeurs de pH 6,6 et 8.

En présence d'ions Mn^{2+} , on remarque que les optima se situent respectivement à pH 6 et 7,7 et sont donc légèrement décalés vers la zone acide.

- Le tracé obtenu en présence d'ions Mg^{2+} est superposable à celui de l'homogénat seul, compte tenu de l'activation apportée par l'ion métallique.

- L'existence de deux maxima d'activité peut s'expliquer par le fait que dans un homogénat brut de pancréas, les interférences avec d'autres protéases ne sont pas à exclure.

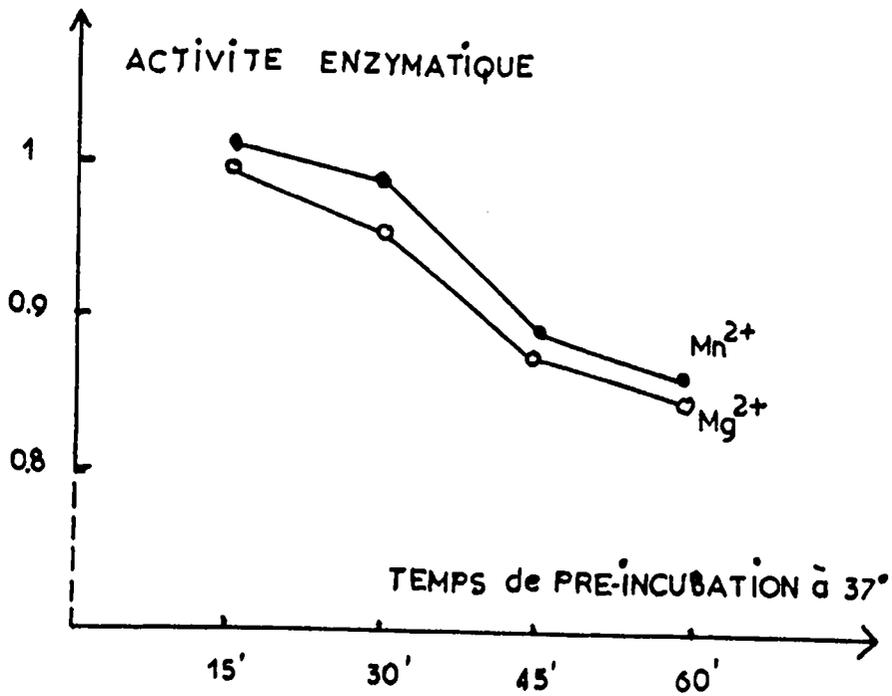


FIG. 29 : INFLUENCE DU TEMPS DE PRE-INCUBATION DE L'ENZYME DE PANCREAS EN PRESENCE DE SOLUTIONS IONIQUES 0,01 M SUR LE TAUX D'HYDROLYSE D'UNE SOLUTION DE L-LEUCINE AMIDE à 10 μ M/ml. L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.



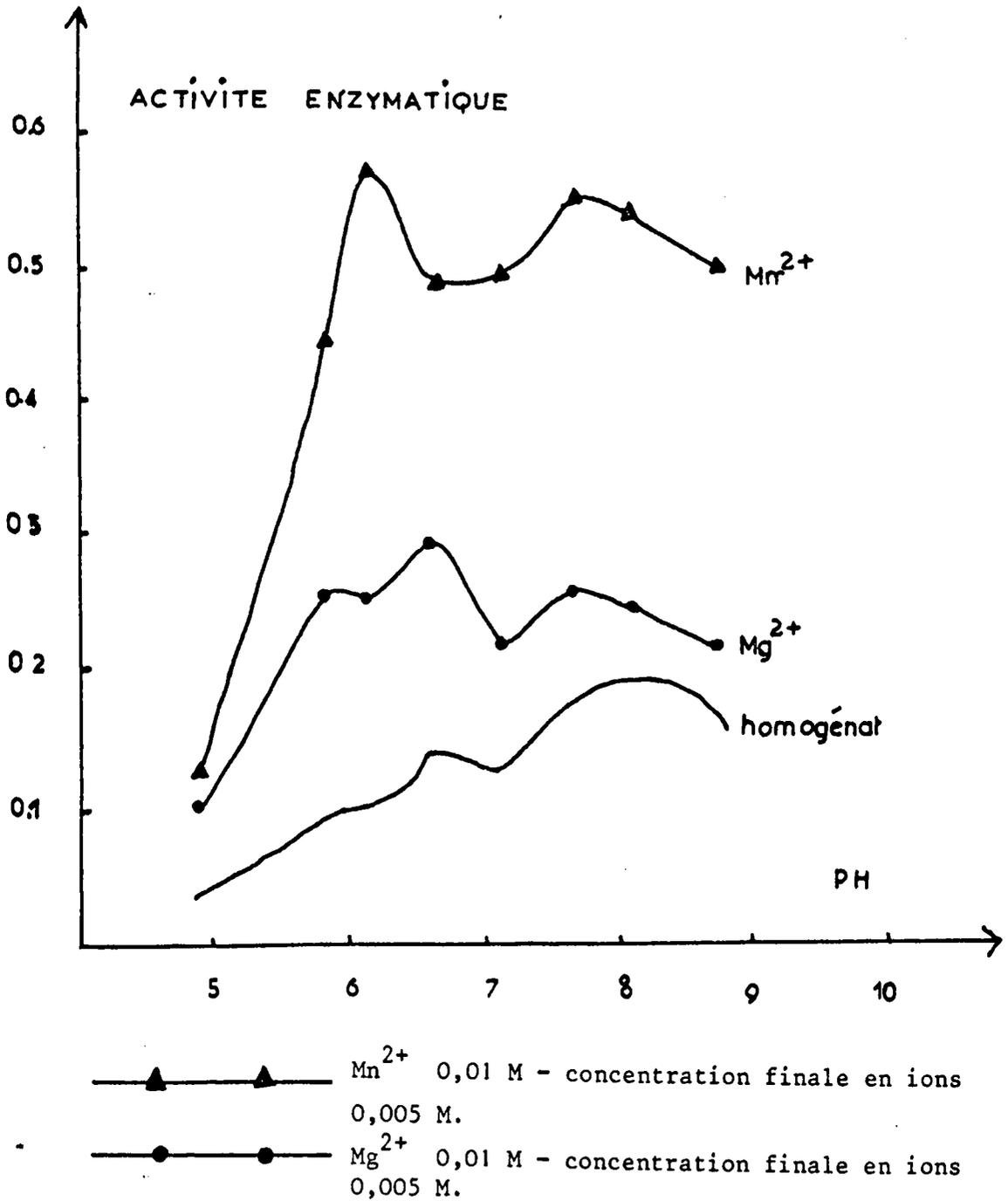


FIG. 30 : ACTION DES IONS Mn²⁺ ET Mg²⁺ SUR UN HOMOGENAT DE PANCREAS AMENE A DIFFERENTES VALEURS DE pH.

- L'enzyme est pré-incubée 15 minutes à 37° C en présence d'ions (0,2 ml d'enzyme + 0,2 ml de solutions ioniques).
- Le dosage de l'activité s'effectue sur une solution de L-leucine amide à 10 μ M/ml dans le borate de sodium à 1 p. 100.

L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.

B/ - LES INHIBITEURS.

a) Action des agents chélateurs.

La leucine aminopeptidase du pancréas est inhibée par l'E.D.T.A. et l'acide citrique tous deux étant des chélateurs puissants des ions Mn^{2+} et Mg^{2+} . De même, l'inhibition par les ions cyanure montre bien que nous sommes en présence d'une métallo-enzyme (91)*.

Il est à noter que l'inhibition par l'E.D.T.A. est réversible en présence d'ions Mg^{2+} . Nous avons procédé comme suit :

Une solution enzymatique partiellement purifiée a été répartie dans trois dialyses :

- la première dialyse a été faite contre de l'eau déminéralisée
- la deuxième contre une solution d'E.D.T.A. 0,001 M
- la troisième contre une solution d'E.D.T.A. 0,002 M.

La durée de la dialyse a été de 24 H à 4° C.

<u>- Résultats</u>	<u>Pourcentage de l'activité initiale</u>
Dialyse contre H_2O	61
Dialyse contre E.D.T.A. 0,001 M	11
Dialyse contre E.D.T.A. 0,002 M	11

La solution enzymatique dialysée contre l'E.D.T.A. a été ensuite soumise à une préincubation en présence d'ions Mg^{2+} : une pré-incubation de 10 minutes à 37° C en présence d'ions Mg^{2+} 0,001 M restaure 60 p.100 de l'activité, une préincubation en présence d'ions Mg^{2+} 0,005 M restaure plus que l'activité initiale et active de 50 p. 100 la solution enzymatique.

(91)* GRASSMAN W. and DYCKERHOFF H....

b) Action des agents bloquant les groupements thiols.

L'acide mono iodacétique et l'arsénite de sodium produisent une inhibition de l'activité enzymatique. Cette inhibition est totale dans le cas de l'acide mono iodacétique. Il y aurait ainsi au moins un groupement thiol bloqué par ces deux agents, qui serait nécessaire à l'activité enzymatique.

Le para chloro mercuribenzoate est sans action.

Pour ce dernier résultat, en contradiction avec l'hypothèse de l'existence de groupements thiols, indispensables à l'activité enzymatique, nous supposons que l'encombrement stérique apporté par le radical phényl interdit l'accès du produit utilisé au site actif de l'enzyme.

c) Autres agents.

Le nitrite de sodium qui se lie au groupement ϵ amino de la lysine inhibe de 60 p. 100 l'activité enzymatique. Nous avons également noté l'action inhibitrice de l'hydroxylamine à laquelle nous n'avons pu donner d'explication.

Les résultats de ces trois paragraphes apparaissent Tableau XVI.

d) Action des acides cétoniques et de quelques acides aminés ramifiés.

Nous avons placé cette étude dans un paragraphe indépendant en raison de l'importance de l'un de ces acides : l'acide isocaproïque, dans les essais de purification de la solution enzymatique (page 55 Chromatographie d'Affinité).

Le mode d'étude est identique à celui utilisé pour les inhibiteurs et les activateurs. Les produits sont en solution dans du tampon borate à 1 p. 100.

L'examen du Tableau XVII nous permet de constater que les acides dont la chaîne comporte 6 et 5 atomes de carbone inhibent, à la concentration de $30 \mu\text{M/ml}$, 67 à 70 p. 100 de l'activité de la leucine aminopeptidase, alors que les acides oxalo acétique et pyruvique (4 et 3 atomes de carbone) à la même concentration, sont nettement moins inhibiteurs (24 et 30 p. 100 d'inhibition).

Cependant, lorsque les acides à 6 et 5 atomes de carbone sont porteurs d'un groupement α ou ϵ aminé : L-leucine, L-isoleucine, DL-isoleucine, acide ϵ amino caproïque, l'inhibition est faible ou nulle. La L-valine se distingue du groupe car elle a une action activante à laquelle nous n'avons pas trouvé d'explication jusqu'à présent.

- La ramification des chaînes carbonées ne semble pas jouer un rôle de premier plan dans l'inhibition de l'enzyme.

- La présence d'un groupement α cétonique ne paraît pas changer l'ordre de grandeur de l'inhibition.

e) Action des alcools.

Nous savons depuis les travaux de SMITH que la leucine aminopeptidase

de rein de porc est inhibée par certains alcools (92)*. Cette inhibition serait due à la fixation de la chaîne aliphatique hydrophobe sur l'enzyme, elle croît avec la longueur de cette chaîne.

Nous avons étudié l'enzyme du pancréas vis-à-vis de cette inhibition. La solution enzymatique a été pré-incubée 30 minutes à 37° C en présence des alcools suivants :

- Méthanol - Ethanol - n propanol - n butanol - iso propanol - butanol secondaire. La concentration finale de l'alcool dans le milieu de pré-incubation est de 50 p. 100 (le n-butanol et le butanol secondaire donnent à cette concentration une émulsion instable qui nécessite une agitation). L'enzyme a été ensuite mise à incuber en présence du substrat L-leucine amide. L'expérience a été réalisée avec un produit purifié par chromatographies sur DEAE-Cellulose et gel filtration, donc ne renfermant pas de magnésium, et avec une solution d'enzyme provenant d'une chromatographie d'affinité sur Sepharose AH-4B acide isocaproïque.

* α) La solution enzymatique est mise à préincuber en présence d'alcools sans ions Mg^{2+} .

<u>Produit</u>	<u>Pourcentage d'inhibition</u>
CH_3OH	29
$CH_3 - CH_2OH$	56
$CH_3 - CH_2 - CH_2OH$	86
$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2OH$	84

(92)* HILL R.L. and SMITH E.L....

TABLEAU XVI

Produit	Concentration/ml	Pourcentage de l'activité initiale
E.D.T.A.	200 μ M	3
	100 μ M	5
Acide citrique	200 μ M	0
	100 μ M	0
Cyanure de sodium	100 μ M	0
	25 μ M	12
Acide monoiodacétique	200 μ M	0
Arsénite de sodium	100 μ M	58
	50 μ M	58
	25 μ M	66
pCMB*	10 μ M	100
Nitrite de sodium	200 μ M	42
Hydroxylamine	100 μ M	0
	50 μ M	50
	25 μ M	62

RESULTATS DE L'ACTION DE DIFFERENTS INHIBITEURS SUR L'ENZYME DE PANCREAS DE COBAYE.

L'étude a été réalisée comme suit :

	L-leucine amide 10 μ M/ml de tampon borate	Inhibiteur en solution dans du tampon borate	Tampon borate	Enzyme
Dosage	0,65 ml	0,35 ml		0,1 ml
Témoin	0,65 ml		0,35 ml	0,1 ml

L'ensemble est placé 30 minutes à 37° C.

* PCMB = parachloromercuribenzoate.



TABLEAU XVII

Produit	Pourcentage de l'activité initiale		Produit	Pourcentage de l'activité initiale	
	10 μ M/ml	30 μ M/ml		Concentration	10 μ M/ml
Ac. isocaproïque	91	23	Ac. ϵ amino caproïque	96	98
Ac. α céto isocaproïque	78	32	L-leucine	86	100
Ac. α céto valérique	91	23	L-isoleucine	100	94
Ac. α céto glutarique	85	30	DL-isoleucine	100	100
Ac. oxaloacétique	95	76	L-valine	111	172
Ac. pyruvique	95	70	DL-valine	81	77

ACTION DES ACIDES CETONIQUES ET DES ACIDES RAMIFIES SUR LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE.

La réaction enzymatique est réalisée comme suit :

	L-leucine amide 10 μ M/ml de tampon borate	Solution d'acides cétoniques ou d'acides aminés à 30 ou 10 μ M/ml de tampon borate	Tampon borate	Enzyme
Dosage	0,65 ml	0,35 ml		0,1 ml
Témoin	0,65 ml		0,35 ml	0,1 ml

L'ensemble est placé 30 minutes à 37° C.



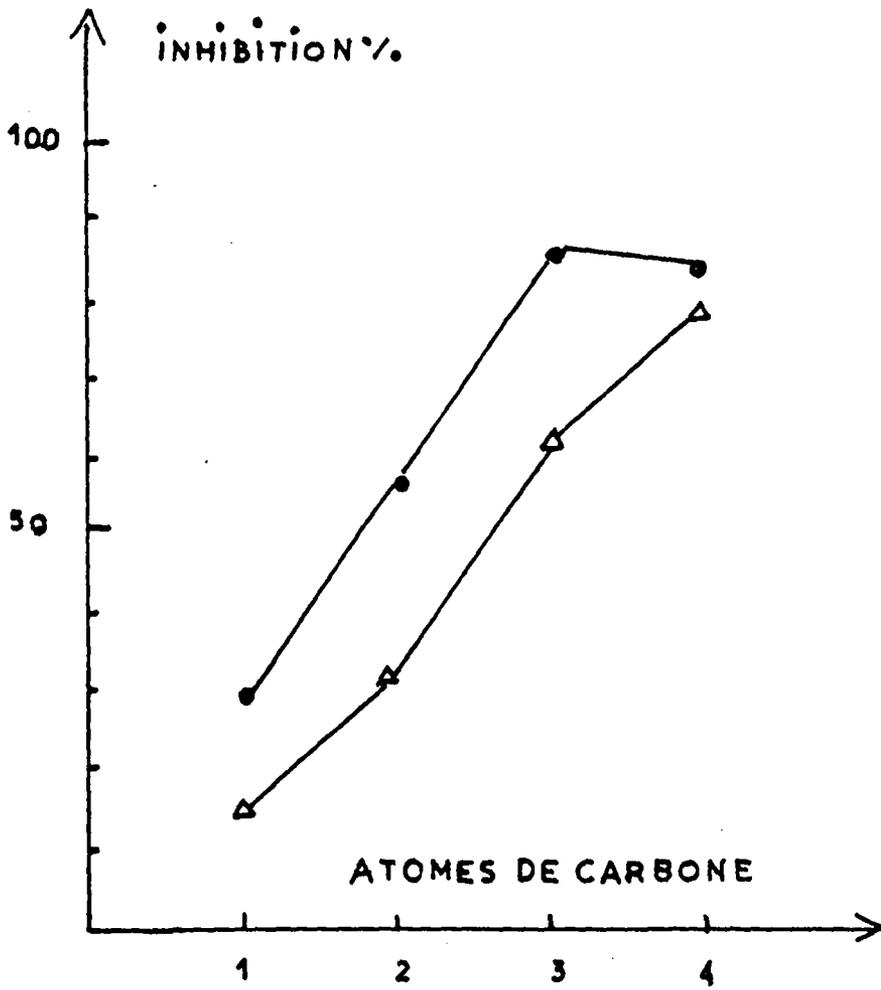


FIG. 31 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'INHIBITION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS PAR LES ALCOOLS ALIPHATIQUES EN FONCTION DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE DE LA CHAINE.

—●— dosage sans ions Mg²⁺

—△— dosage en présence d'ions Mg²⁺

III - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

A. DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION.

Ces essais comme les précédents ont été réalisés sur une solution enzymatique partiellement purifiée par chromatographie sur DEAE-Cellulose et gel filtration sur Sephadex G 200. Le milieu réactionnel a été porté pendant 30 minutes dans une gamme de températures allant de 35° C à 65° C. La représentation graphique (Fig. 32) nous indique une température optimale d'action entre 49 et 52° C.

Nous pouvons comparer cette valeur à celle obtenue pour l'enzyme isolée du cristallin de bovin : l'enzyme purifiée présente une activité optimale vers 56-57° C (93)*.

B. DENATURATION PAR LA CHALEUR.



La solution enzymatique a été portée à différentes températures pendant une minute puis mise à incuber en présence du substrat durant 20 minutes à 37° C. La même expérience a été renouvelée en pré-chauffant l'enzyme 10 minutes.

Nous donnons ci-après (Fig. 33) l'expression graphique des résultats obtenus.

L'examen de ces deux courbes révèle une légère activation par la chaleur à 50° C qui correspond à la température optimale d'action de l'enzyme précédemment déterminée. Nous noterons également la relative résistance à la chaleur, en effet, préchauffée une minute à 80° C l'enzyme conserve 45 p. 100 de son activité.

* (93) HANSON H., GLABER D...

C. EFFETS DE CONGELATIONS ET DE DECONGELATIONS SUCCESSIVES.

2 ml de la solution d'enzyme ont été soumis à 8 congélations et décongélations successives et dosés après chaque décongélation. La figure 34 indique que 80 p. 100 de l'activité sont conservés pendant les 5 premières opérations pour diminuer de 60 p. 100 après la dernière congélation.

Notons aussi que le produit conservé 1 mois au congélateur garde 50 p. 100 de son pouvoir enzymatique.

CONCLUSION SUR L'ETUDE DE L'INFLUENCE DES VARIATIONS THERMIQUES.

Des expériences de ce paragraphe, nous pouvons relever la thermostabilité de la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye partiellement purifiée.

L'optimum d'action se situe à 50° C ; pré-chauffée 10 minutes à 60° C, elle conserve 90 p.100 de son activité ; placée 1 minute à 80° C, l'enzyme est active pour 45 p. 100 de l'activité initiale. Elle résiste à 5 congélations et décongélations successives.

Cette thermostabilité rapproche à nouveau les enzymes du rein de porc et de pancréas de cobaye.

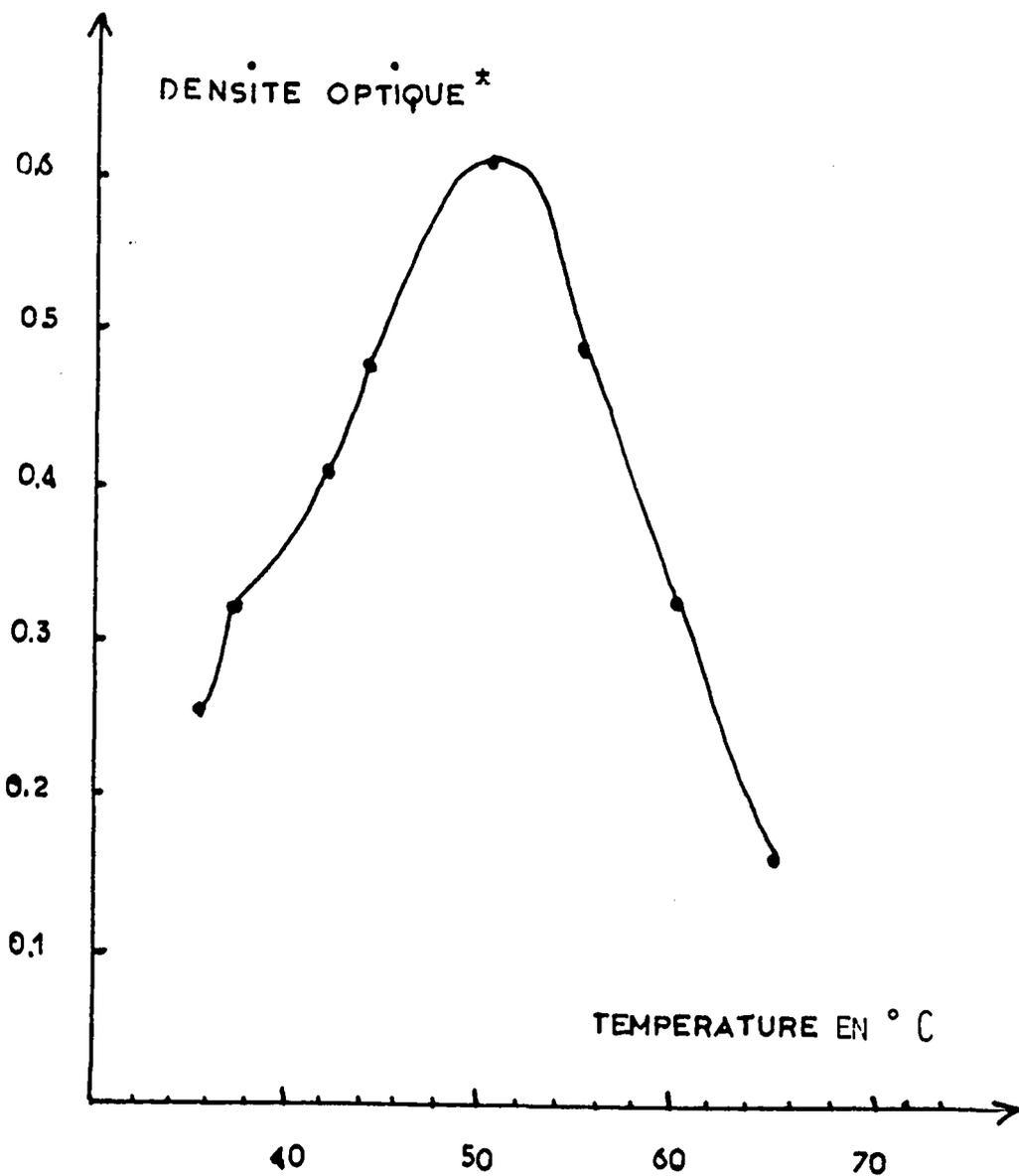


FIG. 32 : DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION DE L'ENZYME DE PANCREAS DE COBAYE PARTIELLEMENT PURIFIEE.

* L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique du BERTHELOT.

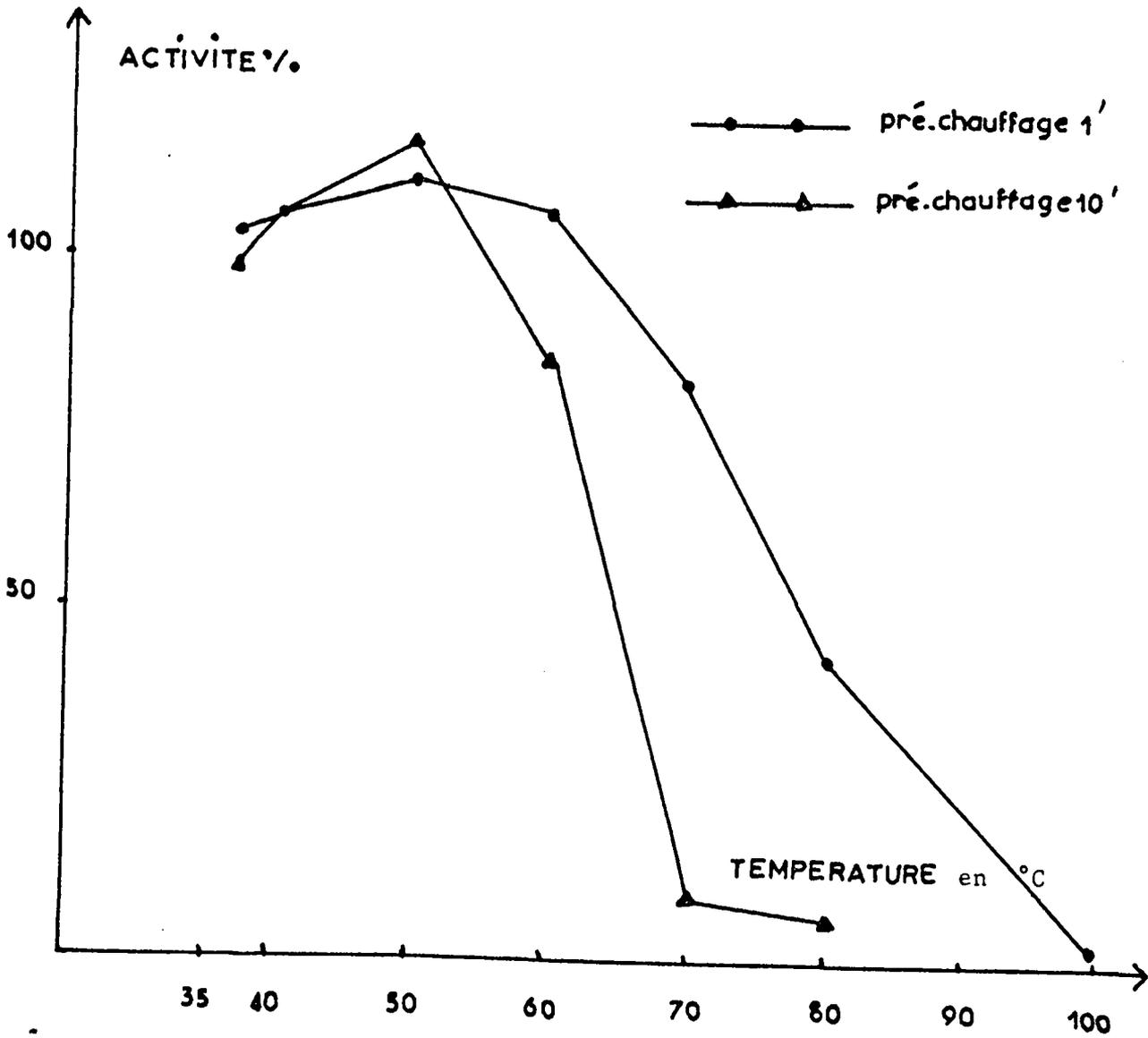


FIG. 33 : ETUDE DE LA THERMOSTABILITE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS. La solution enzymatique partiellement purifiée est préchauffée une minute ou dix minutes à différentes températures avant sa mise en incubation avec le substrat L-leucine amide.



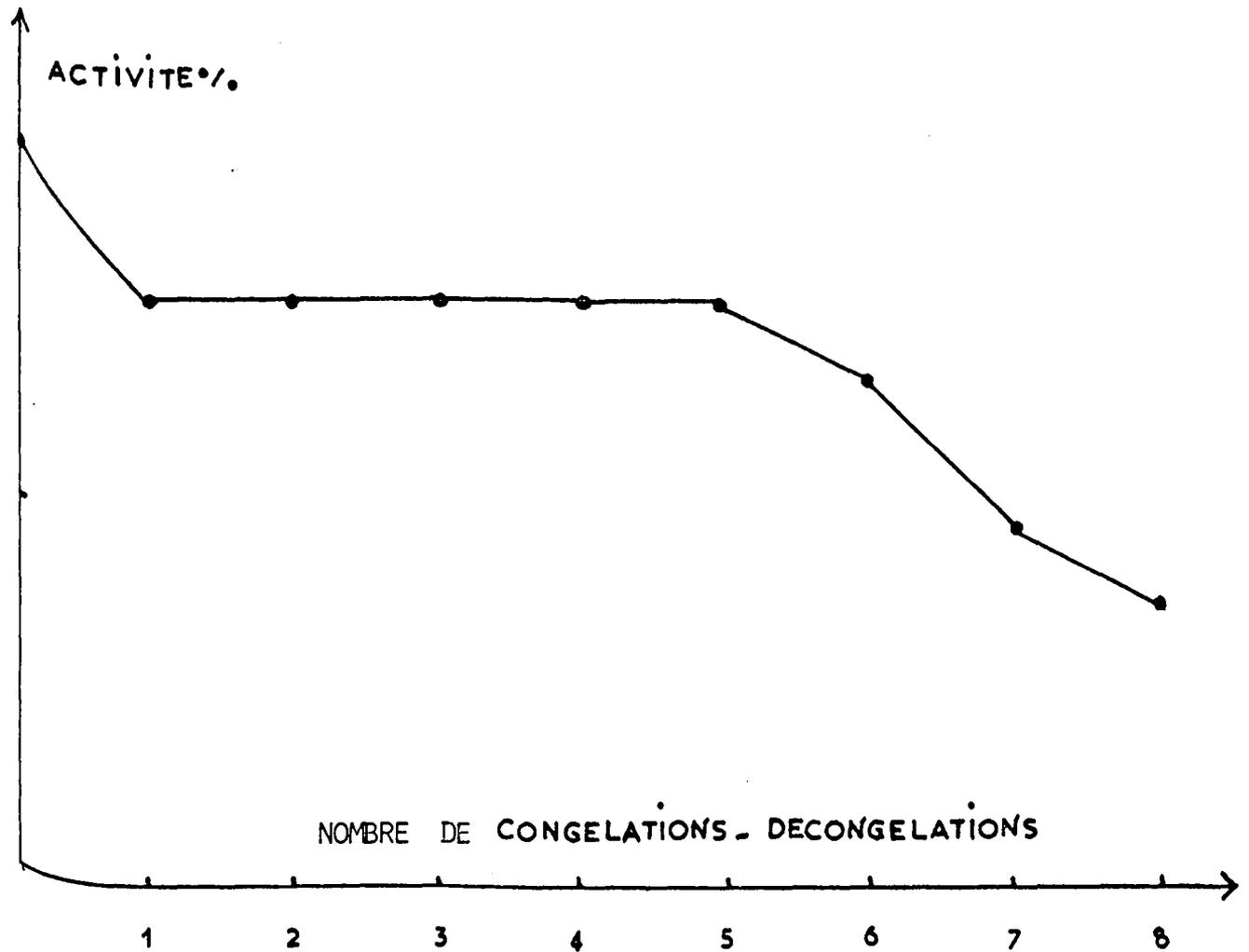


FIG. 34 : ETUDE DES EFFETS DE CONGELATIONS REPETEES SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'UNE SOLUTION DE LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS.

IV - ETUDE DU pH OPTIMAL D'ACTION.

La solution substrat L-leucine amide à $10 \mu\text{M}/\text{ml}$ a été portée à différentes valeurs de pH par addition de soude N/1, N/10 et d'acide chlorhydrique N/10. La gamme de pH s'étalant de pH 2,5 à pH 12.

0,5 ml de L-leucine amide ajustée au pH désiré et 0,1 ml de solution d'enzyme purifiée sur colonne de DEAE-Cellulose et Sephadex G 200, ont été ensuite mis à incuber 20 minutes à 37°C . Les résultats sont traduits par la courbe 35. L'activité montre un optimum à la valeur de pH 10 pour diminuer très rapidement au-delà. Notons que les dosages habituels ont lieu à pH 8,8.

Ce pH optimal d'action est plus alcalin que celui enregistré par SMTIH (pH 9) pour le rein de porc (94).

V - INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION.

L'étude de l'influence du temps d'incubation à 37°C sur le milieu réactionnel a montré (Fig. 36) que la réaction enzymatique est linéaire entre 0 et 60 minutes.

Nous travaillons habituellement aux temps $T = 20$ minutes ou $T = 30$ minutes.

VI - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

Des solutions de L-leucine amide : 100 - 80 - 50 - 40 - 25 - 12,5 - 10 - 6,25 - 5 - 3,25 et 2,5 mM dans du tampon borate à 1 p. 100 ont été mises à incuber à 37° C pendant 20 minutes en présence de l'enzyme pancréatique purifiée sur colonnes de DEAE-Cellulose et de Sephadex G 200. Pour chacun des dosages effectués, des témoins enzymes et substrats ont été déduits du dosage. Nous devons noter que pour les concentrations élevées en L-leucine amide 100 - 80 - et 50 mM, l'hydrolyse spontanée du substrat donne des enregistrements de densités optiques supérieurs à 0,7. Cette zone de lecture étant imprécise, nous n'avons pas tenu compte de ces points pour le tracé de la courbe $\frac{1}{V} = f \frac{1}{s}$

La valeur de la constante de Michaelis obtenue est de 15×10^{-3} .

La même expérience a été réalisée en utilisant une solution enzymatique provenant d'une chromatographie d'affinité donc contenant des ions Mg^{2+} .

La valeur de la constante de Michaelis est alors de $7,1 \times 10^{-3}$. (Fig. 37).

L'enzyme du pancréas activée par le magnésium présente une affinité accrue pour son substrat en présence des cations bivalents.

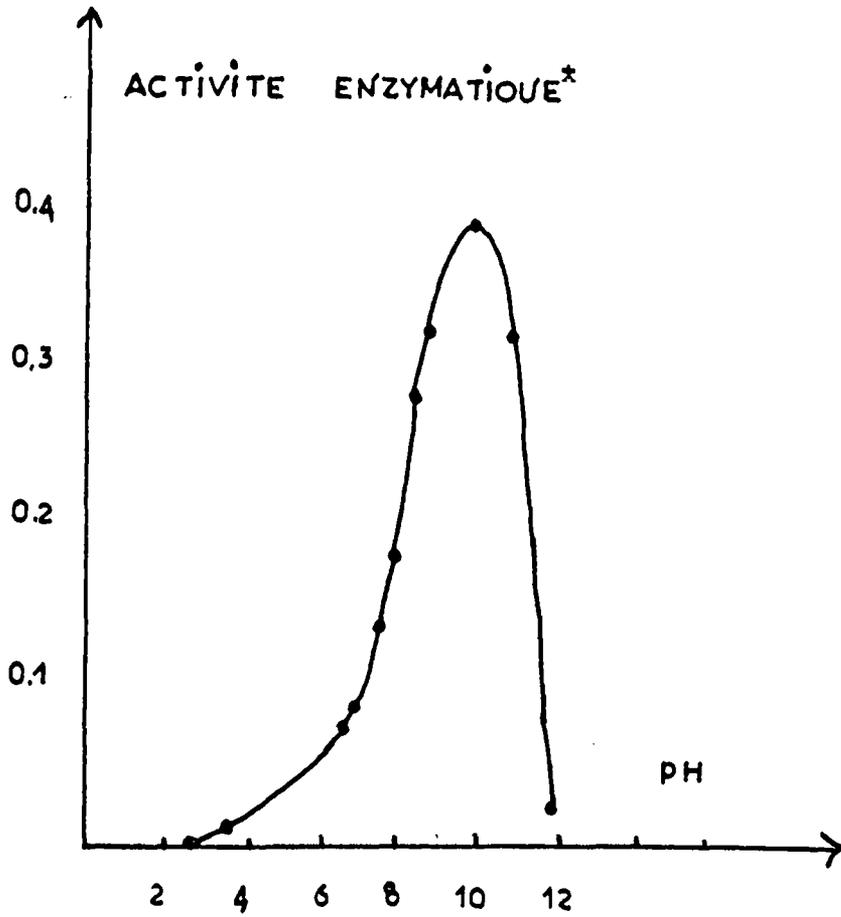


FIG. 35 : DETERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION DE L'ENZYME DU PANCREAS.
La leucine aminopeptidase est mise à incuber en présence du
substrat L-leucine amide amené à différentes valeurs de pH.

* L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.

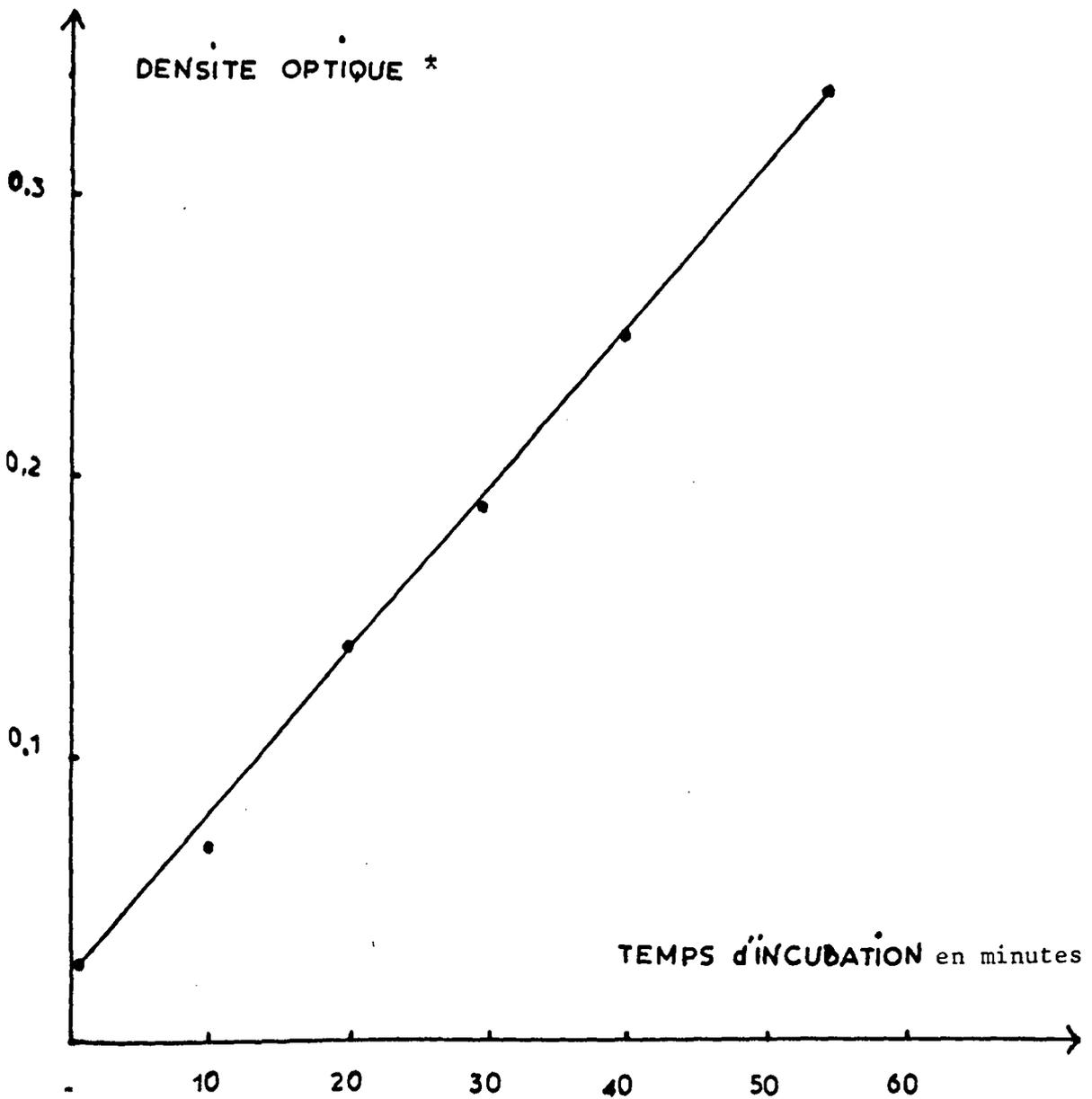


FIG. 36 : INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION A 37° C SUR L'HYDROLYSE DU SUBSTRAT L-LEUCINE AMIDE A 10 μ M/ml DANS DU TAMPON BORATE DE SODIUM.

* L'activité enzymatique est exprimée par la densité optique de la réaction de BERTHELOT.



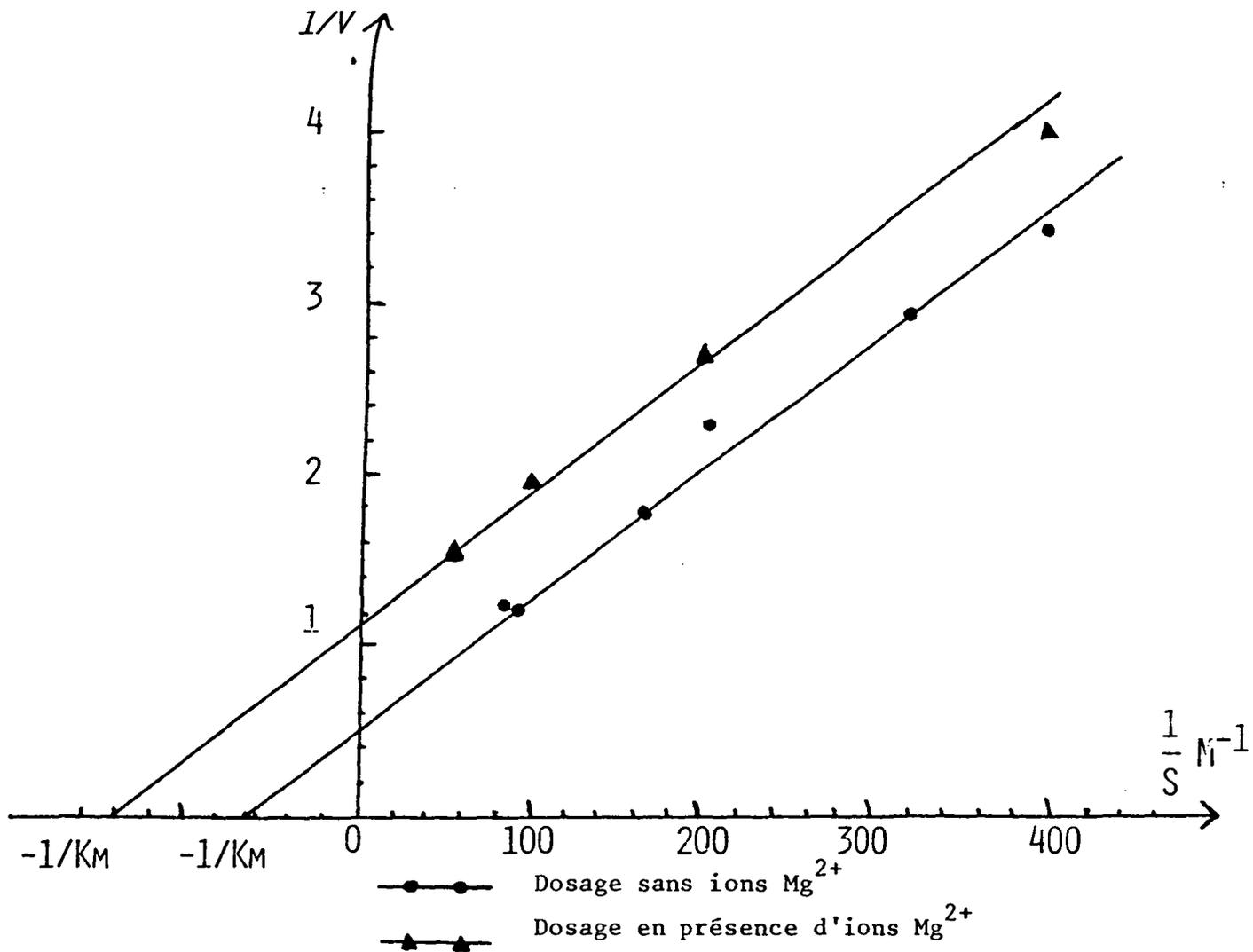


FIG. 37 : ETUDE DE L'AFFINITE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE POUR LE SUBSTRAT L-LEUCINE AMIDE (Représentation de LINEWEAVER et BURCK.)



VII - ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE.

A/ - PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.

La poudre de Sephadex G 200 Catégorie "Fine" (40-120 μ) (PHARMACIA) a été, préalablement à la chromatographie, mise à gonfler pendant 5 jours dans du tampon phosphate M/45 pH 7,9 à 4° C suivant le procédé utilisé par ANDREWS (95) pour la détermination des poids moléculaires des protéines. La préparation de la colonne est identique à celle décrite dans la première partie (page 39).

Nous avons étalonné notre colonne de gel (60 x 1,5 cm) avec des protéines de poids moléculaire connus.

- le fibrinogène P.M. = 330 000
- les gamma-globulines P.M. = 150 000
- la sérum albumine P.M. = 68 000
- l'inhibiteur tryptique du soja P.M. = 25 000

L'élution se fait avec du tampon phosphate M/45 pH 7,9.

Les protéines ont été dosées par la méthode de LOWRY citée dans l'appendice technique, page 23.

Le profil de l'étalonnage est donné par la Figure n° 38.

Différents étalonnages ont donné les résultats suivants :

- pour la leucine aminopeptidase de pancréas : 269 000 - 270 000 - 260 000.

Cette estimation étant faite à \pm 10 p. 100.

La courbe n° 39 donne l'expression du poids moléculaire en fonction des fractions recueillies.

Le poids moléculaire a été estimé à $270\ 000 \pm 10$ p. 100, donc comparable à celui donné par SMITH (96) pour le rein de porc et par HANSON (97) pour le cristallin de bovin. Ces deux poids moléculaires ayant été déterminés par ultracentrifugation.

B/ - PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE.

La solution enzymatique a été soumise à une ultracentrifugation analytique en gradient de saccharose 5-20 p. 100.

Nous avons utilisé pour cette expérience un produit partiellement purifié sur colonnes de DEAE-Cellulose et Sephadex G 200 et un homogénat amené à pH 7,9. Les différentes fractions obtenues ont été dosées en activité enzymatique et en protéines.

L'ultracentrifugation a été étalonnée avec des protéines de poids moléculaire connu.

- Sérum albumine P.M. = 68 000
- Inhibiteur tryptique du soja P.M. = 25 000
- Gamma globulines P.M. = 150 000
- Fibrinogène P.M. = 330 000

Pour ce dernier étalon, des résultats discordants ont été obtenus aussi ne figurent-ils pas dans les courbes n° 40 et 41. L'instabilité du fibrinogène en ultracentrifugation étant peut être due à sa conformation.

Sans permettre une estimation précise du poids moléculaire, cet étalonnage confirme que la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye a un poids moléculaire supérieur aux gamma-globulines, IgG, ce qui est compatible avec nos essais en gel filtration.

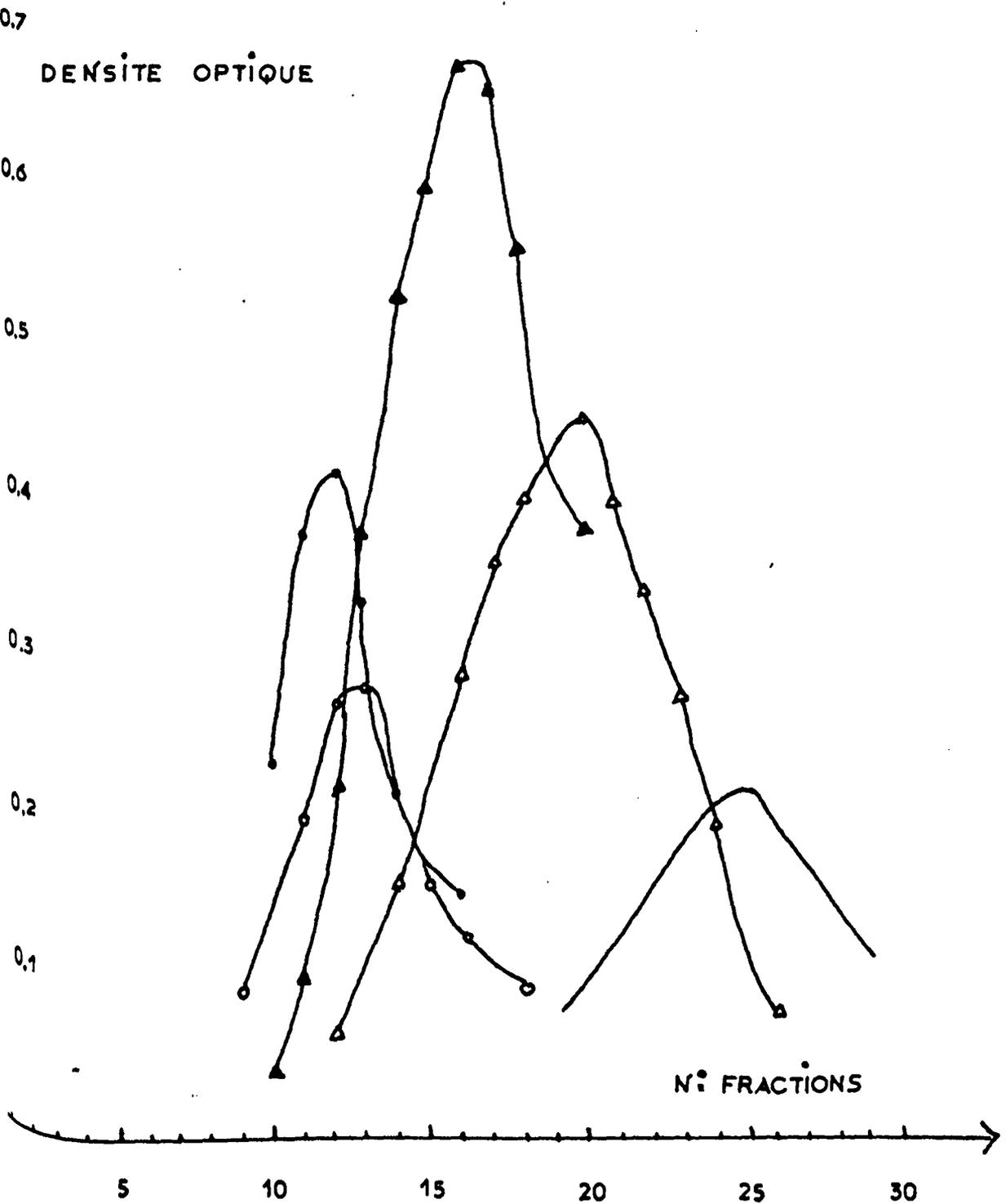


Fig. 38 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUCCESSIVES DE LA LEUCINE AMINO-PEPTIDASE DE PANCREAS DE COBAYE ($\circ-\circ$) ET DES TEMOINS SUIVANTS : γ -GLOBULINES ($\blacktriangle-\blacktriangle$) SERUM ALBUMINE ($\triangle-\triangle$) FIBRINOGENE ($\bullet-\bullet$) ET L'INHIBITEUR TRYPSIQUE DU SOJA (—) SUR COLONNE DE SEPHADEX G 200 (2,5 x 60) EQUILIBREE A + 4° C PAR DU TAMPON PHOSPHATE M/45, pH 7,9 ET ELUEE AVEC LE MEME TAMPON.



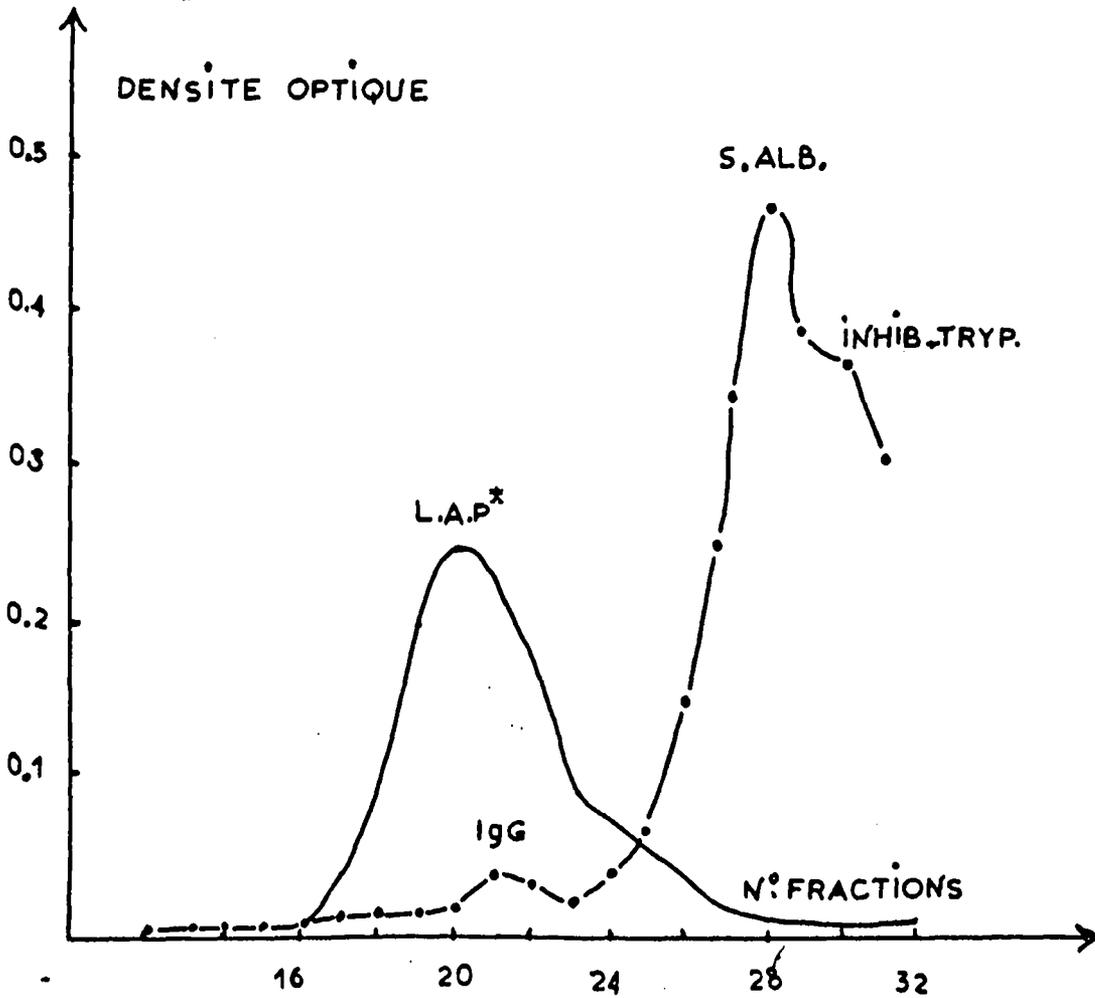


FIG. 40 : ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE EN GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100 D'UNE SOLUTION DE LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE PANCREAS PARTIELLEMENT PURIFIEE ET D'UN MELANGE DE γ GLOBULINES, DE SERUM ALBUMINE ET D'INHIBITEUR TRYPSIQUE DU SOJA.

Vitesse : 41 000 tours tours (286 000 g pour le rotor SW 41 Ti),

Durée : 7 H, Température : + 4° C.

*L.A.P. : Leucine aminopeptidase.

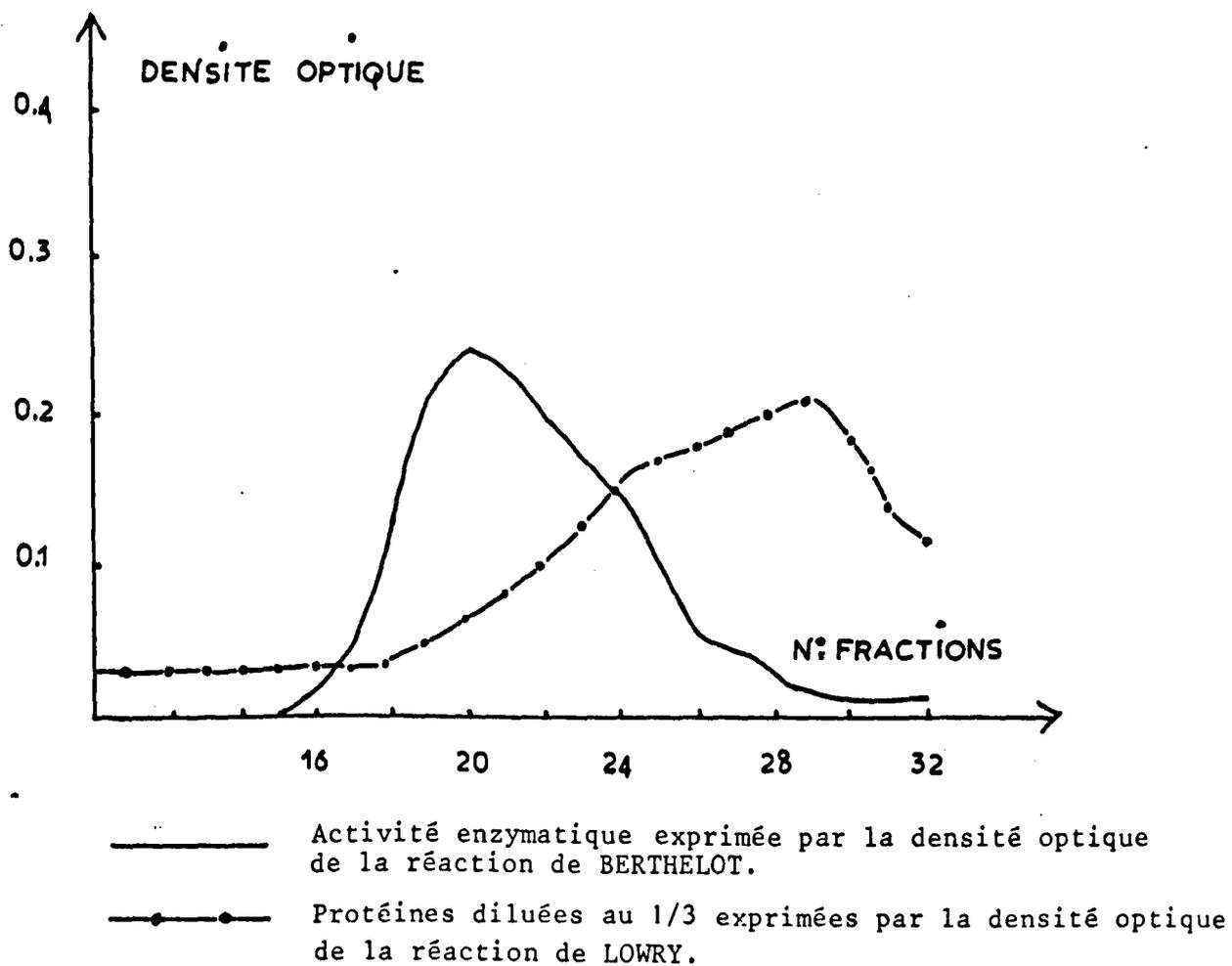


FIG. 41 : ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100
D'UN HOMOGENAT DE PANCREAS AMENE A pH 7,9.

DUREE : 7 H (Vitesse 41 000 tours)

TEMPERATURE : + 4° C.



RESUME ET CONCLUSION

La leucine aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1.) est une enzyme activée par les cations bivalents Mg^{2+} et Mn^{2+} , elle peut hydrolyser la L-leucine amide aussi bien que les leucyl-peptides. Dans ce présent travail, nous avons mis en évidence dans le pancréas du cobaye, l'existence d'une enzyme qui justifie son appellation de leucine aminopeptidase.

Nous avons localisé l'activité enzymatique dans le surnageant de 105 000 g au cours d'une ultra-centrifugation de 1 heure dans du saccharose 0,25 M. Cette leucine aminopeptidase nous l'avons purifiée en partie en mettant en oeuvre différentes techniques, certaines sont classiques, telles la chromatographie sur échangeur d'ions sur DEAE-Cellulose et la gel filtration sur Sephadex G 200, d'autres ont nécessité une mise au point, ainsi la chromatographie d'affinité sur Sepharose AH-4B couplé à de l'acide isocaproïque.

Nous avons enrichi 76 fois une solution enzymatique de pancréas de cobaye par association de la chromatographie sur échangeur d'ions et de gel filtration.

La gel filtration sur Sephadex G 200 suivie d'une chromatographie sur gel de Sepharose AH-4B couplé à de l'acide isocaproïque nous a fourni une enzyme purifiée 45 fois. Malheureusement, le couplage des méthodes d'enrichissement ne se montre pas pleinement satisfaisant, la diminution des contaminants protéiques s'accompagnant le plus souvent d'une perte importante de l'activité enzymatique.

Il est à noter que la précipitation par les sels neutres utilisée par la plupart des auteurs ne donne aucun résultat utilisable avec l'enzyme de pancréas de cobaye.

L'étude de quelques propriétés physiques nous a permis d'établir un parallèle entre les leucine aminopeptidases décrites à ce jour dans la littérature et la leucine aminopeptidase du pancréas de cobaye.

L'activation de l'enzyme de pancréas de cobaye par les cations bivalents Mg^{2+} et Mn^{2+} , son inactivation par l'E.D.T.A. et l'acide citrique, chélateurs de ces mêmes cations, montrent qu'il s'agit d'une métallo-enzyme.

La spécificité de l'enzyme de pancréas de cobaye pour la L-leucine amide et les L-leucyl-peptides (L-leucyl-glycine, L-leucyl-diglycine) est très voisine de la spécificité des leucine aminopeptidases de rein et de muscle de porc.

La leucine aminopeptidase de pancréas de cobaye est thermostable comme l'enzyme de rein de porc qui diffère en cela de l'enzyme de la muqueuse intestinale de porc qui perd son activité même conservée au froid en présence d'ions Mn^{2+} .

Le pH optimum d'action de l'enzyme de pancréas se situe aux environs de pH 10, cet optimum est plus alcalin que celui des leucine aminopeptidases de rein et de muscle de porc (pH 9)

L'estimation du poids moléculaire de la leucine aminopeptidase du Pancréas de cobaye par ultra-centrifugation et par gel filtration sur Sephadex G 200, est de l'ordre de 300 000. Ce haut poids moléculaire est comparable à celui attribué aux enzymes déjà décrites.

Les valeurs des constantes de Michaelis : 15×10^{-3} et 7×10^{-3} en présence d'ions Mg^{2+} se rapprochent des valeurs de Km attribuées à la leucine aminopeptidase jusqu'à présent : 5×10^{-3} pour le muscle de porc (98) $5,2 \times 10^{-3}$ pour le rein de porc (99) et $3,12 \times 10^{-3}$ pour le cristallin de bovin (100).

Naturellement, beaucoup de problèmes n'ont pas encore été abordés dans notre étude, nous pensons à des études physico-chimiques plus précises :

- le haut poids moléculaire laisse présager l'existence de sous-unités.
- l'inhibition par l'E.D.T.A. et l'acide citrique implique qu'un cation bivalent est nécessaire à l'action de l'enzyme. Nous savons aussi qu'un groupement thiol est probablement mis en jeu dans le mécanisme d'action (inhibition par l'acide mono-iodacétique).

Le site actif de l'enzyme de pancréas de cobaye reste à explorer.

- Nous espérons enfin obtenir des préparations enzymatiques beaucoup plus enrichies par la mise en oeuvre de nouveaux moyens de purification ou par perfectionnement de ceux déjà utilisés notamment dans le domaine de la chromatographie d'affinité.

(98) JOSEPH R.L. and SANDERS W.J... (99) BRYCE G.F. and RABIN B.R....

(100) HANSON H., GLÄBER D., KIRSCHKE K...

APPENDICE TECHNIQUE

I - DOSAGE DE L'AMMONIAQUE.

- REACTIFS :

1) Eau bidistillée privée d'ammoniaque.

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

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 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	50 ml
- Acide acétique R.P. cristallisable (Prolabo)	50 ml

. Solution fille (conservation 1 semaine en chambre froide)

- Solution mère	1 ml
- Eau distillée	200 ml

5) Solution tampon phosphate

- Phosphate disodique 12 H ₂ O R.P. Prolabo	180 g
- Eau distillée q.s.p.	1000 ml
- Soude pure en pastilles R.P. (Prolabo)	6 g

6) Solution tamponnée d'hypochlorite préparée extemporanément.

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

N.B. : Se méfier des solutions anciennes d'hypochlorite surtout si elles ont séjourné à la lumière car elles entraînent une perte de la sensibilité.

7) La solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1000 ml et l'eau de rinçage sont additionnées d'un mouillant : le Brij 35 à raison de 0,5 ml de la solution de Brij 35 pour 1000 ml.

- Préparation de la solution de Brij.

- . Brij 35 (Atlas Chemie GMBH) 33 g
- . Eau distillée q.s.p. 100 ml

- Après dissolution à chaud, la solution de Brij est aussitôt filtrée sur coton cardé.

II - DOSAGE DES PROTEINES.

- REACTIFS

a) Solutions - mères :

1) Réactif de Folin-Ciocalteu

- Tungstate de sodium 100 g
- Molybdate de sodium 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 avec de l'eau déminéralisée et nous filtrons.

2) Solution de bicarbonate.

- 84 g de bicarbonate de sodium 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 4 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 dosage :

1) Solution de Folin-Ciocalteu préparée extemporanément

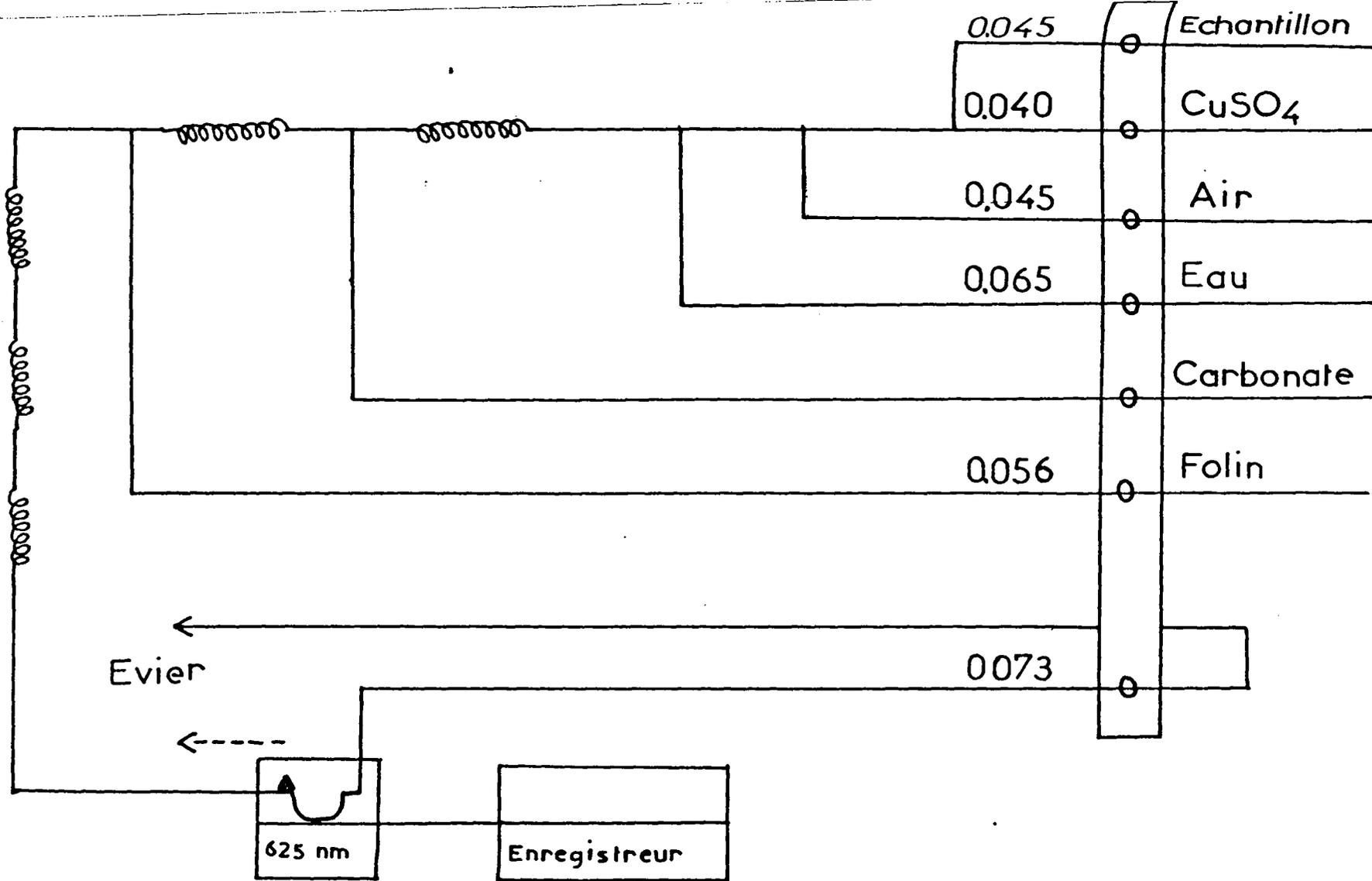
- Réactif de Folin 1 volume
- Eau déminéralisée 3 volumes

2) Solution cupro-alcaline préparée extemporanément

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

3) Solution de bicarbonate.

Solution mère filtrée avant l'emploi.



SCHEMA DU MONTAGE DE L'AUTO-ANALYSEUR TECHNICON POUR LE DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY.

III - ELECTROPHORESE SUR PAPIER A pH 3,9 :

La cuve à électro rhéophorèse utilisée est une cuve en toit qui permet la mesure des mobilités selon Machboeuf, Dubert, Rebeyrotte.

Le tampon d'électrodes est constitué par :

- Acide acétique R.P. (Prolabo) 40 ml
- Pyridine (Prolabo) 12 ml
- H₂O distillée q.s.p. 200 ml

Le pH de ce tampon est de 3,9. La durée de l'électrophorèse est de 4 heures sous 450 volts. Après la migration, la feuille séchée est pulvérisée par une solution de ninhydrine à 0,2 % dans du butanol normal saturé d'eau.

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

IV - CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE UNIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER DANS DU BUTANOL-ACIDE ACETIQUE.

Dans une ampoule à décanter, nous ajoutons :

- Butanol normal (Prolabo) 80 ml
- Acide acétique R.P. (Prolabo) 20 ml
- Eau déminéralisée 100 ml

L'ampoule est placée en chambre thermostatée de chromatographie ; au bout de trois heures, la phase aqueuse est prélevée et introduite dans la cuve à chromatographie, la feuille de dépôt et la cuve sont mises à saturer pendant deux heures avant la mise en route de la chromatographie. La durée

de la migration est de 20 heures. La feuille de chromatographie est révélée comme précédemment avec une solution de ninhydrine.

V - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS.

Nous avons utilisé de la DEAE-Cellulose DE 52 "Pré-Swollen".

1. Equilibrage de la résine.

La résine est équilibrée à pH 7,9 avec le tampon phosphate suivant :

- Composition du tampon phosphate.

- . Phosphate monopotassique 9,08 g/litre = Solution A
- . Phosphate disodique 12 H₂O 13,06 g/litre = Solution B

La valeur de pH 7,9 est obtenue en mélangeant 65 ml de solution A et 935 ml de solution B. La molarité de l'ensemble M/15 est amenée à M/45 par addition de 2 litres d'eau.

L'équilibrage de la résine est obtenu par changement de tampon jusqu'à ce que le surnageant atteigne la valeur de pH 7,9.

La résine est ensuite dégazée sous pression réduite à l'aide d'une trompe d'eau.

Les tampons utilisés par la suite seront également dégazés.

2) Remplissage de la colonne.

La DFAE-Cellulose ainsi préparée est versée dans une colonne de chromatographie de 3,5 cm de diamètre. Le tassement s'effectue par écoulement libre pendant une nuit. Puis le niveau est ajusté de façon à obtenir une hauteur de 16 cm de matériel chromatographique. Cette opération a lieu en chambre froide à + 4° C.

3) Elution.

L'élution de la colonne est réalisée au moyen d'un système de deux flacons communicants A et B (Voir Fig. 42 , page 128).

Le flacon A contient 225 ml de tampon phosphate M/45 pH 7,9, il est relié à la colonne et le flacon B contient 138 ml de solution de NaCl 0,5 M.

L'homogénéité du contenu du flacon A est assurée par une agitation magnétique douce.

Des fractions de 4 ml sont recueillies au moyen d'un collecteur.

Le débit constant de l'éluant est assuré par une pompe péristaltique montée en sortie de colonne.

La durée de l'élution est de 48 heures.

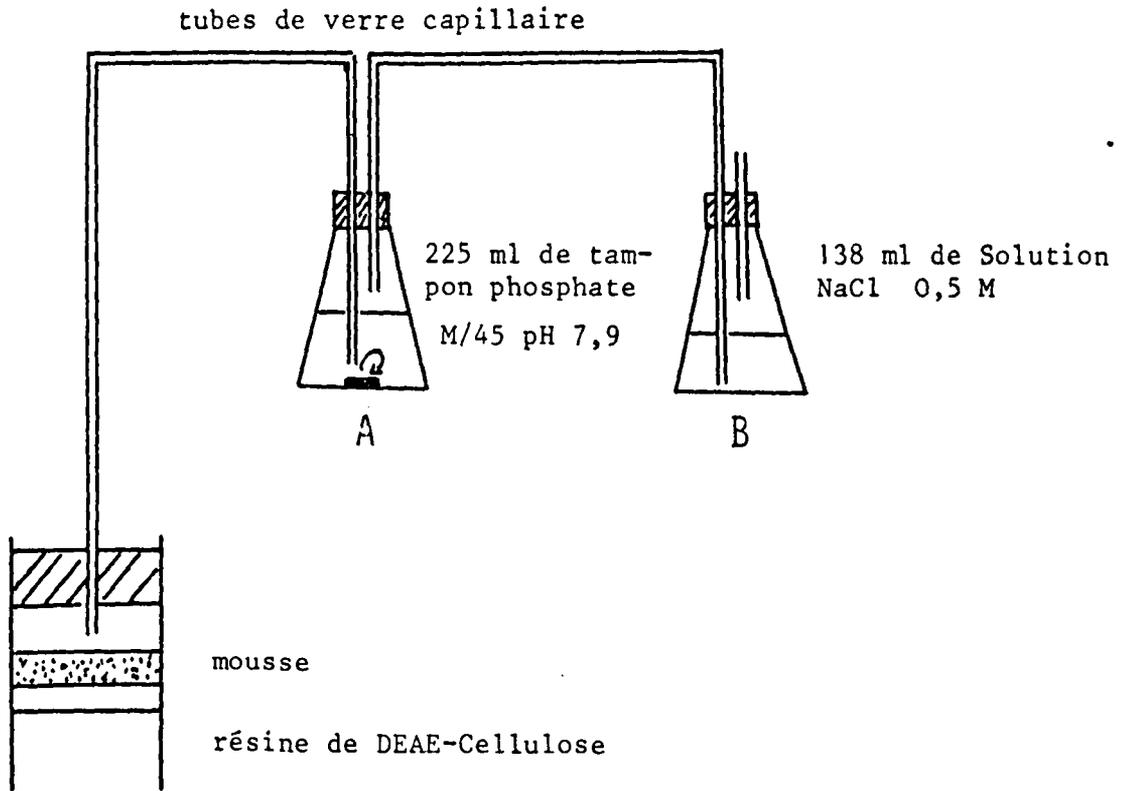


FIG. 42 : SCHEMA DE MONTAGE POUR L'ELUTION D'UNE COLONNE DE DEAE-CELLULOSE.

A et B = 2 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml.



VI - GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.

Nous avons utilisé du Sephadex G 200 Catégorie "Fine" (40-120 μ). Le gel est mis à gonfler 5 jours dans du tampon phosphate M/45 pH 7,9 et à température de + 4° C.

Avant introduction dans la colonne (2,5 cm de diamètre) le gel est dégazé sous vide partiel.

Le tassement s'effectue par écoulement libre de la colonne pendant deux jours puis le niveau est ajusté de façon à obtenir une hauteur de 60 cm de Sephadex.

VII- ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.

1) Matériel.

Les blocs de cellogel de 6 x 17 cm et 2,5 mm d'épaisseur sont fournis par SEBIA 92130 - ISSY-les-Moulineaux.

La capacité de séparation est d'environ 0,5 ml/5 cm. Ils sont conservés dans une solution de méthanol à 30 %.

La cuve à électrophorèse utilisée est une cuve de chez SEBIA - Chemetron Tank Modèle 2000 munie d'un portoir sur lequel sont déposés les blocs.

Le tampon d'électrode est un tampon Véronal/HCl.

- Véronal sodique (Prolabo)	17 g
- HCl N/1	23,5 ml
- H ₂ O distillée q.s.p.	1000 ml

Le pH de cette solution tampon est de 8,4.

2) Technique :

Les blocs sont essorés légèrement avec du papier filtre puis immergés dans le tampon de migration une nuit.

L'excès de tampon est éliminé par essorage avec du papier filtre. La gouttière de dépôt est faite à l'aide d'une lame métallique, ses dimensions : 2 mm de profondeur sur 4,5 cm de longueur, ceci à environ 3 cm du bord.

Les blocs sont ensuite placés sur le portoir, la gouttière de dépôt du côté cathodique.

Le pont entre la solution tampon et le bloc est constitué par un talon de papier Whatman I.

- 0,5 ml de la solution enzymatique sont déposés au maximum sur chaque bloc.
- une intensité constante de 25 mA est appliquée pour chaque bloc. La durée de la migration est de 6 heures.

a) Coloration et décoloration des blocs.

- coloration à l'Amidoschwarz :

- . 1 g d'Amidoschwarz
- . 90 ml de méthanol
- . 10 ml d'acide acétique

- durée de la coloration : 15 minutes.

- la décoloration se fait par bains successifs dans le liquide de lavage suivant :

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

- Conservation des blocs colorés dans une solution d'acide acétique à 5 %.

VIII- ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR BANDES DE CELLOGEL.

1) Matériel.

Les bandes de cellogel de dimensions 2,5 x 17 cm, la cuve à électrophorèse 2 PAC/5, les applicateurs "Chemetron" sont distribués par SEBIA. La capacité est de 3 microlitres/16 mm. Les bandes sont conservées dans du méthanol à 30 %.

- Tampon d'électrode.

- . Véronal sodique 8,24 g
- . Eau déminéralisée q.s.p. 1000 ml

Le pH est de 9,2.

2) Technique.

Les bandes sont essorées entre deux feuilles de papier filtre, puis elles sont immergées dans le tampon véronal 15 minutes. L'excès de tampon éliminé, les feuilles sont tendues sur le portoir, surface mate au-dessus. L'échantillon est déposé du côté cathodique.

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

a. Coloration et décoloration des bandes.

Les bandes sont colorées à l'Amidoschwarz pendant 15 minutes. La décoloration se fait par bains successifs dans une solution de méthanol-acide acétique.

- Acide acétique 100 ml
- Méthanol technique 900 ml

Les bandes ainsi colorées et décolorées se conservent dans une solution d'acide acétique à 5 %.

IX - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR SEPHAROSE AH-4B COUPLE AVEC DE L'ACIDE ISOCAPROIQUE.

1) Matériel.

Nous utilisons une résine AH-Sepharose 4B (Pharmacia). Pour un essai chromatographique, 1,5 g de résine (1 g = 4 ml de gel) sont lavés par une solution de NaCl 0,5 M, ceci afin d'éliminer le lactose, nous utilisons de 200 à 300 ml de solution chlorurée par gramme de poudre.

Le gel est ensuite lavé avec de l'eau déminéralisée. Cette opération se fait sur verre fritté.

- Le ligand, l'acide Me₄ valérique, est ajouté à la solution de gel à raison de 10 micromoles par ml de gel gonflé. L'ensemble est ajusté à pH 5 avec de la soude N/1 et placé sous agitation magnétique douce, à température ambiante.

- La carbodiimide 1-éthyl 3-(3-diméthylaminopropyl) solide est ajoutée à la solution de façon à avoir une concentration finale de 0,1 M.

- Le pH de la solution de gel est maintenu constant par addition de HCl N/1 l'augmentation du pH se manifeste surtout lors de la première heure.

- Au bout de 24 H, la solution de gel est lavée alternativement par des tampons de pH acide et basique, puis à l'eau déminéralisée, le gel est ensuite équilibré avec le tampon de chromatographie ou conservé dans le tampon acide en chambre froide.

2) - Tampons de lavage.

1) Tampon acide

. acétate de sodium 3 H ₂ O R.P.	13,6 g
. chlorure de sodium R.P.	58,4 g
. eau déminéralisée q.s.p.	1000 ml

L'ensemble est ajusté à pH 4 avec de l'acide chlorhydrique R.P.

2) Tampon basique

. bicarbonate de sodium R.P.	8,4 g
. chlorure de sodium R.P.	58,4 g
. Eau déminéralisée q.s.p.	1000 ml

L'ensemble est ajusté à pH 8 avec de la soude N/l.

BIBLIOGRAPHIE

	Page dans le texte	N° de Référence
ANDREWS P. - <u>Biochem. J.</u> , 1965, <u>96</u> , 565.	109	(95)
ARST H.E., MANNING R.T. - <u>The Amer. J. Med. Sci.</u> 1959, 120/598, 131/609.	72	(82)
BEHAL, J.F. and GWYNNE H.L. - <u>Clin. Chim. Acta</u> , 1968, <u>21</u> , 347-355.	6	(45)
BERGER J. and JOHNSON M.J. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1939, <u>130</u> , 641.	1	(3)
BERGER J., JOHNSON M.J. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1939, <u>130</u> , 655.	1	(10)
BERGER J., JOHNSON M.J. and PETERSON W.H., <u>J. Bacteriol.</u> , 1939, <u>36</u> , 521.	1	(11)
BISERTE G., BOULANGER P. et PAYSANT R. - <u>Bull.</u> <u>Soc. Chim. Biol.</u> , 1958, <u>40</u> , 2067.	22	(63)
BRYCE G.F. and RABIN B.R. - <u>Biochem. J.</u> , 1964, <u>90</u> , 509.	3 6 118	(33) (41) (99)
DANNEBERG A.M. and SMITH E.L. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1955, <u>215</u> , 45.	1	(12)
EMMELOT P. and VISSER A. - <u>Biochim. Biophys.</u> <u>Acta</u> , 1971, <u>241</u> , 273-289.	2 2 31	(24) (27) (67)
FELLICETTI D., GRUNDIG G.A. und HANSON H. - Acta Biol. Med. Germ., Band 26, 1971, 475-482	1	(21)
FLEISHER G.A., PANKOW M. and WARMKA C. - <u>Clin.</u> <u>Chim. Acta</u> , 1964, <u>9</u> , 254-258.	1	(19)
FLEISHER G.A., HUGH R., BUTT and KENNETH, HUIZENGA A. - <u>Ann. N.Y. Acad. Sci.</u> , 1968, <u>75</u> , 363.	1	(20)
FRUTON J.S. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1946, <u>166</u> , 721	1	(18)
FRUTON J.S., IRVING G.W.Jr and BERGMANN M. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1941, <u>138</u> , 249.	2	(26)
GARFIELD P., ROYER and ANDREWS P. - <u>The J. Biol.</u> <u>Chem.</u> , 1973, <u>248</u> , n° 5, 1807-1812.	55	(80)

	Page dans le texte	N° de Référence
GENTIT F. - Thèse de Médecine, Lille 1965	15	(62)
GIRARD M.L., ROUSSELET F. et KOCH M. - <u>Ann.</u> <u>Biol. Clin.</u> , 1963, <u>21</u> , 557-572.	15	(61)
GRASSMANN W. and HEYDE W. - <u>Z. Physiol. Chem.</u> 1929, <u>183</u> , 32.	6	(39)
GRASSMANN W. and DYCKERHOFF H. - <u>Z. Physiol.</u> <u>Chem.</u> , 1928, <u>179</u> , 41.	91	(91)
HANSON H., GLÄBER D., KIRSCHKE H. - <u>Z. Physiol.</u> <u>Chem.</u> , 1965, <u>340</u> , 107-125.	1 2 3 5 6 9 12 32 33 39 86 86 99 110 118	(9) (30) (35) (38) (40) (55) (58) (70) (72) (75) (88) (90) (93) (97) (100)
HANSON H., GLASSER D., LUDEWIG M., MANNSFELDT H.G. und JOHN M. - <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol.</u> <u>Chem.</u> , Juin 1967, Band 348, S. 689, 704.	7 31 72	(47) (66) (83)
HILL R.L. and SMITH E.L. - <u>Proc. Soc. Exp. Biol.</u> <u>Med</u> , 1956, <u>92</u> , 500.	6	(43)
HILL R.L. and SMITH E.L. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1965, <u>96</u> , 565.	94	(92)
JOHNSON M.J., JOHNSON H. and PETERSON W.H. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1936, <u>116</u> , 515,	1	(2)
JOSEPH R.L. and SANDERS W.J. - <u>Biochem. J.</u> , 1966, <u>100</u> , 827.	1 1 2 3 5 6 7 15 32 118	(8) (17) (31) (34) (37) (42) (50) (60) (69) (98)

	Page dans le texte	N° de Référence
KRETSCHMER K. and HANSON H. - <u>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</u> , 1968, <u>349</u> , 831.	8	(51)
KOELSCH R., LASCH J. und HANSON H. - <u>Acta. Biol. Med.</u> , 1970, Band 24, 833-846.	55	(78)
LASCH J., IWIG M. und HANSON H. - <u>Eur. J. Biochem.</u> , 1972, <u>27</u> , 431-435.	55	(79)
LINDERSTRØM-LANG K. - <u>Z.Physiol. Chem.</u> , 1929, <u>182</u> , 151.	1	(1)
LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FABR A.L. and RANDAL R.J. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1951, <u>193</u> , 265.	23 45	(64) (77)
MELLIUS P., MOSELEY M.H. and BROWN D.M. - <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1970, <u>221</u> , 62-68.	8	(52)
PATTERSON E., SHU-HSI-HSIAO and KEPPEL A. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1963, <u>238</u> , 11.	2 6 31	(25) (44) (65)
PFLEIDERER G., WASCHMITT E.D., FRITZE I. - <u>Biochemistry</u> , 1966, <u>1</u> , 169-175	1 2 6 7	(7) (23) (46) (49)
ROBINSON D.S., BIRNBAUM S.M. and GREENSTEIN J.P. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1953, <u>202</u> , 1.	2	(22)
ROGEZ J.C. - Thèse de Sciences, Lille 1974	44	(76)
SMITH E.L. and BERGMANN M. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1941, <u>138</u> , 789.	1	(4)
SMITH E.L. and BERGMANN M. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1944, <u>153</u> , 627.	1 2	(5) (28)
SMITH E.L., SPACKMAN D.H. and BROWN D.M. - <u>J. Biochem.</u> , 1955, <u>212</u> , 255.	1 2 4 7 8 9 10 11 15 32 39 55	(6) (29) (32) (36) (48) (53) (54) (56) (57) (59) (68) (74) (81)

	Page dans le texte	N° de Référence
SMITH E.L., SPACKMAN D.H. and BROWN D.M. -	74	(84)
<u>J. Biochem.</u> , 1955, 212, 255.(suite)	77	(85)
	84	(86)
	86	(87)
	86	(89)
	104	(94)
	110	(96)
SMITH E.L. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1948, <u>173</u> ,553	1	(15) (16)
SULD H. et HERBUT P. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1965,	32	(71)
<u>240</u> , n° 5, 2234.	35	(73)
TALLAN H.H., JONES M.E. and FRUTON J.S. -	1	(13)
<u>J. Biol. Chem.</u> , 1952, <u>194</u> , 793.		
WEISS B. - <u>J. Biol. Chem.</u> , 1953, <u>205</u> , 193.	1	(14)

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I

Les leucine-aminopeptidases

Revue générale bibliographique.....	1
I - Extraction de la leucine aminopeptidase	2
1. Purification de la leucine aminopeptidase de rein de porc selon SMITH et SPACKMAN.....	2
2. Purification de la leucine aminopeptidase de muscle de porc selon JOSEPH et SANDERS.....	3
3. Purification de la leucine aminopeptidase de cristallin de bovin selon HANSON	3
II - Dosage de l'activité enzymatique.....	6
III - Propriétés physico-chimiques	7
Conclusion	13

CHAPITRE II

Méthodes personnelles de dosage

I - Mesure de l'activité enzymatique	15
1. Préparation de la solution substrat	15
2. Dosage de l'activité enzymatique	17
3. Expression des résultats	17
4. Contrôle de l'hydrolyse du substrat	18
Montage du Manifold Technicon	19
II - Mesure de l'activité spécifique	23
1. Dosage de l'azote protéique	23
2. Expression des résultats	23

CHAPITRE III

Méthodes personnelles de purification

I - Préparation de l'homogénat	
1. Prélèvement du pancréas.....	26
2. Broyage du tissu.....	26
II - Etude du pH de solubilisation de l'enzyme.....	27
III - Localisation de la leucine aminopeptidase de pancréas. de cobaye dans la cellule.....	31
IV - Essais de précipitation par les sels neutres.....	32
Conclusion sur l'action des sels minéraux sur l'homogénat pancréatique.....	34
V - Essais de purification par chromatographie sur colonne de cellulose à échange d'ions.....	35
- Résultats	38
VI - Etude en chromatographie de gel filtration d'une pré- paration purifiée sur DEAE-Cellulose.....	39
- Résultats.....	39
- Remarques.....	40
VII - Utilisation de l'électrophorèse préparative sur blocs de cellologel.....	45
1) Etude électrophorétique d'un surnageant de 105 000 g.....	45
a) Détermination de l'activité enzymatique et spécifique.....	45
b) Contrôle par électrophorèse sur feuille d'acétate de cellulose.....	45

2) Electrophorèse préparative sur blocs de cellogel d'une solution enzymatique partiel- lement purifiée sur colonne de DEAE-Cellulose.....	50
- Contrôle sur feuilles d'acétate de cellulose ...	50
- Conclusion.....	54
VIII - Chromatographie d'affinité.....	55
1) Chromatographie d'un homogénat.....	55
- Dépôt.....	57
- Elution.....	57
- Dosage des fractions recueillies.....	58
2) Essais de couplage de la chromatographie d'affini- té avec d'autres méthodes de purification.....	61
a) Couplage - gel filtration-chromatographie d'af- finité.....	61
b) Couplage - DEAE-Cellulose-chromatographie d'af- finité.....	64
c) Couplage électrophorèse sur blocs de cellogel- chromatographie d'affinité.....	64
d) Autres procédés de couplage.....	66
Conclusion.....	69

CHAPITRE IV

Propriétés physico-chimiques

I - Spécificité de l'enzyme	71
a) Action sur les amides.....	71
b) Action sur les peptides.....	72
Remarques	73
Conclusion à l'action sur les amides et les peptides.....	74

II - Les effecteurs de la leucine aminopeptidase

A/ - Les activateurs.....	85
a) Influence du temps de pré-incubation de l'enzyme en présence de solutions ioniques.....	87
b) Influence des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} sur l'activité enzymatique d'un homogénat de pancréas en fonc- tion du pH.....	87
B/ - Les inhibiteurs.....	91
a) Action des agents chélateurs.....	91
b) Action des agents bloquant les groupements thiols	92
c) Autres agents inhibiteurs.....	92
d) Action des acides cétoniques et des acides aminés ramifiés.....	92
e) Action des alcools.....	92
III - Influence de la température.....	93
A/ - Détermination de la température optimale d'action..	99
B/ - Dénaturation par la chaleur.....	99
C/ - Effets de congélations et décongélations successives	100
Conclusion à l'étude de l'influence des variations ther- miques.....	100
IV - Etude du pH optimal d'action	104
V - Influence du temps d'incubation.....	104
VI - Influence de la concentration en substrat.....	105
VII - Estimation du Poids Moléculaire	
A/ - Par gel filtration sur Sephadex G 200.....	109
B/ - Par ultracentrifugation en gradient de saccharose..	110
Résumé et Conclusion.....	116

	Pages
Appendice technique.....	120
I - Dosage de l'Ammoniaque.....	120
II - Dosage des Protéines.....	122
Schéma du Manifold Technicon.....	124
III - Electrophorèse à pH 3,9.....	125
IV - Chromatographie descendante unidimensionnelle dans du butanol acide acétique.....	125
V - Chromatographie sur Echangeurs d'ions.....	126
VI - Gel filtration du Sephadex G 200.....	129
VII - Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel..	130
VIII - Electrophorèse analytique sur bandes de cellogel	132
IX - Chromatographie d'affinité.....	133
 Bibliographie.....	 136

