50 376 1977 106 N° d'ordre 398

> 50376 1977 106

UNIVERSITE DE LILLE FACULTE DES SCIENCES

# MEMOIRE PRESENTE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

**OPTION** : **BIOCHIMIE** 

par

# Stéphane BOUQUELET





# RECHERCHES SUR LA

# SPECIFICITE DES EXOGLYCOSIDASES

1. Application à la détermination de la structure des groupements polysaccharidiques

2. Etude de 4 N-acétyl-<sup>β</sup>D-hexosaminidases isolées des graines germées de Fenugrec (*Trigonella foenum graecum*)

Présenté le 21 octobre 1977, devant la Commission d'examen :

MM.	J.	MONTREUIL	Président
	J.E.	COURTOIS	Rapporteur
	F.	PETEK	Rapporteur
	J.L.	STIRLING	Rapporteur
	D.	ROBINSON	Examinateur
Melle	G.	SPIK	Examinateur

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués ; directeur : Professeur J. MONTREUIL) ; sous la direction de G. SPIK, Maître de Conférences.

### 08.03.1977

### 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, DECUYPER DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, 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. M. MIGEON.

VERSITE DES SCIENCES

TECHNIQUES DE LILLE

#### PROFESSEURS TITULAIRES

BACCHUS Pierre Μ. Μ. **BEAUFILS Jean-Pierre** Μ. BECART Maurice BILLARD Jean Μ. **BIAYS** Pierre Μ. Μ. BONNEMAN Pierre **BONNOT Ernest** Μ. Μ. **BONTE** Antoine BOUGHON Pierre Μ. Μ. BOURIQUET Robert Μ. CELET Paul Μ. COEURE Gérard Μ. CONSTANT Eugène Μ. DEBOURSE Jean-Pierre **DELATTRE Charles** Μ. DELMAYE Michel DERCOURT Jean Μ. Μ. DURCHON Maurice Μ. Μ. FAURE Robert Μ. FOURET René Μ. GABILLARD Robert M. GONTIER Gérard Μ. **GRANELLE** Jean-Jacques **GRUSON** Laurent Μ. Μ. GUILLAUME Jean HEUBEL Joseph Μ. M. LABLACHE-COMBIER Alain M. LACOSTE Louis Μ. LANSRAUX Guy M. LAVEINE Jean-Pierre Μ. LEBRUN André LEHMANN Daniel Μ.

Astronomie Chimie Physique Physique Atomique et Moléculaire Physique du Solide Géographie Chimie Appliquée **Biologie** Végétale Géologie Appliqué Algèbre **Biologie** Végétale Géologie Générale Analyse Electronique Gestion des Entreprises Géologie Générale Chimie Physique Géologic Générale Biologie Expérimentale Mécanique Physique du Solide **Electronique** Mécanique Sciences Economiques Algèbre Microbiologie Chimie Minérale Chimie Organique Biologie Végétale Physique Atomique et Moléculaire Paléontologie Electronique Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline
Μ.	LINDER Robert
Μ.	LOMBARD Jacques
Μ.	LOUCHEUX Claude
Μ.	LUCQUIN Michel
Μ.	MAILLET Pierre
Μ.	MONTARIOL Frédéric
Μ.	MONTREUIL Jean
Μ.	PARREAU Michel
Μ.	POUZET Pierre
Μ.	PROUVOST Jean
Μ.	SALMER Georges
Μ.	SCHILTZ René
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène
Μ.	SEGUIER Guy
Μ.	TILLIEU Jacques
Μ.	TRIDOT Gabriel
Μ.	VIDAL Pierre
Μ.	VIVIER Emile
Μ.	WERTHEIMER Raymond
Μ.	ZEYTOUNIAN Radvadour

Physique Atomique et Moléculaire Biologie et Physiologie Végétales Sociologie Chimie Physique Chimie Physique Sciences Economiques Chimie Appliquée Biochimie Analyse Analyse numérique Minéralogie Electronique Physique Atomique et Moléculaire Géométrie Electrotechnique Physique Théorique Chimie Appliquée Automatique Biologie Cellulaire Physique Atomique et Moléculaire Mécanique

### PROFESSEURS SANS CHAIRE

Μ. **BELLET** Jean BKOUCHE Rudolphe Μ. Μ. BODARD Marcel **BOILLET** Pierre Μ. BOILLY Bénoni Μ. BRIDOUX Michel Μ. Μ. CAPURON Alfred Μ. **CORTOIS** Jean Mme DACHARRY Monique DEPREZ Gilbert Μ. **DEVRAINNE** Pierre Μ. Mme EVRARD Micheline GOSSELIN Gabriel Μ. Μ. GOUDMAND Pierre Μ. **GUILBAULT** Pierre **HERMAN Maurice** Μ. Mme LEHMANN Josiane LENTACKER Firmin Μ. Μ. LEROY Jean-Marie LOUAGE Francis Μ. MAIZIERES Christian Μ. Mle MARQUET Simone MIGEON Michel Μ. Μ. MONTEL Marc MONTUELLE Bernard Μ. Μ. **NICOLE** Jacques Μ. **PAQUET** Jacques Μ. RACZY Ladislas Μ. ROUSSEAU Jean-Paul SLIWA Henri Μ. WATERLOT Michel Μ.

Physique Atomique et Moléculaire Algèbre Biologie Végétale Physique Atomique et Moléculaire Biologie Animale Chimie Physique Biologie Animale Physique Nucléaire et Corpusculaire Géographie Physique Théorique Chimie Minérale Chimie Appliquée Sociologie Chimie Physique Physiologie Animale Physique Spatiale **`Analyse** Géographie Chimie Appliquée Electronique Automatique Probabilités Chimie Physique Physique du Solide **Biologie** Appliquée Chimie Appliquée Géologie Générale Electronique Physiologie Animale Chimie Organique Géologie Générale

### MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel M. ANTOINE Philippe M. BART André Mme BATTIAU Yvonne Sciences Economiques Analyse Biologie Animale Géographie

**BEGUIN Paul** Μ. **BONNELLE Jean-Pierre** Μ. Μ. **BOSCQ** Denis BREZINSKI Claude Μ. Μ. **BRUYELLE** Pierre Μ. CARREZ Christian Μ. **COQUERY** Jean-Marie CORDONNIER Vincent Μ. COUTURIER Daniel М. M. CRAMPON Norbert Μ. **CROSNIER** Yves Μ. **DEBRABANT** Pierre Μ. DEGAUQUE Pierre **DELORME** Pierre Μ. DE PARIS Jean-Claude DHAINAUT André Μ. Μ. Μ. DELAUNAY Jean-Claude Μ. DERIEUX Jean-Claude Μ. DOUKHAN Jean-Claude DUBOIS Henri Μ. Μ. DUEE Gérard Μ. DYMENT Arthur **ESCAIG** Bertrand Μ. FAKIR Sabah Μ. Μ. FLAMME Jean-Marie **FOCT** Jacques Μ. FONTAINE Hubert Μ. **FONTAINE** Jacques Μ. Μ. FOURNET Bernard GAMBLIN André Μ. Μ. **GERVAIS Michel** Μ. GOBLOT Rémi Μ. **HECTOR** Joseph Μ. **JACOB** Gérard Μ. JOURNEL Gérard Μ. **KREMBEL** Jean LAURENT Francois Μ. Mle LEGRAND Denise Mle LEGRAND Solange M. LEROY Yves LHENAFF René Μ. Μ. LOCQUENEUX Robert Μ. MACKE Bruno Μ. MAHIEU Jean-Marie M. · MESSELYN Jean Μ. MIGNOT Fulbert N'GUYEN VAN CHI Régine Μ. Μ. NOTELET Francis Μ. NUSSEMBAUM Maurice **PARSY Fernand** Μ. Μ. **PAUPARDIN Colette** Μ. PECQUE Marcel PERROT Pierre Μ. Μ. PERTUZON Emile Μ. **PETIT Francis** Μ. **PONSOLLE Louis** Μ. **POVY Lucien** Μ. RICHARD Alain Μ. **ROGALSKI Marc** Μ. ROY Jean-Claude Μ. SIMON Michel Μ. SOMME Jean

Mécanique Chimie Probabilités Analyse Numérique Géographie Informatique Psycho-Physiologie Informatique Chimie Organique Géologie Electronique Géologie Appliquée Electronique Physiologie Animale Mathématiques Biologie Animale Sciences Economiques Microbiologie Physique du Solide Physique Géologie Mécanique Physique du Solide Algèbre Technologie de Construction Génie Mécanique Physique Electronique **Biochimie** Géographie Gestion des Entreprises Algèbre Géométrie Informatique Physique Atomique et Moléculaire Biochimie Automatique Algêbre Algèbre Electronique Géographie Physique théorique Physique Physique Atomique et Moléculaire Physique Atomique et Moléculaire Analyse Numérique Géographie Electrotechnique Sciences Economiques Mécanique Biologie Physiologie Végétales Chimie Physique Chimie Appliquée Physiologie Animale Chimie Organique Chimie Physique Automatique Biologie Analyse Psycho-Physiologie Sociologie Géographie .../... Mle SPIK Geneviève STANKIEWICZ François Μ. STERBOUL François TAILLEZ Roger THERY Pierre Μ. Μ. Μ. Μ. TOP Gérard TOULOTTE Jean-Marc Μ. TREANTON Jean-René Μ. M. VANDORPE Bernard M. VILLETTE Michel WALLART Francis Μ. WERNER Georges Μ. Mme ZIN-JUSTIN Nicole

Biochimie Sciences Economiques Informatique Biologie Electronique Sciences Economiques Automatique Sociologie Chimie Minérale Mécanique Chimie Informatique Algèbre

## ABREVIATIONS UTILISEES

Α	Absorbance
pNP-G1cNAc	p-nitrophényl-N-acétyl-β-D-glucosaminide
pNP-GalNAc	p-nitrophényl-N-acétyl-β-D-galactosaminide
MUB	4-méthyl-ombelliférone
MUB-G1cNAc	4-méthy1-ombellifery1-N-acéty1-β-D-glucosaminide
MUB-GalNAc	4-méthyl-ombelliféryl-N-acétyl-β-D-galactosaminide
DEAE-cellulose	Diéthylaminoéthyl-cellulose
CM-cellulose	Carboxyméthy1-cellulose
Con-A	Concanavaline A
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
Tris	2-amino-2-hydroxyméthy1-1,3-propane-dio1

	Pages
INTRODUCTION	1
GÉNÉRALITÉS	5
I - PROBLÈMES POSÉS PAR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	6
II - PROBLÈMES POSÉS PAR L'EXISTENCE DE DIFFÉRENTES FORMES D'ENZYMES	10
TRAVAUX PERSONNELS	16
MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
I - SUBSTRATS	17
II - MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES	18
III - MESURE DES PARAMÈTRES D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	21
IV - PROCÉDÉS DE PRÉPARATION DES ENZYMES	24
RÉSULTATS	29
1 PRÉPARATIONS ET SPÉCIFICITÉ D'EXOGLYCOSIDASES	29
I - MÉTHODES DE PRÉPARATION	29
A - β-D-MANNOSIDASE D'ASPERGILLUS NIGER	29
B - N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE D'ASPERGILLUS NIGER	31
$C - \beta$ -D-GALACTOSIDASE DE LA RATE DE PORC	34
D - CONCLUSIONS	36

.

.

	Pages
II - SPÉCIFICITÉ DES EXOGLYCOSIDASES	39
A - SPECIFICITE DES N-ACETYL-8-D-HEXOSAMINIDASES	39
B - SPECIFICITE DE LA B-D-MANNOSIDASE	52
III - CONCLUSIONS	52
A - CONCLUSIONS CONCERNANT LA SPECIFICITE DES	
N-ACETYL-B-D-HEXOSAMINIDASES	52
B - APPLICATIONS DES EXOGLYCOSIDASES A LA DETERMINATION	
DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES NATURELS	55
2. – LES N-ACÉTYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES	
DES GRAINES GERMÉES DE FENUGREC	
(IRIGONELLA FOENUM GRAECUM L.)	60
I - PURIFICATION DES DIFFÉRENTES FORMES	60
A - GERMINATION	60
B - EXTRACTION DE L'ACTIVITE	61
C - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE	61
D - CHROMATOGRAPHIE SUR CONCANAVALINE A	64
E - RECHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE	64
F - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'AFFINITE	64
G - CONCLUSIONS	67
II - CINÉTIQUE DE GERMINATION	67
III - LOCALISATION DES N-ACÉTYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES	
DANS LA GRAINE	74
A CALL TO A MANAGEMENT AND A CALL	A Souther w
IV - PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES	76
A - DH OPTIMIM	76
B - STABILITE AU DH	76
C - TEMPERATURE OPTIMALE	79

		1 ugeo
	D - STABILITE A LA TEMPERATURE	79
	E - DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES	83
	F - ACTION DE LA SERUMALBUMINE	85
	G - ACTION DES CATIONS	88
	1 - Ions ferreux	88
	2 - Ions ferriques	91
	3 - Ions mercuriques	91
	H - ACTION DU SDS	101
	I - ACTION DES ANALOGUES STRUCTURAUX .	104
	J - RETRO-INHIBITION PAR LES PRODUITS LIBERES	104
	K - ACTION DES IONS ACETATES	107
	L - SPECIFICITE DES N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASES	107
	M - CONCLUSIONS	110
v - v	PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES	111
	A - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES	111
	B - MISE EN EVIDENCE DE STRUCTURES SOUS-UNITAIRES	112
	C - DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES	116
	D - ETUDE DE LA COPULE POLYSACCHARIDIQUE	119
	E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES	122
	F - PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES	124
	G - CONCLUSIONS	126
CONC		128
CONC	LUSIONS GENERALLS	
APPE	ENDICE TECHNIQUE	т
•••		
I -	DOSAGE DES MONOSACCHARIDES LIBÉRÉS APRÈS	
	HYDROLYSE ENZYMATIQUE	T <sub>3</sub>
	A - DOSAGE DU GALACTOSE	Ta
	B - DOSAGE DES N-ACETYLOSAMINES	T <sub>3</sub>

	Pages
II - DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES	т <sub>6</sub>
III - DOSAGE DES PROTÉINES	т <sub>6</sub>
IV - DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE	T <sub>7</sub>
A - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION	T <sub>7</sub>
B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	T <sub>8</sub>
V - DÉTERMINATION DES POINTS ISOÉLECTRIQUES	т <sub>8</sub>
VI - MÉTHODE DE SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE	т <sub>9</sub>
A - ELECTROPHORESE EN ACETATE DE CELLULOSE	Tq
B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	T <sub>10</sub>
VII - RÉVÉLATION DES ELECTROPHORÈSES	т <sub>10</sub>
A - METHODES NON SPECIFIQUES	T <sub>10</sub>
B - REVELATION DE L'ACTIVITE GLYCOSIDASIQUE	т <sub>11</sub>
VIII - IMMUNO-DIFFUSION	т <sub>12</sub>
IX - MÉTHODES DE PRÉPARATION DE CERTAINES	
EXOGLYCOSIDASES	<sup>T</sup> 12
A - N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE ISOLEE A PARTIR DE	
MICROORGANISME : ASPERGILLUS NIGER	T <sub>12</sub>
B - N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE DE FEVE JACK	т <sub>13</sub>
C - β-D-GALACTOSIDASE DE FEVE JACK	T <sub>20</sub>
D - N-ACETYL-B-D-HEXOSAMINIDASE DE LA RATE DE BOEUF	T <sub>22</sub>

BIBLIOGRAPHIE

.

### INTRODUCTION

Notre travail s'inscrit dans le cadre général des recherches effectuées au Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 (Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) sur la structure des glycoprotéines. Au moment où nous l'avons entrepris, il n'existait, en effet, que très peu de glycosidases actives sur des groupements glycanniques complexes, comme celui de la sérotransferrine humaine (Fig. 1) qui représentait à l'époque l'essentiel des activités du groupe des "Structuralistes" de notre laboratoire. L'examen de la structure de ce glycanne montre que le problème était de taille puisque rien n'était connu des types d'anomérie des liaisons glycosidiques dans les glycoconjugués et, il était, a priori, nécessaire de posséder des préparations de toutes les enzymes capables de libérer chacun des monosaccharides conjugués, c'est à dire : les  $\alpha$  et  $\beta$ -D- neuraminidases, -galactosidases, -N-acétyl-glucosaminidases, -mannosidases et,dans certains cas, $\alpha$  et  $\beta$ -L-fucosidases. En outre, les glycosidases réalisant des dégradations récurrentes, leur emploi s'avérait très précieux dans l'exploration de la structure primaire des glycannes.

Cet aspect de la question, lié à l'étude des structures glucidiques, a fait l'objet de la première série de nos travaux qui ont consisté à rechercher systématiquement des activités glycosidasiques intéressantes dans de nombreux milieux biologiques, à fournir au laboratoire la panoplie complète de ces enzymes, de définir leur spécificité et à participer ainsi à la détermination de la structure de nombreux oligosaccharides. Les résultats que nous avons obtenus ont été rapportés dans notre D.E.A. et dans notre thèse de 3e Cycle et ont fait l'objet des publications 1 à 10 de la liste ci-dessous.

Dans le présent mémoire de thèse de Doctorat ès Sciences, nous nous sommes limité à résumer cette première phase de nos travaux qui se trouvent, en partie, décrite dans le mémoire de thèse de 3e Cycle. Au contraire, dans ce même mémoire, nous exposerons en détail les résultats des travaux que nous avons effectués, dans une seconde phase de nos recherches, à propos d'une enzyme particulière : la N-acétyl-β-Dhexosaminidase que nous avions isolée du Fenugrec (*Trigonella foenum graecum L. Lé*gumineuse) et qui s'était révélée comme un modèle intéressant de glycosidases du point de vue de sa spécificité d'action, de l'exploration du site N-acétyl-hexosaminidasique et de son hétérogénéité isozymique.

NANA  $\frac{\alpha-2,6}{\alpha-1,4}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,2}{\beta-1,4}$  Man  $\alpha-1,3$ B-1,2 Man  $\alpha-1,6$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  Asn

## Figure 1

Structure primaire du glycanne de la sérotransferrine humaine (G. SPIK, B. BAYARD, B. FOURNET, G. STRECKER, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL) (108)



2

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette dernière étude ont fait l'objet des publications 11 à 12 de la liste ci-dessous.

#### PUBLICATIONS RELATIVES A NOS TRAVAUX

## - Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie. LILLE 1969

Résultats préliminaires sur l'isolement de quelques glycosidases. Application à un hexaose isolé du lait de Femme.

- Thèse de 3e Cycle (mention Biochimie). LILLE 1972

Etude comparée des propriétés et de la spécificité d'action de cinq β-D-N-acétyl-hexosaminidases de diverses origines (Rate et Foie de boeuf, Fève Jack, graines de Fenugrec et Aspergillus Niger).

### MEMOIRES

- 1 L. GRIMMONPREZ, S. BOUQUELET, G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL Détermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de Femme, le dilactaminyl-lacto-N-tetraose, Eur. J. Biochem., 1970, <u>13</u>, 484-492
- 2 B. BAYARD, B. FOURNET, S. BOUQUELET, G. STRECKER, G. SPIK et J. MONTREUIL -Etude sur les glycoprotéines. XLIX. Isolement et structure des oligosaccharides de la fraction neutre des acétolysats de glycopeptides de l'ovomucoïde, <u>Carbohyd.</u> Res., 1972, 24, 445-456
- 3 G. STRECKER, C. TRENTESAUX-CHAUVET, T. RIAZI-FARZAD, B. FOURNET, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL - Mise en évidence d'une oligosaccharidosurie associée à diverses mélituries et détermination de la structure des oligosaccharides excrétés. Hypothèse concernant l'origine des oligosaccharides des liquides biologiques, <u>C.R.</u> Acad. Sci. Paris, 1973, 277D, 1569-1572
- 4 G. SPIK, B. FOURNET, B. BAYARD, R. VANDERSYPPE, G. STRECKER, S. BOUQUELET,
  P. CHARET et J. MONTREUIL Structure des groupements glycanniques de la séro- et de la lactotransferrine, <u>Arch. Intern. Physiol. Biochem.</u>, 1974, <u>82</u>, 791
- 5 G. SPIK, R. VANDERSYPPE, B. FOURNET, B. BAYARD, P. CHARET, S. BOUQUELET,
  G. STRECKER et J. MONTREUIL Structure of glycopeptides isolated from human serotransferrin and lactotransferrin, Actes du Colloque International du C.N.R.S.
  n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, <u>C.N.R.S. éd.</u>, Paris, 1974, tome I, 483-499

- 3 -

- 6 G. STRECKER, B. FOURNET, T. RIAZI-FARZAD, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL -Structure and blood group activity of oligosaccharides isolated from normal and pathological urines. Evidence for an oligosacchariduria associated with melituria, Actes du Colloque International du C.N.R.S. n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd., Paris, 1974, tome II, 663-676
- 7 G. SPIK, B. BAYARD, B. FOURNET, G. STRECKER, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL -Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin, FEBS-Letters, 1975, 50, 296-299
- 8 L. GRIMMONPREZ, M. DELAUTRE, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL Détermination de la structure d'un heptasaccharide isolé du lait de Femme : le lacto-N-fucoheptaose, FEBS-Letters, 1975, 54, 221-223
- 9 G. STRECKER, B. FOURNET, S. BOUQUELET, J. MONTREUIL, J.L. DHONDT et J.P. FARRIAUX -Etude chimique des mannosides urinaires excrétés au cours de la mannosidose, <u>Biochimie</u>, 1976, <u>58</u>, 579-586
- 10 G. STRECKER, T. RIAZI-FARZAD, B. FOURNET, S. BOUQUELET et J. MONTREUIL Structure et propriétés immunochimiques des oligosaccharides urinaires excrétés au cours de galactosurie provoquée, <u>Biochimie</u>, 1976, <u>58</u>, 815-825
- 11 S. BOUQUELET et G. SPIK Properties of a novel N-acétyl-hexosaminidase isolated from germinated seeds of Fenugreek (*Trigonella foenum graecum L.*), Actes du Colloque International du C.N.R.S. n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, <u>C.N.R.S. éd.</u>, Paris, 1974, tome I, 315-327
- 12 S. BOUQUELET and G. SPIK Characterization and localization of four forms of N-acety1-β-D-hexosaminidase from Fenugreek (Trigonella foenum graecum) germinated seeds, FEBS-Letters, 1976, 63, 95-101

- 4 -

## GÉNÉRALITÉS

La digestion enzymatique des glycoconjugués est la meilleure technique qui puisse être appliquée non seulement pour l'isolement et l'étude de la liaison glycanne-protide mais aussi pour l'étude de la structure de la copule polysaccharidique : détermination de l'anomérie des liaisons et de l'enchaînement des différents monosaccharides entre eux par dégradation récurrente. Enfin, cette technique permet de préparer des accepteurs exogènes relativement propres nécessaires à l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines.

- 5 -

Les enzymes utilisées pour ce travail sont des glycosidases et plus particulièrement les "exo-glycosidases". Elles sont capables d'hydrolyser les monosaccharides situés en position terminale non réductrice.

L'utilisation de ces glycosidases est généralement restreinte, et ceci pour des raisons bien précises, il suffit d'établir un parallèle entre glycosidases et protéases.

Les protéases possèdent une spécificité large, sont commercialisées depuis longtemps et leur coût est relativement faible. Les glycosidases, par contre, ne sont pratiquement pas commercialisées, ne possèdent pas de spécificité large et sont d'un coût relativement élevé.

Pour situer un peu le problème des glycosidases, il suffit de voir comment a évolué la situation depuis 10 ans. A cette époque, il n'existait pas d'enzymes commercialisées, les méthodes de purification n'étaient pas aussi sophistiquées que maintenant ce qui se traduisait par des préparations très largement contaminées par d'autres activités glycosidasiques. On pouvait ainsi lire dans une thèse soutenue au laboratoire en 1964 (1)

- "... Cette méthode de dégradation met en oeuvre des osidases spécifiques. Elle a reçu peu d'applications en raison des imperfections des méthodes d'hydrolyse dues, en particulier, au défaut de préparations d'enzymes purs ou purifiés ...".

En 1973, en conclusion du colloque international sur la méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués, R.W. JEANLOZ (60) disait :

- "... The sequential degradation of the carbohydrate chains of glycosonjugates by glycosidases has been the subject of numerous studies in recent years, but biochemists are still looking for enzymes with wide specificity, easy to purify, as well as for good commercial sources ...". En 1975, SHARON (104) précisait :

- "... The best way to obtain purified glycosidases is still to prepare them in the laboratory ...".

L'introduction de la chromatographie d'affinité depuis 1970 par CUATRECASAS (31) a permis d'effectuer de grands progrès dans les méthodes de purification. Il reste cependant de nombreux problèmes à résoudre et nous ne passerons en revue que deux de ces problèmes :

1 - Le problème de l'hydrolyse enzymatique.

2 - L'existence de différentes formes moléculaires d'enzymes.

6 -

# I - PROBLÈMES POSÉS PAR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

La structure du glycanne de la sérotransferrine humaine (Fig. 1, page 2) laissait supposer que l'utilisation des glycosidases, dans ce cas bien précis, est aisée. Or, comme dans tous les cas où les osidases sont utilisées, on ne peut jamais préjuger des résultats que l'on obtiendra, car, l'hydrolyse enzymatique est tributaire de nombreux facteurs que nous passerons en revue ici. Le premier de ces facteurs est évidemment la "pureté enzymatique" des préparations de glycosidases.

A - PURETE DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES.

Ce n'est qu'à partir de 1970, avec l'avénement de la chromatographie d'affinité (31) que des préparations enzymatiques très pures ont été obtenues. Les facteurs de purifications sont de l'ordre de 10.000 à 20.000. Jusqu'à cette date, on n'employait que des solutions plus ou moins purifiées, nous ne citerons qu'un seul exemple : WATANABE (132) en 1936 purifiait, 24 fois, une N-acétyl-β-D-glucosaminidase de foie ; en 1970, en partant de la même source enzymatique, cette enzyme est purifiée 3.000 fois (101). L'utilisation de ces préparations enzymatiques, enrichies de l'étude de la structure des polysaccharides, a entraîné des erreurs d'interprétation. Ces erreurs étant dues à l'activité d'enzymes contaminantes. C'est ainsi que, jusqu'à une date très récente, on admettait que tous les mannoses des glycannes des glycoprotéines se trouvaient enchaînés par des liaisons de type a-glycosidiques, on pensait que le faible pourcentage d'hydrolyse obtenu dans certains cas par l'utilisation des α-D-mannosidases était dû, soit à des spécificités de liaisons, soit à des facteurs conformationnels (présence de fucose, en particulier). Il a fallu attendre les travaux de SUKENO et al. (117) pour que l'on prenne en considération l'existence d'une liaison B-D-glycosidique du mannose. Ce type de liaison était postulé depuis 1969 par WAGH et al. (130). Après ces travaux, des activités ß-D-mannosidasiques contaminantes ont été caractérisées dans les préparations d' $\alpha$ -D-mannosidases utilisées.

La caractérisation de liaisons  $\alpha$ -D-galactosidasiques dans le prothrombine bovine par NELSESTUEN et SUTTIE (87) amène à revérifier les puretés enzymatiques des  $\beta$ -D-galactosidases. Le taux des liaisons  $\alpha$ -D-galactosidasiques étant généralement faible, une légère contamination en  $\alpha$ -D-galactosidase est suffisante pour hydrolyser ces liaisons tout en laissant supposer qu'elles sont de type  $\beta$ -glycosidique.

La caractérisation par BANNISTER et PHIZACKERLEY (11) dans les extraits de la patelle (patella vulgata) d'une enzyme l' $\alpha$ ,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, rend nécessaire de connaître parfaitement le contenu de la solution enzymatique utilisée. Cet inventaire se faisant toujours par l'intermédiaire d'hétérosides de synthèse, il est indispensable, à ce sujet, de se souvenir que toutes les enzymes ne sont pas obligatoirement actives sur ces composés (fucosidases, en particulier). Dans ce cas, des activités enzymatiques peuvent se révéler lors de l'hydrolyse de substrats naturels.

Quand on obtiendra, lors d'une hydrolyse enzymatique, des résultats positifs, il faudra toujours suspecter la possibilité d'une contamination par d'autres glycosidases, la solution "<u>biologiquement pure</u>" étant encore du domaine de l'utopie. Par contre, si aucun résultat n'est obtenu, il faudra envisager diverses hypothèses : existence de forme furanique, mauvais rapport enzyme-substrat mais surtout il faut envisager la spécificité des glycosidases. C'est une des propriétés fondamentales qui les différencie des protéases.

## B - SPECIFICITE DUE A L'ORIGINE DE L'ENZYME.

WEISSMANN *et al.* (133) montrent que la N-acétylglucosamine est libérée du trisaccharide suivant :

GlcNAc $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) GlcUA $\beta$ (1  $\rightarrow$  3) GlcNAc

par la N-acétyl-β-D-glucosaminidase du foie de Boeuf, mais ils n'obtiennent pas de libération en employant les enzymes isolées de Diplococcus pneumoniae, de l'émulsine d'amande ou d'Aspergillus Niger.

MURAMATSU et EGAMI (85) signalent que la vitesse d'hydrolyse par la  $\beta$ -D-galactosidase d'Escherichia Coli de quatre  $\beta$ -galactosyl-glucose suit l'ordre suivant l + 6 > l + 4 > l + 3 > l + 2, l'ordre est inversé avec la  $\beta$ -D-galactosidase isolée de l'intestin du Veau : l + 2 > l + 3 > l + 4 > l + 6.

- 7 -

L'a-D-galactosidase de Mortierella Vinacea (119) est incapable d'agir sur des gangliosides bien qu'elle hydrolyse ce type de liaison dans le cas d'autres composés. D'une façon générale, ce sont les osidases du cerveau qui sont plus particulièrement actives sur les gangliosides.

DRZENIEK (39) a montré que la neuraminidase de Vibrio cholerae peut hydrolyser les liaisons  $2 \rightarrow 3$  et  $2 \rightarrow 6$  sialyl, tandis que les neuraminidases de myxovirus hydrolysent plus difficilement les liaisons  $2 \rightarrow 6$ .

DRZENIEK et GAUHE (40) ont montré que la neuraminidase du N.D.V. coupe la liaison  $2 \rightarrow 8$  d'un disialyllactose, alors que celle du F.P.V. ne l'hydrolyse que très lentement.

### C - SPECIFICITE LIEE AU TYPE DE LA LIAISON.

Toutes les liaisons ne sont pas hydrolysées à la même vitesse par les enzymes. Des enzymes à spécificité stricte ont été caractérisées, il s'agit, par exemple, des  $\alpha$ -L-fucosidases de Clostridium perfringens (4) ou d'Aspergillus Niger (9) qui ne réagissent qu'en présence de liaison  $\alpha$ -1,2 fucosyle. La  $\beta$ -D-galactosidase de la fève Jack (5) n'hydrolyse la liaison  $\beta$ 1  $\Rightarrow$  3 du galactose que très lentement. Nous avons remarqué la même chose avec la  $\beta$ -D-galactosidase des graines germées de Fenugrec. Il s'agirait ici d'une spécificité d'origine plutôt que d'une spécificité vis-à-vis du type de la liaison.

L' $\alpha$ -D-galactosidase de Mortierella Vinacea (119) hydrolyse les liaisons  $\alpha 1 \rightarrow 4$  et  $1 \rightarrow 6$  elle est sans action sur les liaisons  $\alpha 1 \rightarrow 2$  et  $\alpha 1 \rightarrow 3$ .

VIKHA et al. (129) ont montré que la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase de l'épididyme de Porc possédait une affinité décroissante vis-à-vis des liaisons suivantes 1 + 6 > 1 + 3 > 1 > 4.

La neuraminidase de Vibrio cholerae hydrolyse la liaison  $\alpha 2 \rightarrow 6$  sialyle moins vite que la liaison  $\alpha 2 \rightarrow 3$  (DRZENIEK) (39).

D - SPECIFICITE LIEE AU SUBSTRAT.

On évoquera, d'une part, la taille et la nature du substrat et, d'autre part, l'environnement de la molécule à hydrolyser.

La  $\beta$ -D-galactosidase du cerveau de Lapin (61) qui hydrolyse les substrats synthétiques est incapable d'agir sur les gangliosides. WIEDERSCHAIN et ROSENFELD (137) ont montré qu'une  $\alpha$ -L-fucosidase de rein de Porc était capable d'hydrolyser le fucose des fragments de substances de groupe sanguin A + H, cette enzyme

- 8 -

ne possède aucune action sur la substance à l'état natif.

L' $\alpha$ -D-mannosidase de Antherobacter GJM-1 mise en présence de la mannane de saccharomyces cerevisiae laisse un core contenant des liaisons  $\alpha 1 \rightarrow 6$ , bien que l'enzyme hydrolyse des oligosaccharides comportant ce type de liaison.

En plus de la taille du substrat, l'environnement spatial est important pour l'hydrolyse enzymatique. La nature du monosaccharide sur lequel est fixé le monosaccharide à hydrolyser est important.

L'a-L-fucosidase d'Aspergillus Niger (9) hydrolyse le disaccharide Fuc  $\frac{\alpha-1,2}{2}$  Gal mais est incapable d'hydrolyser le Fuc  $\frac{\alpha-1,2}{2}$  Fuc.

La proximité d'un fucose fixé sur la N-acétylglucosamine, sur laquelle est fixé un galactose, empêche l'action de la galactosidase (56) : c'est le cas des lacto-N-fucopentaose II et III.

Le 3-N-acétylneuraminyllactose (fig. 2a) est quantitativement hydrolysé par les neuraminidases, le 3-N-acétylneuraminyl-4-N-acétylgalactosaminyllactose (fig. 2b) résiste à leur action.

а

Ъ

ANAN  $\alpha^{-2,3}$  Gal  $\beta^{-1,4}$  Glc

ANAN  $\frac{\alpha-2,3}{\beta}$  Gal GalNAc

#### Figure 2

#### E - SPECIFICITE LIEE AUX DIFFERENTES FORMES.

Différentes formes d'une même enzyme peuvent exister à l'intérieur d'un même organisme vivant, voire même à l'intérieur d'un même organe. Dans le rein de Porc (138) on a caractérisé deux α-L-fucosidases, l'une de ces formes libère 36 p. 100 du fucose du lacto-N-fucopentaose III, l'autre forme est incapable d'hydrolyser ce pentasaccharide.

TARENTINO et MALEY (122) ont montré que les N-acétyl-hexosaminidases de l'oviducte de Poule possédaient des affinités différentes vis-à-vis d'un tri-Nacétyl-chitotriose. Les différentes galactosidases (8) des cellules de la bordure en brosse de l'intestin possèdent des actions différentes sur les substrats synthétiques et naturels.

- 9 --

Comme nous venons de le voir, l'hydrolyse enzymatique sera tributaire de nombreux facteurs. Les résultats fragmentaires obtenus sur la spécificité des glycosidases font que l'on ne pourra toujours juger qu'a posteriori du résultat des exoglycosidases.

# II - PROBLÈMES POSÉS PAR L'EXISTENCE DE DIFFÉRENTES FORMES D'ENZYMES

A une seule activité enzymatique, il n'existe pas dans la nature, une seule enzyme mais plusieurs entités qui possèdent globalement cette même activité. Il s'agit donc de savoir et de définir s'il s'agit en fait de composés possédant exactement la même activité ou des activités voisines ou différentes pour des compositions moléculaires identiques ou non.

Depuis qu'il a été énoncé par MARVERT et MOLLER (75), en 1959, le concept d'isozyme s'est singulièrement développé. A l'origine, ce terme englobait des protéides différents issus d'une même origine et possédant des activités enzymatiques identiques.

Ce terme est maintenant remplacé par celui d'isoenzyme (IUB), il définit les formes enzymatiques multiples en provenance d'une origine unique. Cette définition ne peut pas toujours être appliquée aux différentes enzymes. En 1962, WIELAND et PFLEIDERER (139) essayent de différencier isoenzymes et hétéroenzymes. Des hétéroenzymes sont, par exemple, l'a-amylase de Bacillus subtilis et celle du pancréas de Porc. Ce sont des enzymes qui possèdent la même activité mais proviennent d'origine différente. Cependant, on peut aussi caractériser, dans un même tissu, des formes enzymatiques qui possèdent la même activité primaire (elles peuvent agir toutes, par exemple, sur la liaison  $\beta$ -contractée par la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine) mais des affinités différentes vis-à-vis des substrats, analogues de substrat, inhibiteurs ou cofacteurs. Il faudrait dans ce cas préférer au terme isoenzyme la dénomination "homoisoenzyme".

Comme nous le constatons ici, il est très difficile de préciser exactement ce que sont les différentes formes moléculaires d'une même activité enzymatique.

Pour notre compte personnel, nous considérerons les <u>isoenzymes</u> comme des enzymes isodynames issues d'une même origine mais possédant des modifications de leur structure primaire (variation dans la séquence d'acides aminés, dans l'assemblage des différentes sous-unités constitutives) et les <u>hétéroenzymes</u> comme des enzymes isodynames d'origine différente. Les enzymes présentant, à la fois, une modification de la structure primaire et des propriétés enzymatiques différentes (enzymes hétérodynames) qu'elles soient issues d'un même organisme ou d'espèce différente sont appelées : <u>enzymes différentes</u>. La complexité de formes enzymatiques est commune dans la nature. Nous nous attacherons plus particulièrement aux N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases (2 acétamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucoside acétamido-désoxyglucohydrolase EC. 3.2.1.30). Ces enzymes sont importantes car leur absence peuvent entraîner des maladies (Tay-Sach's, Sandhoff). Bien que le nombre de rapports scientifiques traitant des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (EC. 3.2.1.52) soit élevé, il existe encore de nombreux problèmes à résoudre et parmi ceux-ci :

- Existe-t-il des enzymes différentes ou des isoenzymes ?

- Peut-on passer d'une forme à une autre forme ?
- Les spécificités sont-elles identiques ou différentes ?

Nous avons, dans les pages suivantes, rassemblé les connaissances les plus récentes sur les N-acétyl-β-D-hexosaminidases (terme général qui englobe les hexosaminidases capablent d'hydrolyser, à la fois, les N-acétyl-β-D-glucosaminides et N-acétyl-β-D-galactosaminides).

# A - MISE EN EVIDENCE ET REPARTITION DES DIFFERENTES FORMES DE N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES.

La mise en évidence des différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (EC. 3.2.1.52) a été faite, pour la première fois, par CAYGILL *et al.* (27). Ces auteurs ont caractérisé deux composés actifs dans la rate humaine : une forme A possédant, en électrophorèse, un comportement acide, une forme B ayant un comportement basique. Ces travaux ont été confirmés, par la suite, par ROBINSON et STIRLING (97). C'est devenu depuis 1968 une véritable inflation, voire quelques fois, une véritable surenchère. STIRLING (113) caractérise une troisième forme, intermédiaire aux formes A et B dans le serum de femme enceinte : c'est la forme P. PRICE et DANCE (92) caractérisent dans le sérum normal, en plus des formes A et B, deux autres formes I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub>. Pour ces auteurs, la forme I<sub>2</sub> serait identique à la forme P (1'existence de forme foetale est donc remise en question). HAYASE et KRITCHEVSKI (57) caractérisent dans les extraits d'aorte humaine 3 formes A, B et P, qui se subdivisent en respectivement 5, 4 et 4 entités qu'ils définissent comme étant les isoenzymes des différentes formes.

Nous avons rassemblés, dans le tableau I , page 12, différentes sources de N-acétyl-β-D-hexosaminidases présentant des formes différentes. Cette liste n'est pas limitative, on peut cependant remarquer l'absence de N-acétyl-β-D-hexosaminidases d'origine végétale et de microorganismes (Cependant DEY et PRIDHAM (35) ont

- 11 -

# Répartition des différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases

Sources	Nombre de formes	Références
Oviducte de Poule	2 formes I et II	TARENTINO et MALEY (122)
Cellules nerveuses du cortex cérébral de Rat	2 formes H et L	SELLINGER, SANTIAGO, SANDS et FURINSLOAT (102)
Rein de Porc	2 formes A et B	WETMORE et VERPOORTE (136)
Testicules de Bélier	3 formes I, II, III	BULLOCK et WINCHESTER (24)
Epididyme de Bélier	4 formes IV, V, VI, VII	
Epididyme de Taureau	Plusieurs formes (17)	HAYASE et al. (58)
Rate de Boeuf	2 formes A et B	VERPOORTE (126)
Sérum humain		
Normal Femme enceinte Mucolipidose II	4 formes A, $I_1$ , $I_2$ , B 3 formes A, P, B 2 formes A, $I_2$	PRICE ET DANCE (92) STIRLING (113) LIE et al. (70)
Urine humaine		
Homme Femme	3 formes A, M, B 2 formes A, B	GREBNER et TUCKER (53)
Fibroblastes humains		
Normaux Mucolipidose II	2 formes A, B 3 formes A, I <sub>2</sub> , B	LIE et al. (70)
Leucocytes humains	2 formes A et B	FRIEDLAND et al. (48)
Placenta humain	2 formes A et B	SRIVASTAVA et al. (110)
Aorte humaine	3 formes A, "P", B	HAYASE et KRITCHEVSKY (57)
Rate humaine	2 formes A et B	ROBINSON et STIRLING (97)
Rein humain	2 formes A et B	DANCE et al. (32)
Foie humain	2 formes A et B	SANDHOFF et WASSLE (101)
Cerveau humain foetal et adulte	3 formes A, B et C	BRAIDMAN et al. (21)

12 -

démontré l'existence de deux formes de galactosidases dans les graines de Vicia faba.). Le nombre moyen de formes semble donc se situer à 2 : certainement les deux formes majeures qui peuvent exister dans chaque tissu. Si le problème des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases ne se situait qu'au niveau de la diversité des formes, il serait, en fait, mineur. La caractérisation de maladies liées plus ou moins directement à l'activité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases et, en particulier, aux différentes formes A et B a relancé l'intérêt porté aux hexosaminidases. Nous savons que le taux de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase augmente dans le sérum de femme enceinte. STIRLING (113) pense que cette augmentation est due à l'apparition de la forme P qui serait ainsi le reflet d'un certain métabolisme. HAYASE et KRITCHEVSKY (57) pensent que la forme P n'est pas spécifique de la grossesse, ils remarquent, dans des cas de cancer ou d'hyperlipidémie, que le taux de N-acétylhexosaminidase augmente par apparition de formes enzymatiques ayant un comportement analogue à celui de la forme P.

L'intérêt le plus grand porté aux N-acétyl-β-D-hexosaminidases l'est dans le cadre de certaines maladies héréditaires telle que maladie de Tay-Sachs ou maladie de Sandhoff. Ces maladies comme de nombreuses maladies enzymatiques lysosomales sont caractérisées par une détérioration mentale et motrice progressive.

Dans les cerveaux de malades atteints de la maladie de Tay-Sachs (variant B), le taux d'hexosaminidase est fortement diminué. Le taux de la forme B reste inchangé par contre la forme A est complètement absente. Dans le cas de la maladie de Sandhoff (variant 0), on constate l'absence des deux formes A et B de Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. On peut noter, toutefois, qu'il n'y a pas d'accumulation de glycosaminoglycanes renfermant des liaisons N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminides. Dans les deux cas de maladies cités ici, il n'y a qu'une accumulation de ganglioside GM<sub>2</sub> et de globoside. Il y aurait seulement une incapacité à couper les liaisons N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasiques des gangliosides due à l'absence ou à l'inactivation ou à la non activation de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase A. Un cas de gangliosidose a été caractérisé, accumulation de ganglioside GM<sub>2</sub>, bien que le taux des N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases A et B soit égal ou supérieur au taux normal. Les hexosaminidases auraient perdu la faculté d'hydrolyser les substrats naturels.

#### B - PROPRIETES DES DIFFERENTES FORMES DE N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASES

Les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases forment un groupe relativement homogène d'enzymes. La masse moléculaire moyenne est de l'ordre de 140.000. Il est admis que ces enzymes sont formés de sous-unités (les masses moléculaires varient de 17.000 à 33.000). Les propriétés enzymatiques sont similaires et dans de nombreux cas, les

- 13 -

résultats étant trop fragmentaires, on ne peut pas savoir s'il s'agit de formes enzymatiques différentes ou de véritables isoenzymes. Le problème majeur qui reste posé est celui de l'interconversion des formes A en B. Pour certains auteurs, il est possible de passer de la forme A à la forme B par un simple chauffage à 50°C. Ces résultats ont été obtenus par TALLMAN *et al.* (121) 100 p. 100 de conversion avec seulement 10 p. 100 de perte d'activité.

SRIVASTAVA et al. (110) obtiennent un résultat similaire. En maintenant pendant 18 heures à 37°C la forme A, il y a formation de 5 p. 100 de forme B.

Pour d'autres auteurs, la stabilité à la température des différentes formes de N-acétyl-hexosaminidases est identique et il n'y a pas moyen de transformer une des formes en une autre forme plus stable.

La nature glycoprotéinique des hexosaminidases, et l'existence d'acide sialique plus précisément, a permis à certains auteurs d'imaginer la possibilité d'interconversion des formes. On sait que les formes A et B diffèrent par leur migration électrophorétique. WETMORE et VERPOORTE (136) démontrent que la forme A possède deux fois plus d'acide sialique que la forme B.

ROBINSON et STIRLING (97) pensent qu'il serait possible, après action de la neuraminidase, de passer de la forme A à la forme B. SRIVASTAVA et al. (110) démontrent qu'il est impossible de transformer A en B par cette méthode.

Depuis la mise en évidence par CARMODY et RATTAZI (25) que c'était le merthiolate, présent dans les solutions de neuraminidase, qui était le facteur de l'interconversion de la forme A en B, il faut être prudent dans les conclusions que l'on peut émettre. Depuis,LEE et YOSHIDA (66) ont démontré que les hexosaminidases A et B du placenta humain ne possédaient pas d'acides sialiques ...

Comme nous pouvons le voir, les problèmes posés par les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases sont loin d'être résolus. Il suffit seulement de passer en revue quelques hypothèses émises pour l'identification des différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases.

1 - L'hexosaminidase A est la forme sialylée de l'hexosaminidase B (MURPHY et CRAIG (86), ROBINSON et STIRLING (97)).

2 - L'hexosaminidase A est identique à l'hexosaminidase B (TALLMAN et al. (121)).

3 - L'hexosaminidase A est différente de l'hexosaminidase B (GILBERT et al. (51)).

- 14 -

4 - Les hexosaminidases A et B possèdent des sous-unités identiques (ROBINSON et CARROLL (98), SRIVASTAVA et al. (111), BEUTLER et al. (18)).

5 - Les hexosaminidases A et B sont des hexamères (SRIVASTAVA et al. (110)).

6 - Les hexosaminidases A et B sont des tétramères (BEUTLER et al. (18)).

Les résultats qui sont obtenus par hybridation interspécifique sont toujours confus et il n'est pas possible de choisir définitivement l'une des différentes hypothèses.

C - CONCLUSIONS.

Comme nous pouvons nous en rendre compte, il est malaisé de choisir l'une ou l'autre des hypothèses émises quant aux N-acétyl-β-D-hexosaminidases. Ce fut, en particulier, l'une des raisons qui nous poussa à étudier plus particulièrement les hexosaminidases.

Nous nous sommes attaché à étudier leur spécificité et nous avons essayé, au travers des N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines de fenugrec, d'apporter notre contribution à l'étude des N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases.

# TRAVAUX PERSONNELS

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le fenugrec (Trigonella foenum graecum L.) est une plante couramment cultivée dans le bassin méditerranéen, au Moyen Orient et en Inde. Dans ces régions, le fenugrec est consommé de différentes façons. En Egypte, les graines sont broyées avec le blé et entrent aussi dans la composition du pain, elles sont infusées et constituent un breuvage qui se consomme chaud dans certains pays de l'Arabie. La partie végétative est consommée comme légume en Inde. Mais, finalement, le mode principal d'utilisation reste l'introduction des graines moulues dans des mélanges d'épices, en particulier, le Curry. A côté de ces utilisations naturelles, les graines de fenugrec sont encore utilisées, dans la pharmacopée occidentale, dans le traitement de l'amaigrissement. Un certain nombre d'études sont entreprises maintenant pour étudier la valeur nutritive de ce fenugrec qui renferme une teneur moyenne de 27 p. 100 de protéines riches en lysine et en tryptophane.

### I - LES SUBSTRATS

### A - SUBSTRATS SYNTHETIQUES.

Les : p-nitrophényl- $\alpha$  et  $\beta$ -D-galactopyranoside, p-nitrophényl- $\alpha$  et  $\beta$ -D mannopyranoside, p-nitrophényl-N-acétyl- $\alpha$  et  $\beta$ -D-glucosaminide, p-nitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide, Naphtol-AS-BI-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide et galactosaminide, 4-méthylombelliferyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide et galactosaminide sont des produits KOCH-Light.

#### **B** - SUBSTRATS NATURELS

### 1 - Oligosaccharides

Les oligosaccharides utilisés pour déterminer les spécificités enzymatiques proviennent de glycopeptides et, en particulier, d'oligosaccharides isolés d'acétolysat d'ovomucoïde selon le procédé de BAYARD *et al.* (13) ou d'urines de patients présentant des déficits en diverses glycosidases lysosomiales.

- 1) GlcNAc  $\frac{\beta-1.4}{2}$  GlcNAc (acétolysat de chitine)
- 2) GlcNAc  $\stackrel{\beta-1.4}{\longrightarrow}$  GlcNAc  $\stackrel{\beta-1}{\longrightarrow}$  Methylombelliferyl (synthèse chimique)
- 3) GlcNAc  $\frac{\beta-1.4}{2}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1.4}{2}$  GlcNAc (acétolysat de chitine)
- 4) GlcNAc  $\stackrel{\beta-1.4}{\longrightarrow}$  Man (acétolysat d'ovomucoide)

- 17 -

- 5) Man α-1.3 Man (acétolysat d'ovomucoĭde)
  β-1.4 GlcNAc
  6) Man α-1.3 Man (acétolysat d'ovomucoĭde)
  β-1.4 β-1.4 β-1.4 GlcNAc
  7) GlcNAc β-1.2 Man (acétolysat d'ovomucoĭde)
  8) GlcNAc β-1.2 Man α-1.3 Man (acétolysat d'ovomucoĭde)
  9) GlcNAc β-1.3 Gal β-1.4 Glc (oligosaccharide du lait de Femme)
  10) GlcNAc β-1.4 GlcNAc (synthèse chimique)
  11) Man β-1.4 GlcNAc (synthèse chimique)
  12) Man β-1.6 GlcNAc (synthèse chimique)
- 13) Man  $\frac{\beta-1.3}{2}$  GlcNAc (synthèse chimique)

### 2 - Les glycopeptides

Les glycoprotéines natives n'ont jamais été utilisées comme substrat pour l'action des glycosidases. Nous avons toujours utilisé des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique des glycoprotéines.

Ces glycopeptides proviennent : de la <u>sérotransferrine humaine</u> : glycoprotéine qui se trouve dans le sang à la concentration de 2 g p. litre environ. Cette transferrine constitue le véhicule du fer à travers tout l'organisme ; de la <u>lactotransferrine humaine</u> : glycoprotéine isolée du lait de Femme à raison de l à 1,5 g p. litre. Elle apporte au nourrisson le fer dont celui-ci a besoin ; de l'<u>ovo-</u> mucoïde : glycoprotéine trouvée dans le blanc d'oeuf de Poule.

Toutes ces glycoprotéines sont préparées au Laboratoire.

## II - MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

L'activité enzymatique est mise en évidence de deux façons différentes : soit par dosage du monosaccharide libéré, soit par le dosage de l'aglycône dans le cas d'un hétéroside de synthèse.

### A - MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE A L'AIDE D'HETEROSIDE DE SYNTHESE.

Pour mettre en évidence une activité enzymatique, les méthyl-osides, les phényl-osides, les p-nitrophényl-osides ou les méthylombelliferyl-osides peuvent être utilisés.

Cependant, les méthodes qui utilisent les méthyl-osides manquent de sensibilité. Par contre, les méthodes qui utilisent les p-nitrophényl-osides et les méthylombelliferyl-osides sont très sensibles (0,1 µg pour les p-nitrophényl-osides et de l'ordre du nanogramme pour les méthylombelliferyl-osides).

### 1 - Principe du dosage

Les p-nitrophényl-osides ou méthylombelliféryl-osides, après action des glycosidases correspondantes, sont hydrolysés en monosaccharide d'une part, en p-nitrophényl ou 4-méthylombelliférone d'autre part. En milieu alcalin, le p-nitrophényl libéré devient jaune et la 4-méthylombelliférone devient fluorescente.

La quantité de ces composés peut donc être déterminée soit par spectrométrie, soit par spectrofluorimétrie.

### 2 - Réactifs

a - Solution aqueuse d'<u>hétéroside de synthèse</u> : la concentration est de l'ordre de 5 mM pour tous les p-nitrophényl-glycosides excepté le p-nitrophényl-N-acétyl-β-Dgalactosaminide qui est 2 mM. La concentration varie entre 0,1 et 0,5 mM pour les 4méthylombelliféryl-glycosides

b - Solution tampon de Mc ILVAINE (79)

c - Solution de carbonate de sodium molaire

3 - Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse on introduit de 25 µl à 100 µl de la solution enzymatique à étudier puis de 200 à 250 µl de la solution tampon de Mc ILVAINE dont le pH est équivalent au pH optimal de l'enzyme. Après agitation, on ajoute 100 µl de la solution d'hétéroside de synthèse. Le mélange est porté à 37°C pendant des temps variant de 5 à 60 minutes.

La réaction est arrêtée par addition de 500 µl de carbonate de sodium molaire. Le p-nitrophénol libéré développe une coloration jaune qui est mesurée à 400 nm après 15 minutes de stabilisation à température ambiante et à l'obscurité dans un spectrophotomètre Zeiss PMQII, cuves MT4. La fluorescence de la 4-méthylombelliférone est déterminée dans un spectrofluorimètre Farrand MK1, longueur d'onde d'excitation 360 nm, longueur d'onde d'émission 450 nm. Dans les deux cas, la concentration du p-nitrophénol ou de la 4-méthylombelliférone est déterminée par rapport à une gamme étalon.

#### B - MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR LE DOSAGE DES MONOSACCHARIDES LIBERES.

#### 1 - Dosage du pouvoir réducteur

Nous avons, dans un premier temps, utilisé la méthode de PARK et JOHNSON (90). A cette méthode, nous préférons la méthode au ferricyanure décrite par MONTREUIL (82) et MONTREUIL et SCHEPPLER (83).

# 2 - Dosage des oligosaccharides libérés par chromatographie de phase gazeuse

Les oligosaccharides libérés après hydrolyse enzymatique sont chromatographiés sur résines échangeuses de cations : Dowex 50 x 8 (forme  $H^+$ ) et d'anions Duolite A 102 D (forme acétate). Les éluats sont ensuite lyophilisés en présence de mésoinositol (témoin de chromatographie). La quantité d'oligosaccharide utilisée lors de l'hydrolyse enzymatique est de l'ordre de 0,5 µmole. Le lyophilisat est soumis à une triméthylsilylation.

#### a - Triméthylsilylation des oligosaccharides

Les hydrolysats d'oligosaccharides sont séchés en excicateur sous P205 pendant une nuit puis repris par 100 µl de pyridine redistillée auxquels on ajoute 200 µl de réactif de silylation (ce réactif est composé par 1 ml de pyridine, 0,8 ml d'hexaméthyldisilazane et 0,4 ml de triméthylchlorosilane). Le mélange est agité pendant 15 minutes, séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 500 µl d'heptane. La suspension est centrifugée pendant 1 minute. Le surnageant est prélevé puis évaporé sous courant d'azote.

#### b - Analyse en chromatographie de phase gazeuse

Le résidu sec est repris par 50  $\mu$ l d'heptane. L'injection de 0,5 à 2  $\mu$ l est effectuée sur une colonne de verre (0,3 x 180 cm) de silicone QF<sub>1</sub> à 3 p. 100 sur chromosorb WHMDS 100-120 mesh. La température est programmée de 120 à 240° C à raison de 2°C min. Le débit du gaz vecteur (N<sub>2</sub>) est de 20 ml/min. La température de 1'injecteur est de 250°C.

### 3 - Dosage spécifique des monosaccharides

Les acides N-acétylneuraminiques libérés par l'action de la neuraminidase sont dosés par la méthode d'AMINOFF ( 3 ).

- 20 -

Le galactose libéré par les galactosidases est dosé par la méthode à la galactose-deshydrogénase de FINCH et al. (44) (cf. appendice technique, page  $T_3$  ).

Les N-acétylhexosamines libérées après action des hexosaminidases sont dosées par la méthode de GOOD et BESSMAN (52) (cf. appendice technique, page T<sub>3</sub> à T<sub>6</sub>).

# III - DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

#### A - HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

100 à 200 µg d'oligosaccharide (0,25 à 0,5 µmole) sont dissous dans 200 µl de la solution tampon dont le pH correspond au pH optimal de l'enzyme. La solution enzymatique est ensuite ajoutée : 100 à 200 µl (5 à 10 mU). Le mélange est porté à 37°C pendant des temps variables : 1 heure à 24 heures. Dans le cas de cinétique enzymatique, les hydrolysats sont arrêtés par un chauffage de 3 minutes à 70°C avant d'être congelés à -20°C.

### B - DETERMINATION DU pH OPTIMUM.

La détermination du pH optimum s'effectue à l'aide des hétérosides de synthèse. Le mode opératoire est le suivant : les solutions enzymatiques sont préincubées dans des solutions tampons (généralement tampon de Mc ILVAINE) de pH différent pendant 15 à 30 minutes à 37°C. On ajoute ensuite l'hétéroside de synthèse et le mélange est replacé à 37°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par addition de carbonate de sodium. Il n'y a pratiquement pas de variation du pH optimum quand on opère avec des oligosaccharides à la place de l'hétéroside de synthèse (variation de 0,1 à 0,2 unité de pH).

C - STABILITE AU pH.

Les solutions enzymatiques sont soumises à l'action de tampon de pH différent. Ces solutions sont maintenues pendant des temps variables à 37°C. On mesure l'activité enzymatique résiduelle après avoir ramené la solution enzymatique à son pH optimal et effectué une hydrolyse dans les conditions standards. Le 100 p. 100 d'activité est donné par une solution enzymatique préincubée pendant 30 minutes au pH optimum d'activité de l'enzyme.

On trace généralement le logarithme décimal du pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation.

- 21 -

#### D - DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE

Quand on détermine la température optimale d'une enzyme, tous les réactifs sont stabilisés séparément à la température choisie. L'activité enzymatique est ensuite mesurée en fonction de la température et les courbes : de la vitesse initiale en fonction du degré de température sont ensuite déterminées.

Lorsqu'on opère en présence d'hétéroside de synthèse du type p-nitrophénylé on aura soin de veiller à ce que l'hétéroside ne s'hydrolyse pas sous la simple action de la température et du pH du milieu.

L'énergie d'activation peut être déterminée lors de la même expérience (les expériences sont effectuées entre 20°C et 55°C). L'énergie d'activation peut être déterminée graphiquement ou par le calcul. Dans ce dernier cas, on applique la formule

$$E_{a} = \frac{4,56 \times T_{1}T_{2} (\log v_{2} - \log v_{1})}{T_{2} - T_{1}}$$

où  $v_2$  et  $v_1$  représentent respectivement les vitesses de réaction aux températures absolues  $T_2$  et  $T_1$ . E<sub>a</sub> représente l'énergie d'activation en calorie par mole.

E - STABILITE A LA TEMPERATURE.

Les solutions enzymatiques sont maintenues pendant des temps variables dans une solution tampon de pH optimal à des températures variables (35°C à 50°C). On arrête l'action du chauffage en plongeant les solution enzymatiques dans un bain de glace. Une fois que la solution est refroidie, l'hydrolyse enzymatique est effectuée selon les conditions standards.

On trace le log du pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps de chauffage.

### F - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS (Km) ET DE LA VITESSE MAXIMALE.

Lorsque les déterminations sont effectuées à l'aide d'hétérosides de synthèse, le temps d'hydrolyse ne sera jamais supérieur à 10 minutes. Le Km et la vitesse maximale sont déterminées graphiquement par la méthode des doubles inverses de LINEWEAVER et BURK (72). Dans le cas de cinétique à deux substrats, comme c'est le cas pour les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases pour caractériser l'existence d'un seul site de catalyse nous avons employé une solution renfermant du N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide et du N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide dans un rapport égal à 1,03. Lorsque les deux activités sont portées par des protéines différentes, les vitesses maximales doivent être égales à la somme des vitesses maximales de chaque activité prise séparément. Dans le cas où un seul site est responsable des deux activités : les deux substrats se comporteront comme des inhibiteurs l'un vis-à-vis de l'autre. La vitesse maximale que l'on mesurera, sera inférieure à la somme des vitesses de chacune des activités prise séparément.

On pourra appliquer dans le premier cas :

 $V_{max} + B = V_{max} + V_{max} B$ 

dans le deuxième cas (DIXON) (38)

$$\frac{\mathrm{Km}_{A}}{\alpha\mathrm{Km}_{B}} = \frac{\mathrm{Vmax}_{A} - \mathrm{Vmax}_{A + B}}{\mathrm{Vmax}_{A + B} - \mathrm{Vmax}_{B}}$$

où Vmax<sub>A + B</sub>, Vmax<sub>A</sub>, Vmax<sub>B</sub> représentent respectivement la vitesse maximale en présence des deux substrats et en présence de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide et N-acétyl- $\beta$ -Dgalactosaminide. Km<sub>A</sub>, Km<sub>B</sub> représentent le Km en présence de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide et de N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide.  $\alpha$  est le rapport N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide sur N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide. On peut, à l'aide de cette formule, prévoir la vitesse maximale que l'on doit expérimentalement obtenir.

G - DETERMINATION DES CONSTANTES D'INHIBITION.

L'inhibiteur est préincubé 15 minutes à 37°C en présence de la solution enzymatique, l'hétéroside de synthèse est ajouté par la suite. La réaction est effectuée selon les conditions standards.

Le type de l'inhibition et la constante d'inhibition sont déterminés par la méthode graphique de DIXON (37).

H - ACTION D'EFFECTEURS DIVERS.

L'effecteur est préincubé à 37°C pendant 30 minutes puis l'hydrolyse enzymatique est effectuée dans les conditions standards. L'activité est toujours exprimée en pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité d'une solution enzymatique non traitée.

Lorsqu'on utilise des cations bivalents, la réaction est arrêtée par du carbonate de sodium molaire renfermant de l'EDTA sel disodique à une concentration finale de 20 mM. Cette solution remplace la solution tampon glycocolle-soude généralement utilisée par les auteurs. Le carbonate seul ne peut être employé car il y a formation de carbonates insolubles.

Dans le cas précis de l'étude de la réversibilité de l'inhibiteur de l'activité enzymatique par la cystéine après action des ions Hg<sup>2+</sup>, le protocole est le suivant : La solution enzymatique est traitée par le chlorure mercurique de manière à obtenir une activité résiduelle de l'ordre de 10 à 20 p. 100 par rapport à une solution enzymatique non traitée. Les solutions sont ensuite préincubées à 37°C pendant 30 minutes avec des solutions de cystéine de concentration croissante. L'activité enzymatique est exprimée en p. 100 d'activité résiduelle récupérée.

### IV - PROCÉDÉS DE FRACTIONNEMENT DES ENZYMES

### A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE.

La DEAE-cellulose type DE 22 est activée selon le protocole préconisé par la firme WHATMAN. Elle est ensuite stabilisée pendant 24 h dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,7 avant d'être introduite dans des colonnes (2,5 x 50 cm). Les colonnes sont équilibrées pendant deux jours avec le même tampon.

Après injection de la solution enzymatique, la colonne est lavée par 1,5 à 2 1 du tampon d'équilibration. Les différentes activités enzymatiques sont ensuite éluées grâce à un gradient discontinu de force ionique (la concentration en phosphate de sodium varie de 10 mM à 160 mM pH 6,7) puis par un tampon phosphate de sodium 200 mM pH 5,6 renfermant du NaCl 0,2 M en concentration finale. La vitesse d'élution est généralement de l'ordre de 30 à 40 ml/h, les fractions recueillies sont de 10 ml. L'élution est suivie par absorption des protéines à 280 nm. Les activités enzymatiques sont mesurées en sortie de colonne toutes les deux fractions. Les diagrammes d'élution seront pratiquement toujours exprimés en activité spécifique.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CM-cellulose.

Les chromatographies sont effectuées sur des colonnes (2 x 16,5 cm) de CM-cellulose (CM 32 Whatman). Après activation, l'échangeur de cations est équilibré dans une solution tamponnée de phosphate disodique 0,015 M et d'acide citrique 0,007 M de pH 4,2. Les élutions sont réalisées à l'aide d'un gradient discontinu de force ionique et de pH.

La vitesse d'élution est de 17 ml/h, les fractions sont de 5,6 ml. C - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.

Trois types de colonne de chromatographie d'affinité ont été réalisés

1 - Colonne de Sépharose 4B-Concanavaline A.

La concanavaline A est une lectine isolée de Canavalia eusiformis, elle est capable de reconnaître des enchaînements renfermant du glucose ou du mannose. Cette propriété peut être mise à profit pour isoler des enzymes de nature glycoprotéinique présentes parmi un mélange de protéines.

## 2 - Colonne de Sépharose 4B-Σ-aminocaproyl-N-acétyl-β-D-glucosaminylamine.

La N-acétyl-β-D-glucosaminylamine est un analogue de substrat pour les hexosaminidases, la liaison contractée par la N-acétylglucosamine et l'aglycone est, ici, de type N-glycosidique. L'enzyme reconnaît le substrat sans pouvoir toutefois l'hydrolyser, il y a formation d'un complexe E-S improductif. Selon l'affinité de l'enzyme, cette dernière sera retenue ou simplement retardée sur une colonne renfermant de la N-acétylglucosaminylamine. La chromatographie d'affinité n'est, dans notre cas, efficace que dans la mesure où l'on intercale un bras entre la matrice et le ligand.

# 3 - <u>Colonne de Sépharose 4B-Σ-aminocaproyl-N-acétyl-β-D-galactosyla-</u> mine.

Le principe est identique à celui exposé précédemment. L'utilisation de cette colonne permet d'éliminer l'activité galactosidasique contaminante des solutions de β-D-mannosidase.

#### 1) Préparation de colonnes de chromatographie d'affinité

a - Réactifs

- Solution de bromure de cyanogène à 1 g par ml dans l'acétonitrile. Cette solution est à conserver à -20°C à l'abri de l'humidité.

- Solution de carbonate de potassium 2 M.

- Solution de bicarbonate de sodium 0,5 M.

- Solution de bicarbonate de sodium 0,1 M.

- Solution de glycocolle M.

b - Mode opératoire

### α - Activation du Sépharose

100 ml de sépharose sont lavés par 1 à 2 litres d'eau préalablement refroidie à 4°C. Le sépharose est ensuite transféré dans un récipient contenant 100 ml de carbonate de potassium 2 M. Le mélange est agité et maintenu dans un bain de glace pilée. Quand la température est suffisamment basse : 4-6°C, on ajoute la solution de bromure de cyanogène à raison de 250 mg de bromure de cyanogène par ml
de sépharose à activer. L'agitation est maintenue pendant exactement 2 minutes (la température du mélange doit toujours être inférieure à 10°C). La suspension est versée sur verre fritté puis lavée par 1 litre d'eau glacée, le lavage, pour éliminer toutes traces de bromure de cyanogène, peut être poursuivi par passage de plusieurs litres d'eau froide (4°C).

## β - Couplage du ligand micromoléculaire.

Une quantité donnée de ligands<sup>\*</sup> l' $\Sigma$ -aminocaproyl-N-acétyl- $\beta$ -Dglucosaminylamine et l' $\Sigma$ -aminocaproyl- $\beta$ -D-galactosylamine est dissoute dans la solution de bicarbonate de sodium 0,5 M pour obtenir une concentration finale du ligand de 2  $\mu$ M par ml de sépharose à coupler. Le ligand et le sépharose sont mélangés et l'agitation est poursuivie pendant 24 h à 4°C. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté puis lavée par 1 l d'une solution froide de bicarbonate de sodium 0,1 M. Le sépharose est ensuite repris par 400 ml d'une solution de glycocolle M et agité pendant 2 à 3 heures à température ambiante (cette opération a pour but de bloquer les groupements fonctionnels résiduels du sépharose).

Après une nouvelle filtration et un lavage à l'eau, le sépharose est alors équilibré dans le tampon de chromatographie.

γ - Couplage de ligand macromoléculaire.

La concanavaline A (2 g) est solubilisée dans 20 ml d'une solution de tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 renfermant du MgCl<sub>2</sub>, du MnCl<sub>2</sub> et du CaCl<sub>2</sub> à une concentration finale de  $10^{-3}$  M et de l' $\alpha$ -D-méthylglucopyranoside à une concentration finale de 0,1 M. Ces conditions permettent de respecter la forme tétramère de la concanavaline et de bloquer par le substrat ( $\alpha$ -D-méthylglucopyranoside) les sites actifs de la concanavaline. La concanavaline ainsi obtenue est fixée sur le sépharose 4B activé en ajoutant à la solution précédente 20 ml de bicarbonate de sodium 0,2 M. Le couplage est réalisé dans les mêmes conditions que celui des ligands micromoléculaires.

Le lavage du sépharose, après couplage, est effectué par une solution de NaCl 2 M (1 à 2 1) puis par une solution d'acide acétique 0,05 N (1 1) et enfin par un lavage à l'eau. Le sépharose couplé est ensuite équilibré dans le tampon de chromatographie.

<sup>\*</sup>Les ligands nous ont été fournis par N. SHARON, WEIZMANN INSTITUTE, REHOVOT, ISRAEL, que nous remercions vivement.

- 26 -

# 2) Chromatographie sur colonne de Sepharose 4B-Concanavaline A

Les colonnes de sépharose 4B-concanavaline (2,5 x 30 cm) sont équilibrées dans une solution tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 renfermant du chlorure de calcium, du chlorure de manganèse et du chlorure de magnésium, chacun de ces cations est à une concentration finale de  $10^{-3}$  M et du NaCl molaire. Lorsque la solution enzymatique est injectée sur la colonne, cette dernière est lavée par le tampon d'équilibration, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéines éluées (ou de glycoprotéines ne renfermant ni mannose, ni glucose).

Les glycoprotéines retenues sur la colonne de concanavaline A sont désorbées par passage d'une solution tampon Tris-HCl, 0,05 M pH 7,6 ; NaCl M, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> et MnCl<sub>2</sub>  $10^{-3}$  M renfermant en concentration finale de l'α-D-méthylglucopyranoside 0,1 M. Les fractions enzymatiques sont concentrées puis dialysées contre de l'eau distillée pendant 3 jours.

La colonne est régénérée par passage du tampon d'équilibration (3 à 4 jours). L'absence d'a-D-méthylglucopyranoside est analysée par la méthode au phénolsulfurique de DUBOIS et al. (41). La chromatographie est réalisée à température ambiante 15-20°C (les solutions tampon renferment de l'azide à une concentration de 2 p. 10.000).

La colonne est éluée à la vitesse de 18 m1/heure, des fractions de 9 ml sont collectées. Les activités enzymatiques sont effectuées tous les deux tubes. L'élution est suivie par l'absorption des protéines à 280 nm.

# Chromatographie sur colonne de sépharose 4B-Σ-aminocaproyl-N-acétyl-β-Dglucosaminylamine

La chromatographie est réalisée à la température ambiante. La colonne (2,5 x 35 cm) est équilibrée dans une solution tampon de phosphate de sodium 10 mM pH 6,15. La solution enzymatique, dialysée contre de l'eau distillée, est amenée à pH 6,15 puis injectée sur la colonne. La colonne est lavée par le tampon d'équilibration puis la fraction enzymatique est éluée par passage d'une solution tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,8.

La colonne est éluée à la vitesse de 24 ml/h, les fractions collectées sont de 8 ml. Les fractions enzymatiques obtenues sont dialysées et concentrées sur membrane filtrante UH 100 (Schleicher et Schüll).

#### 4) Chromatographie sur colonne de sépharose 4B-galactosylamine

Nous utilisons cette colonne pour éliminer les activités α-D-galactosidasiques contaminantes. La colonne de sépharose 4B-galactosylamine (2,5 x 20 cm)

- 27 -

est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,15, après injection de la solution enzymatique, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration. La chromatographie est ensuite poursuivie par un lavage d'une solution tampon de phosphate de sodium 200 mM pH 6,15. La colonne est régénérée par un lavage à l'aide de la solution tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,15.

La colonne est éluée à la vitesse de 15 ml/h, les fractions de 3 ml sont recueillies. Les fractions enzymatiques sont concentrées, dialysées et parfois lyophilisées.

# RÉSULTATS

# 1. - PRÉPARATIONS ET SPÉCIFICITÉ D'EXOGLYCOSIDASES

Nous limiterons l'exposé de nos résultats aux glycosidases suivantes :

- β-D-mannosidase d'Aspergillus niger
- N-acéty1-β-D-hexosaminidase d'Aspergillus niger
- β-D-galactosidase de la rate de Porc

Bien qu'elles ne représentent qu'une partie de la "collection" d'enzymes nécessaires pour aborder l'étude de la structure des glycannes (voir Fig. 1, p. 2) à savoir : neuraminidases,  $\beta$ -D-galactosidase, N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase,  $\alpha$ -D- et  $\beta$ -D-mannosidases. En effet, plusieurs d'entre elles ne posent aucun problème particulier car elles sont commercialisées ou faciles à préparer et elles sont actives vis-à-vis des liaisons glycosidiques concernées : il s'agit des neuraminidases de Vibrio Cholerae et de Clostridium perfringens ; des  $\alpha$ -D-mannosidases qui se préparent aisément par les procédés de LI (67), COURTOIS et PERCHERON modifié par BEAUGIRAUD et al. (15) ; des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases préparées selon le protocole expérimental de LI et LI (68), BAHL et AGRAWAL (10) et WERRIES et al. (135). Ces différents procédés sont décrits dans l'appendice technique (voir p. T<sub>3</sub>).

## I - MÉTHODES DE PRÉPARATION

### A - β-D-MANNOSIDASE D'ASPERGILLUS NIGER

Nous avons adapté la méthode de MATTA et BAHL (76) à nos besoins. La souche d'Aspergillus niger est différente de celle utilisée par les auteurs. La purification de la  $\beta$ -D-mannosidase est effectuée par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE-cellulose et sur colonne d'affinité. Les résultats obtenus sont illustrés par le tableau II, page 30.

1 - Précipitation par le sulfate d'ammonium.

100 ml de moût de fermentation d'un mutant d'Aspergillus niger sont soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium, à 80 p. 100 de saturation. Le précipité est repris par de l'eau distillée, dialysé contre de l'eau pendant 3 jours à 4°C et enfin concentré sur membrane Amicon XM50. La solution enzymatique concentrée est chromatographiée sur colonne de DEAE cellulose.

- 29 -

TABLEAU II

Etapes de purification de la 8-D-mannosidase

Facteur de purification		30 72,8 1642,8 22428
Récupération		100 105 84 55 45,6
Activité spécifique <sub>n</sub> Kat/mg	+	$\begin{array}{cccc} 1,4 & 10 \\ 4,40 & 10 \\ 1,02 & 10 \\ 2,23 \\ 3,14 \\ 3,14 \end{array}$
Activité totale , Kat	-	117 123 98,6 64,4 53,46
Protéine	8 m	837.480 27.916 9.660 280 17
tramemori, transferre	Etape de liaccionneme	Moût de fermentation Concentration sur XM 50 Sulfate d'ammonium Chromatographie sur DEAE-cellulose Chromatographie d'affinité



- 30 -

#### 2 - Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

- 31 -

La DEAE cellulose est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,7. La colonne (2,5 x 50 cm) est éluée à la vitesse de 45 ml/heure, on recueille des fractions de 15 ml. Après injection de la solution enzymatique concentrée et lavage de la colonne par le tampon d'équilibration, la  $\beta$ -D-mannosidase est éluée par un tampon phosphate de sodium 21 mM pH 6,7 (Fig. 3 p. 32). Elle renferme environ 5 p. 100 d'activité  $\alpha$ -D-galactosidasique.

#### 3 - Chromatographie sur colonne d'affinité.

La solution enzymatique recueillie après DEAE-cellulose est dialysée contre de l'eau puis lyophilisée. La poudre obtenue est dissoute dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,15 puis injectée sur une colonne de sépharose  $4B-\Sigma$ aminocaproyl- $\beta$ -D-galactosylamine (2,5 x 20 cm). Nous arrivons, de cette façon, à retenir sur la colonne d'affinité l' $\alpha$ -D-galactosidase contaminante. La  $\beta$ -D-mannosidase est éluée à l'aide du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,15 (Fig. 4 p. 33). L' $\alpha$ -D-galactosidase est éluée par le tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,15.

#### 4 - Conclusions.

La β-D-mannosidase isolée d'une souche d'Aspergillus niger a été purifiée 21.000 fois par rapport au moût de fermentation initial. C'est une enzyme qu'il était nécessaire de préparer au laboratoire car toutes les préparations décrites jusqu'à présent n'agissaient que très lentement sur les substrats qu'ils soient synthétiques ou naturels. La préparation enzymatique, que nous avons, agit beaucoup plus rapidement que les autres. Le rapport est de 1 à 10. Le facteur de purification élevé nous a permis, en outre, d'étudier les propriétés de cette enzyme. Les résultats obtenus font l'objet d'un mémoire à paraître.

#### B - N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE D'ASPERGILLUS NIGER.

Le moût de fermentation est identique à celui utilisé pour préparer la β-D-mannosidase. La méthode de fractionnement est identique à celle précédemment décrite et ce, jusqu'à l'étape de chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

1 - Chromatographie sur DEAE-cellulose.

Un tampon phosphate de sodium 21 mM de pH 6,5 permettait l'élution de la  $\beta$ -D-mannosidase, quand on augmente la concentration en phosphate de sodium 200 mM pH 6,6, on obtient l'élution de l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique. L'enzyme est éluée en un pic non homogène (Fig. 3 p. 32). Les éluats après dialyse contre de l'eau distillée sont lyophilisés.



Figure 3

Chromatographie sur DEAE-cellulose (DE22) d'un extrait de moût de fermentation d'Aspergillus niger après précipitation au sulfate d'ammonium

Les flêches indiquent un changement de tampon

L'absorbance est mesurée à 400 nm

Activité β-D-mannosidique **\$-\$-\$** 



 Activité N-acéty1-β-D-hexosaminidasique. Cette activité est éluée par une solution tampon phosphate de sodium 200 mM pH 5,6 renfermant du NaCl 0,1 M



ω ω

1 -

Chromatographie de la β-D-mannosidase d'Aspergillus niger sur colonne de Sephadex 4B- -aminocaproylgalactosylamine.

L'absorbance des solutions enzymatiques est mesurée à 400 nm.

### 2 - Chromatographie sur colonne d'affinité.

Elle permet d'éliminer l'activité  $\beta$ -D-galactosidasique contaminante. Les éluats lyophilisés sont dissous dans un tampon phosphate de sodium 10 mM de pH 4,9 avant d'être injectés sur une colonne (2,5 x 50 cm) de sépharose 4B- $\Sigma$ -aminocaproyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminylamine équilibrée dans le même système tampon. On remarque l'élution d'une forme de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase qui n'est pas retenue sur la colonne d'affinité. Une deuxième forme de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase est éluée quand on lave la colonne par un tampon phosphate de sodium 200 mM de pH 6,7 (Fig. 5 p. 35).

## 3 - Conclusions.

Des deux formes de N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases éluées, le premier pic d'activité représente 70 p. 100 de l'activité totale pour une purification de l'ordre de 3.520 fois, le deuxième pic représente 30 p. 100 de l'activité totale pour un degré de purification de 14.250 fois.

L'intérêt de cette enzyme réside dans le fait qu'elle est thermostable : on peut la faire travailler à des températures de l'ordre de 55-60°C. Un autre avantage, mais qui semble être dû, celui-là, à l'enzyme, est la stabilité de l'activité enzymatique en lyophilisation.

#### C - $\beta$ -D-GALACTOSIDASE DE LA RATE DE PORC.

La  $\beta$ -D-galactosidase de la Rate de Porc a été préparée en suivant le protocole de WERRIES et al. (135) utilisé pour préparer la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosamínidase de la Rate de Boeuf.

1 - Fractionnement sur sulfate d'ammonium.

La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium est effectuée à 45 p. 100 de saturation. Le précipité est obtenu par une centrifugation de 45 minutes à 16.000 tours par minute. Il est dissous dans le minimum d'eau et dialysé pendant 3 jours à 4°C contre de l'eau distillée.

L'adialysable est ensuite concentré sur membrane Amicon PM30.

2 - Chromatographie sur colonne.

#### a - Chromatographie sur colonne de Séphadex G 200

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites page . Les fractions renfermant une activité  $\beta$ -D-galactosidasique sont rassemblées,

- 34 -



Chromatographie sur colonne de Sepharose 4B-{-aminocaproyl-N-acetylglucosaminylamine Les absorbances sont mesurées à 400 nm. La flêche indique le changement de système tampon (phosphate de sodium 200 mM pH 6,7) Activité N-acétyl-β-D-hexosaminidasique

1:1

concentrées sur membrane Amicon PM30 puis dialysées contre le tampon d'équilibration de la DEAE-cellulose. Il faut noter que la  $\beta$ -D-galactosidase est éluée avant la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (Fig. 6 p. 37)

#### b - Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose

La colonne de DEAE-cellulose (2 x 30 cm) est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7,1. La  $\beta$ -D-galactosidase n'est pas retenue sur cette résine, la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase contaminante est éluée par un tampon acide citrique 0,05 M phosphate disodique 0,1 M pH 6,0 renfermant du NaCl 0,1 M (Fig. 7 p. 38).

La  $\beta$ -D-galactosidase est purifiée 540 fois ce qui est peu par rapport aux autres préparations enzymatiques.

#### D - CONCLUSIONS.

Nous avons préparé d'autres exoglycosidases nécessaires à la détermination de l'anomérie des liaisons des monosaccharides. Les méthodes de préparation déjà publiées sont rassemblées dans l'appendice technique. Comme nous pourrons le remarquer, il s'agit de méthodes de préparation traditionnelles, le degré de pureté est beaucoup moinsélevé que ceux que l'on obtient maintenant grâce à la chromatographie d'affinité. Les activités glycosidasiques contaminantes peuvent entraîner des artefacts d'hydrolyse donc des erreurs d'interprétation surtout si on effectue des hydrolyses récurrentes.

La plus grande pureté des préparations enzymatiques actuelles permet une plus grande sureté des résultats mais il est quelques fois gênant d'avoir des enzymes trop purifiées car, *in vitro*, elles peuvent perdre une grande partie de leur activité enzymatique, soit par une labilité accrue du fait de leur pureté, soit par perte d'un activateur ou d'un cofacteur.

Les enzymes isolées de l'Aspergillus niger sont, à ce sujet, très intéressantes. En effet, ce sont les seules exoglycosidases connues jusqu'à présent (à l'exception de l'a-amylase bactérienne) qui peuvent subir des traitements thermiques poussés (température de l'ordre de 65°C). Ces enzymes même très purifiées peuvent être lyophilisées sans qu'il soit besoin de les protéger par de la serum albumine.

- 36 -



50

Fractions

8IJ .**1**.1



Chromatographie de la  $\beta$ -D-galactosidase de rate de Porc sur colonne de Sephadex G-200 (5 x 80 cm).

Les absorbances sont mesurées à 400 nm.



Activité β-D-galactosidasique

Activité N-acétyl-β-D-hexosaminidasique

0-0-0

Fractions rassemblées, concentrées et dialysées.



Figure 7

BHŞ JUE

Chromatographie sur colonne DEAE-cellulose de la  $\beta$ -D-galactosidase de Rate de Porc.

Les absorbances sont mesurées à 400 nm.

.

La flêche indique le changement de système tampon.

Activité β-D-galactosidasique

O-O-O Activité N-acétyl-β-D-hexosaminidasique

# II - SPÉCIFICITÉ DES EXOGLYCOSIDASES

## A - SPECIFICITE DES N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASES.

#### 1 - Action sur les substrats synthétiques.

#### a - Anomérie de liaison

Toutes les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases décrites jusqu'à présent sont spécifiques de la liaison  $\beta$ -osidique. Il faut noter, cependant, que BANNISTER et PHIZACKERLEY (11) ont démontré qu'il existait une  $\alpha$ ,  $\beta$ -N-acétyl-hexosaminidase dans des extraits de patelle (Patella vulgata).

Dans notre cas personnel, nous n'avons jamais trouvé une activité N-acétyl-α-D-glucosaminidase indissociable de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique.

#### b - Spécificité vis-à-vis de la N-acétyl-hexosamine

Jusqu'à présent, il n'a été signalé que deux préparations enzymatiques ne possédant qu'une seule activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique, il s'agit de l'hexosaminidase C du cerveau (le rapport de l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique est plus grand que dans le cas des hexosaminidases A et B. L'enzyme est cependant encore capable d'hydrolyser la liaison contractée par la N-acétyl- $\beta$ -D-galactosamine) et de l'exo-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase de Bacillus subtilis.

Nous ajouterons à cette liste les N-acétyl-β-D-hexosaminidases de Diplococcus pneumoniae où les activités N-acétyl-β-D-glucosaminidasiques et galactosaminidasiques sont très nettement différenciées (résultats personnels).

Dans tous les autres cas décrits dans la littérature, les activités N-acétyl-&D-glucosaminidasique et N-acétyl-&D-galactosaminidasique sont indissociables, le rapport de ces deux activités reste constant pendant toute la durée du fractionnement, la dégradation qui peut se produire au stockage est identique pour les deux activités. Quand on étudie les cinétiques à deux substrats, on remarque que la vitesse maximale théorique mesurée est inférieure à la somme des vitesses maximales prises séparément. Les N-acétyl-&D-hexosaminidases sont donc des enzymes dont les 2 activités sont portées par la même protéine et catalysées par le même site actif. On remarquera, cependant, que l'activité N-acétyl-&D-glucosaminidasique est toujours supérieure à l'activité N-acétyl-&D-galactosaminidasique. Quand il y a présence de formes enzymatiquès différentes, les rapports d'activité peuvent être différents d'une forme à une autre.

- 39 -

### 2 - Action sur les substrats naturels.

Les oligosaccharides utilisés se différencient, d'une part, par la nature de la liaison et, d'autre part, par leur structure.

#### a - Influence de la nature de la liaison

Les vitesses maximales d'hydrolyse ont été déterminées lors de l'hydrolyse de disaccharides renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par des liaisons  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,6 à un résidu de mannose.

Les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine après 24 heures d'incubation ont été mesurés dans le cas de l'hydrolyse des disaccharides précédents et dans le cas d'un disaccharide renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par une liaison  $\beta$ -1,4 à un résidu de galactose, - dans le cas d'un trisaccharide renfermant de la N-acétyl-glucosamine liée par une liaison  $\beta$ -1,3 à un résidu de lactose.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux III et IV pages 41 et 42.

Les remarques que nous pouvons faire à propos de ces résultats sont les suivantes :

- Toutes les préparations enzymatiques utilisées possèdent une affinité plus grande pour l'hétéroside de synthèse que pour les oligosaccharides analysés, on observe, cependant, que la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase isolée de la Fève Jack possède une affinité plus grande pour le disaccharide A, soit le O- $\beta$ -D-N-acétylglucosaminyl-(1  $\rightarrow$  2)-mannose que pour l'hétéroside de synthèse.

- Les vitesses maximales d'hydrolyse et les pourcentages d'hydrolyse varient, d'une part, avec l'origine de l'enzyme et, d'autre part, avec la nature de la liaison à hydrolyser.

\* Liaison  $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 2)-mannose$ 

Les hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de la Fève Jack possèdent une très grande affinité pour le disaccharide  $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl (1 \rightarrow 2)$ -mannose.

Au bout de 24 heures d'hydrolyse, la libération de la N-acétyl-glucosamine est quantitative comme l'indique le tableau

L'affinité des N-acétyl-ß-D-hexosaminidases isolées du foie de Boeuf,

- 40 -

## TABLEAU III

Pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine

à partir d'oligosaccharides renfermant différents types de liaison

après 24 heures d'hydrolyse par des N-acétyl-β-D-hexosaminidases d'origines diverses

Substrats	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	Aspergillus niger
p-nitrophényl-N-acétyl- β-D-glucosaminide (*)	100	100	100	100	100
G1cNAc $\frac{1,2}{2}$ Man	100	26	100	25	62
GlcNAc $\frac{1,4}{2}$ Man	12,1	2,3	35	32	56,5
GlcNAc 1,6 Man	77	23,5	23	13,1	100
GlcNAc 1,4 Gal	3,4	29	22,9	30	28,4
GlcNAc $\frac{1,3}{2}$ Gal $\frac{1,4}{2}$ Glc	50,4	91	68	0	40,8
		·			

(\*)L'hétéroside de synthèse est hydrolysé totalement en 10 minutes.



41 -

## TABLEAU IV

# Vitesses maximales d'hydrolyse de cinq N-acétyl-β-D-glucosaminidases d'origines diverses. Les valeurs sont exprimées en n.mole s. mg de protéine.

Substrats	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	Aspergillus niger
p-nitrophényl-N-acétyl- β-D-glucosaminide	99	13,1	100,8	45	68,3
GlcNAc $\frac{1,2}{2}$ Man	6,5	1,66	17,1	7,5	7,8
GlcNAc 1,4 Man	27,3	0	23,3	12	14,16
GlcNAc 1,6 Man	102	110	103	138	89,5

Unite

- 42 -

des graines germées de Fenugrec et d'Aspergillus niger pour le disaccharide  $0-\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl- $(1 \rightarrow 2)$ -mannose, est relativement faible. Les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine sont, d'autre part, de 26, 25 et 62 p. 100. La libération de la N-acétyl-glucosamine liée en  $\beta$ -1,2 à du mannose sera réalisée de préférence à l'aide des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de la fève Jack.

#### \* Liaison $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 3)-mannose$

L'influence de l'action des différentes préparations enzymatiques sur une liaison de type  $\beta$ -1,3 n'a pu être étudiée que sur un trisaccharide : le O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$  3)-O- $\beta$ -D-galactosyl-(1  $\rightarrow$  4)-glucose.

Seuls les pourcentages d'hydrolyse ont été calculés. Les valeurs données dans le tableau III indiquent que seule l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf libère quantitativement le résidu de N-acétyl-glucosamine, au contraire, l'hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec ne possède aucune action sur le substrat. L'activité des N-acétyl-β-D-hexosaminidases de la rate de Boeuf, de la fève Jack et d'Aspergillus niger n'est pas totale, elle atteint respectivement 50,4, 68 et 40,8 p. 100.

### \* Liaison $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-mannose$

L'affinité des préparations enzymatiques isolées de la rate, de foie de Boeuf pour le disaccharide :  $0-\beta-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)$ -mannose est faible voire nulle. Au bout de 24 heures d'hydrolyse les pourcentages de N-acétylglucosamine libérée sont négligeables.

Les vitesses maximales des préparations enzymatiques isolées de la fève Jack, des graines germées de Fenugrec et d'Aspergillus niger pour le disaccharide 0- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$  4)-mannose ne sont pas négligeables, elles sont comprises entre 12 et 23 n.mole par seconde et milligramme de protéine. On remarque cependant que les pourcentages de libération de la N-acétyl-D-glucosamine dans les conditions décrites sont faibles, le maximum de libération (56,5 p. 100) est obtenu lors de l'action de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase isolée de l'Aspergillus niger.

#### \* Liaison $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-galactose$

La faible quantité dont nous disposions de ce disaccharide, ne nous a pas permis de déterminer les constantes d'affinité des différentes préparations enzymatiques vis-à-vis de ce substrat. Seuls les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine au bout de 24 heures d'hydrolyse ont été mesurés. Les valeurs données dans le tableau III montrent qu'aucune des préparations enzymatiques utilisées n'est très active sur ce disaccharide. Un maximum de libération de 30 p. 100 est obtenu pour la préparation enzymatique des graines germées de Fenugrec.

#### \* Liaison $0-\beta-D-N-acétylglucosaminyl-(1 \rightarrow 6)-mannose$

Nous avons étudié l'affinité des 5 préparations de N-acéty1- $\beta$ -Dhexosaminidases pour le disaccharide 0- $\beta$ -D-2-déoxy-2-acétamido-glucopyranosy1-(1  $\rightarrow$  6)-D-mannose, ainsi que les pourcentages de libération de la N-acéty1glucosamine au bout de 24 heures d'hydrolyse.

L'affinité des préparations enzymatiques isolées de la rate de Boeuf et de l'Aspergillus niger est très grande, elle est respectivement de 0,038 et 0,018 mM, soit une affinité supérieure à celle trouvée pour l'hétéroside de synthèse. Pour les préparations isolées de la Fève Jack, des graines germées de Fenugrec et du foie de Boeuf, les affinités sont nettement plus faibles, elles sont respectivement de 0,32, 0,58 et 0,38 mM. Les vitesses maximales de réactions sont élevées par comparaison à celles obtenues précédemment, elles varient de 1,66 à 138 n.moles/s/mg de protéine, valeurs légèrement supérieures à celles obtenues pour l'hydrolyse de l'hétéroside de synthèse (Tableau IV p.42). Les pourcentages d'hydrolyse obtenus après 24 heures d'incubation sont rassemblés dans le tableau III p.41. On remarquera que la préparation d'Aspergillus niger coupe à 100 p. 100 la liaison N-acétylglucosaminyl  $\beta 1 \rightarrow 6$  mannose. La préparation enzymatique isolée de la rate de Boeuf libère 77 p. 100 de la N-acétylglucosamine alors que les autres préparations donnent des pourcentages d'hydrolyse variant de 13 à 23 p. 100. La libération de la N-acétylglucosamine liée par une liaison  $\beta$ -1,6 à du mannose sera donc réalisée de préférence à l'aide des hexosaminidases isolées de la rate de Boeuf et de l'Aspergillus niger.

## \* Discussion

Des résultats que nous venons d'exposer ci-dessus nous ne pouvons en aucun cas conclure à la spécificité stricte de telle ou telle enzyme vis-à-vis de tel ou tel type de liaison à hydrolyser. Nous pouvons, cependant, remarquer les faits suivants : toutes les enzymes étudiées ici sauf celle isolée des graines germées de Fenugrec présente une affinité très grande pour les liaisons  $\beta$ -1,6.

MATTA et BAHL (77) ont obtenu une libération totale de la N-acétylglucosamine lors de l'hydrolyse du O- $\beta$ -D-N-acétyl-glucosaminyl-(1  $\rightarrow$  6)-mannose par l'enzyme isolée d'Aspergillus niger. VIKHA et al. (129) ont observé que la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase isolée de l'épididyme de Porc présente une affinité décroissante

- 44 -

pour les liaisons  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 lorsque la N-acétylglucosamine est liée à du glucose. Si on se réfère uniquement aux valeurs de Km, on remarque que les 5 préparations de N-acéty1-β-D-hexosaminidases étudiées peuvent être classées en deux groupes. Le premier groupe constitué par les enzymes isolées de la rate, du foie de Boeuf et de la Fève Jack, ces enzymes présentent une activité décroissante pour les liaisons N-acétylglucosaminyl  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,2 et  $\beta$ -1,4 mannose. Le deuxième groupe constitué par les enzymes isolées de l'Aspergillus niger et des graines germées de Fenugrec. Ces enzymes présentent une affinité décroissante pour les liaisons N-acétylglucosaminyl  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,2 mannose. Les variations observées sont d'ailleurs confirmées par l'étude des vitesses maximales théoriques d'hydrolyse. Si on examine, d'autre part, les résultats obtenus lors de la cinétique d'hydrolyse enzymatique, on remarque quelques anomalies. La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase isolée des graines germées de Fenugrec est incapable d'hydrolyser la liaison N-acétyl-glucosaminyl  $\beta$ -1,3 galactose. Par l'étude systématique que nous venons de réaliser sur la spécificité des hexosaminidases, nous montrons que seule l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf est capable de libérer quantitativement la N-acétyl-glucosamine liée en  $\beta$ -1,3 au galactose.

Dans la littérature, d'autres exemples de l'incapacité des hexosaminidases à hydrolyser certains types de liaisons sont donnés, c'est ainsi que la Nacétyl-glucosamine présente dans l'oligosaccharide suivant : GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{4}$  GlcUA  $\frac{\beta-1,3}{61}$  GlcNAc est libérée par l'hexosaminidase isolée du foie de Boeuf (WEISSMAN *et al.*) (133), de l'aorte bovine (BUDDECKE et WERRIES) (23) et enfin par l'hexosaminidase isolée de la fève Jack (LI et LI) (68). Par contre, aucune libération de N-acétyl-glucosamine n'est obtenue par les hexosaminidases isolées de l'émulsine d'amande et de l'*Aspergillus niger* (WEISSMAN *et al.*) (133) et par des extraits de pneumocoques (LINKER *et al.*) (73) (WEISSMAN *et al.*) (133). Dans le cas de la maladie de Tay-sachs, l'hexosaminidase B encore présente est incapable d'agir sur des structures analogues aux gangliosides GM<sub>2</sub>. Cette forme enzymatique possède pourtant la faculté d'hydrolyser les N-acétylgalactosamines. La spécificité enzymatique semble en fait être beaucoup plus liée à l'environnement spatial et à la nature du monosaccharide penultième plutôt qu'à l'origine de l'hexosaminidase.

Nous avons d'ailleurs montré, dans le tableau III p.41que le monosaccharide sur lequel est branchée la N-acétylglucosamine est important pour la spécificité enzymatique. Le seul fait de passer d'un  $0-\beta-D-2-désoxy-2-acétamidoglucopyra$  $nosyl-(1 <math>\rightarrow$  4)-D-mannose à un  $0-\beta-D-2-désoxy-2-acétamidoglucopyranosyl-(1 <math>\rightarrow$  4)-Dgalactose entraîne une diminution notable du pourcentage d'hydrolyse des liaisons sauf

- 45 -

dans le cas de l'hydrolyse par la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase du foie de Boeuf. Ces observations sont en accord avec les résultats trouvés par VIKHA et al.(129).

Ces auteurs remarquent que l'affinité diminue lorsqu'on remplace un glucose par un galactose ou par une N-acétyl-glucosamine. Il n'est donc pas possible dans l'état actuel de nos connaissances de conclure à l'existence d'une spécificité plus ou moins stricte des enzymes vis-à-vis du type de la liaison à hydrolyser.

### b - Influence de la taille du substrat

Des tri- et tétrasaccharides renfermant des liaisons N-acétyl-glucosamine  $\beta$ -1,2 et  $\beta$ -1,4 ont été hydrolysées par deux préparations enzymatiques isolées de la fève Jack et d'Aspergillus niger afin d'étudier les variations de libération de la N-acétyl-glucosamine en fonction de la structure du substrat. Les hexosaminidases isolées de la fève Jack et d'Aspergillus niger ont été choisies car ces deux préparations se sont révélées être parmi les plus actives sur les liaisons  $\beta$ -1,2 et  $\beta$ -1,4.

## \* Liaison $0-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 2)-mannose$

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau V p. 47. Nous pouvons remarquer tout d'abord que l'activité des préparations enzymatiques de la fève Jack et de l'Aspergillus niger au bout de 24 heures d'hydrolyse est nettement inférieure quand on compare les pourcentages obtenus pour le  $0-\beta-D-2-désoxy-2-acéta$ mido-glucopyranosyl- $(1 \rightarrow 2)$ -D-mannose et le  $0-\beta-D-2-désoxy-2-acétamido-glucopyrano$  $syl-<math>(1 \rightarrow 2)-0-\beta$ -D-mannopyranosyl- $(1 \rightarrow 3)$ -D-mannose. La poursuite de l'hydrolyse pendant 5 jours ne modifie pas le pourcentage de libération. Ces travaux ont été vérifiés au laboratoire par R. VANDERSYPPE (125).

### \* Liaison 0-β-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 → 4)-mannose

L'hexosaminidase isolée de la fève Jack est l'enzyme la plus active, on obtient, respectivement, 81 et 71 p. 100 d'hydrolyse pour le tri- et le tétrasaccharide alors que le disaccharide n'est hydrolysé qu'à 35 p. 100 pour le même type de liaison. La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase de l'Aspergillus niger capable d'hydrolyser la liaison  $\beta$ -1,4 du disaccharide est incapable de couper la même liaison dans un tri- ou tétrasaccharide (tableau V, page 47).

# \* Liaison 0-β-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 → 4)-0-β-D-N-acétylglucosaminyl-(1 → 4)-D-N-acétyl-glucosamine

L'action des cinq préparations enzymatiques a été étudiée sur le Nacétyl-chitotriose. Les constantes d'affinité, les vitesses maximales théoriques

# TABLEAU V

Pourcentages de N-acétyl-glucosamine libérée au bout de 24 heures d'hydrolyse à partir d'oligosaccharides de taille variable

par des préparations enzymatiques isolées de la Fève Jack et d'Aspergillus niger

	N-acétyl-β-D-glucosaminidase isolée de :			
Substrats	Fève Jack	Aspergillus niger		
GlcNAc $\frac{1,2}{2}$ Man	100	62		
Man 1,3 Man 1,2 GlcNAc	47	53		
GlcNAc 1,4 Man	35	56,5		
Man 1,3 Man 1,4 GlcNAc	81	0		
$\begin{array}{c} \text{Man}  \frac{1,3}{4}  \text{Man} \\ 1,4  1,4 \\ 1 \text{ (IcNAc}  \text{GlcNAc} \end{array}$	71	0		

- 47 -

ainsi que les pourcentages de libération de la N-acétyl-glucosamine ont été déterminés et rassemblés dans le tableau VI p.49. Les hexosaminidases isolées de la rate et du foie de Boeuf sont sans action sur le N-acétyl-chitotriose. Les trois autres préparations possèdent une action négligeable, dans les conditions utilisées, sur la libération de la N-acétyl-glucosamine. L'affinité des hexosaminidases, principalement celle d'Aspergillus niger est importante, les enzymes isolées de la rate et du foie de Boeuf sont incapables d'agir sur le Nacétyl-chitotriose.

#### \* Discussion

La modification de la structure du substrat entraîne une modification dans les modalités d'hydrolyse de ces oligosaccharides. Cependant, les différences ne vont pas toutes dans le même sens. En présence d'une liaison  $\beta$ -1,2 à hydrolyser, les enzymes isolées de la fève Jack et de l'Aspergillus niger coupent plus facilement la liaison du disaccharide par rapport à celle du trisaccharide.

Dans le cas des liaisons  $O-\beta-D-N-acétyl-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-mannose,$ l'enzyme de la fève Jack agit de préférence sur le tri- et le tétrasaccharide, l'hexosaminidase de l'Aspergillus niger est capable d'hydrolyser le chitotriose. BAHL et AGRAWAL (10) ont montré que cette enzyme était capable d'agir sur le Nacétyl-chitotétraose et le N-acétyl-chitohexaose avec des vitesses d'hydrolyse d'autant plus faible que la masse moléculaire est plus élevée.

De notre étude, il apparaît que si la masse moléculaire intervient, elle joue un rôle assez faible, le facteur influençant le plus l'hydrolyse est, sans nul doute, la conformation spatiale du substrat.

Ainsi, il semble que l'enzyme de l'Aspergillus niger soit capable d'hydrolyser les n-glycannes, par contre, l'hexosaminidase de la fève Jack est capable d'hydrolyser plus facilement les isoglycannes.

#### c - Action sur un glycopeptide isolé de l'ovomucoide

Le comportement des cinq préparations enzymatiques a été étudié sur un glycopeptide dont la masse moléculaire est de 3.220, isolé de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule selon le procédé décrit par YAMASHINA et MAKINO (140), modifié par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (81). Le glycopeptide renferme 40 p. 100 d'hexosamines soit 10 résidus de N-acétyl-glucosamine.

Les résultats obtenus par méthylation par FOURNET (47) sont en faveur de l'existence de 6 résidus de N-acétyl-glucosamine en position externe non réductri-

- 48 -

# TABLEAU VI

# Hydrolyse du tri-N-acétyl-chitotriose par cinq N-acétyl-β-D-glucosaminidases d'origines diverses

Origine de l'hexosaminidase	Km (mM)	VMax (n.mole/mn/ mg de protéine)	p.100 de libération au bout de 24 heures
 Rate de Boeuf	<u> </u>	0	0
Foie de Boeuf		0	0
Fève Jack	1,66 ± 0,17	1,33	1,2
Graines de Fenugrec	1,66 ± 0,11	9,83	23,6
Aspergillus niger	0,58 ± 0,02	5,16	14

- 49 -

ce, soit 60 p. 100 des hexosamines totales.

Dans les conditions d'hydrolyse utilisées, le nombre de résidus de N-acétyl-glucosamine libéré par l'hydrolyse du glycopeptide de l'ovomucoïde par les cinq préparations enzymatiques étudiées est très faible. Le tableau VII p. 51 rassemble les résultats obtenus. Les enzymes isolées de la fève Jack et de la rate de Boeuf libèrent un seul résidu de N-acétyl-glucosamine. L'action des autres préparations enzymatiques est négligeable : 0,1 à 0,3 résidu de N-acétyl-glucosamine.

On pourrait expliquer l'activité restreinte des différentes N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases sur le glycopeptide  $\beta$  de l'ovomucoïde de différentes manières.

 - Existence possible de liaisons N-acétyl-α-D-glucosaminidasiques.
 Cette hypothèse est à rejeter car la détermination de la structure des oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide natif de l'ovomucoïde par BAYARD et al.
 (14) a montré que la N-acétyl-glucosamine était toujours liée par une liaison β-glycosidique.

On remarquera, en outre, que les hexosaminidases sont capables d'hydrolyser les oligosaccharides sans agir sur le glycopeptide natif.

- Présence de nombreuses liaisons N-acétyl-β-D-glucosaminidasique 1,4 difficiles à hydrolyser.

- Existence d'une conformation spatiale telle qu'il existe de nombreux encombrements stériques empêchant les hexosaminidases d'intervenir.

- Le faible pourcentage d'hydrolyse peut encore s'expliquer par l'existence de conditions d'hydrolyse impropres au maximum d'efficacité des enzymes. L'hydrolyse du glycopeptide pourrait, peut-être, commencer par l'action de l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase : enzyme qui effectue la coupure du chaînon chitobiose.

- Les enzymes sont inefficaces car elles ne sont pas adaptées à cette structure. Les essais d'hydrolyse réalisés par MURAMATSU et EGAMI (85) à l'aide de l'hexosaminidase de Turbo cornutus sur un glycopeptide de l'ovomucoïde donnent 19 p. 100 de libération de N-acétyl-glucosamine par rapport aux hexosamines totales. De même, CLAMP et HOUGH (29) ont obtenu, par action de l'hexosaminidase isolée de l'épididyme de Bélier sur un glycopeptide de l'ovomucoïde, une libération de 0,95 résidu de N-acétylglucosamine.

Comme on peut le remarquer, ces résultats viennent confirmer ceux que nous avons obtenus et ils démontrent que la libération de la N-acétyl-glucosamine à partir des glycopeptides n'est jamais totale.

# ' TABLEAU VII

Libération de N-acétyl-glucosamine à partir d'un glycopeptide obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde

		Hexosaminidase isolée à partir de			
	Rate de Boeuf	Foie de Boeuf	Fève Jack	Graines germées de Fenugrec	Aspergillus niger
Pourcentage de libération de N-acétyl-glucosamine	16	0	14,8	1,4	5
Nombre de résidus de N- acétyl-glucosamine libérée	1	0	1	0,1	0,3



#### **B** - SPECIFICITE DE LA β-D-MANNOSIDASE

1 - Action sur les hétérosides de synthèse.

La  $\beta$ -D-mannosidase n'hydrolyse que les liaisons  $\beta$ -D-glycosidiques contractées par le mannose. L'enzyme est incapable de réagir avec les liaisons  $\alpha$ -D-mannosidiques.

### 2 - Action sur les substrats naturels.

Nous avons déjà montré (107) que la  $\beta$ -D-mannosidase isolée de l' Aspergillus niger était capable d'hydrolyser la liaison  $\beta$ -D-mannosidique présente dans les glycoprotéines. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par WAN et al. (131). Nous avons, d'autre part, voulu savoir si l'enzyme pouvait hydrolyser tous les types de liaison pouvant être contractés par le mannose et la N-acétylglucosamine. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII page 53. Comme nous pouvons le remarquer, la  $\beta$ -D-mannosidase d'Aspergillus niger est capable de réagir sur tous les types de liaison mais avec des vitesses d'hydrolyse très nettement différentes. Le substrat le plus adapté se trouve, sans contestations possibles, être celui qu'on trouve dans la nature, le mannose  $\beta$ -1,4 N-acétyl-D-glucosamine.

Nous remarquons aussi que la  $\beta$ -D-mannosidase hydrolyse plus vite le mannose  $\beta$ -1,4 N-acétyl-D-glucosamine que l'hétéroside de synthèse.

On note généralement le phénomène inverse avec les hydrolases sauf dans le cas de certaines galactosidases ou fucosidases.

## III - CONCLUSIONS

#### A - CONCLUSIONS CONCERNANT LA SPECIFICITE DES N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASES.

Lorsque nous avons commencé cette étude, nous pensions qu'il existait une spécificité de liaison très étroite. Il a fallu très vite abandonner cette idée au fur et à mesure que nous avancions dans notre travail. A la vue des résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

1 - La spécificité enzymatique varie selon l'origine de l'enzyme. C'est une constatation valable pour toutes les glycosidases, par exemple, la neuraminidase de Vibrio cholerae hydrolyse quantitativement l'acide N-acétyl-neuraminique du 3-sialyllactose et du 6-sialyllactose, la neuraminidase du virus de l'influenza est incapable de couper la liaison 6-sialyllactose alors que le 3-sialyllactose est hydrolysé (DRZENIEK (39)).

- 52 -

# TABLEAU VIII

	Substrat à hydrolyser	Pourcentage de mannose libéré *	Vitesse d'hydrolyse du substrat n.mole/min/mg
Man	$\beta - 1, 4$ GlcNAc	100	6,56
Man	$\beta-1,3$ G1cNAc	22	0,17
Man	β-1,6 GlcNAc	4	0,96
ſan	$\beta - 1$ , pNP	52	3,41

# Spécificité d'action de la β-D-mannosidase

\* Hydrolyse de une heure à 37°C

La  $\beta$ -D-galactosidase de la fève Jack hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4 contractées par le galactose beaucoup plus vite que les liaisons  $\beta$ -1,3. On trouve l'inverse pour la  $\beta$ -D-galactosidase de l'émulsine (ARAKAWA *et al.* (5)).

2 - La spécificité enzymatique dépend du type de la liaison à hydrolyser. Dans notre cas particulier, la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase du foie de Boeuf était incapable d'hydrolyser les liaisons  $\beta$ -1,4. D'autres exemples viennent renforcer nos conclusions : nous ne citerons que le cas des  $\alpha$ -1,2 fucosidases de Clostridium perfringens (AMINOFF et FURUKAWA (4)) et d'Aspergillus niger (BAHL (9)). Ces enzymes ne sont capables que d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,2 contractées par le fucose et ceci quel que soit l'environnement spatial.

3 - La spécificité peut dépendre de la nature du monosaccharide sur lequel est branchée la N-acétyl-glucosamine. Dans le cas des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases, lorsque les N-acétyl-hexosamines sont branchées sur un galactose ou une autre N-acétyl-hexosamine, le taux d'hydrolyse est beaucoup plus faible. Des résultats analogues sont obtenus, par exemple, avec les  $\alpha$ -1,2 fucosidases. Cette enzyme hydrolyse le disaccharide Fuc  $\alpha$ -1,2 Gal, mais elle est sans action sur le disaccharide Fuc  $\alpha$ -1,2 Fuc (BAHL (9)).

4 - La spécificité dépendra de l'environnement spatial de la liaison à hydrolyser. La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase isolée d'Aspergillus niger est pratiquement incapable d'agir sur des oligosaccharides ramifiés. La constatation est identique lors de l'hydrolyse de certains oligosaccharides par les  $\beta$ -D-galactosidases. HARRAP et WATKINS (56) démontrent que la  $\beta$ -D-galactosidase de Trichomonas foetus n'hydrolyse pas le galactose quand sur la N-acétylglucosamine jouxtant le galactose se trouve greffé un fucose.

En conclusion, lorsqu'il s'agira de déterminer uniquement la nature de l'anomérie de la liaison N-acétylglucosaminyle présente dans un polysaccharide, le choix de l'origine de l'enzyme sera donc plus vaste car, sans avoir une libération totale de la N-acétylglucosamine, cette libération pourra être significative quant à la nature de l'anomérie. Lorsque la libération doit être quantitative, le choix des enzymes est plus limité. Nous conseillons d'hydrolyser de préférence :

- Les oligosaccharides linéaires ou ramifiés à liaison  $\beta$ -1,2 par les enzymes isolées de la rate de Boeuf ou de la fève Jack.

- Les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta$ -1,3 par les enzymes isolées du foie ou de la rate de Boeuf.

- 54 -

- Les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta$ -1,4 par les enzymes isolées de l'Aspergillus niger ou les graines germées de Fenugrec.

- Les oligosaccharides ramifiés à liaison  $\beta$ -1,4 par l'enzyme isolée de la fève Jack.

- Enfin les oligosaccharides linéaires à liaison  $\beta$ -1,6 par les enzymes isolées de l'Aspergillus niger et de la Rate de Boeuf.

Cette étude, plus particulière, ajoutée aux études déjà effectuées sur les spécificités des glycosidases nous ont permis de participer à la détermination de la structure de nombreux oligosaccharides.

# B - <u>APPLICATIONS DES EXOGLYCOSIDASES A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES</u> OLIGOSACCHARIDES NATURELS.

Les différentes glycosidases que nous avons préparées :  $\beta$ -D-galactosidase, N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase,  $\alpha$ -D- et  $\beta$ -D-mannosidases nous ont permis de participer à l'élaboration de la structure de 34 oligosaccharides natifs ou produit d'acétolyse de glycoprotéines.

Les oligosaccharides sont décrits ci-dessous et ils ont fait l'objet de 7 publications.

1 - Hexasaccharide libre du lait

ANAN 
$$\xrightarrow{\alpha-2,3}$$
 Gal  $\xrightarrow{\beta-1,3}$  GlcNAc  $\xrightarrow{\beta-1,3}$  Gal  $\xrightarrow{\beta-1,4}$  Glc  
 $\begin{pmatrix} 6\\ 2\\ 2\\ 2\\ \end{pmatrix}$   
ANAN

GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. (54)

2 - Oligosaccharides d'acétolysat de glycoprotéine

Treize oligosaccharides ont été isolés à partir de la fraction neutre des acétolysats de l'asialoglycopeptide  $\beta$  obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde de poule. Ces composés possèdent les formules suivantes : 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glycopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-D-mannopyranose ; 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose ; 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-D-mannopyranose ; 0- $\alpha$ -D-mannopyranosyl(1  $\rightarrow$  3)-D-mannopyranose ; 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glycopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-0-{2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-D-mannopyranose ; 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-D-mannopyranose ; 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-D-mannopyranose ; 0-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl $\{2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 2)\}-D-mannopyranose ; 0-2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 2)-0-\alpha-D-mannopyranosyl-(1 + 3)-D-mannopyranose ; 0-2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glycopyranosyl-(1 + 2)-0-\alpha-D-mannopyranosyl-(1 + 3)-D-mannopyranose ; 0-\alpha-D-mannopyranosyl-(1 + 3)-0-\{2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4)\}-D-mannopyranosyl-0-\{2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4)\}-D-mannopyranose ; 0-2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4)\}-D-mannopyranose ; 0-2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4)\}-D-mannopyranose ; 0-2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4)}-0-\{2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 3)-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 3)-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 3)-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 3)-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-0-(2-ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-0-(2-\operatorname{ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-0-(2-ac\acute{e}tamido-2-d\acute{e}soxy-\beta-D-glucopyranosyl-(1 + 4))-$ 

BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J. (14).

## 3 - Glycoprotéine

NANA 
$$\frac{\alpha-2,6}{4}$$
 Gal  $\frac{\beta-1,4}{4}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,2}{4}$  Man  
NANA  $\frac{\alpha-2,6}{-1,6}$  Gal  $\frac{\beta-1,4}{-1,4}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,2}{-1,6}$  Man  
3

Fuc  $\frac{\alpha - 1, 6}{6}$  (G1cNAc) 1,2,3 ou 4

sérotransferrine humaine.

Schéma proposé pour la séquence oligosaccharidique des glycannes I et II de la lactotransferrine.

SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G. et MONTREUIL J. (107).

4 - Glycoprotéine isolée du serum

NANA 
$$\frac{\alpha-2,6}{\alpha-1,4}$$
 GlcNAc  $\frac{\beta-1,2}{\alpha-1,6}$  Man  $\alpha-1,3$   
Man  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  GlcNAc  $\frac{\beta-1,4}{\alpha-1,6}$  Structure de la copule polysaccharidique des glycopeptides GP-2 et GP-3 isolés de la

SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. (108).

- 56 -

### 5 - Heptasaccharide libre du lait

"A new heptasaccharide, lacto-N-fucoheptaose has been isolated from human milk. It contains D(+)-galactose, D(+)-glucose, L(-)-fucose and N-acetyl-D-(+)-glucosamine in a 3 : 1 : 1 : 2 ratio. The glucose residue is at the reducing end of the oligosaccharide. Data obtained by partial acid hydrolysis, permethylation and enzymic hydrolysis establish the structure of lacto-N-fucoheptaose as follows :

> D-Galp $\beta$ I  $\rightarrow$  4 D-GlcNAcp $\beta$ I D-Galp $\beta$ I  $\rightarrow$  3 D-GlcNAcp $\beta$ I D-Galp $\beta$ I  $\rightarrow$  4 D-Glcp

> > L-Fucpal

GRIMMONPREZ L., DELAUTRE M., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. (55).

4

6 - <u>Oligosaccharides urinaires</u>

II<sub>H</sub> : Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2)-Gal

- III<sub>A</sub> : GalNAc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) Gal Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2)
- III<sub>B</sub> : Gal- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) Gal Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2)

V<sub>A</sub>

IV<sub>H</sub> : Fuc-
$$\alpha$$
-(1  $\rightarrow$  2)-Gal- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)  
Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)

: GalNAc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2) Fuc- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) Glc

- 58 -

BUS

 $\alpha$ -1,3 Man  $\beta$ -1,4 G1cNAc

$$V_{B} : Gal^{-}a^{-}(1+3) \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+2)} \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+3)} Glc$$

$$VI_{H} : Fuc^{-}a^{-}(1+2)^{-}Gal^{-}\beta^{-}(1+3) \xrightarrow{GlcNAc^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} Gal$$

$$VII_{A} : GalNAc^{-}a^{-}(1+3) \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+3)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} \xrightarrow{GlcNAc^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} Gal$$

$$VII_{Aa} : GalNAc^{-}a^{-}(1+3) \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+3)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} GlcNAc^{-}\beta^{-}(1+3)^{-}Gal^{-}\beta^{-}(1+4)^{-}Glc$$

$$VII_{B} : Gal^{-}a^{-}(1+2) \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+3)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} \xrightarrow{GlcNAc^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} Gal$$

$$VII_{B} : Gal^{-}a^{-}(1+2) \xrightarrow{Gal^{-}\beta^{-}(1+3)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} \xrightarrow{GlcNAc^{-}\beta^{-}(1+4)}_{Fuc^{-}a^{-}(1+4)} Gal$$

$$STRECKER G., RIAZI^{-}FARZAD T., FOURNET B., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. (114)$$

$$7 - Oligosaccharides urinaires$$

$$Ml$$

$$Man \xrightarrow{\alpha^{-}1,3}_{Man} \frac{\beta^{-}1,4}{\beta^{-}} GlcNAc$$

Man  $\frac{\alpha-1,2}{2}$  Man

M2

- 59 -



M5

M6

M3

Man 
$$\alpha^{-1,3}$$
  
Man  $\frac{\beta^{-1,4}}{\alpha^{-1,6}}$  GlcNAc  
Man  $\alpha^{-1,6}$ 







Structure des mannosides urinaires

STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DHONDT J-L. et FARRIAUX J-P. (115).

M7

M8

2. - LES N-ACÉTYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES DES GRAINES GERMÉES DE FENUGREC (TRIGONELLA FOENUM GRAECUM L.)

De nombreuses N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origine végétale ont été décrites dans la littérature, leur nombre est cependant plus limité que celles d'origine animale. Ces dernières se présentent toujours sous différentes formes moléculaires et on essaie de savoir : s'il s'agit de différentes formes enzymatiques ou s'il s'agit tout simplement d'isoenzymes.

Chez les végétaux, seuls DEY et PRIDHAM (35) ont caractérisé deux formes d' $\alpha$ -D-galactosidase dans les graines de Vicia faba. Parmi les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases d'origine végétale décrites jusqu'à présent, seuls RAFESTIN *et al.* (94), MEYER et BOURRILLON (80) ont caractérisé l'existence de plusieurs pics d'activité.

Nous avons caractérisé, dans les graines de Fenugrec, un substrat utilisé par COURTOIS et PERCHERON (30) d'une part, et par BEAUGIRAUD et al. (15) d'autre part, pour l'isolement des galactosidases et des mannosidases, une N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (20). Nous avons voulu vérifier si cette enzyme existait sous différentes formes et si elle présentait des points de comparaison avec les N-acétylhexosaminidases d'origine animale. Nous avons purifié l'enzyme et étudié ses propriétés enzymatiques et physicochimiques.

# I - PURIFICATION DES DIFFÉRENTES FORMES DE N-ACÉTYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES

#### A - GERMINATION DES GRAINES.

Les graines sont lavées par une solution d'acide sulfurique à 10 p. 100 pendant 15 à 20 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau courante puis à l'eau permutée. Les graines sont ensuite traitées par de l'éthanol absolu pendant 10 minutes. Elles sont enfin mises à gongler dans de l'eau distillée renfermant de l'azide de sodium à 0,2 p. 1.000 pendant 12 heures. Après essorage, les graines gonglées sont disposées dans des plateaux sur des feuilles de papier filtre humidifiées à l'aide de la solution d'azide de sodium précédente. Elles sont recouvertes de papier filtre humidifié et d'une feuille de plastique pour éviter les évaporations. La germination est menée à 20°C, à l'obscurité pendant des temps variables : O à 144 heures.

- 60 -

#### **B** - EXTRACTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Les graines entières, après germination, sont broyées dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000. Le broyage s'effectue à 4°C. La suspension laiteuse obtenue est agitée pendant 10 à 12 heures à 4°C. Après ce temps, la suspension est filtrée sur gaze (la solution est extrêmement visqueuse à O heure de germination, la filtration est très lente). Le filtrat est centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée pendant 1 heure à raison de 4.000 tours par minute. Le surnageant obtenu est amené à pH 4,6 avec de l'acide citrique molaire. Si un précipité se forme, il est éliminé par une nouvelle centrifugation. Le surnageant obtenu est amené à 80 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité, après une nuit de repos à 4°C, est collecté par centrifugation de 1 heure à 15.000 tours par minute. Le précipité est dissous dans une solution tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,7 et dialysé contre ce même tampon pendant 3 jours à 4°C. Le précipité qui peut se former en cours de dialyse est éliminé par une centrifugation. Le surnageant est alors soumis à une concentration sur membrane Amicon XM50 ou cartouche Amicon H1DX50. L'ultrafiltrat est éliminé, la solution concentrée obtenue est soumise à différentes chromatographies.

#### C - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE.

La solution enzymatique, après avoir été concentrée, est chromatographiée sur colonne de DEAE-cellulose (cf p. 24). La colonne est, dans un premier temps, lavée à l'aide de 1.400 ml d'une solution tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,7. Une activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique est éluée. La colonne est ensuite éluée par un tampon phosphate de sodium pH 6,7 de molarité croissante, 66 mM, 160 mM et enfin par une solution tampon phosphate de sodium 200 mM pH 5,6 renfermant du NaCl 0,2 M.

A chaque variation de molarité et de pH, il y a élution d'une activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique. La chromatographie sur DEAE-cellulose nous permet d'obtenir 4 formes d'hexosaminidases. Les résultats sont illustrés par la figure 8 (p. 62). La chromatographie sur DEAE cellulose pouvant amener, soit des artefacts dans l'élution ou des modifications des composés chromatographiés, nous avons étudié le comportement de la solution enzymatique brute sur une colonne de CMcellulose (le protocole expérimental est décrit page <sup>24</sup>). Les résultats sont illustrés par la figure <sup>9</sup> (p. 63). Il apparaît 3 pics d'activité N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidasique dont l'un est dédoublé. Le premier pic élué de la CM-cellulose, lorsqu'il est chromatographié sur colonne de DEAE-cellulose, possède uniquement le


Figure 8

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (DE22) d'un extrait de protéines de graines germées de Fenugrec. Les absorbances sont mesurées à 400 nm.

Chaque flêche indique une variation de la concentration du système tampon utilisé

66 mM pH 6,7
160 mM pH 6,7
200 mM pH 5,6 - NaCl 0,2 M

Activité N-acéty1-8-D-hexosaminidasique q ò

Absorbance à 280 nm. 1111

BIIS ULLE





Chromatographie sur colonne de CM-cellulose (CM32) d'un extrait de protéines de graines germées de Fenugrec. Les absorbances sont effectuées à 400 nm

A REAL

1 - La colonne est lavée par un tampon phosphate de sodium disodique 0,015 M - acide citrique 0,007 M pH 4,2
 2 - La colonne est éluée par un tampon phosphate disodique 0,03 M - acide citrique 0,015 M pH 4,95
 3 - La colonne est enfin éluée par un tampon phosphate disodique 0,3 M - acide citrique 0,15 M pH 5,6
 Les flêches indiquent le changement de systèmes tampon.

▲-----▲

Activités N-acétyl-β-D-hexosaminidasiques.

63

comportement chromatographique de la forme IV. Le deuxième pic CM-cellulose non homogène, lorsqu'il est chromatographié sur DEAE cellulose, est constitué par 83 p. 100 de forme III, les 17 p. 100 d'activités restantes sont représentés par les formes I et II. Le troisième pic CM-cellulose rechromatographié sur DEAE-cellulose ne donne que les formes I et II.

Nous pouvons donc conclure que les différentes formes de N-acétylβ-D-hexosaminidases obtenues par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ne sont pas des artefacts de préparation mais de véritables entités enzymatiques.

### D - CHROMATOGRAPHIE SUR CONCANAVALINE A.

Le protocole expérimental est identique à celui exposé page 27 Après injection de la solution enzymatique, la colonne est lavée par 1.900 ml du tampon d'équilibration. Aucune activité enzymatique n'est caractérisée dans l'éluat. L'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique est éluée quand on lave la colonne par le tampon d'équilibration renfermant du méthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Fig. 10, p. 65).

## E - RECHROMATOGRAPHIE DES DIFFERENTES FORMES SUR DEAE-CELLULOSE.

Après dialyse et concentration des fractions enzymatiques recueillies à l'étape précédente, chaque pic d'activité est rechromatographié dans des conditions identiques à la première chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. Cette rechromatographie de chacun des pics permet, d'une part, d'augmenter la pureté des préparations et, d'autre part, de vérifier si la chromatographie des Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases sur DEAE-cellulose ne donnait pas lieu à des phénomènes de copolymérisation ou d'adsorption non spécifique sur le support chromatographique. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau IX (page 66). Les fractions enzymatiques récupérées après chromatographie renferment entre 89 et 99 p. 100 d'une seule et même activité. Les formes les plus contaminées sont les formes III et IV. Nous avons noté aussi la présence d'un pic d'activité (6 p. 100) élué par la solution tampon phosphate 10 mM pH 6,7 et qui ne correspond pas à la forme I. Ce pic nous semble-t-il serait une forme de dégradation des différentes N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases.

# F - <u>CHROMATOGRAPHIE</u> SUR SEPHAROSE 4B-Σ-AMINOCAPROYL-N-ACETYL-β-D-GLUCOSA-MINYLAMINE.

Les conditions expérimentales sont celles citées page 27. On distingue une différence d'affinité entre les différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosami-

- 64 -





Chromatographie sur colonne de Sepharose 4B-Concanavaline A Les absorbances sont effectuées à 280 nm : \_\_\_\_\_\_ 400 nm : ▲·····▲ Activité N-acéty1-β-D-hexosaminidasique La flêche indique le passage du méthy1-α-D-glucopyranoside

> 9415. 11 - 2

# TABLEAU IX

# Rechromatographie des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases sur DEAE-cellulose (\*)

Forme enzymatique	Formes enzymatiques						
rechromatographiée	I	II III	IV				
Forme I	94	on caractérise une activi qui ne correspond ni à I	té enzymatique I, III ou IV				
Forme II	0,1-0,2	99 0,3	0,5				
Forme III	0	0 89,8	10				
Forme IV	0	6,8 2,2	90				

 (\*) Les résultats sont exprimés en p. 100 d'activité par rapport à l'activité totale injectée.

- 66 -

nidases. La forme enzymatique I n'est que retardée sur la colonne, les autres formes sont retenues, l'élution n'a lieu qu'en présence de solution tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,8 (Fig. 11 , p. 68).

Les fractions enzymatiques sont rassemblées, concentrées sur membrane XM50, dialysées contre de l'eau distillée puis reconcentrée sur membrane Schleicher et Schüll UH100 (limite d'exclusion 10.000).

Quand les solutions enzymatiques doivent servir à l'étude des propriétés des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases, on ajoute, dans ces solutions, du tampon phosphate de sodium 200 mM pH 5,0. Elles sont conservées à 4°C ou congelées. Quand on veut étudier les compositions en acides aminés ou en monosaccharides, les solutions enzymatiques sont lyophilisées (à ce stade, l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique est détruite).

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par le tableau X (p. 69) et par la figure 12 (p. 70).

Les électrophorèses en gels de polyacrylamide montrent que l'on obtient une préparation enzymatique homogène. Le degré de purification varie d'une forme à une autre : (2.000 à 20.000 fois). Les différentes formes de N-acétyl-β-Dhexosaminidases sont exemptes de toutes autres activités glycosidasiques ou protéasiques.

G - CONCLUSIONS.

Nous avons caractérisé, dans les graines germées de Fenugrec, quatre formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. C'est la première fois qu'on caractérise autant de formes enzymatiques chez les végétaux avec des degrés de purification aussi élevés (20.000 fois). Nous retrouvons ici un caractère qui semble être général chez les enzymes : la multiplicité des formes. Jusqu'à présent, les nombreuses formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases décrites chez les animaux sont données comme étant des isoenzymes. Il nous a paru intéressant, avec les méthodes que nous disposions, d'étudier la variation de l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique au cours de la germination et de la répartition des différentes formes, en fonction des différentes parties de la graine.

II - CINÉTIQUE DE GERMINATION

Il est connu depuis longtemps que la germination augmente les activités enzymatiques, par rapport à celles qui existent dans la graine dormante.

- 67 -





Chromatographie sur colonne de Sepharose 4B-2-aminocaproyl-N-acetylglucosaminylamine Les absorbances sont mesurées à :

280 nm

400 nm  $\bigcirc - \bigcirc - \bigcirc$  Activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique La flêche indique le changement de système tampon (tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,8)

La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I est éluée en fin de lavage (I)

Les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV sont éluées par le deuxième système tampon

## TABLEAU X

## Purification des différentes formes de N-acétyl-B-D-hexosaminidases

Etapes de fractionnement	Formes enzymatiques	Protéines en mg	Activité totale Unités	Activité spécifique U/mg	Facteur de purification
Extraction par NaCl		174.468	3.663,8	0,021	1
Sulfate d'ammonium		171.472	3.772,4	0,022	1,04
Dialyse		162.501	3.493,7	0,022	1
Concentration sur membrane		27.735	<b>*</b> 3.439	0,124	5,9
	I	641,9	462,1	0,72	34,2
Chromatographie sur DEAE-cellulose	II	322,2	145,00	0,45	21,42
	III	254,5	595,5	2,34	11,92
	IV	437,5	476,8	1,09	52
	I	62,50	266,87	4,27	203,3
	11	33,70	125,21	3,71	176
Chromatographie sur concanavaline A	III	33,70	376,76	11,18	532
	IV	39,10	150,53	3,85	183
	I	8,9	131,8	14,8	705
	· 11	10,2	120,36	11,8	533
Rechromatographie sur DEAE-cellulose	111	10,5	195,9	18,6	888
	IV	8,3	104	12,5	597
	I	2,2	104	47	2.262
Chromatographie sur	II	0,8	35	44,0	2.102
N-acétyl-β-D-glucosaminylamine	111	0,3	128	428	20.380
	IV	0,9	96	106	5.062



### Figure 12

Electrophorèse en gel de polyacrylamide des différentes fractions obtenues au cours de la purification des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (Nous n'avons représenté ici que le cas de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II).

- A Fraction brute après précipitation au sulfate d'ammonium
- B Fraction après DEAE-cellulose
- C Fraction après Concanavaline A
- D Fraction après chromatographie d'affinité.

Les révélations sont effectuées au Bleu de Coomassie

- E Révélation spécifique de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique
- F Révélation spécifique de l'activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique

Nous ne citerons que quelques cas : glycosidases de Phaseolus vulgaris, AGRAWAL et BAHL (2), de Dolichos biflorus, MEYER et BOURRILLON (80), de Canavalia eusiformis, BOERSMA et DEGAND (19), de légumineuses, McCLEARY et MATHESON (78).

La variation de l'activité enzymatique a été mesurée en fonction du temps de germination. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI page 72. Les remarques qui peuvent être faites sont les suivantes. Le taux des enzymes augmente pour atteindre un maximum entre 48 et 96 heures. L'optimum d'activité est extrêmement variable. Il est de 6 jours dans le cas de Phaseolus vulgaris, 5 jours dans le cas de Canavalia eusiformis, 8 jours dans le cas de la ß-mannanase de graine de Caroube. Dans certains cas, le taux des activités enzymatiques est maximum à 0 heure de germination et décroît avec la germination, c'est le cas de la β-D-mannosidase de la luzerne.

Pour notre travail, nous avons fixé le temps de germination à 48 heures. De cette façon, nous obtenons 74 p. 100 de graines germées dont l'axe embryonnaire possède une valeur moyenne égale à 1,7 cm (1,5 à 1,9 cm).

L'activité variant en fonction du temps de germination, nous avons voulu voir si toutes les activités enzymatiques étaient concernées. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 13 (p. 73). Comme nous pouvons le constater, dans la graine après gonflement, il n'y a que trois activités enzymatiques, les "formes" II, III et IV. Au bout de 24 heures, le taux des formes II et IV diminue, celui de la forme III augmente (cette augmentation, à elle seule, compense la perte en activités des deux autres, nous verrons plus loin que la forme III est la forme possèdant la vitesse maximale de réaction la plus grande). Au bout de 48 heures, il y a augmentation du taux des formes II et III, la forme IV continue à baisser mais on note l'apparition de la forme I.

De 48 à 96 heures, les formes I, II et III ont atteint leur maximum, le taux de la forme IV commence à augmenter. Après 144 heures, le taux des formes I et II tend vers zéro, le taux de la forme III tend vers la valeur initiale (graine non germée), le taux de la forme IV augmente toujours, sans pour cela être revenu au taux initial. Nous nous sommes arrêté à ce stade de germination car, au-delà de ce temps, il commence à apparaître des feuilles et beaucoup trop de facteurs peuvent intervenir sur l'activité enzymatique.

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont les suivantes :

- 71 -

# TABLEAU XI

Variation de l'activité enzymatique totale en fonction du temps de germination

Temps de germination en heures	Activité N-acétyl-β-D- glucosaminidasique U/mg	Activité N-acétyl-β-D- galactosaminidasique U/mg
0	0,0015	0,0006
24	0,0040	0,0015
48	0,033	0,013
96	0,023	0,009
144	0,006	0,0024



 Variation de l'activité enzymatique en fonction du temps de germination
 En ordonné : A représente l'activité spécifique des différentes N-acétyl-β-D-hexosaminidases

- En abscisse : H représente le temps de germination en heures.

N-acéty1-β-D-hexosaminidase I

**◊---**◊ N-acéty1-β-D-hexosaminidase II

 $\Delta$ ---- $\Delta$  N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III

▶ — ♦ N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV



1 - L'activité enzymatique augmente en fonction du temps de germination

2 - Cette activité est maximale au bout de 48 heures et elle diminue par la suite

3 - Il existe une "forme" qui n'apparaît qu'après 48 heures de germination et qui disparaît au bout de 96 heures. Nous pensons qu'il s'agit là d'une forme enzymatique très nettement différente des autres formes.

4 - On pourrait supposer qu'entre 0 et 24 heures de germination, l'activité enzymatique des formes II et IV serait due à l'existence d'enzyme du type "foetal" comme chez les enzymes d'origine animale. Le taux de ces enzymes est minimum au bout de 24 heures et il augmente par la suite. Nous n'avons pas noter de variation importante du taux de protéine qui pourrait expliquer ce phénomène. Nous ne pouvons pas savoir s'il s'agit, à partir de 24 heures de germination, d'une synthèse de nouvelles enzymes ou d'une réactivation d'enzymes présentes dans le milieu ou s'il s'agit d'une augmentation de la biosynthèse des enzymes préexistantes dans la graine dormante.

5 - L'activité des différentes formes enzymatiques variant dans le temps, nous avons pensé qu'elle pouvait aussi varier en fonction des différentes parties de la graine.

# III - LOCALISATION DES N-ACÉTYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASES DANS LA GRAINE

Jusqu'à présent, les différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases ont été obtenues par un broyage de la graine dans sa totalité. Pour caractériser des localisations différentes, les graines sont disséquées en : endosperme, cotyledon et axe embryonnaire. Chacune des trois parties de la graine est traitée séparément. Les activités enzymatiques sont ramenées à un même taux de protéine pour pouvoir être comparées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII (p. 75), les remarques sont les suivantes :

l - La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I est localisée uniquement dans le cotyledon où elle représente 19 p. 100 des enzymes.

2 - La N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase II est localisée dans l'endosperme et le cotyledon où elle représente, respectivement, 95 et 79 p. 100 des enzymes.

3 - La N-acétyl-β-D-hexosaminidase III se retrouve dans l'endosperme,
les cotyledons et l'axe embroynnaire où elle représente respectivement 0,2, 0,7 et
8 p. 100 des enzymes.

# TABLEAU XII

			·
Endosperme	Cotylédon	Axe embryonnaire	Forme enzymatique
0	100	0	Ι
13	86	0	II
2,1	73,5	24	III
12	24	63	IV

Localisation des activités N-acétyl-β-D-hexosaminidasiques dans les graines après une germination de 48 heures

L'activité dans chaque partie de la graine pour chaque forme enzymatique est calculée par rapport à l'activité totale de chaque forme (Activité obtenue pour des graines broyées entières).

4 - La N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV se retrouve dans l'endosperme,
les cotyledons et l'axe embryonnaire où elle représente, respectivement 4,5, 1 et
92 p. 100 des enzymes.

Des résultats similaires ont été obtenus par McCLEARY et MATHESON (78) avec la  $\beta$ -D-mannosidase de la luzerne. Ces auteurs caractérisent deux formes A et B, l'une (A) est présente dans le cotyledon et l'embryon, l'autre (B) ne se retrouve que dans l'endosperme. Chez les animaux, la répartition des enzymes est, elle aussi, variable, on distingue les enzymes lysosomales et les enzymes cytosolubles. Parmi les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase, si on rencontre dans tous les tissus les formes A et B, la forme C (22) n'est caractérisée que dans le cerveau.

Nous observons donc un phénomène qui est général chez les hydrolases et nous pensons que, dans notre cas, les différentes activités N-acétyl-β-D-hexosaminidasiques sont, en fait, des enzymes différentes et non des isoenzymes. C'est par l'étude séparée des propriétés physico-chimiques et enzymatiques que nous pensons pouvoir vérifier cette hypothèse.

# **IV - PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES**

### A - DETERMINATION DU PH OPTIMUM D'ACTIVITE.

Le pH optimum d'activité a été mesuré à l'aide des solutions de McILVAINE (79). Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII (p. 77).La première remarque qui peut être faite est la différence qui existe entre le pH optimum de l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique de la forme I et de la forme III (variation de 0,5 unité de pH). L'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique nécessite toujours un pH plus acide. On peut, en outre, noter un démarquage très net existant entre le pH optimum des formes II, III et IV d'une part, et de la forme I d'autre part (variation de une unité de pH).

B - STABILITE AU pH.

La stabilité des différentes N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases a été mesurée dans une zone de pH comprise entre pH 3,5 et pH 7,5. Pendant des temps courts (2 à 5 heures) à 37°C, les enzymes sont stables, exception faite pour les enzymes stabilisées dans un tampon pH 3,5. A cette valeur de pH, la perte d'activité est fonction du temps. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIV (p.78) . La perte d'activité maximale de 70 p. 100 pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et 60 p. 100 pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique. Cette dernière

# TABLEAU XIII

# Détermination du pH optimum d'activité des N-acéty1-β-D-hexosaminidases

Formos ongumatiques -	ACTI	VITES
rormes enzymatiques	N-acéty1-β-D- glucosaminidasique	N-acétyl-β-D- galactosaminidasique
I	6,0	5,5
II	5,0	5,0
III	5,0	4,4
IV	4,8	4,6

BUS

- 77 -

TABLEAU XIV

Stabilité des différentes formes de N-acétyl-8-D-hexosaminidase à pH 3.5

Les résultats sont exprimés en p. 100 d'activité résiduelle

		V	2-N 24:+	arétvl-8-D-		Act	tivité N-ac	éty1-8-D-	
			glucosamir	nidasique		80	alactosamin	idasique	
	Formes enzymatiques			P1	céincubatio	n en heure	S		
		2	2	24	48	2	5	24	48
	Ι	60	. 58	47	47	78	63	64	64
	II	77	75	67	64	92	80	74	20
	III	56	52	43	38	72	55	47	36
	IV	83	73	33	29	82	65	44	37
IIC						1			

- 78 -

activité est toujours plus résistante que la première. Pour des valeurs de pH plus élevées mais inférieures à pH 6,5 et pour des périodes d'incubation plus longues (supérieures à 96 heures) la stabilité des formes enzymatiques est maximale au niveau de leur pH optimum. Pour des valeurs de pH comprises entre pH 6,5 et pH 7,5, la perte d'activité est de l'ordre de 10 à 20 p. 100 après une période d'incubation de 3 jours.

Quand les solutions enzymatiques sont conservées à 4°C (à leur pH optimum d'activité), on remarque dans tous les cas l'apparition d'une nouvelle forme de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. Cette forme a été décrite par LINEATTE (71). Nous pensons qu'il s'agit d'une forme ultime de dégradation des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (masse moléculaire faible, 60.000: constantes cinétiques très faibles).

## C - DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE.

La température optimale a été déterminée pour chaque N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase, elle est de 40°C pour la forme I, 42°C pour la forme II et 45°C pour les formes III et IV. Les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase sont stables jusqu'à une température de 40°C. L'instabilité commence à apparaître à partir de 45°C. L'activité enzymatique est complétement détruite à 60°C.

Les énergies d'activation ont été déterminées graphiquement et par application de la formule mathématique donnée page 22. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XV (p. 80). L'énergie d'activation la plus basse est celle de la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase III, la plus élevée celle de la forme II. Les énergies d'activation, pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique, sont toujours supérieures à celles de l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique correspondante.

Des résultats analogues sont obtenus par AGRAWAL et BAHL (2) pour la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase isolée du haricot  $E_a = 9.800$  cal mole<sup>-1</sup>  $Q_{10}$  1,7-1,9. Les  $Q_{10}$  que nous mesurons entre 25 et 35°C varient en fonction des formes et de l'activité enzymatique. Nous remarquons, cependant, que le  $Q_{10}$ , pour la forme I, est identique pour les deux activités N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasiques.

### D - STABILITE A LA TEMPERATURE.

Les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines germées de Fenugrec ont été soumises à des températures comprises entre 45°C et 55°C. A 45°C, commence

- 79 -

# TABLEAU XV

# Détermination des énergies d'activation ( $E_a$ ) des différentes N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases

(l'énergie d'activation est exprimée en cal.mole<sup>-1</sup>)

	Activité N-acé glucosaminic	étyl-β-D- lasique	Activité N-acétyl-β-D- galactosaminidasique		
Formes enzymatiques	Ea	Q <sub>10</sub>	Ea	Q <sub>10</sub>	
I	5.263	1,4	9.014	1,4	
II	6.913	1,3	12.485	1,7	
III	4.490	1,25	8.599	1,5	
IV	4.815	1,38	10.328	1,6	

la dénaturation thermique, à 55°C l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique est pratiquement détruite. Nous avons choisi une température de 50°C ± 2°C pour étudier la stabilité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases vis-à-vis de la chaleur. Cette température est, en outre, celle qui a été utilisée par ROBINSON et STIRLING (97) pour caractériser les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases A et B dans les tissus animaux. Ces conditions sont devenues pratiquement une méthode standard permettant de mettre en évidence les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases quand elles existent. Les résultats que nous avons obtenus pour des enzymes stabilisées dans une solution tampon dont le pH correspond au pH optimum des différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases à 50°C, sont rassemblés dans la figure 14 (p. 82).

Les remarques que nous pouvons faire sont les suivantes :

l - La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I est la forme la plus thermolabile. Après 15 minutes de chauffage à 50°C, la perte d'activité est de l'ordre de 83 p. 100. L'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique est un peu plus résistante aux conditions de chauffage.

2 - Les N-acéty1-β-D-hexosaminidases II, III et IV sont, toute proportion gardée, thermostables, par rapport à la forme I. Les pertes d'activités sont de l'ordre de 60 p. 100 pour la forme II et de 30 p. 100 pour les formes III et IV, après une incubation de 15 min.

Nous retrouvons, ici, la propriété qui permet de différencier, chez les animaux, les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases A et B, exception faite des N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases du rein de Porc décrites par WETMORE et VERPOORTE (136). Dans ce cas précis, on ne distingue pas de différence de stabilité à la chaleur. Quand l'une des formes est instable, ROBINSON et STIRLING (97) ont démontré que la forme A possédait une demie-vie de 10 minutes à 50°C et la forme B une demie-vie de 27 minutes dans les mêmes conditions.

Certains auteurs ont même caractérisé, au cours des expérimentations à 50°C, la possibilité de passer de l'une des formes instables à la forme stable, sans disparition notable de l'activité, nous ne citerons, par exemple, que les travaux de TALLMAN et al. (121). Cette constatation est d'ailleurs maintenant largement controversée.

3 - Les différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases des graines de Fenugrec semblent être formées de deux composants. En effet, les courbes de stabilité en fonction de la température sont d'allure biphasique. L'un des composants serait très sensible à la chaleur, le deuxième composant étant beaucoup plus

- 81 -



- 82 -

stable. Les mêmes constatations sont faites quand on étudie les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origine animale. Ces résultats laissent supposer que les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (quelle que soit leur origine) sont des édifices po-lymériques.

### E - DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES.

La vitesse initiale de réaction varie de façon linéaire avec la concentration en substrat. La concentration limite est de 7 mM pour les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases III et IV, elle est de 2mM dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase I et de 5 mM dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II. Dans les deux derniers cas, on obtient des inhibitions par excès de substrats quand celuici est en concentration trop élevée. La constante de Michaelis (Km) et la vitesse maximale de réaction (Vmax) sont calculées à partir de la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (72). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau XVI (p. 84).

La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III possède la vitesse maximale de réaction la plus élevée : 323 n.moles par seconde et par milligramme de protéine enzymatique. Dans un ordre décroissant, nous avons ensuite les vitesses de la forme IV, de la forme I et de la forme II. Si on examine l'activité N-acétyl- $\beta$ -Dgalactosaminidasique, on remarque que c'est toujours la forme III qui possède la vitesse maximale la plus grande, suivie de la forme I, de la forme IV et de la forme II.

Nous pouvons, d'autre part, remarquer que les Km et les Vmax sont différents d'une forme de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase à une autre forme (et ceci quelle que soit l'activité envisagée) vis-à-vis des hétérosides de synthèse. Les N-acétyl-hexosaminidases des graines de Fenugrec ne sont pas, a priori, des enzymes isodynames. Ce qui les différencie des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origine animale. On peut donc penser qu'il s'agit d'hétéro-enzymes. Avant de démontrer qu'il en est ainsi, nous avons vérifié si les enzymes du Fenugrec supportaient les deux activités N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique sur la même protéine, avec un site unique de catalyse. On peut démontrer de différentes façons qu'une protéine est porteuse de deux activités enzymatiques.

 1 - On mesure le rapport des deux activités N-acétyl-β-D-glucosaminidasique et N-acétyl-β-D-galactosaminidasique tout au long des différentes étapes de fractionnement (de la solution brute à la solution enzymatique purifiée). Si les deux activités sont portées par la même protéine, le rapport sera constant. Les

- 83 -

TABLEAU XVI

Détermination des paramètres cinétiques des N-acétyl-β-D-hexosaminidases

es de six expériences).

	(Les valt	eurs sont le	s valeurs moyennes	o vre an			
	N-acétyl-f glucosamin:	3-D- idase	N-acétyl-β- galactosamini	D- dase	N-acétyl- N-acétyl-β	β-D-glucosamini + -D-galactosamin	dase idase
Forme enzymatique	substrat pNP	-GlcNAc	substrat pNP-G	alNAc	pNP-G1cNAc +	· pNP-GalNAc : α	= 1,03
	Km mM	Vmax <sub>1</sub> *	Кт тМ	Vmax <sub>2</sub> *	Vmax <sub>1</sub> + Vmax <sub>2</sub> V	max calculée V <sub>m</sub> **	lax mesurée
I	0,04 ± 0,004	4,8	0,15 ± 0,01	3,95	8,75	4,53	4,28
II	0,62 ± 0,08	2,40	0,55 ± 0,06	1,49	3,89	1,92	1,99
III	0,087 ± 0,001	323,7	0,09 ± 0,01	49	373	189,4	181,6
IV	0,37 ± 0,02	52	0,04 ± 0,02	2,7	54,7	7,6	7,7

\* Vmax est exprimée en n.mole par seconde et par milligramme de protéine Vmax<sub>A + B</sub> Vmax<sub>B</sub> ۱ Vmax<sub>A</sub> + B Vmax<sub>A</sub> ŧ Km<sub>A</sub> otKm<sub>B</sub> \*\* Vmax calculée d'après la formule

RUS

84 ----

résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XVII (p. 86). Quelle que soit l'étape de purification ou de germination, le rapport des deux activités reste constant. Cependant, si nous regardons d'un peu plus près le rapport de ces deux activités, nous remarquons qu'il est variable d'une forme à une autre. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVIII (p.87).Nous remarquons que la N-acétyl-β-D-hexosaminidase I hydrolyse pratiquemment de la même façon les N-acétyl-glucosaminides et les N-acétyl-galactosaminides.

La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase IV est 17 fois plus active sur les N-acétyl-glucosaminides par rapport aux N-acétyl-galactosaminides. Nous retrouvons ici une des propriétés décrite par PENTON *et al.* (91) concernant la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase C du placenta humain. Dans le cas de la maladie de Tay-Sachs, la présence de N-acétyl-hexosaminidase B ne permet pas l'hydrolyse des gangliosides à N-acétyl-galactosamine, il se peut donc, dans ce cas, que la N-acétyl-hexosaminidase B soit la forme enzymatique qui présente le rapport le plus élevé des deux activités N-acétyl-hexosaminidasique, l'enzyme ne serait capable que d'hydrolyser les N-acétyl-glucosaminides. L'impossibilité de dissocier les deux activités enzymatiques fait que nous pensons pouvoir affirmer que les activités N-acétyl- $\beta$ -Dglucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique des graines de Fenugrec sont portées par la même protéine. Cette propriété semble être générale chez les N-acétyl-hexosaminidases, sauf chez les microorganismes tels que *Bacillus subtilis* (BERKELEY *et al.* (17)) et *Diplococcus pneumoniae* (résultats personnels).

2 - Le fait d'avoir démontrer l'existence de deux activités portées par la même protéine nous amène à rechercher s'il existait deux sites ou un seul site de catalyse. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XVI(p. 84). Ils sont conformes à ce que nous attendions. Le site de catalyse est unique pour les deux activités enzymatiques envisagées. D'autres propriétés, que nous verrons par la suite, viendront renforcer l'exactitude de cette conclusion.

### F - ACTION DE LA SERUMALBUMINE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Il est connu que la serumalbumine peut jouer un rôle sur les paramètres cinétiques d'une enzyme. Dans le cas général, des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases, on remarque que la serumalbumine augmente la vitesse de la réaction sans modifier la constante de Michaelis. A la vue de ces résultats, on pense généralement que la serumalbumine joue un rôle de protection au niveau de l'enzyme (on stabilise d'ailleurs des activités enzymatiques labiles par de la serumalbumine). Nous avons remarqué que la serumalbumine possédait une action sur les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases

# TABLEAU XVII

# 

	N-acétyl-β-D- hexosaminidase U.mg	N-acétyl-β-D- galactosaminidase U.mg	Rapport
Temps de germination en heures			
0	0,0015	0,0006	2,48
24	0,0040	0,0015	2,66
48	0,033	0,013	2,54
96	0,023	0,009	2,55
144	0,006	0,0024	2,50
Etape de fractionnement			
DEAE-cellulose	2,36	0,94	2,5
ConA	2,70	1,06	2,55
Affinité	92,2	37,0	2,49

(aus)

- 86 -

## TABLEAU XVIII

Rapport des activités  $\frac{N-acety1-\beta-D}{N-acety1-\beta-D}$ 

<u>N-acéty1-β-D-glucosaminidase</u> N-acéty1-β-D-galactosaminidase

Forme enzymatique	DEAE-cellulose	Con A	Affinité
I	1,3	1,27	1,25
II	2,2	2,3	2,35
III	6,0	6,2	6,5
IV	17	17	18

Ces activités sont déterminées pour des graines ayant germées pendant 48 heures

(BHS) ULLE

- 87 -

des graines de Fenugrec. Il y a augmentation de la vitesse de réaction sans que le Km soit modifié. Les activités N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasiques I et II sont augmentées respectivement de 50 p. 100 pour la première et de 100 p. 100 pour la seconde. Les N-acétyl-glucosaminidase III et IV ne sont pas dépendantes de la serumalbumine (Fig. 15A, p. 89).

Quand on étudie la variation de l'activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique vis-à-vis de la serumalbumine, nous remarquons que seule la forme I est activée. Cette augmentation est de l'ordre de 50 p. 100 (Fig.15B , p. 89). Les autres formes ne sont que très peu influencées (variation de 10 à 20 p. 100).

L'activation par la serumalbumine est surtout appréciable dans le cas des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases I et II. Il est à noter que ces formes enzymatiques possèdent des vitesses maximales de réaction faibles par rapport aux Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases III et IV. D'autre part, nous le verrons par la suite, les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases I et II possèdent les masses moléculaires les plus faibles. L'action de la serumalbumine serait inversement proportionnelle à la masse moléculaire. Il semblerait que les formes enzymatiques I et II auraient besoin d'un certain environnement protéique pour pouvoir fonctionner correctement.

# G - ACTION DE DIFFERENTS CATIONS SUR L'ACTIVITE N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDA-SIQUE.

Nous avons déjà montré (BOUQUELET et SPIK (20)) que l'activité Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique des graines germées de Fenugrec était modifiée par la présence ou non de différents cations. Nous avons étendu ces travaux aux quatre formes d'enzymes purifiées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIX (p. 90).

L'EDTA est sans action sur l'activité enzymatique (LINEATTE (71)). Nous pensons pouvoir affirmer que les différentes N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases ne sont pas des metallo-protéides ni des enzymes à metal-dependant.

L'étude de l'action des cations nous a apporté cependant des résultats intéressants. Il s'agit de ceux obtenus après action des ions ferreux, ferriques et mercuriques.

1 - Action des ions ferreux

On sait que les sels de fer ferreux sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique, des résultats identiques ont été obtenus pour les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases II, III et IV. La perte d'activité est de l'ordre de 40 à 60 p. 100

- 88 -





Action de la serumalbumine bovine sur l'activité N-acétyl-B-D-hexosaminidasique

- A Activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique
- B Activité N-acéty1-β-D-galactosaminidasique

N-acéty1-β-D-hexosaminidase I

- ◊---◊ N-acéty1-β-D-hexosaminidase II
- $\triangle$ — $\triangle$  N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase III
- ♦----♦ N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV

- 89 -

# TABLEAU XIX

Action de différents cations sur l'activité enzymatique

Cations 10 mM	t	N-acéty glucosan forme mol	l-β-D- ninidase éculaire		1	N-acéty galactosa forme mo	yl-β-D- aminidase léculaire	2
	I	11	III	IV	I	II	III	IV
Ca <sup>2+</sup>	96.9	98.9	98.7	102	96	99	97	94
Zn <sup>2+</sup>	102	101	97.5	96	100	102	97	97
Mg <sup>2+</sup>	102.7	100	101	94.5	101	102	108	101
Mn <sup>2+</sup>	101	93.2	94.3	97	97	96	98	94
Cd <sup>2+</sup>	100	95	90	97	100	99	94	98
C0 <sup>2+</sup>	94	100	94.7	95	96	101	97	96
$Cu^{2+}$	109	100	98	97	98	102	99	97
Hg <sup>2+</sup>	4	0	. 0	0	<sup>.</sup> 5	0	0	0
Fc <sup>2+</sup>	167	43	61	58	177	42	12	34
Fe <sup>3+</sup>	102	66	60	80	160	106	83	94
Nat	97	97	96	99	98	96	94	97
Li <sup>+</sup>	114	109	102	101	102	<sup>.</sup> 103	101	99
Ag <sup>+</sup>	49	44	37	36	52	49	43	44
E.D.T.A.	100	101	99	108	101	100	99	102

90 -

dans les deux cas. On peut constater que le maximum d'activité est obtenu pour une concentration de 4 mM. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 16 (p. 92).

# 2 - Action des ions ferriques

Les sels ferriques n'ont pratiquement pas d'action sur les acticités des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV (la perte d'activité est de l'ordre de 20 à 30 p. 100). La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I présente des différences si on la compare aux autres formes. L'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidique est identique à celles précédemment citées, par contre, l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique est augmentée de 60 p. 100 comme dans le cas des ions ferreux, la concentration en ions ferriques nécessaires pour obtenir cette activation est de 1 mM au lieu de 4 mM dans le cas des ions ferreux. Les résultats sont rassemblés dans la figure 17(p. 93). Les mêmes constatations ont été faites par VERPOORTE (127) pour des enzymes isolées de la rate de Boeuf.

## 3 - Action du mercure

Toute activité enzymatique est, en général, inhibée par les sels de mercure. Cette méthode d'inhibition était surtout utilisée pour caractériser au niveau ou à proximité des sites actifs la présence de groupements thiols. Il est admis maintenant que les ions mercuriques peuvent réagir avec d'autres composés que les -SH, nous ne citerons que le cas du glycocolle, des acides aspartique et glutamique, de l'arginine et de la lysine. Dans ce dernier cas, les affinités du mercure pour ces différents acides aminés sont nettement plus faibles que pour la cystéine par exemple. Les expérimentations ont été réalisées à l'aide de l'ion mercurique (HgCl<sub>2</sub>) et d'un organomercurique, le p.chloromercuribenzoate de sodium (pCMB). La différenciation des résultats pourra provenir, d'une part, de la taille du dérivé mercuriel : l'ion mercurique pourra accéder beaucoup plus facilement aux -SH que le pCMB, les conformations spatiales des enzymes vont donc jouer un rôle prépondérant. D'autre part, la différenciation des résultats pourra provenir de la modification de réactivité des inhibiteurs: HgCl<sub>2</sub> est bifonctionnel dans ce sens qu'il peut réagir avec 2 ligands, les organomercuriques comme le pCMB ne sont que monofonctionnels.

Nous envisagerons successivement les résultats obtenus avec la Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I, d'une part, et ceux obtenus par les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase II, III et IV, d'autre part.

- 91 -



# Figure 16

Action des ions ferreux sur l'activité N-acétyl-ß-D-hexosaminidasique

- A Activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique
- B Activité N-acéty1-β-D-galactosaminidasique

N-acéty1-β-D-hexosaminidase I

- ◊→→ N-acéty1-β-D-hexosaminidase II
  - \_\_\_\_∆ N-acéty1-β-D-hexosaminidase III
- ♦\_\_\_\_♦ N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV

- 92 -



Action des ions ferriques sur l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique

BU: ULU

- A Activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique
- B Activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique

●----● N-acéty1-β-D-hexosaminidase I

- N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase II

 $\Delta$  —  $\Delta$  N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase III

N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV

#### a - Cas de la N-acétyl-β-D-hexosaminidase I

## 1) Inhibition par les sels mercuriques

Les résultats sont rassemblés dans la figure 18 (p. 95).

Pour une concentration de l'ordre de 14  $\mu$ M en HgCl<sub>2</sub>, on obtient une inhibition de l'ordre de 85 p. 100 pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et de 65 p. 100 pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique. Quand on détermine le type de l'inhibition par la méthode de DIXON (37), on remarque qu'elle est de type non compétitive. La fixation du mercure ne se fait pas au niveau du site actif. Les constantes d'inhibition sont de 1,2  $\mu$ M pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et 1,6  $\mu$ M pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -Dgalactosaminidasique. Ces deux résultats sont en faveur de l'existence d'un seul site de catalyse pour les deux activités enzymatiques. L'addition de cystéine, après action des ions mercuriques, permet de lever l'inhibition mais on remarque que les concentrations de cystéine à ajouter sont toujours très supérieures à ce qu'on pouvait attendre, 100  $\mu$ M pour l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et galactosaminidasique, soit environ une concentration 5 fois plus élevée que prévue (Fig. 19, p. 96). C'est un fait qui est généralement admis sans qu'on puisse, pour le moment, donner une explication (TARENTINO et MALEY (122) ; VERPOORTE (127)).

## 2 - Inhibition par le p.CMB

En aucun cas, nous n'avons réussi à obtenir une inhibition à l'aide du pCMB. Les deux activités sont même légèrement activées pour des concentrations en pCMB comprises entre 0 et 5 mM.

## b - Cas des N-acéty1-β-D-hexosaminidases II, III et IV

### 1) Inhibition par les sels mercuriques

Les résultats sont rassemblés dans la figure 20 (p. 97). Lorsqu'on trace le log de l'activité résiduelle en fonction de la concentration en inhibiteur, on obtient des courbes à réponse biphasique comme cela a été obtenu pour de faibles concentrations en  $\text{HgCl}_2$  par TARENTINO et MALEY (122). Les deux activités N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et galactosaminidasique sont inhibées de la même manière. Le pourcentage d'inhibition est de 90 à 95 p. 100 pour une concentration de 14  $\mu$ M en HgCl<sub>2</sub>. La première partie de la courbe pourrait être le reflet de la fixation du mercure au hasard sur la molécule, la deuxième partie pourrait être la fixation du mercure au niveau ou à proximité du site actif de l'enzyme. TARENTINO et MALEY (122) pensaient que cette réponse biphasique était due à la présence d'isoenzymes

- 94 -



O--O Activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique

۰.



Réactivation des activités N-acéty1-β-D-hexosaminidasiques par la cystéine après action des sels de mercure A - Activité N-acétyl-8-D-glucosaminidasique

- B Activité N-acétyl-8-D-galactosaminidasique
- $\Delta$   $\Delta$  N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III ---- ♦ N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV ♦ N-acéty1-8-D-hexosaminidase II N-acétyl-β-D-hexosaminidase I

BUS

- 96 -


les expériences réalisées après isolement des différentes isoenzymes donnaient exactement les mêmes résultats. Il s'agit donc de réponse propre à la molécule enzymatique.

Les choses se compliquent encore quand on essaie de déterminer le type de l'inhibition par la méthode graphique de DIXON. Les courbes obtenues pour des concentrations en HgCl<sub>2</sub> comprises entre 0 et 5  $\mu$ M laissent supposer que l'inhibition est du type incompétitif (la pente des droites est identique pour différentes valeurs de concentration en substrat). Cependant, les résultats, pour des concentrations en sels mercuriques comprises entre 5 et 10  $\mu$ M, sont anormaux, on obtient des portions de droite hyperbolique, ce qui laisse supposer une inhibition incompétitive hyperbolique (Fig. 21, p. 99). Dans ce cas, le complexe secondaire formé par action de l'inhibiteur sur le complexe primaire ES peut se décomposer en redonnant le produit, l'inhibiteur et l'enzyme.

Pour se rendre compte de cette propriété, on trace le pourcentage d'inhibition en fonction de log I, le tracé est sigmoïde comme dans le cas de l'inhibition par excès de substrat (Fig. 21, p. 99). Ce phénomène se produit donc lorsque la concentration en ion  $Hg^{2+}$  est élevée. Nous avons voulu voir quelle était l'action de faible concentration en ion mercurique (0 à 2 µM) sur l'activité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV. Les résultats que nous avons obtenus montrent 1) qu'il n'y a pas d'inhibition entre 0 et 0,3 µM; 2) que pour des concentrations en  $Hg^{2+}$ , comprises entre 0,3 et 1,4 µM, l'inhibition produite était du type compétitif, les constantes d'inhibition qui ont été déterminées sont, respectivement, de 1,3, 0,7 et 0,44 µM pour les deux activités N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasiques des formes II, III et IV. (Fig. 22 p. 100).

Nous pensons donc que, dans le cas des formes II, III et IV, les ions mercuriques agissent, dans un premier temps, au niveau du site actif de l'enzyme et, quand la concentration en Hg<sup>2+</sup> augmente, cette action se porte sur la totalité de la molécule.

Comme dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I, l'inhibition est levée lorsqu'on ajoute de la cystéine dans le milieu. L'activité est complétement restaurée pour une concentration de 200  $\mu$ M dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase IV, 400  $\mu$ M dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III et 800  $\mu$ M dans le cas de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II. Les quantités de cystéine nécessaires à restaurer l'activité enzymatique sont inversement proportionnelles au Ki. Comme dans le cas précédent, les quantités de cystéine nécessaires sont très

98 -



Détermination du type de l'inhibition provoquée par les sels de mercure sur les N-acétyl-B-D-hexosaminidases II, III et IV

A - Représentation selon la méthode de DIXON

- En ordonnée : 1/v 10<sup>3</sup> vitesse initiale de réaction

- En abscisse : I concentration en inhibiteur

B - Représentation de KUHN

- En ordonnée : Inh : pourcentage d'inhibition

- En abscisse : logarithme décimal de la concentration en inhibiteur.

Nous n'avons représenté que le cas de la N-acétyl-β-D-hexosaminidase III. Les résultats sont identiques pour les autres formes.

ഹ

1



B - N-acétyl-8-D-hexosaminidase IV

nettement supérieures aux quantités théoriques. Dans la mesure où les sels mercuriques agissent au niveau du site actif on peut encore admettre ces résultats qui seraient dus aux différences d'affinité entre -SH protéique et -SH de la cystéine. (Fig. 19 p. 96).

#### 2) Inhibition par le p. CMB

Contrairement à la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I, le p. CMB possède une action inhibitrice sur l'activité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV. L'inhibition est du type compétitif mais il est à signaler une anomalie, jusqu'à présent, les constantes d'inhibition étaient toujours pratiquement identiques pour une forme donnée, quelle que soit l'activité envisagée, dans le cas du p. CMB, les valeurs de Ki sont différentes quand on envisage les deux activités de la même forme. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XX (p.102). Ces variations pourraient être dues à des modifications de conformation spatiale.

# H - ACTION DU SDS SUR L'ACTIVITE N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASIQUE.

L'utilisation du SDS dans de nombreuses techniques nous a amené à étudier l'action de ce composé sur l'activité enzymatique. Les résultats sont illustrés par la figure 23(p. 103). On constate, encore une fois, un comportement très nettement différent entre la N-acétyl-B-D-hexosaminidase I d'une part, et les autres formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. Pour une concentration équivalente à 4 mM, l'activité résiduelle N-acéty1-β-D-glucosaminidasique I est de l'ordre de 40 p. 100, l'activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique est complètement détruite à cette concentration. C'est la première fois que nous caractérisons une activité Nacétyl-B-D-galactosaminidasique plus labile que l'activité N-acétyl-B-D-glucosaminidasique. L'inhibition de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique donne une réponse linéaire, l'activité N-acétyl-β-D-galactosaminidasique donne une réponse biphasique. Les N-acéty1-B-D-hexosaminidases II, III et IV donnent des réponses biphasiques quelle que soit l'activité envisagée. Les activités N-acétyl-β-D-galactosaminidasiques sont, comme dans le cas de la forme I, plus sensibles à l'action du SDS que les activités N-acéty1-B-D-glucosaminidasiques. On pourrait penser que la première partie de la courbe, zone dans laquelle l'inhibition est faible, correspondrait à l'action du SDS sur la périphérie de la molécule sans entraîner de modification notable de la conformation des sites actifs. La deuxième partie de la courbe, par contre, rendrait compte du changement de conformation des sites actifs sans pour cela que le SDS agisse obligatoirement au niveau de ces sites.

- 101 -

## TABLEAU XX

Action du p. chloromercuribenzoate de sodium sur l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique La constante d'inhibition est donnée en mM

	N-acéty glucosa	71-β-D- minidase	N-acéty galactosa	1-β-D- minidase
Forme enzymatique -	Ki	nombre d'expériences	Ki	nombre d'expériences
N-acétyl-β-D- hexosaminidase II	1,28 ± 0,04	3	4,2 ± 0,3	3
N-acétyl-β-D- hexosaminidase III	0,59 ± 0,09	8	1,22 ± 0,18	6
N-acéty1-β-D- hexosaminidase IV	0,71 ± 0,05	3	1,25 ± 0,17	6



- 102 -



#### I - ACTION DES ANALOGUES STRUCTURAUX

Les analogues structuraux que nous avons choisis sont les suivants : N-acétyl-D-mannosamine, N-acétyl-D-glucosamino-(1,5)-lactone et N-acétyl-D-galactosamino-(1,5)-lactone.

### 1 - Action de la N-acétyl-D-mannosamine

En aucun cas nous n'avons obtenu d'inhibition d'activité N-acétylβ-D-hexosaminidasique et cela même pour des concentrations allant jusqu'à 85 mM.

### 2 - Action des aldonolactones correspondantes

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXI (p.105). Les constantes d'inhibitions sont très faibles, les lactones sont de puissants inhibiteurs de l'activité enzymatique en général (LEABACK ( $^{64}$ )). On remarquera que l'activité inhibitrice de la N-acétyl-galactosamino-(1,5)-lactone est plus importante que celle de la N-acétyl-glucosamino-(1,5)-lactone. Les constantes d'inhibition sont identiques quelle que soit la forme enzymatique envisagée (valeur moyenne 0,011 mM). Dans le cas de la N-acétyl-D-glucosamino-(1,5)-lactone, les valeurs des constantes d'inhibition sont différentes pour chacune des formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase.

D'une façon générale, l'inhibition par les lactones est une inhibition compétitive. Pour une forme de N-acétyl-β-D-hexosaminidase choisie, les constantes d'inhibition sont identiques quelle que soit l'activité enzymatique choisie. Cette dernière constatation vient en plus renforcer l'hypothèse de l'existence d'un seul site de catalyse pour deux activités enzymatiques différentes.

J - RETRO-ACTION PAR LES PRODUITS LIBERES.

L'hydrolyse enzymatique libère de la N-acétyl-D-glucosamine et de la N-acétyl-D-galactosamine. Ces produits peuvent inhiber la réaction enzymatique par retro-inhibition. Nous avons cherché dans quelles conditions ces produits pouvaient agir sur la réaction. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXII (p.106).L'inhibition obtenue est du type inhibition compétitive. Comme dans le cas des lactones précédemment citées, la N-acétyl-D-galactosamine est plus inhibitrice que la N-acétyl-D-glucosamine. Cette propriété est surtout très nette pour les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases I et II (rapport 1 à 15). L'action est beaucoup plus nuancée pour les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases III et IV (rapport 1 à 6 et 1 à 2, respectivement). Il semble y avoir une relation entre ces valeurs de Ki et le rapport des activités N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-

# TABLEAU XXI

	N-acétyl-D-glucosa	amino (1,5) lactone	N-acétyl-D-galacto	samino (1,5) lactone
Forme enzymatique —	N-acétyl-β-D- glucosaminidase	N-acétyl-β-D- galactosaminidase	N-acéty1-β-D- glucosaminidase	N-acétyl-β-D- galactosaminidase
I	0,068 ± 0,004	0,071 ± 0,006	0,01 ± 0,002	0,012 ± 0,001
II	0,119 ± 0,01	0,134 ± 0,015	0,011 ± 0,003	0,011 ± 0,002
III	0,080 ± 0,007	0,087 ± 0,005	0,01 ± 0,001	0,011 ± 0,001
IV	0,121 ± 0,06	0,148 ± 0,05	0,011 ± 0,001	0,012 ± 0,003

Constante d'inhibition (Ki mM) vis-à-vis des aldono-lactones correspondantes

Valeurs moyennes de 4 expérimentations



- 105 -

## TABLEAU XXII

Action de la N-acétyl-D-glucosamine, de la N-acétyl-D-galactosamine et des ions acétate sur les N-acétyl-β-D-hexosaminidases Détermination des constantes d'inhibition (Ki mM). Valeurs moyennes de trois expérimentations.

N-acéty Formes		D-glucosamine	N-acéty1-D	-galactosamine	Ions	Ions acétate		
enzymatiques	N-acétyl-β-D- glucosaminidase	N-acétyl-β-D- galactosaminidase	N-acéty1-β-D- glucosaminidase	N-acéty1-β-D- galactosaminidase	N-acétyl-β-D- glucosaminidase	N-acétyl-β-D- galactosaminidase		
Ĩ	44 ± 2,2	42 ± 1,4	4,9 ± 0,6	4,5 ± 0,7	38 ± 2,1	39 ± 2,5		
II	37,5 ± 2,3	39,5 ± 1,2	1,4 ± 0,22	1,35 ± 0,44	17 ± 0,8	19 ± 1,5		
III	20,5 ± 1,2	18,5 ± 0,9	3,8 ± 0,46	3,5 ± 0,1	29 ± 0,9	28 ± 1,2		
IV	15 ± 1,5	17,5 ± 2,1	6,6 ± 1,0	7,25 ± 0,8	29 ± 2,5	31 ± 2		



106 -

L

galactosaminidasique (cf. p. 85). D'une façon générale, s'il y a variation des constantes d'inhibition d'une forme à une autre, pour une même forme, ces constantes sont identiques quelle que soit l'activité envisagée. Ce qui renforce toujours l'hypothèse d'un seul site de catalyse pour deux activités enzymatiques.

#### K - ACTION DES IONS ACETATES.

On sait que les solutions tampons renfermant les ions acétates diminuent l'activité des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (97). Nous avons essayé de savoir quelle était en fait l'action de ces ions acétates. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXII(p. 106). L'inhibition produite est du type inhibiteur compétitive, ceci dans tous les cas envisagés. Les valeurs des constantes d'inhibition sont pratiquement identiques exception faite de la Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II. On peut supposer, à la vue de ces résultats, qu'il existerait sur la molécule enzymatique un site de reconnaissance du radical acétyl, il serait identique quelle que soit la forme de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase.

En effet, lorsqu'on étudie l'action de composé tel que D-glucose, D-galactose, D-mannose nous n'enregistrons pas d'action inhibitrice, ce qui semble donc affirmer que la fonction N-acétylée est obligatoire pour que l'enzyme puisse agir.

## L - SPECIFICITE DES N-ACETYL-B-D-HEXOSAMINIDASES.

L'activité des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases a été étudiée vis-à-vis de différents substrats synthétiques et naturels. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIII (p.108).Les différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases ne possèdent pas toutes la même réactivité vis-à-vis des substrats utilisés.

L'activité va dépendre, dans le cas de substrats synthétiques, de la nature de l'aglycone. Nous remarquons que le pourcentage d'hydrolyse obtenu à l'aide des formes II, III et IV diminue, il augmente, par contre, dans le cas de la N-acétyl-β-D-hexosaminidase I. Des travaux analogues ont été réalisés par ARTYUKOV et al. (7) à l'aide de N-acétyl-hexosaminidases d'Ophiura sarsi. Les résultats de ces auteurs montrent que l'activité est tributaire de la nature de l'aglycone. Lorsqu'on étudie l'action des N-acétyl-β-D-hexosaminidases sur les substrats naturels, nous constatons que les réactivités vis-à-vis des différents types de liaisons à hydrolyser sont très variables.

# TABLEAU XXIII

Spécificité des N-acétyl-β-D-hexosaminidases vis-à-vis de substrats divers. Les résultats sont exprimés en p. 100 de N-acétyl-glucosamine libérée en 24 heures

	N-acétyl-β-D-hexosaminidase							
Substrats —	I	11	III	IV				
GlcNAc $\frac{\beta 1}{pNP}$ *	4,2	33	100	73				
GalNAc $\frac{\beta 1}{2}$ , pNP *	3,1	18	17	7,5				
GlcNAc $\stackrel{\beta_1}{\longrightarrow}$ MUB *	8,5	26,8	28,1	41,5				
GlcNAc $\beta_{1,4}$ GlcNAc	76	2,6	1,7	3,2				
GlcNAc $\frac{\beta_{1,4}}{\beta_{1,4}}$ GlcNAc $\frac{\beta_{1,4}}{\beta_{1,4}}$ MUB	98	0	0	0				
GlcNAc $\beta_{1,4}$ Man	51,3	0	0	0				
GlcNAc $\beta_{1,2}^{\beta_{1,2}}$ Man	.0 .	0	53	36,8				
GlcNAc $\beta_{1,6}$ Man	0	13	0	0				
GlcNAc $\beta 1, 3$ Gal $\beta 1, 4$ Glc	0	0	0	0				

\* Hydrolyse de 10 minutes seulement

La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I ne semble reconnaître que des résidus de N-acétyl-glucosamine liés par des liaisons  $\beta$ -1,4 glycosidiques. Cette forme enzymatique hydrolyse le chitobiose à une vitesse supérieure à celle obtenue par le disaccharide GlcNAc $\beta$ -(1,4)Man. VIKHA *et al.* (129) ont pourtant démontré que les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases possédaient des vitesses d'hydrolyse plus faibles quand on substituait un résidu de glucose ou de galactose par une N-acétyl-glucosamine. Nous avons d'ailleurs revérifié cette constatation avec les diverses N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origines diverses (cf. spécifi-

cité des N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases p. 45)

- 109 -

Dans notre cas précis, nous observons le phénomène inverse avec la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I. L'enzyme est plus active vis-à-vis des structures du type chitine plutôt que des structures du type glycoprotéidique. On peut penser que cette enzyme est une chitobiosidase analogue à celle décrite dans le serum humain {DELMOTTE ( 34)}. Nous observons, d'autre part, que l'activité de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I est maximale quand il s'agit d'hydrolyser le composé suivant : GlcNAc $\beta$ -(1,4)GlcNAc $\beta$ -(1,)MUB. Cette forme moléculaire pourrait donc agir spécifiquement sur les N-acétyl-glucosamines du chainon chitobiose au niveau du point d'attache dans les glycoconjugués à liaison N-glycosidique. Ceci expliquerait, d'autre part, le fait que cette N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I n'apparaisse qu'au bout de 48 heures de germination. L'enzyme n'apparaîtrait que pour obtenir une dégradation totale des glycoconjugués. Ceci laisse supposer que l'endo-Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase responsable de la coupure du chainon chitobiose n'existe pas chez les végétaux.

L'action des autres N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV est négative sur tout substrat à liaison  $\beta$ -1,4 glycosidique sauf dans le cas du chitobiose où les pourcentages d'hydrolyse restent cependant très faibles (1,7 à 3,2 p. 100). On peut penser qu'il s'agit d'une activité résiduelle de chitobiosidase après "évolution" des différentes formes de N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases.

La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,6 contractées par la N-acétyl-glucosamine. Cette forme enzymatique est, par contre, sans action sur les liaisons  $\beta$ -1,2 glycosidiques de la N-acétyl-glucosamine.

Les N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases III et IV hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,2 contractées par la N-acéty1-glucosamine.

Les différentes N-acéty1-β-D-hexosaminidases des graines de Fenugrec sont incapables d'hydrolyser les liaisons de type β-1,3 glycosidiques (nous avons observé, d'autre part, que la  $\beta$ -D-galactosidase des graines germées de Fenugrec était incapable d'hydrolyser le galactose enchaîné par une liaison  $\beta$ -1,3 glycosidique. Il faut aussi remarquer que les enzymes de la fève Jack hydrolysent de moins bonne façon les liaisons  $\beta$ -1,3. Il se pourrait que ce soit une propriété générale des enzymes d'origine végétale).

La différence observée entre les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines de Fenugrec et celles décrites dans la littérature est la suivante : les différentes formes moléculaires possèdent des spécificités différentes. De tous les cas de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases étudiées, seuls, TARENTINO et MALEY (122) d'une part, ont montré qu'il pouvait exister des différences de spécificité entre les deux formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. La variation de spécificité est très faible et elle ne joue que sur l'hydrolyse d'un tri-N-acétyl-chitotriose.

WENGER et al. (134) ont montré, d'autre part, que les N-acétylhexosaminidases A et B du foie normal possédaient des affinités différentes visà-vis du globoside (nomenclature de SVENNERHOLM (120)), la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase A possède une vitesse d'hydrolyse 3 fois supérieure à celle de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase B. Par contre, ces deux formes enzymatiques possèdent la même vitesse d'hydrolyse vis-à-vis du GA<sub>2</sub>.

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont que, contrairement aux N-acétyl-hexosaminidases décrites jusqu'à présent, les différentes formes moléculaires isolées des graines germées de Fenugrec sont fondamentalement différentes les unes des autres. Nous sommes en présence de N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases différentes. Dans le cas des formes enzymatiques III et IV, on peut penser être en présence d'isoenzymes (bien qu'elles ne soient pas isodynames).

M - CONCLUSIONS.

L'étude des propriétés enzymatiques des différentes formes de Nacétylhexosaminidases du Fenugrec nous a permis de mettre en évidence une différence fondamentale entre la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I, d'une part, et les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases II, III et IV, d'autre part.

La N-acétyl-β-D-hexosaminidase I ressemble à la forme A des hexosaminidases animales. Elle est beaucoup plus instable que les autres formes vis-àvis du pH ou de la température. Elle est cependant,chez les végétaux, la forme la plus basique, alors que chez l'animal, cette forme A est la N-acétyl-hexosaminidase

- 110 -

la plus acide. Cette N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I possède, d'autre part, des caractéristiques différentes vis-à-vis des effecteurs.

- 111 -

Mais, d'une façon générale, les quatre formes moléculaires de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases possèdent toutes la double activité N-acétyl- $\beta$ -Dglucosaminidasique et N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidasique. Ces deux activités sont portées par la même protéine, le rapport de ces deux activités est constant pendant toute la durée du fractionnement. Il est à noter que le rapport est différent selon la N-acétyl-hexosaminidase considérée, le rapport est croissant depuis la forme I qui hydrolyse de façon presque identique N-acétyl-D-glucosamine et N-acétyl-D-galactosamine jusqu'à la forme IV qui hydrolyse préférentiellement la N-acétyl-D-glucosamine. Il y aurait donc une "spécialisation" de la molécule vis-à-vis de la N-acétyl-glucosamine.

L'étude des paramètres cinétiques (Km, Vmax, Ki) démontre que si les deux activités enzymatiques sont portées par la même protéine, il n'y a qu'un seul et unique site de catalyse.

Ces propriétés semblent être générales chez les N-acétyl-β-Dhexosaminidases quelle que soit leur origine sauf toutefois celle de Bacillus subtilis (BERKELEY et al. (17)) et de Diplococcus pneumoniae (résultats personnels) où la N-acétyl-β-D-hexosaminidase est une N-acétyl-β-D-glucosaminidase stricte.

L'étude de la spécificité vis-à-vis de substrats de synthèse ou naturel nous a montré que la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I ne pouvait hydrolyser que les liaisons  $\beta$ -1,4 et préférentiellement les enchaînements de chitobiose. La Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II n'hydrolyse que les liaisons  $\beta$ -1,6. Les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases III et IV n'hydrolysent, par contre, que les liaisons  $\beta$ -1,2 contractées par la N-acétyl-glucosamine.

Nous pensons pouvoir conclure que ces différentes formes moléculaires possèdant des constantes cinétiques différentes vis-à-vis des substrats de synthèse et des affinités différentes vis-à-vis des substrats naturels sont, en fait, des enzymes différentes dont la répartition est différente à l'intérieur de la plante.

## V - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

### A - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES.

Les masses moléculaires sont déterminées par gel filtration sur co-

lonne de Sepharose 6B. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans la figure 24 (p. 113). Les masses moléculaires sont les suivantes : N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase I : 84.000 ± 10.000 daltons ; N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II : 72.000 ± 10.000 ; N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III : 180.000 ± 10.000 et N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase IV : 150.000 ± 10.000. La masse moléculaire des formes III et IV est en accord avec celles généralement citées dans la littérature pour des enzymes d'origine animale. Le mélange de ces quatre formes enzymatiques donne une masse moyenne de l'ordre de 140.000 ± 10.000 daltons.

Toutes les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases A et B caractérisées jusqu'à présent, pour un tissu donné, possèdent la même masse moléculaire sauf dans le cas des N-acétyl-hexosaminidases du rein de Cheval (SEYAMA et YAMAKAWA (103)) où l'une des trois formes (masse moléculaire<sup>250.000</sup>) serait une association des deux autres formes (masse moléculaire 125.000). On peut évidemment faire un rapprochement analogue dans le cas des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines de Fenugrec. On pourrait facilement émettre plusieurs hypothèses :

-	l'association	de	2	formes	Ι		donne	1	forme	III
	1'association	de	3	formes	II		donne	1	forme	III
-	1'association	de	2	formes	11		donne	1	forme	IV
	l'association	des	: 1	Formes	I et	II	donne	1	forme	IV

- les différentes formes ne peuvent pas être considérées comme des associations ou des dissociations de formes préexistentes.

Pour vérifier ces hypothèses, il suffit de démontrer que les différentes formes peuvent posséder des sous-unités communes, des compositions chimiques analogues, des propriétés immunologiques communes.

B - MISE EN EVIDENCE DE STRUCTURES SOUS-UNITAIRES.

Les masses moléculaires relativement élevées des différentes Nacétyl-β-D-hexosaminidases laissent prévoir une structure sous-unitaire. La caractérisation de ces sous-unités est réalisée en électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de NEVILLE (88). Quand les solutions enzymatiques sont maintenues pendant 30 minutes à 37°C dans le mélange SDS 5 p. 100, β-mercapto-éthanol 0,1 M, les résultats sont les suivants :

l - La N-acétyl-β-D-hexosaminidase I donne des bandes dont les masses moléculaires approximatives sont de 82.000 ± 2.000, 58.000 ± 2.000 et 34.000 ± 2.000 daltons. Les bandes les plus importantes sont celles de 58.000 et 34.000



## Figure 24

Détermination de la masse moléculaire des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases

I N-acéty1-β-D-hexosaminidase I

II N-acéty1-β-D-hexosaminidase II

III N-acéty1-β-D-hexosaminidase III

IV N-acéty1-β-D-hexosaminidase IV

Les protéines de référence utilisées sont les suivantes :

1. IgG bovine ; 2. Sérotransferrine humaine ; 3. Serumalbumine bovine ; 4.  $\beta$ -lactoglobuline bovine ; 5. Pepsine.

2 - La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II donne des bandes de masse moléculaire égales à 62.000 ± 2.000,54.000 ± 2.000 et 28.000 ± 2.000. La bande la plus importante est celle à 28.000 daltons.

3 - La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase III donne des bandes à 120.000, 52.000 ± 2.000, 38.000 ± 2.000 et 30.500 ± 2.000 daltons. Les intensités les plus importantes se situent à 52.000 et 38.000.

4 - La N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidases IV donne des bandes à 55.000 ± 2.000 et 35.000 ± 2.000 daltons.

Lorsque les conditions de dissociation des sous-unités sont changées (SDS 5 p. 100 et  $\beta$ -mercapto-éthanol 0,1 M, mais incubation 2 heures à 37°C) les résultats suivants sont obtenus (Fig. 25 p. 115) : une bande majeure apparaît dans tous les cas de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. La masse moléculaire peut être évaluée à 30.000 ± 2.000 daltons. Ce résultat laisse supposer que les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines germées de Fenugrec sont formées de structures sous-unitaires dont les masses moléculaires moyennes sont identiques sans pour cela que l'on puisse affirmer que les sous-unités soient identiques.

Toutes les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases caractérisées jusqu'à présent sont des enzymes constituées de différentes sous-unités (VERPOORTE (126)). Selon les auteurs, les sous-unités sont identiques quelle que soit la forme enzymatique envisagée (A ou B). C'est le cas de TALLMAN *et al.* (121) pour les N-acétylhexosaminidases A et B du placenta humain (sous-unité identique de 33.000 daltons de masse moléculaire). SRIVASTAVA *et al.* (110), par contre, montrent que la structure sous-unitaire des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases A et B du placenta sont différentes. La forme A donne des bandes de masse moléculaire égale à 18.000, 36.000 et 65.000 daltons. La forme B ne donne qu'une seule bande de 18.000 daltons, ceci dans les mêmes conditions de dissociation et pour une masse moléculaire identique.

La présence de sous-unités dans les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases a permis à ROBINSON *et al.* (99) de proposer, pour ces enzymes, l'existence d'un site actif commun aux différentes formes moléculaires porté par une sous-unité et d'un site responsable de la spécificité enzymatique (différent selon les formes) porté par une autre sous-unité. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les variations et les modifications d'activités dans le cas des maladies de Tay sach's et de Sandhoff. SRIVASTAVA et BEUTLER (109) émettent l'hypothèse que les N-acétyl-hexosaminidases A et B sont un assemblage de sous-unités différentes. La N-acétyl- $\beta$ -D-

- 114 -



## Figure 25

Mise en évidence de sous-unité après électrophorèse en gel de polyacrylamide après action du SDS

A - Electrophorèse des 4 formes natives de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases

B - Electrophorèse après action du SDS

I, II, III, IV, respectivement N-acétyl-β-D-hexosaminidases I, II, III et IV BB: Bleu de Bromophénol hexosaminidase A serait l'association de sous-unités  $\alpha$  et de sous-unités  $\beta$ . La forme B serait l'association de sous-unités  $\beta$ . On peut même établir leur formule brute :

> N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase A =  $(\alpha\beta)_{\eta}$ N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase B =  $(\beta\beta)_{\eta}$

n étant égale à 3 ou 2.

La forme tétramérique est reconnue par TALLMAN *et al.* (121) qui pensent que les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases sont formées de sous-unités identiques, la différence existente entre les deux formes ne serait que le reflet de variations de conformation spatiale dues à la stabilité ou à l'instabilité des formes tétramériques. La forme tétramérique est admise par BEUTLER *et al.* (18) avec cependant des compositions sous-unitaires différentes selon les formes de N-acétyl-hexosaminidases.

La forme hexamérique est proposée par SRIVASTAVA *et al.* (110), la forme A est un hétéropolymère, la forme B un homopolymère. La forme hexamérique est en partie confirmée par l'existence dans le rein et le foie de 5 formes moléculaires de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases (SRIVASTAVA *et al.* (110)). La figure <sup>26</sup> (p.117) résume cette hypothèse qui ne sera vérifiée que dans la mesure où on caractérisera l'homopolymère ( $\alpha$ )<sub>6</sub> qui parait-il existe mais est très instable (si on applique les lois de l'hybridation, on obtient des résultats différents, la forme homopolymérique  $\beta_6$  ne devrait représenter que 3 p. 100 de l'activité totale et la forme hétéropolymérique 27 p. 100. Expérimentalement, il s'agit de 40 p. 100 dans chaque cas. On pourrait expliquer cette différence dans la mesure où la forme homopolymérique possède une activité 10 fois supérieure à la forme hétéropolymérique. Or, les constantes cinétiques sont identiques).Il semble d'ailleurs que cette hypothèse d'hexamérisation soit petit à petit abandonnée au profit de la tétramérisation.

### C - DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES.

La détermination des points isoélectriques a été réalisée par électrofocalisation classique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 27 (p.118). Les valeurs des points isoélectriques sont en accord avec les élutions obtenues par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose. La Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I possède un pI = 6,78 ; la forme II un pI = 6,30 ; la forme III un pI = 4,92 et la forme IV un pI = 4,65. A la vue de ces résultats, il





Sile

Composition sous-unitaire des isoenzymes des hexosaminidases humaines. Diagramme d'élution des hexosaminidases du rein et de foie humain sur colonne de DEAE-cellulose (DE 52) selon SRIVASTAVA *et al.* (111). L'activité enzymatique est exprimée en p. 100 d'activité enzymatique totale. A = hexosaminidase A ; B = hexosaminidase B ; I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub> : hexosaminidases I ; S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> : hexosaminidase S.

7





Ţ

Courbe de pH

◊---◊ N-acétyl-β-D-hexosaminidase II

 $\Delta$  —  $\Delta$  N-acéty1-8-D-hexosaminidase III

BUS

semble que l'on a deux groupes d'hexosaminidases, les formes I et II, d'une part, et les formes III et IV, d'autre part. On obtient des résultats identiques quand on examine les valeurs des masses moléculaires : 72.000 et 84.000, d'une part pour les hexosaminidases II et I, 180.000 et 150.000 pour les formes III et IV. Ces faits laissent supposer que l'on pourrait avoir une filiation entre les formes I et III, d'une part, et les formes II et IV, d'autre part.

#### D - ETUDE DE LA COPULE POLYSACCHARIDIQUE.

Deux séries d'expérimentations ont été réalisées :

### 1 - Détermination de la composition centésimale

La composition centésimale en monosaccharide neutre des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases a été déterminée à l'aide de la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (123) modifiée par RIMINGTON (96).

La composition centésimale en osamine a été réalisée après hydrolyse chlorhydrique par la méthode d'ELSON et MORGAN (42) modifiée par BELCHER et al. (16). Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIV (p. 118).

# 2 - <u>Détermination de la composition et des rapports molaires des</u> différents monosaccharides

Nous avons employé la chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse des différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases selon la méthode de ZANETTA et al. (141) mise au point au Laboratoire par FOURNET (47). Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIV (p. 120).

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont les suivantes : les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases des graines de Fenugrec ne possèdent pas d'acide N-acétylneuraminique. Elles renferment, par contre, du fucose, du galactose, du mannose et de la N-acétyl-glucosamine. Les quantités de galactose sont toujours très faibles de l'ordre de 0,4 p. 100. Le monosaccharide le plus important est le mannose, nous n'avons jamais caractérisé de glucose dans nos préparations. Cependant, VERPOORTE (127), RUDICK et ELBEIN (100) ont caractérisé du glucose dans différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. A notre avis, il s'agit d'artefact de préparation dû à la chromatographie sur colonne de Sephadex G-200 (le glucose provient du support chromatographique). Jusqu'à présent, quelques compositions centésimales ont été déterminées sur les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. Le tableau XXV (p. 121) nous montre la grande diversité des résultats quant à la composition centésimale en oligosaccha-

# TABLEAU XXIV

# Composition centésimale des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases

Formes	Compos centés	ition imale	Composition molaire					
enzymatiques	Oses neutres	Osamines	Fuc	Gal	Man	GlcNAc		
I	3,25	1,78	0,81	0,1	4,5	2		
II	4,74	1,90	1,1	0,54	6,2	2		
III	6,28	1,80	1,06	0	9,1	2		
IV	5,5	1,80	0,8	0,86	8,07	2		

- 120 -

## TABLEAU XXV

Composition centésimale en oligosaccharides de quelques hexosaminidases d'origine animale

·		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		·		•	
Oligosaccharides	Hexosamin	idase (1)	Hexosaminidase (2)	Hexosamini	dase (3)	Hexosamini	dase (4)
	A	В	-	A	В	A	В
Acides sialiques	0,38	0,20	0,3		-	0	0
Oses neutres	3,2	1,4	4,6		· =	2,5	5,0
N-acétylglucosamine	0,3	. 0,8	0,6	2,6	1,5	2,45	3,40

121

(1) d'après VERPOORTE J.A. (126) {Rate de Boeuf, masse moléculaire 140.000}

(2) d'après VERPOORTE J.A. (127) {Plasma humain, masse moléculaire 105.000}

(3) d'après SRIVASTAVA et al. (110) {Placenta humain, masse moléculaire 140.000}

(4) d'après LEE et YOSHIDA (66) {Placenta humain, masse moléculaire 110.000}

rides. Certains auteurs tels que LEE et YOSHIDA (66) refutent même la présence d'acides sialiques sur les molécules de N-acétyl-hexosaminidases. Dans notre cas personnel, nous pensons pouvoir affirmer que les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases de graines de Fenugrec sont des glycoprotéines dont la copule polysaccharidique est du type oligomannosidique. Le ou les glycannes des différentes formes s'articuleraient sur la partie protéique par l'intermédiaire du chainon chitobiose (65, 105). Sur ce chainon serait fixé le tri-mannose et un certain nombre de mannoses variables selon les différentes formes enzymatiques. De notre étude, il ressort que le nombre de mannoses varie de 5 à 9. FORSEE et ELBEIN (45) et FORSEE *et al.* (46) ont démontré que de nombreuses glycoprotéines végétales étaient du type oligomannosidique (le nombre des molécules de mannose varie de 3 à 10). Des structures identiques ont été caractérisées par LAMPORT (63) toujours chez les végétaux où la copule protéique et riche en hydroxy-proline. Ces structures ont été confirmées ensuite par RUDICK et ELBEIN (100) dans certaines glycosidases d'Aspengillus fumígatus.

Les seules différences fondamentales que nous observons avec d'autres N-acétyl-β-D-hexosaminidases sont :

- absence d'acide sialique

- présence de fucose et de galactose.

Nous proposons comme modèle structural l'enchaînement suivant :

 $(Fuc)_{1} - (Ga1)_{0-1} - (Man)_{5-9} - (G1cNAc)_{2}$ 

Ce qui nous donne :

N-acéty1-β-D-hexosaminidase	I	:	Fuc-(Man) <sub>5</sub> -(G1cNAc) <sub>2</sub> -
N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase	II	:	Fuc-(Man) <sub>6</sub> -(GlcNAc) <sub>2</sub> -
N-acéty1-β-D-hexosaminidase	111	:	Fuc-(Man) <sub>9</sub> -(G1cNAc) <sub>2</sub> -
N-acéty1-β-D-hexosaminidase	IV	:	Fuc-(Gal) $_{0-1}$ -(Man) $_{8}$ -(GlcNAc) $_{2}$

E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXVI (p. 123). Nous remarquons que les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases forment un groupe relativement homogène d'enzymes. Il ne se trouve pas d'acides aminés dont le taux soit exceptionnel, on peut, toutefois, noter une assez forte teneur en proline (6 p. 100), chez les végétaux les glycoprotéines à mannose décrites jusqu'à présent n'ont que des teneurs de l'ordre de 3 p. 100 (PUSZTAI et WATT (93)). Cependant, toutes les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases étudiées jusqu'à

# TABLEAU XXVI

# Composition en amino-acides des différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidase

		moles p	p. 100			dus		
Hexosaminidases	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Amino-acides					, ,	•	·	
Acide aspartique	9,2	12	13	13,5	67	76,5	203	176
Acide glutamique	9,5	9,5	10,1	10,4	60	53	140,8	120,
Threonine	7	6,5	6,3	6,3	56	46	112	93,
Serine	10	12	8,1	8,2	98	98	167	141
Proline	6	5,5	5,4	5,8	52	41	100	89,
Glycocolle	9	11	8	8,1	121	137	248	209
Alanine	7,7	7,0	7,2	7,3	94,5	72	182,5	154
Cystéine	1,1	0,6	0,5	1,0	3,5	2,0	4,4	7,
Valine	3,6	3,5	4,3	4,7	32	26	78	72
Methionine	1,26	1,0	1,9	1,5	8,5	6	26	17,
Isoleucine	3,0	3,0	3,7	4,4	21,5	20	58,8	58,
Leucine	7,5	6,5	10,2	8,2	53	42	162	109
Tyrosine	4,0	2,5	3,2	3,5	21	16	35	33
Phenylalanine	6	4,0	5,1	4,8	35	20	62	48
Lysine	9	5,3	7	5,8	58	30	98	67,
Histidine	1,5	1,8	1,8	1,75	10	9,5	23,5	19
Arginine	3	2,9	2,4	3,0	17	13	27,5	29

- 123 -

présent, possèdent ce taux assez élevé de proline. On note, d'autre part, que le taux des acides aminés soufrés est faible.

Les compositions en acides aminés semblent être conformes aux résultats obtenus lors de la détermination des points isoélectriques. Le taux d'acide aspartique diminue quand le taux de lysine augmente.

Nous remarquons, d'autre part, en comparant les compositions des différentes formes que nous ne pouvons pas avoir de filiation entre les différentes formes, les pourcentages des différents constituants étant par trop différents. Les résultats obtenus sont donc en faveur de l'existence d'enzyme différente.

#### F - PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES.

Les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases réagissent toutes contre un antiserum anti-Fenugrec total. On remarque un raccordement d'arc pour les formes I et II, d'une part, et pour les formes III et IV, d'autre part. Les formes II et III, d'une part, et I et IV, d'autre part, donnent des arcs de précipitations qui se coupent ce qui laisse supposer que l'on n'a pas d'identité même partielle entre ces différentes formes (Fig. 28, p. 125). Lorsqu'on effectue l'immuno-diffusion contre un antiserum anti-forme I, on obtient uniquement des arcs de précipitation dans le cas des formes I et II et dans ce cas précis, il y a un raccordement total des deux arcs. Les formes III et IV ne donnent pas d'arcs de précipitations et ceci quelle que soit la concentration utilisée. Les résultats sont inversés quand on utilise un antiserum anti-forme III (Fig. 28, p.125).

Les résultats obtenus laissent supposer qu'il existe des déterminants antigéniques communs entre les formes I et II, d'une part et les formes III et IV, d'autre part.

On peut penser a priori qu'il y a deux groupes différents de Nacétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. La variation des propriétés immunologiques serait alors due à une modification des conformations spatiales plus qu'à des variations de composition en acides aminés ou en oligosaccharides. Si nous comparons nos résultats à ceux obtenus par d'autres auteurs pour des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origine animale, nous remarquons que nos enzymes d'origine végétale sont très différentes. En 1973, CARROLL et ROBINSON (26) montraient que les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases A et B du foie humain donnaient des réactions croisées sans présence de "spur". Il y a une réaction de complète identité immunologique entre les différentes formes de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases. Des observations identiques ont été faites par



AsIII : anti-serum anti-N-acéty1-8-D-hexosaminidase III

AsT : anti-serum anti-fenugrec total

Immunodiffusion des différentes formes de N-acétyl-8-D-hexosaminidases

I, II, III, IV : N-acéty1-β-D-hexosaminidases I, II, III, IV

AsI : anti-serum anti-N-acétyl-8-D-hexosaminidase I

- 125 -

BUS

GEIGER et al. (50), ces auteurs concluent, d'une part, que des enzymes en provenance de différents organes d'une même espèce sont immunologiquement identiques. Des résultats identiques ont été obtenus avec les Cathepsines D par DINGLE et al. (36), les asparaginases du Cobaye par SULD et HERBUT (116) et la citrate synthétase du Rat par MORIYAMA et SRERE (84). D'autre part, il peut y avoir des réactions croisées entre enzyme identique d'origine différente (humain et bovin, par exemple). Cette dernière propriété avait déjà été remarquée par SHERWIN et al. (106) dans le cas de la créatine phosphokinase (C.P.K.) du Lapin, où l'enzyme isolée du muscle donne une réaction croisée avec une C.P.K. isolée du muscle humain. Par contre, il n'y a pas de réaction croisée quand on fait réagir une C.P.K. de cerveau de Lapin avec une C.P.K. de muscle de Lapin. Pour ces auteurs, et dans ce cas précis, les antiserums formés sont spécifiques de l'origine organique de l'enzyme plutôt que de l'espèce considérée.

Des résultats analogues ont été démontrés par SUSSMAN et al. (118) dans le cas de la phosphatase alcaline isolée soit du foie, du placenta ou de l'os, des neutrophiles, du rein et de l'intestin. Ces auteurs caractérisent 3 types antigéniques différents, l'un dérivant du foie, l'autre du placenta et le dernier dérivant des autres sources. Il n'y a pas de réaction croisée entre les différentes formes moléculaires des phosphatases.

Une observation similaire est faite par REUSER et GALJAARD (95) au sujet de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase C des fibroblastes humains, qui n'est pas précipitable par un antiserum anti-forme A. Les déterminants antigéniques entre ces deux formes enzymatiques doivent être différents bien que les enzymes soient de même origine.

Nous pensons, à la vue de nos résultats, que nous sommes ramenés à un cas semblable. En effet, les formes I et II qui donnent une réaction croisée avec un antiserum anti-forme I ont pour origine l'endosperme et le cotyledon de la graine de Fenugrec. Par contre, les formes III et IV qui donnent, elles aussi, des réactions croisées vis-à-vis d'un antiserum anti-forme III trouvent essentiellement leur origine dans l'axe embryonnaire de la graine germée. Nous aurions dans la graine deux types antigéniques différents, l'un dans la zone de catabolisme de la graine, l'autre dans la zone où les biosynthèses sont les plus importantes.

G - CONCLUSIONS.

Les conclusions qui peuvent être tirées de l'étude fragmentaire des propriétés physico-chimiques sont les suivantes :

- 126 -

1 - Les N-acéty1-β-D-hexosaminidases des graines de Fenugrec possèdent des masses moléculaires différentes, elles varient de 72.000 à 180.000 daltons (il ne s'agit ni d'association ou de dissociation des différentes formes entre-elles).

2 - Les différentes formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases sont des enzymes polymériques. Les sous-unités possèdent une masse moléculaire moyenne de l'ordre de 28.000 daltons. Mais on ne peut pas affirmer que ces sous-unités sont identiques. BANNISTER et PHIZACKERLEY (12) sont les seuls à avoir démontré que la composition en acide aminé était identique dans les sous-unités de N-acétylglucosaminidase de Patella vulgata.

3 - Les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases possèdent des compositions en acides aminés et en oligosaccharides voisines les unes des autres. On peut conclure à la nature polymannosidique des glycannes de ces différentes formes enzymatiques. Le point d'attache devant s'effectuer par une liaison N-glycosidique or, ce n'est pas toujours le cas, BANNISTER et PHIZACKERLEY (12) décrivent une N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase où il n'y a pas de N-acétyl-glucosamine, l'articulation devant se faire dans ce cas par une liaison 0-glycosidique.

4 - Les propriétés immunologiques sont différentes selon les formes envisagées. Il est certain que les formes I et II, d'une part, et III et IV, d'autre part, possèdent des déterminantes antigéniques communs. Ces déterminants antigéniques seraient spécifiques de l'origine de l'enzyme.

# CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les études que nous avons réalisées ont porté, d'une part, sur l'isolement de 11 exoglycosidases destinées à la détermination des anoméries de liaison des oligosaccharides et glycopeptides isolés dans le Laboratoire et, d'autre part, sur l'analyse plus détaillée des propriétés enzymatiques de 4 N-acétyl-β-D-hexosaminidases présentes dans les graines germées de Fenugrec. Les conclusions de ces deux études peuvent être résumées de la manière suivante :

1. - Les préparations enzymatiques d' $\alpha$ - et  $\beta$ -D-galactosidases, de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase, d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -D-mannosidases nécessaires à la détermination des structures ont été réalisées à partir de substrats divers, soit par l'application des procédés de chromatographie classique, soit par modification de ces procédés. En particulier, l'introduction au cours des étapes de purification, de la chromatographie d'affinité sur colonnes de Sepharose 4B  $\Sigma$ aminocaproyl- $\beta$ -D-galactosylamine et  $\Sigma$ -aminocaproyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminylamine a permis d'obtenir, à partir d'un moût de fermentation d'Aspergillus niger, une N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase et une  $\beta$ -D-mannosidase qui répondent aux critères actuels de pureté physico-chimiques et enzymatiques.

2. - L'utilisation de 4 N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases d'origines diverses purifiées et très actives a permis une dégradation séquentielle d'oligosaccharides et a permis de préciser d'une manière certaine la spécificité d'action de ces exoglycosidases. En particulier, le disaccharide GlcNAc  $\frac{\beta-1,2}{\beta}$  Man présent dans de nombreuses glycoprotéines n'est hydrolysé quantitativement que par la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase isolée de la rate de Boeuf et de la Fève Jack, le disaccharide GlcNAc  $\frac{\beta-1,6}{\beta}$  Man est hydrolysé, par contre, par la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase isolée d'Aspergillus niger. L'emploi d'oligosaccharides de masse moléculaire plus importante et de glycopeptides démontre et confirme que la conformation spatiale du substrat joue un rôle prépondérant au cours de l'hydrolyse enzymatique.

La  $\beta$ -D-mannosidase d'Aspergillus niger agit essentiellement sur le disaccharide et les glycopeptides renfermant une liaison mannosyl  $\beta$ -1,4. Cette spécificité d'action fait de la  $\beta$ -D-mannosidase isolée un outil extrêmement précieux lors de la détermination des structures glycopeptidiques. 3. - Les 11 glycosidases que nous avons isolées nous ont servi à la détermination de la structure de 34 oligosaccharides isolés au Laboratoire et nous ont permis de participer à la détermination de la structure de 2 glycopeptides de la sérotransferrine. La structure de ces glycopeptides a été récemment confirmée par l'utilisation d'une méthode physique : la résonance nucléaire paramagnétique (RMN).

4. - Nous avons mis au point un protocole original de préparation qui nous permet d'obtenir, à partir des graines germées totales, 4 N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases extrêmement pures. Il s'agit, à notre connaissance, de la première mise en évidence des formes moléculaires différentes de la N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase d'origine végétale.

Ces différentes formes possèdent des localisations spécifiques dans la graine et ont des activités enzymatiques qui varient au cours de la germination, ainsi la forme I qui n'est présente que dans les cotylédons et la forme IV qui est présente essentiellement dans l'axe embryonnaire ont une activité qui est maximale entre 48 et 96 h de germination.

5. - Les 4 formes de N-acétyl-β-D-hexosaminidases possèdent une double activité N-acétyl-β-D-glucosaminidasique et N-acétyl-β-D-galactosaminidasique. Ces 2 activités sont portées par la même protéine, le rapport de ces 2 activités reste constant au cours du fractionnement. Ce rapport dépend de la forme enzymatique : il est croissant depuis la forme I qui hydrolyse de façon identique les:N-acétyl-glucosaminide et galactosaminide jusqu'à la forme IV qui hydrolyse préférentiellement les N-acétylglucosaminides.

L'étude des paramètres cinétiques (Vmax, Km, Ki) démontre l'existence d'un seul site enzymatique possédant une double activité.

L'étude de la stabilité à la température a permis de montrer que, d'une façon générale, les activités N-acétyl-ß-D-galactosaminidasiques sont plus résistantes et que des 4 formes, c'est la forme I qui est la plus thermolabile.

Cette forme ressemble à la forme A des hexosaminidases d'origine animale.

L'allure biphasique des courbes de stabilité à la température des 4 formes est en faveur de l'existence dans la molécule de chaque enzyme de 2 constituants réagissant de manière différente à la dénaturation thermique. L'utilisation de différents effecteurs permet de montrer que l'activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidasique et  $\beta$ -D-galactosaminidasique de la forme I se différencient nettement des activités des formes II, III et IV. En particulier, la forme I est la seule forme où les 2 activités sont activées par les ions Fe<sup>++</sup> et Fe<sup>+++</sup>.

Les sels mercuriques inhibent de manière non compétitive les 2 activités de la forme I, tandis que pour des faibles concentrations en sels mercuriques l'inhibition des formes II, III et IV semble être de type incompétitif.

Les ions acétates inhibent de façon compétitive toutes les activités.

L'activité N-acétyl-β-galactosaminidasique des 4 formes est toujours plus résistante vis-à-vis des différents inhibiteurs étudiés que l'activité N-acétyl-β-glucosaminidasique.

L'étude de la spécificité enzymatique vis-à-vis des substrats naturels renfermant de la N-acétyl-D-glucosamine en position terminale non réductrice a montré que la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase I n'hydrolysait que les liaisons  $\beta$ -1,4. Elle est, en outre, très active sur le chitobiose. La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase II n'hydrolyse que les liaisons  $\beta$ -1,6 et les N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidases III et IV n'hydrolysent que les liaisons  $\beta$ -1,2. Toutes les formes enzymatiques sont incapables d'agir sur les liaisons  $\beta$ -1,3.

6. - Les 4 formes possèdent des p**H** différents compris entre 4,6 et 6,7. Les masses moléculaires sont comprises entre 72.000 et 180.000. Chacune des formes possède une structure sous-unitaire, la masse moléculaire de l'unité de base serait de 30.000 daltons. La composition en acides aminés révèle l'existence de quelques différences entre les 4 formes enzymatiques. L'analyse des monosaccharides en chromatographie en phase gazeuse démontre que les 4 formes enzymatiques renferment de la N-acétylglucosamine et une proportion importante de mannose ce qui laisse prévoir une structure glycannique de type oligomannosidique.

7. – L'étude des propriétés immunochimiques montre que les N-acétyl-  $\beta$ -D-hexosaminidases I et II possèdent des déterminants antigéniques communs. Il en est de même pour les N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases III et IV. Aucune réaction croisée n'a pu être mise en évidence entre les groupes I et II, d'une part, et III et IV, d'autre part.

- 130 -

En résumé, l'ensemble des propriétés enzymatiques, physico-chimiques et immunologiques des quatres N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases montre que les hexosaminidases d'origine végétale possèdent de nombreuses analogies avec les hexosaminidases d'origine animale. Cependant, de notre étude, il faut remarquer que les différentes formes moléculaires ne sont pas des formes isoenzymatiques mais des enzymes différentes.

# APPENDICE TECHNIQUE

T<sub>1</sub>-

- I DOSAGE DES MONOSACCHARIDES LIBÉRÉS APRÈS HYDROLYSE ENZYMATIQUE
  - A DOSAGE DU GALACTOSE
  - B DOSAGE DES N-ACETYL-OSAMINES
- II DOSAGE DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES

III - DOSAGE DES PROTÉINES

IV - DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

A - GEL FILTRATION

B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

V - DÉTERMINATION DES POINTS ISOÉLECTRIQUES

VI - MÉTHODES DE SÉPARATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES

VII - RÉVÉLATION DES ÉLECTROPHORÉGRAMMES

VIII - IMMUNO-DIFFUSION

IX - MÉTHODES DE PRÉPARATION DE CERTAINES EXOGLYCOSIDASES

A - N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE D'ASPERGILLUS NIGER

B – N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASE DE LA FEVE JACK

C - β-D-GALACTOSIDASE DE LA FEVE JACK

D - N-ACETYL-B-D-HEXOSAMINIDASE DE LA RATE DE BOEUF

Nous avons rassemblé, dans cet appendice technique, un certain nombre de méthodes d'analyses ou de préparations enzymatiques. Ces méthodes sont déjà décrites dans la littérature mais leur intérêt nous a incité à les décrire, à nouveau, ainsi que les modifications que nous avons apportées.
# I – DOSAGE DES MONOSACCHARIDES LIBÉRÉS APRÈS HYDROLYSE ENZYMATIQUE

A - DOSAGE DU GALACTOSE PAR LA METHODE A LA GALACTOSE-DESHYDROGENASE FINCH et al. (44)

1 - Principe

Le galactose libre est dosé par oxydation en présence de galactosedeshydrogénase et de NAD<sup>+</sup> selon le schéma réactionnel suivant :

Galactose + NAD<sup>+</sup> galactose-deshydrogénase galactono.lactone + NADH + H<sup>+</sup>

2 - <u>Réactifs</u>

- Solution de NAD à 3,315 mg par ml, soit 0,5  $\mu$ mole/100  $\mu$ 1

- Solution de Tris 1,25 M, pH 8,6, Tris 15,14 mg

H<sub>2</sub>0 qsp 100 m1

- Solution de galactose-deshydrogénase à 5 U/mg. Solution à 1 mg par ml dans l'eau - Solution de galactose à 100  $\mu$ g/ml

# 3 - Mode opératoire et discussion

Dans une cuve en quartz  $MT_4$ , on introduit 0,5 µmole de la solution de NAD (100 µ1), 500 µmoles de Tris pH 8,6 (400 µ1), 0 à 0,2 µmoles de galactose (0 à 400 µ1). On complète à 900 µ1 par de l'eau distillée et on ajoute 50 µ1 de la solution de galactose-deshydrogénase. Le mélange est agité et la lecture est effectuée à 340 nm. La variation de densité optique est mesurée entre 0 et 30 minutes de réaction, les mesures sont faites toutes les 30 secondes au début de la réaction puis toutes les deux minutes lorsqu'on atteint le palier.

On introduit deux témoins, l'un sans galactose-deshydrogénase, l'autre sans galactose. Les solutions de références renferment 2,5 et 10  $\mu$ g de galactose.

B - METHODE SPECIFIQUE DE DOSAGE DES N-ACETYLHEXOSAMINES.

Nous avons employé la méthode de GOOD et BESSMAN (52) pour doser les N-acétylhexosamines libérées après hydrolyse enzymatique.

## 1 - Principe

Par chauffage en milieu alcalin, les N-acétyl-osamines libérées, après hydrolyse enzymatique, et les N-acétyl-osamines conjuguées en position termi-

- <sub>T3</sub> -

nale dont l'hydroxyl en C<sub>4</sub> est libre, donnent trois chromogènes identifiés par STANLEY (112), KUHN et KRUGER (62). Le chromogène III se condense ensuite avec le p-diméthyl-aminobenzaldéhyde.

# 2 - Réactifs

a - Solution de tétraborate de potassium pH 9,2

Acide borique	1,12	moles
Potasse	0,56	mole
Eau distillée qsp	1.000	m1

## b - Solution de p-diméthylamino-benzaldéhyde

La solution est obtenue en dissolvant 10 g de p-DMAB dans 100 ml d'acide acétique glacial renfermant 12,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. La solution est diluée au dixième avec de l'acide acétique glacial au moment de l'emploi.

# 3 - Mode opératoire et discussion

Dans des tubes à hémolyse très propres, on introduit 100  $\mu$ 1 de la solution à doser et 100 ul de la solution de tétraborate de potassium. Les tubes bouchés sont placés exactement 3 minutes au bain-marie bouillant. Les tubes sont ensuite portés dans un bain d'eau et de glace pendant 5 minutes. 800 µl de la solution diluée de p-DMAB sont alors ajoutés. On place les tubes après agitation pendant 20 minutes à 37°C. Ils sont ensuite ramenés à température ambiante et les mesures sont effectuées à 585 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration en osamines pour des quantités comprises entre 2 et 10 µg p. 100 1. Ces résultats ont été acquis sur des solutions aqueuses. Nous nous sommes heurtés à de nombreux problèmes lorsque nous avons voulu doser directement les N-acétyl-osamines dans un milieu tamponné. En effet, l'intensité de coloration était très faible, voire nulle. Nous avons voulu vérifier si le tampon intervenait sur l'intensité de coloration. Le tableau XXIII rassemble les résultats obtenus. L'ensemble des résultats dénote un effet inhibiteur joué par les tampons phosphates sur l'apparition de la coloration. Cette inhibition s'explique fort probablement par la formation d'esters phosphoriques de la N-acétyl-osamine au cours d'hydrolyse enzymatique prolongée. Pour éliminer cette inhibition, nous avons réalisé des hydrolyses uniquement en présence de tampon citrate.

Les solutions tampon phosphate de sodium peuvent, cependant, être utilisées pour des périodes d'incubation ne dépassant pas 24 heures. Pour éviter

-т<sub>4</sub>-

# TABLEAU XXIII

Influence de différents tampons sur le dosage de la N-acétylglucosamine par la méthode de GOOD et BESSMAN (52)

Nature du tampon	Pourcentage de récupération au bout de				
-	0 h	12 h	24 h	38 h	120 h
Témoin N-acétylglucosamine dans l'eau	100	100	100	100	100
N-acétylglucosamine dans un tampon : phosphate monosodique 0,01 M et phosphate disodique 0,02 M de pH 4,5	100	121	121	100	10
N-acétylglucosamine dans un tampon : acide citrique 0,01 M et phosphate disodique 0,02 M de pH 4,5	100	99	99	71	0
N-acétylglucosamine dans un tampon : acide citrique 0,01 M et citrate trisodique 0,02 M de pH 4,5	100	88	90	90	82



. Г d'éliminer les ions des solutions tampon par chromatographie d'échanges d'ions, on peut faire varier les quantités de réactif : à 100  $\mu$ l de la solution à analyser (5  $\mu$ g de N-acétylglucosamine), on ajoute 200  $\mu$ l de solution tampon borate pH 9,2. La solution est portée à 100°C pendant 3 minutes puis refroidie 15 min en bain de glace.

• <sup>т</sup> 6 •

Le développement de la coloration est obtenu en 20 minutes à 37°C après addition de 1.200 µl de la solution de p.DMAB.

# II - DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS POTÉOLYTIQUES

Les activités protéasiques sont déterminées à l'aide d'azocoll (Calbiochem). Le principe est le suivant :

# 1 - Principe

L'azocoll est de la caséine bovine insoluble sur laquelle est fixée un colorant rouge. Quand une enzyme protéolytique coupe l'une des liaisons peptidiques, le colorant est libéré dans le milieu réactionnel, la vitesse à laquelle est libéré le colorant peut servir à mesurer l'activité protéolytique d'un milieu.

2 - Mode opératoire

Une certaine quantité d'azocoll (500 µg) est mise en suspension dans une solution renfermant des protéases (500 µl), on introduit 500 µl de solution tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0. L'ensemble est placé à 37°C pendant 15 à 20 minutes. Le colorant, s'il y a eu coupure de liaisons peptides, se solubilise dans le milieu réactionnel, l'azocoll qui n'a pas été hydrolysé est éliminé soit par centrifugation ou filtration. Le surnageant ou le filtrat sont ensuite passés au spectrophotomètre à 520 nm.

Dans la mesure où il s'agit de déterminer des activités protéolytiques bien déterminées, il faut opérer au pH optimal de l'enzyme.

# III - DOSAGE DES PROTÉINES

Les protéines sont dosées, soit par la méthode de LOWRY et al. (74), soit par la méthode de UDENFRIED et al. (124). Nous ne décrirons que cette dernière technique qui permet de doser des quantités de protéines de l'ordre du nanogramme.

## 1 - Réactifs

a - Solution de fluorescamine

De 15 à 30 mg de fluoram (Roche) sont solubilisés dans 100 ml d'acétone (l'acétone doit être redistillée ou de qualité pour microscopie électronique).

#### b - Solution tampon borate de sodium pH 9, 0,2 M

Une solution 0,2 Molaire d'acide borique est amenée à pH 9,0 par l'intermédiaire de soude.

#### 2 - Mode opératoire

0,1 à 100 n.moles/ml de fonction amine peuvent être dosées.

0,5 à 1 ml de la solution de protéine à doser sont mélangés avec du tampon borate de sodium de façon à avoir un volume final de 1,5 ml. On ajoute ensuite 0,5 ml de la solution de fluorescamine. Cette solution doit être ajoutée très rapidement, la fluorescamine possède une solubilité minimale dans l'eau, elle se décompose dans l'eau en 1 minute en donnant un composé non fluorescent.

La fluorescence émise stable pendant 4 heures est mesurée dans un spectrofluorimètre:longueur d'onde d'excitation 390 nm, longueur d'onde d'émission 475-490 nm. Les mesures sont faites par rapport à une gamme étalon de serumalbumine bovine.

# IV - DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

La masse moléculaire a été déterminée par deux procédés : la chromatographie de gel filtration et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

A - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION.

La colonne de sépharose 6B (2 x 125 cm) est équilibrée dans une solution tampon phosphate disodique 0,1 M - acide citrique 0,05 M de pH 5,6. La vitesse d'élution est de l'ordre de 15 ml/h, les fractions recueillies sont de 1 ml. La colonne est calibrée à l'aide des composés suivants : bleu dextran 2.000, immuno-globulines bovines, sérotransferrine humaine, sérumalbumine bovine,  $\beta$ -lactoglobuline bovine, pepsine, cytochrome C et vitamine B12. La masse moléculaire est calculée en fonction du Kd.

- T<sub>7</sub> ·

#### B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

# 1 - Principe

La méthode de NEVILLE (88) possède un très haut pouvoir de résolution dans une gamme de masses moléculaires de 23.000 à 320.000 daltons. Cette méthode est caractérisée par un système de tampons discontinus (borate et sulfate) et la formation de complexe protéine-SDS. Les complexes protéines-SDS ont une mobilité électrophorétique qui ne dépend que de la masse moléculaire, ils possèdent tous un comportement amionique dû à la fonction sulfate du détergent.

# 2 - Mode opératoire

10 à 50 µg de protéine sont traités pendant 30 min à 37°C par une solution de carbonate de sodium 0,05 M renfermant du SDS à 5 p. 100 et du  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1 M. Ce traitement permet d'obtenir des sous-unités quand les édifices sont formés d'oligomères. Les échantillons sont transferrés sur le gel de polyacrylamide. La migration est effectuée à 2 mA par tube, elle est arrêtée quand le marqueur arrive au bas des tubes. L'électrophorèse est réfrigérée par un circuit d'eau froide. Après démoulage, les gels sont colorés.

La méthode de NEVILLE (88) permet de déterminer les masses moléculaires des sous-unités obtenues. On effectue une migration de protéine et de glycoprotéine de masse moléculaire connue. La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant, pour chaque valeur du  $R_F$ , le logarithme du poids moléculaire (SHAPIRO *et al.* (105)). La méthode est valable pour des composés dont le  $R_F$  est compris entre 0,3 et 0,7

# V - DÉTERMINATION DES POINTS ISOÉLECTRIQUES PAR ÉLECTROFOCALISATION

Les expériences sont réalisées dans une colonne d'électrofocalisation LKB. Les conditions expérimentales utilisées sont celles de VESTERBERG et SVENSSON (128).

# 1 - Réactifs

# a - Solution dense

Saccharose	28	g
Ampholine	1,8	m1 <sub>.</sub>
Eau distillée	42	m1

- т<sub>8</sub> -

# b - Solution légère

Saccharose	2,7	g
Ampholine	0,7	<b>m1</b>
Eau distillée qsp	50	ml

c - Solution cathodique (cathode en bas)

Saccharose	12	g
Ethylenediamine	0,4	ml
Eau distillée	14	m1

d - Solution anodique (anode en haut)

Acide phosphorique 0,1 ml Eau distillée 10 ml

# 2 - Mode opératoire

Le gradient de saccharose est formé à l'aide de l'appareil à gradient LKB, il est monté à la vitesse de 1,2 ml par minute. Les 2,5 ml d'ampholine à 40 p. 100 donnent une concentration finale de 1 p. 100 en ampholine tout au long de la colonne. La zone de pH utilisée est de pH 3,5 à pH 10. La solution enzymatique, après dialyse contre une solution d'ampholine, est diluée dans la solution légère. La solution à étudier est soumise, à 4°C, à un courant constant de 400 volts (7,5 mA) pendant 24 heures. Puis on applique une tension de 700 volts pendant 12 à 24 heures supplémentaires (0,5 - 0,8 mA). L'élution de la colonne est effectuée à la vitesse de 120 ml/h. Des fractions de 1 ml sont recueillies, le pH est mesuré à l'aide d'un pHmètre Radiometer pHM4D, précision ± 0,01 unité de pH. L'absorbance des différentes fractions est effectuée à 280 nm et 254 mm.

# VI - MÉTHODES DE SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE

#### A - ELECTROPHORESE SUR BANDE D'ACETATE DE CELLULOSE.

Les bandes d'acétate de cellulose sont placées pendant 15 à 20 minutes dans une solution tampon citrate de sodium 0,035 M de pH 5,5, elles sont ensuite essorées et placées dans la cuve à électrophorèse. Les dépôts sont effectués sous tension. La migration électrophorétique dure 1 heure sous une tension de 120 volts dans le système tampon citrate de sodium 0,035 M de pH 5,5. Les bandes d'acétate de cellulose sont traitées, soit par les réactifs classiques, soit par les méthylombelliferryl-glycosides.

T<sub>9</sub>

# B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées à l'aide d'un gel à 7 p. 100 dans un tampon de pH 9,5 selon la méthode de DAVIS (33).

Le bleu de bromophénol sert d'indicateur de migration. Les conditions expérimentales sont les suivantes : la quantité de protéine déposée est de l'ordre de 10 à 30 µg. Quand le volume de l'échantillon ne dépasse pas 20 µl, chaque gel est soumis à un courant dont l'intensité est constante et égale à 2,5 mA. Quand le volume de l'échantillon est très élevé, de l'ordre de 100 µl, l'intensité du courant est diminuée dans un premier temps (0,5 à 1 mA) et dans un deuxième temps, on attend que la totalité du bleu de bromophénol soit entré à l'intérieur du gel de concentration. A ce moment l'intensité du courant est ramenée à 2,5 mA par tube. La migration s'effectue dans une enceinte refrigérée (10-15°C) et elle est arrêtée quand le front de bleu de bromophénol arrive à quelques millimètres du bas de chaque gel. Les gels sont ensuite démoulés dans de l'eau distillée puis colorés.

# VII - RÉVÉLATION DES ÉLECTROPHORÈSES

Les électrophorégrammes peuvent être révélés de deux façons différentes :

- soit par les réactifs de caractérisation des protéines,

- soit par révélation de l'activité enzymatique.

A - METHODES NON SPECIFIQUES DE REVELATION.

Nous avons utilisé la méthode de CHRAMBACH et al. (28) au bleu de Coomassie. Les protéides apparaissent sous forme de bande de couleur bleue.

Nous avons utilisé une autre méthode qui consiste à traiter les échantillons à analyser par la fluorescamine. 100 µl de tampon phosphate de sodium pH 8,5 0,065 M à 5 p. 100 de SDS renfermant de 50 à 100 µg de protéine sont portés à 80°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, on ajoute 5 µl d'une solution de fluorescamine à 1 mg par ml dans l'acétone. On prélève 10 µl du mélange que 1'on dépose sur le gel. Une fois démoulés, les gels sont éclairés en lumière de WOOD. Les protéines apparaissent sous forme de bandes fluorescentes. C'est la méthode de ENG et PARKES (43).

#### B - REVELATION DE L'ACTIVITE GLYCOSIDASIQUE.

# 1 - Méthode de GABRIEL et WANG (49)

Les gels de polyacrylamide sont maintenus à 37°C dans une solution tampon de citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 (ou pH optimal de l'enzyme) pendant 10 minutes. Après cette incubation les gels sont mis en présence de p-nitrophenylglycosides (5 mM) dissous dans le tampon citrate de sodium 0,05 M pH 5,0 (ou pH optimal de l'enzyme). Après apparition de bande jaune, les gels sont immédiatement traités à l'aide de chlorure de 2, 3, 5 triphenyltetrazolium.

2 - Méthode de HAYASHI (59)

Nous avons transposé la méthode d'HAYASHI utilisée pour les colorations histologiques.

Les gels, après démoulage, sont placés à 37°C pendant 20 minutes dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 5,0 (ou de pH équivalent au pH optimal de l'enzyme). Après cette incubation, les gels sont plongés dans une solution renfermant :

- solution tampon phosphate de sodium : 100 ml

- Naphtol-AS-BI-glycoside : 20 mg

Une fois que le naphtol-glycoside est complétement dissous, on

ajoute :

- sel de diazonium Fast Garnett G.B.C. (Sigma) : 130 mg

Après agitation, le mélange est filtré sur papier Whatman 3.

Les gels sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 12 heures. Il se développe une coloration rouge violacée au niveau des enzymes (condensation entre le sel de diazonium et le naphtol).

Cette méthode est plus sensible que la méthode de GABRIEL et WANG (49).

On peut employer la même méthode quand on effectue les électrophorèses sur bande d'acétate de cellulose.

3 - Méthode au methylombelliferyl-glycoside

Les bandes d'acétate de cellulose, après migration des fractions enzymatiques, sont recouvertes par une autre bande d'acétate de cellulose imprégnée du réactif suivant : tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 5,0 (ou de pH équivalent au pH optimal de l'enzyme) renfermant le methylombelliferyl-glycoside à une concentration de 0,025 mM.

Les bandes sont placées sur papier filtre imprégnés de tampon phosphate 0,05 M pH 5,0 (ou de pH optimal) dans une enceinte hermétique à 37°C pendant l heure (la réaction se fait à l'obscurité). Après hydrolyse du substrat, la bande imprégnée du réactif est enlevée, la bande qui a servi à la migration est soumise à l'action de vapeurs d'ammoniaque qui permettent de visualiser les zones d'activité enzymatique fluorescentes en lumière de WOOD.

# VIII - IMMUNO-DIFFUSION

Nous avons employé la technique d'OUCHTERLONY (89) dans cette méthode la diffusion de l'échantillon et de l'immunserum a lieu sans électrophorèse préalable. Les immunserums ont été obtenus après injection de solution enzymatique brute et de solutions enzymatiques purifiées à des lapins. Après saignée, le serum obtenu est précipité à 35 p. 100 de saturation par le sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est dissous dans l'eau, dialysé contre de l'eau et concentré sur ultra-gaine Schleicher et Schüll.

Les immuno-diffusions sont lavées pendant 3 jours dans une solution de NaCl à 9 p. 1.000 puis séchées à température ambiante sous papier Whatman 3.

La révélation est effectuée à l'aide du réactif à l'amido-schwartz ou selon la méthode d'HAYASHI ( 59). Dans certains cas, la plaque d'immuno-diffusion est coupée en 2 parties pour permettre 2 révélations différentes (il s'agit, d'une façon générale, du même type de révélation mais pour deux activités différentes).

# IX - MÉTHODES DE PRÉPARATION DE CERTAINES EXÓGLYCOSIDASES

# A - <u>N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASE ISOLEE A PARTIR DE MICROORGANISME</u> : ASPERGILLUS NIGER.

Nous avons repris le protocole de BAHL et AGRAWAL (10). La méthode implique un fractionnement des enzymes par le sulfate d'ammonium suivi d'une purification par chromatographie sur colonne de Bio-gel P-300.

- T<sub>12</sub> -

## 1 - Précipitation par le sulfate d'ammonium

30 g de Rhozyme HP 150 source commerciale d'Aspergillus niger sont mis en suspension dans 100 ml d'eau. La solution est agitée pendant 1 heure et centrifugée pour éliminer l'insoluble. Au surnageant est ajouté une quantité suffisante de sulfate d'ammonium cristallisé pour obtenir une saturation équivalente à 80 p. 100. Le précipité obtenue après centrifugation est alors dissous dans un tampon citrate de sodium 0,05 M pH 4,6. Une deuxième précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation permet d'obtenir un précipité qui est dissous dans 250 ml du tampon citrate de sodium.

#### 2 - Ultrafiltration de la solution enzymatique

Pour éviter l'action des cellulases présentes dans le Rhozyme HP 150, sur les membranes de cellophane, nous soumettons la solution enzymatique à une ultrafiltration sur cartouche "Amicon" HIDX50. Cette méthode permet, d'une part, de désioniser le milieu et, d'autre part, de concentrer la solution enzymatique.

# 3 - Chromatographie sur Bio-gel P-300

La chromatographie de la solution enzymatique a été réalisée sur une colonne de Bio-gel P-300 (5 x 100 cm). L'élution a été effectuée à l'aide d'un tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 5,0. Une deuxième chromatographie a été réalisée sur colonne de Bio-gel P-300 (2,5 x 120 cm), l'élution est effectuée par un tampon citrate de sodium 0,01 M de pH 5,0 renfermant du chlorure de sodium 0,1 M.

Les résultats obtenus après précipitation du Rhozyme HP 150 par le sulfate d'ammonium à 80 p. 100, ultrafiltration et chromatographie sur colonne de Bio-gel P-300 sont illustrés dans les figures 29 et 30 (p.T<sub>14</sub>,  $T_{15}$ ). On arrive, par rechromatographie sur colonne de Bio-gel P-300, à séparer N-acétyl- $\beta$ -Dhexosaminidase et  $\beta$ -D-galactosidase. L'enzyme est purifiée 96 fois, seulement.

#### B - PREPARATION DE LA β-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE A PARTIR DE LA FEVE JACK.

Nous avons appliqué le protocole expérimental préconisé par LI et LI (68), protocole fondé sur la précipitation de la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase de la fève Jack à son pH isoélectrique (pI 4,9).

# 1 - Extraction

A 200 g de farine de fève Jack (\*), on ajoute 1.200 ml d'eau

(\*) La farine de fève Jack est fournie par SIGMA Chemical Company, St Louis Missouri, U.S.A.

- T<sub>13</sub> -







BUS



distillée. La suspension est agitée pendant une heure à température ambiante puis filtrée sur Büchner muni de gaze. Le filtrat est ajusté à pH 5,5 à l'aide de citrate de sodium 1,5 M pH 2,7 et centrifugé. Le surnageant ainsi obtenu (760 ml) renferme la majorité des glycosidases.

## 2 - Fractionnement au sulfate d'ammonium

Du sulfate d'ammonium cristallisé est ajouté au surnageant pour obtenir 30 p. 100 de saturation. Après un repos d'une nuit, le précipité Pl est éliminé par centrifugation et le surnageant est amené à 50 p. 100 de saturation par addition de sulfate d'ammonium cristallisé. Le précipité P2 est recueilli après une nuit de repos et dissous dans 50 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,0.

#### 3 - Fractionnement éthanolique

Dans la figure 31 (p. T<sub>17</sub>) nous avons résumé les différentes étapes du fractionnement par l'éthanol du précipité obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium. Notons que les précipitations sont réalisées à -10°C, la dernière précipitation est effectuée au point isoélectrique de l'enzyme.

## 4 - Chromatographie sur colonne de Sephadex

#### a - Chromatographie sur Sephadex G-200

La solution enzymatique est chromatographiée sur colonne de Sephadex G-200 (5 x 100 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0. Les fractions renfermant l'activité N-acétyl-β-D-hexosaminidasique sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration (Fig. 32, p. T<sub>18</sub>).

#### b - Chromatographie sur DEAE Sephadex A-50

La solution est chromatographiée sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 (2 x 50 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,0. La N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase est éluée par un tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 6,0 renfermant du chlorure de sodium 0,05 M. Les fractions recueillies sont concentrées par ultrafiltration et ajustées à pH 4,4 (Fig. 33, p. T<sub>10</sub>).

#### c - Chromatographie sur CM Sephadex C-50

La solution enzymatique ajustée à pH 4,4 est chromatographiée sur colonne de CM-Sephadex C-50 (2 x 50 cm) équilibrée en tampon citrate de sodium 0,05 M de pH 4,4. La β-N-acétylglucosaminidase est éluée par un gradient linéaire de pH (500 ml de tampon pH 4,4 ; 500 ml de tampon pH 5,5). Les fractions enzymatiques sont recueillies puis concentrées par ultrafiltration. La solution enzymatique

-т<sub>16</sub>-

Précipité P2 dissous dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 7,0

Précipité P3 éliminé 🖛

Ethanol à 95 p. 100 concentration finale : 25 p. 100 (v/v)

Température ambiante, centrifugation à 25°C

Surnageant S1 refroidi à -10°C

Précipité P4 éliminé -

Centrifugation à -10°C

Surnageant S2 amené à température ambiante ajusté à pH 4,9 par tampon citrate de sodium 1,5 M, pH 2,7 et refroidi à -10°C

Surnageant S3 éliminé 🕳

Précipité P5 de N-acéty1- $\beta$ -D-hexosaminidase repris dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,0

Figure 31 : Précipitation des N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidases de la farine de Fève Jack par l'éthanol selon LI et LI (68).





de la N-acétyl-β-D-glucosaminidase de la Fève Jack. Chromatographie sur Sephadex G200 (5 x 100 cm).

-O Absorbance à 280 nm

O

\_\_\_ N-acéty1-β-D-glucosaminidase



Absorbance à 280 nm 0-0

 $N-acéty1-\beta-D-glucosaminidase$ 

BUS ULLE

est ajustée à pH 7,0 (Fig. 33, p. T<sub>19</sub>).

Des résultats analogues à ceux de LI et LI (68) ont été obtenus. Cependant, une seule précipitation par l'éthanol au point isoélectrique s'est révélée être insuffisante pour purifier la N-acétyl-β-D-hexosaminidase. Nous avons réalisé un deuxième cycle de précipitation. L'enzyme est purifiée 477 fois.

## C – $\beta$ -D-GALACTOSIDASE DE LA FEVE JACK

La procédure que nous employons dérive de celle décrite par LI et LI (69).

La farine de fève Jack est soumise à une extraction par l'eau à température ambiante (1 heure). La suspension laiteuse obtenue est filtrée sur gaze, le filtrat est ajusté à pH 5,5 à l'aide de tampon citrate de sodium 1,5 M pH 2,7. Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation à 4°C (8.000 t.p.m., 30 min). Le surnageant est précipité par le sulfate d'ammonium à 30 p. 100 de saturation. Le précipité formé est éliminé, le surnageant est soumis à une nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium à 60 p. 100 de saturation. Le précipité obtenu est collecté par centrifugation et dissous dans un tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 renfermant du chlorure de sodium 0,1 M. La solution est soumise à une dialyse contre ce tampon pendant 3 jours à 4°C. Après concentration sur membrane Amicon XM50. La solution enzymatique est chromatographiée sur une colonne de Sephadex G-200 (5 x 90 cm) équilibrée dans le tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 ; NaCl 0,1 M. Les fractions renfermant une activité β-D-galactosidasique sont rassemblées, concentrées sur membrane XM50 puis dialysées contre de l'eau distillée. La solution enzymatique obtenue est alors soumise à un chauffage de 60°C pendant 30 minutes. Le précipité formé est éliminé par une centrifugation de 60 minutes à 12.000 t.p.m.. Le surnageant est chromatographié sur une colonne de DEAE cellulose (DE 22) (2 x 25 cm) équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,7.

La solution de  $\beta$ -D-galactosidase après chromatographie sur G-200 (Fig. 34, p. T<sub>21</sub>) est contaminée par une activité  $\alpha$ -D-galactosidasique. On ne remarque pas d'activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique et  $\beta$ -D-mannosidasique. Le chauffage détruit l'activité  $\alpha$ -D-galactosidasique résiduelle : la perte d'activité de la  $\beta$ -D-galactosidase est de 28 p. 100. Cette solution enzymatique, après concentration sur membrane XM50, est utilisée pour dégrader la copule polysaccharidique des glycoprotéines.



#### D - ISOLEMENT DE LA N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASE DE LA RATE DE BOEUF.

La méthode de fractionnement décrite par WERRIES et al. (135) a été reprise et modifiée.

# 1 - Extraction

Une rate de boeuf ( 750 g) congelée est débarassée du tissu conjonctif, découpée en petits morceaux qui sont broyés et homogénéisés dans un tampon citrate de sodium 0,1 M pH 6,0. Un égal volume de tampon citrate renfermant du NaCl 0,15 M est ajouté, le mélange est agité une nuit à 4°C. La suspension est filtrée sur gaze, le filtrat est centrifugé pendant 1 heure à 3.000 tours par minute dans une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant obtenu est ajusté à pH 4,0 à l'aide d'acide citrique 0,1 M. Le précipité obtenu est éliminé par une nouvelle centrifugation.

## 2 - Fractionnement au sulfate d'ammonium

Au surnageant obtenu, nous ajoutons du sulfate d'ammonium cristallisé jusqu'à obtenir 80 p. 100 de saturation. Après un repos d'une nuit à 40°C, le précipité est recueilli par centrifugation. Il est dissous dans le minimum d'eau et dialysé pendant 3 jours contre de l'eau distillée. L'adialysable est centrifugé, le surnageant est lyophilisé.

Les protéines sont précipitées ensuite à 33, 50 et 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Chacun des précipités obtenus est repris par le minimum d'eau distillée, dialysé contre de l'eau distillée et centrifugé.

## 3 - Chromatographie sur colonnes

#### a - Chromatographie sur Sephadex G-200

La fraction 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est la fraction la plus riche en activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique, elle renferme, en outre, une  $\beta$ -D-mannosidase. La chromatographie sur colonne (5 x 100 cm) de Sephadex G-200 équilibrée en tampon acide citrique 0,05 M, phosphate disodique 0,1 M de pH 4,6 permet d'obtenir une enzyme purifiée 84 fois (Fig. 35, p. T<sub>23</sub>). Les fractions renfermant une activité N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidasique sont rassemblées, concentrées puis dialysées contre un tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 6,4.

#### b - Chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite

La colonne d'hydroxylapatite (2 x 20 cm) est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 6,4. La solution enzymatique obtenue à l'étape

- T<sub>22</sub> -



Figure 35 : Diagramme de fractionnement de la N-acétyl-β-D-hexosaminidase de la Rate de Boeuf. Chromatographie sur Sephadex G200

-O Protéines

O

-**Ξ** N-acéty1-β-D-hexosaminidase



précédente est chromatographiée sur cette colonne, les activités enzymatiques sont éluées à l'aide d'un gradient discontinu de concentration 0,05 M, 0,1 M et 0,2 M en phosphate de sodium. On caractérise 3 pics d'activités de N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (Fig. 36, p. T<sub>25</sub>). A l'époque où nous avons obtenu ces résultats, nous ne savions pas s'il s'agissait de formes différentes, d'isoenzymes ou d'artefacts de préparations. Nous savons maintenant qu'il s'agit de différentes formes moléculaires.

- T<sub>24</sub> -



#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 ADAM-CHOSSON A. Thèse Doct. es Sci. Lille, 1964 (p. 5)
- 2 AGRAWAL K.M.L. et BAHL O.P. J. Biol. Chem. 1968, 243, 103-111 (p. 71, 79)
- 3 AMINOFF D. Biochem. J. 1961, 81, 384 (p. 20)
- 4 AMINOFF D. et FURUKAWA K. J. Biol. Chem. 1970, 245, 1659-1669 (p. 8, 54)
- 5 ARAKAWA M., OGATA S.H., MURAMATSU T. et KOBATA A. J. Biochem. 1974, 75, 707-714 (p. 8, 54)
- 6 ARIMA T., SPIRO M.J. et SPIRO R.G. J. Biol. Chem. 1972, 247, 1825-1835 (p. 122)
- 7 ARTYUKOV A.A., VAFINA M.G. et MOLODTSOV N.V. Comp. Biochem. Physiol. 1976, 54B, 303-305 (p. 107)
- 8 ASP N.G. Biochem. J. 1971, 121, 299-308 (p. 9)
- 9 BAHL O.P. J. Biol. Chem. 1970, 245, 299-304 (p. 8, 9, 54)
- 10 BAHL O.P. et AGRAWAL K.M.L. J. Biol. Chem. 1969, 244, 2970-2978 (p. 29, 48, T12)
- 11 BANNISTER J.V. et PHIZACKERLEY P.J.R. FEBS-Letters 1973, 29, 313-317 (p. 7, 39)
- 12 BANNISTER J.V. et PHIZACKERLEY P.J.R. FEBS-Letters 1973, 34, 120-122 (p. 127)
- 13 BAYARD B. Thèse Doc. es Sci. Lille, 1974 (p. 17)
- 14 BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J. -Carbohyd. Res. 1972, 24, 445-456 (p. 50, 56)
- 15 BEAUGIRAUD S., PERCHERON F., COURTOIS J.E. et LANCHEC C. Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, 621-631 (p. 29, 60)
- 16 BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M. Analyst. 1954, 79, 201 (p. 119)
- 17 BERKELEY R.C.W., BREWER S.J., ORTIZ J.M. et GILLESPIE J.B. Biochim. Biophys. Acta 1973, 309, 157-168 (p. 85, 111)
- 18 BEUTLER E., YOSHIDA A., KUHL W. et LEE J.E.S. Biochem. J. 1976, 159, 541-543 (p. 15, 116)
- 19 BOERSMA A. et DEGAND P. C.R. Acad. Sci. Paris 1974, 2780, 1903-1906 (p. 71)
- 20 BOUQUELET S. et SPIK G. Actes du colloque international du CNRS n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd., Paris 1974, Tome I, 315-327 (p. 60, 88)

- 21 BRAIDMAN I., CARROLL M., DANCE N. et ROBINSON D. Biochem. J. 1974, 143, 295-301 (p. 12)
- 22 BRAIDMAN I., CARROLL M., DANCE N., ROBINSON D., POENARU L., WEBER A., DREYFUS J.C., OVERDIJK B. et HOOGHWINKEL G.J.M. - FEBS-Letters 1974, 41, 181-184 (p. 76)
- 23 BUDDECKE E. et WERRIES E. Hoppe Seylers' Z. Physiol. Chem. 1965, 340, 257 (p. 45)
- 24 BULLOCK S. et WINCHESTER B. Biochem. J. 1973, 133, 593-599 (p. 12)
- 25 CARMODY P.J. et RATTAZI M.C. Biochim. Biophys. Acta 1974, 371, 117-125 (p. 14)
- 26 CARROLL M. et ROBINSON D. Biochem. J. 1973, 131, 91-96 (p. 124)
- 27 CAYGILL J.C., ROSTON C.P.J. et JEVONS F.R. Biochem. J. 1966, 98, 294-298 (p. 11)
- 28 CHRAMBACH A., REISFELD R.A., WYCKOFF M. et ZACCARI J. Anal. Biochem. 1967, 20, 150-154 (p. T<sub>10</sub>)
- 29 CLAMP J.R. et HOUGH L. Chem. and Ind. Londres 1963, 82 (p. 50)
- 30 COURTOIS J.E. et PERCHERON F. Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 167-175 (p. 29, 60)
- 31 CUATRECASAS P. J. Biol. Chem. 1970, 245, 3059-3065 (p. 6)
- 32 DANCE N., PRICE R.G., ROBINSON D. et STIRLING J.F. Clin. Chim. Acta 1969, 24, 189-197 (p. 12)
- 33 DAVIS B.J. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 121, 404-427 (p. T<sub>10</sub>)
- 34 DELMOTTE F. Thèse Doc.es Sci. Orléans, 1976 (p. 109)
- 35 DEY P.M. et PRIDHAM J.B. Biochem. J. 1969, 113, 49-55 (p. 11, 60)
- 36 DINGLE J.J., BARRETT A.J. et WESTON P.D. Biochem. J. 1971, 123, 1-13 (p. 126)
- 37 DIXON M. Biochem. J. 1953, 55, 170 (p. 23, 94)
- 38 DIXON M. et WEBB E.C. in Enzymes, Longmans, Green and Co London 1964, 2e ed. p. 84-87 (p. 23)
- 39 DRZENIEK R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967, 26, 631-638 (p. 8, 52)
- 40 DRZENIEK R. et GAUHE A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1970, 38, 651-656 (p. 8)
- 41 DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. Anal. Chem. 1956, 28, 350-356 (p. 27)
- 42 ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. Biochem. J. 1933, 27, 1824-1828 (p. 119)
- 43 ENG P.R. et PARKES C.O. Anal. Biochem. 1974, 59, 323-325 (p. T<sub>10</sub>)

- 44 FINCH P.R., YUEN R., SCHACHTER H. et MOSCARELLO M.A. Anal. Biochem. 1969, 31, 296-305 (p. 21, T<sub>2</sub>)
- 45 FORSEE W.T. et ELBEIN A.D. J. Biol. Chem. 1975, 250, 9283-9293 (p. 122)
- 46 FORSEE W.T., VALKOVICH G. et ELBEIN A.D. Arch. Biochem. Biophys. 1976, 174, 469-479 (p. 122)
- 47 FOURNET B. Thèse Doc. es Sci. Lille, 1973 (p. 48, 119)
- 48 FRIEDLAND J., SCHNECK M., SAIFER A., POURFAR M. et VOLK B.W. Clin. Chim. Acta 1970, 28, 397-402 (p. 12)
- 49 GABRIEL O. et WANG S.F. Anal. Biochem. 1969, 27, 545-554 (p. T11)
- 50 GEIGER B., BEN-YOSEPH Y. et ARNON R. Immunochemistry 1976, 13, 485-490 (p. 126)
- 51 GILBERT F., KUCHERLAPATI R., CREAGAN R.P., MURNANE M.J., DARLINGTON G.J. et RUDDLE F.H. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1975, 72, 263-267 (p. 14)
- 52 GOOD T.A. et BESSMAN S.P. Anal. Biochem. 1964, 9, 253-262 (p. 21, T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub>)
- 53 GREBNER E. et TUCKER J. Biochim. Biophys. Acta 1973, 321, 228-233 (p. 12)
- 54 GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. Eur. J. Biochem. 1970, 13, 484-492 (p. 55)
- 55 GRIMMONPREZ L., DELAUTRE M., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. FEBS-Letters 1975, 54, 221-223 (p. 57)
- 56 HARRAP G.J. et WATKINS W.M. Biochem. J. 1970, 117, 667-675 (p. 9, 54)
- 57 HAYASE K. et KRITCHEVSKY D. Clin. Chim. Acta 1973, 46, 455-464 (p. 11, 12, 13)
- 58 HAYASE K., REISHER S.R. et KRITCHEVSKY D. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1973, 142, 466-470 (p. 12)
- 59 HAYASHI M. J. Histochem. Cytochem. 1965, 13, 355-360 (p. T<sub>11</sub>, T<sub>12</sub>)
- 60 JEANLOZ R.W. Actes du colloque international du CNRS n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd. Paris 1974, Tome II, 1093-1905 (p. 5)
- 61 JUNGALWALA F.B. et ROBINS E. J. Biol. Chem. 1968, 243, 4258-4266 (p. 8)
- 62 KUHN R. et KRUGER G. Chem. Ber. 1956, 89, 1473 (p. T<sub>4</sub>)
- 63 LAMPORT D.T.A. in Biogenesis of Plant cell wall polysaccharides. Loewus F.W. ed. 1973, 149-164 Acad Press N.Y. (p. 122)
- 64 LEABACK D.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968, 32, 1025-1030 (p. 104)
- 65 LEE Y.C. et SCOCCA J.R. J. Biol. Chem. 1972, 247, 5753-5758 (p. 122)
- 66 LEE J.E.S. et YOSHIDA A. Biochem. J. 1976, 159, 535-540 (p. 14, 121, 122)
- 67 LI Y.T. J. Biol. Chem. 1966, 241, 1010-1012 (p. 29)
- 68 LI Y.T. et LI S.C. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5153-5160 (p. 29, 45, T<sub>13</sub>, T<sub>17</sub>,

69 - LI Y.T. et LI S.C. in Methods in Enzymology 1972, 28, 702-713. GINSBURG V. ed.
1972 Acad. Press (p. T <sub>20</sub> )
70 - LIE K.K., THOMAS G.H., TAYLOR H.A. et SENSENBRENNER J.A Clin. Chim. Acta
1973, 45, 243-248 (p. 12)
71 - LINEATTE M.T D.E.A. Biochimie Lille, 1974 (p. 79, 88)
72 - LINEWEAVER H. et BURK D J. Amer. Chem. Soc. 1934, 56, 658-666 (p. 22, 83)
73 - LINKER A., MEYER K. et WEISSMAN B J. Biol. Chem. 1955, 213, 237 (p. 45)
74 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J J. Biol. Chem. 1951,
193, 265-275 (p. T <sub>6</sub> )
75 - MARVERT C.L. et MØLLER F Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 1959, 45, 753- (p. 10)
76 - MATTA K.L. et BAHL O.P J. Biol. Chem. 1972, 247, 1-780-1787 (p. 29)
77 - MATTA K.L. et BAHL O.P Carbohyd. Res. 1972, 21, 460-464 (p. 44)
78 - McCLEARY B.V. et MATHESON N.K Phytochemistry 1975, 14, 1187-1194 (p. 71, 76)
79 - McILVAINE J.C J. Biol. Chem. 1921, 49, 183-186 (p. 19, 76)
80 - MEYER D. et BOURRILLON R Biochimie 1973, 55, 5-10 (p. 60, 71)
81 - MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J Bull. Soc. Chim. Biol. 1968,
50, 857- 886 (p. 48)
82 - MONTREUIL J Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 1639-1641 (p. 20)
83 - MONTREUIL J. et SCHEPPLER N Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 13-28 (p. 20)
84 - MORIYAMA T. et SRERE P.A J. Biol. Chem. 1971, 246, 3217-3223 (p. 126)
85 - MURAMATSU T. et EGAMI F Japan J. Exp. Med. 1965, 35, 171-179 (p. 7, 50)
86 - MURPHY J.V. et CRAIG L Clin. Chim. Acta 1972, 42, 267-272 (p. 14)
87 - NELSESTUEN G.L. et SUTTIE J.W J. Biol. Chem. 1972, 247, 6096-6102 (p. 7)
88 - NEVILLE D.M J. Biol. Chem. 1971, 246, 6328-6334 (p. 112, T <sub>8</sub> )
89 - OUCHTERLONY P Acta Path. Microbiol. Scand. 1948, 25, 186 (p. T12)
90 - PARK J.T. et JOHNSON M.J J. Biol. Chem 1949, 181, 149 (p. 20)
91 - PENTON E., POENARU L. et DREYFUS J.C Biochim. Biophys. Acta 1975, 391,
162-169 (p. 85)
92 - PRICE R.G. et DANCE N Biochim. Biophys. Acta 1972, 271, 145-153 (p. 11, 12)
93 - PUSZTAI A. et WATT W.B Biochim. Biophys. Acta 1970, 207, 413-431 (p. 122)
94 - RAFESTIN M.E., OBRENOVITCH A., OBLIN A. et MONSIGNY M FEBS-Letters 1974,
40, 62-66
95 - REUSER A.J.J. et GALJAARD H FEBS-Letters 1976, 71, 1-5 (p. 126)
96 - RIMINGTON C Biochem. J. 1931, 25, 1062 (p. 119)
97 - ROBINSON D. et STIRLING J.L Biochem. J. 1968, 107, 321-327 (p. 11, 12, 14,
81, 107)

- 98 ROBINSON D. et CARROLL M. Lancet 1972, i, 322 (p. 15)
- 99 ROBINSON D., CARROLL M. et STIRLING J.L. Nature 1973, 243, 415-416 (p. 114)
- 100 RUDICK M.J. et ELBEIN A.D. J. Biol. Chem. 1973, 248, 6506-6513 (p. 119, 121)
- 101 SANDHOFF K. et WASSLE W. Z. Physiol. Chem. 1971, 352, 1119-1133 (p. 6, 12)
- 102 SELLINGER O.Z., SANTIAGO J.C., SANDS M.A. et FURIN-SLOAT B. Biochim. Biophys. Acta 1973, 315, 128-146 (p. 12)
- 103 SEYAMA Y. et YAMAKAWA T. J. Biochem. 1974, 75, 947-950 (p. 112)
- 104 SHARON N. in complex carbohydrates, Addison-Wesley Publishing Company 1975, p. 88 (p. 6)
- 105 SHAPIRO A.L., VINUELA E., MAIZEL J.V. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967, 28, 815 (p. 122)
- 106 SHERWIN A.L., KARPATI G. et BULCK J.A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1969, 64, 171-175 (p. 126)
- 107 SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G. et MONTREUIL J. - Actes du colloque international du CNRS n° 221. Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. éd. Paris, 1974, tome I, 483-499 (p. 52, 56)
- 108 SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. -FEBS-Letters 1975, 50, 296-299 (p. 2, 56)
- 109 SRIVASTAVA S.K. et BEUTLER E. Nature New Bio1. 1973, 241, 463-465 (p. 114)
- 110 SRIVASTAVA S.K., AWASTHI Y.C., YOSHIDA A. et BEUTLER E. J. Biol. Chem. 1974, 249, 2043-2057 (p. 12, 14, 15, 114, 116, 121)
- 111 SRIVASTAVA S.K., WIKTOROWICZ J.E. et AWASTHI Y.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976, 73, 2833-2837 (p. 116, 117)
- 112 STANLEY P.G. Anst. J. Exptl. Biol. Med. Sci. 1953, 31, 187 (p. T<sub>1</sub>)
- 113 STIRLING J.L. Biochem. J. 1971, 123, 11P (p. 11, 12, 13)
- 114 STRECKER G., RIAZI-FARZAD T., FOURNET B., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. -Biochimie 1976, 58, 815-825 (p. 58)
- 115 STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DHONDT J.L. et FARRIAUX J.P. - Biochimie 1976, 58, 579-586 (p. 59)
- 116 SULD H.M. et HERBUT D.A. J. Biol. Chem. 1970, 245, 2802-2808 (p. 126)
- 117 SUKENO T., TARENTINO A.L., PLUMMER T.H. et MALEY F. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971, 45, 219-225 (p. 6)
- 118 SUSSMAN H.H., SMALL P.A. et COTLOVE E. J. Biol. Chem. 1968, 243, 160-166 (p. 124)

- 119 SUZUKI H., LI S.C. et LI Y.T. J. Biol. Chem. 1970, 245, 781-786 (p. 8) 120 - SVENNERHOLM L. - J. Neurochem. 1963, 10, 613 (p. 110) 121 - TALLMAN J.F., BRADY R.O., QUIRK J.M., VILLALBA M. et GAL A.E. - J. Biol. Chem. 1974, 249, 3489-3499 (p. 14, 81, 114, 116) 122 - TARENTINO A.L. et MALEY F. - Arch. Biochem. Biophys. 1971, 147, 446-456 (p. 9, 12, 94, 110) 123 - TILLMANS J. et PHILIPPI K. - Biochem. Z. 1929, 215, 36 (p. 119) 124 - UDENFRIED S., STEIN S., BOHLEN P., DAIRMAN W., LEIMGRUBER W. et WEIGELE M. -Science 1972, 178, 871-872 (p. T.) 125 - VANDERSYPPE R. - D.E.A. de Biochimie Lille, 1971 (p. 46) 126 - VERPOORTE J.A. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 4787-4793 (p. 12, 114, 121) 127 - VERPOORTE J.A. - Biochemistry 1974, 13, 793-799 (p. 91, 94, 119, 121) 128 - VESTERBERG O. et SVENSSON H. - Acta Chem. Scand. 1966, 20, 820-834 (p. T<sub>o</sub>) 129 - VIKHA G.V., KAVERZNEVA E.D. et KHORLIN A. Ya - Biokhimiya 1971, 36, 33-42 (p. 8, 45, 47, 107) 130 - WAGH P.V., BORNSTEIN I. et WINZLER R.J. - J. Biol. Chem. 1969, 244, 658-665 (p. 6) 131 - WAN C.C., MULDREY J.E., LI S.C. et LI Y.T. - J. Biol. Chem. 1976, 251, 4384-4388 132 - WATANABE K. - J. Biochem. 1936, 24, 305- (p. 6) 133 - WEISSMAN B., HADJIIOANNOU S. et TORNHEIM J. - J. Biol. Chem. 1964, 239, 59-) 63 (p. 7, 45) 134 - WENGER D.A., OKADA S. et O'BRIEN J.S. - Arch. Biochem. Biophys. 1972, 153, 116-129 (p. 110) 135 - WERRIES E., WOLLEK E., GOTTSCHALK A. et BUDDECKE E. - Eur. J. Biochem. 1969, 10, 445-449 (p. 29, 34, T<sub>22</sub>) 136 - WETMORE S.J. et VERPOORTE J.A. - Can. J. Biochem. 1972, 50, 563-573 (p. 12, 14, 81) 137 - WIEDERSCHAIN G.Y. et ROSENFELD E.L. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1969, 51, 1075-1084 (p. 8) 138 - WIEDERSCHAIN G.Y. et ROSENFELD E.L. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971, 44, 1008-1014 (p. 9)
  - 139 WIELAND T. et PFLEIDERER G. Angew. Chem. Internat. Edn. 1962, 1, 169 (p. 10)
  - 140 YAMASHINA I. et MAKINO M. J. Biochem. 1962, 51, 359 (p. 48)
  - 141 ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G. J. Chromatogr. 1972, 69, 291-304 (p. 119)