

N° d'ordre : 699

50376
1978
105

50376
1978
105

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

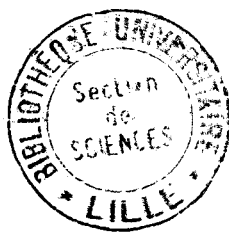
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Jean-Pierre DUCATILLON

RECHERCHES SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE
DE L'ACTIVITE ENDO- β -N- ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE
DU FOIE DE RAT



Soutenue le 24 juin 1978, devant la Commission d'Examen

M. J. MONTREUIL

Président

Melle G. SPIK

Rapporteur

M. G. STRECKER

Examineur



030 021566 4

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

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	I
GENERALITES	4
I - <u>DEFINITION</u>	6
II - <u>REPARTITION</u>	6
A - <u>ENDOHEXOSAMINIDASES BACTERIENNES</u>	6
1 - Diplococcus pneumoniae type I	6
2 - Streptomyces griseus	7
3 - Clostridium perfringens	7
4 - Saccharomyces cerevisiae	7
B - <u>ENDOHEXOSAMINIDASE PRESENTE DANS DES TISSUS VEGETAUX ET ANIMAUX</u>	8
III- <u>PROPRIETES DES ENDO-β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASES</u>	8
A - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	8
1 - Masse moléculaire	8
2 - Composition en acides aminés	9
B - <u>PROPRIETES ENZYMATIQUES</u>	9
1 - pH optimum et stabilité en fonction du pH	9
2 - Influence de la température	9
3 - Action des effecteurs	9
4 - Spécificité d'action	12

	Pages
TRAVAUX PERSONNELS	20
MATERIELS ET METHODES	21
ISOLEMENT ET ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE	22
I - <u>PREPARATIONS DES GLYCOPEPTIDES</u>	22
A - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE</u>	22
B - <u>MARQUAGE DU GLYCOPEPTIDE DE L'OVALBUMINE PAR <u>N-ACETYLATION</u></u>	22
I - N-acétylation du glycopeptide	23
2 - Purification du glycopeptide-N-acétylé	23
II - <u>PREPARATION DU TEMOIN N-β -ASPARTYL-GLUCOSMINYLAMINE- <u>N-ACETYLE</u></u>	23
PREPARATION DE DIFFERENTES FRACTIONS A PARTIR DU FOIE DE RAT	25
I - <u>PREPARATION D'UNE FRACTION RENFERMANT L'ACTIVITE ENDO -β - <u>N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE A PARTIR DU FOIE DE RAT TOTAL</u></u>	25
II - <u>PREPARATION DE DIVERSES FRACTIONS CELLULAIRES BRUTES</u>	25
III - <u>PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN CERTAINS ORGANITES</u>	27
A - <u>PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHIE EN MEMBRANES <u>PLASMIQUES</u></u>	27
B - <u>PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHIE EN NOYAUX</u>	30

	Pages
<u>C - PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHEE EN LYSOSOMES, PEROXYSOMES ET MITOCHONDRIES</u>	32
<u>D - PREPARATION D'UNE FRACTION CYTOSOLIQUE</u>	34
MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ENDO- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS DU FOIE DE RAT	35
I - <u>ACTION DES DIFFERENTES PREPARATIONS ENZYMATIQUES DU FOIE DE RAT SUR LE GLYCOPEPTIDE-N-ACETYLE DE L'OVALBUMINE</u>	35
II - <u>IDENTIFICATION DES PRODUITS DE LA REACTION ENZYMATIQUE</u>	35
A - <u>SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE</u>	35
B - <u>REPERAGE DES FRACTIONS RADIO-ACTIVES</u>	36
C - <u>ETUDE DES COMPOSES N-ACETYLES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	36
RESULTATS	37
ETUDE DU SUBSTRAT UTILISE	38
I - <u>ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPROTEINIQUE</u>	38
II - <u>ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE</u>	38
A - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	40
B - <u>COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES</u>	41
C - <u>CONCLUSION</u>	41
III - <u>ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE (¹⁴C)-N-ACETYLE</u>	43

	Pages
<p>ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES DE LA REACTION ENZYMATIQUE</p>	46
I - <u>CINETIQUE D'HYDROLYSE</u>	47
II - <u>DETERMINATION DU PH OPTIMUM D'ACTION</u>	53
III - <u>TEMPERATURE OPTIMALE</u>	56
IV - <u>CONCLUSION</u>	56
<p>RECHERCHE DE LA FRACTION CELLULAIRE CONTENANT L'ACTIVITE ENDO-β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE</p>	57
I - <u>A PARTIR DE FRACTIONS CELLULAIRES BRUTES</u>	57
II - <u>A PARTIR DE FRACTIONS ENRICHIES EN CERTAINS ORGANITES</u>	60
A - <u>A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN MEMBRANES PLASMIQUES</u>	60
B - <u>A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN NOYAUX</u>	61
C - <u>A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN LYSOSOMES, PEROXYSOMES ET MITOCHONDRIES</u>	64
D - <u>A PARTIR D'UNE FRACTION CYTOSOLIQUE</u>	64
<p>CONCLUSIONS GENERALES</p>	66
<p>BIBLIOGRAPHIE</p>	70

I N T R O D U C T I O N

Les glycoprotéines sont des molécules issues de l'association d'une protéine et d'un groupement prosthétique de nature glucidique. Les glycoprotéines peuvent être divisées en deux types, suivant la manière dont se lie le groupement glycanique à la protéine. En effet, les auteurs distinguent les glycoprotéines à liaison O-glycosidique et les glycoprotéines à liaison N-glycosidique.

Des travaux récents et en particulier ceux de MONTREUIL (1) sur la structure des glycoprotéines permettent de classer les glycoprotéines à liaison N-asparaginyl-glucosamine en deux groupes distincts.

- les glycoprotéines de type oligomannosidique,
- les glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique.

Les structures de ces deux groupes sont schématisées sur la figure I page 2.

Il semble d'ailleurs de plus en plus que ces deux groupes de glycoprotéines possèdent un noyau pentasaccharidique commun.



L'étude d'oligosaccharides tissulaires ou urinaires de différentes maladies lysosomiales, caractérisées par des déficits de l'activité d'hydrolases acides des lysosomes, montre une accumulation de composés incomplètement dégradés provenant le plus souvent du catabolisme des glycoconjugués. Ces oligosaccharides possèdent une N-acétylglucosamine en position réductrice terminale (NORDEN et al. (2,3), STRECKER et al. (4)).

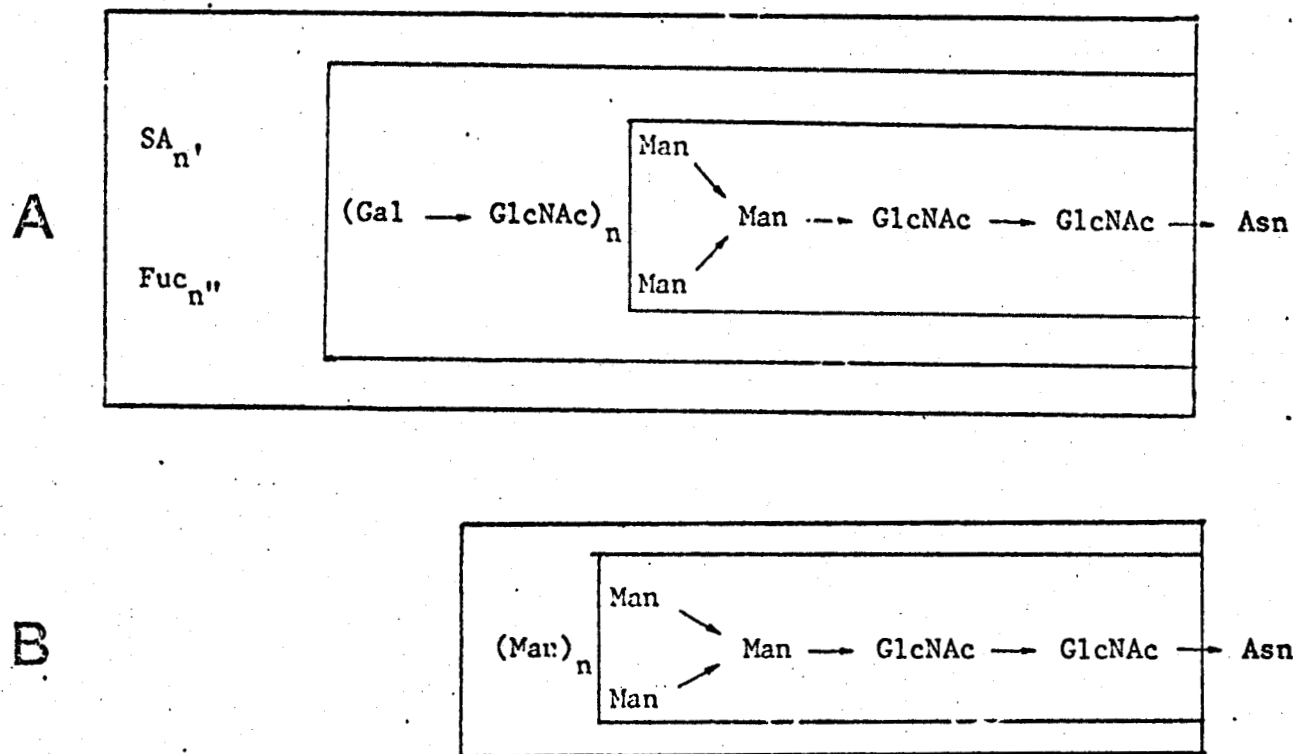


Figure 1 : Schéma général de structure de glycoprotéines

A - de type N-acétylglucosaminique

B - de type oligomannosidique

(D'Après MONTREUIL (1))

Nous remarquons d'autre part dans d'autres maladies , notamment l'aspartylglucosaminurie , une accumulation de Asn-GlcNAc (JENNER et al. (5) , PALO et al. (6)) . Ces observations suggèrent donc l'existence dans les tissus humains d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase agissant au niveau du di-N-acétylchitobiose (GlcNAc-GlcNAc) proche du point d'attache du glycanne lié au peptide ou à la protéine .

La plupart des enzymes caractérisées , dégradant les chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines , sont des exoglycosidases libérant des monosaccharides à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique .

Cependant , récemment , MURAMATSU (7) puis d'autres auteurs ont mis en évidence une endohexosaminidase qui libère la chaîne oligosaccharidique de la chaîne protéinique des glycoprotéines.

L'étude d'une telle enzyme présente un grand intérêt . Tout d'abord un intérêt structural : une enzyme purifiée permettra de préciser la structure glycanne de certaines glycoprotéines (tels les travaux de TRIMBLE et al.(8)); puis un intérêt métabolique : en effet , la localisation cellulaire de cette enzyme permettra de mieux comprendre le catabolisme des glycoprotéines ; enfin grâce à l'utilisation de cette enzyme nous pourrions éliminer les chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines et ainsi mieux comprendre le rôle biologique de ces chaînes .

Nous nous sommes plus particulièrement attachés au problème de la localisation cellulaire de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase et à sa mise en évidence dans le foie de rat . Pour cela nous avons utilisé comme NISHIGAKI et al.(9) un substrat oligomannosidique . Cependant cette étude devra être complétée en utilisant comme substrat des glycopeptides N-acétyllactosaminiques avec ou sans acide sialique . Ceci nous permettrait de jeter les bases du catabolisme des glycoprotéines encore relativement mal connu .

GENERALITES

Depuis quelques années de nombreux auteurs ont mis en évidence des endoglycosidases agissant sur différents substrats saccharidiques : d'une part , différentes endoglucanases (JONES et al. (10) YAMAMOTO et al.(11) WILSON et al.(12) BATHGATE et al.(13) MANNERS et al.(14) et et endomannases (KUZNETSON et al. (15), WADSTROM et al. (16)) agissant à l'intérieur de chaînes saccharidiques ; d'autre part , une endo-N- β -acétylglucosaminidase isolée de Staphylococcus aureus (NAKAJIMA et al. (17)), de Clostridium perfringens (MARTIN et al. (18)) et d'une préparation d' α -amylase d'orge (IWATA et al. (19)) hydrolysant la muréine de la paroi cellulaire bactérienne en libérant des peptido-glycannes possédant une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice . Une endo- β galactosidase a également été isolée de Escherichia freundii par FUKUDA et al. (20) et de Diplococcus pneumonia par TAKASAKI et KOBATA (21) hydrolysant des chaînes polysaccharidiques au niveau de résidus de galactoses internes.

Enfin trois types d'endoglycosidases , nous intéressant plus spécialement ont été mis en évidence. Ces enzymes sont actives sur le polysaccharide attaché par une liaison asparaginy-N-acétylglucosamine ou séryl-N-acétylgalactosamine à une protéine.

Le premier type est une glycoaspartamidase (YAMASHINA et al. (22)). Cette enzyme hydrolyse la liaison amide N-acétylglucosamine - asparagine si l'asparagine n'est pas conjuguée à d'autres acides aminés. Les sources et le mécanisme d'action de cette 4 L-aspartyl-N-acétylglucosylamine-amido-hydrolase ont été décrits par TANAKA et al. (23) .

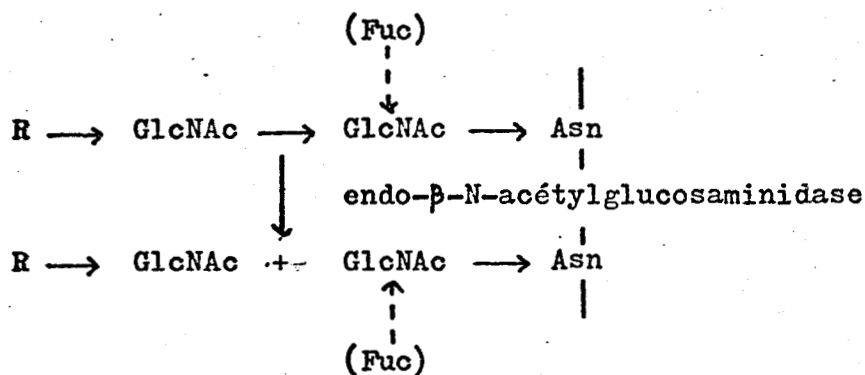
Le second type est une endo- α -N-acétylgalactosaminidase hydrolysant la liaison N-acétylgalactosaminide de la sérine ou de la thréonine d'une glycoprotéine (ENDO et KOBATA (24)) .

Le troisième groupe d'enzyme est constitué par les endo- β -N-acétylglucoaminidases hydrolysant le résidu di-N-acétylchitobiose du noyau pentasaccharidique des glycopeptides. Ce sont ces enzymes que nous étudierons plus spécialement .

Nous verrons successivement le mécanisme d'action , la répartition et les principales propriétés de ce groupe d'enzymes .

I - DEFINITION

Les endohexosaminidases étudiées sont des enzymes qui hydrolysent le résidu di-N-acétylchitobiose du noyau pentasaccharidique des glycopeptides en un oligosaccharide possédant une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice , et en un composé peptidique sur lequel s'attache le deuxième résidu N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice .



La mise en évidence de l'enzyme a été faite dans différentes souches bactériennes et dans des tissus de certains végétaux et animaux

II - REPARTITION :

A - ENDOHEXOSAMINIDASES BACTERIENNES :

1 - Diplococcus pneumoniae type I

C'est en 1971 que MURAMATSU (25) a mis en évidence une enzyme

préparée à partir de Diplococcus pneumoniae type I libérant un oligosaccharide contenant du mannose et de la N-acétylglucosamine à partir des γ -globulines de myélome de souris . Cette enzyme a été appelée endo- β -N-acétylglucosaminidase D .

2 - Streptomyces griseus :

Parallèlement TARENTINO et coll. (26) ont extrait une enzyme de ce type à partir d'une préparation de Streptomyces griseus . Aujourd'hui il a été montré que l'enzyme provenait en réalité d'une préparation de Streptomyces plicatus (TARENTINO et MALEY (27)) .

Cette enzyme agit aussi comme une endo- β -N-acétylglucosaminidase sur la liaison β -1,4 N acétylglucosaminide du résidu di-N-acétylchitobiose présent dans de nombreuses glycoprotéines .

Par la suite , cette préparation a été fractionnée en une endo- β -N-acétylglucosaminidase L et en une endo- β -N-acétylglucosaminidase H (TARENTINO et coll (28)) .

3 - Clostridium perfringens :

Après que CHIEN et coll. (29) aient mis en évidence une endo- β -N-acétylglucosaminidase dans une préparation commerciale de neuraminidase extraite de Clostridium perfringens , ITO et al. (30) ont démontré l'existence de deux enzymes de ce type mais de spécificités différentes dans cette même souche bactérienne .

4 - Saccharomyces cerevisiae :

NAKAJIMA et al. (31) supposent l'existence d'une enzyme de ce type dans Saccharomyces cerevisiae libérant dans le milieu un résidu oligosaccharidique contenant 18 mannoses et une N-acétylglucosamine en position réductrice terminale .

B - ENDOHEXOSAMINIDASE PRESENTE DANS DES TISSUS VEGETAUX
ET ANIMAUX .

Dans le règne végétal, OGATA-ARAKAWA et al.(32) ont caractérisé une endo- β -N-acétylglucosaminidase dans un extrait de figue . Par la suite, CHIEN et al.(33) ont montré l'existence de deux enzymes de ce type de spécificités différentes dans la sève de figuier .

Dans le règne animal une même activité endohexosaminidasique a été mis en évidence par TARENTINO et MALEY (34) dans l'oviducte de poule et par NISHIGAKI et al.(35) dans différents tissus de mammifères tels que le foie , la rate , et le rein de rat ainsi que dans le foie et la rate de porc . Enfin la présence d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase a été démontrée dans le foie humain par BOERSMA et al.(36) .

III - PROPRIETES DES ENDO- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASES:

A-- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES:

Parmi ces différentes sources, seules les propriétés physico-chimiques de l'endohexosaminidase H isolée de Streptomyces plicatus ont été plus spécialement étudiées par TARENTINO et coll.(37) . Pour les autres sources nous ne possédons pratiquement que des renseignements concernant les propriétés enzymatiques que nous essaierons de rassembler dans le chapitre suivant.

1 - Masse moléculaire :

La masse moléculaire de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H a été déterminée par centrifugation analytique et électrophorèse en gel de polyacrylamide avec du dodécyl sulfate de sodium . Cette masse moléculaire est de 28 000.

Récemment la masse moléculaire de l'endoenzyme isolée de l'oviducte de poule a été déterminée par TARENTINO et MALEY (38) et est de 56 000 .

2 - Composition en acides aminés :

La protéine enzymatique H contient approximativement 40% d'acides aminés neutres tels que le glycolle , l'alanine , la valine , la leucine et l'isoleucine .

Cette protéine contient en outre 3 résidus de méthionine et un résidu d'acide cystéique .

B. - PROPRIETES ENZYMATIQUES :

Les propriétés enzymatiques des endo- β -N-acétylhexosaminidases d'origines différentes ont été partiellement étudiées . Les renseignements que nous possédons concernant ces propriétés sont les suivants :

1- PH optimum et stabilité en fonction du pH :

Comme nous le montre le tableau I (pIO) les endo- β -N-acétylglucosaminidases , suivant leur origine , présentent un pH optimum différent , variant de pH 7,0 à 5,0 .

2 - Influence de la température :

Aucune étude de la variation de l'activité enzymatique en fonction de la température n'a été faite jusqu'à présent . Seul TARENTINO et coll. (39) indiquent que l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H ne perd pas son activité après lyophilisation ou après des congélations et décongélations successives .

3 - Action des effecteurs :

Selon KOIDE et coll. (40) et comme nous le montre le tableau II (pII), l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D est inhibée par le mannose . Par contre , le glucose , le galactose et la N-acétylglucosamine ne semblent pas avoir d'effet sur celle-ci .

Le méthyl α -mannoside et le p-nitrophényl α -mannopyranoside

TABLEAU I

pH optimum et p. 100 d'activité résiduelle à pH 5,3 et 8,2
des endo- β -N-acétylglucosaminidases isolées de différentes souches.

Enzyme	pH optimum	p. 100 d'activité résiduelle		Référence
		5,3	8,2	
<u>Diplococcus pneumoniae D</u>	6,5	50	50	KOIDE <u>et Coll.</u> (41)
<u>Streptomyces griseus H</u>	5,0 à 6,0	100	24	TARENTINO <u>et Coll.</u> (42)
<u>Clostridium perfringens</u> type C _I type C _{II}	6,5 à 7,0	85	60	ITO <u>et al.</u> (43)
	7,0	50	40	
Foie de porc	7,0	10	-	NISHIGAKI <u>et Coll.</u> (44)
Oviducte de poule	5,5	-	40	TARENTINO <u>et Coll.</u> (45)



Effet de différents composés sur l'activité des
endo-β-N-acétylglucosaminidases D et H
 (KOIDE *et al.* (46))

Composés	Concentration	p.100 d'activité résiduelle	
		D	H
Témoin		100	100
Mannose	0,5	6,1	80,1
Glucose	0,5	82,8	
Galactose	0,5	76,9	
N-acétylglucosamine	0,5	108	79,3
Méthyl- α -mannoside	0,05	46,5	89,7*
p-Nitrophényl α -mannopyranoside	0,01	30,0	105
p-Nitrophényl α -glucopyranoside	0,01	97,1	105
Mannane de levure	15 mg/ml	106	38,0
HgCl ₂	0,01		40,0
Chloromercurobenzoate	0,01		70,0
EDTA	0,035	100	

* La concentration en méthy- α -mannoside est de 0,5 M.



sont aussi des inhibiteurs . Le p-nitrophényl α -mannopyranoside se révèle être un inhibiteur compétitif se fixant au voisinage du site catalytique de l'enzyme .

Ces différents composés ne semblent pas influencer l'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H . Par contre, celle-ci est sensible aux mannanes de levure .

Ces résultats nous montrent donc que nous nous trouvons en présence d'au moins deux types d'enzymes différents , à spécificité d'action différente .

4 - Spécificité d'action :

Nous avons vu que des endo- β -N-acétylglucosaminidases ont été isolées de différentes sources . Il semble que ces endoenzymes possèdent des spécificités d'action différentes . Nous allons tenter ici de définir leur spécificité . Les résultats sont rassemblés dans les tableaux III et IV (p13 et p14) .

a - Spécificité d'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H isolée de Streptomyces griseus :

Cette endoenzyme H isolée de Streptomyces griseus définie aujourd'hui comme étant Streptomyces plicatus (47) a été séparée d'une autre endo- β -N-acétylglucosaminidase appelée L ou "Light" , encore très peu étudiée actuellement , active sur $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_4$. Cette enzyme semble être spécifique des chaînes légères et n'agit sur aucun glycopeptide de masse moléculaire plus importante .

L'endo- β -N-acétylglucosaminidase H ou "heavy" n'agit que sur des glycoprotéines , glycopeptides et dérivés glycosylasparagiques du type oligomannosidique possédant au moins 3 mannoses (Tableau III p13) . Par contre , elle est inactive sur des glycopeptides de type N-acétyl-lactosaminique , intacts ou partiellement hydrolysés .

Tableau III :

Action des différentes endo-β-N-acétylglucosaminidases sur des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique et leurs dérivés

Glycopeptides préparés à partir d'immunoglobuline IgG	Streptomycètes griséus		Diplococcus pneumoniae	Foie de porc
	L TARENTINO et al. (48)	H ARAKAWA et al. (49)	ARAKAWA et al. (50)	NISHIGAKI et al. (51)
$\begin{array}{c} \text{NANA} \begin{array}{l} \xrightarrow{\alpha-2,6} \text{Gal} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,3} \text{Man} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{Asn} \\ \xrightarrow{\alpha-2,6} \text{Gal} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta-1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{Man} \end{array} \\ \text{Fuc} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{GlcNAc} \end{array}$	-	-	-	-
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Man} \\ \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Man} \end{array}$	-	-	-	-
$\begin{array}{c} \text{Fuc} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Man} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Asn} \\ \text{Man} \end{array}$	-	-	-	-
$\begin{array}{c} \text{Gal} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Man} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Asn} \\ \text{Man} \end{array}$	- (a)	- (a)	+ (a)	-
$\begin{array}{c} \text{Fuc} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Man} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Asn} \\ \text{Man} \quad \text{Man} \end{array}$	-	-	+	-
$\begin{array}{c} \text{Man} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Asn} \\ \text{Man} \quad \text{Man} \end{array}$	-	-(b)	+	-
$\text{Man} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc} \longrightarrow \text{Asn}$	+	-	-	-
$\text{GlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc}$	-	-	-	-



(a) D'après ITO et al. (52) - (b) d'après TARENTINO et al. (53) réaction positive

TABLEAU IV:

Action des différentes endo- β N-acétylglucosaminidases
sur les glycopeptides de type oligomannosidique et de leurs dérivés.

Nature des Glycopeptides	Streptomyces griseus H		Diplococcus pneumoniae	Foie de porc
	TARENTINO <u>et al.</u> (54)	ARAKAWA <u>et al.</u> (55)		
<p>THYROGLOBULINE :</p> <p>(Man)₈ (GlcNAc)₂ Asn</p>	-	+	-	-
<p>OVALBUMINE :</p> <p>(GlcNAc)₂ (Man)₆ (GlcNAc)₂ Asn</p>	-	+	-	+
(Man) ₆ (GlcNAc) ₂ Asn	-	+	-	+
(Man) ₅ (GlcNAc) ₂ Asn	-	+	+	+
(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Asn	-	-(b)	+	-
(Man) ₁ (GlcNAc) ₂ Asn	+	-	-	
(GlcNAc) ₂ (Man) ₆ (GlcNAc) ₂		+		



(b) d'après TARENTINO et al. (57) : réaction positive

L'asparagine n'est pas nécessaire à l'hydrolyse . Selon TARENTINO et MALEY (57) le fucose attaché au niveau du di-N-acétylchitobiose ne permet pas l'action de celle-ci sur le glycopeptide suivant :

$(AA)_x \text{Asn}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{Fuc})_4$; par contre, cette enzyme est active sur ce composé défucosylé , ceci contrairement aux résultats donnés par ARAKAWA et al. (58) où l'enzyme ne semble avoir aucune action sur les deux composés .

b - Spécificité d'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase

D isolée de Diplococcus pneumoniae :

Le tableau III (p13) nous montre que l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D agit seulement sur des glycopeptides de type N-acétyl-lactosaminique préalablement hydrolysés par la neuraminidase , la β galactosidase et la β -N-acétylglucosaminidase . La présence ou l'absence de fucose sur le résidu di-N-acétylchitobiose ne semblent pas intervenir dans la spécificité d'action de cette enzyme .

Récemment ITO et al. (59) ont démontré que l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D est également active sur un glycopeptide d'immunoglobuline de type G (IgG) possédant une chaîne intacte et une chaîne hydrolysée jusqu'au mannose du noyau pentasaccharidique . Après action de l' α -mannosidase , ce glycopeptide devient résistant à l'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D . Le résidu mannose semble donc nécessaire à l'action de cette enzyme .

D'autre part , cette enzyme est active sur un dérivé glycopeptidique de l'ovalbumine dont la structure est indiquée sur la figure 2 page I6 .

Par contre , l'enzyme n'est pas active sur l'homologue supérieur de ce glycopeptide de composition $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$ possédant un résidu mannosyl en plus , lié en $\alpha 1-2$ sur le mannose marqué d'une

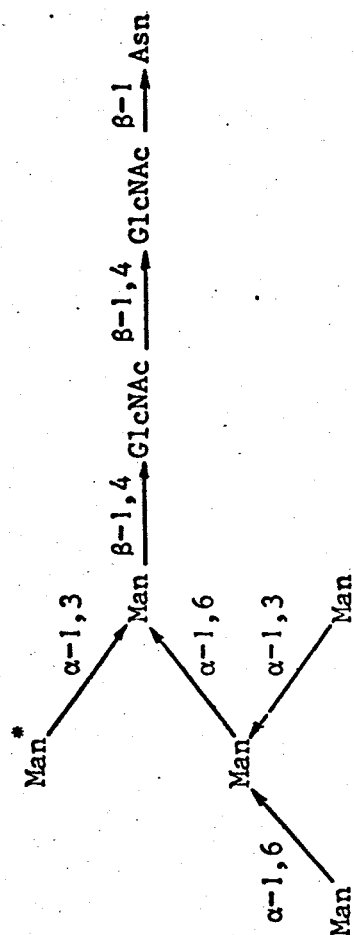


Figure 2: Structure d'un glycopeptide de l'ovalbumine

(TAI et coll. (60))

astérisque . Il semble donc que la spécificité envers le substrat soit basée sur la présence d'un résidu mannosyl libre lié sur le résidu mannosyl , lui-même lié en β sur le di-N-acétylchitobiose .

c - Spécificité d'action des endo- β -N-acétylglucosaminidases isolées de Clostridium perfringens :

Récemment ITO et al. (61) ont démontré l'existence chez Clostridium perfringens de deux types d'endo- β -N-acétylglucosaminidases appelées C_I et C_{II} . C_I n'hydrolyse que des glycopeptides de structure N-acétyllactosaminique de même nature que ceux hydrolysés par l'endo-enzyme isolée de Diplococcus pneumoniae , tandis que C_{II} ne semble hydrolyser que des glycopeptides de structure oligomannosidique mais possède cependant une spécificité plus étroite que l'endoenzyme H isolé de Streptomyces plicatus . En effet selon TAI et al. (62,63) l'endoenzyme C_{II} doit posséder un résidu mannosyl (branché en α 1-3 sur le mannose branché en β -voir fig. 4-) non substitué en C-4 .

d - Spécificité d'action des endo- β -N-acétylglucosaminidases isolées de la sève de figuier :

Dernièrement CHIEN et al. (64) ont mis en évidence dans la sève de figuier également deux types d'endo- β -N-acétylglucosaminidases nommées F_I et F_{II} . L'endoenzyme F_I agit de la même manière que l'endoenzyme D isolée de Diplococcus pneumoniae tandis que F_{II} semble avoir les mêmes caractéristiques de spécificité que l'endoenzyme H .

e - Spécificité d'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase isolée de l'oviducte de poule :

Cette enzyme étudiée par TARENTINO et al. (65) semble n'hydrolyser que des glycopeptides de type oligomannosidique . Cependant cette enzyme est capable d'agir sur le glycopeptide $(AA)_x \text{Asn} (\text{GlcNAc})_2 (\text{Man})_3 (\text{Fuc})_4$ se rapprochant des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique .

f - Spécificité d'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase
de foie de porc :

La spécificité d'action envers le substrat de l'enzyme de foie de porc a peu été étudiée jusqu'à présent . Cependant, il semble que cette enzyme n'agisse que sur des glycopeptides de type oligomannosidique .

g - Conclusions concernant les spécificités d'action :

Il semble qu'il existe dans la nature au moins deux types d'endo- β -N-acétylglucosaminidases : un premier groupe n'hydrolysant que des glycopeptides de type oligomannosidique , se rapprochant de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H et un deuxième groupe n'agissant que sur des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique ayant déjà subi l'action d'exoglycosidases (tel que ceux décrit dans le tableau III page 13) , se rapprochant ainsi de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D . Nous avons essayé de classer les différentes endo- β -N-acétylglucosaminidases décrites plus haut dans le tableau V page 19 .

Cependant il devrait exister dans la nature d'autres endo- β -N-acétylglucosaminidases à spécificité d'action différentes car certains auteurs (STRECKER et al. (66)) ont mis en évidence dans les urines de certains malades des composés polysaccharidiques de nature N-acétyllactosaminique possédant une N-acétylglucosamine en position réductrice terminale . Ces structures ne peuvent provenir que de l'hydrolyse de glycoprotéines par une endo- β -N-acétylglucosaminidase .

TABLEAU V

Essai de classification des endo- β -N-acétylglucosaminidases
isolées de diverses sources.

Enzyme de type		oligomannosidique	N-acétyl lactosaminique
Source			
<u>Diplococcus</u> <u>pneumoniae</u>			+
<u>Streptomyces</u> <u>plicatus</u>		+	
<u>Clostridium</u> <u>perfringens</u>	C _I		+
	C _{II}	+	
Sève de figuier	F _I		+
	F _{II}	+	
Oviducte de poule		+	
Foie de porc		+	



TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

ISOLEMENT ET ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE

Les analyses enzymatiques ont été effectuées essentiellement sur le glycopeptide provenant de l'hydrolyse pronasique de l'ovalbumine Sigma V N° A 5 503.

Le choix de ce substrat provient du fait qu'il s'agit d'une glycoprotéine de type oligomannosidique dont la structure donnée p.16 est hydrolysée par l'endoenzyme de foie de rat (NISHIGAKI et al. (67)).

I PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

A - HYDROLYSE PRONASIQUE

Le glycopeptide a été obtenu par hydrolyse pronasique de l'ovalbumine selon le protocole décrit par YAMASHINA et MAKINO (68) modifié selon MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (69).

Après passage sur colonnes d'échangeurs d'ions, les glycopeptides sont purifiés par gel filtration sur des colonnes de Biogel P 30 (2 x 25 cm). L'élution de la colonne est réalisée par de l'eau distillée et le repérage des constituants présents dans l'effluent est obtenu en dosant les glucides par la méthode calorimétrique au phénol-sulfurique (DUBOIS et coll. (70)).

B - MARQUAGE DU GLYCOPEPTIDE DE L'OVALBUMINE PAR

N - ACETYLATION

Le glycopeptide natif a été N - acétylé par l'anhydride acétique (^{14}C) selon la méthode modifiée de KOIDE et MURAMATSU (71).

1- N-acétylation du glycopeptide :

A 2 μ M de glycopeptide de l'ovalbumine dissoutes dans 200 μ l d'une solution de NaHCO₃ à 0,5% , on ajoute à -20° C 70 μ l d'une solution d'anhydride acétique (53 mCi par m mole) dans de l'acétone (18,4 μ l d'anhydride acétique contenue dans 200 μ l d'acétone).

Il est important de respecter les quantités ci-dessus car un déficit en anhydride acétique provoque une N-acétylation partielle tandis qu'un excès provoque une dé-N-acétylation du glycopeptide .

La réaction s'effectue à la température du laboratoire pendant une heure. Le glycopeptide-N-acétylé est alors séché sous courant d'air et repris par une quantité minimale d'eau distillée.

2- Purification du glycopeptide-N-acétylé:

La solution de glycopeptide-N-acétylé est ensuite purifiée par gel filtration sur une colonne de Biogel P₂ (1 x 50 cm). L'élution de la colonne est réalisée par de l'eau distillée à un débit de 8 ml/h ; des fractions de 1 ml sont recueillies. Le repérage du glycopeptide-N-acétylé dans l'effluent est obtenu en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique (DUBOIS et coll. (72)) et en mesurant la radioactivité des différentes fractions de l'effluent.

II- PREPARATION DU TEMOIN N- β -ASPARTYL-GLUCOSAMINYLAMINE-N-ACETYLE

La N- β -aspartyl-glucosaminyllamine témoin a été préparée, dans un premier temps, selon le protocole décrit par MONSIGNY , ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (73), à partir du glyco-amino-acide β de l'ovomucoïde, puis dans un deuxième temps, nous avons utilisé une préparation commerciale Sigma.

Dans les deux cas, la pureté du composé a été vérifiée par analyse à l'auto-analyseur BECKMANN après hydrolyse (HCl 5,6 N, 100° C, 24 heures) et par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse (méthanol-HCl 0,5 et 1,5 N, 80° C pendant 48 heures).

La N- β -aspartyl-glucosaminylamine est ensuite N-acétylée par de l'anhydride acétique (¹⁴C) dans les conditions décrites précédemment, puis étant donné sa faible masse moléculaire, purifiée par une électrophorèse préparative sur papier Whatmann 3 MM sous une tension de 400 volts (7 volts/cm) pendant 16 heures dans le tampon pyridine-acide acétique-eau (3 : 1 : 387) de pH 5,4 décrit par GRIMMONPREZ et al. (74).

PREPARATIONS DE DIFFERENTES FRACTIONS

A PARTIR DU FOIE DE RAT

I PREPARATION D'UNE FRACTION RENFERMANT L'ACTIVITE ENDO- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE A PARTIR DU FOIE DE RAT TOTAL

L'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat a été préparée selon la méthode préconisée par NISHIGAKI, MURAMATSU et KOBATA (75) en vue de mettre au point une méthode permettant de mettre en évidence l'action de cette enzyme.

Des rats mâles de souche Wistar, en général au nombre de trois, sont décapités ; les foies sont rapidement prélevés et placés dans un bain de glace. Ils sont ensuite homogénéisés à + 4° C dans un broyeur Brand en présence d'une solution tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,0 (3 ml par g. de foie humide) pendant 15 minutes. L'homogénat est ensuite centrifugé à 88 000 g pendant 2 heures. Le surnageant est utilisé comme préparation d'endo- β -N-acétylglucosaminidase.

II PREPARATION DE DIVERSES FRACTIONS CELLULAIRES BRUTES.

Les différentes fractions cellulaires ont été préparées selon la méthode modifiée de HOGEBOM et al. (75 bis).

Des rats mâles de souche Wistar (généralement au nombre de trois) sont décapités. Les foies sont prélevés rapidement et placés dans le milieu d'homogénéisation (saccharose 0,33 M et acétate de Ca 3,3 mM), maintenus à basse température grâce à un bain de glace. Toutes les opérations ultérieures se font à + 4° C. Le détail des opérations est résumé dans la figure 3 page 26. Les foies sont débarrassés du tissu conjonctif par passage dans l'appareil de Fischer. L'homogénéisation se fait par 5 allers et retours du piston de l'appareil de Potter-Elvehjem.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Messieurs R. CACAN et C. DISSOUS qui nous ont formé aux techniques de fractionnement cellulaire

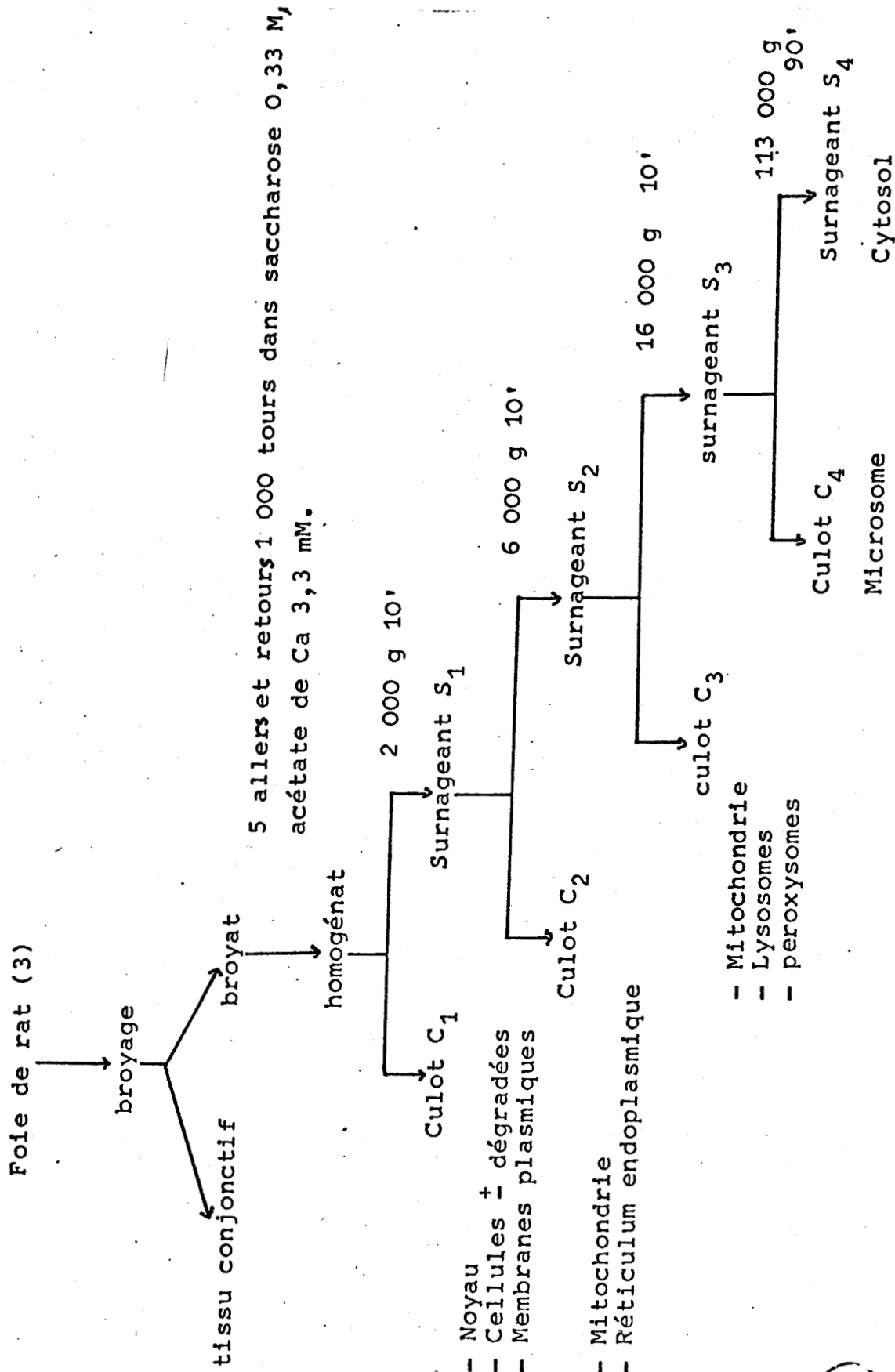


Fig. 3 : Schéma des différentes opérations pour l'obtention des différentes fractions cellulaires. HOGEBOM et al.(75 bis).

L'homogénat est amené à 100 ml avec le tampon (un ml est conservé pour l'étude de l'endoenzyme). L'homogénat est réparti dans des pots de centrifugation du rotor JA 20 et centrifugé à 2 000 g pendant 10 minutes. Les culots sont repris par le tampon et réhomogénéisés par 3 allers et retours du piston. On obtient ainsi 73 ml de culot C_1 contenant principalement des noyaux, des membranes plasmiques, et des cellules intactes ou plus ou moins brisées. Les surnageants S_1 (70 ml) sont rassemblés et centrifugés à 6 000 g pendant 10 minutes. On obtient ainsi de la même manière que précédemment 24 ml de culot C_2 contenant principalement des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Le surnageant S_2 (69 ml) est alors centrifugé à 16 000 g pendant 10 minutes. On obtient 31 ml de culot C_3 contenant des mitochondries, des peroxyosomes et des lysosomes. Aux 63 ml de surnageant S_3 on ajoute du $MgCl_2$ de façon à obtenir une concentration finale en $MgCl_2$ de 10 mM. Cette solution est alors centrifugée à 113 000 g pendant 90 minutes. On obtient alors 22 ml de culot C_4 contenant principalement du réticulum endoplasmique et 62 ml de surnageant S_4 correspondant au cytosol.

III PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN CERTAINS ORGANITES

A - PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHIE EN MEMBRANES

PLASMIQUES :

La méthode d'isolement des membranes plasmiques utilisée est celle décrite par RAY (76). La préparation comprend deux parties : d'abord la préparation de la fraction nucléaire grossière, puis le passage de cette fraction sur un gradient discontinu de saccharose. Le détail des opérations est résumé dans la figure 4 p. 28 et 5 p. 29 .

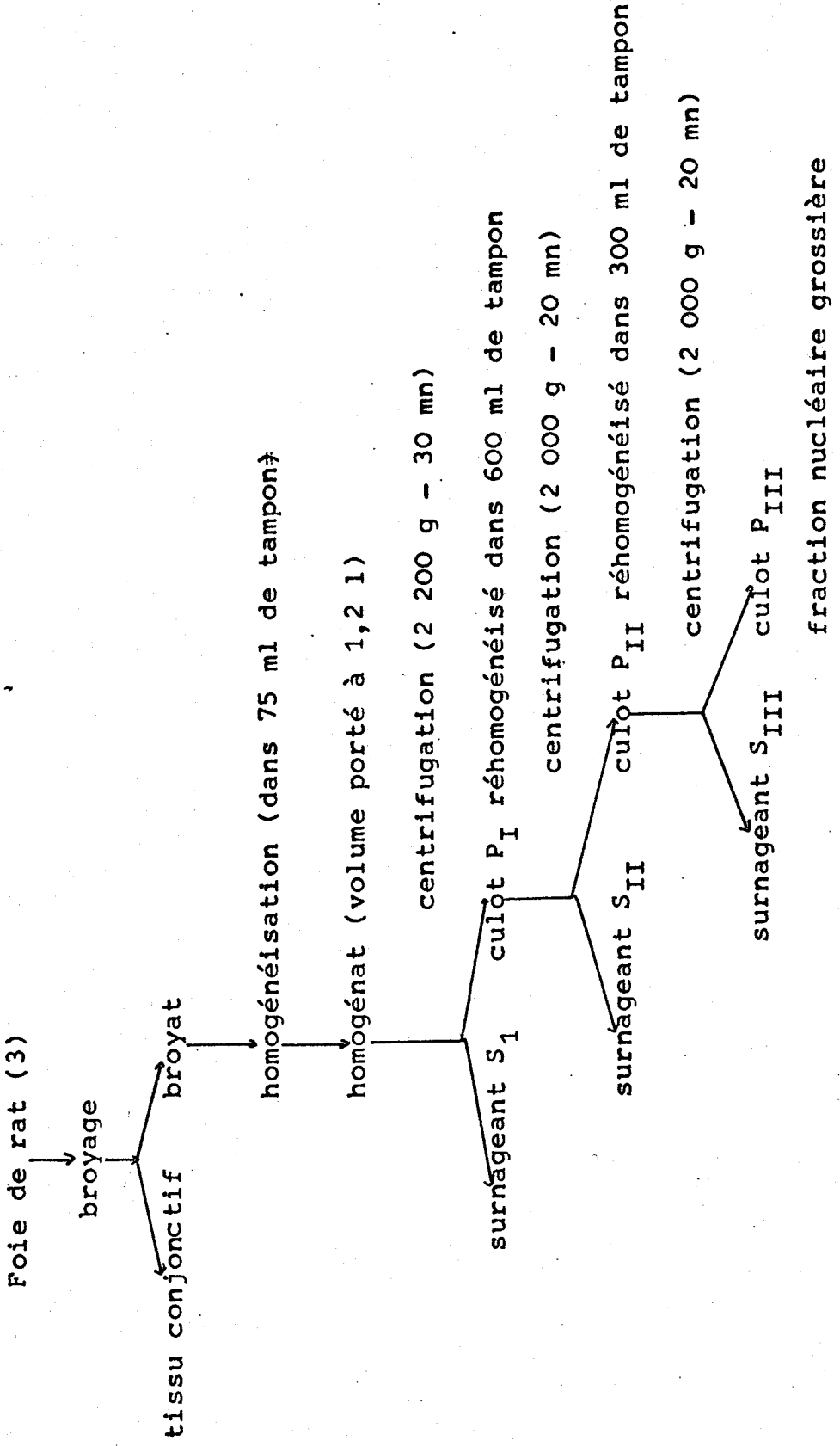


Fig.4: Schéma des différentes opérations pour l'obtention de la fraction nucléaire grossière par la méthode de RAY.(77)



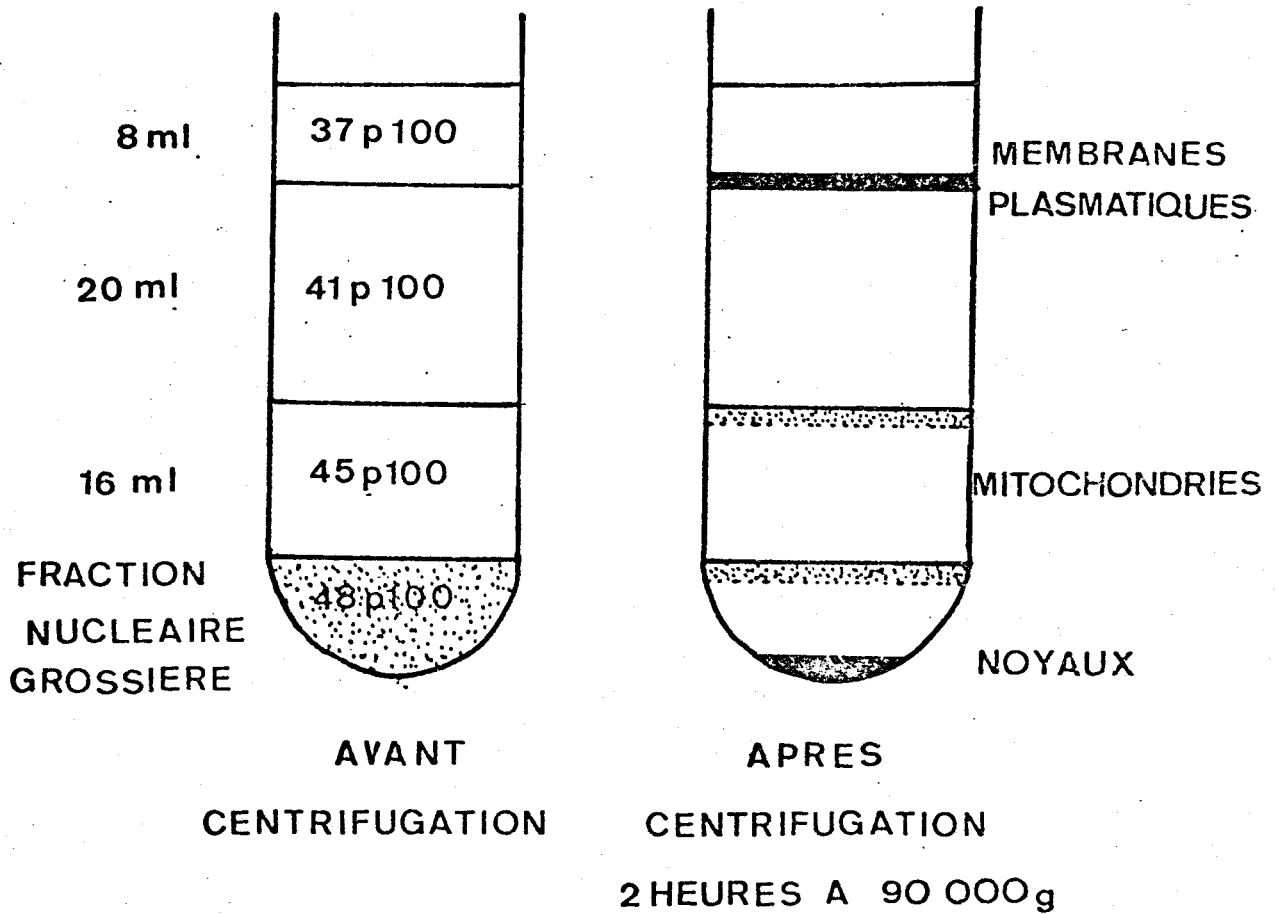


Figure 5

Schéma du fractionnement, par flottation, des membranes plasmiques sur gradient discontinu de saccharose. Les couches de saccharose sont exprimées en p. 100 (poids-poids).



La préparation et l'homogénéisation des foies de rat sont réalisées de la même façon que précédemment mais dans 70 ml de tampon d'homogénéisation composé d'une solution de NaHCO_3 , 1 mM et de CaCl_2 0,5 mM ajustée à pH 7,5. L'homogénat est amené à 1,2 l avec le tampon puis centrifugé à 22 000 g pendant 30 minutes.

Les culots (P_I) sont réhomogénéisés par 4 à 5 allers et retours du piston et amenés à 600 ml avec le tampon. Ce volume est centrifugé à 2 000 g pendant 20 minutes. Les culots (P_{II}) (homogénéisés de la même façon que précédemment) sont amenés à un volume de 300 ml et centrifugés à 2 000 g pendant 20 minutes pour donner le culot P_{III} : ce culot représente la fraction nucléaire brute.

Le culot P_{III} est suspendu dans 1 ml de tampon et mélangé à 8 ml de saccharose 70 p 100 (p/p). La suspension est ensuite répartie dans des tubes du rotor SW 25. On place sur la suspension 8 ml de saccharose 45 p 100 puis 10 ml de saccharose 41 p 100 et enfin 4 ml de saccharose 31 p 100. Les tubes sont ensuite centrifugés 2 heures à 90 000 g dans la centrifugeuse L2 65 B (BECKMANN). On prélève la fraction membranaire entre les couches de saccharose 41 p 100 et 37 p 100. La fraction membranaire est alors reprise par le tampon et centrifugée 15 minutes à 3 000 g. Ce culot est alors repris par 1,8 ml du tampon d'homogénéisation.

B - PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHIE EN NOYAUX

La fraction nucléaire purifiée a été préparée selon la méthode (légèrement modifiée) décrite par CHAUVÉAU et coll. (78). Le détail des opérations est résumé dans la figure 6 p. 31

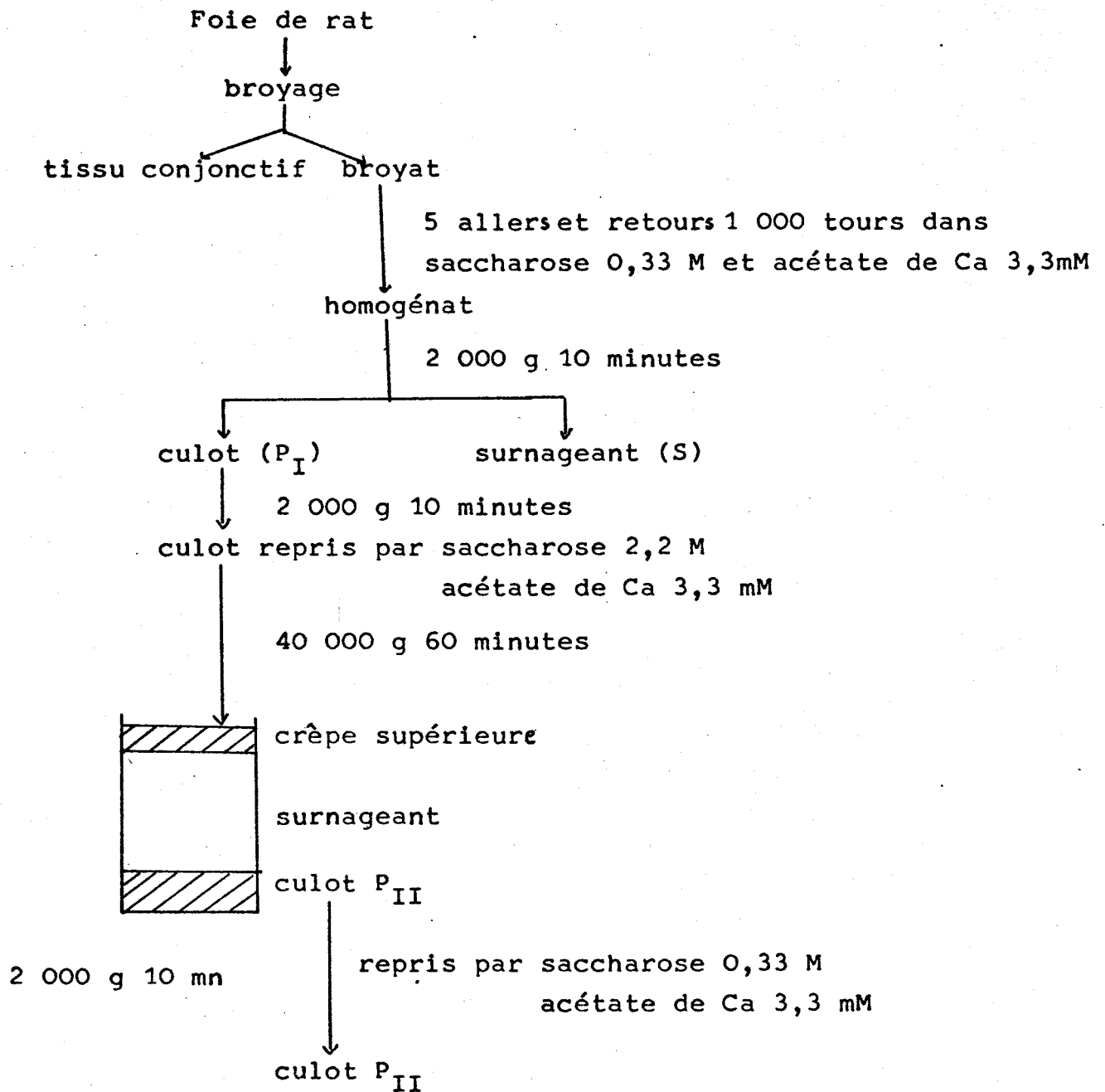


fig. 6: Schéma des différentes opérations pour l'obtention d'une fraction enrichie en noyaux.

Les premières étapes de la préparation sont identiques à celles de la première préparation. Le premier culot P_I obtenu (après centrifugation à 2 000 g pendant 10 mn) est remis en suspension puis centrifugé à 2 000 g pendant 10 minutes. Le culot est alors repris par un tampon composé de saccharose 2,2 M, acétate de Ca 3,3 mM et ajusté à 75 ml.

L'homogénat est centrifugé 60 minutes à 40 000 g. On obtient alors un culot P_{II} contenant la fraction nucléaire purifiée. Celui-ci est repris par un tampon saccharose 0,33 M, acétate de Ca 3,3 mM et centrifugé 10 minutes à 2 000 g. Le culot final repris par 18 ml de tampon représente la fraction nucléaire purifiée.

C - PREPARATION D'UNE FRACTION ENRICHIE EN LYSOSOMES,

PEROXYSOMES ET MITOCHONDRIES

Cette fraction a été préparée selon la méthode de MURRAY et al.(78 bis). Trois rats mâles de souche Wistar sont décapités. Les foies sont rapidement prélevés dans les mêmes conditions que précédemment et placés dans le milieu d'homogénéisation (saccharose 0,25 M et Tris 5 mM ajusté à pH 7,5). Le détail des différentes opérations effectuées est résumé dans la figure 7 p. 33 .

Les foies sont débarrassés du tissu conjonctif et homogénéisés de la même manière que pour la préparation des fractions cellulaires brutes (p. 25). Cet homogénat est alors centrifugé à 17 600 g pendant 10 minutes dans le rotor JA 20. On obtient alors deux culots : un premier culot rouge formé d'hématies qui est éliminé et un deuxième culot C_I qui est récupéré. Ce deuxième culot C_I est remis en suspension et centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est centrifugé une deuxième fois à 1 000 g pendant 10 minutes, puis centrifugé à 17 600 g pendant 10 minutes. Le culot

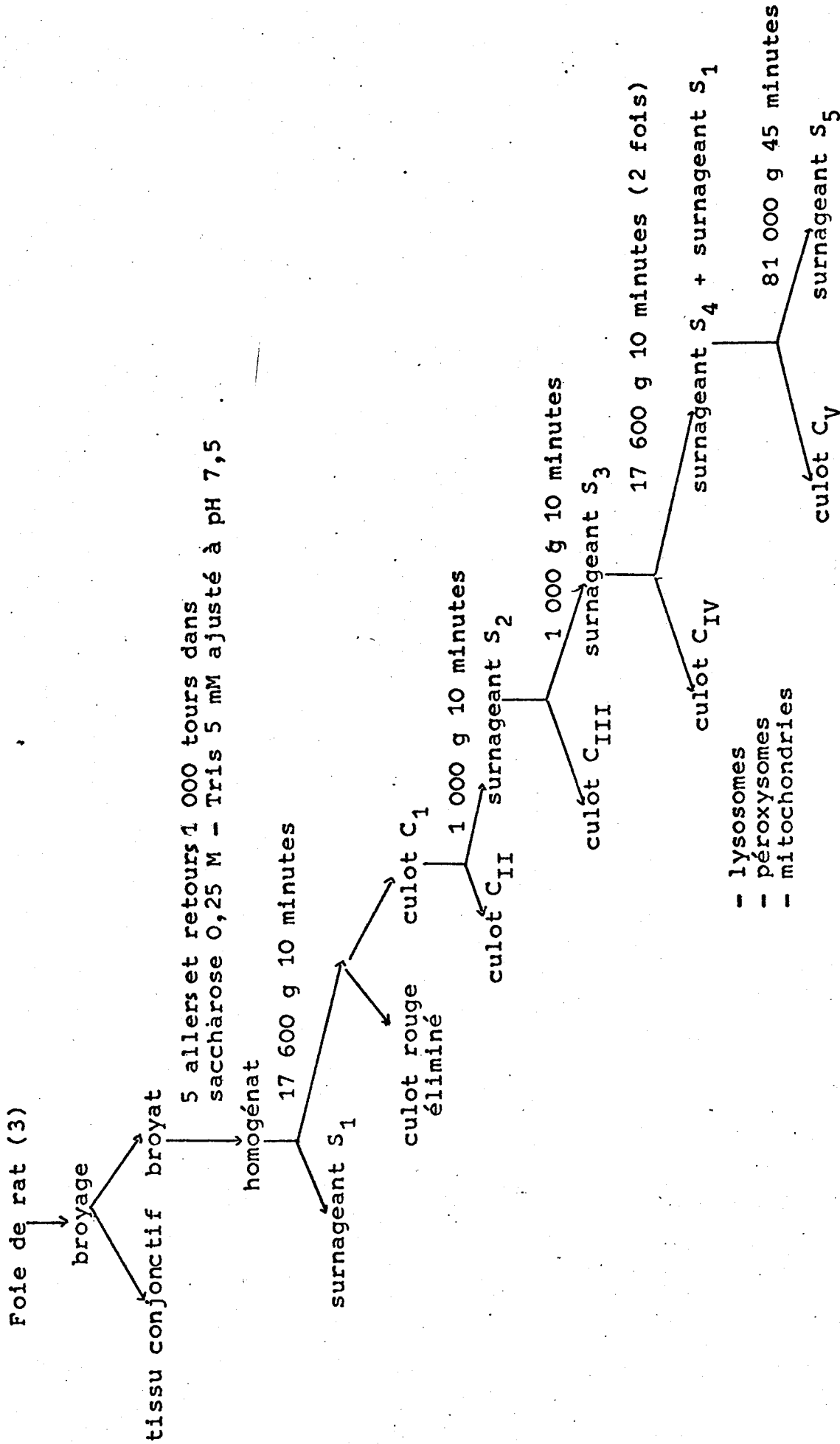


Fig. 7 : Schéma des différentes opérations pour l'obtention
des fractions enrichies en lysosomes, péroxysomes, mitochondries.
(MURRAY *et al.* (78 bis)).

BUS
LILLE

C_{IV} obtenu est repris puis centrifugé de la même manière pendant 10 minutes. On obtient alors un culot C_{IV} principalement constitué de lysosomes, peroxyosomes et mitochondries.

D - PREPARATION D'UNE FRACTION CYTOSOLIQUE

Pour préparer cette fraction, on utilise le dernier surnageant S₄ obtenu lors de la préparation précédente. Ce surnageant est centrifugé à 81 000 g pendant 45 minutes. Le surnageant S₅ obtenu est considéré comme la fraction cytosolique.

MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE
 ENDO- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE
 DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS DU FOIE DE RAT

Les différentes fractions cellulaires contenant ou non l'endo- β -N-acétylglucosaminidase sont utilisées en présence du glycopeptide-N-acétylé de l'ovalbumine.

I ACTION DES DIFFERENTES PREPARATIONS ENZYMATIQUES DU FOIE DE RAT
SUR LE GLYCOPEPTIDE-N-ACETYLE DE L'OVALBUMINE

0,1 ml de chaque fraction cellulaire préparée précédemment et 0,1 ml de tampon phosphate 50 mM ajusté au pH optimum, définit comme étant pH 7,0 sont placés à 37° C pendant 1 heure en présence d'une solution renfermant 0,1 mg de glycopeptide (¹⁴C)-N-acétylé de l'ovalbumine. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,2 ml d'éthanol, le mélange est centrifugé à basse vitesse et le surnageant éthanolique est évaporé à sec.

II IDENTIFICATION DES PRODUITS DE LA REACTION ENZYMATIQUE

L'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase sur le glycopeptide-N-acétylé doit s'accompagner de la libération du fragment GlcNAc-Asn-N-acétylé que nous avons cherché à mettre en évidence par chromatographie sur papier.

A - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

La recherche du fragment GlcNAc-Asn-N-acétylé présent dans le surnageant éthanolique a été réalisé par chromatographie descendante sur papier (Whatmann 3) dans le système solvant :
 pyridine - acétate d'éthyle - eau (1 : 2 : 2) décrit par JERMYN et

ISHERWOOD (79) pendant 40 à 48 heures. La vitesse de migration est contrôlée par un témoin coloré posé sur la même feuille de papier.

B - REPERAGE DES FRACTIONS RADIO-ACTIVES

Le chromatogramme est séché et découpé en bandes de 1 cm. Celles-ci sont déposées dans des fioles de comptage contenant 10 ml de liquide scintillant de composition suivante :

- 2 g de PPO (2,5 - diphényloxazol) ;
- 0,2 g de POPOP (1,4-bis - 2 (5 phényloxazolyl) benzène) ;
- toluène q.s.p. 1 litre.

Les fioles sont alors comptées dans un compteur à scintillation liquide Unilux (Nuclear-Chicago).

C - ETUDE DES COMPOSES-N-ACETYLES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les composés N-acétylés qui ont été élués après chromatographie sur papier ont été hydrolysés par HCl, 5,6 N à 100° C pendant 24 heures. L'asparagine-N-acétylé a été dansylé et identifié par chromatographie en couche mince (HARTLEY (80)). D'autre part, ces composés ont été méthanolysés (méthanol-HCl 1,5 N à 80° C pendant 48 heures) et les O-méthylglucosides trifluoracétylés des monosaccharides ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse selon le procédé de ZANETTA et al. (81).

RESULTATS

ETUDE DU SUBSTRAT UTILISE

I) ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPROTEINIQUE

L'ovalbumine du blanc d'oeuf de poule, qui est une préparation commerciale, s'est révélée hétérogène en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose. En effet, par électrophorèse, on sépare un constituant majeur précédé d'une bande plus fine non identifiée.

Les compositions centésimales et molaires des différents monosaccharides présents dans cette glycoprotéine sont rassemblés dans le tableau VI p 39.

Les valeurs obtenues en ce qui concerne la composition molaire en mannose et en N-acétylglucosamine (3,5 : 3) diffèrent de celles données dans la littérature (5 : 3) par MARSHALL et NEUBERGER (82). Cette différence peut s'expliquer par l'hétérogénéité de l'ovalbumine mise en évidence par électrophorèse.

II) ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE

L'hydrolyse pronasique de la glycoprotéine de l'ovalbumine nous conduit à un mélange de glycopeptides pronasiques qui, fractionné sur colonne de Biogel P₂ nous permet de récupérer à partir de 5 g d'ovalbumine deux fractions glycopeptidiques : A : 115 mg et

TABLEAU : VI
COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES
DE L'OVALBUMINE

Ovalbumine de poule

Composition centésimale

Monosaccharides neutres	2,1
N-acétylhexosamines	1,3

Composition molaire

Mannose	3,5
N-acétylglucosamine	3

B : 28 mg. Ces deux fractions ont été étudiées de façon à connaître leur composition en acides aminés et en monosaccharides.

A) COMPOSITION EN ACIDES AMINES

750 μ g de chaque échantillon sont hydrolysés par 750 μ l d'HCl 5,6 N sous vide pendant 24 heures à 105° C. L'hydrolysate, après avoir été séché et lavé au méthanol, est chromatographié sur papier dans le système solvant de FISHER et NEBEL (83) : pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5 : 5 : 1 : 3). L'échantillon A nous révèle que de l'acide aspartique et de la glucosamine tandis que l'échantillon B contient des résidus d'acide aspartique de thréonine, de leucine, de sérine et de glucosamine.

L'étude de ces deux hydrolysats en couche mince bidimensionnelle sur gel de silice G dans les systèmes solvants méthanol ; chloroforme ; ammoniac 17 % (2 : 2 : 1) pour la première dimension et phénol ; eau (75 : 25) pour la deuxième nous montre exactement les mêmes résultats.

Les mêmes hydrolysats, analysés à l'auto-analyseur BECKMAN, nous donnent pour l'échantillon A un résidu d'acide aspartique pour 3,6 résidus de glucosamine et pour l'échantillon B différents acides aminés (acide aspartique ; thréonine ; sérine ; leucine) et des traces de glycolle et alanine ; le rapport acide aspartique, glucosamine étant de 1 : 4,7.

B) COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

La composition centésimale en oses neutres et en osamines des 2 fractions A et B, a été déterminée à l'aide des techniques décrites dans la revue générale de MONTREUIL et SPIK (84), tandis que la composition molaire en glucides a été déterminée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de ZANETTA et al (85) adaptée au laboratoire par FOURNET (86).

Les résultats de ces analyses sont rassemblés dans le tableau VII p 42.

Ces deux fractions A et B ne contiennent que des résidus de mannose et N-acétylglucosamine dans les rapports 3 : 1,89 pour l'échantillon A et 3 : 1,71 pour l'échantillon B.

C) CONCLUSION

L'étude de la composition en acides aminés et en glucides de la fraction A nous montre que celle-ci ne contient uniquement que des résidus d'asparagine, de N-acétylglucosamine et de mannose : le rapport asparagine, N-acétylglucosamine étant de 1 pour 3,6 et le rapport N-acétylglucosamine et mannose de 1,89 pour 3. Ceci nous permet de donner la composition molaire moyenne de la fraction A : pour un résidu asparagine 3,6 résidus de N-acétylglucosamine et 5,71 résidus de mannose. Cette fraction est vraisemblablement constituée d'un mélange de glycopeptides III de l'ovalbumine isolé et étudié par TAI et al. (86 bis) .

TABLEAU : VII

COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES PRESENTS
DANS LES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES DE L'OVALBUMINE

	fraction A	fraction B
Composition centésimale		
Monosaccharides neutres	46,2	27,1
N-acétylhexosamines	23,7	23,5
Composition molaire		
Mannose	3	3
N-acétylglucosamine	1,89	1,71

L'étude de la composition de la fraction B nous montre que celle-ci contient outre des résidus asparagine, mannose et N-acétylglucosamine de nombreux autres acides aminés. La composition molaire moyenne de cette fraction est donc d'un résidu d'asparagine pour 4,77 résidus de N-acétylglucosamine, 8,36 résidus de mannose et d'autres acides aminés attachés à l'asparagine, soit une composition molaire moyenne de : x résidus acides aminés, un résidu d'asparagine, 5 résidus de N-acétylglucosamine, 9 résidus de mannose.

Cette étude nous amène donc à choisir comme substrat glycopeptidique la fraction A dont la composition molaire moyenne se rapproche le plus des glycopeptides utilisés par NISHIGAKI et al (87) pour l'étude de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase présente dans le foie de rat et de porc (voir p. 14).

III) ETUDE DU SUBSTRAT GLYCOPEPTIDIQUE(¹⁴C)-N-ACETYLE

Après avoir marqué, à l'aide de l'anhydride acétique marqué au carbone 14, le glycopeptide de l'ovalbumine comme nous l'avons décrit plus haut, le composé est purifié sur colonne de Biogel P₂. On mesure alors la radioactivité sur 5 μ l de chacune des fractions recueillies. La courbe obtenue en traçant les variations de la radioactivité au cours du fractionnement présente deux pics (figure 8 p. 44). Le premier pic correspond au glycopeptide de l'ovalbumine marqué. Ce pic se confond d'ailleurs avec la courbe de repérage des sucres au phénol-sulfurique. Le deuxième pic, très radioactif et négatif au phénol-sulfurique, correspond à de l'acide

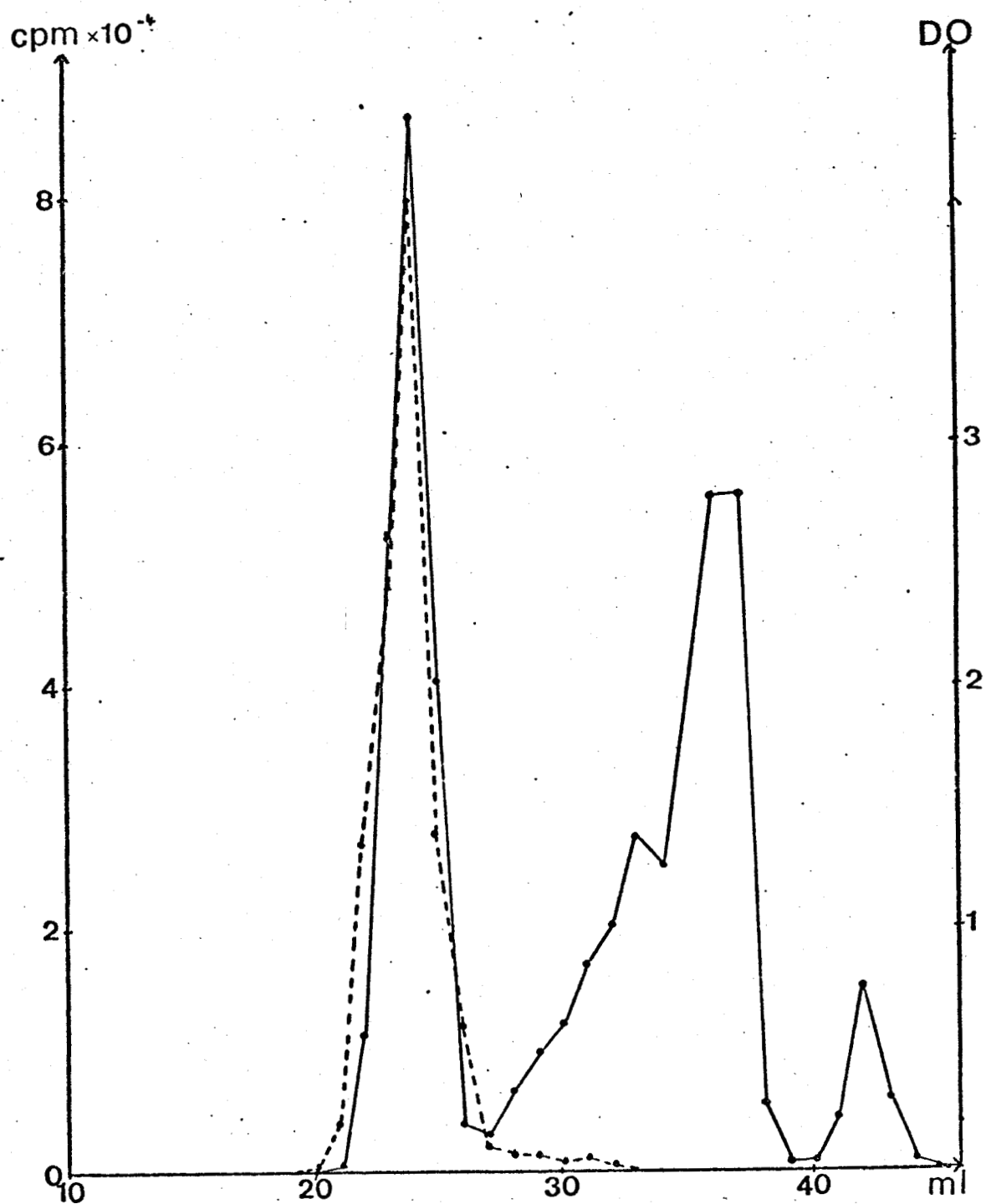


Figure : 8

Purification du glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine par passage sur colonne de Biogel P_2 .

●—● : Mesure de la radioactivité sur $5 \mu\text{l}$ de chacune des fractions de 1 ml recueillies après passage sur colonne de Biogel P_2 .

●- - ● : Dosage au phénol-sulfurique des sucres présents dans chacune des fractions.



acétique marqué en excès. Nous avons recueilli la totalité du premier pic totalisant 39 633 800 coups par minute pour 5 mg de glycopeptide soit 15 853 coups par minute et par nanomole de glycopeptide. Après une chromatographie sur papier de 5 μ l de cette fraction (préalablement séchée et repise dans 250 μ l d'eau distillée), nous ne retrouvons que 699 592 coups par minute soit pour 5 mg de glycopeptide de l'ovalbumine 34 979 600 coups par minute ou encore 13 991 coups par minute et par nanomole de glycopeptide. Ceci représente une perte d'environ 11 % de radioactivité. Cette radioactivité se retrouve au front du chromatogramme et représente de l'acide acétique. Le glycopeptide marqué recueilli après passage sur Biogel n'est donc pas tout à fait libre d'acide acétique ¹⁴C. Pour éliminer les dernières traces d'acide acétique marqué, nous avons réalisé une chromatographie préparative sur papier.

ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES
DE LA REACTION ENZYMATIQUE

Pour l'étude de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase contenue dans le foie de rat, nous avons utilisé dans un premier temps le protocole décrit par NISHIGAKI et al. (88). La solution "enzymatique brute" a été préparée selon ce protocole.

50 μ l de cette solution "enzymatique brute" (2,9 mg de protéine) préparée dans une solution tampon phosphate de Na 50 mM pH 7,0, sont incubés avec 10 μ l de la solution substrat contenant 0,3 nM de glycopeptide (14 C)-N-acétylé de l'ovalbumine à 37° C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,1 ml d'éthanol puis centrifugé à basse vitesse. Le surnageant est analysé par électrophorèse sur papier à haut voltage, sous une tension de 73 volts/cm dans le système solvant : pyridine - acide acétique - eau (3 : 1 : 387) pH 5,4 pendant 1 heure.

Après mesure de la radioactivité, nous obtenons un pourcentage de libération du fragment β -aspartylglucosaminylamine-N-acétylé d'environ 10 % alors que NISHIGAKI et al. (89), pour une expérience de 3 heures d'incubation, nous donne un pourcentage de libération d'hydrolyse de 63 %. Mais ce résultat de 10 % est fortement sujet à discussion. En effet, d'une part la séparation des différents produits obtenus après incubation se fait assez mal (de même les témoins utilisés se séparent faiblement : 16 cm de distance maximale

de migration pour le fragment GlcNAc \longrightarrow Asn (^{14}C)-N-acétylé et 13 cm pour le glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine), d'autre part le maximum de radioactivité des pics obtenus est assez faible (500 à 1 000 cpm) ce qui ne permet pas une étude de détail. Ceci nous a donc amené à changer de méthode de détection des produits de la réaction et pour cela à réétudier la réaction enzymatique.

I) CINETIQUE D'HYDROLYSE

Pour effectuer une étude cinétique de l'hydrolyse par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase, nous avons utilisé la solution "enzymatique brute" préparée selon la méthode préconisée par NISHIGAKI et al (90).

A 100 μl de la solution enzymatique préparée dans un tampon phosphate de Na 50 mM, pH 7,0 on ajoute 5 μl de la solution substrat contenant 50 nM de glycopeptide- (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine (soit 0,1 mg de glycopeptide). Nous nous plaçons ainsi à saturation de substrat. Le mélange est incubé pendant des temps variables à 37° C puis précipité par 200 μl d'éthanol et centrifugé. Le surnageant est chromatographié sur papier dans le solvant pyridine - acétate d'éthyle - eau (1 - 2 - 2) pendant 40 à 48 heures (voir p. 35).

Après mesure de la radioactivité, nous voyons que 2 substances radioactives sont séparées par chromatographie sur papier. Le premier pic correspond au glycopeptide marqué non hydrolysé, le deuxième pic correspond au β -aspartyl glucosaminyllamine-N-acétylé (figure 3 p. 48).

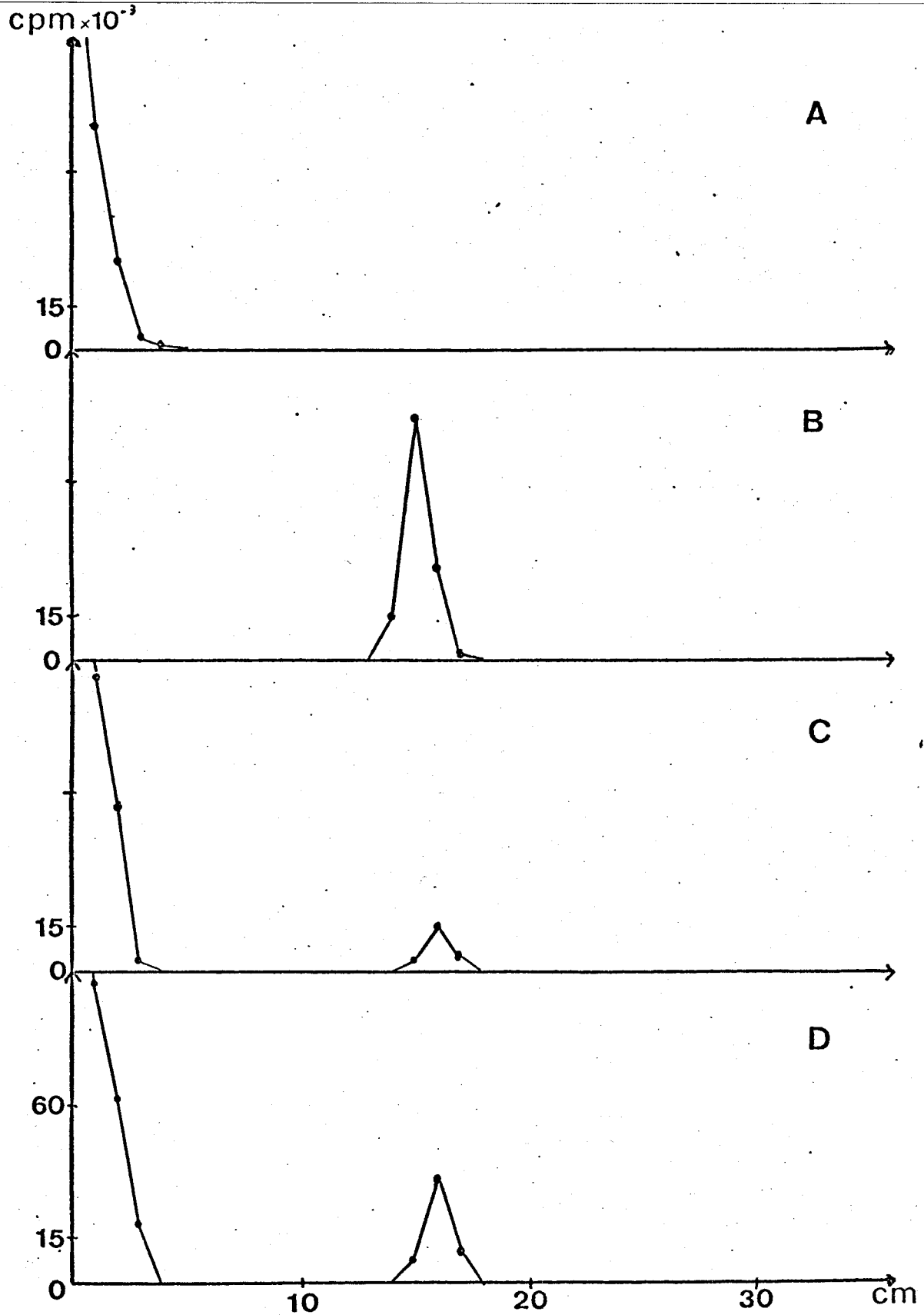


Figure : 9

Mesure de radioactivité après chromatographie sur papier de 40 h. dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) des produits de la réaction de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat sur le glycopeptide de l'ovalbumine (^{14}C)-N-acétylé.

A : Témoin glycopeptide de l'ovalbumine (^{14}C)-N-acétylé .

B : Témoin GlcNAc-Asn-(^{14}C)-N-acétylé .

C : Après 30 minutes d'incubation .

D : Après 1 heure d'incubation .



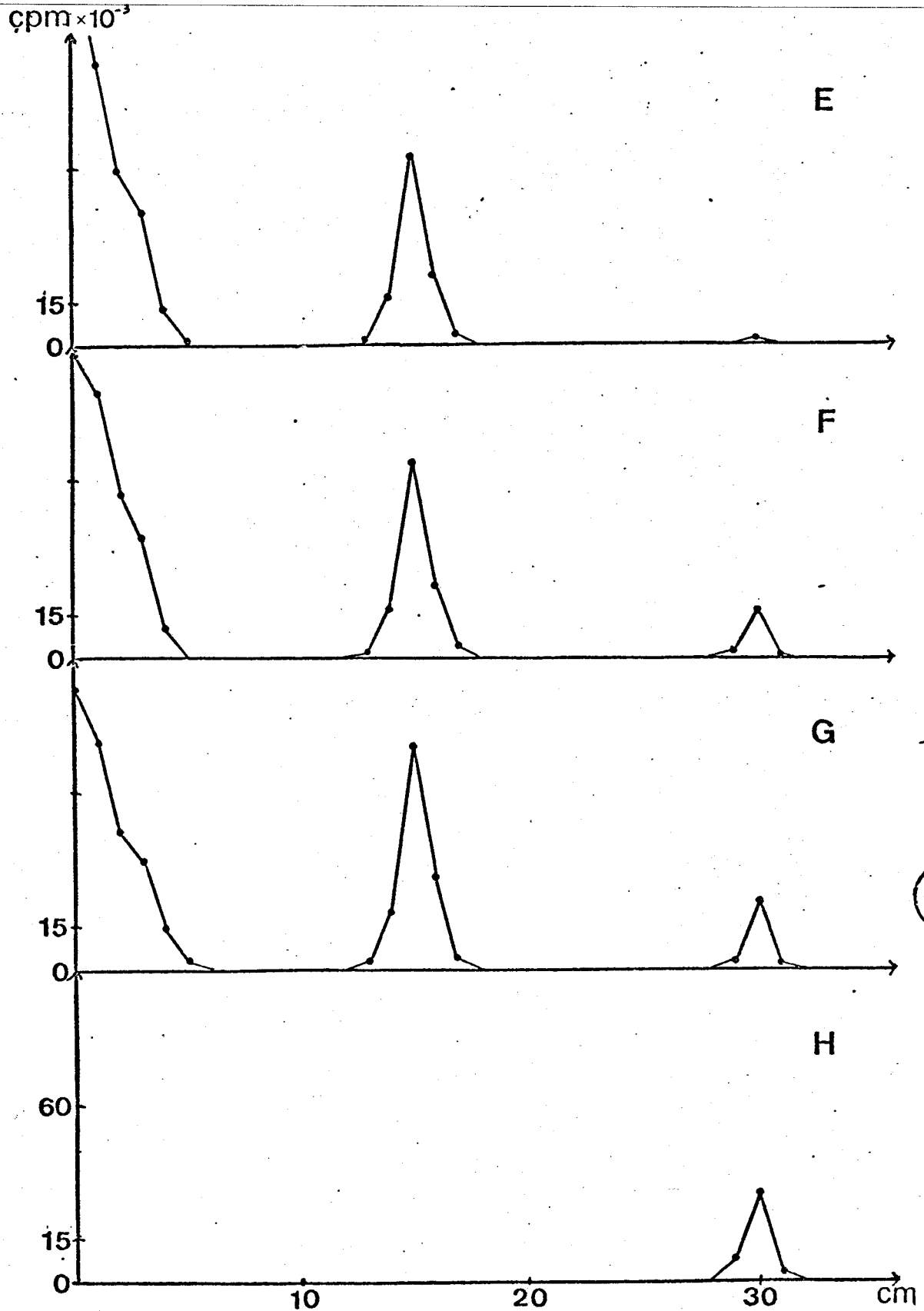


Figure : 10

Mesure de radioactivité après chromatographie sur papier de 40 h. dans le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) des produits de la réaction de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat sur le glycopeptide de l'ovalbumine (^{14}C)-N-acétylé.

E : Après 2 heures d'incubation.

F : Après 4 heures d'incubation.

G : Après 16 heures d'incubation.

H : Témoin acide aspartique (^{14}C)-N-acétylé.

TABLEAU VIII

Variation du pourcentage d'hydrolyse du glycopeptide
(¹⁴C) -N-acétylé de l'ovalbumine en fonction du temps d'incubation.

Temps de réaction en heure	Pourcentage de libération du fragment GlcNAc→Asn-N-acétylé	Pourcentage de formation d'un composé migrant au niveau de l'acide aspartique- N-acétylé.
0,5	6,21	0
1	13,30	0
2	25,68	trace
4	26,50	4,92
16	31,38	6,67

La valeur de la radioactivité du pic correspondant au fragment GlcNAc \rightarrow Asn(^{14}C) acétylé divisé par la valeur de la radioactivité totale nous donne le pourcentage d'hydrolyse enzymatique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les figures 9 p 48 et 10 p. 49 ainsi que dans le tableau VIII p. 50 .

Nous pouvons observer que la vitesse d'hydrolyse est linéaire jusqu'à 2 heures d'incubations puis que la courbe s'infléchit pour atteindre un maximum d'hydrolyse de 40 % (figure 11 p. 52). A partir de 2 heures d'incubation (figure 10 p. 49), on observe un étalement du pic correspondant au glycopeptide radioactif non dégradé par l'endoenzyme. Cette modification est probablement due à l'action d'exoenzymes également présentes dans la solution enzymatique (bien que ces exoenzymes présentent généralement un pH optimum aux environs de 5,0).

Nous pouvons également observer à partir de 2 heures d'incubation à l'état de traces, puis plus franchement au bout de 4 et de 16 heures l'apparition d'un deuxième pic migrant au niveau de l'acide aspartique-N-acétylé marqué au ^{14}C probablement due à l'hydrolyse du résidu GlcNAc-Asn-(^{14}C) acétylé, par la N-acétylglucosamine aspartamidase également contenue dans la solution enzymatique (bien que cette enzyme possède un pH optimum d'action à 5,5).

Ces différentes constatations nous ont amené à choisir un temps d'incubation d'une heure pour la suite de nos expérimentations.

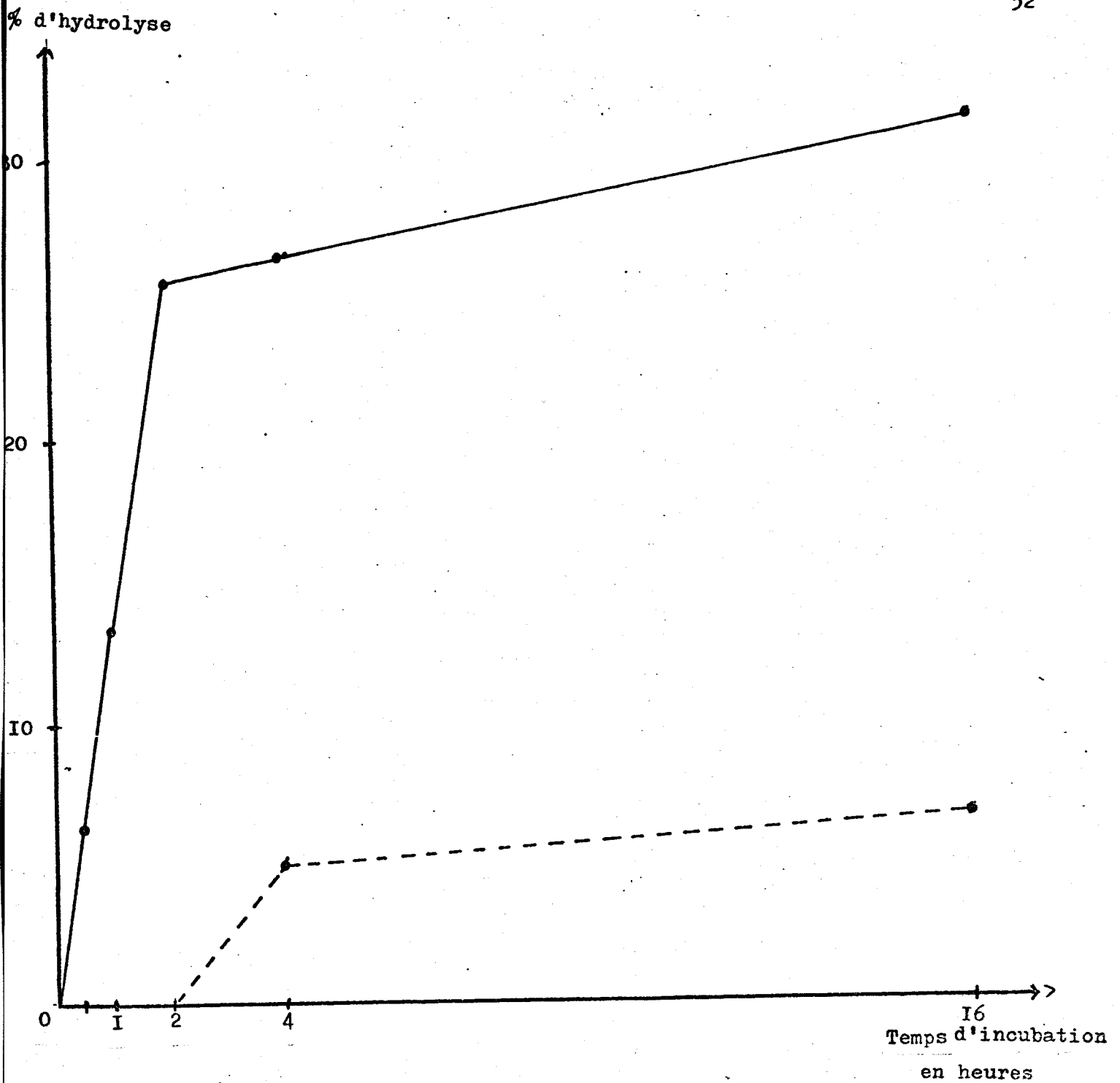


Figure : II

Variation du pourcentage d'hydrolyse du glycopeptide (¹⁴C)-N-acétylé de l'ovalbumine en fonction du temps d'incubation.

- : % de libération du fragment GlcNAc-Asn-(¹⁴C)-N-acétylé.
- - - ● : % de libération d'un composé migrant au niveau de l'acide aspartique (¹⁴C)-N-acétylé.



II) DETERMINATION DU PH OPTIMUM D'ACTION

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé des solutions "enzymatiques brutes" préparées selon la même méthode que précédemment.

A 100 μ l de chaque solution préparée dans un tampon acétate de Na 50 mM pour les pH de 4,0 à 5,5 et phosphate de Na 50 mM pour les autres pH à partir de pH 5,0, on ajoute 5 μ l de la solution substrat contenant 50 nM de glycopeptide (14 C)-N-acétylé de l'ovalbumine (soit 0,1 mg de glycopeptide). Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37° C puis précipité par 0,2 ml d'éthanol, le surnageant est ensuite chromatographié comme précédemment.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau IX p. 54 et la figure 12 p. 55 . Nous observons que pour une valeur de pH 7,0 l'activité de l'endoenzyme est maximale et que l'endoenzyme ne présente plus d'activité à un pH en dessous de 5,0 et au-dessus de 9,0. La courbe résumant les pourcentages d'hydrolyse présente un aspect en cloche classique (voir figure 12 p. 55). Le changement de tampon, d'acétate de Na en phosphate de Na ne semble pas avoir une grande influence, car les réactions réalisées à pH 5,0 et 5,5 en tampon acétate de Na puis en tampon phosphate de Na donnent un résultat identique.

Pour les courbes réalisées de pH 4,0 à 5,5, nous constatons une dégradation du pic due au glycopeptide (14 C)-N-acétylé de l'ovalbumine provoquant une trainée. Cette trainée est certainement provoquée

TABLEAU IX.

Variation du pourcentage d'hydrolyse du glycopeptide
(¹⁴C)-N-acétylé de l'ovalbumine en fonction du pH.

pH	Pourcentage de libération du fragment GlcNAc- Asn-N-acétylé
4,0	0
5,0	0
5,5	4,07
6,0	7,56
6,5	12,08
7,0	13,91
7,5	11,91
8,0	9,51
8,5	5,94
9,0	0

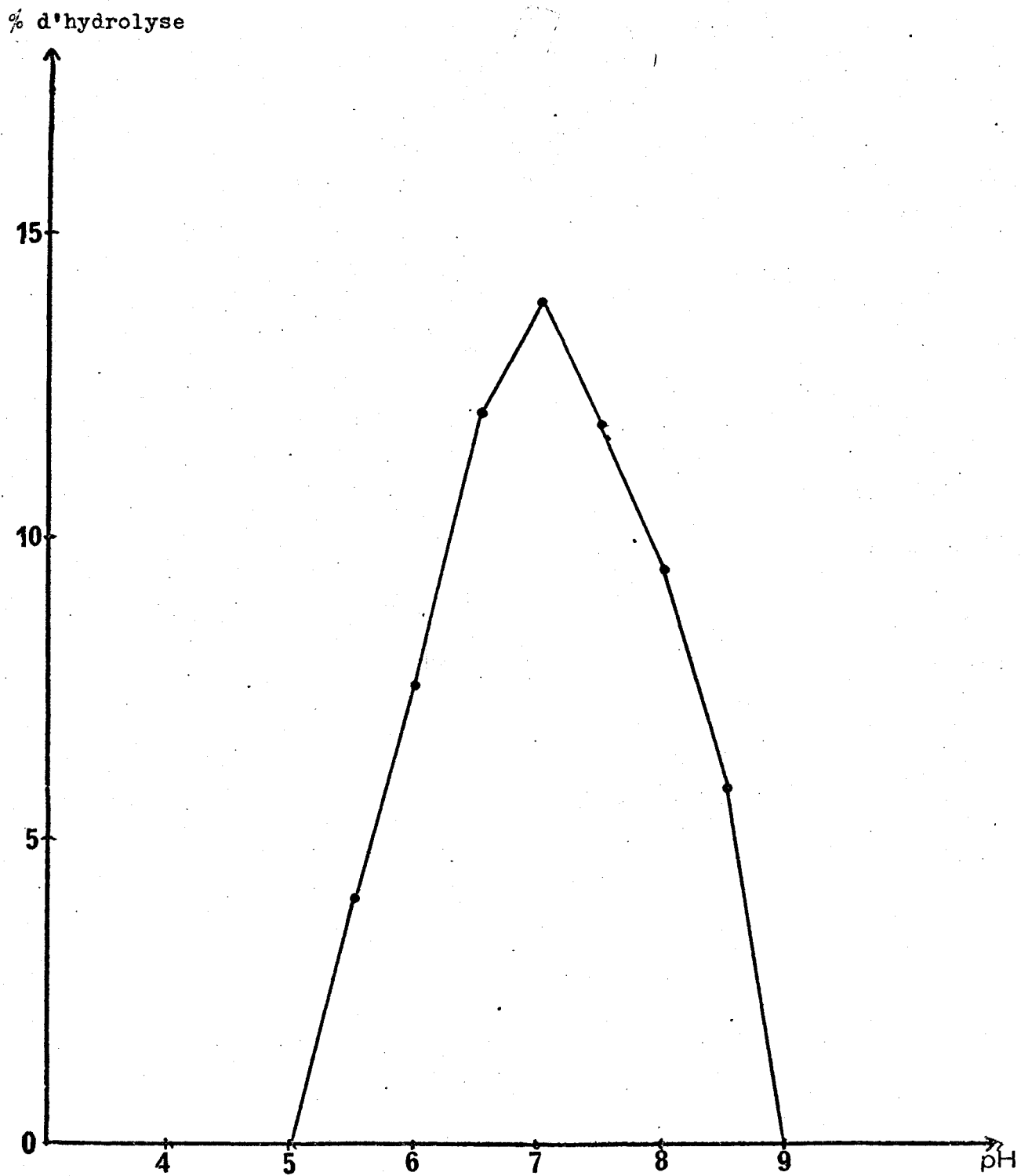


Figure : I2

Variation du pourcentage d'hydrolyse du glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat en fonction du pH .



par l'action des exoenzymes présentes dans la solution enzymatique qui dégradent la partie glycanique du glycopeptide.

Cette étude a également été faite sur un homogénat total de foie de rat et sur des fractions cellulaires plus purifiées. Lorsque ces fractions présentent une réaction positive, on obtient des résultats analogues à ceux obtenus ci-dessus, c'est-à-dire un pH optimum de 7,0. C'est ce pH que nous avons choisi pour la suite de l'étude.

III) TEMPERATURE OPTIMALE

Après une étude analogue, nous avons été amené à choisir comme température optimale d'incubation une température de 37° C.

IV) CONCLUSION

Après une étude sommaire de l'activité enzymatique de l'endoenzyme contenue dans notre solution "enzymatique brute", nous avons ainsi défini les conditions d'action de la réaction enzymatique :

- solution substrat à saturation contenant 50 nM de glycopeptide marqué.
- pH optimum de 7,0.
- 1 heure d'incubation à 37° C.

La séparation des différents produits de la réaction de l'endoenzyme sur le glycopeptide (¹⁴C) acétylé de l'ovalbumine a été réalisée par chromatographie descendante sur papier dans le système solvant : pyridine - acétate d'éthyle - eau (1 : 2 : 2) pendant 40 à 48 heures.

RECHERCHE DE LA FRACTION CELLULAIRE
CONTENANT L'ACTIVITE
ENDO- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUE

I) A PARTIR DES FRACTIONS CELLULAIRES BRUTES

Après avoir préparé les différentes fractions à étudier, comme nous l'avons décrit précédemment dans le chapitre matériel et méthodes, nous avons incubé, pendant 1 heure à 37° C, 100 μ l de chacune de ces fractions avec 5 μ l de solution substrat contenant le glycopeptide -(¹⁴C)-N-acétylé de l'ovalbumine (50 n Moles de glycopeptides) et 100 μ l de tampon phosphate 50 mM pH 7,0. Après arrêt de la réaction par 200 μ l d'éthanol et centrifugation, le surnageant est chromatographié. Après mesure de radioactivité, on détermine le pourcentage d'hydrolyse pour chacune de ces fractions. De façon à pouvoir comparer les activités de chacune de ces fractions, nous avons ramené le pourcentage d'hydrolyse (étudié ici pour 100 μ l) au volume total de la fraction. Ceci nous donne un nombre comparable d'une fraction à l'autre : ce nombre a été appelé "activité enzymatique".

D'autre part, l'"activité" obtenue pour l'homogénat total est ramené à 100 %, ce qui nous permet de donner un pourcentage d'activité pour chacune des fractions.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau X p. 58. L'étude par dichotomie de l'"activité" de l'endoenzyme dans chacune des fractions et dans son surnageant correspondant nous permet de comparer leur activité. La somme de l'activité de ces

TABLEAU: X

Pourcentage de libération du fragment GlcNac-Asn-N-acétylé, à partir d'un glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine ; "activité enzymatique" et pourcentage "d'activité enzymatique" de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase dans les différentes fractions cellulaires de foie de rat.

Fraction cellulaire	% de libération du fragment GlcNac-Asn-N-acétylé	"Activité enzymatique"	Pourcentage "d'activité enzymatique"
Homogénat total	26,29	26 031	100
Fraction nucléaire brute	13,11	14 447	55,50
Surnageant post- nucléaire	14,68	10 276	39,50
Fraction mitochondriale	2,13	511	1,96
Surnageant post- mitochondrial	13,85	9 557	36,71
Fraction lysosomiale	1,26	390	1,42
Surnageant post- lysosomiale	13,44	8 469	32,53
Fraction microsomiale	2,85	629	2,38
Fraction cytosolique	12,42	7 706	29,60

deux fractions étant égale à la fraction de départ avant fractionnement (dont on a retiré l'activité contenue dans la fraction utilisée pour les mesures d'hydrolyse précédentes). Cependant, nous constatons une perte d'environ 9 % d'activité durant le fractionnement (dont 5 % d'ailleurs lors de la première centrifugation).

Tel que le montre le tableau p. 58 les activités les plus importantes sont rencontrées dans la première séparation : 55,5 % dans la fraction nucléaire et 39,5 % dans le surnageant nucléaire. Lorsque nous poursuivons le fractionnement de ce surnageant, nous obtenons une forte activité uniquement dans la fraction contenant le cytosol : 75 % de l'activité du surnageant post-nucléaire. Toutes les autres fractions (contenant chacune différents organites cellulaires) ne présentent qu'une faible activité allant de 1 à 3 %, probablement due à des contaminations.

Ceci nous amène à conclure que l'endoenzyme se trouve soit dans la fraction nucléaire brute contenant notamment des noyaux, des membranes plasmiques, des cellules intactes ou plus ou moins brisées et une partie du réticulum endoplasmique rattaché soit aux membranes plasmiques, soit aux noyaux. De façon à localiser plus précisément l'endoenzyme, nous avons été amené à réaliser d'autres fractionnements nous permettant de disposer de fractions cellulaires plus purifiées.

II) A PARTIR DE FRACTIONS ENRICHIES EN CERTAINS ORGANITES

A) A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN MEMBRANES PLASMIQUES

A 100 μ l de fraction enrichie en membranes plasmiques préparées selon la méthode de RAY (91) (voir chapitre Matériel et Méthodes), on ajoute 100 μ l de tampon phosphate de Na, pH 7,0, 50 mM et 5 μ l de glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine (soit 50 nM de glycopeptide). Ce mélange est incubé une heure à 37° C, la réaction est ensuite arrêtée par précipitation à l'aide de 200 μ l d'éthanol. Après centrifugation et chromatographie sur papier du surnageant dans le système solvant de JERMYN et ISHERWOOD (92) : pyridine - acétate d'éthyle - eau (1 : 2 : 2), on mesure la radioactivité de chaque fraction séparée par chromatographie sur papier.

Aucune activité autre que celle due au glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine n'a été déterminée sur le chromatogramme. On ne retrouve pas non plus d'hydrolyse lorsqu'on augmente dans l'incubat la quantité de fraction enrichie en membranes plasmiques, ni lorsqu'on utilise un tampon de pH différent.

L'endo- β -N-acétylglucosaminidase recherché ne se trouve donc pas dans cette fraction.

L'activité retrouvée dans la fraction nucléaire brute ne provient donc pas des membranes plasmiques : c'est pourquoi nous avons préparé une fraction nucléaire purifiée.

B) A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN NOYAUX

La façon dont a été préparée cette fraction a été décrite plus haut dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Chaque fraction préparée a été essayée avec le glycopeptide marqué, de la même façon que précédemment.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI p. 62. Nous obtenons pour l'homogénat total 26,61 % d'hydrolyse, ce qui se rapproche du résultat trouvé lors du fractionnement des différentes fractions brutes p. 58.

Si l'on donne la valeur 100 pour la valeur de l'hydrolyse réalisée pour l'homogénat total : 53,5 d'hydrolyse sont obtenus lors de l'hydrolyse par le culot et 37 lors de l'hydrolyse par le surnageant post-nucléaire. Ceci est d'ailleurs comparable aux résultats trouvés lors des fractionnements précédents.

A partir du culot nucléaire nous trouvons 3 fractions : une fraction nucléaire purifiée, une fraction surnageante intermédiaire et une "crêpe surnageante" contenant des cellules intactes ou plus ou moins brisées, des membranes plasmiques ainsi que différents organites cellulaires présents sous forme d'impuretés.

Le culot nucléaire nous donne un pourcentage "d'activité enzymatique" de 4,59 % alors que la "crêpe" surnageante en donne 17,5 %.

TABLEAU: XI

Pourcentage de libération du fragment GlcNAc-Asn-N-acétylé, à partir d'un glycopeptide (^{14}C)-N-acétylé de l'ovalbumine ; "activité enzymatique" et pourcentage "d'activité enzymatique" de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase contenue dans les différentes fractions cellulaires préparées à partir d'une fraction nucléaire brute de foie de rat.

Fraction cellulaire	% de libération du fragment GlcNAc-Asn-N-acétylé	"Activité enzymatique"	Pourcentage "d'activité enzymatique"
Homogénat total	26,61	18 627	100
Fraction nucléaire brute	13,11	9 832	53,55
Surnageant post- nucléaire	13,03	6 777	39,91
Fraction de noyaux purifiés	4,69	844	4,59
"Crêpe" surnageante	12,6	3 780	17,15

Si nous donnons la valeur 100 pour l'hydrolyse réalisée par le culot nucléaire brut, nous retrouvons 8,7 % "d'activité enzymatique" pour la fraction nucléaire purifiée et 38,44 % pour la crêpe supérieure.

Dans le culot de noyaux purifiés nous ne retrouvons que 8,7 % de l'activité du culot primitif donc l'endoenzyme ne semble pas se trouver dans cette fraction.

Par contre, nous retrouvons 38,44 % d'activité dans la "crêpe" surnageante : l'endoenzyme semble donc se trouver plus spécialement dans cette fraction. Or, cette fraction contient surtout des membranes plasmiques que nous avons étudié précédemment et qui nous ont donné un résultat négatif. L'endoenzyme, présente dans cette fraction, semble provenir des autres organites cellulaires présents sous forme d'impuretés ou de cellules intactes ou plus ou moins brisées. Ce fait peut d'ailleurs être confirmé en augmentant l'homogénéisation du foie de rat : ce qui a pour conséquence d'augmenter le pourcentage d'hydrolyse dans le surnageant post-nucléaire et le diminuer dans le culot des noyaux non purifiés.

D'autre part, nous pouvons remarquer que lors de la préparation des noyaux purifiés nous ne retrouvons qu'un total de 47,2 % de l'activité de départ. Cette perte d'activité peut être due soit : à la présence d'une activité dans le surnageant intermédiaire (cette activité a été impossible à mesurer à cause de la trop forte concentration en saccharose), soit : à une perte d'activité

due aux différents lavages notamment de la "crêpe" supérieure.

Pour connaître plus précisément la localisation cellulaire de cette enzyme, nous avons été amené à séparer les constituants se trouvant dans le surnageant post-nucléaire.

C) A PARTIR D'UNE FRACTION ENRICHIE EN LYSOSOMES,
PEROXYSOMES ET MITOCHONDRIES

Cette fraction a été préparée comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes p. 33 .

Les essais d'activité enzymatique ont été réalisés de la même manière que précédemment.

Pour cette fraction enrichie en mitochondries, peroxysomes et lysosomes, nous obtenons (quel que soit le pH à laquelle a été réalisé l'essai) que des résultats négatifs. L'endo- β -N-acétyl-glucosaminidase recherchée ne se trouve donc pas dans cette fraction.

D) A PARTIR D'UNE FRACTION CYTOSOLIQUE

La fraction cytosolique a été préparée comme décrit plus haut.

Parallèlement, nous avons préparé une fraction enrichie en microsomes. Les essais enzymatiques ont été réalisés de la même façon que précédemment.

Nous obtenons 9,23 % d'hydrolyse pour la fraction microsomale et 8,9 % d'hydrolyse pour la fraction cytosolique.

Or, la fraction microsomale a été obtenus sous forme de culot repris par 10 ml de tampon, alors que la prise d'essai pour la fraction cytosolique a été prélevée de 120 ml de surnageant.

Ceci nous amène donc à calculer une "activité enzymatique" (défini plus haut). Celle-ci est pour la fraction microsomale de 923 alors qu'elle est de 10 680 pour la fraction cytosolique. Si nous considérons l'activité contenue dans le mélange de départ égale à 100 %, nous trouvons 7,95 % d'activité dans la fraction microsomale et 92,04 % dans la fraction cytosolique. Ceci est d'ailleurs comparable au résultat trouvé dans le premier fractionnement (7,44 % pour 92,56 %). Il semble donc que l'endo- β -N-acétylglucosaminidase ne se trouve pas dans la fraction microsomale mais dans la fraction cytosolique.

CONCLUSIONS GENERALES

L'endo- β -N-acétylglucosaminidase, localisée pour la première fois dans le foie de rat par NISHIGAKI et al., présente un grand intérêt du point de vue du catabolisme des glycoprotéines. En effet, cette endoenzyme doit agir en premier lieu lors de la dégradation des glycoprotéines et doit, en libérant la partie glycanique de la partie protéique, faciliter l'action ultérieure des exoglycosidases présentes dans les lysosomes de cellules hépatiques.

Les recherches que nous avons entreprises sur l'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat, concernent, dans un premier temps, la localisation cellulaire de cette enzyme. Ces recherches nous ont donc amené, à préparer un substrat glycopeptidique marqué, à préciser les meilleures conditions de l'hydrolyse enzymatique par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase ainsi que meilleures conditions de séparation chromatographique des produits de l'hydrolyse enzymatique du glycopeptide.

Dans une deuxième partie du travail, nous avons, grâce à la mise au point du procédé de détermination de l'activité enzymatique, recherché l'activité endo- β -N-acétylglucosaminidasique dans différentes fractions cellulaires plus ou moins purifiées du foie de rat.

Les résultats obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Le substrat utilisé est un glycoamino-acide, isolé à partir de l'ovalbumine, ayant pour composition molaire moyenne : Asp : 1 ; Man : 5,71 ; GlcNAc : 3,6. Ce glycoamino-acide a été marqué par N-acétylation de l'asparagine à l'aide d'anhydride acétique marqué au ^{14}C et possède une activité spécifique de 14'000 cpm par nanomole.

2 - Les meilleures conditions d'hydrolyse du glycopeptide marqué par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase du foie de rat sont les suivantes : 1 heure d'incubation à 37°C à un pH optimum de 7,0 et les meilleures conditions de séparation chromatographique du glycopeptide non hydrolysé de l'ovalbumine et de la β -aspartylglucosaminylamine N-acétylée, provenant de l'hydrolyse par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase, sont réalisées par chromatographie descendante sur papier dans le système-solvant : pyridine-acétate d'éthyle-eau (1 : 2 : 2).

3 - Un premier type de fractionnement cellulaire, réalisé selon le principe de HOGEBOM, nous a amené à localiser l'activité endo- β -N-acétylglucosaminidasique du foie de rat soit dans la fraction nucléaire brute (55% d'activité enzymatique"), soit dans la fraction cytosolique (45% d'"activité enzymatique").

4 - Des fractionnements cellulaires particuliers à chaque type d'organites cellulaires nous ont amené à préciser, par la suite, la localisation cellulaire de cette endoenzyme.

a - Aucune activité enzymatique, quelles que soient les conditions d'hydrolyse, n'a été décelée dans les préparations de fractions enrichies en mitochondries, lysosomes et en microsomes.

b - Une faible activité enzymatique (environ 8%) a été trouvée dans une fraction de noyaux purifiés préparée selon la méthode de CHAUVEAU. Mais une activité de 38% a été décelée dans la fraction "crêpe surnageante" provenant également de la fraction nucléaire brute et contenant des membranes plasmiques, des cellules plus ou moins brisées et des impuretés des autres fractions cellulaires.

Comme aucune activité n'a été retrouvée dans une fraction enrichie en membranes plasmiques préparée selon la méthode de RAY, l'activité enzymatique de la fraction "crêpe surnageante" serait donc due fort probablement aux cellules plus ou moins brisées.

c - Par contre, une activité enzymatique de 30% de l'homogénat total et de 75% du surnageant post-nucléaire a été trouvée dans la fraction cytosolique.

Ces 5 types différents de fractionnements cellulaires qui nous ont permis de préparer des fractions enrichies en mitochondries lysosomes, microsomes, noyaux et membranes plasmiques, nous amènent donc à conclure à la présence de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase dans la fraction cytosolique. Cependant, cette étude ne permet pas de conclure à la présence de cette endoenzyme uniquement dans le cytosol car, d'une part, les mesures d'activité ont été réalisées sur des fractions cellulaires dont nous n'avons pas vérifié le degré de pureté par des enzymes marqueurs et par microscopie électronique et, d'autre part, seul un type de substrat glycopeptidique a été utilisé pour déterminer l'activité enzymatique.

La localisation cellulaire de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase dans le cytosol pose un problème. En effet, si cette endoenzyme est une enzyme de dégradation et agit, en premier lieu, lors du catabolisme d'une glycoprotéine de type oligomannosidique, cette glycoprotéine devrait d'abord être présente dans le cytosol de la cellule pour y subir l'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase puis ce sont les produits de dégradation qui devraient pénétrer dans les lysosomes pour y subir une dégradation plus complète. Cette hypothèse suppose un schéma de catabolisme des glycoprotéines beaucoup plus complexe que celui envisagé jusqu'à présent.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus, qui sont en faveur de la présence dans le cytosol d'une activité endo- β -N-acétylglucosaminidase agissant sur des glycoamino-acides de type oligomannosidique, n'excluent pas la possibilité de la présence, dans les lysosomes, d'une activité endo- β -N-acétylglucosaminidase agissant sur des glycopeptides ou des glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique. L'utilisation de différents substrats de type N-acétyllactosaminique plus ou moins dégradés par l'action d'exoglycosidases et l'utilisation au cours du fractionnement cellulaire d'inhibiteurs de protéases qui pourraient éventuellement empêcher la dégradation de l'endoenzyme lysosomiale, si celle-ci existe, devraient apporter rapidement une réponse à ce problème important de localisation subcellulaire des endo- β -N-acétylglucosaminidases dans le foie de rat.

BIBLIOGRAPHIE

- ARAKAWA W. et MURAMATSU T. - J. Biochem. (Tokyo) 1974, 76, 307-317 (49, 50, 55, 58)
- BATHGATE G.N. et PALMER G.M. - J. Inst. Brew. (London) 1974, 80, 278-282 (13)
- BOERSMA A., LAMBLIN G., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1975, 281, 1269-1272 (36)
- CHAUVEAU J., MOULE Y. et ROUILLER C. - Explt. Cell. Res. 1956, 11, 317-321 (78)
- CHIEN S.F., WEINBURG R., LI S.C. et LI Y.T. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 76, 317-323 (33, 64)
- CHIEN S.F., YEVICH S., LI S.C. et LI Y.T. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 683-691 (29)
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. - Anal. Chem., 1956, 28, 350 (70, 72)
- ENDO Y. et KOBATA A. - J. Biochem., 1976, 80, 1-8 (24)
- FISHER F.G. et NEBEL H.G. - Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10-14 (83)
- FOURNET B. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, 1973 (86)
- FUKUDA M.N. et MUTSUMURA G. - J. Biol. Chem., 1976, 251, 6218-6225 (20)
- GRIMMONPREZ L. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 843 (74)
- HARTLEY B.S. - Biochem. J., 1970, 119, 805-822 (80)
- HOGEBOOM G.H., SCHNEIDER W.C. et STRIEBICH M.J. - J. Biol. Chem., 1952, 196, III (75 bis)
- ITO S., MURAMATSU T. et KOBATA A. - Arch. Biochem. Biophys., 1975, 171, 78-86 (30, 43, 61)
- ITO S., MURAMATSU T. et KOBATA A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 63, 938-944 (52, 59)
- IWATA S. - Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1974, 48, 171-191 (19)
- JENNER F.A. et POLLITT R.J. - Biochem. J., 1967, 103, 48P-49P (5).
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A. - Biochem. J., 1949, 44, 402 (79, 92)
- JONES D., GORDON A.H. et BACON J.S.D. - Biochem. J., 1974, 140, 47-51 (10)
- KOIDE N. et MURAMATSU T. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 4897-4904 (41, 71)
- KOIDE N. et MURAMATSU T. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 66, 411-416 (40, 46)
- KUZNETSOV A.A. et STEPANENKO B.N. - Prikl. Bioklim. Mikrobiol., 1974, 10, 483-489 (15)

- MANNERS D.J. et WILSON G. - Carbohydr. Res., 1974, 37, 9-12 (14)
- MARSHALL R.D. et NEUBERGER A. - In Glycoproteins. Their composition, structure and function Ed. GOTTSCHALK, Elsevier, 1972, part B, 732 (82)
- MARTIN H.H. et KLEMPER S. - J. Bact., 1970, 102, 347-350 (18)
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 857 (69, 73)
- MONTREUIL J. - Pure Appl. Chem., 1975, 42, 431-444 (1)
- MONTREUIL J. et SPIK G. - Microdosage des glucides. Monographie N° 1, Lille, 1963 (84)
- MURAMATSU T. - J. Biol. Chem., 1971, 246, 5535-5537 (7, 25)
- MURRAY R.H., SUSS R. et PITOT H.C. - in Methods in Cancer Research, Ed. BUSCH, London, 1967, II, 262-271 (78 bis)
- NAKAJIMA T. et BALLOU C.E. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 7685-7694 (17)
- NAKAJIMA T. et BALLOU C.E. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 66, 870-879 (31)
- NISHIGAKI M., MURAMATSU T. et KOBATA A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 59, 638-645 (9, 35, 44, 51, 56, 67, 75, 87, 88, 89, 90)
- NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S., ÖCKERMAN P.A. et AUTIO S. - J. Biol. Chem., 1973, 248, 6210-6215 (2)
- NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S. et AUTIO S. - Biochemistry, 1974, 13, 871-87- (3)
- OGATA-ARAKAWA M., MURAMATSU T. et KOBATA A. - J. Biochem. (Tokyo) 1977, 82, 611-61- (32)
- PALO J. et SAVOLAINEN M. - Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 431 (6)
- RAY T.K. - Biochim. Biophys. Acta, 1970, 196, 1-8 (76, 77, 91)
- STRECKER G. et MONTREUIL J. - Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 395-401 (4, 66)
- TAI T., YAMASHITA K. et KOBATA A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 78, 434-44- (63)
- TAI T., YAMASHITA K., ITO S. et KOBATA A. - J. Biol. Chem., 1977, 252, 6687-6694 (62, 86 bis)
- TAI T., YAMASHITA K., OGATA-ARAKAWA M., KOIDE N., MURAMATSU T., IWASHITA S., INOUE et KOBATA A. - J. Biol. Chem., 1975, 250, 8569-8575 (60)

- TAKASAKI S. et KOBATA A. - J. Biol. Chem., 1976, 251, 3603-3609 (21)
- TANAKA M., KOHNO M. et YAMASHINA I. - J. Biochem. (Tokyo) 1973, 73, 1285-1288 (23)
- TARENTINO A.L. et MALEY F. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 811-817 (28, 37, 39, 42)
- TARENTINO A.L., PLUMMER T.H. et MALEY F. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 818-824 (48,54)
- TARENTINO A.L. et MALEY F. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975, 67, 455-462 (53,57)
- TARENTINO A.L. et MALEY F. - J. Biol. Chem., 1976, 251, 6537-6543 (34, 38, 45, 65)
- TARENTINO A.L. et MALEY F. - Anal. Biochem., 1977, 77, 185-194 (27-47)
- TARENTINO A.L., PLUMMER T.H. et MALEY F. - J. Biol. Chem., 1972, 247, 2629-2631
(26)
- TRIMBLE R.B. et MALEY F. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 78, 935-944 (8)
- WADSTRÖM T. et HISATSUNE K. - Biochem. J., 1970, 120, 725-752 (16)
- WILSON G. - Biochem. Soc. Trans., 1974, 5, 12-15 (12)
- YAMAMOTO S., KOBAYASHI R. et NAGASAKI S. - Agric. Biol. Chem., 1974, 38, 1493-1500
(11)
- YAMASHINA I. - In GOTTSALK "glycoproteins", 1972, Part B, 1187 (22)
- YAMASHINA I. et MAKINO M. - J. Biochem., 1962, 51, 359 (68)
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G. - J. Chromatogr., 1972, 69, 291-304
(81, 85)