

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE

50376
1976
66

50376
1976
66

THESE

Pour l'obtention du Doctorat de 3^e Cycle

Mention Biochimie

Présentée et Soutenue Publiquement

Le 30 Juin 1976

Par

Odile VINCENT-FIQUET

Maître ès Biologie Humaine (Mention Biochimie)

Maître ès Sciences (Mention Biologie Animale)

Assistante de Chimie Biologique

L-LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU REIN 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 la mémoire de mon père

A Michel et à nos enfants, Gilles et Rémi,
Ma raison d'être, ma force
Mon courage et ma joie

A ma mère,
Pour tout ce qu'elle a fait pour moi

A la mémoire de mon grand-père

A toute ma famille

A tous 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.

Votre enseignement nous a profondément marquée et nous vous exprimons toute notre gratitude pour avoir accepté de présider notre Jury de Thèse.

Soyez assuré de toute notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur Roger PLAQUET

Professeur de Chimie Biologique

à l'U.E.R. de Médecine d'AMIENS

Biologiste des Hôpitaux

Chef de Service

Chevalier des Palmes Académiques

En nous accueillant dans votre service, vous nous avez permis de mener à bien ce travail.

Vous avez bien voulu nous honorer de votre confiance en maintes circonstances et nous vous remercions pour la bienveillance que vous nous avez toujours témoignée.

Soyez assuré de notre gratitude et de notre dévouement.

A Monsieur le Professeur Gérard BISERTE

Professeur de Biochimie Pathologique

Directeur de l'Institut de Recherche sur le Cancer
de LILLE

Biologiste des Hôpitaux

Commandeur des Palmes Académiques

Chevalier du Mérite National

Chevalier de la Légion d'Honneur

C'est un grand honneur pour nous de vous compter
parmi nos juges.

Vous nous avez toujours réservé un accueil chaleureux et vous nous avez aimablement conseillée.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de la qualité de votre enseignement.

Soyez assuré de notre respectueuse reconnaissance et de la vive admiration que nous avons pour votre haute compétence scientifique.

A Monsieur le Professeur Michel DAUTREVAUX

Professeur de Biochimie Structurale et Comparée
à l'U.E.R. de Médecine et de Pharmacie de LILLE.
Officier des Palmes Académiques

Vous nous avez toujours prodigué un enseignement
de qualité et aujourd'hui nous sommes très honorée
de votre présence dans ce Jury.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de
notre respectueuse considération pour l'intérêt
que vous avez bien voulu porter à notre travail.

A Monsieur Jean KREMBEL
Maître de Conférences de Chimie Biologique
à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I.

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

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre gra-
titude

A Monsieur Paul PERSONNE
Maître de Conférence de Biologie Animale
à l'U.E.R. de Sciences d'AMIENS

Vous avez bien voulu mettre votre savoir à notre disposition en portant une minutieuse attention à l'étude des différents fractionnements cellulaires et de leur contrôle en microscopie électronique.

Qu'il nous soit permis aujourd'hui de vous exprimer notre reconnaissance et notre gratitude.

Nous tenons également à remercier chaleureusement :

Monsieur DESOEURBRUN pour sa gentillesse et ses réalisations techniques sans lesquelles nous n'aurions pu réaliser une grande partie de ce travail.

Madame POLLEUX qui a bien voulu nous aider dans la réalisation de cet ouvrage.

Toutes les laborantines du laboratoire pour leur gentillesse et pour les marques de sympathie qu'elles nous ont toujours témoignées.

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.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénéoni	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
Melle	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.	BOSCOQ 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
Melle	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 Micheline	Chimie Appliquée
M.	FONTAINE Jean-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.	JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Melle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Melle	LEGRAND Denise	Algèbre
Melle	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.	MACKÉ 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
Melle	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.	VANDORPE 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

INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont purifié des leucine aminopeptidases extraites de différents organes d'animaux. Les enzymes de rein et de muscle de porc, ainsi que celles du cristallin de boeuf ont été étudiées plus particulièrement.

Au cours d'une exploration de l'activité enzymatique du rein de cobaye, nous avons décelé une quantité importante d'une amidase hydrolysant la L-leucinamide. L'étude des propriétés physico-chimiques nous a conduite à rattacher cette enzyme au groupe des leucine aminopeptidases de référence 3.4.11.1. à la nomenclature internationale.

Dans ce travail, nous nous sommes attachée à purifier la leucine aminopeptidase du rein de cobaye par couplage de différentes méthodes physico-chimiques telles que la chromatographie, l'électrophorèse et l'ultracentrifugation en gradient de sucrose.

Les préparations enzymatiques partiellement purifiées ainsi obtenues nous ont permis d'étudier quelques propriétés physiques.

Le fractionnement cellulaire d'un homogénat rénal, outre la détermination de la localisation de l'enzyme au sein de la cellule, nous a révélé deux formes actives de leucine aminopeptidase de poids moléculaires et de migrations électrophorétiques différentes.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE GENERALE DES LEUCINE AMINOPEPTIDASES

I - HISTORIQUE.

En 1929, LINDERSTRØM-LANG (1,2) a montré que l'érepsine extraite de la muqueuse intestinale de porc contient une enzyme qui hydrolyse rapidement la L-leucyl-glycine et la L-leucyl-glycyl-glycine. Cette enzyme est distincte des autres peptidases et de l'érepsine qui ont été décrites plus tôt par Von EULER et JOSEPHSON (3) et par WALDSCHMIDT-LEITZ et coll. (4). Plus tard, cette enzyme, appelée leucylpeptidase a été purifiée partiellement par JOHNSON et coll. (5) qui ont montré le rôle activateur du magnésium. BERGER et JOHNSON (6) ont démontré ensuite que la manganèse est le meilleur activateur de l'enzyme. SMITH et BERGMANN (7,8) ont confirmé ces données et purifié l'enzyme 35 fois environ pour étudier plus amplement sa spécificité. Il a été ainsi suggéré que l'enzyme soit appelée leucine aminopeptidase non seulement parce qu'elle hydrolyse la L-leucinamide mais aussi des L-leucyl-peptides en opposition à des substrats N-acétylés. Ce nom a persisté quoiqu'il soit reconnu clairement que son pouvoir hydrolytique ne soit pas réservé uniquement aux seuls leucyl-dérivés.

Des études faites de 1940 à 1950 par SMITH (9,10) en collaboration avec HANSON, POLGLASE, SLONIM et SPACKMAN ont démontré qu'un grand nombre d'amides et de peptides synthétiques sont hydrolysés par cette enzyme. De plus, ces études ont permis de pénétrer plus en avant dans le domaine de l'activation par les ions métalliques et de la catalyse.

C'est en 1955, que la meilleure description des propriétés chimiques et physiques a été établie quand SPACKMAN et coll. (11) ont décrit des procédés de purification qui permettent d'obtenir une enzyme hautement purifiée.

HILL et SMITH (12) ont ensuite observé l'action de la leucine aminopeptidase sur plusieurs polypeptides et protéines de structure partiellement ou totalement connue. Les résultats de l'hydrolyse enzymatique sont en accord avec ceux obtenus sur de petits substrats synthétiques, ce qui a permis d'utiliser la leucine aminopeptidase comme peptidase lors de l'analyse structurale de peptides et de protéines, au même titre que d'autres enzymes telles que trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase.....

D'autres auteurs décrivent ensuite l'enzyme obtenue à partir de différents organes animaux. Il faut citer HANSON et ses collaborateurs (13) qui décrivent une leucine aminopeptidase de cristallin de boeuf, sa purification et ses propriétés physiques et chimiques.

Ce fut ainsi le point de départ d'études diversifiées sur les leucine aminopeptidases d'origine variée.

II - DISTRIBUTION DE L'ENZYME.

Une enzyme identique ou similaire à la leucine aminopeptidase de rein de porc et de muqueuse intestinale est largement distribuée (14 , 15) dans le règne animal (16) le règne végétal (17) sans oublier les microorganismes (18).

Une activité aminopeptidasique a été décelée dans la glande pituitaire (19), les poumons (20 , 21), la rate (22 , 23), le thymus (24 , 25), le muscle cardiaque (26), les muscles du squelette (27), l'utérus (28), le rein (29) et le plasma (30). La distribution cellulaire de l'enzyme de plusieurs tissus a été également étudiée (31 à 36).

Cependant, souvent l'identification en a été difficile car la plupart des tissus contiennent d'autres protéases qui interfèrent avec l'aminopeptidase.

III - CLASSIFICATION DE L'ENZYME.

Depuis les travaux de SMITH notamment et ceux d'autres auteurs, il est courant de trouver dans la littérature sous le même vocable de leucine aminopeptidase des enzymes qui en fait sont différentes entre elles.

- (14) JOHNSON... (15) SMITH... (16) LINDERSTRØM... (17) BERGER 1939...
(18) BERGER 1938... (19) ADAMS... (20) FRUTON... (21) DANNEBERG...
(22) FRUTON... (23) TALLAN... (24) FRUTON... (25) WEISS... (26) SMITH...
(27) SMITH... (28) SMITH ... (29) DEKKER ... (30) FRUTON...
(31) PATTERSON... (32) BURSTONE... (33) TABACHNIK ... (34) LUNDQUIST
(35) Mc CONNELL... (36) ROBINSON...

Or, il est maintenant reconnu qu'il existe plusieurs sortes d'aminopeptidase, nommées différemment dans la classification, selon le substrat qu'elles hydrolysent.

On a souvent désigné sous le même nom deux enzymes qui hydrolysent des substrats aussi différents que la L-leucinamide, la L-leucyl β naphthylamide ou la L-leucyl paranitroanilide et on parlait indifféremment de la leucine aminopeptidase et d'arylamidase en recommandant l'un ou l'autre de ces substrats pour déterminer l'activité enzymatique.

C'est ainsi que d'après les nouvelles normes de classification (37) la leucine aminopeptidase dite classique hydrolyse la L-leucinamide et est d'origine cytoplasmique : elle est du type E.C. 3.4.11.1.

L'aminopeptidase d'origine microsomale, encore appelée arylamidase ou aminopeptidase particulaire, hydrolyse des substrats chromogènes tels que les dérivés β naphthylamides ou paranitroanilides : elle est du type E.C. 3.4.11.2.

Il existe aussi toute une série d'aminopeptidases qui hydrolysent des peptides ayant une extrémité N-terminale précise en particulier des prolyl-peptides, arginyl-peptides, aspartyl-peptides, etc, ... et qui portent ainsi le nom de l'acide aminé qu'elles détachent ; on a ainsi des proline aminopeptidases (E.C. 3.4.11. 5), des arginine aminopeptidases (E.C. 3.4.11.6), des aspartate aminopeptidases (E.C. 3.4.11.7) etc,...

Il faut noter cependant qu'en 1965 avant l'adoption des nouvelles normes, HANSON et coll (38) extraient une enzyme de cristallin de boeuf qu'ils nomment leucine aminopeptidase et dont ils déterminent l'activité par hydrolyse de la L-leucinamide alors qu'ils utilisent pour le dosage de la leucine aminopeptidase pure cristallisée, une méthode colorimétrique à la L-leucyl β naphthylamide.

De cette pluralité de substrats sont nées de nombreuses confusions de terminologie de ces enzymes et il convient donc de rester prudent dans l'attribution d'un nom à une enzyme donnée.

(37) FLORKIN...

IV - DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

D'après la classification internationale de l'enzyme, n'est appelée leucine aminopeptidase que l'enzyme qui hydrolyse le substrat L-leucina-
mide. SMITH utilise et recommande ce substrat.

Déjà en 1960, il recommandait la prudence quant à l'emploi de
substrats chromogènes suggérés par GOMORI (39), FOLK et BURSTONE (40) et
GREEN et SELIGMAN (41), notamment en ce qui concerne la détermination
enzymatique d'extraits tissulaires bruts.

Nous savons maintenant que l'utilisation de ces substrats permet
de détecter principalement une activité arylamidasiq. Cette technique
doit donc être bannie pour déterminer une activité leucine aminopeptidasiq
vraie.

L'activité enzymatique peut donc être déterminée à l'aide du
substrat L-leucinamide. L'hydrolyse peut être suivie par :

- La titrimétrie selon le procédé de GRASSMAN et HEYDE (42)
- La spectrophotométrie selon une modification de la méthode de microdif-
fusion de CONWAY (43).
- La colorimétrie selon la méthode de BERTHELOT adaptée à l'auto-analyseur
Technicon (44) ou non (45) et selon la méthode de NESSLER (46).
- La chromatographie avec dosage de la leucine selon BOHLEY (47).

BEHAL (48), JOSEPH et SANDERS (49) suivent aussi l'activité enzy-
matique à partir de l'hydrolyse de dipeptides en se basant sur le fait que
la leucine aminopeptidase possède une activité dipeptidasiq.

V - PURIFICATION DE L'ENZYME.

1) Technique de SPACKMAN et SMITH (50)

SMITH et SPACKMAN partent de 2400 g de rein de porc. A partir d'un
homogénat, ils effectuent plusieurs extractions :

(44) GIRARD... (45) OKUDA... (46) MARKHAM...

ETAPES	C_1	Protéines totales (mg)	Activité enzymatique totale	Rendement %
Homogenat	0,055	293 000	2450	100
1. Poudre acétonique	0,25	45 300	1700	69
2. 1ère précipitation au $(NH_4)_2SO_4$	1,1	11 600	1900	78
3. 2ème précipitation au $(NH_4)_2SO_4$	2,4	4 170	1500	61
4. Précipitation par le $MgCl_2$	3,6	2 640	1430	58
5. Préchauffage	5,8	1 320	1120	46
6. Fractionnement acétonique	43	105	720	29
7. Vieillissement	52	87	720	29
8. Electrophorèse	88	23	320	14

TABLEAU I : PURIFICATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU REIN DE PORC
selon SPACKMAN, SMITH et BROWN (51).

$C_1 = K_1/E$ est le coefficient protéolytique où K_1 est la vitesse de réaction exprimée en logarithmes décimales et E est la teneur en protéines exprimée en mg d'azote protéique par ml de solution enzymatique.



Etapes	C_1	Protéines totales (mg d'azote protéique)	Activité enzymatique totale	Facteur de Purification	Rendement %
Homogenat brut	0,156	802,5	125	1	100
Zinc-chaleur	15,04	7,93	119	96	95
Enzyme cristallisée	170	0,497	84,5	1172	68

TABLEAU II : PURIFICATION DE L'ENZYME DE CRISTALLIN DE BOVIN selon
H. HANSON, D. GLABER & H. KIRSCHKE (52).

$C_1 = K_1/E$ est le coefficient protéolytique où K_1 est la vitesse de réaction exprimée en logarithmes décimales et E est la teneur en protéines exprimée en mg d'azote protéique par ml de solution enzymatique.



- alcoolique puis acétonique

- par le sulfate d'ammonium à 40 et 50 p. 100 de saturation.

Les culots de relargage obtenus par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sont ensuite traités par le chlorure de magnésium et la chaleur.

Un nouveau fractionnement par l'acétone, puis un vieillissement de 6 à 10 semaines en chambre froide sous toluène à pH 8,0 permet d'obtenir une enzyme purifiée 950 fois.

Enfin, une électrophorèse préparative sur papier termine la purification de cette enzyme qui est finalement purifiée 1600 fois. (Tableau I)

L'enzyme ainsi purifiée apparaît homogène à l'électrophorèse comme à l'ultracentrifugation.

2) Technique de HANSON (53).

HANSON et ses collaborateurs ont donné une technique différente de celle de SMITH. Ils associent un traitement combiné zinc-chaleur suivi d'une cristallisation de l'enzyme par du sulfate d'ammonium. L'enzyme cristallisée est recristallisée une seconde fois. L'enzyme est ainsi purifiée près de 1200 fois (Tableau II).

L'enzyme est stable pendant des mois sans perte significative d'activité à pH 8,0 et à + 4° C.

Comme celle de SMITH, elle apparaît homogène à l'électrophorèse comme à l'ultracentrifugation.

3) Autres techniques.

Il faut mentionner également les méthodes de purification utilisées par :

- JOSEPH & SANDERS à partir de muscles squelettiques porcins (54).
- BRUCE & RABIN (55), BINKLEY (56) à partir de rein de porc.
- PATTERSON à partir d'un fractionnement cellulaire de cellules tumorales d'ascite. (57, 58)

Origine de la LAP	pH	K_m
Rein de porc ^a	8,4	$5,2 \cdot 10^{-3}$ M
Cristallin de boeuf ^b	9,0	$3,1 \cdot 10^{-2}$ M
Muscle de porc ^c	8,4	$5 \cdot 10^{-3}$ M
Foie de rat ^d	8,0	$2,8 \cdot 10^{-3}$ M

TABLEAU III : VALEURS DE K_m DES LEUCINE AMINOPEPTIDASES EXTRAITES
DE DIFFERENTS ORGANES PAR LES AUTEURS SUIVANTS :

a : BRYCE et RABIN (59)

b : HANSON (60)

c : JOSEPH et SANDERS (61)

d : EMMELOT et VISSER (62)



VI - CINETIQUES ENZYMATIQUES.

Les différentes valeurs de K_m déterminées par hydrolyse de la L-leucinamide par la leucine aminopeptidase extraite de différents organes sont à peu près de même ordre. Le Tableau III regroupe ces valeurs données par les différents auteurs.

VII - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

Elles ont été étudiées à partir d'enzyme partiellement ou très purifiée.

Les propriétés de la leucine aminopeptidase de rein de porc de SMITH et SPACKMAN restent toujours le point de comparaison avec les autres leucine aminopeptidases extraites d'organes différents.

a. Poids moléculaire.

Le Tableau IV rend compte des différents poids moléculaires déterminés par les auteurs.

b. Rôle des ions métalliques.

Le Mg^{2+} et le Mn^{2+} activent la leucine aminopeptidase, le Mn^{2+} étant meilleur activateur que le Mg^{2+} .

L'activation de l'enzyme se fait par préincubation de l'enzyme avec les ions. SMITH et HANSON ont montré l'effet du temps de la préincubation et de la concentration en ions sur l'activation de l'enzyme. (Tableau V).

Tous deux notent une activation maximale après 15 minutes de préincubation. La concentration en ions est toujours moins importante pour le Mn^{2+} que pour le Mg^{2+} .

Pour la leucine aminopeptidase de cristallin :

- . $2 \cdot 10^{-3}$ M en Mn^{2+}
- . $125 \cdot 10^{-3}$ M en Mg^{2+}

Origine	Poids moléculaire	Sous-unités	
		P M	Nombre
Rein de porc ^a	300 000		
Rein de porc ^b	255 000	63 500	4
Cristallin de boeuf ^c	326 000	32 600	10
Cristallin de boeuf ^d	327 000	54 000	6
Cellule d'ascite ^e	100 000		
	à 300 000		

TABLEAU IV : POIDS MOLECULAIRES DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE EXTRAITE DES DIFFERENTS ORGANES PAR LES AUTEURS SUIVANTS :

- a : SPACKMAN & SMITH (63)
- b : MELIUS et MOSELEY (64)
- c : HANSON et coll. (65)
- d : MELBYE et CARPENTER (66)
- e : PATTERSON (67).



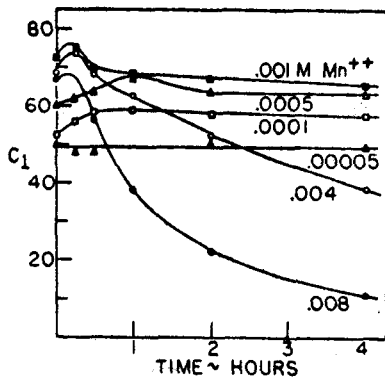


Fig. 1

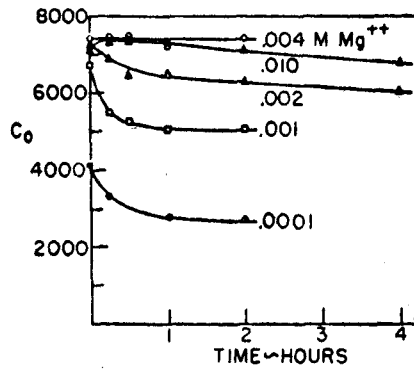
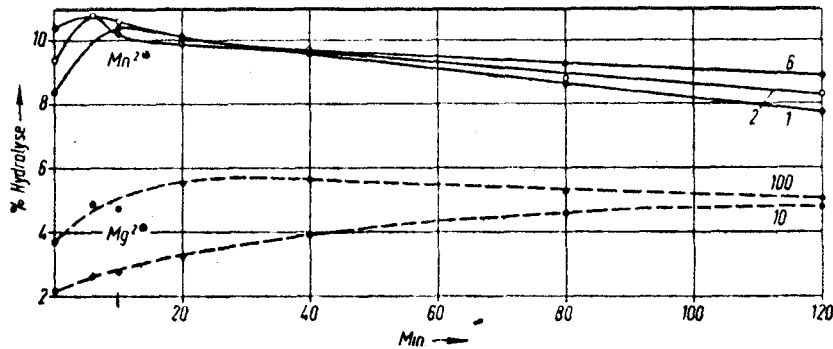


Fig. 2

Fig. 3



TABEAU V : PREINCUBATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE AVEC DES SOLUTIONS IONIQUES DE CONCENTRATIONS DIFFERENTES SELON :

- SMITH : solutions de Mn^{2+} (Fig. 1) et de Mg^{2+} (Fig. 2). (68)

Les solutions ioniques sont en milieu Tris 0,04 M de pH 8,0. Les solutions enzymatiques préincubées avec les différentes solutions ioniques sont ensuite incubées avec de la L-leucinamide à pH 8,6.

- HANSON : (Fig. 3) (69)

Les solutions en ions Mn^{2+} sont respectivement 12,5 et 125 mM pour les courbes 10 et 100 de la figure ; celles en ions Mg^{2+} sont respectivement 1,25, 2,5 et 7,5 mM pour les courbes 1, 2 et 6 de la figure. L'activité enzymatique est déterminée après hydrolyse de la L-leucinamide.

(70) SMITH & SPACKMAN ... (71) BRYCE & RABIN....

Cette étude a été reprise par différents auteurs (PATTERSON, BEHAL, HANSON) qui ont pu ainsi démontrer que l'arylamidase et la leucine aminopeptidase étaient deux enzymes différentes, au moins déjà par leur pH optimal d'action (pH voisin de 7 pour l'arylamidase). (Figure n° 3).

de pH 9,0.

Ce pH se trouve dans une zone nettement alcaline aux environs

SMITH (72) et HANSON (73) ont déterminé le pH optimal d'action de l'enzyme sur différents substrats : L-leucyl-glycine et L-leucinamide pour SMITH (Figure n° 1) et pour HANSON (Figure n° 2).

d. pH optimal d'action.

plication d'un mécanisme d'action.

Ces observations sont venues renforcer le rôle des ions dans l'ex-

présence d'un groupement polaire dans R' diminuant ce taux.

L-leucinamide est hydrolysée 4 fois plus vite que la glycyl-L-leucine, la deuxième résidu d'acide aminé influe sur le taux d'hydrolyse. Ainsi la glycyl-

ments polaires diminuant le taux d'hydrolyse. De même, le radical R' du

Le taux d'hydrolyse dépend de la taille du radical R, les groupe-

un groupement aminé libre et une configuration L.

Elle hydrolyse un grand nombre d'amides et de peptides qui possèdent

une activité estérasique et dipeptidasique. (Tableaux VI et VII).

Outre l'activité amidasique, la leucine aminopeptidase possède

c. Spécificité.

d'action possible. (70) (71).

Le rôle de ces ions a en outre permis de donner un mécanisme

. $4 \cdot 10^{-3}$ M en Mg^{2+}

. $1 \cdot 10^{-3}$ M en Mn^{2+}

Pour la leucine aminopeptidase de rein :

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-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-n-butylamide	0.082	5,100	36	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	26	0.543	1140	17
L-Tyrosinamide	0.328	2,200	16			
L-Histidinamide	0.541	2,700	19	0.543	680	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-Tert-leucinamide	1.64	16	0.11			
α-Aminoisobutylamide	1.64	0	0			
D-Leucinamide	1.64	0	0	3.26	0	0

TABLEAU VI : HYDROLYSE DES AMIDES D'ACIDES AMINES selon SMITH. (74)



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	1,360	9.4			
t-Histidylglycine	0.137	5,600	40	0.163	580	9.0
Glycyl-L-leucine	0.274	1,400	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			

TABLEAU VII : HYDROLYSE DE DIPEPTIDES selon SMITH. (75)



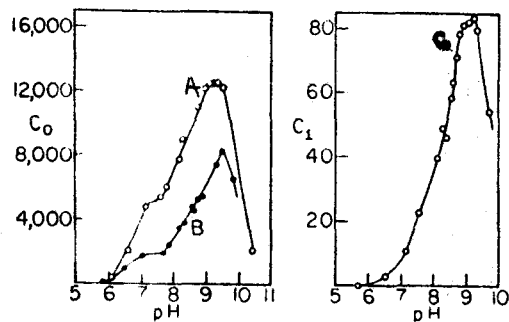


FIGURE 1

: INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE PORC selon SMITH. (76) La courbe B représente l'hydrolyse de la L-leucinamide en présence de Mg^{2+} et la courbe C en présence de Mn^{2+} en fonction du pH. (La courbe A représente l'hydrolyse de L-leucyl glycine en présence de Mn^{2+}).



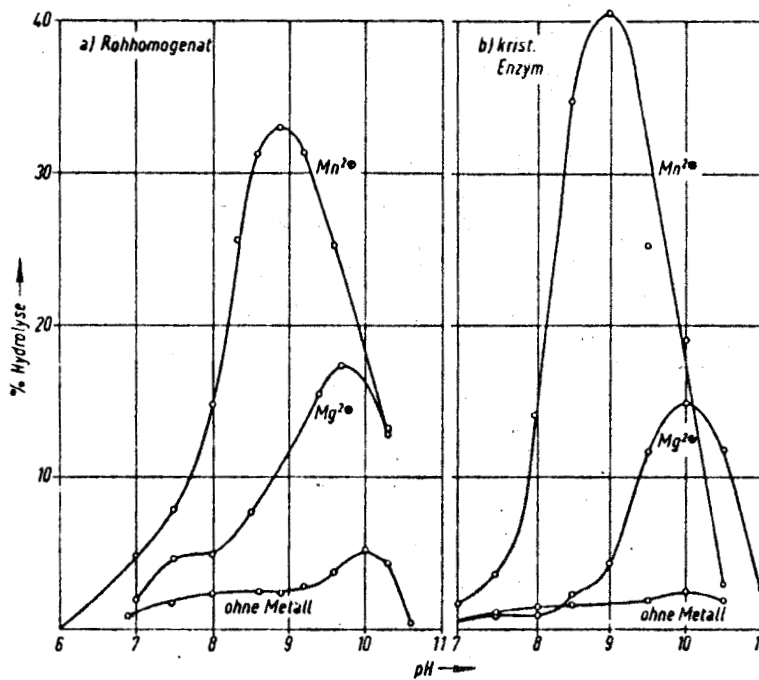


FIGURE 2 : INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE CRISTALLIN DE BOEUF selon HANSON (77).

L'activité enzymatique est déterminée, avec ou sans activation préalable par les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} , par action de la leucine aminopeptidase non purifiée (courbe a) ou de la leucine aminopeptidase cristallisée (courbe b) sur la L-leucinamide.



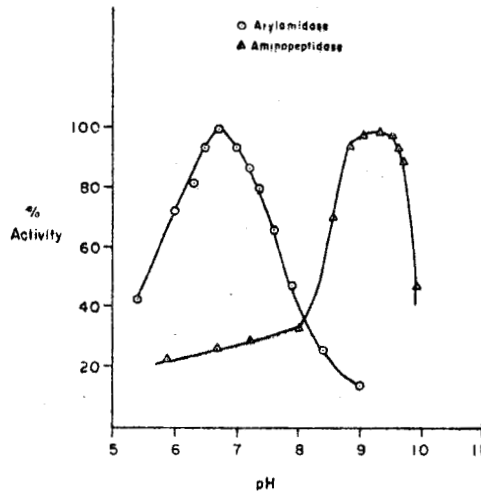


FIGURE 3 : INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ARYLAMIDASE ET DE L'AMINOPEPTIDASE EXTRAITES DU DUODENUM HUMAIN selon BEHAL & LITTLE. (78)

Pour chaque enzyme, une valeur théorique de 100 est attribuée à l'activité enzymatique déterminée au pH optimal d'action.



e. Température optimale d'action.

La leucine aminopeptidase est une enzyme thermostable puisque l'on peut la soumettre à l'action de la chaleur au cours de sa purification.

f. Inhibiteurs.

3 grands types d'inhibiteurs sont décrits par SMITH (79).

- Les inhibiteurs de l'ion métallique

ex : E.D.T.A., citrate, CN^-

- Les inhibiteurs du site hydrophobe de l'enzyme

ex : alcools

l'inhibition augmente avec le nombre de carbone de la chaîne aliphatique des alcools utilisés.

- les inhibiteurs à la fois de l'ion et du site hydrophobe de l'enzyme.

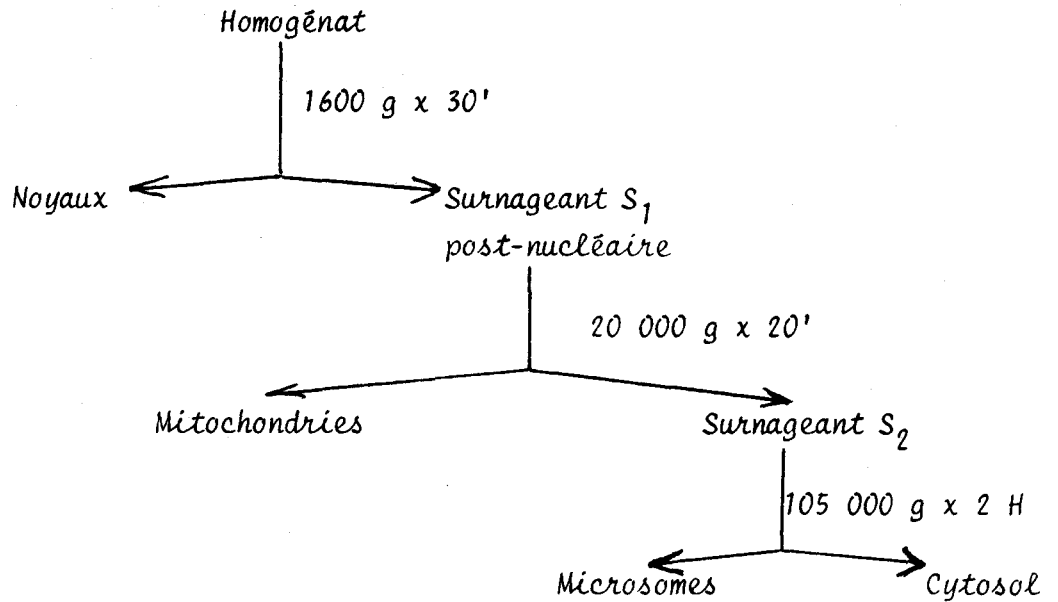
ex : leucine, acide isocaproïque, n-hexyl-amine.

VIII - LOCALISATION CELLULAIRE DE L'ENZYME.

PATTERSON et al (80) a étudié la leucine aminopeptidase de cellules d'ascite (et l'arylamidase) à partir d'un fractionnement cellulaire.

Ils opèrent en milieu de sucrose 0,25 M tamponné par du tris et à pH 8,2.

Ils ont suivi le plan de fractionnement suivant :



La distribution enzymatique est donnée dans la Figure 4. Les mitochondries contiennent des traces de leucine aminopeptidase et l'on peut voir que la localisation de la leucine aminopeptidase est cytoplasmique, alors que l'arylamidase est surtout microsomale.

Ces résultats sont en accord avec ceux de HANSON sur le cristallin de boeuf (81), de WASCHMUTH et al. sur le rein de porc (82) et de EMMELOT et VISSER sur le foie de rein (83).

Cette étude a d'ailleurs permis à PFLEIDERER (84) en 1966 d'émettre une hypothèse quant à la relation qui existerait entre ces deux types d'enzyme. L'activité enzymatique engagée dans les microsomes correspondrait à la forme primitive native de la molécule. La leucine aminopeptidase "cytoplasmique" apparaîtrait par dénaturation au cours du vieillissement de la préparation microsomale ou sous l'action des solvants organiques au cours de la purification.

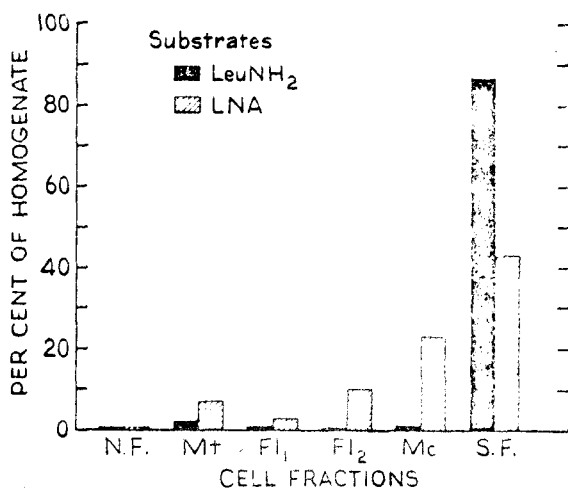


FIGURE 4 : DISTRIBUTION DES ENZYMES QUI HYDROLYSENT LA L-LEUCINAMIDE (Leu-NH₂) ET LA L-LEUCYL β NAPHTYLAMIDE (LNA) DANS LES DIFFERENTS ELEMENTS CELLULAIRES selon PATTERSON et coll. (85).

Le fractionnement est effectué à partir d'un homogénat de cellules d'ascite ELD dans du sucrose 0,25 M tamponné (Tris 0,01 M, acide succinique 0,002 M, MgCl₂ 0,0005 M) et de pH 8,2.

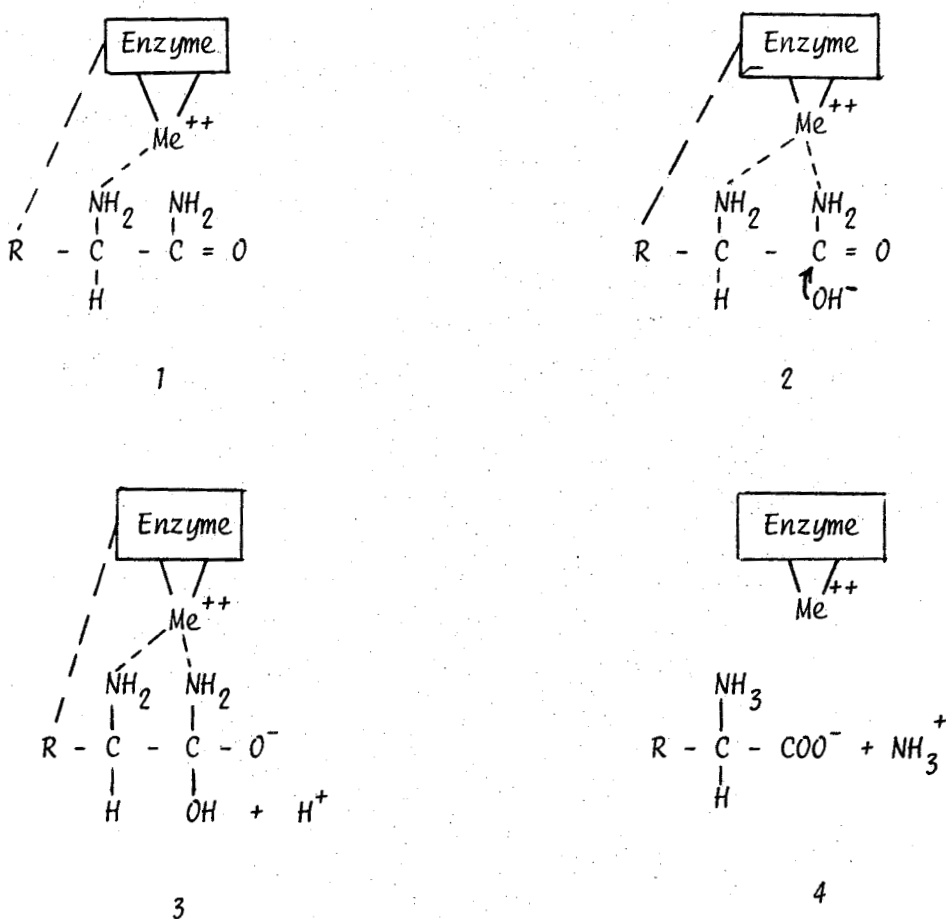
La fraction Fl₁ est le culot obtenu (après 2 lavages) par fractionnement de la zone "duveteuse" issue de la centrifugation mitochondriale. La fraction Fl₂ est le matériel situé juste au-dessus du culot Fl₁ lors du premier lavage de Fl₁. Cette fraction Fl₂ est lavé 2 fois à 105 000 g pendant 1 heure.



IX - MECANISME D'ACTION.

Une hypothèse de mécanisme d'action, basée sur les spécificités de substrat, l'action des inhibiteurs et le rôle des ions, a été présentée par SMITH en 1955 (86).

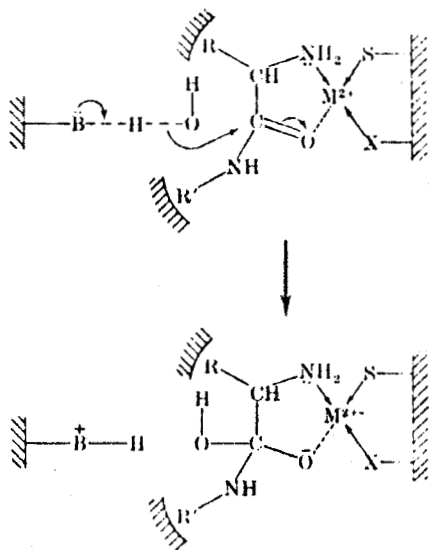
Le mécanisme réactionnel suivrait alors le schéma suivant :



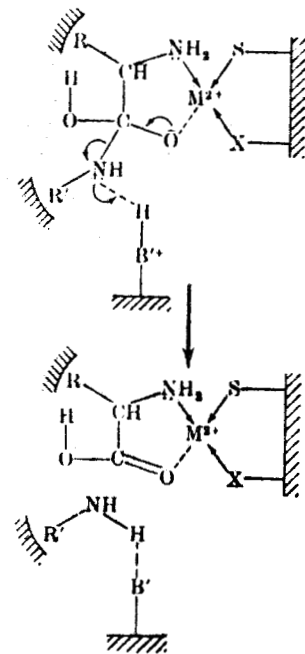
BRYCE et RABIN (87) proposent en 1964 un mécanisme réactionnel un peu différent de celui proposé par SMITH. Ils démontrent en outre que l'activité peptidasique et estérasique de l'enzyme a lieu au même site catalytique. Le fait que la leucine aminopeptidase soit réversiblement inactivée par l'E.D.T.A. et irréversiblement par le p-mercuribenzoate, implique la présence d'un groupement thiol dans la structure de l'enzyme lié à l'ion métallique.

L'ion métallique servirait d'intermédiaire de liaison entre le substrat et l'enzyme. Les sites probables d'interaction seraient les groupements aminés non chargés et les atomes d'oxygène des esters ou des amides peptidiques.

Le mécanisme réactionnel global serait le suivant :



Scheme 1. M²⁺, Mg²⁺ or Mn²⁺ ion.

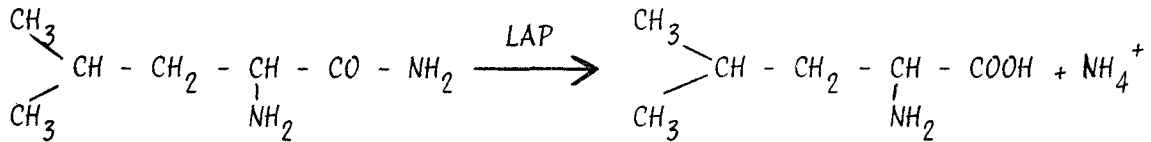


Scheme 2. M²⁺, Mg²⁺ or Mn²⁺ ion.

CHAPITRE I

METHODES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

La L-leucine aminopeptidase (L.A.P.) hydrolyse la L-leucinamide en L-leucine et en ammoniacque selon la réaction :



L'activité enzymatique peut donc être déterminée par le dosage des produits de la réaction.

Nous avons vérifié la libération de la L-leucine dans le milieu réactionnel par une électrophorèse pH 3,9.

L'étude des éluats de colonne nécessitant un très grand nombre de dosages, nous avons préféré doser l'activité leucinaminopeptidasique en mesurant l'ammoniacque libérée à partir de la leucinamide par une technique automatique.

A/ - Dosage de l'ammoniacque.

Nous avons choisi la méthode colorimétrique de BERTHELOT adaptée par GIRARD (88) à l'Auto-Analyseur Technicon et modifiée par GENTIT (89).

a. Réactifs.

1) eau distillée privée d'ammoniacque.

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

2) Solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000.

3) Solution de nitroprussiate de sodium.

. Solution mère :

- nitroprussiate de sodium RP (Prolabo)	10 g
- acide acétique cristallisable RP (Prolabo)	50 ml
- eau distillée	50 ml

. Solution fille :

(se conserve une semaine en chambre froide)

- solution mère précédente 1 ml
- eau distillée 200 ml

4) Solution de phénol

- phénol (fondu) pur cristallisable (Prolabo) 25 g
- soude RP en pastilles (Prolabo) 0,1 g
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

5) Solution tampon phosphate

- phosphate disodique, 12 H₂O RP (Prolabo) 180 g
- soude RP en pastilles (Prolabo) 6 g
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

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

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

b) Schéma de montage du manifold Technicon.

Le schéma de montage de l'Auto Analyseur Technicon est décrit sur la Figure 5.

Les flacons de réactifs, ainsi que les entrées d'air, sont munis d'un piège à ammoniaque constitué d'un flacon-laveur contenant de l'acide sulfurique concentré.

c) Gamme étalon d'ions ammonium.

Elle est constituée à partir d'une solution mère aqueuse de sulfate d'ammonium dont la composition est la suivante :

- sulfate neutre d'ammonium pur et sec R.P. (Prolabo) 0,3667 g
- acide sulfurique N (Titrisol MERCK) 20 ml
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

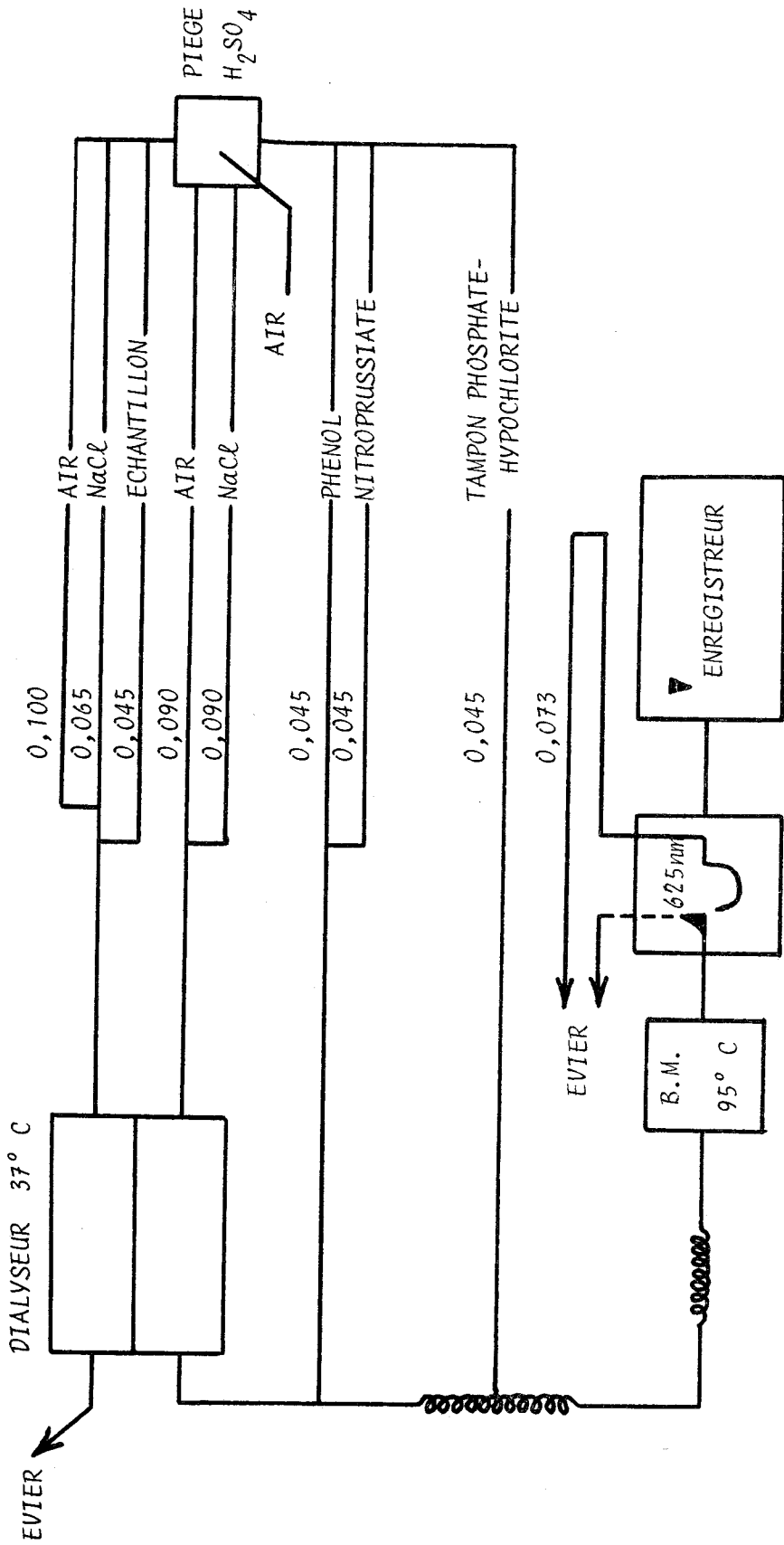


FIGURE 5 : SCHEMA DU MONTAGE DU MANIFOLD TECHNICON UTILISE POUR LE DOSAGE DE L'AMMONIAQUE, selon la méthode de BERTHELOT.



Cette solution mère est diluée de façon à obtenir des solutions aqueuses de 0,010 - 0,025 - 0,050 - 0,125 - 0,250 - 0,500 et 1 micromole d'ions ammonium par millilitre (Tableau VIII).

Les densités optiques relevées sur l'enregistreur Technicon seront ainsi reportées sur une courbe témoin d'ions ammonium, (Fig. 6) courbe établie avant chaque série de dosages. Pour des concentrations égales ou supérieures à 1 micromole d'ions ammonium dans le milieu enzymatique, nous diluons systématiquement la solution d'enzyme.

d) Réaction enzymatique.

. Réactifs.

1. Tampon borate de sodium 10 mM pH 9,2

- Borate de sodium R.P. (Prolabo) 109,7 mg
- Eau distillée q.s.p. 50 ml

2. Solution tamponnée de L-leucinamide 10 mM

- L-leucinamide (chlorhydrate)* 33,3 mg
- $MgCl_2, 6 H_2O$ 1 mM (MERCK)** 4 mg
- Tampon borate de sodium q.s.p. 20 ml

La solution de L-leucinamide, ainsi tamponnée, a un pH de 8,8.

. Mode opératoire.

La réaction enzymatique s'effectue dans un tube à hémolyse placé dans un bain-marie réglé à 37° C.

- tube "dosage" :

0,1 ml de solution enzymatique est mis à incuber pendant 15 minutes avec 1 ml de substrat.

→ Soit D, la densité optique lue sur l'enregistrement.

* L-leucinamide "leucine free" (Schwarz-Mann)

** Nous nous proposons d'expliquer dans le paragraphe suivant C, page 34 le but et le choix de cette concentration de chlorure de magnésium.

Solution mère (en ml)	0,18	0,45	0,90	2,25	4,5	9,0	18,0
Eau distillée q.s.p. (en ml)	100	100	100	100	100	100	100
Micromole d' NH_4^+ par ml	0,010	0,025	0,050	0,125	0,250	0,500	1

TABLEAU VIII: Préparation de la gamme étalon d'ions ammonium
à partir d'une solution mère de sulfate d'ammonium.



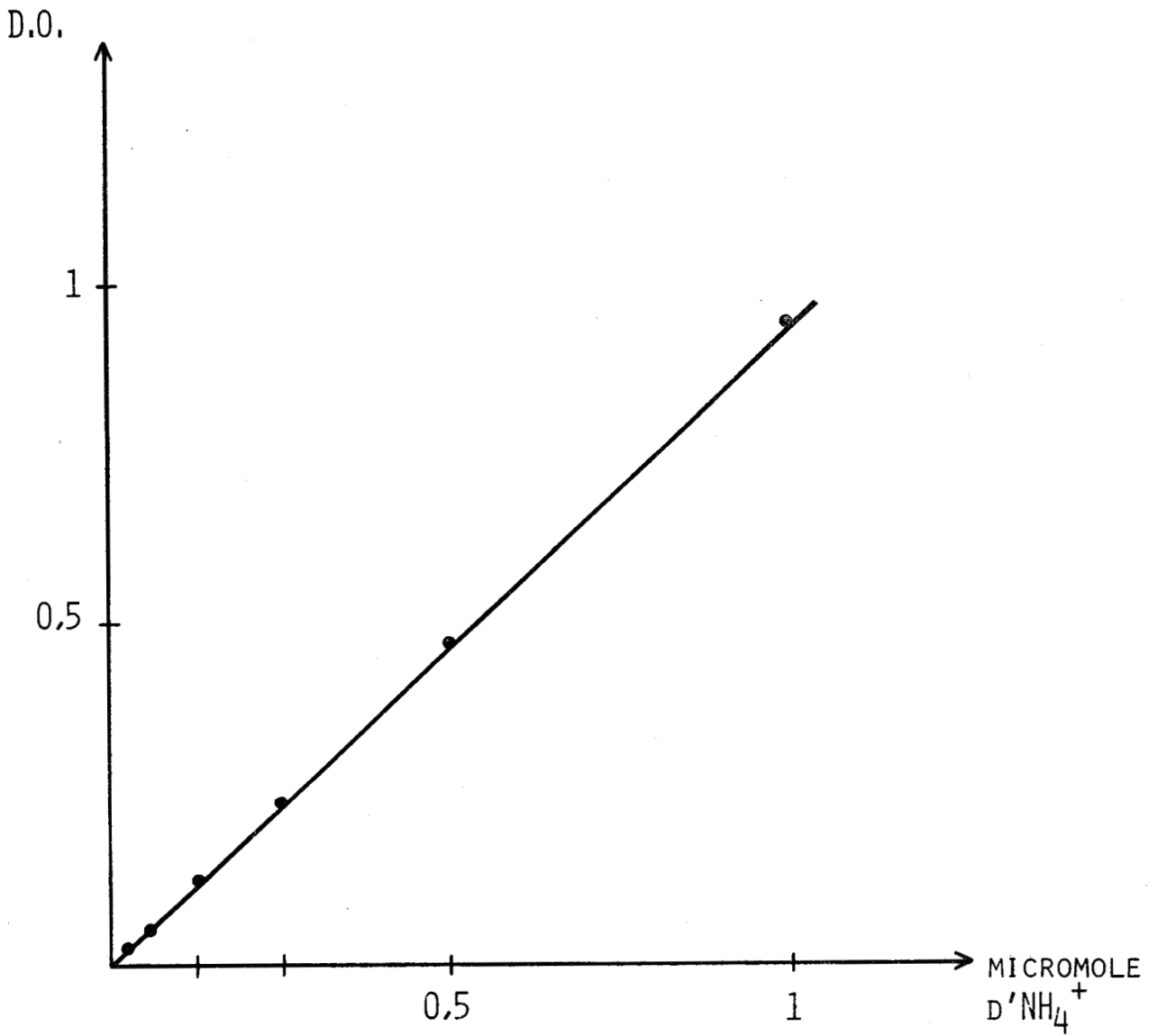


FIGURE 6 : COURBE D'ETALONNAGE D'IONS AMMONIUM obtenue en reportant en ordonnées la Densité Optique d'un témoin et en abscisses sa concentration en ions NH₄⁺.



- tube "témoin enzyme" :

0,1 ml de solution enzymatique est mis à incuber pendant 15 minutes avec 1 ml de tampon borate de sodium.

—————> Soit T_e , la densité optique lue sur l'enregistrement.

- tube "témoin substrat" :

0,1 ml d'eau distillée privée d'ammoniaque est mis à incuber pendant 15 minutes avec 1 ml de substrat.

(un seul "témoin substrat" est effectué par série de dosage).

—————> Soit T_s , la densité optique lue sur l'enregistrement.

Ces deux témoins permettent de déterminer l'activité enzymatique réelle en éliminant les ions NH_4^+ contenus dans la solution enzymatique ainsi que ceux résultant de l'autolyse de la L-leucinamide.

e) Expression de l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique est exprimée en unités internationales U.I. par millilitre d'enzyme. L'unité internationale se définit par le nombre de micromoles de substrat hydrolysées, (soit ainsi par le nombre de micromoles d'ions ammonium libérées), par minute et par millilitre d'enzyme.

La densité optique réelle D_R du dosage nous est donnée par la relation :

$$D_R = D - (T_e + T_s)$$

Le nombre de micromoles d'ions ammonium libérées est déterminé en reportant la densité D_R sur la courbe d'étalonnage (Figure 6), soit n micromoles d'ions NH_4^+ .

L'activité enzymatique s'exprime par la relation :

$$\text{U.I.} = \frac{n \times 1,1}{0,1 \times 15}$$

où 1,1 = volume final en ml du milieu réactionnel

0,1 = volume en ml de la prise d'essai

15 = temps en minutes de l'incubation.

B / - Dosage des protéines.

La détermination du taux des protéines est effectuée par la méthode de LOWRY au FOLIN-CIOCALTEU (90) adaptée à l'Auto-Analyseur Technicon.

a) Description de la méthode :

Cette méthode est décrite dans l'appendice technique, page 144 .

b) Expression de l'activité spécifique :

L'activité spécifique est égale au rapport de l'activité enzymatique exprimée en unités internationales, et du taux de protéines, exprimé en milligrammes d'azote protéique par millilitre.

L'activité spécifique s'exprime donc comme le nombre de micromoles d'ions NH_4^+ libérées par mg d'azote protéique et par minute.

C / - Détermination des conditions optimales de dosage.

Les travaux de BERGER et JOHNSON (91), puis ceux de SMITH et BERGMANN (92) ont montré que la leucine aminopeptidase était une métallo-enzyme dont le site actif comprend des cations bivalents (Mn^{++} , ou Mg^{++}). La présence de l'un de ces deux métaux stimule son activité ou la lui restitue si elle a été perdue par dialyse (93). De plus, ils la stabilisent ce qui a permis à SPACKMAN et SMITH (94) de préparer une leucine aminopeptidase hautement purifiée.

Afin de déterminer ces conditions optimales de dosage nous avons, dans un premier temps, étudié les effets de ces ions magnésium et manganèse sur notre enzyme. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les conditions optimales de la réaction enzymatique.

a) Effet de la concentration en ions Mn^{2+} et Mg^{2+} .

Les concentrations en Mn^{2+} ($\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$ Billault F.B.) et Mg^{2+} ($\text{MgCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$ Merck) varient de 0,5 mM à 100 mM.

(93) SMITH et SPACKMAN

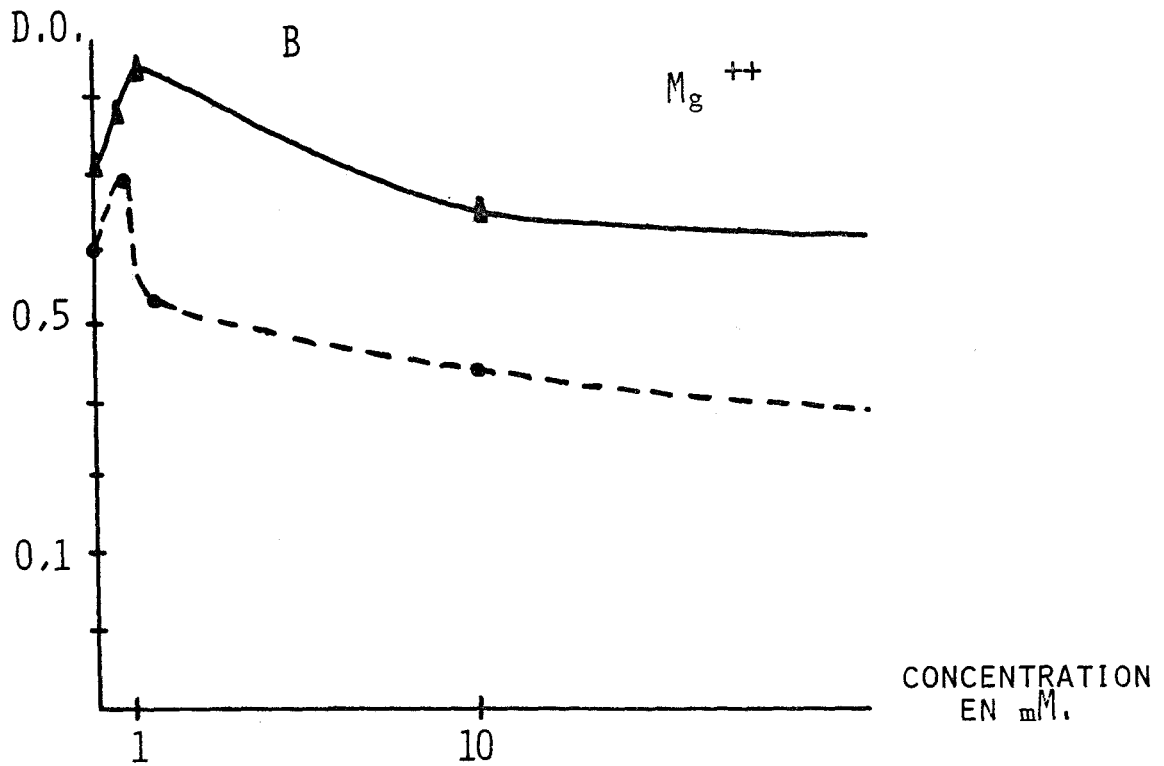
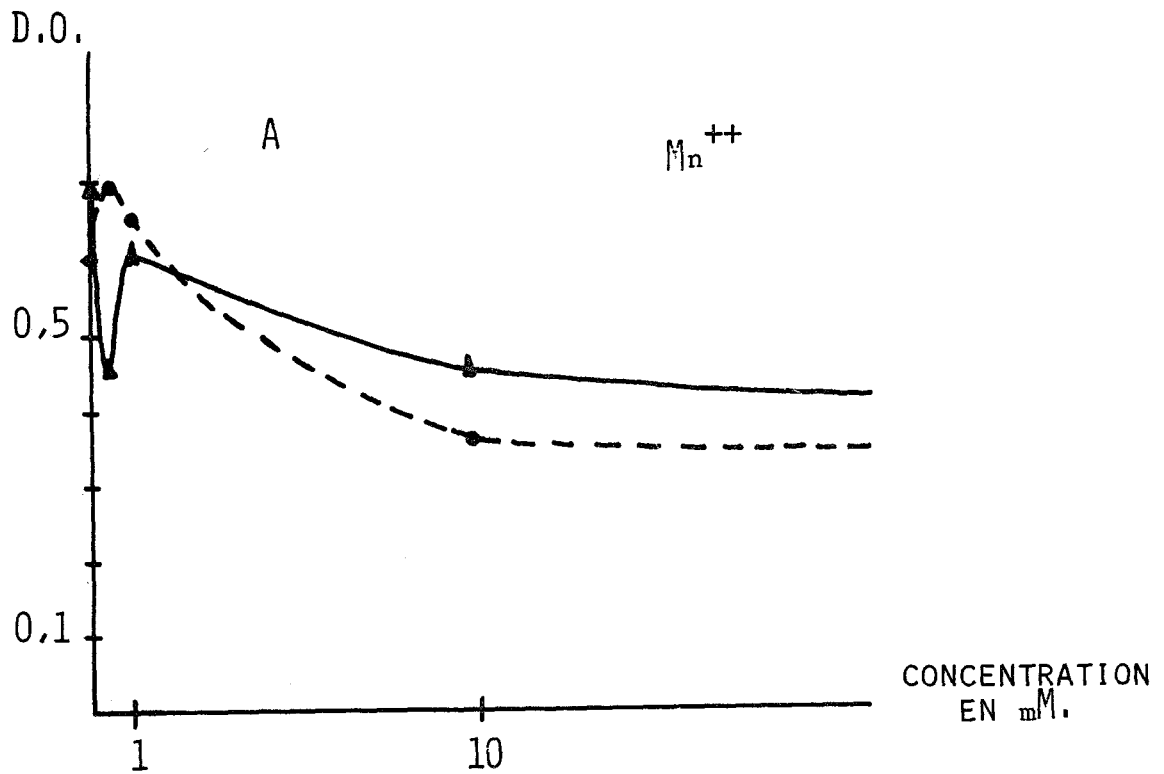


FIGURE 7 : Activation de la leucine aminopeptidase en fonction de la concentration en ions Mn^{++} (A) et en ions Mg^{++} (B)

L'activité enzymatique est exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

- Solution ionique non tamponnée
- ▲--- Solution ionique tamponnée (Tampon borate de sodium pH 9,2).



Les solutions ioniques sont faites :

- en solution aqueuse d'une part
- en solution tamponnée (Borate de sodium R.P. Prolabo 10 mM pH 9,2) d'autre part.

Mode opératoire :

L'enzyme est mise à préincuber avec les solutions ioniques de manganèse ou de magnésium dans un bain-marie réglé à 37° C.

Par quelques essais préliminaires, nous avons fixé ce temps de préincubation à 10 minutes.

Le tube de préincubation contient :

- 1 volume de solution enzymatique
- 1 volume de solution ionique

Puis, un volume de solution enzymatique préincubée est mis à incuber avec de la L-leucinamide.

Parallèlement, nous effectuons deux témoins dans lesquels la solution enzymatique est mise à préincuber sans ion.

Le premier témoin contient :

- 1 volume de solution enzymatique
- 1 volume d'eau distillée

Le deuxième témoin contient :

- 1 volume de solution enzymatique
- 1 volume de tampon borate

Nos observations sont incluses dans la Figure 7.

Il en ressort que l'activation maximale de la leucine aminopeptidase est atteinte pour une concentration de :

- 1 mM en ions Mg^{2+} en solution dans le tampon borate
- 0,5 mM en ions Mn^{2+} en solution aqueuse.

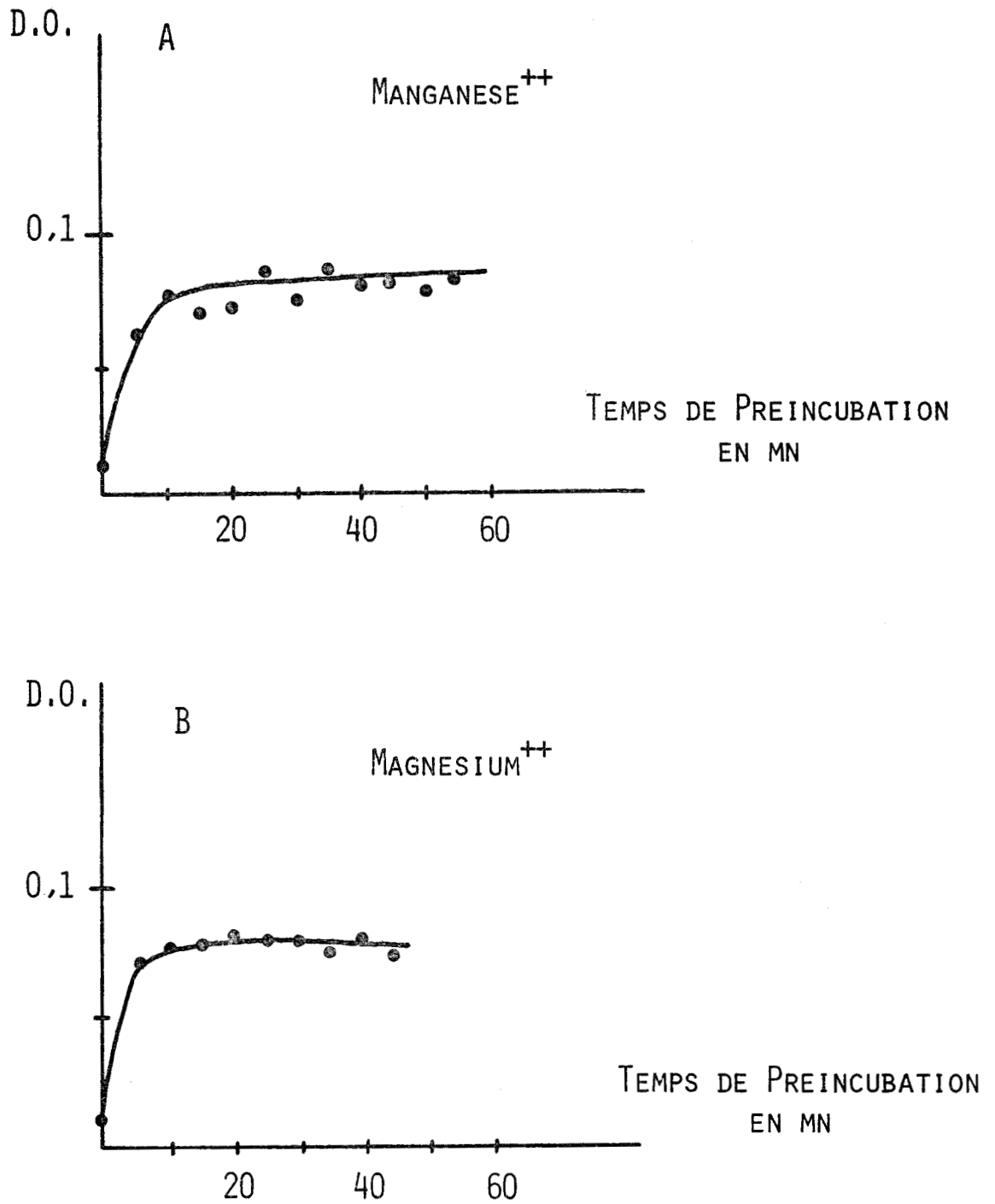


FIGURE 8 : ACTIVATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE EN FONCTION DU TEMPS DE PREINCUBATION avec :

- des ions Mn^{++} (A) 0,5 mM en solution non tamponnée
- des ions Mg^{++} (B) 1 mM en solution tamponnée (Borate de sodium, pH 9,2).



L'activité enzymatique est exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

L'activation de la leucine aminopeptidase par les ions magnésium en solution aqueuse est nettement moindre qu'en solution dans le tampon borate.

Au contraire, les ions manganèse sont plus actifs en simple solution aqueuse. En solution dans le tampon borate pH 9,2, il se forme un épais dépôt brunâtre de $Mn(OH)_2$ dont l'importance augmente avec la concentration en manganèse. Ce précipité s'accompagne d'une perte d'activité, voire d'une gêne dans le dosage, aussi avons-nous utilisé par la suite, des ions manganèse en solution aqueuse. Le problème de formation du $Mn(OH)_2$ se repose lors du dosage (le substrat étant à pH 8,8) mais à un degré moindre.

b) Effet du temps de préincubation.

Nous utilisons donc d'après les résultats précédents des solutions de :

- Mg^{2+} 1 mM en milieu boraté
- Mn^{2+} 0,5 mM en milieu aqueux

Le protocole de la préincubation est le même que précédemment. Les temps de préincubation de la leucine aminopeptidase varient de 5 minutes à 50 mn. (Figure 8).

L'activation de la leucine aminopeptidase par les ions Mg^{2+} semblent être très rapide. Elle a presque atteint son maximum après 5 minutes de préincubation, celui-ci étant atteint au bout de 15 à 20 minutes (Figure 8 B).

Pour les ions Mn^{2+} , la progression semble être la même (Figure 8 A).

c) Effet du pH en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} .

Nous avons voulu vérifier si l'action des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} variait en fonction du pH de la solution enzymatique.

Pour cela, nous avons amené à différents pH, par de la soude 0,1 N ou de l'acide chlorhydrique très dilué, une solution enzymatique obtenue à partir d'un homogénat rénal brut.

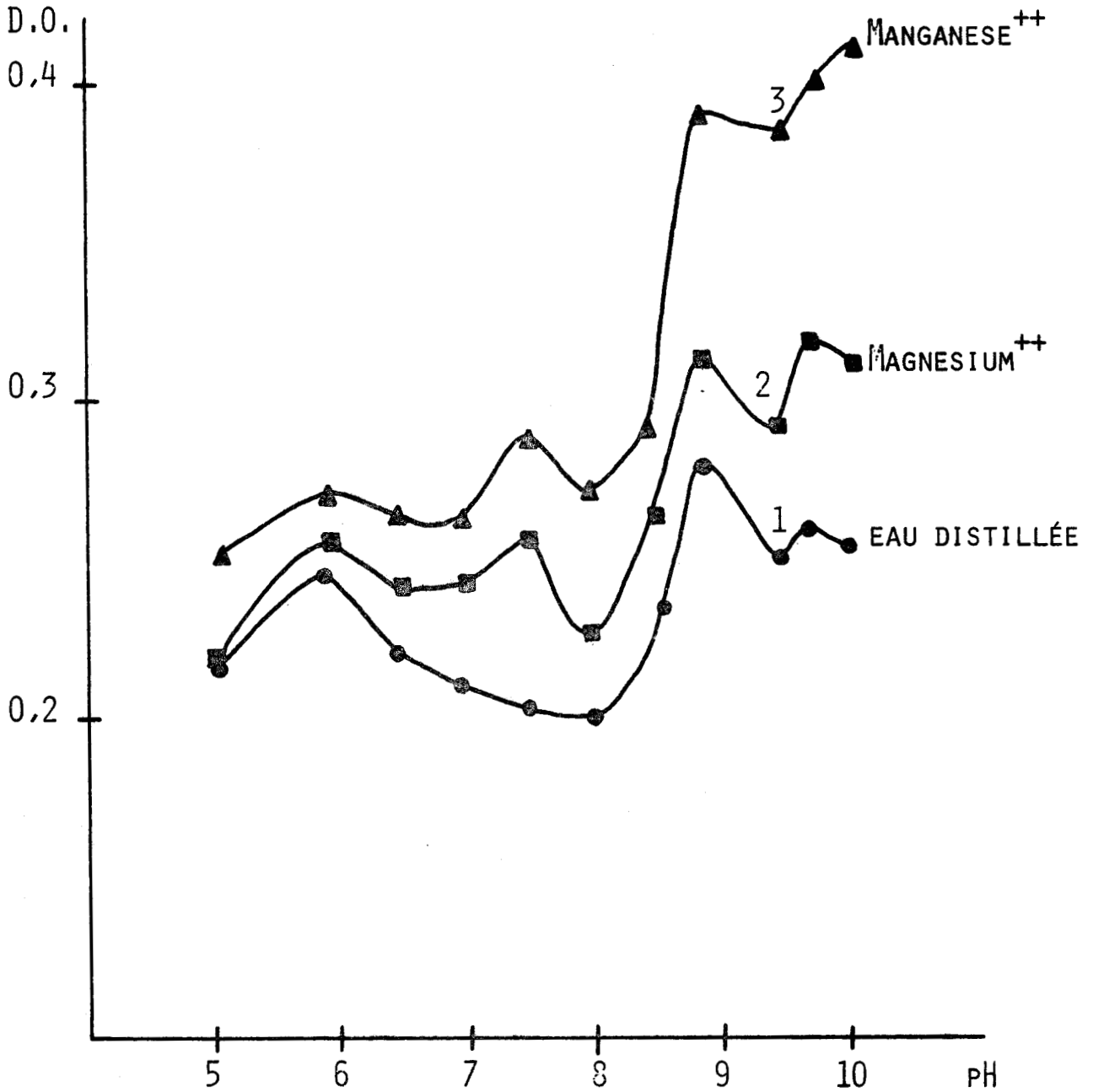


FIGURE 9 : EFFET DU pH DE L'ENZYME SUR L'ACTIVATION PAR LES IONS Mg^{2+} et Mn^{2+} .

- Courbe 1 : préincubation avec de l'eau distillée
- Courbe 2 : préincubation avec du Mg^{2+} 1 mM en milieu boraté
- ▲—▲ Courbe 3 : préincubation avec du Mn^{2+} 0,5 mM en milieu aqueux.



L'activité enzymatique est exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

Chaque solution enzymatique de pH différents est mise à préincuber 15 minutes avec :

- des ions Mg^{2+} 1 mM en solution dans du tampon borate
- des ions Mn^{2+} 0,5 mM en solution aqueuse
- de l'eau bidistillée, celle-ci permettant de faire ainsi une courbe témoin servant de référence pour l'action des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} .

Cette préincubation est suivie d'une incubation de 20 minutes avec le substrat L-leucinamide en solution dans le tampon borate.

La Figure 9 nous permet de constater que le pH optimal pour lequel l'activité enzymatique est maximale est au voisinage de 9, que l'homogénat soit ou non activé par le magnésium ou le manganèse.

De plus, ceci nous permet de montrer que l'action du manganèse est supérieure à celle du magnésium.

Nous pouvons aussi remarquer, que l'activité enzymatique augmente à pH 7,5 en présence de manganèse et de magnésium. Nous ne pouvons dans l'immédiat que constater ce fait, sans pouvoir l'expliquer. Cependant, il nous faut remarquer que ceci est obtenu avec un homogénat brut d'où l'hétérogénéité enzymatique de ce milieu.

d) Effet de la concentration en substrat.

Nous avons étudié la vitesse de la réaction enzymatique en utilisant des solutions de substrat dont la concentration varie de 0,3 mM à 40 mM (Figure 10).

Nous avons observé que les solutions de L-leucinamide produisent avec les réactifs de la méthode de dosage de BERTHELOT une coloration proportionnelle à la concentration en substrat. Cette coloration immédiate ne variant pas avec le temps et la température d'incubation, nous avons pensé qu'elle était due à une réaction parasite de la L-leucinamide au contact des réactifs précédemment cités. (Figure 10 - courbe T_s).

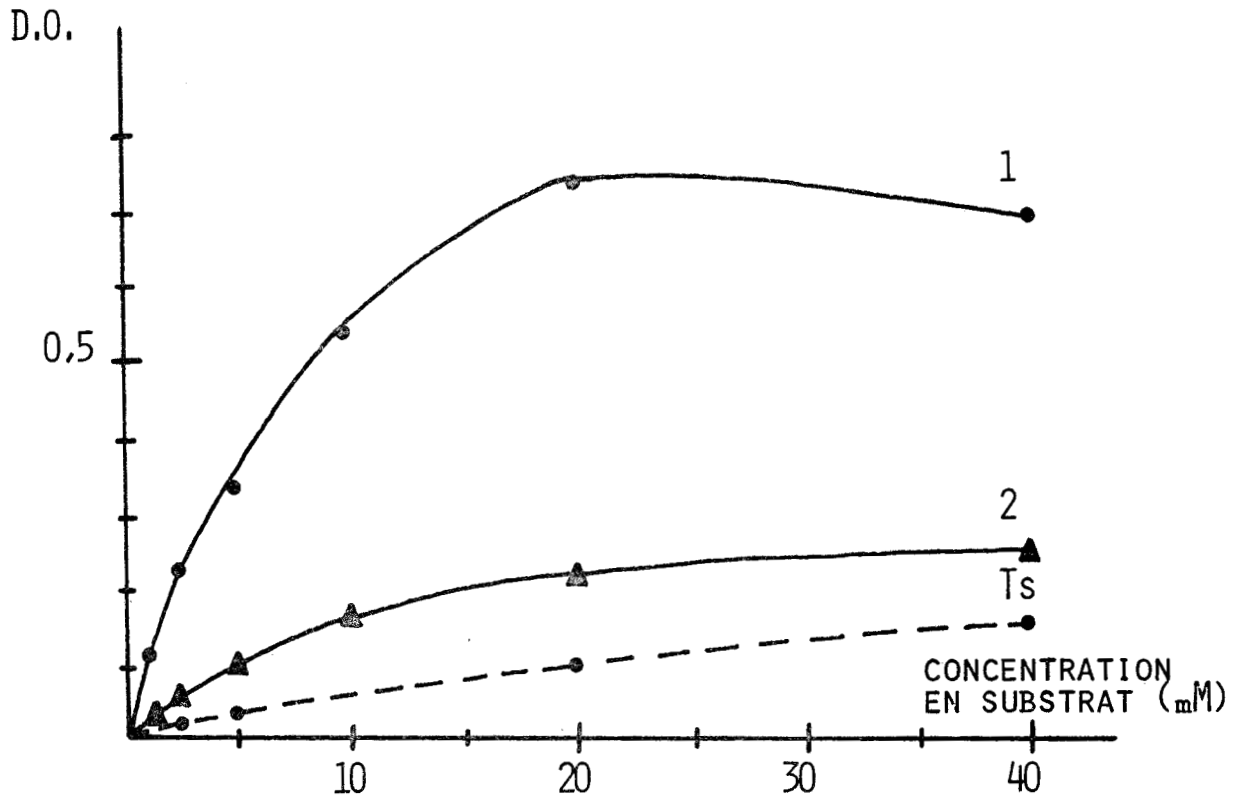


FIGURE 10 : ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT L-LEUCINAMIDE.
L'activité enzymatique est exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

- Courbe 1 : La solution enzymatique utilisée est un homogénat brut.
- ▲— Courbe 2 : La solution enzymatique utilisée est un éluat de Sephadex G 200.
- Courbe Ts : Hydrolyse spontanée du substrat L-leucinamide en tampon borate.



Aussi avons-nous retenu une concentration en substrat de 10 mM pour laquelle la valeur du témoin substrat n'est pas trop élevée et pour laquelle l'hydrolyse du substrat par la leucine aminopeptidase soit suffisamment appréciable vis-à-vis de ce témoin substrat.

e) Effet du temps d'incubation.

Nous avons réalisé des hydrolyses de la L-leucinamide pendant des temps variant de 0 à 60 minutes.

La Figure 11 nous permet de constater que cette hydrolyse est linéaire en fonction du temps.

Pour nos dosages, nous avons choisi des temps variant de 10 à 20 minutes selon la concentration en enzyme de nos solutions, ce qui permet parfois de supprimer les dilutions, et ainsi d'éliminer les erreurs imputables à celles-ci.

f) Conclusion sur l'activation de la leucine aminopeptidase par les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} .

Nous avons pu mettre en évidence une activation par le magnésium 1 mM en solution tamponnée et par le manganèse 0,5 mM en solution aqueuse. Nous avons pensé que l'activation par les ions magnésium serait d'un usage plus facile pour notre technique de dosage, étant donné la formation du précipité de $Mn(OH)_2$ nuisible pour la lecture de nos dosages lors de l'utilisation des ions Mn^{2+} .

D'autre part, nous avons pensé que si nous introduisions le magnésium dans la solution de L-leucinamide, l'activation serait assez comparable à celle produite après préincubation de l'enzyme avec ces mêmes ions.

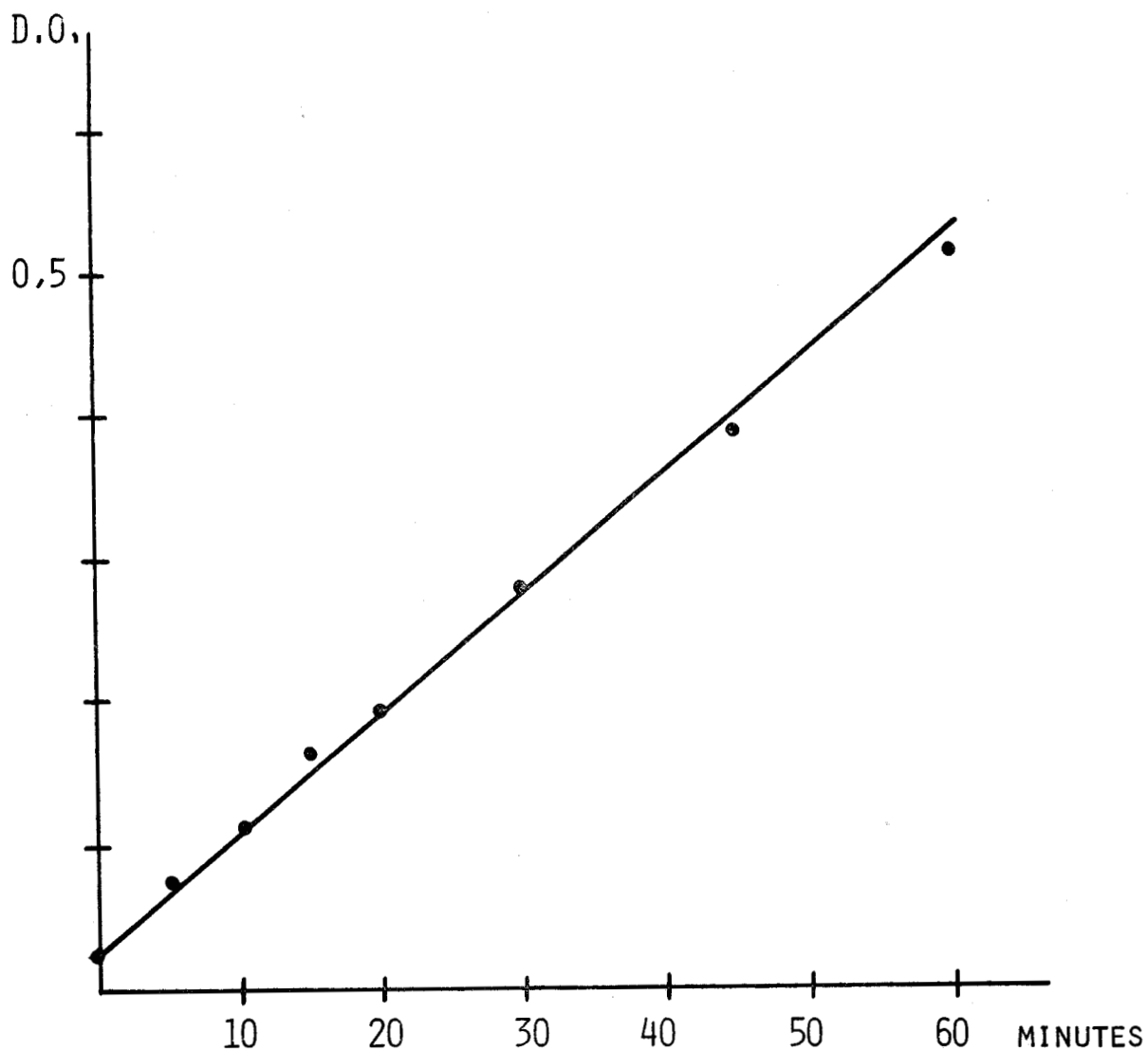


FIGURE 11 : HYDROLYSE DE LA L-LEUCINAMIDE EN FONCTION DU TEMPS.

L'activité enzymatique s'exprime par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.



Aussi avons-nous pour cela :

- préincubé un homogénat brut avec de l'eau distillée d'une part, (Témoin) et avec des ions Mg^{2+} 1 mM d'autre part.

Cette préincubation est suivie du dosage habituel avec la L-leucinamide.

- effectué un dosage du même homogénat brut avec le substrat L-leucinamide contenant ou non du magnésium 1 mM.

Le Tableau IX renferme les résultats.

Nous pouvons noter une activation de :

- 16 p. 100 par la préincubation avec les ions Mg^{2+} .
- 11 p. 100 par l'incubation directe dans le substrat contenant les ions Mg^{2+} .

Nous pensons que cette différence n'est pas suffisamment grande pour que cette préincubation soit de rigueur avant les dosages. Pour nos nombreux dosages, notamment pour les éluats de colonne, nous avons choisi de supprimer la préincubation et de la remplacer par le substrat L-leucinamide contenant du Magnésium 1 mM.

Préincubation		Réaction enzymatique		Activité enzymatique (U.I.)	Activité enzymatique relative
Temps (mn)	Milieu	Temps (mn)	Substrat		
10	eau distillée	15	L-leucina- mide	0,18	100
10	Mg ²⁺ 1 mM	15	L-leucina- mide	0,21	116
0	0	15	L-leucina- mide	0,18	100
0	0	15	L-leucina- mide + Mg ²⁺ 1 mM	0,20	111

TABLEAU IX : COMPARAISON DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DETERMINEE :

- par hydrolyse du substrat L-leucinamide précédée d'une activation par les ions Mg²⁺ 1 mM
- par hydrolyse du substrat L-leucinamide contenant du Mg²⁺ 1 mM sans activation préalable par ces mêmes ions.



CHAPITRE II

EXTRACTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A PARTIR D'UN HOMOGENAT BRUT.

A/ - PREPARATION DE L'HOMOGENAT BRUT.

1. Prélèvement de l'organe.

Les cobayes de race "tricolore" sont anesthésiés par une solution aqueuse d'uréthane (Prolabo) à 10 p.100 à raison de 1 ml pour 100 grammes de poids corporel. Nous pratiquons ensuite une exsanguino-transfusion avec une solution de chlorure physiologique héparinée (Héparine Fournier) sur les deux carotides. Lorsque les cobayes sont pratiquement exsangues, nous prélevons les reins. Cette opération a pour but d'éliminer au maximum d'éventuels contaminants du sérum.

2. Broyage des reins.

Après avoir enlevé les capsules surrénales, nous nous débarrassons de la graisse et des membranes qui entourent les reins ainsi que des pédicules rénaux, au niveau du hile, formés des vaisseaux sanguins et canaux urinaires.

Les reins sont alors lavés dans du sérum physiologique.

Remarque : Lorsque les reins ne sont pas utilisés aussitôt après leur prélèvement, il est préférable de les congeler (à - 25° C) entourés de leur graisse, ce qui évite ainsi le dessèchement des organes.

Les reins sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax (JANKE & KUNKEL) dans 10 ml environ de solution chlorurée physiologique pendant quelques secondes, de façon à avoir une bouillie homogène.

On obtient ainsi un homogénat brut.

B/ - SOLUBILISATION DE L'ENZYME A PARTIR D'UN HOMOGENAT BRUT : DETERMINATION DU PH OPTIMAL DE SOLUBILITE.

Après centrifugation d'un homogénat brut, nous avons remarqué que l'activité du surnageant est beaucoup plus faible que celle du culot

pH	Activité enzymatique (U.I.)	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique	Activité spécifique relative
Référence 6,7	0,193	1,000	0,190	100
4,0	0,029	0,225	0,130	68
5,0	0,025	0,225	0,110	58
5,5	0,091	0,605	0,150	79
6,0	0,167	0,800	0,208	109
7,5	0,223	1,200	0,180	94
8,0	0,248	1,100	0,225	118
8,5	0,270	1,100	0,245	129
9,0	0,314	1,400	0,224	118
9,5	0,387	1,500	0,257	135
9,8	0,354	1,400	0,267	140
10	0,328	1,400	0,235	123

TABEAU X : DETERMINATION DU pH OPTIMAL DE SOLUBILITE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE : le témoin à pH 6,7 est le surnageant obtenu après centrifugation d'un homogénat brut à 15 000 t/mn pendant 15 minutes. L'homogénat brut est amené à différents pH et les résultats du tableau correspondent aux dosages des différents surnageants obtenus après une centrifugation de 15 000 tours/mn pendant 15 minutes.



Aussi avons-nous cherché à obtenir sous forme soluble le maximum d'activité enzymatique en faisant varier le pH de l'homogénat.

1. Technique :

. Cette technique est effectuée à partir d'un homogénat de pH 6,7 environ.

L'homogénat a été divisé en 12 fractions. 11 fractions ont été amenées à différents pH par addition de soude N ou 0,1 N (Titrisol Merck) ou d'acide chlorhydrique dilué (Merck). La douzième fraction a été laissée au pH initial de 6,7 : elle servira de référence.

Toutes les fractions ont été centrifugées à 15 000 t/minute pendant 15 minutes dans une centrifugeuse refroidie à + 4° C (JOUAN L 65 R).

Tous les culots ont été rejetés. L'activité spécifique des surnageants a été mesurée et comparée à la préparation de référence.

2. Résultats.

Il nous faut remarquer qu'au-dessous de pH 6,0, l'activité enzymatique des surnageants diminue alors qu'elle est maximale à un pH très basique (Tableau X). Cependant, cet optimum est atteint après une croissance en dents de scie, ce qui peut paraître paradoxal si l'on ne s'attache pas à considérer l'hétérogénéité de l'homogénat de départ. Il est possible que ce broyat contienne des inhibiteurs qui agissent de manière différente selon les conditions dans lesquelles ils se trouvent.

C'est à pH 9,8 que nous atteignons le maximum d'activité enzymatique dans le surnageant, ce qui nous permet d'obtenir un surnageant dont l'activité est de 20 p. 100 environ supérieure à celle du surnageant de référence obtenu à pH 6,7 (Tableau XI).

3. Conclusion.

C'est ce pH de 9,8 qui est finalement retenu pour préparer une solution enzymatique d'activité maximale. Le surnageant ainsi obtenu (S₁) sera soumis aux essais de purification.

pH	Activité enzymatique (U.I.)	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique	Activité spécifique relative
Homogénat pH 6,7	0,79	1,9	0,42	100
Surnageant pH 6,7	0,19	1,0	0,19	45
Surnageant pH 9,8	0,35	1,4	0,27	64

TABLEAU XI : RENDEMENT DE LA SOLUBILISATION DE L'ENZYME A pH 9,8 A PARTIR D'UN HOMOGENAT BRUT.



CHAPITRE III

PURIFICATION DE L'ENZYME

Nous nous sommes attachée, dans ce travail sur la leucine aminopeptidase de rein de cobaye, à mettre au point des techniques utilisables en vue de la purification de cette enzyme.

Dans un premier temps, nos essais ont porté sur les techniques de relargage par les sels neutres classiquement utilisées dans les purifications d'enzymes. La description de ces expériences fera l'objet d'un premier paragraphe.

Devant les résultats obtenus, a vrai dire peu encourageants, nous avons renoncé à une étape de relargage préalable, au profit de l'utilisation directe de méthodes chromatographiques et électrophorétiques qui seront développées dans un deuxième paragraphe. Enfin, le développement de nos essais nous a mené à observer l'importance des ions Mg^{2+} qui se sont révélés non seulement activateurs, mais aussi protecteurs de l'enzyme. Dans ce deuxième paragraphe nous décrirons donc également les résultats obtenus lorsqu'au cours des différentes étapes préparatives, l'enzyme est constamment maintenue en présence d'ions Mg^{2+} .

A/ - ESSAIS PRELIMINAIRES : RELARGAGE ET CHROMATOGRAPHIE :

Des essais préliminaires dans la purification nous ont conduit à étudier le relargage par le sulfate de sodium, puis à coupler cette technique avec la chromatographie d'échange d'ions suivie elle-même d'une gel filtration sur Sephadex G 200.

1. Relargage par le sulfate de sodium.^{*}

a) Technique :

Nous avons repris une technique utilisée par SULD et HERBUT (95) : au surnageant S_1 extrait d'un homogénat brut, nous ajoutons sous agitation douce et avec précaution, une solution de sulfate de sodium à 30 g pour 100 ml, à raison de 12 ml de sulfate pour 10 ml de solution d'enzyme. Dès que l'addition du sulfate est terminée, nous laissons la solution 30 minutes à la température du laboratoire et nous la centrifugeons à 15 000 tours/minute. Nous recueillons le surnageant S_2 dont nous mesurons le volume afin de reprendre le culot C_2 respectivement obtenu dans un même volume de tampon borate pH 9,8.

b) Résultats :

Nous avons constaté jusqu'à 96 % d'augmentation de l'activité spécifique dans le culot de relargage par rapport à la solution enzymatique S_1 de départ avec un rendement de 30 p. 100 (Tableau XII).

Cette technique nous ayant semblé encourageante nous avons tenté de la coupler avec des méthodes chromatographiques.

2. Couplage du relargage avec des méthodes chromatographiques.

Nous avons d'abord chromatographié, sur une colonne de cellulose à échange d'anions, le produit enrichi obtenu par relargage (C_2).

Puis nous avons rassemblé et concentré les fractions enzymatiquement actives éluées de la colonne de DEAE-Cellulose, que nous avons soumises à une chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200.

^{*} La très grande sensibilité de la méthode de dosage de la leucine aminopeptidase par mesure de l'ammoniaque libérée à partir du substrat leucinamide ne nous permet pas d'utiliser le relargage par le sulfate d'ammonium.

Fractions étudiées	Activité enzymatique totale ($\mu\text{M NH}_4^+/\text{mn}$)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique	Activité spécifique relative	Rendement
S ₁	5,58	30,0	0,186	100	100 %
S ₂	0,86	8,9	0,096	51	15 %
C ₂	1,64	4,5	0,365	196	30 %

TABLEAU XII : Relargage par le sulfate de sodium à 30 p. 100 : comparaison de l'activité enzymatique, avant et après relargage, dans la solution enzymatique de départ S₁, dans le culot C₂ et le surnageant S₂ après une centrifugation de 15 minutes à 15 000 tours/minute.



a) Chromatographie sur DEAE-cellulose du culot obtenu par relargage

Le culot de relargage (C_2) est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose DE 52 de 14 x 3,5 cm équilibrée dans un tampon borate 0,025 M de pH 8,0 selon la technique décrite dans l'appendice technique, page 147.

L'élution de l'activité enzymatique est rapide : entre les fractions 25 et 30 avec un maximum à 27. Un pic important de protéines est élué avant l'enzyme (Tableau XIII).

Les fractions 25 à 30 sont rassemblées puis concentrées par lyophilisation avant d'être chromatographiées sur une colonne de Sephadex G 200.

b) Gel filtration des fractions actives obtenues après la chromatographie d'échange d'ions :

L'éluat enzymatiquement actif issu de la chromatographie précédente est déposé sur une colonne de Sephadex G 200 de 0,60 x 1 m. Le gel est gonflé et équilibré selon la technique décrite dans l'appendice technique, page 148.

L'enzyme est éluée par le tampon d'équilibration du gel.

Le pic d'élution de l'enzyme révèle une bonne homogénéité avec un maximum d'activité à la fraction 16 qui se situe dans une dépression protéique sur le chromatogramme (Tableau XIII).

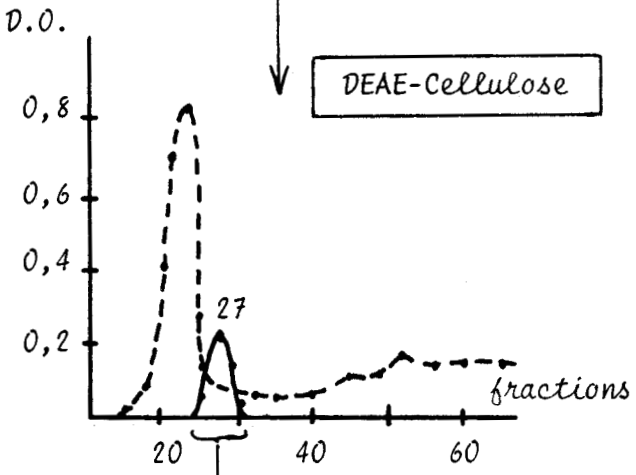
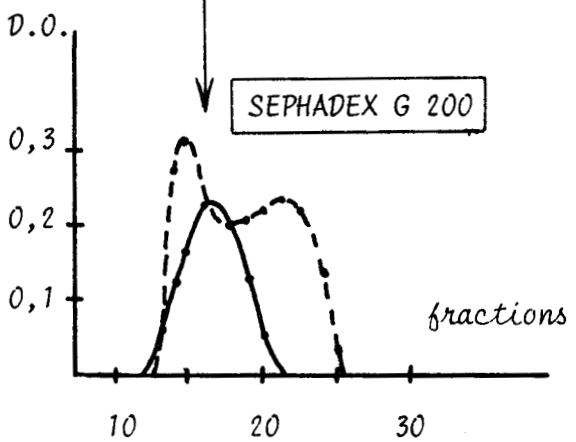
c) Résultats

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau XIII.

Nous constatons que le couplage du relargage avec la chromatographie d'échange d'ions permet d'obtenir une préparation enzymatique enrichie 9,5 fois (fraction 27 du chromatogramme) par rapport à l'homogénat brut. Cependant, après gel filtration, le facteur de purification retombe à 2 fois (pour la fraction 16).

3. Conclusion.

Le relargage utilisé isolément paraissait à priori pouvoir être appliqué comme étape de purification mais son couplage avec des méthodes chromatographiques s'est révélé inutilisable.

Etapes de la purification	Facteur de Purification
<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HOMOGENAT BRUT</div> ↓ </div>	1
<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CULOT DE RELARGAGE C₂</div> ↓ </div>	0,8
 <p style="text-align: center;">↓</p>	9,5 (fraction 27)
	2,2 (fraction 16)

TABEAU XIII : TABLEAU RECAPITULATIF DES ESSAIS PRELIMINAIRES DE PURIFICATION

- Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction du LOWRY.



L'élimination de l'excès du sulfate de sodium par dialyse ne nous permet pas d'obtenir de meilleurs résultats (96).

Après ces résultats peu encourageants, nous avons donc abandonné le relargage comme étape possible de la purification de l'enzyme.

La suppression du relargage ne suffit pas à lui seul pour améliorer la purification de l'enzyme (97), et le couplage DEAE-Cellulose + gel filtration montre que l'enzyme est dénaturée au cours de ces étapes chromatographiques.

SMITH et coll. pensent que le magnésium stabilise l'enzyme. Celui-ci étant absent des tampons utilisés jusque maintenant, nous l'avons introduit dans les différents milieux pour stabiliser l'enzyme.

B/ - METHODES DE PURIFICATION EN PRESENCE D'IONS Mg^{2+} :

On sait que les ions Mg^{2+} activent l'enzyme et peuvent la stabiliser. C'est pourquoi nous les avons introduits dans les tampons. Nous avons choisi la concentration qui permet d'obtenir l'activité maximale, c'est-à-dire une concentration de 0,001 M (Cf. page 36).

La première étape de la purification consiste en une chromatographie sur DEAE-Cellulose. Elle se révèle être une assez bonne méthode pour éliminer des protéines sans trop de dommage pour l'enzyme.

Nous exposons les différents couplages de cette première étape, avec des méthodes d'électrophorèse, de gel filtration ou d'ultracentrifugation, ce qui nous a permis d'obtenir une solution enzymatique enrichie et aussi peu dénaturée que possible.

1. Chromatographie sur DEAE-Cellulose.

a. Technique :

Nous nous sommes inspirée d'une technique mise en oeuvre par SULD et HERBUT (98).

(96 et 97) VINCENT O... (D.E.A.)

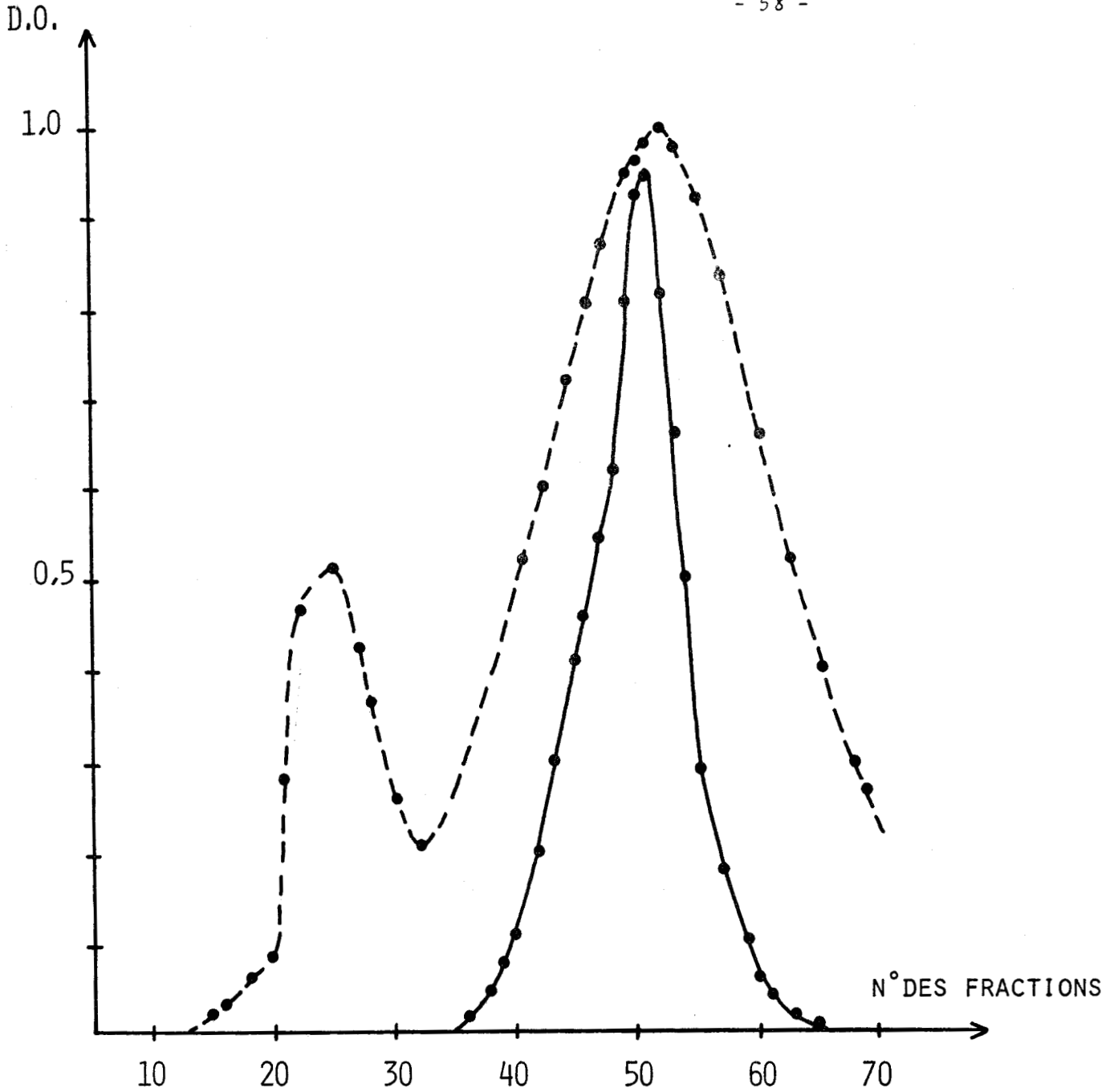


FIGURE 12 : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS sur colonne de DEAE-Cellulose DE 52 en tampon borate 0,025 M, pH 8,0 d'un surnageant S₁. Elution par un système tampon NaCl 0,5 M - Tampon borate 0,025 M, pH 8,0.

- Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- - ●- - Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.



Nous utilisons une colonne (14 x 3,5 cm) de DEAE-Cellulose DE 52 humide (Whatman) que nous équilibrons dans du tampon borate 0,025 M, pH 8,0.*

Des difficultés techniques d'équilibration de la DEAE-Cellulose à pH 9,8 (pH optimal de solubilisation de l'enzyme) nous ont conduite finalement à adopter un pH de 8,0.

L'élution de la colonne s'effectue au moyen d'un gradient linéaire de NaCl préparé de la manière suivante :

- un premier erlenmeyer de 500 ml contient 225 ml de tampon borate 0,025 M, pH 8,0.
- un deuxième erlenmeyer de 500 ml, contient 138 ml de NaCl 0,5 M (Prolabo R.P.).

Nous utilisons une pompe péristaltique et nous collectons ainsi des fractions de 3 ml toutes les 20 minutes.

Cette chromatographie s'effectue en chambre froide régulée à + 4° C.

b) Résultats :

Les fractions à activité leucine aminopeptidasique sont éluées dès le tube n° 35 avec un maximum au tube n° 51 (Figure 12). Ces fractions sont repérables à l'oeil nu, leur couleur se situant dans les tons rouge orangé.

Le profil du chromatogramme protéique montre deux pics. Le premier est élué au début de la chromatographie et ne correspond à aucune activité leucine aminopeptidasique. Le second est élué en même temps que l'enzyme. Ce dernier pic de protéines est toujours important.

Le rendement de cette chromatographie varie entre 15 et 25 % et le facteur de purification de 1,5 à 3 fois à chaque chromatographie de ce type (Tableau XIV).

Les fractions à activité leucine aminopeptidasique les plus actives, représentant un volume d'environ 50 ml, sont rassemblées. Elles sont concentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol en vue d'une utilisation ultérieure.

* La composition du tampon figure dans l'appendice technique, page 147.

Etapes	Volume (ml)	Activité enzymatique totale ($\mu\text{M NH}_4^+$ /mn)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique	Facteur de Purification	Rendement
Brut	7,5	117	218	0,53	1	100 %
S ₁	6	34,6	141	0,25	0,5	30 %
DEAE-Cellulose	49	17,7	23,1	0,76	1,5	15 %

TABLEAU XIV : PURIFICATION DE LA LAP APRES CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS sur colonne de DEAE-Cellulose DE 52.

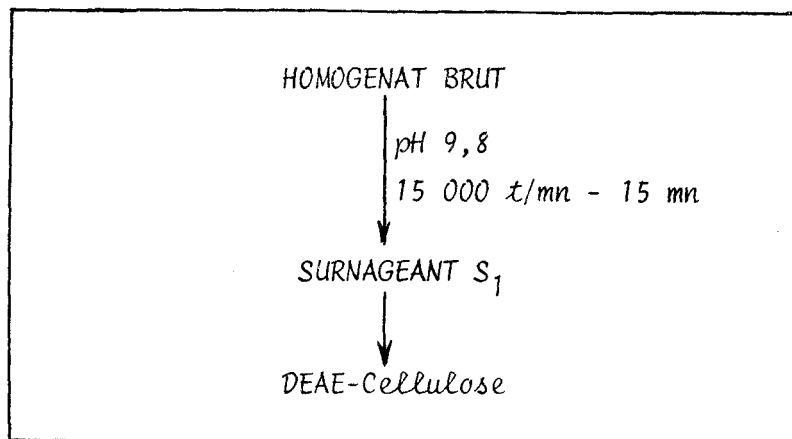


c) Conclusion.

Le chromatogramme enzymatique montre un pic d'allure symétrique.
Le Tableau de rendement (Tableau XIV) de cette chromatographie indique une forte diminution du taux de protéines par rapport à l'homogénat brut.

Nous avons donc choisi de coupler la chromatographie d'échanges d'ions avec d'autres techniques.

Le Tableau suivant résume les étapes précédentes qui sont à la base des différents couplages que nous avons pu réaliser :



2. Couplage : DEAE-Cellulose + Gel filtration sur Sephadex G 200.

L'éluat enzymatique concentré, issu de la chromatographie d'échange d'ions est filtré sur une colonne de Sephadex G 200 dont le tampon d'équilibration contient du Mg^{2+} 0,001 M.

a) Technique :

La préparation du gel est indiquée dans l'appendice technique, page 148.

L'éluat de la colonne se fait par le tampon d'équilibration du gel (tampon borate 0,025 M de pH 8,0, Mg^{2+} 0,001 M).

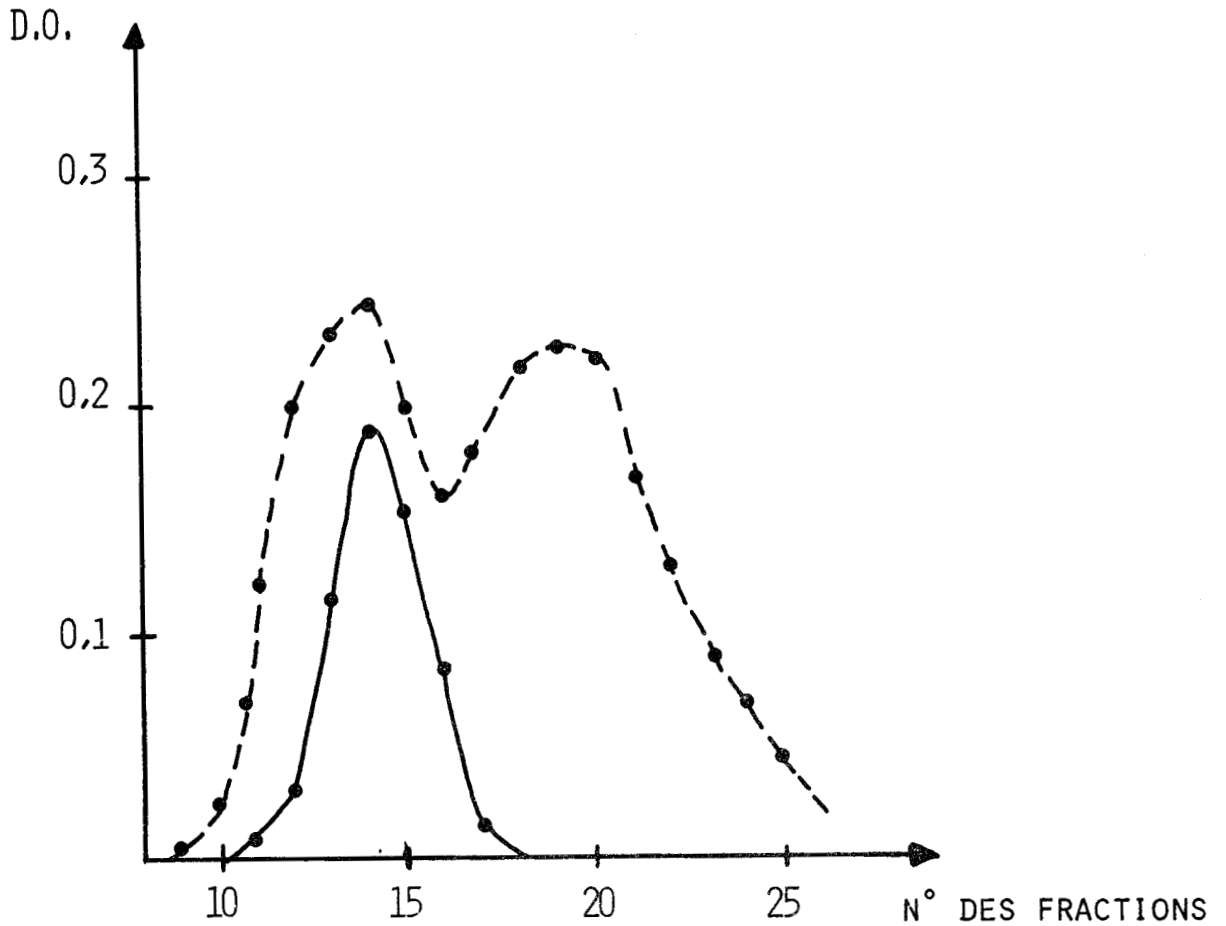


FIGURE 13 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION sur Sephadex G 200 des fractions actives enzymatiquement obtenues après chromatographie d'échange d'ions. L'élution s'effectue par du tampon borate 0,025 M, pH 8,0.

- Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- Protéines exprimées par la Densité Optique du LOWRY.



Etapes	Activité enzymatique totale. μ M NH ₄ ⁺ /mm	Protéines totales (mg)	Activité spécifique	Facteur de Purification	Rendement
Brut	123,5	637,2	0,19	1	100 %
S ₁	137	345	0,39	2	111 %
DEAE-Cellulose	26	56	0,46	2,4	21 %
Sephadex G 200	3,4	1,8	1,8	11	3 %

TABEAU XV : RESULTAT DU COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS ET DE LA GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.



Le débit de la pompe péristaltique 2 PP 60 QUICKFITT est réglé à 4 gouttes par minute, soit au total un volume de 1,5 ml par fraction collectée toutes les 15 minutes.

Cette chromatographie a également lieu en chambre froide thermostatée à + 4° C.

La solution enzymatique obtenue après chromatographie sur DEAE-Cellulose est concentrée par dialyse contre du polyéthylène glycol puis déposée sur la colonne de Sephadex G 200.

b) Résultats.

Le chromatogramme nous révèle un pic homogène d'activité enzymatique dont le maximum se situe à la fraction 14 (Figure 13). L'éluion de l'enzyme se répartit sur 7 fractions entre les tubes 11 et 17.

Par contre, le profil protéique nous révèle deux pics. Le premier contient l'enzyme tandis que le second, inactif, semble correspondre à des protéines d'un poids moléculaire voisin de celui de la sérum albumine.

Le Tableau XV rend compte de la purification de l'enzyme par ce couplage : l'enzyme ainsi purifiée 11 fois avec un rendement de 3 % reste active et a pu être utilisée pour étudier ses propriétés physiques, notamment son poids moléculaire (Cf. Chapitre IV des propriétés physiques) ainsi que pour contrôler sa pureté protéique par électrophorèse.

CONTROLE DU DEGRE DE PURETE PROTEIQUE DE L'ENZYME PURIFIEE par le couplage DEAE-Cellulose + Gel filtration.

Ce contrôle s'effectue sur électrophorèses d'acétate de cellulose. Les électrophorèses sont faites en double avec le matériel et selon la technique décrite dans l'appendice technique, page 150.

Après révélation à l'Amido-schwarz de l'une d'entre elles, nous obtenons un repérage des protéines sous forme de bandes colorées. En fonction

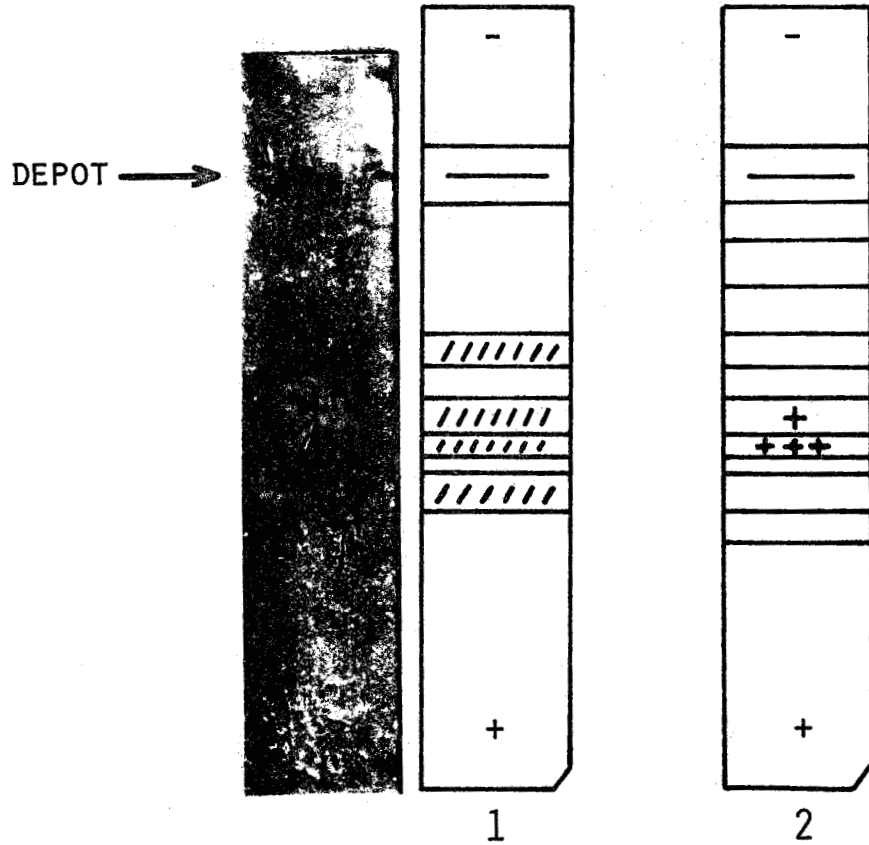


FIGURE 14 : ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR ACETATE DE CELLULOSE d'une solution enzymatique partiellement purifiée par couplage DEAE-Cellulose + Sephadex G 200.

Tampon véronal pH 9,2 - 200 volts - 75 minutes.

Electrophorese 1 : /////////////// protéines révélées à l'Amido-schwarz

Electrophorèse 2 : +++ activité enzymatique déterminée par incubation dans le substrat L-leucine amide des bandes découpées selon le schéma 2.



de ce repérage, nous découpons la seconde électrophorèse en 11 bandes dont 5 correspondent à des protéines, les 6 autres à des fractions intermédiaires. Chaque bande ainsi séparée est coupée en petits morceaux qui sont incubés dans le substrat L-leucinamide en vue du repérage de la leucine aminopeptidase. Ce dosage nous permet de localiser une activité enzymatique au niveau de 2 bandes protéiques (Figure 14).

3. Couplage : DEAE-Cellulose + Gel filtration + Ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.

Parmi les techniques susceptibles d'améliorer la purification, nous avons retenu l'ultracentrifugation préparative car effectuée sur un gradient de saccharose, elle permet d'obtenir à partir d'un homogénat brut un fractionnement encourageant (Figure 15 A).

a) Technique :

Nous avons utilisé une ultracentrifugation BECKMAN L₃50 équipée d'un rotor SW 41 à godets mobiles.

Sur plusieurs tubes de gradient (préparés selon la méthode décrite dans l'appendice technique, page 155). Nous avons déposé 0,2 ml de l'enzyme partiellement purifiée après le couplage DEAE-Cellulose + Gel filtration.

Les tubes sont équilibrés à 0,1 g près, puis placés dans les pots de centrifugation qui sont fixés sur le rotor préalablement refroidi à + 4° C.

La centrifugation dure 7 H à 41 000 tours/minute (286 000 g) et à + 4° C.

Chaque tube est ensuite fractionné selon la méthode décrite dans l'appendice technique, page 157. Sur chaque fraction sont dosées l'activité enzymatique et les protéines.

b) Résultats.

La Figure 15 C met en évidence 2 pics d'activité enzymatique dont les maxima se situent au niveau des fractions 20 et 25. La fraction 25 est moins active que la fraction 20.

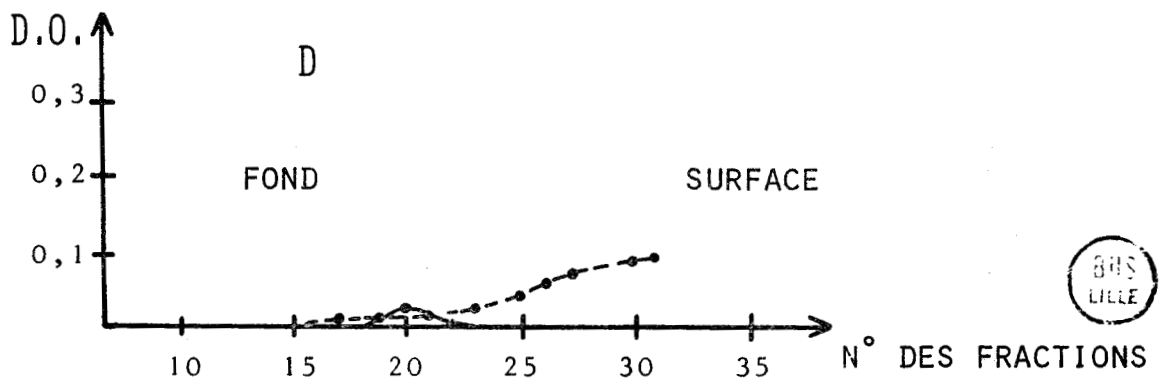
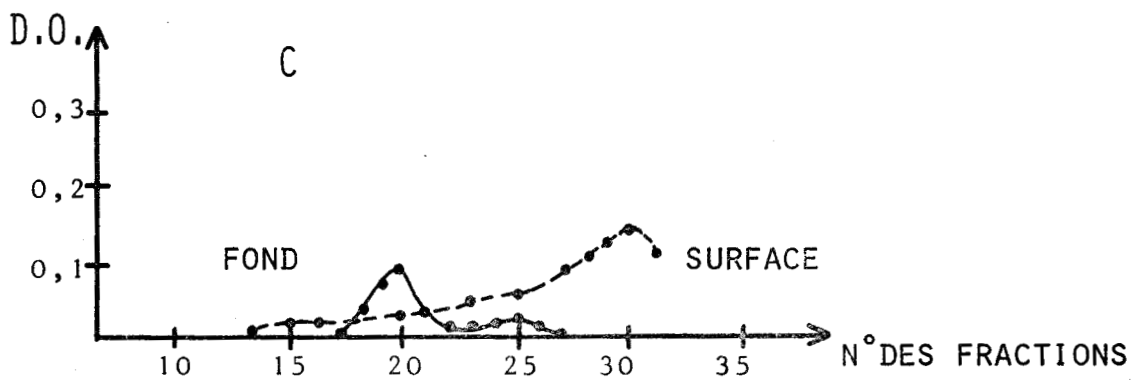
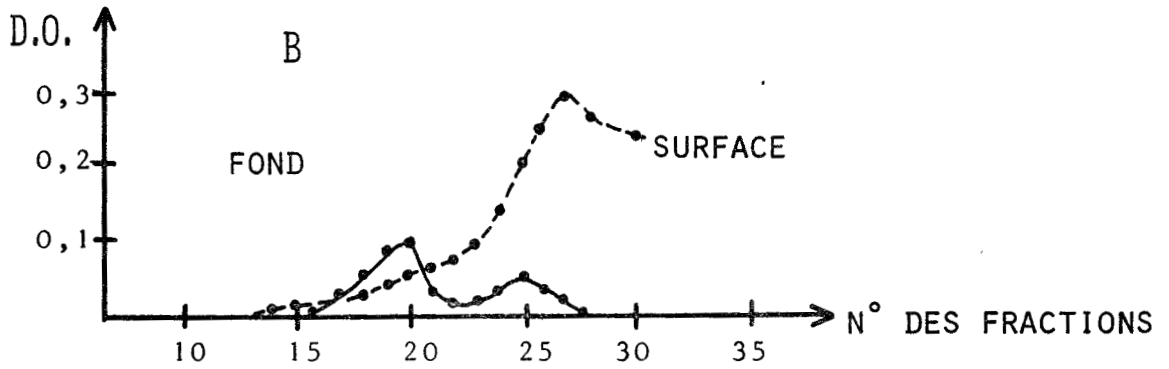
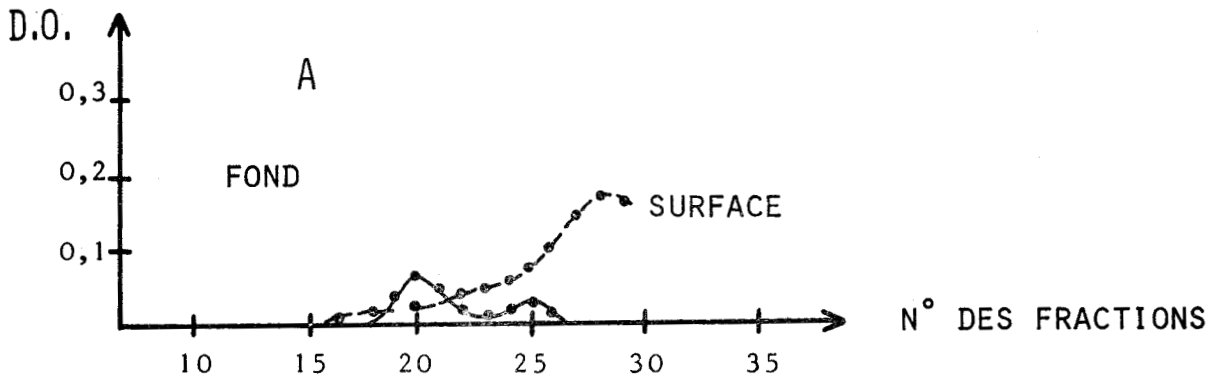


FIGURE 15 : ULTRACENTRIFUGATION DE 7 H EN GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100 d'un homogénat brut (A), d'un éluat de DEAE-Cellulose (B), de la fraction enzymatique résultant du couplage DEAE + G 200 (C), de la fraction enzymatique résultant du couplage DEAE + électrophorèse préparative sur blocs de cellogel (D).

Le profil protéique est d'intensité assez faible. Seules, des protéines légères forment un pic qui se détache sur ce profil vers la surface du gradient.

Les profils enzymatique et protéique rappellent ceux obtenus par simple ultracentrifugation de l'homogénat brut (Figure 15 A).

Ainsi le caractère d'homogénéité enzymatique du couplage DEAE-Cellulose + gel filtration sur Sephadex G 200 précédent n'est plus fondé. L'ultracentrifugation sépare deux activités enzymatiques de poids moléculaires différents.

D'ores et déjà, nous pouvons nous demander si ces deux activités qui ne sont décelables qu'à l'ultracentrifugation sont le fait de la mise en évidence de sous-unités de l'enzyme, ou encore de formes enzymatiques différentes.

4. Couplage : DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative sur bloc de cellogel.

Cette électrophorèse est le résultat d'un couplage préalable avec une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Cellulose.

a) Technique et méthode utilisées*

b) Résultats :

Après coloration du demi-bloc et en regard de celui-ci, nous découpons les blocs en fonction des bandes colorées à l'Amido-schwarz. Nous mettons ainsi en évidence 4 bandes distinctes numérotées de 1 à 4 : la bande n° 4 étant la plus rapide à l'anode (Figure 16) . Parfois, la bande 1 est très faible.

Chaque bande y compris la zone de dépôt est éluee à l'aide d'une seringue (type SPUF-Chemotron) par simple pressage. Le dosage enzymatique de chaque fraction ainsi obtenue nous révèle que les bandes 3 et 4 sont

* La technique et la méthode utilisées sont décrites dans l'appendice technique, page 148.

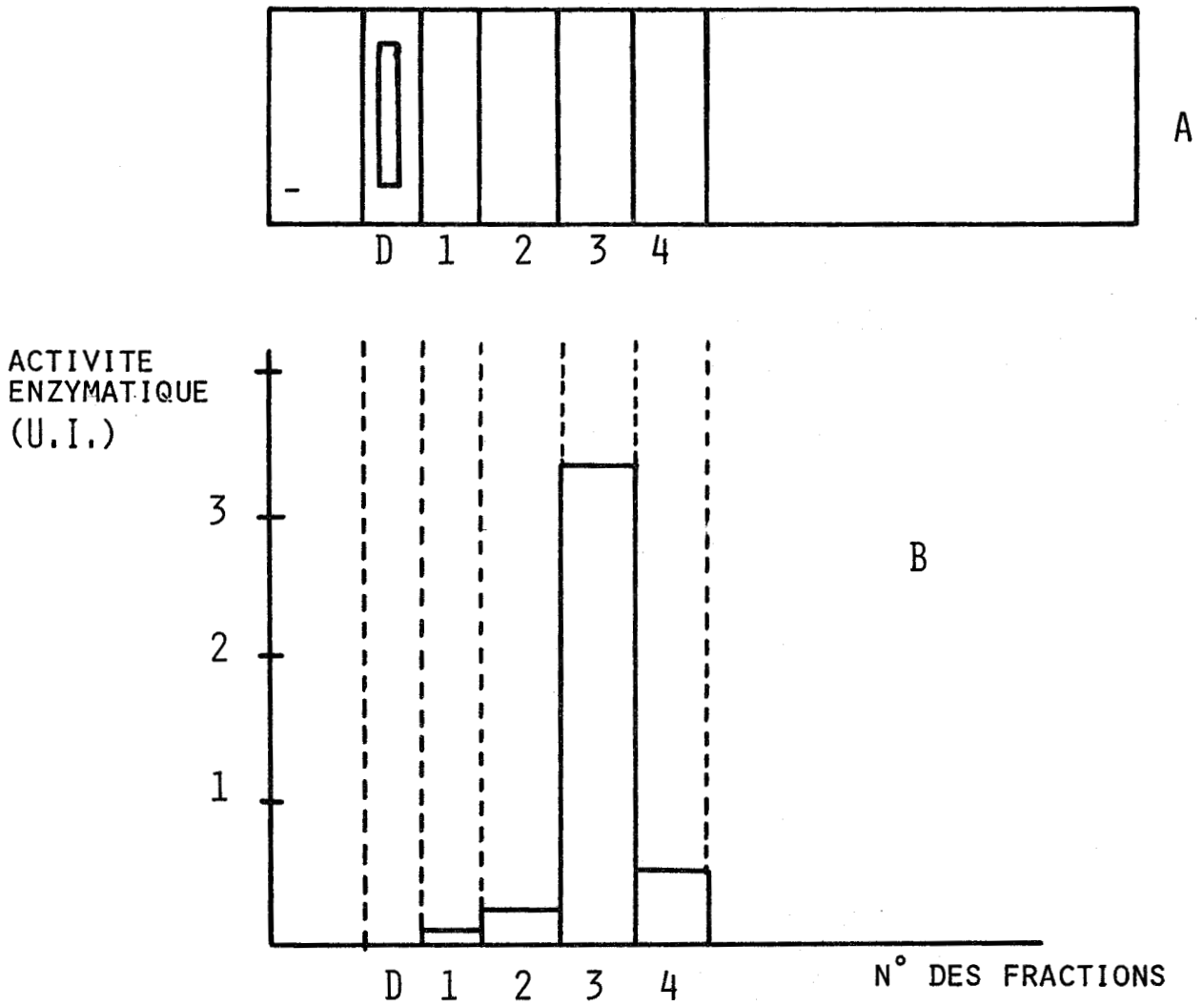


FIGURE 16 : ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL D'UN ELUAT DE DEAE-CELLULOSE.

A : Schéma de la matrice du bloc

D : zone du dépôt

1 }
2 } bandes colorées à l'Amidoschwarz
3 }
4 }

B : Diagramme de l'activité enzymatique de chaque bande découpée selon la matrice du bloc.



Etapes	Volume (ml)	Activité enzymatique (U.I.)	Activité enzymatique totale	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique	Facteur de Purification	Rendement
BRUT	12,5 ml	11,4	142	39,5	0,3	1	100 %
S ₁	9 ml	4,6	42	34,5	0,13	0,4	30 %
DEAE-Cellulose	28 ml	0,9	25	1,0	0,9	3	18 %
B	D	1,8 ml	0,003	0,4	0	-	0 %
	1	1,16 ml	0,04	0,6	0,06	0,2	0 %
L	2	3,2 ml	0,23	1,4	0,16	0,5	0,5 %
	3	2,2 ml	3,28	0,56	5,8	19,5	5 %
O	4	2,4 ml	0,5	0,48	1,04	3,5	0,8 %

TABEAU XVI : PURIFICATION DE LA LAP DE REIN DE COBAVE PAR COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS ET L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.



actives, surtout en ce qui concerne la bande 3 (Figure 16). Les bandes 3 et 4 étant bien distinctes, il semble difficile de conclure que l'enzyme traîne sur le bloc.

La fraction enzymatique de la bande n° 3 est purifiée 19,5 fois par rapport à l'homogénat de départ avec un rendement de 5 %, tandis que celle de la bande n° 4 est purifiée 3,5 fois avec un rendement de 0,8 %. (Tableau XVI).

Il semble donc que le couplage DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative mette en évidence deux activités enzymatiques.

D'emblée, le couplage antérieur (DEAE-Cellulose + Gel filtration) n'avait rien révélé de semblable. Seul le contrôle protéique de ce couplage met en évidence 2 bandes de protéines actives enzymatiquement, et ce n'est qu'après un troisième couplage (DEAE-Cellulose + Gel filtration + Ultracentrifugation) que deux activités enzymatiques apparaissent.

Le résultat du couplage DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative nous a donc conduit à le compléter par une ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.

Auparavant, nous avons concentré les cinq fractions obtenues par électrophorèse préparative afin de contrôler par électrophorèse analytique la qualité de la récupération.

Nous avons fait deux contrôles :

- l'un sur acétate de cellulose pour chacune des fractions obtenues après électrophorèse préparative.
- l'autre sur gel de polyacrylamide à chacune des étapes préparatives qui conduit à une enzyme purifiée 19,5 fois.

1er contrôle électrophorétique : sur acétate de cellulose :

Chaque fraction est déposée deux fois, l'une des électrophorèses servant de repère après coloration à l'Amidoschwarz tandis que l'autre est découpée selon les bandes mises en évidence.

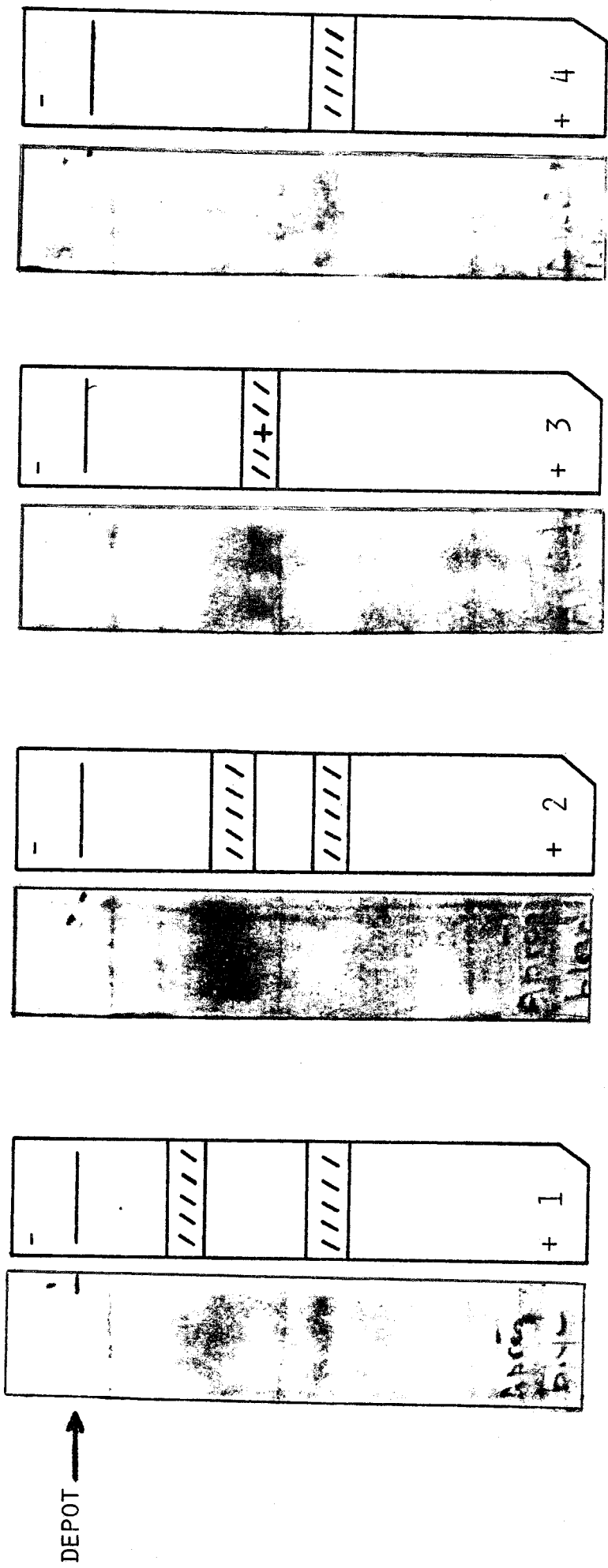


FIGURE 17 : ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR FEUILLE D'ACETATE DE CELLULOSE DES DIFFERENTES FRACTIONS (1 à 4)
 OBTENUES APRES UNE ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.

////////// protéines révélées à l'Amidoschwarz

+ activité enzymatique déterminée par incubation des différentes bandes dans le substrat L-leucine amide.



Les fractions 1 et 2 de l'électrophorèse préparative montrent chacune en électrophorèse analytique, deux bandes protéiques. Par contre, les fractions 3 et 4 de cette même électrophorèse préparative ne révèlent qu'une seule bande à l'électrophorèse analytique. Seule, l'électrophorèse de la fraction 3 présente une activité enzymatique qui se superpose à la bande de protéines (Figure 17).

Nous pouvons donc remarquer que l'activité enzymatique mineure de la bande 4 d'électrophorèse préparative a disparu, sans doute désactivée lors de la concentration préalable à l'électrophorèse analytique.

2ème contrôle électrophorétique : sur gel de polyacrylamide :

Nous avons déposé en électrophorèse sur gel de polyacrylamide la fraction majeure active issue de l'électrophorèse préparative, mais aussi un homogénat brut, un surnageant S₇ et les fractions actives éluées de la DEAE-Cellulose.

La technique de dosage de l'ammoniaque par la méthode de BERTHELOT ne nous permet pas de mettre en évidence une activité enzymatique des bandes. En effet, nous avons observé que les différents réactifs A*, C*, G*, E*, H* et le teemed* perturbent la réaction de BERTHELOT : les réactifs C (acrylamide + bis) et G (amino persulfate) apportent de l'ammoniaque en quantité très importante. Le tampon d'électrode H (glycine + tris) et surtout le teemed sont des inhibiteurs de la coloration. Il en est de même pour le réactif A (Teemed + Tris + HCl) qui en plus inhibe la réaction enzymatique.

Nous constatons la diminution du nombre de bandes au cours des étapes de purification, sans toutefois pouvoir repérer précisément l'enzyme.

Ainsi les électrophorèses de contrôle de l'éluat enzymatique majeur (bande n° 3) obtenu après électrophorèse préparative sur bloc de cellogel nous donnent 2 bandes protéiques en gel de polyacrylamide alors qu'elle n'en donnait qu'une seule sur acétate de cellulose : (Figure 18).

* Le nom de ces réactifs et leur composition sont indiqués dans l'appendice technique, page 153.

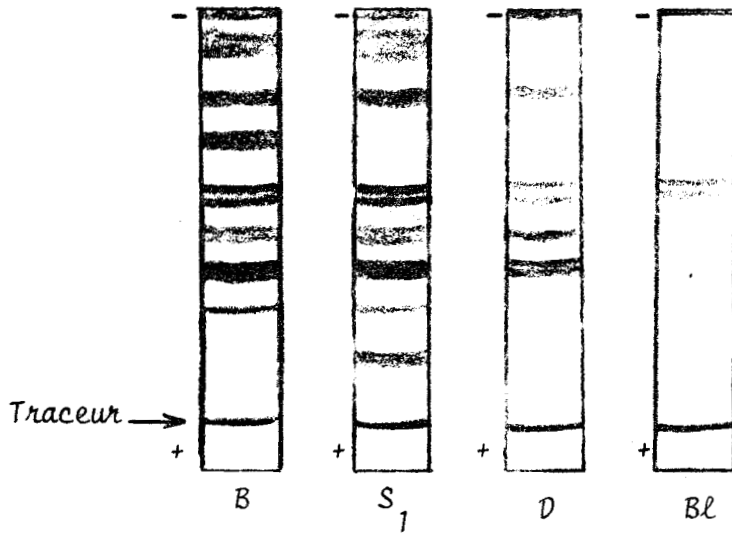


FIGURE 18 : SCHEMA DES ELECTROPHORESES EN DISQUES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE des différentes étapes de purification par couplage de la chromatographie sur DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative sur blocs de cellogel.

B = Homogénat brut

S₁ = Solution enzymatique à pH 9,8

D = Eluat de DEAE-Cellulose

Bl = Eluat de blocs de cellogel (bande majeure n° 3).



5. Couplage : DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative + Ultra-centrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.

Le contrôle par électrophorèse analytique montre que la seconde fraction enzymatique (fraction mineure de la bande n° 4) de l'électrophorèse préparative n'est pas stable et s'inactive après concentration, même en présence de magnésium. Aussi seule, la fraction enzymatique majeure (bande n° 3) a été soumise à l'ultracentrifugation.

a) Technique :

Nous avons utilisé une centrifugeuse BECKMAN L₃50 équipée d'un rotor SW 41 à godets mobiles.

Nous avons déposé 0,2 ml de l'enzyme partiellement purifiée par électrophorèse préparative après une concentration par dialyse contre du polyéthylène glycol.

Parallèlement, dans un autre tube nous avons déposé comme référence un homogénat brut sur un gradient identique.

Après une centrifugation de 7 H à 41 000 t/minute (286 000 g), chacun des 2 tubes est fractionné en 32 fractions dans lesquelles nous avons dosé l'activité enzymatique et les protéines.

b) Résultats.

Dans le premier tube correspondant à la fraction préalablement purifiée en électrophorèse, on met en évidence (Figure 15 D) un seul pic d'activité enzymatique dont le maximum se situe à la fraction n° 20.

Le profil protéique est d'intensité assez faible lui-aussi. Seules, des protéines légères forment un faible pic qui se détache du profil.

Dans le deuxième tube qui correspond à l'homogénat brut, les profils enzymatique et protéique sont identiques à ceux déjà mis en évidence dans un paragraphe précédent (Figure 15 A) ; ils montrent deux zones d'activité enzymatique avec un maximum aux fractions 20 et 25.

La fraction enzymatique obtenue après la triple étape DEAE-Cellulose + Electrophorèse préparative + Ultracentrifugation est très faiblement active et bien qu'elle ne montre pas d'hétérogénéité les résultats restent difficilement interprétables.

6. Couplage : DEAE-Cellulose + Ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.

Les différents couplages des techniques précédentes avec l'ultracentrifugation, nous ont conduite à considérer la seule chromatographie d'échange d'ions couplée avec l'ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %, sans autre stade intermédiaire.

a) Technique utilisée.

L'éluat enzymatique concentré, issu de la chromatographie d'échange d'ions, est déposé sur un tube de gradient de sucrose 5-20 %.

Après une centrifugation de 7 H à 41 000 t/minute (286 000 g) le tube est fractionné en 32 fractions desquelles, nous dosons l'activité enzymatique et les protéines.

b) Résultats.

La Figure 15 B montre, deux fractions enzymatiques actives dont les maxima se situent au niveau des fractions numéros 20 et 25.

Le profil enzymatique révèle un faible pic au niveau de la fraction n° 20 tandis qu'un pic correspondant à des protéines plus légères se détache vers la surface du gradient.

Nous retrouvons donc ici les résultats obtenus après le couplage DEAE-Cellulose + Gel filtration + Ultracentrifugation d'un homogénat brut.

7. Conclusion générale de la purification de l'enzyme.

Les différents couplages de la chromatographie d'échange d'ions avec des méthodes de gel filtration ou d'électrophorèse sur cellogel ont montré que nous pouvions purifier une enzyme qui reste relativement stable

contrairement aux premiers essais préliminaires et notamment en présence de Mg^{2+} (99).

Après le couplage DEAE-Cellulose + Electrophorèse sur cellogel, nous avons purifié l'enzyme environ 20 fois. Le contrôle de pureté protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ne montre que 2 bandes. Cette enzyme ainsi préparée est moins stable que celle purifiée 11 fois par le couplage DEAE-Cellulose + Gel filtration, c'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons choisi ce dernier couplage pour obtenir une enzyme partiellement purifiée en vue d'en étudier les propriétés physiques.

Nous n'avons pas pu jusqu'à présent obtenir une purification plus poussée, car nous sommes en présence d'une enzyme qui se révèle très instable dès que l'on soustrait des protéines de son milieu.

L'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide reste inutilisable à cause de l'interférence des réactifs qui entrent dans les compositions du gel et des tampons.

La chromatographie d'affinité appliquée à la leucine aminopeptidase de rein de cobaye n'est pas encore mise au point. Nos premiers essais confirment à nouveau l'instabilité de l'enzyme, ce qui rend difficile les études ultérieures.

L'ultracentrifugation de l'enzyme purifiée par les différents couplages précédemment cités, a mis en évidence, dans la plupart des cas, deux activités enzymatiques, ce qui infirme l'homogénéité apparente de l'enzyme par le couplage chromatographique DEAE-Cellulose + Gel filtration.

Ce dernier résultat nous a conduit à aborder l'étude de l'enzyme selon une autre technique, celle du fractionnement cellulaire (Voir Chapitre V).

CHAPITRE IV

PROPRIETES PHYSIQUES

Il ne nous a pas semblé possible d'aborder l'étude des propriétés physiques sur les préparations enzymatiques les plus purifiées en raison de leur grande instabilité. Nous avons préféré utiliser la préparation enzymatique partiellement purifiée obtenue page 61. Rappelons que cette purification est obtenue après les stades successifs suivants :

Homogénat \longrightarrow Surnageant pH 9,8 \longrightarrow DEAE-Cellulose \longrightarrow Gel filtration

A/ - SPECIFICITE.

Le leucine aminopeptidase hydrolyse comme son nom l'indique la liaison amide des L-leucyl peptides et de la L-leucinamide. Mais son action doit être prise au sens large du terme, car nous avons constaté qu'elle hydrolyse d'autres amides ainsi que des di et tri-peptides.

1. Hydrolyse d'amides.

a. Méthodes.

Nous avons essayé la spécificité de la leucine aminopeptidase du rein de cobaye en remplaçant la L-leucinamide par un certain nombre d'amides à une concentration de 10 mM dans du tampon borate 10 mM pH 9,2.

L'hydrolyse éventuelle de ces différents substrats s'effectue de la manière suivante :

- 1 ml de substrat en présence de 0,1 ml d'enzyme est incubé pendant 20 minutes dans un bain-marie à 37° C.

b. Résultats.

Les résultats sont inclus dans le Tableau XVII.

Nous constatons que l'enzyme n'a aucune action pour certaines amides telles que glycinamide, acétamide, butyramide, nicotinamide. Il en est de même pour le succinimide et la N-carbobenzoxo asparagine.

Tout comme SMITH et coll. (100) l'ont remarqué, l'action de la leucine aminopeptidase est augmentée lorsqu'il existe un groupement NH_2 libre à proximité de la liaison amide. Inversement, on constate l'absence d'action sur l'acétamide et la N-carbobenzoxo asparagine par exemple.

Substrats	Formule chimique	Activité enzymatique relative
L-leucinamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \quad \\ \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	100
Glycinamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CONH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	0
L-tyrosinamide	$\text{HO}-\langle \text{benzene ring} \rangle-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CONH}_2$ <p style="text-align: center;"> NH₂</p>	15,2
L-phénylalaninamide	$\langle \text{benzene ring} \rangle-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CONH}_2$ <p style="text-align: center;"> NH₂</p>	23
L-asparagine D-asparagine D-L-asparagine	$\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p style="text-align: center;"> NH₂</p>	$\begin{array}{l} < 5 \\ < 5 \\ < 5 \end{array}$
L-glutamine	$\text{NH}_2-\text{CO}(\text{CH}_2)-\text{CH}-\text{COOH}$ <p style="text-align: center;"> NH₂</p>	15,2
N-carboxybenzoxy- L-asparagine	$\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p style="text-align: center;"> N O-CO- CH₂- ⟨benzene ring⟩</p>	0
Formamide	H-CO-NH ₂	0
Acétamide	CH ₃ -CO-NH ₂	0
Butyramide	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CONH ₂	0
n-valérianamide	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CONH ₂	0
Benzamide	$\langle \text{benzene ring} \rangle-\text{CONH}_2$	0
Nicotinamide	$\langle \text{pyridine ring} \rangle-\text{CONH}_2$	0
Succinimide	$\begin{array}{c} \text{CO} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \quad \text{NH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CO} \end{array}$	0



TABLEAU XVII: HYDROLYSE DE DIFFERENTES AMIDES PAR LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE COBAVE. Le pourcentage d'activité est calculé par rapport à l'hydrolyse du substrat L-leucinamide.

L'action de la leucine aminopeptidase est d'autant plus grande que la chaîne aliphatique des acides aminés est longue. La L-glutamine est plus facilement hydrolysée que la L-asparagine. Les amides d'acides aminés aromatiques sont également sensibles à l'action de la leucine aminopeptidase.

Son action est pratiquement nulle pour les amides d'acides aminés de la série D (D-asparagine).

2. Hydrolyse de di et tri-peptides.

a. Méthodes.

Pour étudier l'action de l'enzyme sur des di ou tri-peptides, nous avons utilisé les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques pour détecter ou non la présence de produits d'hydrolyse.

Les peptides utilisés sont à une concentration de 10 mM dans du tampon borate de sodium. Ils sont mis à incuber pendant 3 heures à 37° C en présence d'enzyme partiellement purifiée. Nous déposons un aliquot de 50 μ l du milieu réactionnel final (temps t). Le dépôt t_0 correspond à un milieu réactionnel peptide-enzyme non incubé. Parallèlement à ces dépôts nous déposons des témoins d'acides aminés contenus dans ces peptides.

Nous avons utilisé :

- l'électrophorèse à pH 3,9 en milieu Acide acétique/Pyridine/Eau (40/12/1000) pendant 3 heures sous 450 volts.

- la chromatographie unidimensionnelle descendante sur papier dans le milieu Butanol/Acide acétique/Eau (4/1/5) pendant 20 H.

Nous avons ainsi essayé l'action de la leucine aminopeptidase sur les peptides suivants :

- glutathion
- L-leucyl-glycyl-glycine
- L-leucyl-glycine
- DL-alanyl-L-asparagine
- L-histidyl-L-histidine
- Glycyl-L-proline

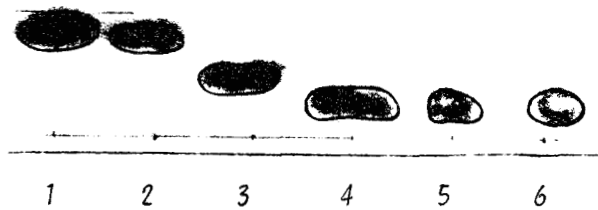


FIGURE 19 : ELECTROPHORESE A pH 3,9 EN MILIEU ACIDE ACETIQUE/PYRIDINE/EAU (40/12/1000) 3 HEURES SOUS 450 VOLTS.
Hydrolyse du substrat glutathion par la leucine aminopeptidase.

1. Témoin glycocolle
2. Témoin cystéine
3. Témoin acide glutamique
4. Témoin glutathion
5. T_0 : produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37° C.
6. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C.

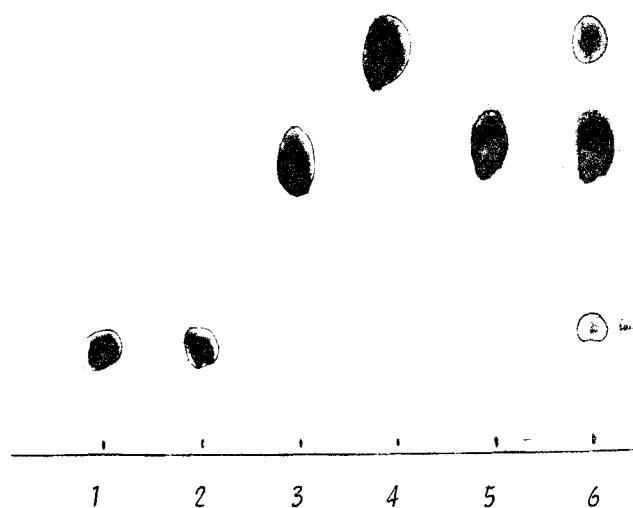


FIGURE 20 : CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE DANS LE BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4/1/5) : Hydrolyse du substrat L-leucyl-glycyl-glycine par le leucine aminopeptidase.

1. Témoin glycolle
2. Témoin glycyl-glycine
3. Témoin L-leucyl-glycyl-glycine
4. Témoin L-leucine
5. T_0 : Produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37° C.
6. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C.



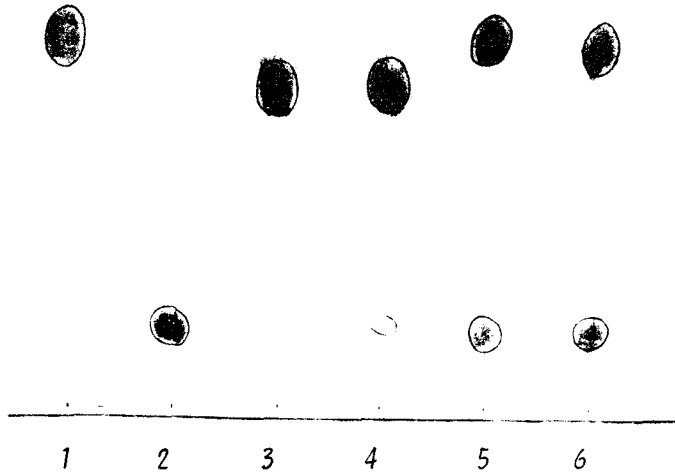


FIGURE 21 : CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE DANS LE BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4/1/5) : Hydrolyse du substrat L-leucyl-glycine par la leucine aminopeptidase.

1. Témoin leucine
2. Témoin glycoColle
3. Témoin L-leucyl-glycine
4. T_0 : Produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37° C.
5. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C sans ion Mg^{2+} .
6. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C avec des ions Mg^{2+}



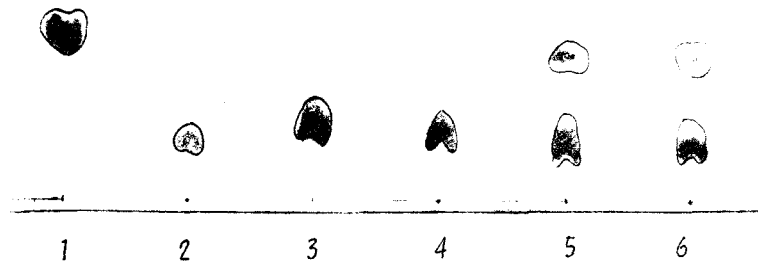


FIGURE 22 : CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE DANS LE BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4.1.5) : Hydrolyse du substrat DL-alanyl-L-asparagine par la leucine aminopeptidase.

1. Témoin DL-alanine
2. Témoin L-asparagine
3. Témoin DL-alanyl-L-asparagine
4. T_0 : Produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37° C.
5. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C sans ion Mg^{2+}
6. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C avec des ions Mg^{2+} .

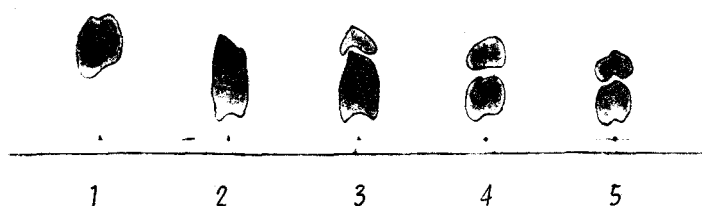


FIGURE 23 : CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE DANS LE BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4/1/5) : Hydrolyse du substrat L-histidyl-L-histidine par la leucine aminopeptidase.

1. Témoin Histidine
2. Témoin L-histidyl-L-Histidine
3. T_0 : Produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37° C.
4. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C sans ion Mg^{2+} .
5. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37° C avec des ions Mg^{2+} .

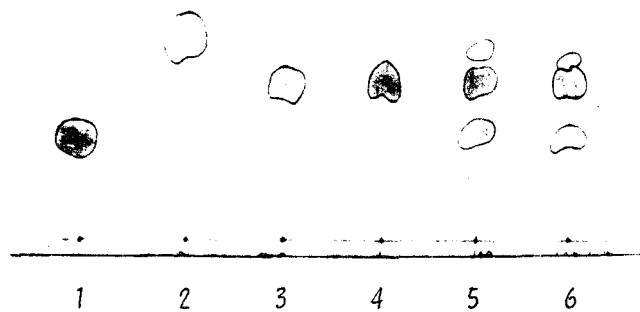


FIGURE 24 : CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE DANS LE BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4/1/5) : Hydrolyse du substrat Glycyl-L-proline par la leucine aminopeptidase.

1. Témoin glycine
2. Témoin proline
3. Témoin glycyl-L-proline
4. T_0 : Produits du milieu réactionnel non incubés préalablement à 37°C .
5. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37°C sans ion Mg^{2+} .
6. Produits du milieu réactionnel après une incubation de 3 H à 37°C avec des ions Mg^{2+}



b. Résultats.

Les Figures 19 à 24 montrent que seul le glutathion n'est pas hydrolysé par la leucine aminopeptidase du rein de cobaye, résultat classique puisque l'acide glutamique engage son γ -carboxyle dans la liaison peptidique avec la cystéine.

Pour les autres dipeptides, nous constatons l'apparition d'acides aminés libres dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est complète pour le seul dipeptide L-leucyl-glycine.

L'hydrolyse du tripeptide montre bien la présence de L-leucine et de dipeptide glycyl-glycine. Cette hydrolyse est incomplète.

3. Hydrolyse de la L-leucyl paranitranilide et de la L-leucyl β naphthyl amide.

La leucine aminopeptidase du rein de cobaye hydrolyse également des substrats chromogènes tels que la L-leucylparanitranilide (101) et la L-leucyl β naphthylamide (102).

Il nous est difficile de comparer rigoureusement l'activité de l'enzyme sur de tels substrats par rapport à l'activité L-leucine amidasique, les conditions d'hydrolyse, notamment de pH, de ces trois substrats étant différentes.

Toutefois, dans ces conditions expérimentales, non strictement comparables, nous constatons que l'enzyme hydrolyse ces deux substrats de manière appréciable.

B/ - INHIBITEURS et ACTIVATEURS.

Nous avons étudié l'effet d'un certain nombre d'effecteurs classiques de la réaction enzymatique de la leucine aminopeptidase sur son substrat. Certains sont des activateurs, d'autres au contraire sont des inhibiteurs.

(101) ANDREWS... (102) ARST...

Pour certains effecteurs, il existe même une inversion d'action suivant que l'enzyme est ou non en présence de magnésium. Dans certains cas, l'étude a été faite avec et sans magnésium selon que l'élution de la gel filtration de l'enzyme a été effectuée par le tampon borate contenant ou non du magnésium 1 millimolaire.

1. Types de composés étudiés.

Nous avons étudié tout d'abord l'effet :

- de composés à chaînes aliphatiques hydrophobes (Leucine, Iso-leucine, Valine, Acide isocaproïque).
- de quelques acides α cétoniques.
- d'ions métalliques tels que Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} et Na^+ .
- de composés divers dont des agents bloquants les groupements thiols ou complexant les ions métalliques.

2. Protocole de l'étude.

Nous avons modifié le milieu réactionnel de la façon suivante :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée dans du tampon borate de sodium 10 mM.
- 0,35 ml d'inhibiteur ou d'activateur à différentes concentrations en solution dans du tampon borate de sodium 10 mM.
- 0,1 ml de solution enzymatique partiellement purifiée contenant ou non du magnésium.

Parallèlement, nous effectuons pour chaque effecteur :

- un témoin substrat T_s dans lequel l'enzyme est remplacée par 0,1 ml d'eau distillée.
- un témoin enzyme T_e dans lequel le substrat et l'effecteur sont remplacés par du tampon borate.

L'hydrolyse s'effectue à 37° C pendant 30 minutes.

L'activité enzymatique est déterminée par la méthode de BERTHELOT.

3. Résultats.

a. Acides aminés et autres composés voisins de la L-leucinamide.

A la concentration initiale de 10 mM, la L-Isoleucine, et en particulier, la L-leucine n'ont aucune action sur la réaction enzymatique et ceci

Effecteurs	Concentration initiale mM	Activation %	Inhibition %
L-leucine	10	0	0
	30	15,7	
L-isoleucine	10	0	0
	30		10
D,L-isoleucine	10	0	0
	30	5	
L-valine	10	10	
	30	5	
D,L-valine	10	0	
	30		15,7
acide ϵ amino* caproïque	10		10,5
	30	16	
acide iso* caproïque	10		42
	30		68

TABLEAU XVIII : ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE SUR LE SUBSTRAT L-LEUCINAMIDE EN PRESENCE DE COMPOSES DE STRUCTURE VOISINE DE CELUI-CI. L'étude est faite en présence de magnésium sauf pour les composés marqués d'un astérisque (*).

Le milieu réactionnel se compose de :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée par du borate de sodium 10 mM
- 0,35 ml d'effecteur
- 0,1 ml de solution enzymatique



La réaction enzymatique s'effectue à 37° C pendant 20 mn.

en présence de magnésium (Tableau XVIII).

La L-valine est un activateur à 10 comme à 30 mM.

Pour une concentration supérieure (30 mM) la L-leucine a un léger effet d'activation.

L'acide isocaproïque a une action variable selon que l'enzyme est ou non en présence d'ions Mg^{2+} :

- inhibiteur à 10 et 30 Mm en absence de Mg^{2+}

- activateur aux mêmes concentrations en présence de magnésium

(38 p. 100 et 3 p. 100 respectivement).

Sur ces composés, nous ne sommes que partiellement en accord avec les résultats de SMITH et coll. (103). Ils montrent en effet que la L-leucine est un inhibiteur à leur concentration de travail (50 mM), alors que nous ne relevons aucun effet, de même, pour l'acide isocaproïque, inhibiteur (à 100 mM) en présence de manganèse. Il est vrai que SMITH active son enzyme par du manganèse et que toutes ces différences sont peut être liées à l'emploi de cet ion métallique.

b. Action de quelques acides α cétoniques.

Ici encore nous retrouvons une inversion d'action pour un même composé, inhibiteur et activateur selon que l'on active ou non l'enzyme par du magnésium.

En l'absence de celui-ci, tous les acides cétoniques inhibent l'action de la leucine aminopeptidase sur son substrat. Cette inhibition est d'autant plus forte que la concentration en acides cétoniques est élevée (sauf pour l'acide pyruvique et α cêto-valérique).

En présence de magnésium 1 mM, l'enzyme est au contraire activée, sauf dans deux cas de plus fortes concentrations par les acides α cêto-succiniques et α cêto-glutarique. (Tableau XIX).

Acides cétoniques	Concentration initiale (mM)	Mg ²⁺ 1 mM		sans Mg ²⁺
		Inhibition %	Activation %	Inhibition %
Acide α ceto succinique COOH-CH ₂ -CO-COOH	10		35	37
	30	59		89,5
Acide α ceto glutarique COOH-(CH ₂) ₂ -CO-COOH	10		26,5	26
	30	97		95
Acide pyruvique CH ₃ -CO-COOH	10		21	32
	30		50	21
Acide α ceto valérique CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CO-COOH	10		44	16
	30		35	5
Acide α ceto isocaproïque $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	10		32	16
	30		23,5	42

TABLEAU XIX : INFLUENCE DES ACIDES CÉTONIQUES SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE COBAYE SUR LE SUBSTRAT L-LEUCINAMIDE. La solution enzymatique est activée ou non par du magnésium 1 mM.

Le milieu réactionnel se compose de :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée par du borate de sodium 10 mM.
- 0,35 ml d'acide α cétonique
- 0,1 ml de solution enzymatique

La réaction enzymatique s'effectue à 37° C pendant 20 minutes.



c. Ions métalliques : Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} et Na^+ .

Nous avons déjà vu dans les méthodes de dosage comment les ions magnésium et manganèse agissent sur l'activité enzymatique. L'activation est maximale par la préincubation à des concentrations de 1 mM en tampon borate pour le magnésium et de 0,5 mM pour le manganèse en milieu aqueux.

En utilisant le protocole de dosage (décrit page 89), nous constatons que l'enzyme est activée de 71 p. 100 par le magnésium et de 170 p. 100 pour le manganèse à une concentration initiale de 200 mM (Tableau XX). Nous avons réalisé des cinétiques enzymatiques avec le magnésium que nous développerons dans un des paragraphes suivants.

Quant au cobalt, comme pour le manganèse, la formation d'un hydroxyde ($Co(OH)_2$) insoluble en tampon borate provoque une gêne très importante dans le dosage : les montées de ligne de base rendent difficile l'interprétation des enregistrements. Pour pallier ces difficultés, nous avons modifié le réactif phénol de la méthode de BERTHELOT habituellement utilisée, en y ajoutant de l'E.D.T.A.* qui complexe les ions métalliques au cours de la réaction. Ainsi, nous constatons que les ions cobalt sont inhibiteurs (70 p. 100 d'inhibition).

Nous avons essayé de modifier le pH du milieu d'incubation de la L-leucinamide. Un tampon véronal de pH 7,0 a été utilisé. A ce pH, il n'y a pas apparition de $Co(OH)_2$. Nous constatons aussi une inhibition (55 p. 100 contre 22 p. 100 déterminés dans les conditions normales de dosage).

Quant au sodium, il est activateur, qu'il soit sous forme sulfate ou phosphate (Tableau XX).

d. Inhibiteur des ions métalliques.

Nous avons étudié l'inhibition par l'E.D.T.A. et l'acide citrique sur une solution enzymatique non activée par le magnésium. Le Tableau XXI rassemble les résultats.

D'après GRASSMAN et coll. (104) l'inhibition par les ions cyanure CN^- confirme encore la nature métallo enzymatique de la leucine aminopeptidase.

* Sel disodique de l'acide éthylène tétra acétique en solution dans le réactif phénol : 4,15 g/l.

Activateurs	Concentration initiale mM	% d'activation
Na_2SO_4	200	18,5
$\text{Na H}_2 \text{PO}_4$	200	22
$\text{Na H}_2 \text{PO}_4$	100	37
MgSO_4	200	88
MgCl_2	200	71
MnCl_2	200	170

TABLEAU XX : ACTION DES IONS METALLIQUES SUR L'ACTIVITE LEUCINAMINO-PEPTIDASIQUE DE REIN DE COBAYE.

Le milieu réactionnel de compose de :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée par du borate de sodium 10 mM
- 0,35 ml d'ions métalliques
- 0,1 ml de solution enzymatique non activée par le magnésium au préalable.

La réaction enzymatique s'effectue à 37° C pendant 20 mn.



Inhibiteur	Concentration finale en mM	Inhibition %
E.D.T.A.	16	58
	8	27
	4	14
	1,6	0
	0,8	0
	0,32	0
Acide citrique	32	98
	16	95
	8	90
	3,2	47
	1,6	19
	0,8	14
	0,32	10
Cyanure de potassium	32	67
	16	53
	8	43
	1,6	20

TABLEAU XXI : INHIBITION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE PAR INCUBATION EN PRESENCE D'ACIDE ETHYLENE DIAMINE TETRAACETIQUE, OU D'ACIDE CITRIQUE, OU DE CYANURE DE POTASSIUM.

Le milieu réactionnel se compose de :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée par du borate de sodium 10 mM.
- 0,35 ml d'inhibiteur
- 0,1 ml de solution enzymatique non activée par du magnésium.

La réaction enzymatique s'effectue à 37° C pendant 20 minutes.



Contre Dialyse	Recharge en ions Mg ²⁺ après dialyse (en mM)	Activité enzymatique (U.I.)	Activité enzymatique relative
0 (témoin non dialysé)	0	0,094	100
H ₂ O distillée	0	0,054	58
	0,5	0,080	85
	2,5	0,096	102
	5	0,108	115
	12,5	0,124	132
	25	0,124	132
E.D.T.A. 50 mM	0	0,010	11
	0,5	0,008	8,5
	2,5	0,008	8,5
	5	0,008	8,5
	12,5	0,004	4,2
	25	0	0
E.D.T.A. 25 mM	0	0,010	11
	0,5	0,016	17
	2,5	0,004	4,2
	5	0,008	8,5
	12,5	0,009	9,5
	25	0,010	11

TABLEAU XXII : INHIBITION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE COBAYE PAR UNE DIALYSE DE 24 H CONTRE DE L'EAU DISTILLÉE OU DE L'E.D.T.A. 25 mM ou 50 mM.

Après 24 heures les adialysables sont réactivés pendant 15 minutes par du magnésium dont les concentrations finales varient de 0,5 à 25 mM. L'activité enzymatique relative est le rapport de l'activité enzymatique après dialyse à celle du témoin non dialysé.



Contre dialyse	Recharge en ions Mg^{2+} après dialyse (en mM)	Activité enzymatique (U.I.)	Activité enzymatique relative
0 (témoin non dialysé)	0	0,046	100
Eau distillée	0	0,038	82
	0,5	0,052	113
	2,5	0,048	104
	5	0,052	113
	12,5	0,060	130
	25	0,076	165
E.D.T.A. 10 mM	0	0,018	39
	0,5	0,028	61
	2,5	0,020	43
	5	0,020	43
	12,5	0,016	35
	25	0,008	17
E.D.T.A. 5 mM	0	0,026	56
	0,5	0,024	52
	2,5	0,060	130
	5	0,060	130
	12,5	0,072	156
	25	0,048	104

TABLEAU XXIII : INHIBITION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE DE REIN DE COBAYE PAR UNE DIALYSE DE 24 H CONTRE DE L'EAU DISTILLÉE OU DE L'E.D.T.A. 10 mM ou 5 mM

Après 24 H, les adialysables sont réactivés pendant 15 minutes par du magnésium dont les concentrations finales varient de 0,5 à 25 mM. L'activité enzymatique relative est le rapport de l'activité enzymatique après dialyse à celle du témoin non dialysé.

Cette inhibition est croissante avec la concentration en cyanure. (Tableau XXI)

Puis nous avons voulu vérifier dans quelle mesure l'activité enzymatique, inhibée par l'E.D.T.A., pouvait être restaurée par la pré-incubation avec du magnésium.

Une solution enzymatique fraîchement préparée est dialysée contre de l'eau bidistillée, de l'E.D.T.A. 50 mM, 25 mM, 10 mM et 5 mM pendant 24 H.

Les adialysables sont récupérés et réactivés pendant 15 minutes par du magnésium dont les concentrations finales varient de 0,5 à 25 mM.

Dans l'adialysable, nous avons remarqué un précipité important de couleur blanche pour une dialyse contre de l'E.D.T.A. 50 mM. A cette concentration, l'enzyme est inactivée irréversiblement puisqu'il ne nous a pas été possible de restaurer l'activité enzymatique. Il en est pratiquement de même pour une dialyse contre de l'E.D.T.A. 25 mM où la restauration de l'activité reste faible. Ce n'est qu'après une dialyse contre de l'E.D.T.A. 5 mM que nous restaurons totalement l'activité enzymatique pour des concentrations en magnésium, comprises entre 2,5 et 25 mM (Tableaux XXII et XXIII).

e. Blocage des groupements thiols.

Nous avons utilisé des agents de blocage des groupements thiols tels que l'acide iodoacétique, le parachloro mercuribenzoate, les sels arsénicaux à arsenic trivalent. Ceux-ci inhibent l'enzyme. Cette inhibition est maximale si l'enzyme n'est pas activée par le magnésium (Tableau XXIV). (Nous avons pu noter par ailleurs, que l'arséniate était inhibiteur à certaines concentrations).

Ces effecteurs montrent donc la présence de groupements thiols au niveau du site actif de l'enzyme.

f. Composés divers.

L'hydroxylamine et le nitrite de sodium se sont révélés être des inhibiteurs de la réaction enzymatique (Tableau XXIV).

Inhibiteurs	Concentration initiale mM	% d'Inhibition
CH ₂ I COOH	200	95
pCMB	20	74
Arsénite de Na	100	39
	50	27
	25	15
	5	0
	100	19
Arséniate de Na	50	14
	25	19
	5	24
	100	26
NH ₂ OH	50	59
	25	76
	5	73
	200	66
NaNO ₂	200	66



TABLEAU XXIV : ACTION DES AGENTS BLOQUANT LES GROUPEMENTS THIOLS ET LES COMPOSES DIVERS TELS QUE L'ARSENATE, L'HYDROXYLAMINE ET LE NITRITE DE SODIUM.

Le milieu réactionnel se compose de :

- 0,65 ml de L-leucinamide 10 mM tamponnée par du borate de sodium.
- 0,35 ml d'inhibiteur
- 0,1 ml de solution enzymatique non activée par du magnésium

La réaction enzymatique s'effectue à 37° C pendant 20 minutes.

4. Conclusion.

De cette étude sur les effecteurs de l'enzyme, il ressort que les ions métalliques sont activateurs de la leucine aminopeptidase.

Au contraire, l'E.D.T.A. et l'acide citrique en chélatant le magnésium nécessaire à l'activité leucine aminopeptidasique, sont inhibiteurs de l'enzyme.

L'inhibition par les réactifs bloquant les groupements thiols prouve la présence de ces groupements dans le site actif de l'enzyme.

Des effecteurs, comme les acides α cétoniques montrent une inversion dans l'action de l'enzyme selon qu'elle est activée ou non par le magnésium.

Des composés de structure voisine de la L-leucinamide comme les acides aminés ramifiés n'ont aucune action (sauf pour la valine) à la concentration initiale de 10 mM. Par contre l'acide isocaproïque est un inhibiteur de l'enzyme.

C/ - CINETIQUE ENZYMATIQUE.

Cette étude a été réalisée avec une solution enzyme partiellement purifiée.

Les solutions enzymatiques utilisées sont de deux types :

- le premier type ne contient pas de magnésium (gel filtration en tampon borate seul).

- le deuxième type contient déjà du magnésium (gel filtration en tampon borate contenant du magnésium 1 mM).

La concentration en substrat varie de 0,3 à 40 mM.

Pour chaque type d'enzyme nous avons réalisé plusieurs cinétiques d'hydrolyse :

- sans préincubation avec du Mg^{2+}

- avec préincubation de 10 minutes avec du Mg^{2+} 1 mM

Le dosage de l'enzyme s'effectue toujours par la même technique.

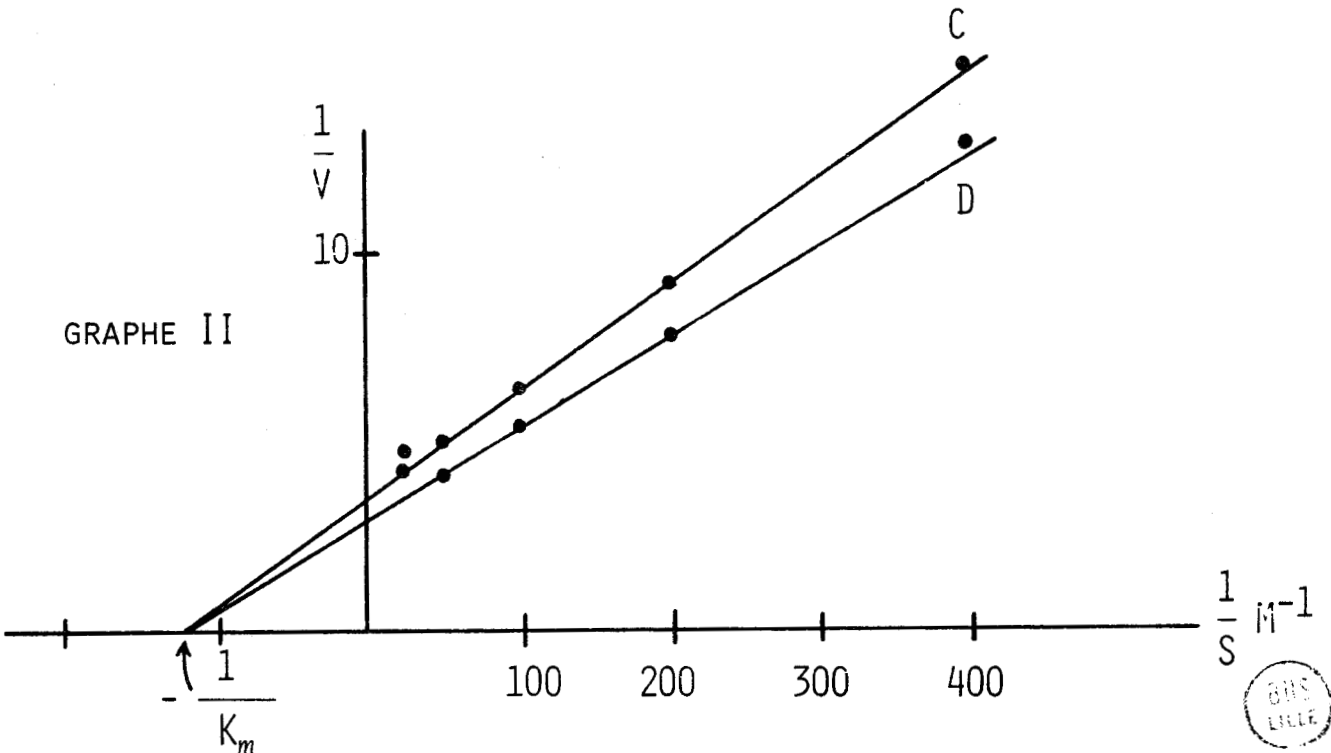
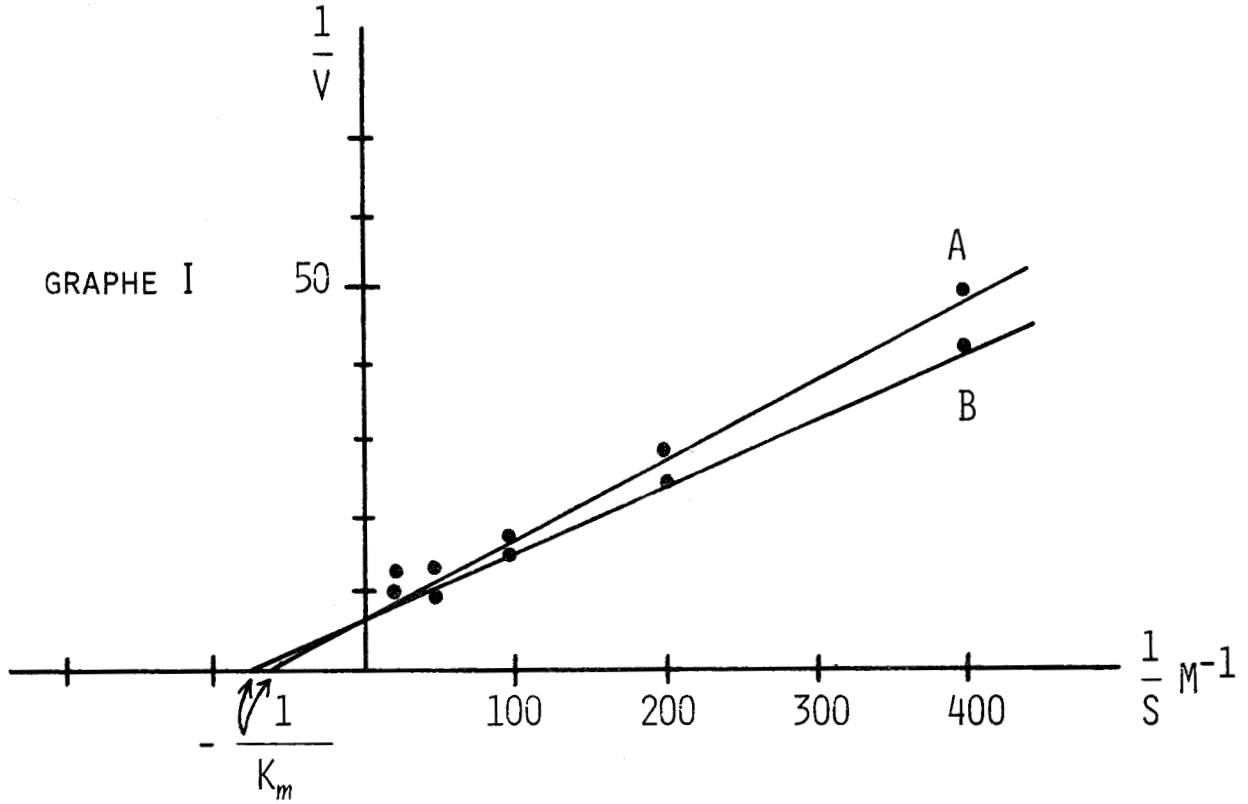


FIGURE 25 : VITESSE DE REACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT L-LEUCINAMIDE SELON LA REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK. L'enzyme ne contient pas de Mg^{2+} dans sa préparation (Graphe I) : elle est ensuite activée par du Mg^{2+} 1 mM (Courbe B) ou non activée par ces mêmes ions (courbe A). L'enzyme contient déjà du Mg^{2+} lors de sa purification (Graphe II) : elle est également activée par du Mg^{2+} 1 mM (courbe C) ou non activée par ces mêmes ions (courbe D).

1. Construction graphique.

La constante de Michaelis K_m nous est donnée par le graphique de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat, selon la représentation de LINEWEAVER-BURK. L'activité enzymatique est donnée en Unités Internationales (U.I.) et la concentration en substrat en mole/l.

Nous reportons dans un axe de coordonnées, l'inverse de l'activité enzymatique ($\frac{1}{V}$) en ordonnée et l'inverse de la concentration en substrat $\frac{1}{S}$ en abscisse.

Nous obtenons une droite qui coupe l'axe des abscisses au point correspondant à $-\frac{1}{K_m}$.

2. Résultats.

a. Enzyme sans magnésium. (Figure 25 Graphe I).

La cinétique d'hydrolyse de ce type d'enzyme, nous conduit à déterminer sa constante de Michaelis à $17,8 \cdot 10^{-3}$ M/l. (Droite A du Graphe 25-I)

Si nous activons l'enzyme avec du magnésium la constante de Michaelis est de $14,7 \cdot 10^{-3}$ M/l. (Droite B du Graphe 25-I).

Nous pouvons donc confirmer que le magnésium est un activateur de l'enzyme puisque son affinité pour le substrat est plus grande lorsqu'elle est activée par du magnésium.

b. Enzyme contenant du magnésium. (Figure 25 Graphe II).

Que l'enzyme soit activée par du magnésium 1 mM (préincubation de 10 minutes) (Droite D, du Graphe 25-II), ou non (Droite C, du Graphe 25-II), nous trouvons la même valeur de K_m égale à $8,3 \cdot 10^{-3}$ M/l.

La constante de Michaelis est dans ce cas moins élevée que précédemment. Nous pouvons donc dire que son affinité pour le substrat est encore plus forte. D'où le rôle important du magnésium dans l'activité enzymatique de la leucine aminopeptidase. La gel filtration par un tampon contenant du magnésium conduit à des rendements nettement meilleurs et la réactivation ultérieure de l'enzyme par addition d'ions Mg^{2+} après la gel filtration n'est pas nécessaire.

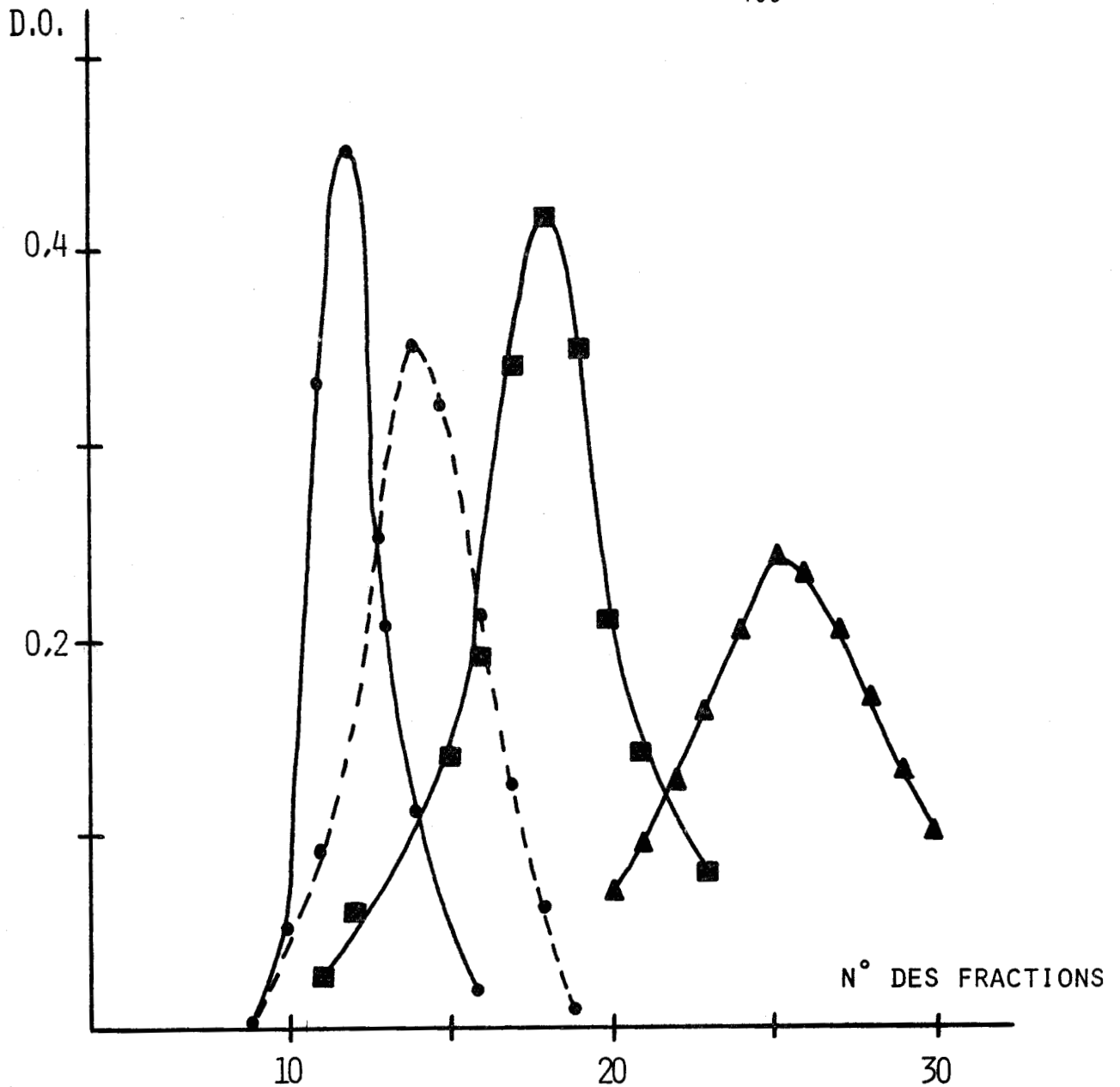


FIGURE 26 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 DES DIFFERENTS ETALONS DE POIDS MOLECULAIRES CONNUS ET DE LA LEUCINAMINOPEPTIDASE PARTIELLEMENT PURIFIEE.

- Fibrinogène
 - Sérum albumine
 - ▲—▲ Inhibiteur trypsique du soja
 - Leucine aminopeptidase du rein de cobaye : l'activité est exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- Les protéines sont exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.



D/ POIDS MOLECULAIRE.

Certains réactifs entrant dans la composition des gels de polyacrylamide perturbent la réaction du BERTHELOT. Aussi avons-nous choisi de déterminer le poids moléculaire de la leucine aminopeptidase par gel filtration sur Sephadex G 200. En étalonnant dans des conditions expérimentales identiques (vitesse d'élution, temps de fractionnement) la colonne de Sephadex G 200, nous avons pu estimer le poids moléculaire de la leucine aminopeptidase. Nous avons déposé successivement :

- du fibrinogène de P.M 330 000
- de la sérum albumine de P M 67 000
- de l'inhibiteur trypsique du soja de P M 21 500.

Nous avons effectué deux chromatographies de l'enzyme partiellement purifiée sur la même colonne, avant et après étalonnage pour vérifier son bon fonctionnement. (Figure 26).

Les protéines et l'activité enzymatique sont dosées par les méthodes habituelles.

Le chromatogramme (Figure 26) nous a permis d'estimer le poids moléculaire à $190\ 000 \pm 50\ 000$ en portant sur un axe de coordonnées les numéros de fractions en abscisses et les logarithmes des poids moléculaires en ordonnées. (Les écarts $\pm 50\ 000$ correspondent à \pm une fraction recueillie sur le collecteur).

E/ INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Nous avons déterminé la température optimale d'action de l'enzyme et sa dénaturation à la chaleur.

1. Température optimale d'action.

a. Technique :

0,1 ml d'enzyme partiellement purifiée est mis à incuber avec 0,5 ml de L-leucinamide contenant du Mg^{2+} 1 mM pendant 15 minutes dans un bain-marie réglé aux différentes températures de cette étude. Parallèlement aux dosages nous effectuons un témoin enzyme et un témoin substrat pour chaque température

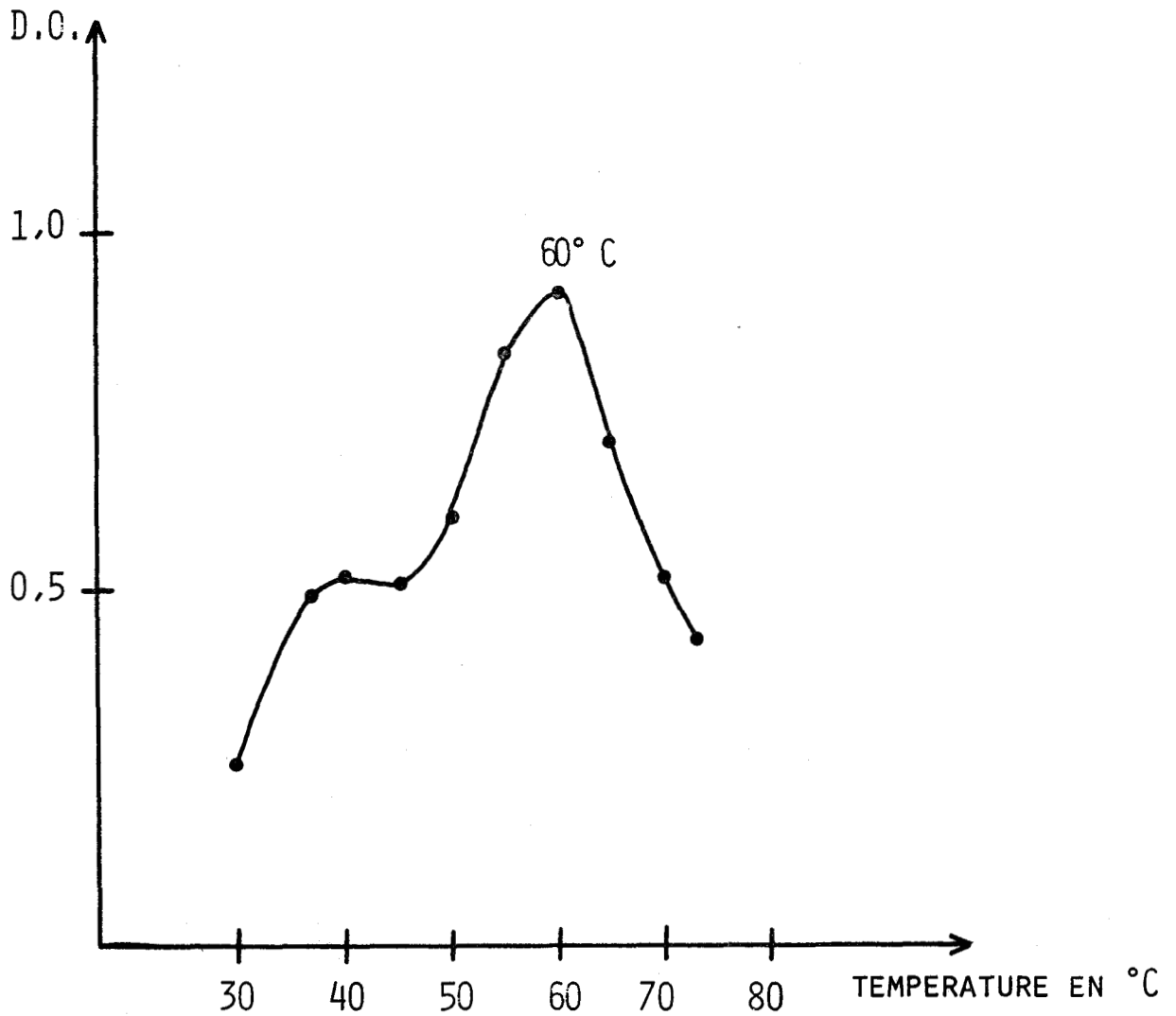


FIGURE 27 : DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE :

L'hydrolyse s'effectue pendant 15 minutes à des températures variant de 30 à 75° C.

L'activité enzymatique est déterminée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.



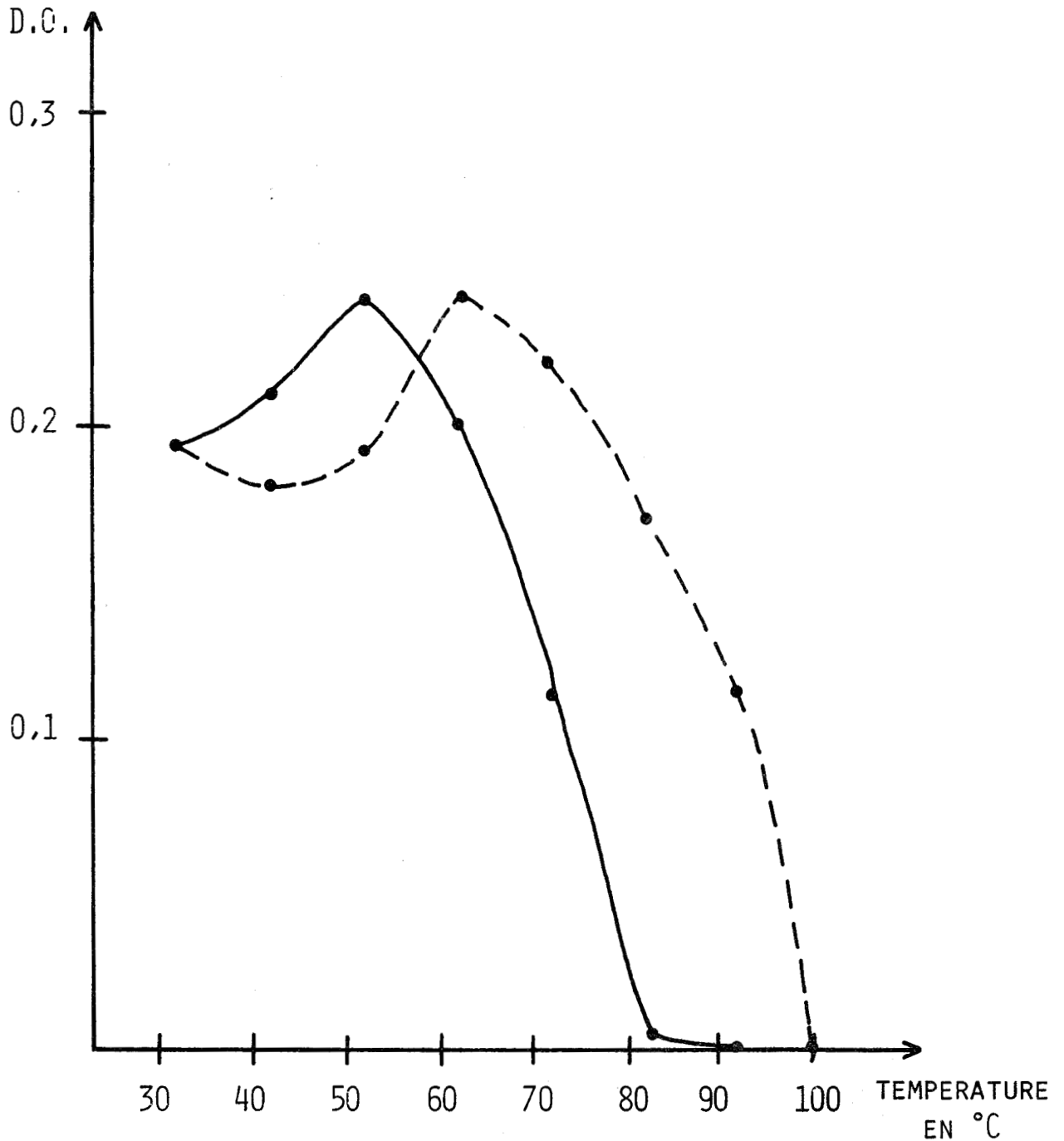


FIGURE 28 : DENATURATION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE PAR LA CHALEUR :

l'enzyme est préincubée à différentes températures pendant 1 minute (●—●) et pendant 10 minutes (---●)

Ce préchauffage est suivi d'une hydrolyse du substrat L-leucinamide à 37° C pendant 15 minutes. L'activité enzymatique s'exprime par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

b. Résultat :

La courbe de la Figure 27 rend compte de la température optimale d'action de l'enzyme. Celle-ci est au voisinage de 60° C. Nous pouvons remarquer aussi un épaulement dans la courbe des températures aux alentours de 40° C.

2. Dénaturation de l'enzyme par la chaleur.

a. Technique :

L'enzyme est préincubée à différentes températures pendant 1 et 10 minutes très exactement.

Au bout d'une minute un aliquot de 0,1 ml est prélevé et mis à incuber avec 0,5 ml de substrat pendant 15 minutes et à 37° C.

Au bout de 9 minutes, un aliquot de 0,1 ml est prélevé et mis à incuber dans les mêmes conditions.

Pour chaque temps de préchauffage et chaque température nous faisons un témoin enzyme dans lequel nous remplaçons le substrat par du tampon borate. Un seul témoin substrat suffit à la série de dosages.

b. Résultats :

Pour un préchauffage de 1 minute à 40° C, l'activité enzymatique diminue avant d'atteindre un maximum entre 60 et 65° C. Au-delà de 65° C, l'activité de l'enzyme diminue à nouveau progressivement lorsqu'on la soumet à des températures de plus en plus grandes. A 100° C l'enzyme est complètement détruite. (Figure 28).

Pour un préchauffage de 10 minutes, l'activité enzymatique est maximale à 55° C. Cette activité diminue assez rapidement lorsque la température augmente : elle est pratiquement nulle à 80° C.

F/ - pH optimal d'action.

1. Technique.

Des solutions de L-leucinamide sont amenées à différents pH par

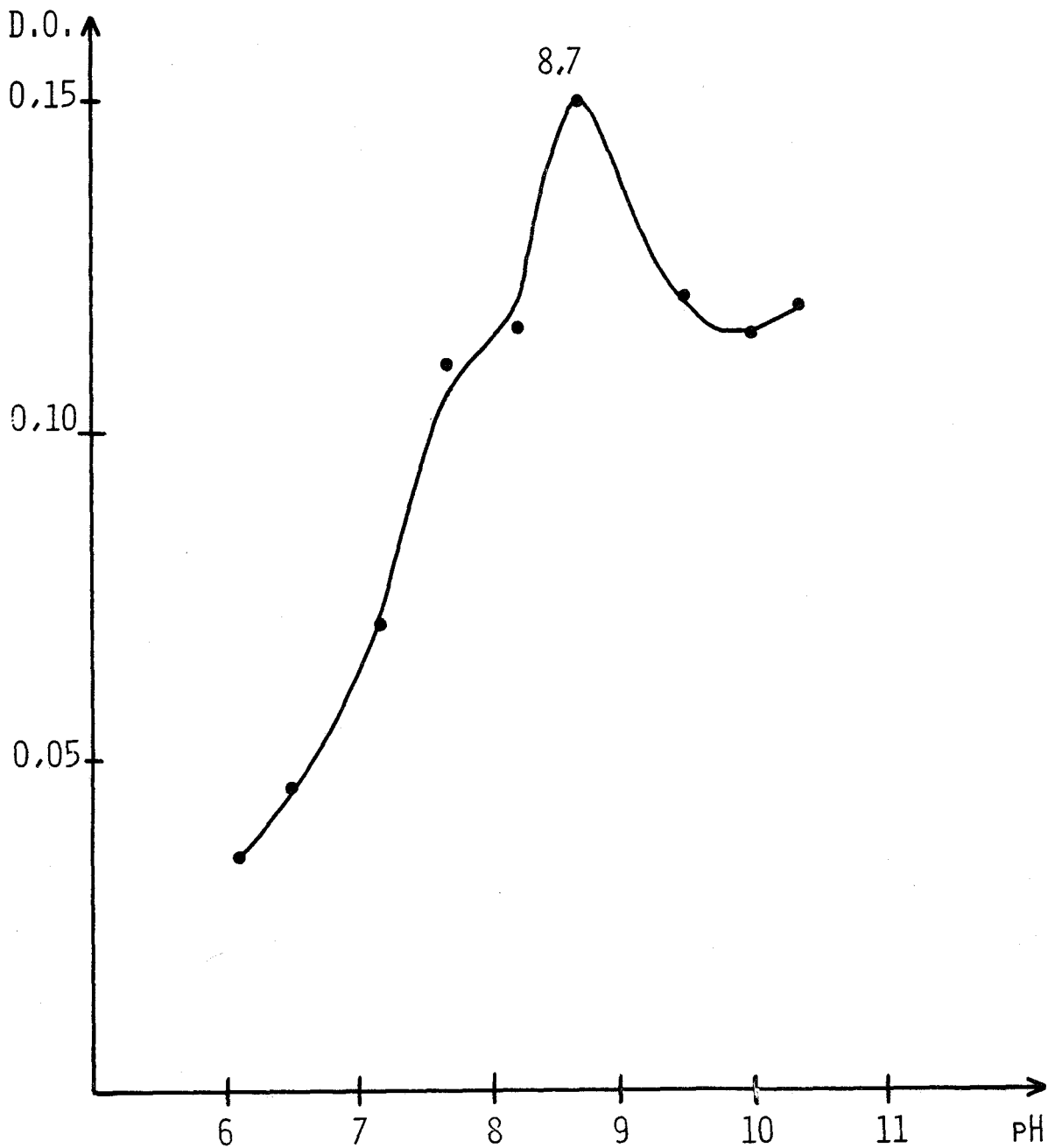


FIGURE 29 : DETERMINATION DU pH OPTIMAL D'ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE.

Le substrat L-leucinamide est amené aux différents pH par addition de soude ou d'acide chlorhydrique. L'hydrolyse du substrat s'effectue à 37° C pendant 15 minutes et l'activité enzymatique s'exprime par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.



par addition de soude N ou d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Le milieu réactionnel est le suivant :

- 0,5 ml de substrat à différents pH
- 0,1 ml d'enzyme.

Parallèlement aux dosages, nous effectuons des témoins "substrat" pour chaque pH étudié en remplaçant l'enzyme par 0,1 ml d'eau bidistillée, un seul témoin "enzyme" est suffisant pour l'ensemble de l'étude.

L'hydrolyse s'effectue à 37° C pendant 15 minutes.

2. Résultat.

La Figure 29 montre que l'activité enzymatique est maximale aux environs de pH 8,5 - 9,0. Un léger épaulement existe aux environs de pH 7,5. Des épaulements analogues dans les courbes de pH ont été décrits par SMITH (105).

CHAPITRE V

MISE EN EVIDENCE DE DEUX FORMES ENZYMATIQUES

Les méthodes de purification ayant montré combien la purification de l'enzyme était difficile, nous avons été amenée à utiliser la technique du fractionnement cellulaire, d'une part pour localiser l'enzyme dans la cellule rénale, et, d'autre part, pour observer le comportement de la leucine aminopeptidase ainsi obtenue vis-à-vis des méthodes de séparation déjà utilisées dans les essais de purification de l'enzyme.

C'est au cours de cette étude que nous avons pu mettre en évidence deux formes enzymatiques de poids moléculaires et de migration électrophorétique différents.

Nous ne présentons ici que les différents stades du fractionnement cellulaire ainsi que l'étude qui nous a permis de mettre en évidence les deux formes enzymatiques de la leucine aminopeptidase de cobaye, laissant pour une étude ultérieure la purification enzymatique de ces fractions.

A/ - PREPARATION DE L'HOMOGENAT.

Les reins sont prélevés sur l'animal selon les conditions énoncées au Chapitre II.

Ils sont pesés, puis coupés en fins morceaux à l'aide d'un scalpel.

Ils sont alors broyés dans un homogénéiseur de POTTER-ELVEHJEM (type Potter de Thomas) dans 9 volumes de saccharose 0,25 M contenant du Magnésium 0,001 M. Lors du broyage, l'homogénéiseur est maintenu dans un bēcher contenant de l'eau glacée.

Nous obtenons ainsi un homogénat brut.

B/ - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DE L'HOMOGENAT.

1. Matériel utilisé.

Nous avons utilisé une centrifugeuse BECKMAN L₃50 équipée d'un rotor SW 41 à godets mobiles et réglée à + 4° C.

Toutes les opérations de transvasements dans les godets sont faites en chambre froide.

2. Schéma du fractionnement cellulaire.

Ce fractionnement, dont le plan est indiqué dans les Tableaux XXV et XXVI, a pour base la technique de M. LEVY, R. TOURY & J. ANDRE (106) mise au point par HAREL & JACOB & MOULE (107). Il a pour but l'obtention de mitochondries pures.

Cette technique a été complétée par celle d'APPELMANS et coll. (108) reprise par BERTHILLIER (109). Elle permet d'obtenir à partir de la phase cytoplasmique amitochondriale S_3 , une fraction correspondant au cytosol, terme ultime du fractionnement cellulaire (Tableau XXVI).

Au total, nous avons utilisé le protocole suivant :

. L'homogénat soumis à une centrifugation de 600 g pendant 10 minutes conduit à :

- un culot C_1 contenant des noyaux et des cellules non broyées
- un surnageant post-nucléaire S_1 .

. Le surnageant post-nucléaire soumis à une force centrifuge de 8500 g pendant 10 minutes conduit à :

- un culot C_2 qui contient des mitochondries dites "lourdes". Ce culot est lavé par du saccharose 0,25 M par 4 centrifugations successives de 10 minutes à 8500 g.

- un surnageant S_2 qui contient une zone nébuleuse située au-dessus du culot C_2 et qui est constituée de mitochondries dites "légères". Ce sont des mitochondries dont la structure n'est pas intacte.

. Le surnageant S_2 est centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes.

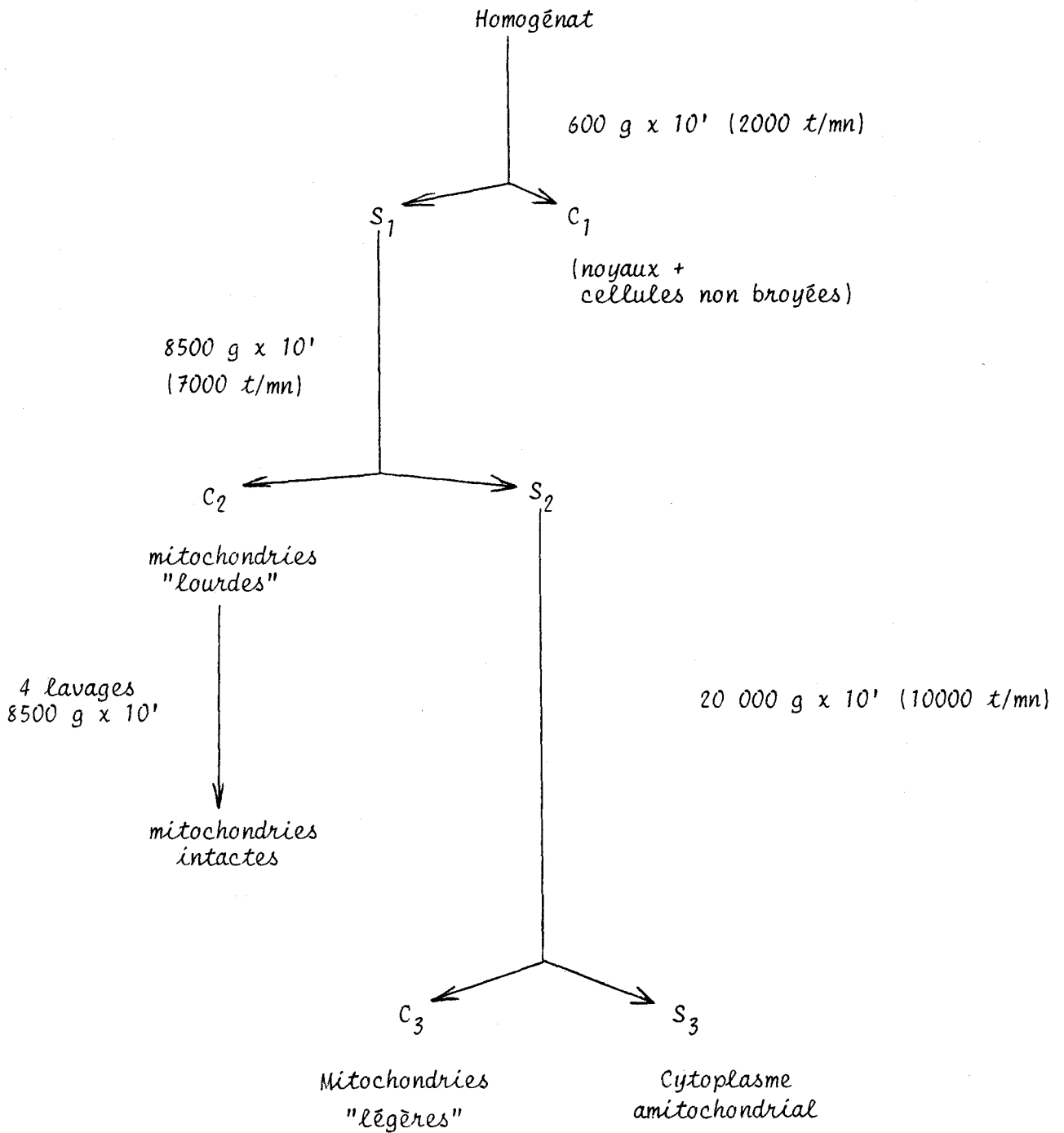
On obtient :

- un culot C_3 de mitochondries "légères"

- un surnageant post-mitochondrial S_3 . C'est un cytoplasme amitochondrial.

. Cette phase cytoplasmique S_3 est alors soumise à une centrifugation de 105 000 g pendant 60 minutes. On obtient :

- un culot C_4 particulière
- un surnageant S_4 qui correspond au cytosol



TABEAU XXV : PLAN DE FRACTIONNEMENT D'UN HOMOGENAT SELON LA TECHNIQUE
MISE AU POINT PAR HAREL & JACOB & MOULE. (110)



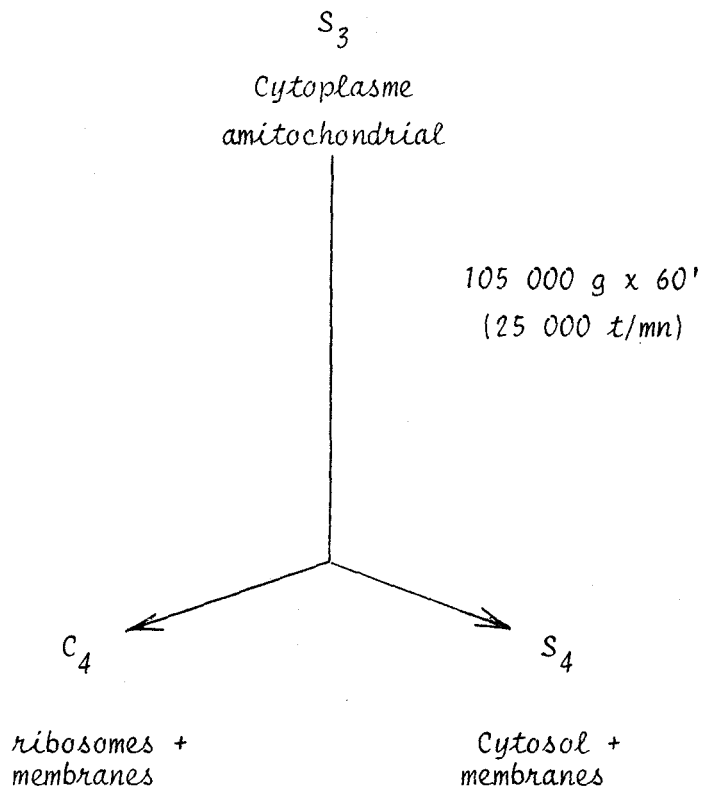


TABLEAU XXVI : PLAN DE FRACTIONNEMENT SELON LA TECHNIQUE DE APPELMANS (111)
DU CYTOPLASME AMITOCHONDRIAL S₃ OBTENU PAR LA TECHNIQUE
DE HAREL.



3. Contrôle microscopique de chaque fraction obtenue.

Chacune des fractions obtenues est examinée au microscope électronique afin d'en contrôler l'intégrité et le degré de pureté.

L'examen microscopique confirme la nature mitochondriale du culot C_2 . Malgré les lavages successifs, des souillures ribosomales subsistent (Figure 30).

La Figure 31 montre que le cytoplasme amitochondrial S_3 contient surtout des membranes du réticulum endoplasmique ainsi que des petites granulations de formes sphéroïdes qui contrastent très nettement avec les vésicules membranaires.

Le culot C_4 obtenu après une ultracentrifugation de 60 minutes à 105 000 g montre sa richesse en ribosomes et en membranes. Sur la Figure 32 un lysosome est même visible, voire peut être un peu de Golgi.

Le cytosol S_4 correspondant à ce culot C_4 montre encore la présence de quelques membranes et de ces mêmes petites granulations déjà visibles dans la phase cytoplasmique amitochondriale S_3 . (Figure 33).

4. Localisation de l'enzyme.

a. Détermination de l'activité enzymatique des éléments cellulaires.

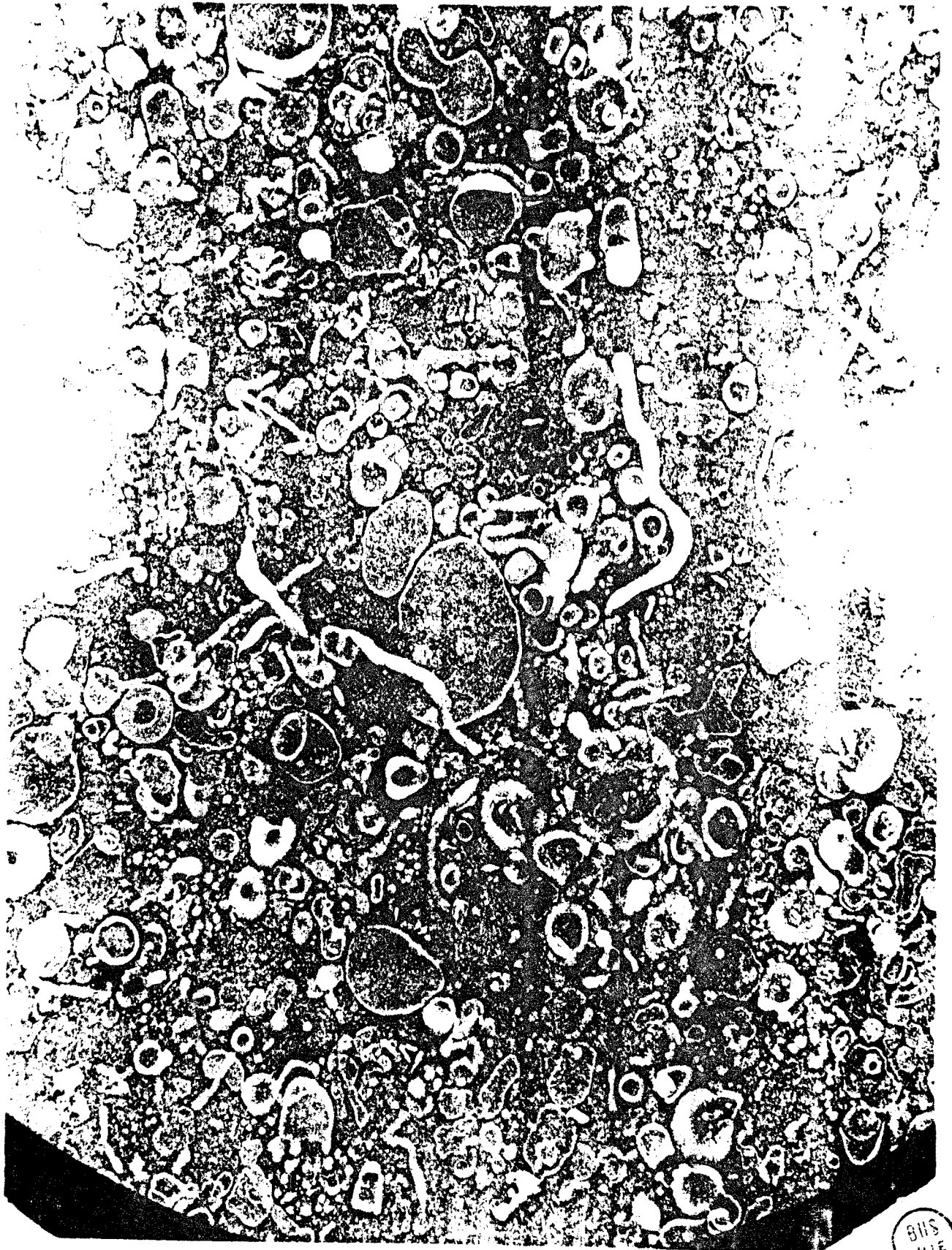
Dès que le fractionnement cellulaire est terminé, les culots sont repris dans de l'eau distillée qui par osmose, fait éclater les différentes structures.

Les surnageants sont homogénéisés quelques secondes, à l'aide d'un homogénéiseur de type VIRTIS.



BHS
LILLE

FIGURE 30 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES MITOCHONDRIES C₂.
Grossissement : 45 000.



BINS
LILLE

FIGURE 31 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU CYTOPLASME AMITOCHONDRIAL S₃.
Grossissement : 45 000.

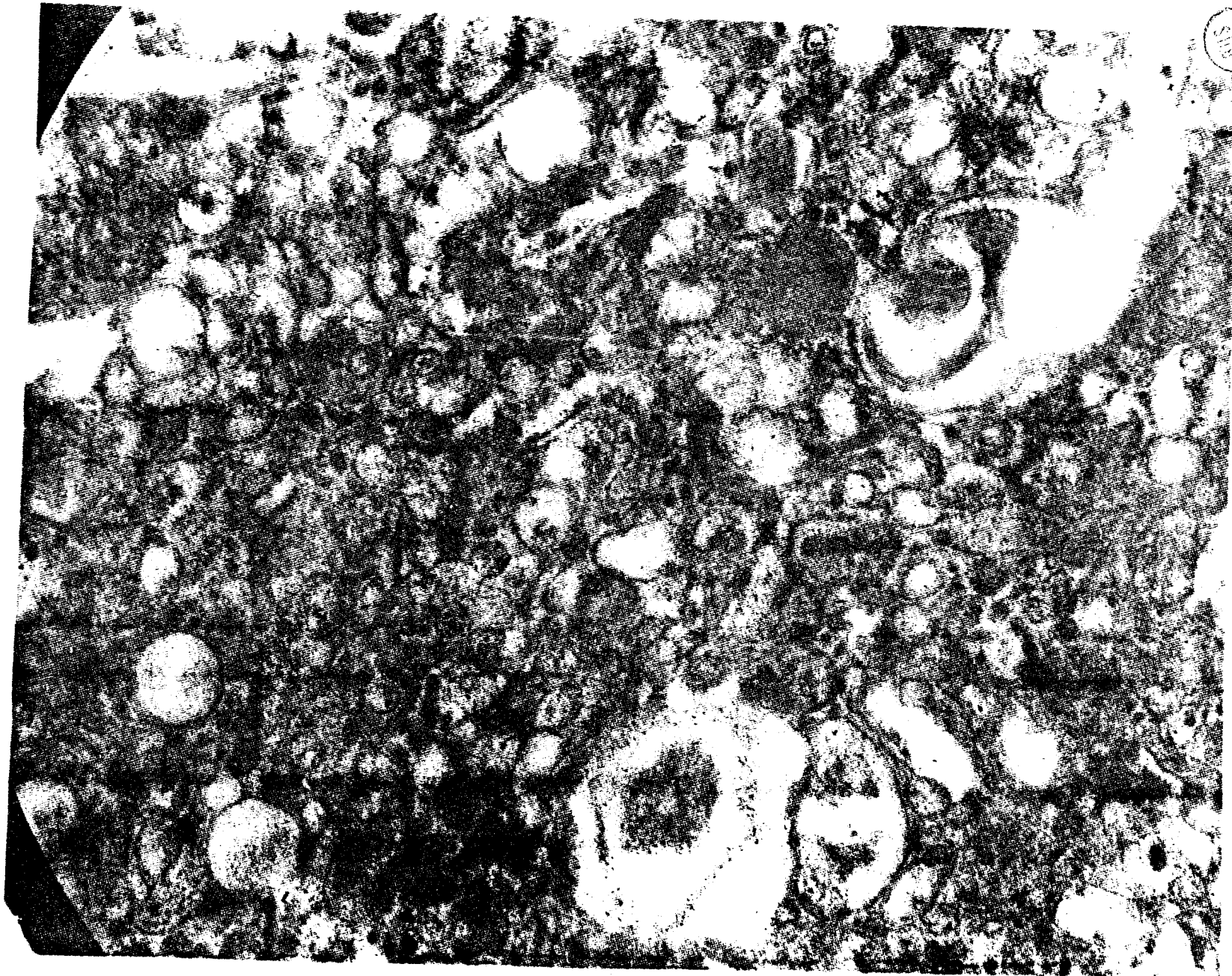


FIGURE 32 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU CULOT PARTICULAIRE C₄.
Grossissement : 45 000.



FIGURE 33 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU CYTOSOL S₄.

Grossissement : 45 000.

BHS
VILLE

Etapes	Volume (ml)	Activité enzymatique (μ M/ml/min)	Activité enzymatique totale	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique	Purification	Rendement %
Brut	12,5	2,34	29,31	12,56	0,18	1	100
C ₁ = noyaux + cellules non broyées	5	0,87	4,39	7,68	0,11	0,6	15
C ₂ = mitochondries lourdes	5	0,29	1,46	3,40	0,08	0,46	5
C ₃ = mitochondries légères	5	0,22	1,09	4,72	0,04	0,24	3,7
S ₃ = cytoplasme amitochondrial	12	0,88	10,54	3,52	0,25	1,33	36
C ₄ = ribosomes	5	0,36	1,83	2,52	0,14	0,78	6
S ₄ = cytosol	12	0,59	7,03	4,0	0,14	0,78	24

TABLEAU XXVII : ACTIVITE ENZYMATIQUE DES ELEMENTS CELLULAIRES D'UN HOMOGENAT RENAL SEPARES PAR ULTRACENTRIFUGATION.

La technique utilisée est celle de HAREL et coll. La phase cytoplasmique amitochondriale

S₃ est soumise en outre à une ultra-centrifugation de 105 000 g x 60' (selon APPELMANS et coll.)



Un aliquot de chaque élément cellulaire est prélevé afin d'en déterminer l'activité enzymatique et la teneur en protéines.

Le Tableau XXVII rend compte de l'activité enzymatique de chaque élément cellulaire. Il montre une répartition hétérogène de la leucine aminopeptidase que l'on retrouve dans les mitochondries, la fraction ribosomo-membranaire du culot C_4 , le cytoplasme amitochondrial et le cytosol S_4 .

Ce sont le cytosol S_4 et le cytoplasme amitochondrial S_3 qui contiennent la plus grande quantité de leucine aminopeptidase avec une prédominance dans le cytoplasme S_3 .

Les mitochondries en contiennent très peu, ce qui exclut l'origine mitochondriale de l'enzyme. En effet, il est difficile d'envisager que la présence de leucine aminopeptidase dans le cytoplasme S_3 , en quantité assez appréciable, puisse provenir de mitochondries altérées au cours du fractionnement cellulaire.

La centrifugation à 105 000 g montre que le cytosol est plus riche en enzyme que le culot correspondant.

Ceci tend donc à montrer l'origine cytoplasmique de l'enzyme.

Il faut cependant remarquer que la faible activité spécifique du culot C_4 n'est pas négligeable. Une souillure cytoplasmique ne permet pas d'expliquer la richesse enzymatique du culot, et l'hypothèse d'une origine particulière d'une fraction de l'enzyme, soit (ribosomale, soit membranaire) semble donc devoir être envisagée.

b. Gel filtration de chaque élément cellulaire.

L'hypothèse de deux origines de la leucine aminopeptidase, nous a conduite à tenter une séparation par chromatographie de gel filtration, de ces différents éléments cellulaires.

- TECHNIQUE

Nous avons déposé sur 6 colonnes de Sephadex G 200* :

1. le culot C_2 de mitochondries "lourdes".

* La préparation du gel est indiqué dans l'appendice technique, page 148.

2. le culot C_3 de mitochondries "légères"
3. la phase cytoplasmique amitochondriale S_3
4. le culot C_4
5. le cytosol S_4
6. un homogénat brut de référence

Le débit des gel filtrations a été de 4 gouttes/minute. Les fractions de 1,5 ml ont été collectées toutes les 20 minutes.

- RESULTATS

Le dosage de l'activité enzymatique et des protéines des éluats de chaque colonne, a conduit aux chromatogrammes représentés dans la Figure 34.

. Les chromatogrammes protéiques présentent des profils presque toujours identiques.

On distingue toujours :

- un important premier pic de protéines élué en début de colonne donc de poids moléculaire élevé.
- un second pic d'intensité plus faible correspondant à des protéines légères. Ce deuxième pic est pratiquement inexistant sur le chromatogramme du culot C_4 .
- une dépression protéique bien nette se situe entre ces 2 pics.

. Du point de vue enzymatique, plusieurs analogies sont retrouvées :

- 2 pics distincts d'activité enzymatique d'importance très inégale sur les chromatogrammes de la phase cytoplasmique S_3 , du culot C_4 et de l'homogénat brut de départ.

Le premier pic majeur, correspondant à un poids moléculaire élevé est élué au niveau de la dépression protéique.

Le second pic ayant une intensité plus faible, correspond à un petit poids moléculaire. Il est élué en même temps que le deuxième pic de protéines.

- un seul pic enzymatique sur les chromatogrammes des mitochondries "légères" C_3 et du cytosol S_4 .

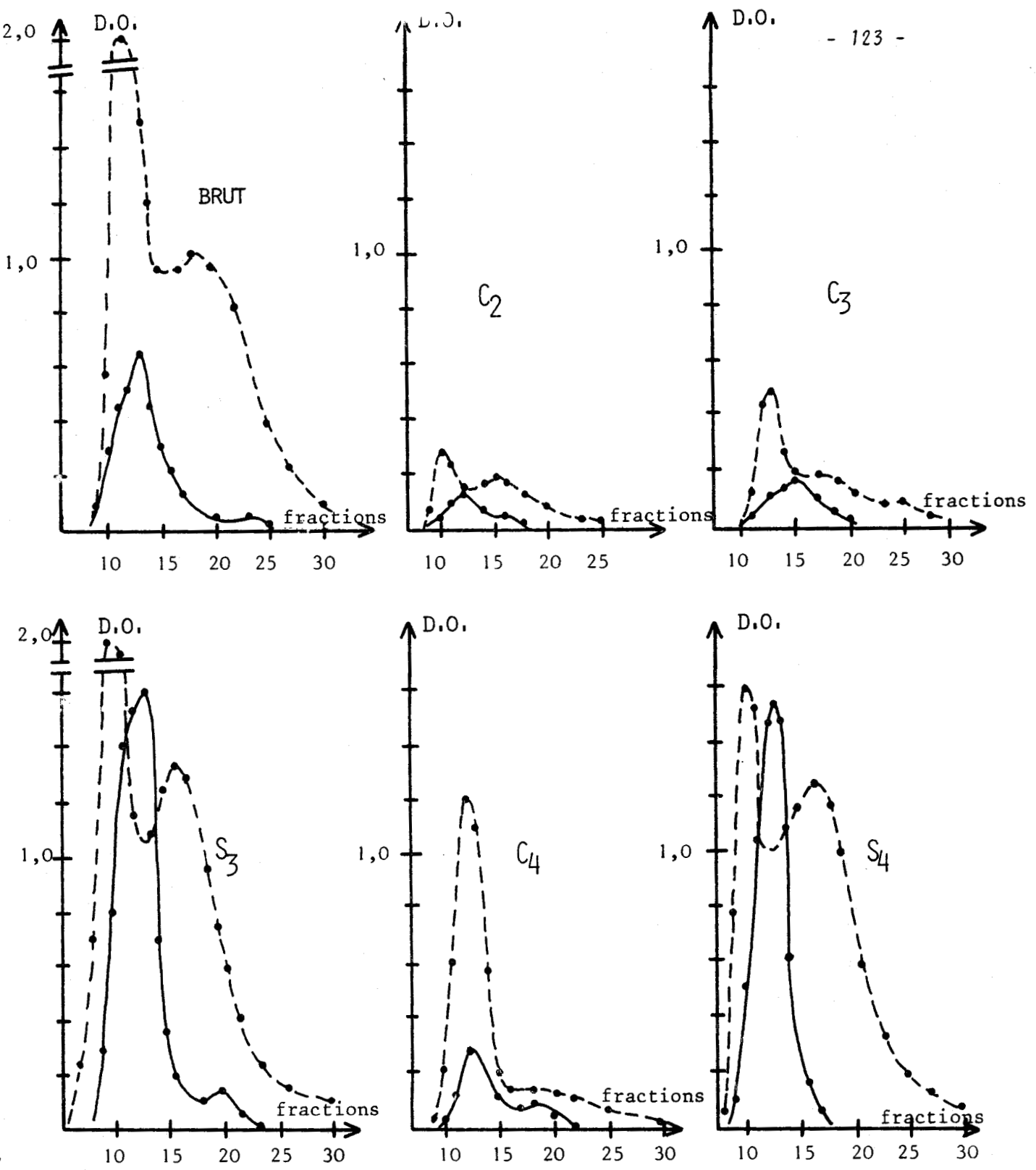


FIGURE 34 : GEL FILTRATION DES ELEMENTS CELLULAIRES D'UN HOMOGENAT RENAL SEPARES PAR UN FRACTIONNEMENT CELLULAIRE.

- C₂ = mitochondries "lourdes"
- C₃ = mitochondries "légères"
- S₃ = phase cytoplasmique amitochondriale
- C₄ = ribosomes + membranes
- S₄ = cytosol

—●— activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
 -●- protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.



c. Conclusion.

Par simple gel filtration de la phase cytoplasmique S_3 , nous avons mis en évidence, deux pics d'activité enzymatique : le premier est très important, a un poids moléculaire élevé en opposition avec le second, qui est mineur et possède un plus faible poids moléculaire.

Par contre, la gel filtration du cytosol S_4 ne montre qu'une seule activité enzymatique de haut poids moléculaire. L'activité enzymatique de petit poids moléculaire ne se retrouvant que dans le culot C_4 .

Un examen en microscopie électronique des deux fractions séparées par gel filtration de la phase cytoplasmique S_3 montre que :

- la fraction légère contient surtout des membranes (Figure 36),
- la fraction lourde est pratiquement aparticulaire si l'on considère que les granulations ovoïdes ne sont pas des éléments cellulaires connus au sens propre du terme, et que les ribosomes, d'après leur poids moléculaire, sont exclus de ces fractions (Figure 35).

Ceci confirmerait donc la double origine de la leucine aminopeptidase, déjà observée lors de l'étude du Tableau XXVII :

- une origine cytoplasmique
- une origine particulaire, plutôt membranaire d'après les observations faites sur la Figure 36.

Les poids moléculaires étant différents, il est alors facile d'imaginer que la forme enzymatique particulaire et de petit poids moléculaire soit à l'origine de la forme enzymatique lourde cytoplasmique.

5. Mise en évidence et étude de 2 formes enzymatiques de la fraction S_3 .

La gel filtration des éléments cellulaires obtenus par un fractionnement cellulaire ayant montré que la phase cytoplasmique S_3 contient deux activités enzymatiques séparables par une simple chromatographie, une étude plus approfondie de cette phase cytoplasmique mitochondriale S_3 a donc été envisagée.

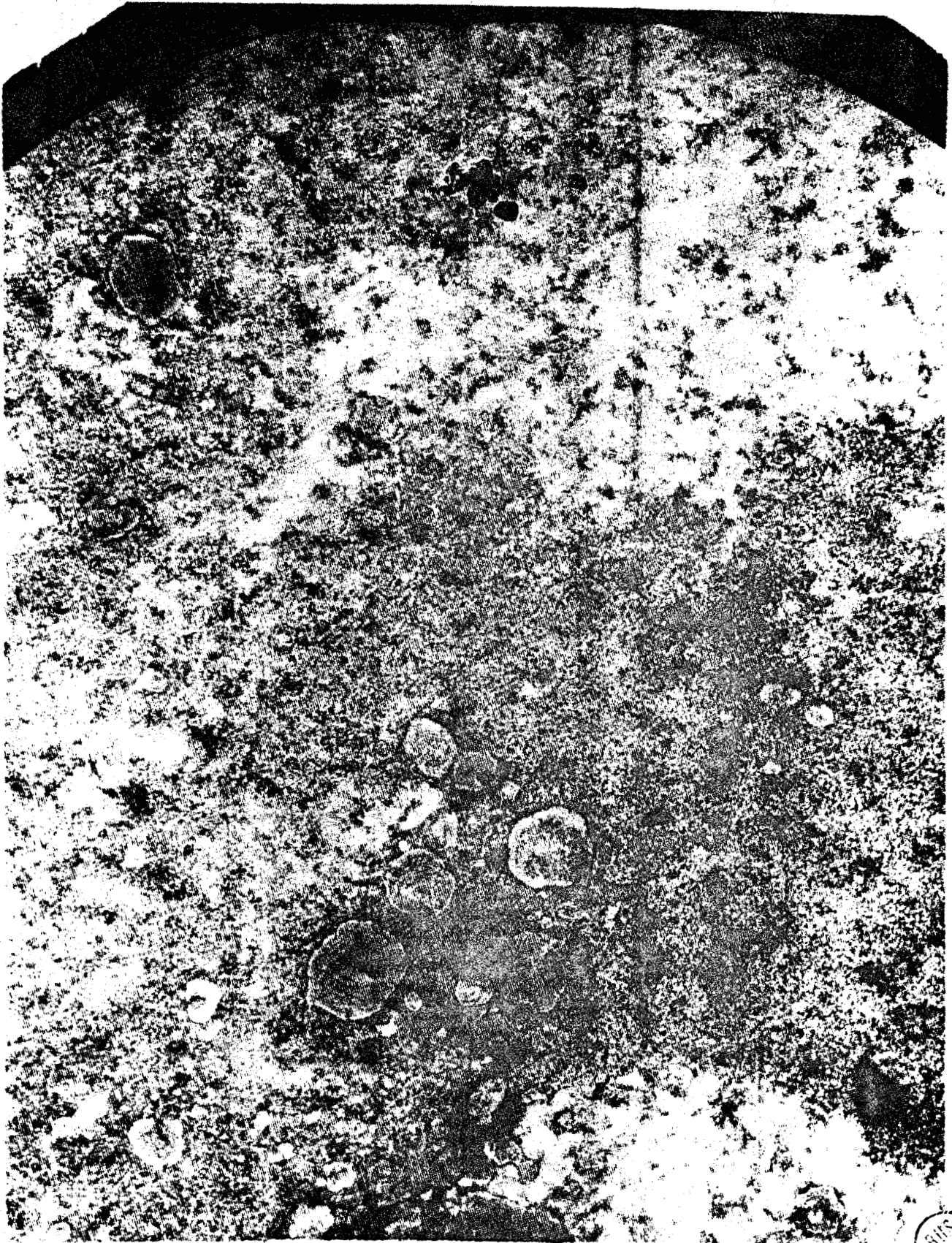


FIGURE 35 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA FORME I OBTENUE APRES SEPARATION PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.

Grossissement : 60 000.

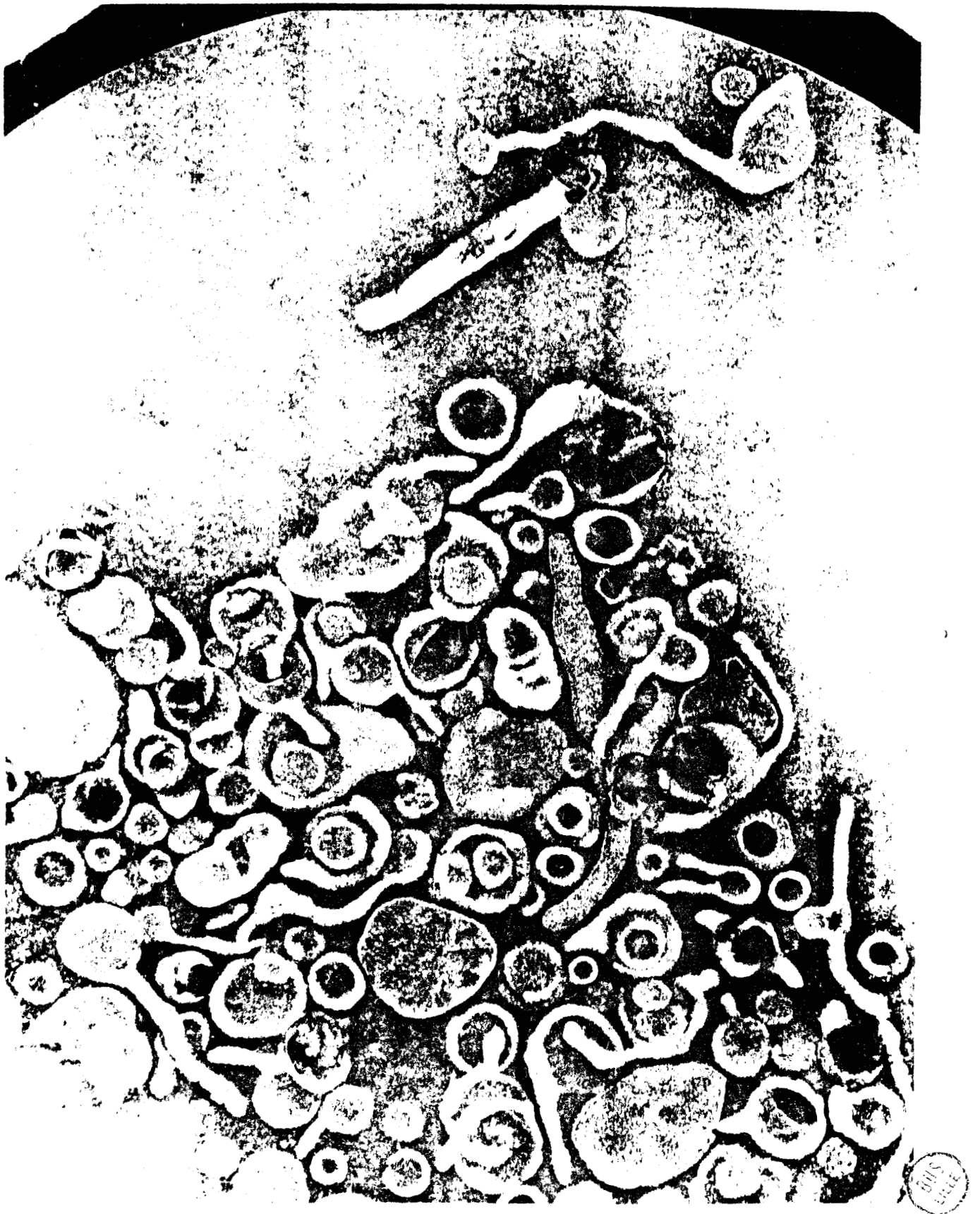


FIGURE 36 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA FORME II OBTENUE APRIS SEPARATION
PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200.

Grossissement : 60 000.

a. Gel filtration de la phase cytoplasmique S_3 : détermination du poids moléculaire des deux formes enzymatiques.

Comme nous l'avons montré, (Figure 34 - S_3) la gel filtration sur Sephadex G 200 sépare :

- une forme enzymatique majeure, lourde appelée forme I
- une forme enzymatique mineure, légère appelée forme II.

Nous avons étalonné la colonne de Sephadex en opérant dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons déposé successivement :

- du fibrinogène de PM 330 000
- des immunoglobulines IgG de PM 150 000
- de la sérum albumine de PM 67 000
- de l'inhibiteur trypsique du soja de PM 21 500.

Nous avons effectué 2 chromatographies de la phase cytoplasmique S_3 sur la colonne de Sephadex, l'une avant et l'autre après étalonnage pour vérifier son bon fonctionnement.

Les protéines et l'activité enzymatique ont été dosées par les méthodes habituelles.

- RESULTATS

Le chromatogramme (Figure 37) nous a permis de déterminer le poids moléculaire des formes I et II en reportant sur un système d'axes orthonormés, les numéros des fractions en abscisses et les logarithmes des poids moléculaires en ordonnées.

Ceci nous permet d'estimer :

- la forme I à $169\ 000 \pm 35\ 000$
- la forme II à $21\ 800 \pm 4500$

Ces poids moléculaires sont donnés à plus ou moins une fraction près.

A la suite de cet étalonnage nous avons contrôlé le degré de pureté protéique de ces deux formes enzymatiques I et II.

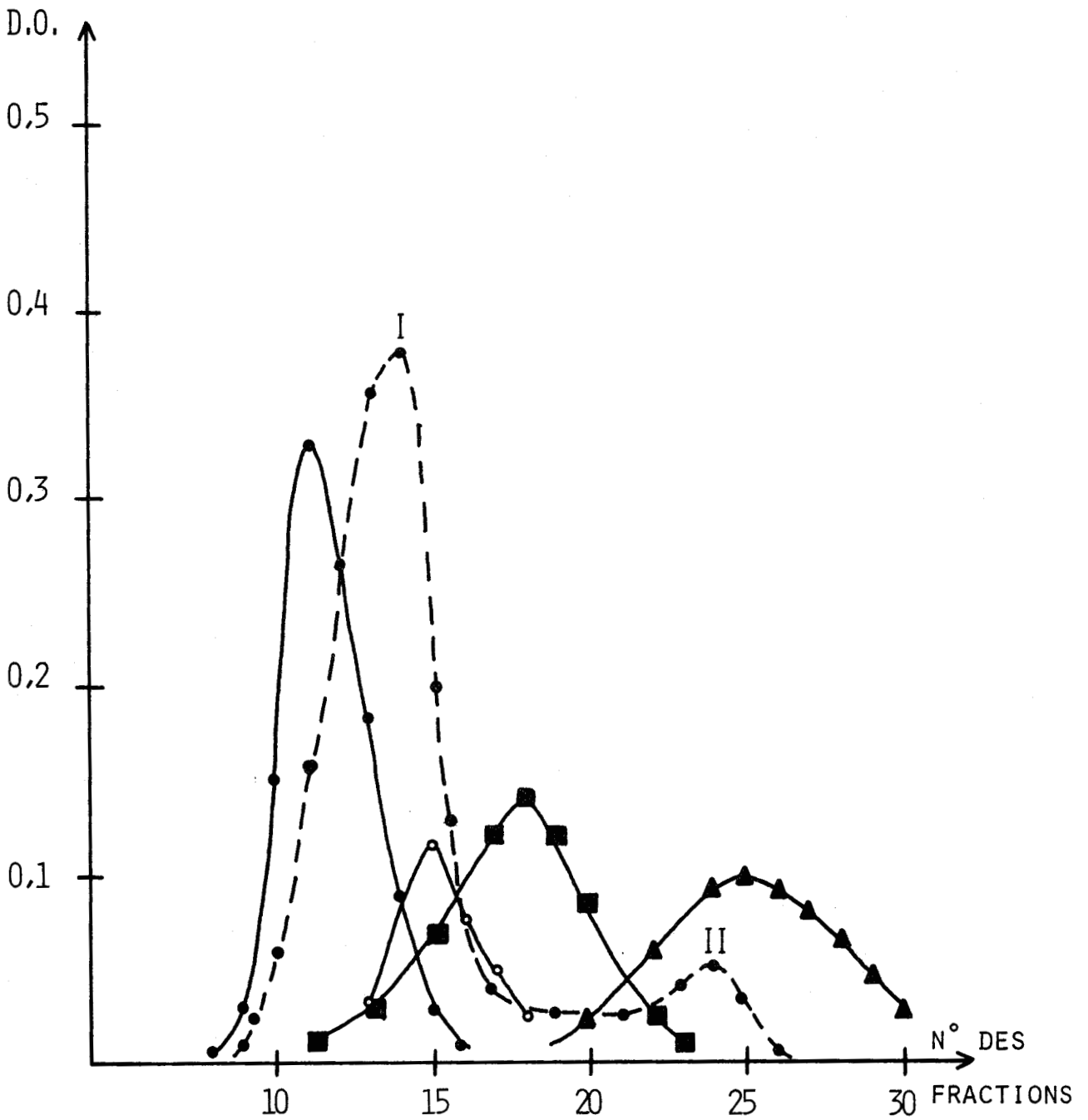


FIGURE 37 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 DES DIFFERENTS ETALONS DE POIDS MOLECULAIRES CONNUS ET DES FORMES I ET II DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE SEPARÉES A PARTIR DE LA PHASE CYTOPLASMIQUE AMITOCHONDRIALE S₃.

- Fibrinogène
 - IgG
 - Sérum Albumine
 - ▲—▲ Inhibiteur trypsique
 - Enzyme : activité exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- } protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.



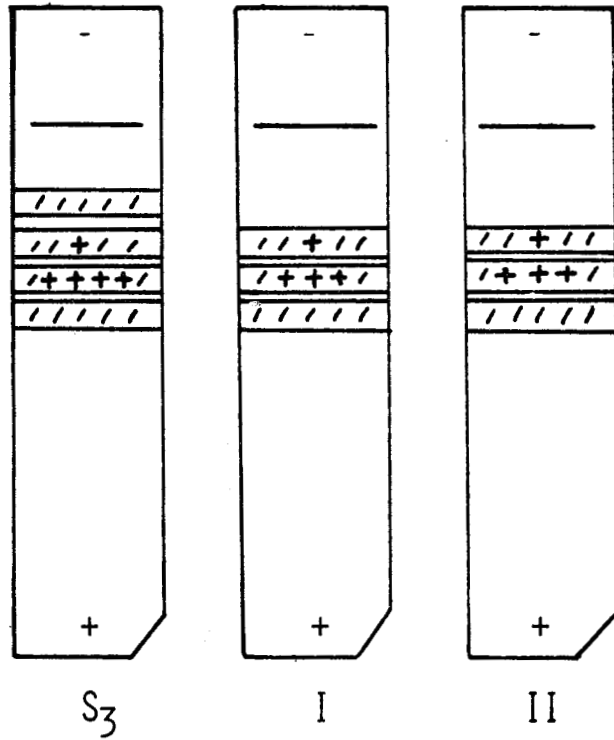


FIGURE 38 : ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE AVANT ET APRES GEL FILTRATION DE LA PHASE CYTOPLASMIQUE AMITOCHONDRIALE S₃.
S₃ : électrophorèse de la phase cytoplasmique mitochondriale.
I et II : électrophorèses des formes I et II séparées par la gel filtration.

////// protéines révélées à l'Amidoschwarz.

++++ activité enzymatique déterminée par incubation dans le substrat L-leucinamide en tampon borate des différentes bandes.

- CONTROLE PROTEIQUE PAR ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE.

Nous avons déposé la phase cytoplasmique avant gel filtration et les fractions contenant les deux formes I et II obtenues après gel filtration (Figure 38).

Avant gel filtration, la phase cytoplasmique montre un grand nombre de bandes protéiques dont deux migrent à 3 et 3,5 cm du dépôt vers l'anode. A chacune de ces deux bandes protéiques se superpose une activité enzymatique, la bande active la plus rapide vers l'anode étant la plus importante enzymatiquement dans le cas de la forme I comme de la forme II.

De ces électrophorèse, nous ne pouvons donc retenir qu'un simple contrôle de pureté protéique, les migrations électrophorétiques des formes I et II obtenues par gel filtration étant identiques, ces 2 formes seraient réciproquement souillées l'une par l'autre.

b. Ultracentrifugation de 7 H en gradient de sucrose 5-20 p. 100 de la phase cytoplasmique S₃.

- PROTOCOLE

Nous avons déposé sur plusieurs tubes de gradient de sucrose 5-20 p. 100, 0,2 ml de la phase cytoplasmique S₃.

Parallèlement à cette ultracentrifugation, nous avons chromatographié sur Sephadex G 200, cette même phase cytoplasmique afin de vérifier la présence des formes I et II (Figure 39 - A).

- RESULTATS

Le dosage de l'activité enzymatique et des protéines permet de réaliser le diagramme de la Figure 39-B . Nous distinguons deux activités :

- une fraction majeure et lourde
- une fraction mineure et légère

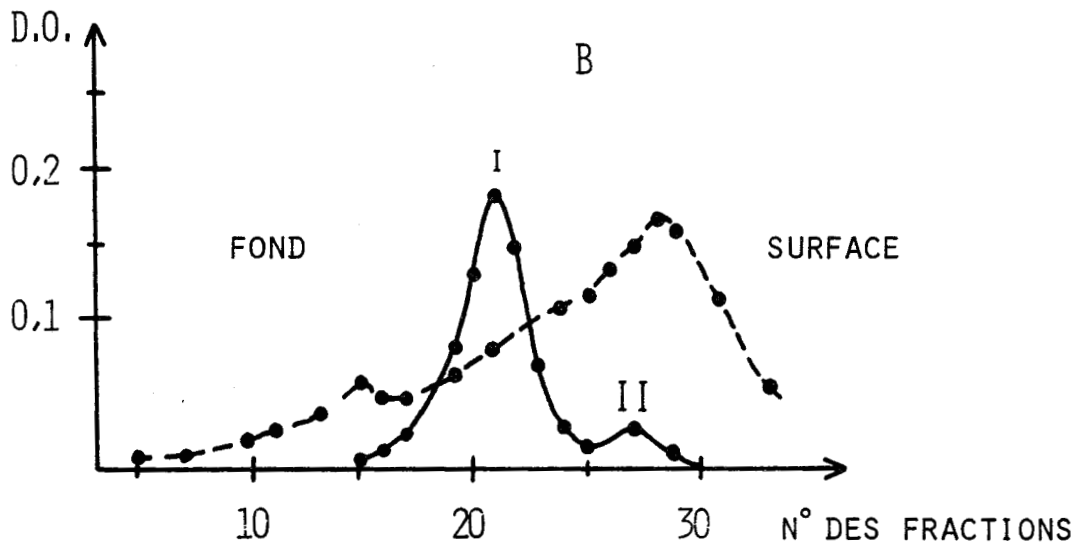
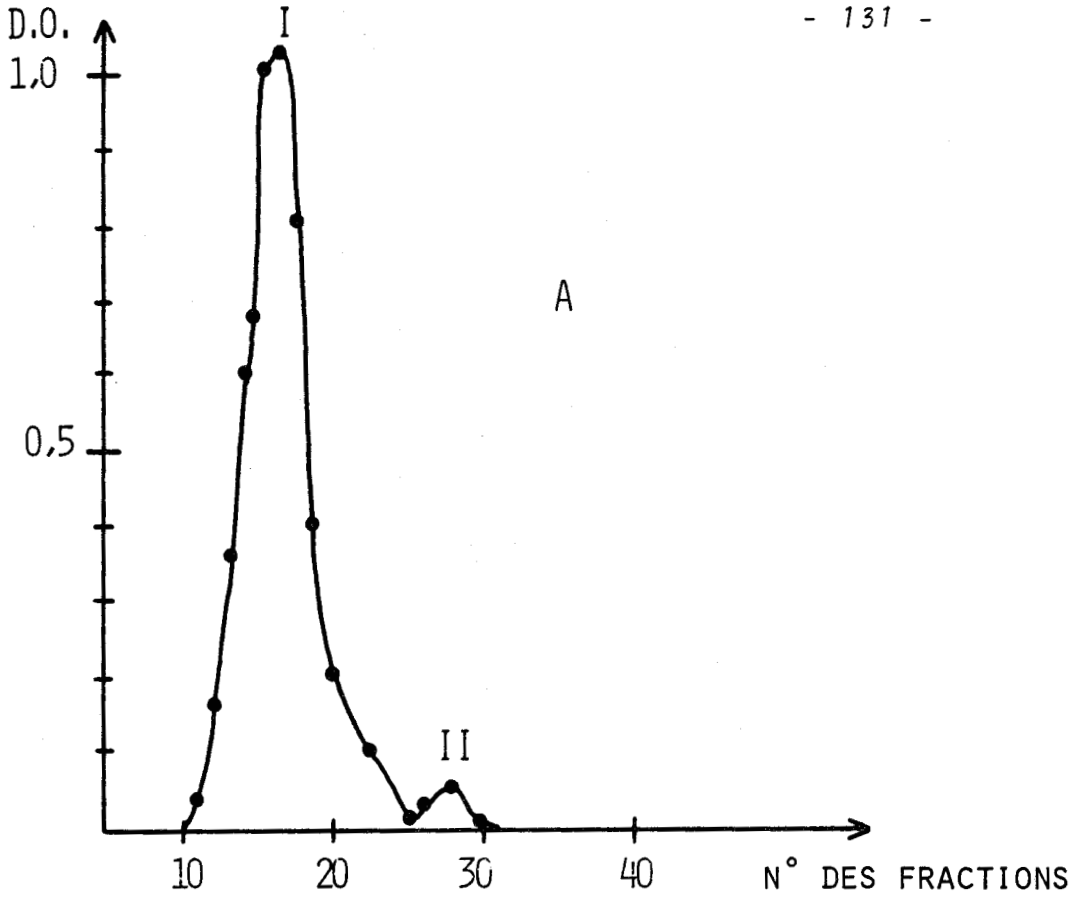


FIGURE 39 : A : GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 DE LA PHASE CYTOPLASMIQUE S₃ (les protéines ne sont pas représentées).

B : ULTRACENTRIFUGATION DE 7 H EN GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100 DE LA PHASE CYTOPLASMIQUE S₃.

—●—●— Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

—●—●— Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.

BUS
LILLE

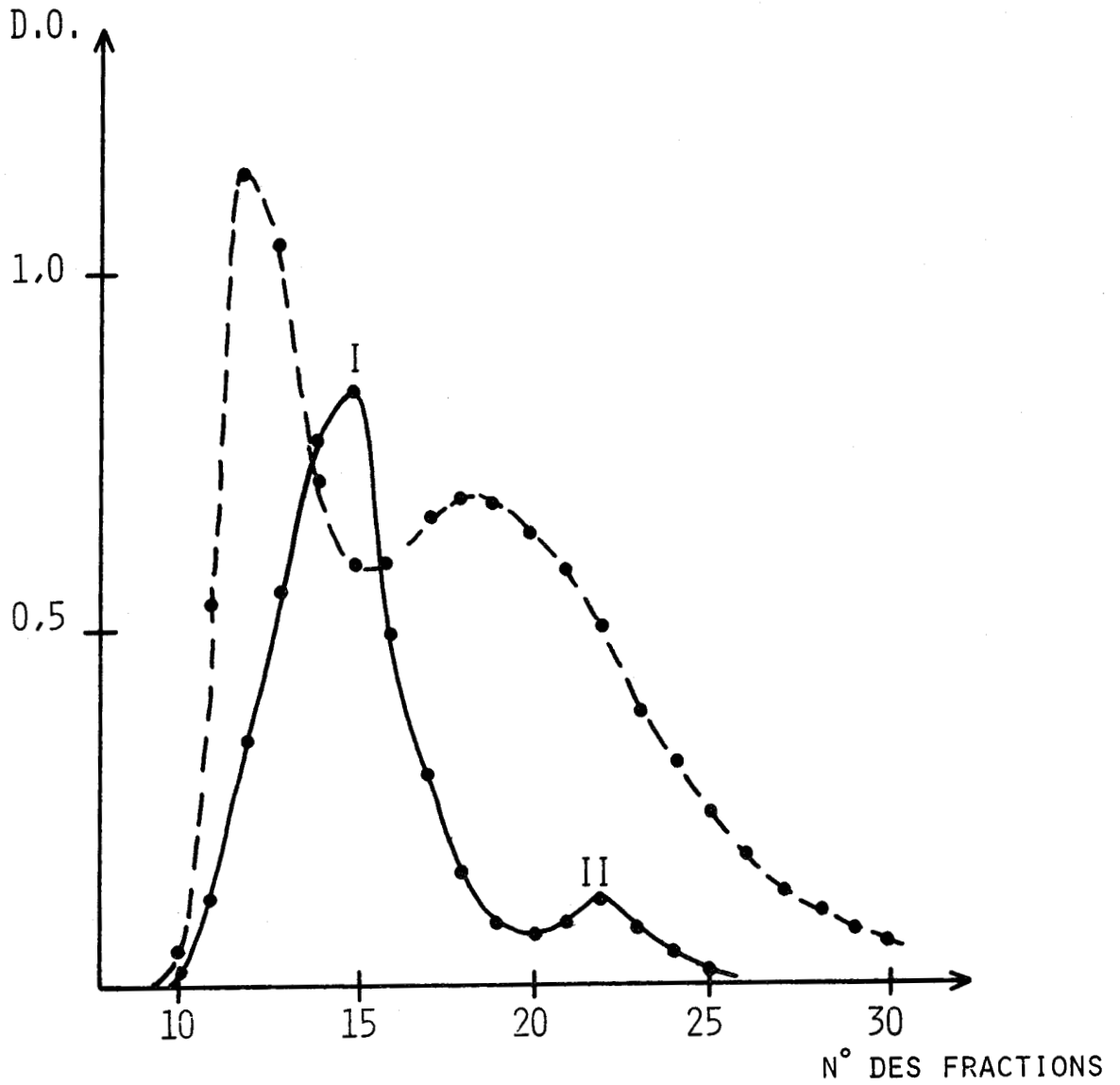


FIGURE 40 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 D'UNE PHASE CYTOPLASMIQUE AMITOCHONDRIALE S_3 .

Elution par du tampon borate 0,025 M, pH 8,0 Mg^{2+} 1 mM

- — ● Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.
- — ● Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.



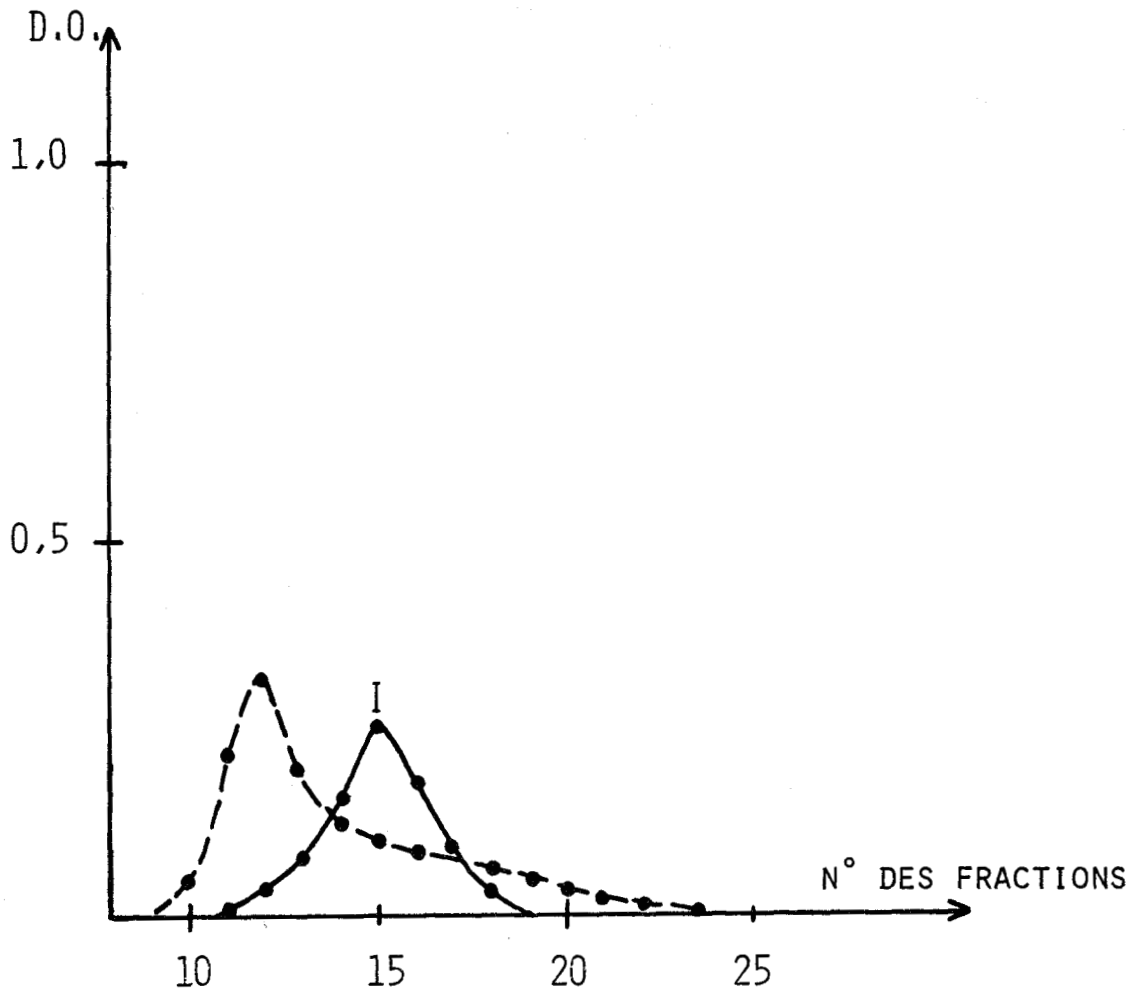


FIGURE 41 : CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 DE LA FORME I OBTENUE PAR GEL FILTRATION DE LA PHASE CYTOPLASMIQUE AMITOCHONDRIALE S_3 (fractions 12 à 17 - Cf. figure 40).

Elution par tampon borate 0,025 M pH 8,0 Mg^{2+} 1 mM

- Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY
- Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.

Ces deux formes ont respectivement leur maxima d'activité aux fractions 21 et 27.

Le profil protéique présente un pic important proche de la surface. Il est donc constitué de protéines légères.

Nous retrouvons ainsi les deux activités enzymatiques de poids moléculaires différents séparés par gel filtration.

c. Conclusion.

La gel filtration comme l'ultracentrifugation met en évidence deux formes enzymatiques de poids moléculaires différents.

Nous avons vérifié par gel filtration que la forme II ne provenait pas de la forme I par détérioration de celle-ci au cours de la chromatographie : la forme I séparée de la forme II par une première gel filtration donne, après une seconde chromatographie du même type, un seul pic d'activité enzymatique de poids moléculaire identique à la forme I. (Figures 40 et 41).

Ainsi la présence de ces deux formes nous a conduite à les étudier séparément.

6. Etude de la forme enzymatique I.

Nous avons choisi la gel filtration comme méthode de séparation des formes I et II, celle-ci étant une méthode facile, rapide et assez rentable du point de vue quantitatif.

a. Ultracentrifugation en gradient de sucrose.

Séparée de la forme II par gel filtration, la forme I est concentrée puis déposée sur un gradient de sucrose 5-20 p. 100.

Après une sédimentation de 7 H à 286 000 g sur un profil protéique, formé essentiellement d'un unique pic, qui correspond à des protéines légères, se détache un profil d'activité enzymatique montrant deux pics ayant leur maxima d'intensité aux fractions 23 et 28. (Figure 42).

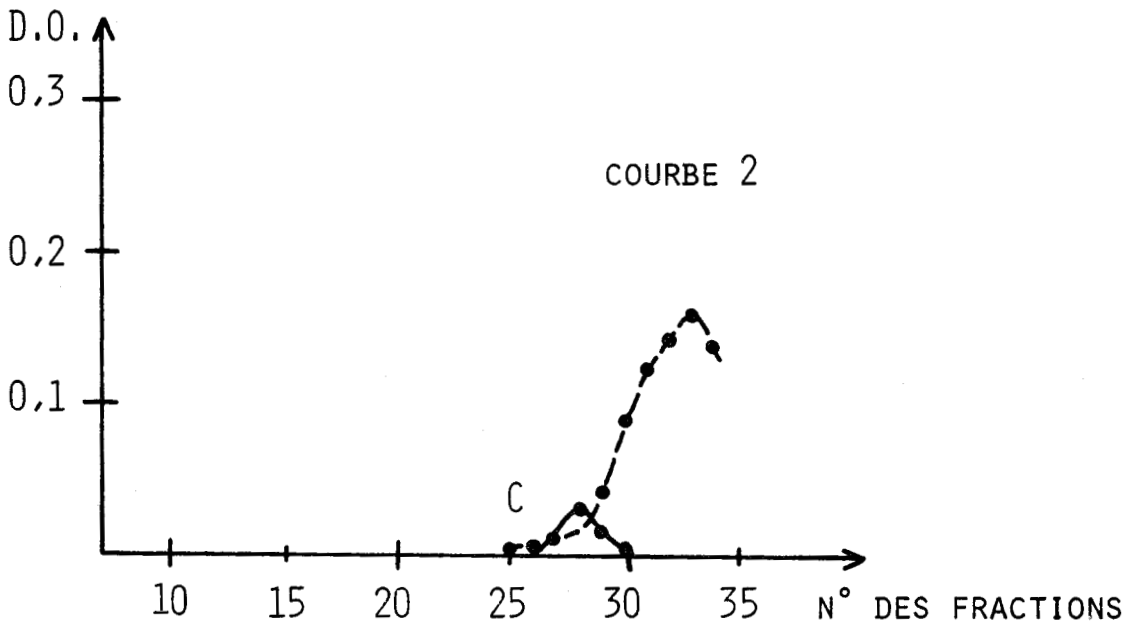
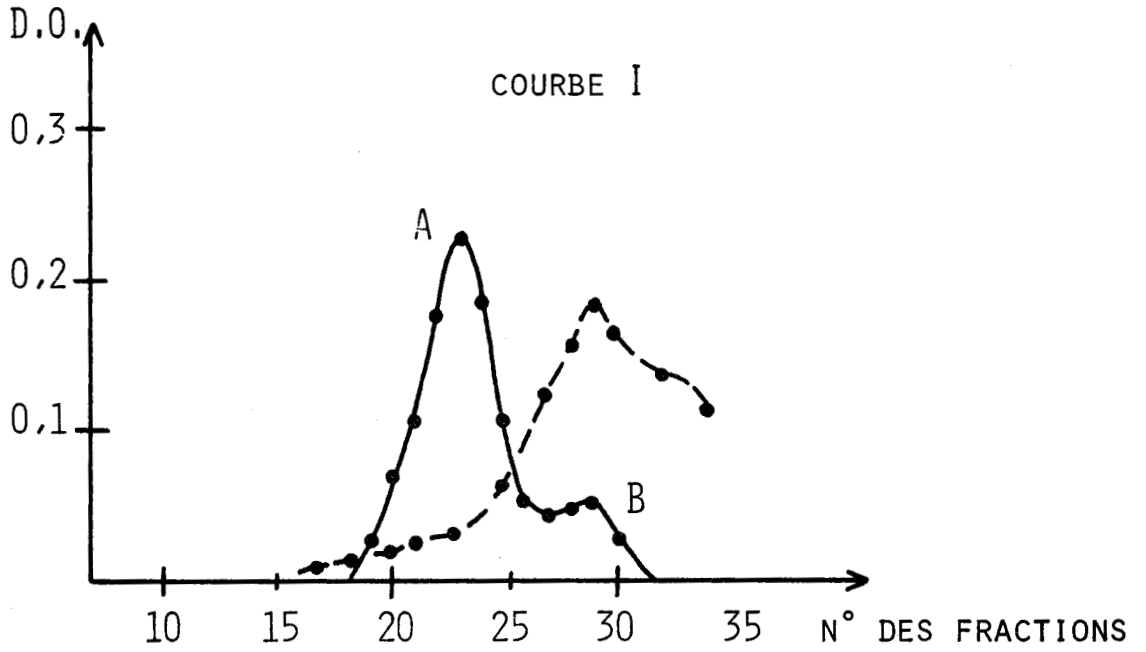


FIGURE 42 : ULTRACENTRIFUGATION DE 7 H A 286 000 g EN GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100 DES FORMES I (courbe 1) et II (courbe 2) APRES LEUR SEPARATION PAR GEL FILTRATION.

- Activité enzymatique exprimée par la Densité Optique de la réaction de BERTHELOT.
- Protéines exprimées par la Densité Optique de la réaction de LOWRY.

Par ultracentrifugation, la forme I se sépare donc en deux fractions A et B (Figure 42-I) semblant correspondre aux formes I et II.

b. Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Nous avons étudié en électrophorèse les fractions A et B obtenues par ultracentrifugation à partir de la forme I.

Le dosage, après repérage des bandes protéiques colorées (Figure 43) donne les résultats suivants :

- Pour la fraction A :

- . 6 bandes protéiques visibles avec une superposition de l'activité enzymatique au niveau de la 4^{ème} bande, soit à 3,5 cm du dépôt.

- Pour la fraction B :

- . 6 bandes protéiques visibles avec une superposition de l'activité enzymatique au niveau de la 2^{ème} bande soit à 2,5 cm du dépôt.

c. Conclusion.

Cette électrophorèse des fractions A et B obtenues par ultracentrifugation à partir de la forme I sont plus qu'un simple contrôle de pureté protéique : nous constatons en effet, que la fraction A sédimente comme la forme I et la fraction B comme la forme II : ceci implique donc bien que la forme I donne naissance à une partie de la forme II.

Ces deux fractions A et B, donc les deux formes I et II, migrent différemment en électrophorèse. La forme I migre plus rapidement vers l'anode que la forme II, ce que nous n'avons pas pu démontrer à l'issue d'une seule gel filtration (Figure 38).

7. Etude de la forme II.

La forme II, comme la forme I, est obtenue après séparation par gel filtration.

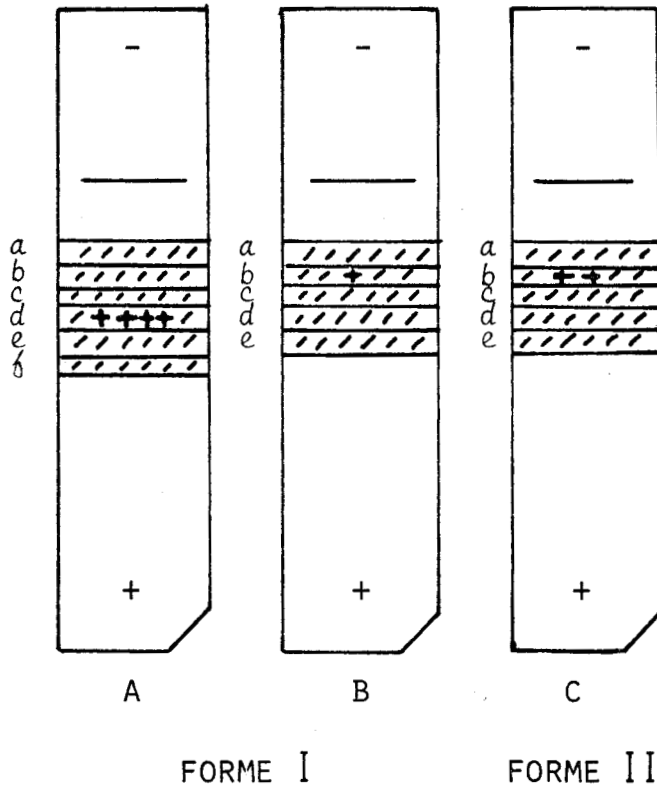


FIGURE 43 : ELECTROPHORESES ANALYTIQUES SUR ACETATE DE CELLULOSE DES SOUS-FRACTIONS A ET B OBTENUES PAR ULTRACENTRIFUGATION DE LA FORME I ET DE LA SOUS-FRACTION C OBTENUE PAR ULTRACENTRIFUGATION DE LA FORME II.

//////// Protéines révélées à l'Amidoschwarz

++++ Activité enzymatique déterminée par incubation dans le substrat L-leucinamide en tampon borate des différentes bandes découpées a, b, c, d, e, f.



a. Ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 p.100.

Après concentration, la forme II est soumise à une sédimentation de 7 H à 286 000 g. Le dosage des fractions obtenues permet de mettre en évidence un seul pic d'activité enzymatique, ayant un maximum à la fraction 28, et un pic de protéines légères (Figure 42-II). Cette fraction unique, que nous appellerons C, sédimente au même endroit que la fraction B obtenue à partir de la forme I. Ces deux fractions B et C semblent donc identiques et ainsi assimilables à la forme II.

b. Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Nous avons déposé en électrophorèse la fraction C obtenue par ultracentrifugation.

Nous obtenons 5 bandes protéiques. Leur dosage montre que l'activité enzymatique se superpose à la deuxième bande soit à 2,5 cm du dépôt (Figure 43).

c. Conclusion.

La forme II reste homogène à l'ultracentrifugation et donne une fraction C unique de sédimentation identique à la forme II.

L'électrophorèse de la fraction C montre une migration identique à la fraction B, ceci confirme donc bien que les fractions B et C sont identiques, et ainsi assimilables à la forme II.

8. Conclusion générale du Chapitre.

Le fractionnement cellulaire d'un homogénat rénal montre une répartition majeure de la leucine aminopeptidase au niveau du cytosol, avec cependant une fraction mineure dans le culot ribosomo-membranaire.

La gel filtration des différents éléments cellulaires laisse augurer

la présence de deux formes enzymatiques. Leur étude s'est effectuée à partir de la phase cytoplasmique amitochondriale.

On distingue :

- une forme majeure, lourde (forme I)
- une forme mineure, légère (forme II)

Seule la forme I se retrouve dans le cytosol. Par contre, la forme II se retrouve dans le culot ribosomo-membranaire, accompagnée de souillures constituées par la forme I (Figures 34 C₄ et S₄).

L'examen de microscopie électronique des formes I et II séparées par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 200 semble montrer que la fraction contenant la forme I est aparticulaire, tandis que la fraction contenant la forme II renferme de nombreuses membranes. (Figures 35 et 36).

L'étude de ces deux formes I et II, séparables par gel filtration a permis d'en déterminer leur poids moléculaire : 169 000 et 21 800 respectivement.

L'ultracentrifugation de la forme I a montré que celle-ci donnait naissance à une partie de la forme II.

L'électrophorèse de ces 2 formes séparées par l'ultracentrifugation a montré que la forme I migrerait plus rapidement que la forme II, à l'anode.

Nous avons donc deux formes de poids moléculaires différents et de migrations électrophorétiques également différentes.

CONCLUSION GENERALE

La purification de la leucine aminopeptidase de rein de cobaye nous permet de mettre en évidence une enzyme assez instable aux différents traitements de purification. Elle est sous la dépendance très étroite du magnésium puisque sans cet ion, sa désactivation est très rapide.

L'enzyme ainsi purifiée possède une spécificité d'action caractéristique des leucine aminopeptidases vraies.

Elle est activée par les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} mais elle est inhibée par les ions Co^{2+} .

La leucine aminopeptidase est inhibée par les inhibiteurs d'ions métalliques, E.D.T.A., acide citrique, CN^- . Pour de faibles concentrations en E.D.T.A., cette inhibition est réversible. L'étude des agents bloquants des groupements thiols montre que la leucine aminopeptidase possède des groupements thiols libres au niveau du site actif.

Son pH optimal d'action est situé entre 8,5 et 9,0. Elle est thermostable et son K_m est de $8,3 \cdot 10^{-3}$ M/l à pH 8,8.

Au cours du couplage DEAE-Cellulose-électrophorèse préparative sur bloc, on peut mettre en évidence deux formes enzymatiques de migration différente et en quantité inégale. La forme mineure ne se retrouve pas au cours de stades ultérieurs, tant en électrophorèse analytique qu'en ultracentrifugation de sucrose 5-20 p. 100. Par contre, le couplage de la chromatographie sur DEAE-Cellulose et de la gel filtration avec l'ultracentrifugation de sucrose 5-20 p. 100 laisse augurer la présence de deux formes de l'enzyme.

L'étude de la phase cytoplasmique mitochondriale obtenue après un fractionnement cellulaire confirme l'existence de ces 2 formes enzymatiques I et II. Elles ont des poids moléculaires différents et des migrations électrophorétiques différentes :

- la forme I possède un poids moléculaire de 169 000 environ et la forme II un poids moléculaire de 21 800 environ. En électrophorèse, la forme I migre plus rapidement vers l'anode que la forme II.

- La forme II semble provenir de la forme I puisqu'à l'issue d'une ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 p. 100, la forme I donne les deux formes à la fois.

Le fractionnement cellulaire semble indiquer une localisation cytoplasmique et particulaire de l'enzyme. L'étude en microscopie électronique des formes I et II, séparées par gel filtration montre que les fractions contenant la forme I est aparticulaire et que les fractions contenant la forme II renferment des membranes.

APPENDICE TECHNIQUE

I - DOSAGE DES PROTEINES.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode colorimétrique de LOWRY au FOLIN-CIOCALTEU (112) adaptée à l'Auto-Analyseur Technicon.

A/ - REACTIFS.

1. Solution cupro-tartrique.

- solution A : $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ R.P. (Prolabo) à 0,2 pour cent.
- solution B : tartrate double de sodium et de potassium R.P. (Prolabo) à 0,4 pour cent.

Mélanger extemporanément :

- . 1 volume de solution A
- . 1 volume de solution B

2. Solution de carbonate.

- 84 g de bicarbonate de sodium R.P. (Prolabo) à dissoudre dans 500 ml d'eau distillée.
- 45 g de soude en pastilles R.P. (Prolabo) à dissoudre dans 300 ml d'eau distillée.

Après refroidissement de la soude, nous mélangeons les deux solutions et nous complétons à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution est conservée à l'obscurité et filtrée avant chaque usage.

3. Solution de FOLIN-CIOCALTEU*

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| - Tungstate de sodium R.P. (Prolabo) | 100 g |
| - Molybdate de sodium pur (Prolabo) | 25 g |
| - eau distillée | 700 ml |

Après dissolution, nous ajoutons :

* Cette solution peut être remplacée par le réactif de FOLIN-CIOCALTEU (Merck) qui est d'aussi bonne qualité que la solution que nous fabriquons.

- acide phosphorique à 85 % (Prolabo) 50 ml
- acide chlorhydrique pur (Prolabo) 100 ml

Cette solution est soumise à une ébullition à reflux pendant 10 H. à l'aide d'un chauffe-ballon, puis nous ajoutons :

- sulfate de lithium (Prolabo) dissous dans
50 ml d'eau distillée 150 g
- Brome (R.P. Prolabo) goutte à goutte
jusqu'à décoloration partielle 10 à 15 gouttes

Cette solution est à nouveau portée à ébullition pendant 15 minutes afin de chasser l'excès de brome.

Après refroidissement, nous complétons à 2000 ml avec de l'eau distillée et nous filtrons la solution.

La solution de travail est diluée au quart avant chaque usage.

B/ - MONTAGE DU MANIFOLD TECHNICON.

Le schéma de montage de l'Auto Analyseur est décrit dans la Figure 44.

C/ - GAMME-ETALON DE PROTEINES.

Une gamme-étalon de protéines est faite à partir de dilution d'une solution de LAB-TROL (DADE-Division American Hospital Supply Corporation - Miami) de titre connu.

A partir de cette solution, différentes dilutions sont effectuées de façon à ce que la concentration en protéines varient de 0,035 à 0,7 milligrammes de protéines par millilitre.

La courbe d'étalonnage est linéaire jusqu'à des concentrations de 0,5 milligrammes de protéines par millilitre. Au-dessus de cette concentration nous diluons la solution enzymatique.

Le taux de protéines s'exprime en milligrammes d'azote protéique par millilitre de solution.

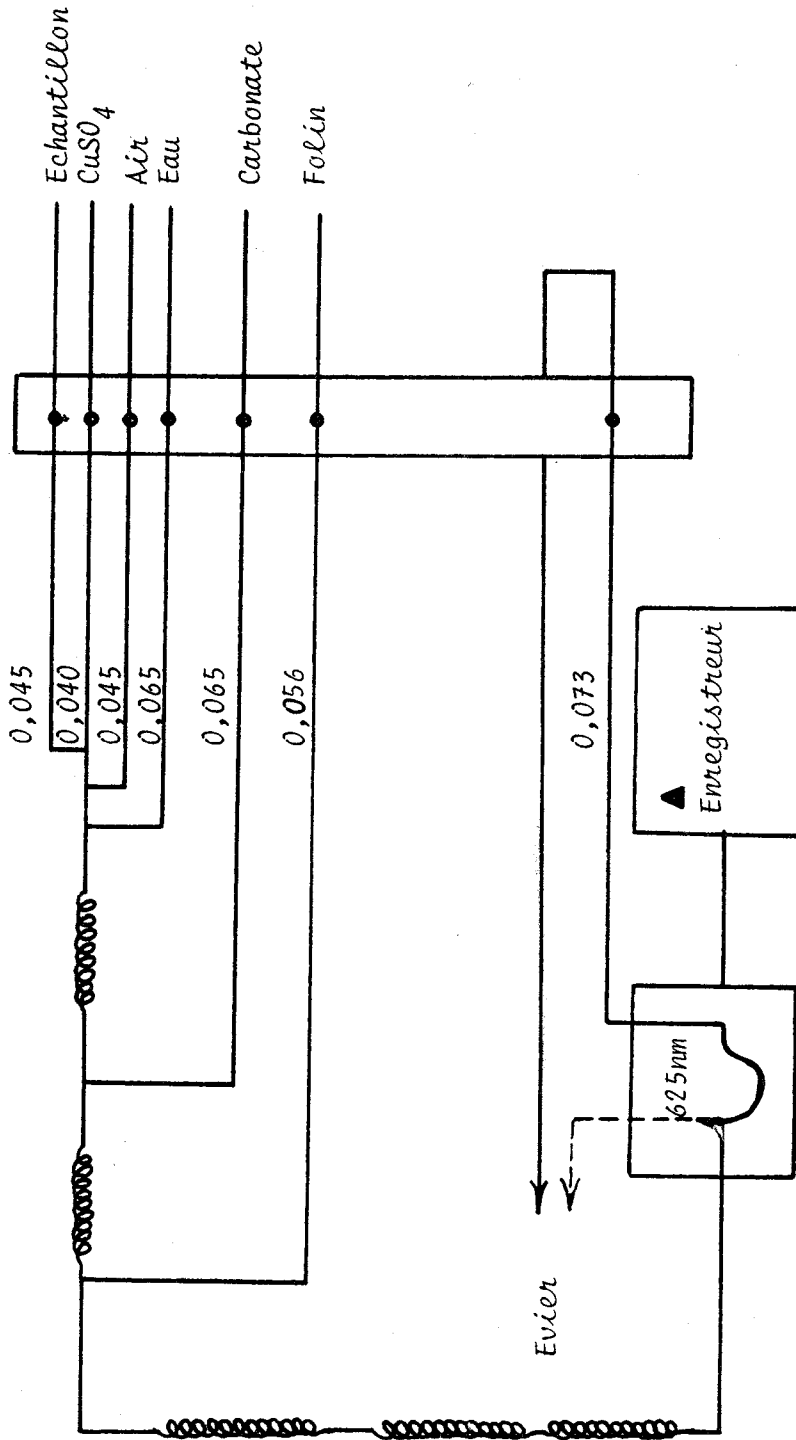


FIGURE 44 : Schéma du Manifold Technicon utilisé pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY.

II - COMPOSITION DU TAMPON BORATE (113) :

Il est composé d'un mélange de deux solutions-mères.

1) Préparation des solutions-mères.

Solution A :

- acide borique 0,1 M (Prolabo) R.P.
- chlorure de potassium 0,1 M (Billault F.B.)

Solution B :

- NaOH 0,1 N (Merck)

2) Préparation du tampon borate pH = 8,0 - 0,025 M.

Solution A	50 ml
Solution B	3,97 ml
Eau distillée q.s.p.	200 ml

Le tampon ainsi préparé a un pH de 8,0.

Pour un tampon qui doit contenir du magnésium nous ajoutons du $MgCl_2$ 0,001 M.

III - PREPARATION DE LA DEAE-CELLULOSE.

Pour une colonne de 14 x 3,5 cm nous pesons 60 grammes environ de DEAE-Cellulose DE 52.

L'équilibration du gel s'effectue dans le tampon borate pH 8,0 0,025 M. Elle nécessite une dizaine de lavages et de décantations successifs par ce même tampon pour atteindre pH 8,0.

Le gel est ensuite dégazé à l'aide d'une trompe à vide, puis coulé dans la colonne surmontée d'un entonnoir. Le tassement du gel s'effectue par écoulement libre de la colonne à + 4° C. La hauteur du gel est ajustée au niveau choisi, soit 14 cm.

(113) CLARKS & LUBS...

IV - PREPARATION DU GEL SEPHADEX G 200.

3 g de Sephadex G 200 (40-120 μ Pharmacia) sont introduits progressivement dans 2 litres de tampon borate. Le gel est mis à gonfler 5 jours à + 4° C. Le tampon est renouvelé chaque jour.

Après dégazage, le gel est introduit dans une colonne (70 x 1 cm) surmontée d'un entonnoir.

Le tassement du gel s'effectue à + 4° C pendant 48 heures par écoulement libre de la colonne.

La hauteur du gel est ajustée au niveau choisi, soit 60 cm.

V - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.

1. Matériel.

. Nous utilisons des blocs de cellogel de 6 x 17 cm et de 2,5 mm d'épaisseur de chez CHEMETRON fourni par la firme SEBIA-PARIS.

Ceux-ci sont conservés dans du méthanol à 30 %.

. Nous utilisons la cuve CHEMETRON (Modèle 2000) munie de 2 électrodes de platine et d'un portoir dont les dimensions sont adaptées aux blocs de façon qu'ils évitent l'utilisation d'une plaque de verre comme support de bloc pendant l'électrophorèse.

. Un pont de papier Whatman I est utilisé entre le tampon d'électrode et les blocs.

. Le tampon d'électrode a un pH de 8,4. Sa composition est la suivante :

- Véronal sodique (Prolabo)	17 g
- Acide chlorhydrique N (Titrisol Merck)	23,5 ml
- Chlorure de magnésium (MgCl ₂ , 6 H ₂ O Merck)	0,2 g
- eau distillée q.s.p.	1000 ml

2. Dépôt sur le bloc de cellogel.

Avant d'être utilisés, les blocs de cellogel sont essorés entre deux feuilles de papier filtre, puis immergés dans le tampon véronal pendant 2 heures au minimum. (Il est conseillé de ne pas prolonger ce temps au-delà d'une nuit).

Puis l'excès de tampon est éliminé en épongeant les blocs entre 2 feuilles de papier filtre. Ceux-ci sont alors placés sur une plaque de verre, elle-même placée sur le portoir de la cuve à électrophorèse. Les 2 extrémités des blocs sont recouverts d'un pont de papier Whatman 1 préalablement trempé dans le tampon d'électrode.

A 2,5 cm environ de l'une des extrémités, nous creusons une petite rigole régulière à l'aide du dos d'un scalpel, ou mieux encore, à l'aide d'un parallélépipède dont la surface de contact avec le bloc est égale à celle de la rigole. Sa profondeur est de 2 mm et sa longueur de 4,5 cm environ.

Il est prudent de veiller à ne pas dépasser les 2 mm de profondeur afin de ne pas transpercer le gel de part en part.

Le dépôt de la solution enzymatique ne doit pas excéder 0,5 ml et celui-ci est fait en 5 à 8 fois à l'aide d'une pipette Pasteur, le temps d'absorption de la solution enzymatique dépendant du pouvoir absorbant du bloc et de la viscosité de la solution enzymatique.

Après le dépôt de la solution enzymatique, nous enlevons la plaque de verre supportant le bloc, pour poser directement celui-ci sur le portoir de la cuve prévu à cet effet.

3. Electrophorèse.

Les électrodes étant reliées à la cuve (cathode, côté dépôt) nous appliquons une intensité de 25 mA par bloc pendant 5 heures.

Lorsque la migration est terminée, nous coupons, en deux, un bloc dans le sens de la longueur à l'aide d'un scalpel assez fin ou d'une lame de rasoir.

4. Coloration et décoloration.

Nous colorons une moitié de blocs dans l'Amido-schwarz dont la composition est la suivante :

- Amido schwarz 10 B (Merck)	1 g
- Acide acétique (Prolabo)	10 ml
- Méthanol (Merck)	90 ml

La solution est mise sous agitation magnétique pendant une nuit. Après filtration, le colorant est prêt à l'emploi.

L'immersion dans le colorant est de 15 minutes.

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

- Méthanol technique (Prolabo)	900 ml
- Acide acétique (Prolabo)	100 ml

Les blocs ainsi révélés se conservent dans de l'acide acétique à 5 p. 100.

VI - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR BANDES DE CELLOGEL.

1. Matériel.

. Nous utilisons des bandes de cellogel standard 2,5 x 17 cm Chemetron fourni par la firme SEBIA (Paris).

. Les bandes se conservent indéfiniment dans du méthanol à 35 p. 100.

. L'électrophorèse s'effectue dans une cuve du type 2 PAC/5 Chemetron pouvant contenir 6 bandes.

. L'existence de ponts de papier Whatman 1 n'est pas nécessaire, les bandes suffisamment longues, trempent, après fixation sur leur portoir, directement dans le tampon d'électrode.

. Le tampon d'électrode a un pH de 9,2. Sa composition est la suivante :

- véronal sodique (Prolabo) 8,24 g
- chlorure de magnésium ($MgCl_2, 6 H_2O$ Merck) 0,2 g
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

2. Dépôt.

Avant d'être immergées dans le tampon d'électrode pendant 15 minutes (une nuit au maximum) les feuilles de cellogel sont essorées entre 2 feuilles de papier filtre.

L'excès de tampon est éliminé par la même technique. Les feuilles sont alors tendues sur le portoir, de façon à orienter l'angle coupé de chaque feuille en bas et à droite. La surface des feuilles ainsi tendue est mate, seule pénétrable aux protéines. Le portoir est immédiatement placé dans la cuve contenant ce tampon, afin d'éviter la dessiccation des feuilles.

Le dépôt de l'échantillon est de 2 microlitres. Il est effectué à l'aide de l'applicateur d'échantillon Chemetron, constitué de 2 fils métalliques parallèles. Après absorption de l'échantillon, il est possible de faire plusieurs dépôts l'un sur l'autre ; le premier restant brillant par rapport à la surface de la bande de cellogel, il sert de point de repère pour les dépôts suivants.

3. Electrophorèses.

Les électrodes étant reliées à la cuve (cathode, côté dépôt) nous appliquons un voltage constant de 200 volts, pendant 75 minutes.

4. Coloration et décoloration des bandes.

Les bandes sont colorées dans une solution de rouge ponceau S (SEBIA-Paris) pendant 5 minutes.

La décoloration s'effectue par 3 ou 4 bains successifs dans une solution aqueuse d'acide acétique à 5 p. 100.

Les bandes ainsi révélées se conservent dans la même solution d'acide acétique à 5 p. 100 que précédemment.

L'équilibration du gel s'effectue dans le tampon borate pH 8,0 0,025 M. Elle nécessite une dizaine de lavages et de décantations successifs par ce même tampon pour atteindre pH 8,0.

Le gel est ensuite dégazé à l'aide d'une trompe à vide, puis coulé dans la colonne surmontée d'un entonnoir. Le tassement du gel s'effectue par écoulement libre de la colonne à + 4° C. La hauteur du gel est ajustée au niveau choisi, soit 14 cm.

VII - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN DISQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

A/ - PRINCIPE.

L'électrophorèse est réalisée dans un milieu constitué par la superposition de 3 couches de gel de polyacrylamide.

- le gel de chargement : mélangé à l'échantillon à étudier, il agit comme un milieu anti-convection pendant l'électrophorèse.

- le gel de tassement : il préconcentre l'échantillon en suivant leur seule mobilité électrique, les fractions les plus chargées étant les plus rapides.

- le gel de séparation : de porosité plus fine et de pH plus élevé que les deux premiers gels, il permet de séparer alors les fractions selon un nouvel ordre basé en partie sur la mobilité électrophorétique et sur le poids moléculaire de celles-ci.

B/ - APPAREILLAGE.

L'appareillage est constitué par un ensemble de 2 cuves du type 1200 et d'une source génératrice de courant du type 300 de CANALCO RESEARCH.

Ce modèle de cuve permet de faire 12 électrophorèses en même temps.

C/ - REACTIF*

1. Réactif A : pH 8,8 - 9,0.
 - . HCl N (Merck) 24 ml
 - . Tris 18,1 g
 - . Teemed 0,12 ml
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

2. Réactif B : pH 6,6 - 6,8.
 - . HCl N (Merck) 48 ml
 - . Tris 5,98 g
 - . Teemed 0,46 ml
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

3. Réactif C :
 - . Acrylamide (à 7 p. 100) 28 g
 - . Bis 0,735 g
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

4. Réactif D :
 - . Acrylamide 20 g
 - . Bis 5 g
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

5. Réactif E :
 - . Riboflavine 4 mg
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

6. Réactif F :
 - . sucrose 40 g
 - . Eau distillée q.s.p. 100 ml

* Tous les réactifs proviennent de CANALCO RESEARCH.

7. Réactif G :

- . persulfate d'ammonium 0,14 g
- . eau distillée q.s.p. 100 ml

8. Réactif H : tampon d'électrode, pH 8,2 - 8,4.

- . Tris 3 g
- . Glycine 14,4 g
- . Eau distillée q.s.p. 1000 ml

9. Réactif I : colorant

- . Noir amide 1 g
- . Acide acétique à 7 % 200 ml

10. Réactif J : traceur

- . bleu de bromophénol à 0,05 %.

D/ - CONSTITUTION DES GELS.

Les proportions sont données pour la constitution de 12 tubes.

1. Gel de séparation.

Il est de 7 % de réticulation et à un pH de 8,8 - 9,0.

- 1 volume de A
- 1 volume de C
- 1 volume de G

La polymérisation s'effectue à température ambiante pendant une trentaine de minutes.

2. Gel de tassement.

Il est de 5 % de réticulation et de pH plus acide : 6,6 - 6,8.

- 1 volume de B 0,5 ml
- 1 volume de D 0,5 ml
- 1 volume de E 0,5 ml
- 1 volume d'eau distillée 0,5 ml
- 4 volume de F 2 ml

Il est déposé sur le gel précédent puis polymérisé par une source lumineuse pendant 30 minutes.

3. Gel de chargement.

- 1 volume de B
- 1 volume de D
- 1 volume de E
- y volume d'échantillon
- x volume de F

Soit au total 8 volumes dans lesquels $x + y = 5$ volumes, le volume maximum de ce gel pour chaque tube d'électrophorèse étant de 0,2 ml.

Le gel est déposé sur le précédent puis polymérisé par une source lumineuse pendant un temps plus ou moins important (30 minutes environ) variable avec la concentration en protéines de l'échantillon déposé.

VIII - GRADIENT DE SUCROSE 5-20 %.

1. Préparation du gradient.

Nous préparons 2 solutions de sucrose FLUKA "puriss", l'une à 5 %, l'autre à 20 %. Elles sont déposées dans un appareil à gradient constitué de deux chambres rigoureusement identiques, reliées entre elles par un canal fermé par un robinet.

La solution à 20 % est déposée dans la chambre extérieure. Le robinet est ouvert de façon à remplir le canal. Puis nous déposons la solution à 5 % dans la chambre intérieure, le robinet ayant été préalablement fermé. Les volumes des solutions de sucrose V_1 et V_2 sont tels que si d_1 et d_2 sont les densités des solutions, la relation $V_1 d_1 = V_2 d_2$ soit vérifiée.

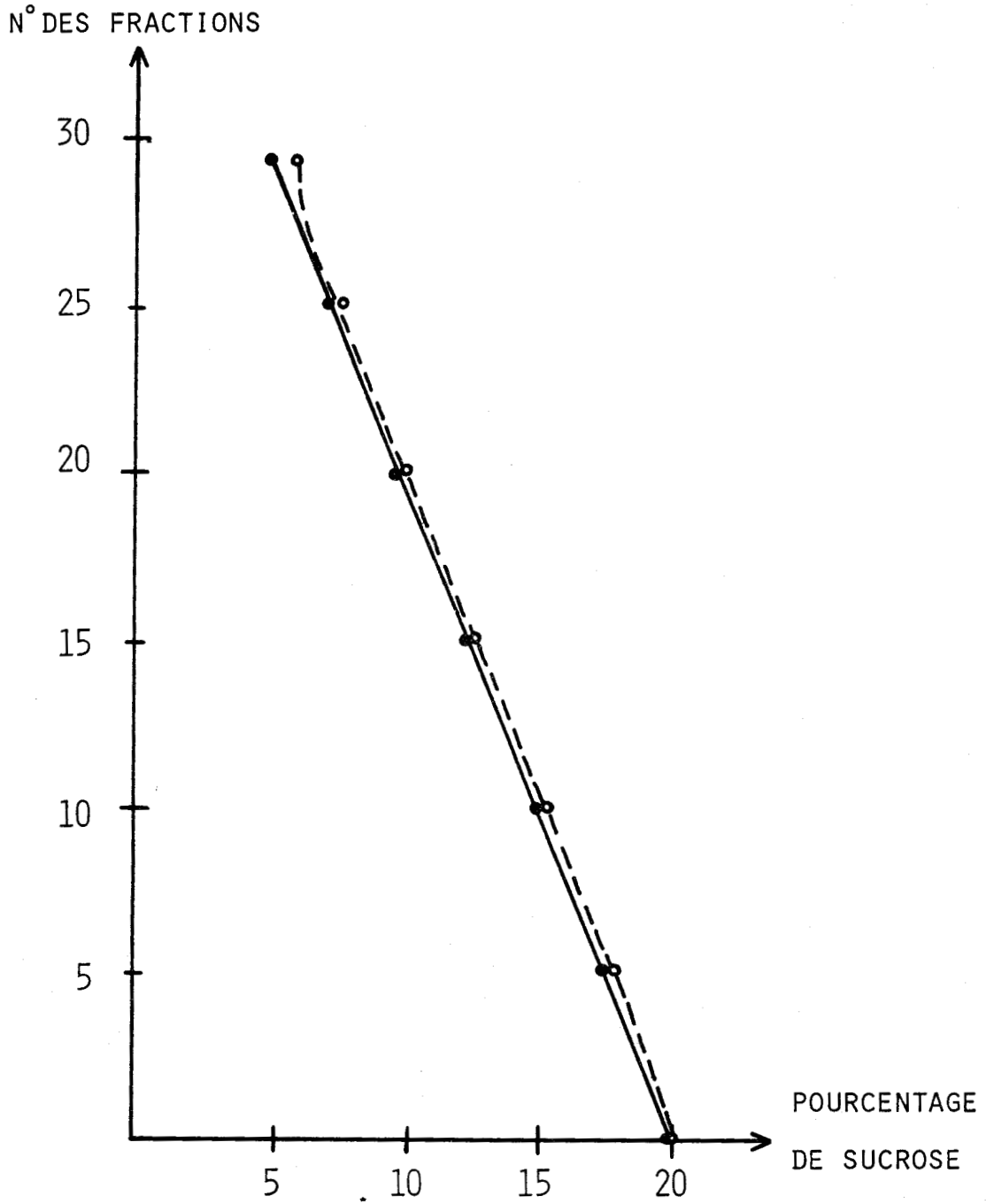


FIGURE 45 : CONTROLE DE LINEARITE DU GRADIENT DE SUCROSE 5-20 p. 100.

—●—●— Courbe théorique
—○—○— Courbe expérimentale



Une agitation douce est maintenue dans la chambre de mélange contenant la solution à 20 %. Le canal de sortie de cette chambre est raccordé au moyen d'un tube de polyéthylène PE 60 Technicon à une pompe péristaltique dont le débit est réglé à 36 ml/heure. Le gradient est ensuite laissé quelques heures au repos. Toutes les opérations sont effectuées en chambre froide à + 4° C.

2. Fractionnement du gradient.

Après centrifugation, chaque tube est fractionné au moyen d'une aiguille creuse portée par un support à crémaillère et reliée à une pompe péristaltique par un tube de polyéthylène PE 60. Cette aiguille est enfoncée doucement jusqu'au fond du tube. La pompe reliée à un collecteur de fractions, est alors mise en route.

Le débit est de 0,35 ml/minute. Les fractions ont un volume de 0,35 ml.

3. Contrôle de linéarité.

Une partie de chaque fraction est mise sur le prisme d'un réfractomètre d'ABBE qui nous donne directement, grâce à une échelle saccharimétrique, le pourcentage de saccharose des fractions.

En reportant en abscisse les numéros de fractions et en ordonnée le pourcentage de sucrose, nous pouvons ainsi vérifier la linéarité du gradient, le pourcentage de saccharose diminuant du fond vers la surface du tube (Figure 45).

BIBLIOGRAPHIE

	Références	Pages
ADAMS E. & SMITH E.L - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1951), <u>191</u> , 651.	19	5
ANDREWS P. - <i>Biochem. J.</i> , (1965), <u>96</u> , 595.	101	88
APPELMANS F., WATTIAUX R. & DE DUVE C. - <i>Biochem. J.</i> , (1964), <u>90</u> , 360.	108 111	112 114
ARST H.E., MANNING R.T., MALHON DELP M.D. - <i>Am. J. Med. Sci.</i> , (Nov. 1959), 120/598.	102	88
BEHAL F.J. & LITTLE G.H. - <i>Clin. Chim. Acta</i> , (1968), <u>21</u> , 347.	48 78	7 20
BERGER J., JOHNSON M.J. & PETERSON W.H. - <i>J. Bacteriol.</i> (1938), <u>36</u> , 521.	18	5
BERGER J., & JOHNSON M.J. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1939), <u>130</u> , 641.	6 91	4 34
BERGER J., & JOHNSON M.J. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1939), <u>130</u> , 655.	17	5
BERTHILLIER G., COLOBERT L., RICHARD M. & GOT R. - <i>Biophys. Biochim. Acta</i> , (1970), <u>206</u> , 1.	109	112
BINKLEY F., ALEXANDER V., BELL F.E. & LEA C. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1957), <u>228</u> , 559.	56	10
BOHLEY P. - <i>Naturw.</i> , (1962), <u>49</u> , 326.	47	7
BRYCE G.F. & RABIN B.R. - <i>Biochem. J.</i> , (1964), <u>90</u> , 509.	55 59	10 11
BRYCE G.F. & RABIN B.R. - <i>Biochem. J.</i> (1964), <u>90</u> , 513.	71 87	15 24
BURSTONE M.S. - <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> , (1956), <u>16</u> , 1149.	32	5
CLARK & LUBS - <i>J. Bact.</i> (1947), <u>2</u> , 1.	113	147
Mc CONNEL W.B., SPENCER E.G. & TREW J.A. - <i>Cancer J. Chem.</i> , (1953), <u>31</u> , 697.	35	5
CONWAY E.J. - <i>Microdiffusion Analysis and Volumetric error</i> , Crosby Lockwood, London, 1947.	43	7

	Références	Pages
DANNEBERG A.M. & SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1955, <u>215</u> , 4.	21	5
DEKKER C.A., TAYLOR S.P. Jr. & FRUTON J.S. - J. Biol. Chem., (1949), <u>180</u> , 155.	29	5
EMMELÖT P. & VISSER A. - Biophys. Biochem. Acta, (1971), <u>241</u> , 273.	62 83 86	11 22 27
Von EULER H. & JOSEPHSON K. - Z. Physiol. Chem. (1926), <u>157</u> , 122.	3	4
FLORKIN & STÖTZ - Comprehensive Biochemistry, Enzyme Nomenclature Vol. 13, 3ème Edition - Elsevier - 1972.	37	6
FOLK J.E. & BURSTONE M.S. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1955), <u>89</u> , 473.	40	7
FRUTON J.S., IRVING G.W. Jr., BERGMANN M. - J. Biol. Chem., (1941), <u>138</u> , 249.	22	5
FRUTON J.S. - J. Biol. Chem., (1946), <u>166</u> , 721.	20 30	5 5
FRUTON J.S., SMITH V.A. & DRISCOLL P.E. - J. Biol. Chem., (1948), 173, 457.	24	5
GENTIT F. - Thèse Doct. Med. Lille (1965).	89	27
GIRARD M.L., ROUSSELET F., KOCH M. - Ann. Biol. Clin., (1963), <u>21</u> , 557.	44 88	7 27
GOMORI G. - Proc. Soc. Expl. Biol. Med., (1954), <u>87</u> , 559.	39	7
GRASSMANN W. & DYCKERHOFF H. - Z. Physiol. Chem., (1928), <u>179</u> , 41.	104	93
GRASSMANN W. & HEYDE W. - Z. Physiol. Chem., (1929), <u>183</u> , 32.	42	7
GREEN M.N., TSOU K.C., BRESSLER R. & SELIGMAN A.M. - A.B.B. (1955), <u>57</u> , 458.	41	7

	Références	Pages
HANSON H., GLABER D., KIRSCHKE H. - <i>Z. Physiol. Chem.</i> , (1965), <u>340</u> , 107.	13 38 52 53 60 65 69 73 77	5 6 9 10 11 13 14 15 19
HANSON H., GLASSER D., LUDEWIG M., MANNSFELDT H. & JOHN M. - <i>Z. Physiol. Chem.</i> , (1967), <u>348</u> , 689.	81	22
HAREL L., JACOB A., MOULE Y. - <i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , (1957), <u>39</u> , 819.	107 110	112 113
HILL R.L. & SMITH E.L. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1958) <u>231</u> , 117.	12	4
JOHNSON M.J., JOHNSON G.H. & PETERSON W.H. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1936), <u>116</u> , 515.	5	4
JOHNSON M.J. - <i>Adv. Enz.</i> , (1942), <u>2</u> , 69.	14	5
JOSEPH R.L. & SANDERS W.J. - <i>Biochem. J.</i> , (1966), <u>100</u> , 827.	49 54 61	7 10 11
LEVY M., TOURY R., ANDRE J. - <i>Biophys. Biochem. Acta</i> , (1967), <u>135</u> , 599.	106	112
LINDERSTRØM-LANG K. & SATO M. - <i>Ber.</i> (1929), <u>62</u> , 956.	16	5
LINDERSTRØM-LANG K. - <i>Z. Physiol. Chem.</i> , (1929), <u>182</u> , 151.	1	4
LINDERSTRØM-LANG K. - <i>Z. Physiol. Chem.</i> , (1930), <u>188</u> , 48.	2	4
LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1951), <u>193</u> , 265.	90 112	34 144
LUNDQUIST F., THORSTEINSSON Th., BUNS O. - <i>Biochem. J.</i> , (1955), <u>59</u> , 69.	34	5
MARKHAM R. - <i>Biochem. J.</i> , (1942), <u>36</u> , 719.	46	7
MELBYE S.W. & CARPENTER F.H. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1971), <u>246</u> , 2459.	66	13

	Références	Pages
MELIUS P., MOSELEY M.H., BROWN D.M. - <i>Biophys. Biochem. Acta</i> , (1970), <u>221</u> , 62.	64	13
OKUDA H. & FUJII S. - <i>Tokushima J. Exp. Med.</i> , (1965), <u>12</u> , 11.	45	7
PATTERSON E.K. & PODBER E. - <i>Am. N.Y. Acad. Sci.</i> , (1956), <u>63</u> , 988.	31	5
PATTERSON E.K. - <i>Fédération Proc.</i> , (1957), <u>16</u> , 231.	57	15
PATTERSON E.K. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1959), <u>234</u> , 2327.	58	15
PATTERSON E.K., HSIAO S., KEPPEL A. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1963), <u>238</u> , 3611.	67 80 85	13 21 23
PFLEIDERER G., CELLIERS P.G., STANULOVIC M., WACHSMUTH E.D., DETERMANN H., BRAUNITZER U.G. - <i>ebenda</i> (1964), <u>340</u> , 552.	84	22
ROBINSON D.S., BIRNBAUM S.M., GREENSTEIN J.P. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1953), <u>202</u> , 1.	36	5
SMITH E.L. & BERGMANN M. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1941), <u>138</u> , 789.	7 92	4 34
SMITH E.L. & BERGMANN M. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1948), <u>153</u> , 627.	8	4
SMITH E.L. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1948), <u>173</u> , 553.	26 27 28	5 5 5
SMITH E.L. - <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , (1949), <u>18</u> , 35.	15	6
SMITH E.L. - <i>Adv. Enzymol.</i> , (1951), <u>12</u> , 191.	9	4
SMITH E.L., DAVIS N.C., ADAMS E. & SPACKMAN D.H. in " <i>Mecanism of Enzyme Action</i> " (W.D. Mc Elroy & B. Glass, Ed) p. 291 - Johns Hopkins Press, Baltimore (1954).	10	4
SMITH E.L., SPACKMAN D.H. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1955), <u>212</u> , 217.	68 70 72 74 75 76 86 93 105	14 15 15 16 17 18 24 34 109

	Références	Pages
SMITH E.L. & HILL R.L. - <i>The Enzymes</i> , (1960), <u>4</u> 37.	79 100 103	21 79 91
SPACKMAN D.H., SMITH E.L., BROWN D.M. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1955), <u>212</u> , 255.	11 50 51 63 94	4 7 8 13 34
SULD H.M. & HERBUT P.A. - <i>J. Biol. Chem.</i> (1965), <u>240</u> , 2234.	95 98	53 57
TABACHNICK J. & WEISS C. - <i>A.M.A. Arch. Pathol.</i> , (1956), <u>61</u> , 76.	33	5
TALLAN H.H., JONES M.E. & FRUTON J.S. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1952), <u>194</u> , 793.	23	5
VINCENT-FIQUET O. - <i>DEA Biochimie Lille</i> (1972)	96 97 99	57 57 77
WASCHSMUTH E.D., FRITZE I., PFLEIDERER G. - <i>Biochemistry</i> (1966), <u>5</u> , 169.	82	22
WALDSCHMIDT-LEITZ E., BALLS A.K., WALDSCHMIDT- GLASER J. - <i>Ber.</i> (1929), <u>62</u> , 956.	4	4
WEISS B. - <i>J. Biol. Chem.</i> , (1953), <u>205</u> , 193	25	5

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I - HISTORIQUE.....	4
II - DISTRIBUTION DE L'ENZYME.....	5
III - CLASSIFICATION DE L'ENZYME.....	5
IV - DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	7
V - PURIFICATION DE L'ENZYME.....	7
VI - CINETIQUES ENZYMATIQUES.....	12
VII - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	12
VIII - LOCALISATION CELLULAIRE DE L'ENZYME.....	21
IX - MECANISME D'ACTION	24
<u>CHAPITRE I</u> : METHODES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE...	26
A/ - Dosage de l'ammoniaque.....	27
B/ - Dosage des protéines.....	34
C/ - Détermination des conditions optimales de dosage..	34
a. Effet de la concentration en ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ...	34
b. Effet du temps de préincubation.....	38
c. Effet du pH en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+}	38
d. Effet de la concentration en substrat.....	40
e. Effet du temps d'incubation.....	42
f. Conclusion sur l'activation de la leucine amino- peptidase par les ions Mg^{2+} et Mn^{2+}	42
<u>CHAPITRE II</u> : EXTRACTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE A PARTIR D'UN HOMOGENAT BRUT.....	46
A/ - Préparation de l'homogénat brut.....	47
B/ - Solubilisation de l'enzyme à partir d'un homogénat brut : détermination du pH optimal de solubilité..	47
<u>CHAPITRE III</u> : PURIFICATION DE L'ENZYME	51
A/ - Essais préliminaires : relargage et chromatogra- phie.....	53

	Pages
1. Relargage par le sulfate de sodium.....	53
2. Couplage du relargage avec des méthodes chromatographiques.....	53
a) Chromatographie sur DEAE-Cellulose du culot obtenu par relargage (C ₂).....	55
b) Gel filtration des fractions actives obtenues après la chromatographie d'échange d'ions.....	55
c) Résultats.....	55
3. Conclusion.....	55
B/- Méthodes de purification en présence d'ions Mg ²⁺	57
1. Chromatographie d'échange d'ions.....	57
2. Couplage DEAE-Cellulose + gel filtration sur Sephadex G 200.....	61
3. Couplage DEAE-Cellulose + gel filtration + ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.....	66
4. Couplage DEAE-Cellulose + électrophorèse préparative sur bloc de cellogel.....	68
5. Couplage DEAE-Cellulose + électrophorèse préparative + ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.	75
6. Couplage DEAE-Cellulose + ultracentrifugation en gradient de sucrose 5-20 %.....	76
7. Conclusion générale de la purification de l'enzyme..	76
<u>CHAPITRE IV - PROPRIETES PHYSIQUES</u>	78
A/ - Spécificité.....	79
1. Hydrolyse d'amides.....	79
2. Hydrolyse de di-et tripeptides.....	81
3. Hydrolyse de la L-leucyl paranitraniline et de la L-leucyl β naphtylamide.....	88
B/ - Inhibiteurs et activateurs.....	88
1. Types de composés étudiés.....	89

	Pages
2. Protocole de l'étude.....	89
3. Résultats.....	89
a) Acides aminés et autres composés voisins de la L-leucinamide.....	89
b) Action de quelques acides α cétoniques.....	91
c) Ions métalliques Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Na^{2+}	93
d) Inhibiteurs des ions métalliques.....	93
e) Blocage des groupements thiols.....	98
f) Composés divers.....	98
4. Conclusion.....	100
C/ - Cinétique enzymatique.....	100
D/ - Poids moléculaire.....	104
E/ - Influence de la température.....	104
1. Température optimale.....	104
2. Dénaturation de l'enzyme par la chaleur.....	107
F/ - pH optimal d'action.....	107
<u>CHAPITRE V</u> : MISE EN EVIDENCE DE DEUX FORMES ENZYMATIQUES....	110
A/ - Préparation de l'homogénat.....	111
B/ - Fractionnement cellulaire de l'homogénat.....	111
1. Matériel utilisé.....	111
2. Schéma du fractionnement cellulaire.....	112
3. Contrôle microscopique de chaque fraction.....	115
4. Localisation de l'enzyme.....	115
5. Mise en évidence et étude des deux formes enzymatiques de la fraction S_3	124
6. Etude de la forme enzymatique I.....	134
7. Etude de la forme II.....	136
8. Conclusion générale du chapitre	138
CONCLUSION GENERALE.....	140
APPENDICE TECHNIQUE	143
I - DOSAGE DES PROTEINES.....	144
II - COMPOSITION DU TAMPON BORATE.....	147

	Pages
III - PREPARATION DE LA DEAE-CELLULOSE.....	147
IV - PREPARATION DU GEL SEPHADEX G 200.....	148
V - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR BLOC DE CELLOGEL.....	148
VI - ELECTROPHORESE PREPARATIVE ANALYTIQUE SUR BANDES DE CELLOGEL.....	150
VII - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN DISQUE SUR GEL DE POLY- ACRYLAMIDE.....	151
VIII - GRADIENT DE SUCROSE 5-20 %.....	155
BIBLIOGRAPHIE.....	158

