

50376  
1979  
27

50376

1979

N° d'ordre 451 27

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# TH E S E

présentée à l'Université de Lille I pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

OPTION BIOCHIMIE

par

Pierre RUFFIN

ETUDE DE LA PROTEOLYSE DU CHEVEU

PAR KERATINOMYCES AJELLOI



Présentée le 3 Mai 1979

**JURY**

Président : M. J. MONTREUIL

Rapporteurs : M. J. MONTREUIL

M. G. BISERTE

M. F. MIRANDA

Examineurs : M<sup>lle</sup> G. SPIK

M. Ch. MONTANT

M. J. BIGUET

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

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

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

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mme MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUBRULLE Alain	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup>	LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>le</sup>	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	MACKÉ Bruno	Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M <sup>le</sup>	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M.	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie

M<sup>le</sup> SPIK Geneviève  
M. STERBOUL François  
M. TAILLIEZ Roger  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. WALLART Francis  
M<sup>me</sup> ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie  
Informatique  
Biologie  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Chimie  
Algèbre

ETUDE DE LA PROTEOLYSE DU CHEVEU

PAR KERATINOMYCES AJELLOI

Le travail que nous présentons a été réalisé dans les laboratoires de l'Unité de Recherches sur la Biochimie des Protéines (U-16 de l'INSERM) créée par Monsieur le Professeur Paul BOULANGER et actuellement dirigée par Monsieur le Professeur Philippe ROUSSEL.

De plus, ce travail s'est intégré parfaitement dans le cadre du Groupe de Mycologie Fondamentale et Appliquée fondé par Monsieur le Professeur Jean BIGUET (Unité INSERM N°42).

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur MONTREUIL, Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I d'avoir accepté la Présidence du Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur BISERTE, Professeur de Biochimie Pathologique à l'Université de LILLE II, Directeur de L'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et de l'Unité N°124 de l'INSERM qui, malgré de nombreuses charges, a dirigé l'ensemble du travail avec beaucoup d'intérêt et de compréhension pour le sujet particulièrement délicat et qui, de plus, a accepté de corriger dans le détail, l'intégralité du manuscrit.

Je remercie Mademoiselle SPIK, Professeur de Chimie Biologique à l'Université de LILLE I, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Monsieur MONTANT, Professeur de Cryptogamie à l'Université des Sciences et Techniques de TOULOUSE, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail et dont la compétence sur la kératinolyse est incontestable.

Je remercie Monsieur MIRANDA, Professeur de Biochimie à l'Université d'AIX-MARSEILLE d'avoir accepté d'être mon parrain au C.N.R.S, de me guider au début de mes recherches et de juger la thèse que je présente.

Je remercie Monsieur BIGUET, Professeur de Parasitologie à l'Université de LILLE II pour l'attention qu'il a porté au déroulement de mes travaux pour les conseils qu'il m'a donnés et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qui correspond strictement à l'activité scientifique qu'il a développé dans son laboratoire.

Je remercie Mademoiselle ANDRIEU, Chef de Travaux à l'Université de LILLE II pour sa compétence indiscutable dans le domaine des cultures de Keratinomyces ajelloi.

Je remercie Monsieur VANDEPERRE pour le travail de photographie.

Je remercie Mademoiselle MASSON qui a accepté de dactylographier cette thèse et qui l'a fait avec promptitude et bonne humeur.

Je remercie Madame POPEYE et Madame MASSET qui ont réalisé les cultures du champignon.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame VAN BRUSSEL, Technicienne affectée à mon Laboratoire pour l'aide constante et précieuse qu'elle m'a apportée pour la réalisation et l'exécution des nombreuses techniques mises en œuvre. Elle a toujours exécuté avec beaucoup de conscience les études qui lui ont été confiées.

PUBLICATIONS SUR LE SUJET

.....

- 1°) Les enzymes kératinolytiques de Keratinomyces ajelloi  
Etude comparative en fonction du temps de culture et  
de la nature du substrat.  
RUFFIN P., ANDRIEU S., MOSCHETTO Y. et BISERTE G.  
C.R. Acad.Sci. (Série D) 1971, 272, 1908-1911
  
- 2°) Etude des constituants protéiques de la laine et du cheveu  
RUFFIN P. et MOSCHETTO Y.  
C.R. Acad. Sci. (Série D) 1973, 276, 2403-2405
  
- 3°) Evaluation du développement du Keratinomyces ajelloi par  
la mesure du contenu en osamines.  
RUFFIN P., ANDRIEU S. et MOSCHETTO Y.  
Sabouraudia, 1974, 12, 18-21
  
- 4°) Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof  
RUFFIN P., ANDRIEU S., BISERTE G. et BIGUET J.  
Sabouraudia, 1976, 14, 181-184
  
- 5°) Column chromatography of cysteine sulfinic acid, cysteic  
acid and S-sulfo-cysteine.  
RUFFIN P. and BISERTE G.  
Anal. Biochem., 1976, 76, 233-238
  
- 6°) Caractérisation de deux aminopeptidases (arylamidases)  
extracellulaires du dermatophyte Keratinomyces ajelloi  
RUFFIN P., VAN BRUSSEL E., BIGUET J. et BISERTE G.  
Biochimie, 1979. Acceptée pour publication.

Abréviations utilisées dans le texte

AP<sub>1</sub> = aminopeptidase 1  
AP<sub>2</sub> = aminopeptidase 2  
DCCI = dicyclohexylcarbodiimide  
DEAE cellulose = diméthylamino-éthyl cellulose  
DTNB = acide 5,5'dithiobis nitrobenzoïque  
DTT = dithio thréitol  
EDTA = acide éthylène diamine tétra acétique  
HMDA = hexaméthylène diamine  
L.A.P = leucine aminopeptidase  
Leu-p-NA = L-leucine-p-nitroanilide  
2-ME = 2-mercaptoéthanol  
OP = o-phénanthroline  
p-CMPB = p-chloromercuribenzoate  
p-CMPS = p-chloromercuriphenylsulfényle  
SCMC = S-carboxyméthyl cystéine  
SCMK = S-carboxyméthyl kératine  
Tris = Tris hydroxyméthyl amino méthane  
SDS = sodium dodecyl sulfate

=====  
= T A B L E D E S M A T I E R E S =  
=====

INTRODUCTION .....	Page	1
CHAPITRE I : Les kératines du cheveu .....	Page	2
CHAPITRE II : <u>Keratinomyces ajelloi</u> .....	Page	14
CHAPITRE III : Mise en évidence de la ..... kératinolyse de la fibre de cheveu par <u>K. ajelloi</u>	Page	22
CHAPITRE IV : Activité protéolytique et ..... kératinolytique de <u>K. ajelloi</u>	Page	31
CHAPITRE V : Activité exopeptidasique des ..... extraits de culture	Page	48
DISCUSSION .....	Page	94
RESUME .....	Page	102
BIBLIOGRAPHIE .....	Page	104
APPENDICE TECHNIQUE .....	Page	1-t
BIBLIOGRAPHIE DE .....		
L'APPENDICE TECHNIQUE .....	Page	45-t

E R R A T A

=====

-oOo-

- Page 7 : Dans la légende, lire G 200 au lieu de G 100
- Page 19 : Lire 110° C et 22° C au lieu de 110 C et 22 C
- Page 23 : A la 2ème ligne, lire "ions phosphates" au lieu de "ions sulfate"  
  
2 lignes avant le bas de la page, lire KUNERT au lieu de KURNET
- Page 33 : A la dernière ligne, lire "très semblables" au lieu de "très comparables"
- Page 58 : 3 lignes avant la fin du 2ème paragraphe, lire "5 à 6 fois" au lieu de "7 à 8 fois"
- Page 79 : Ajouter : ——— AP<sub>1</sub>  
                  ----- AP<sub>2</sub>
- Page 90 : Ajouter "500" sur l'axe des abscisses
- Page 100 : A la fin du 3ème paragraphe, lire "les compositions en acides aminés sont très voisines" au lieu de "la composition en acides aminés est très comparable"

-oOo-



## INTRODUCTION

Dans le règne animal, seuls quelques larves d'insectes et quelques champignons sont capables de dégrader les protéines fortement résistantes que sont les kératines.

Pour essayer de comprendre le mécanisme de kératinolyse d'une part et de connaître la nature des enzymes responsables d'autre part, nous avons étudié l'attaque du cheveu qui est une kératine typique par le dermatophyte Keratinomyces ajelloi, connu pour être à la fois kératinophile et kératinolytique.

CHAPITRE I

LES KERATINES DU CHEVEU

Le cheveu, substance de nature essentiellement protéique appartient à la classe des kératines qui sont des protéines fibreuses particulièrement insolubles ayant pour fonction principale de protéger le corps des vertébrés des agressions du milieu extérieur (agressions mécaniques, thermiques, bactériologiques....).

Le cheveu à priori, semble avoir un rôle d'isolant thermique analogue à celui de la laine chez le mouton alors que la peau joue un rôle de barrière sélective entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Le cheveu, comme la laine, fait partie de la sous-classe des kératines dites "dures" dans la terminologie employée par MERCER (1).

Les kératines dures ne desquament pas et se caractérisent par ailleurs par un faible taux de lipides (6 % pour le cheveu de l'homme adulte, 3,5 % pour le cheveu de l'enfant) et par un taux en soufre de l'ordre de 3 %. Les kératines dures s'opposent aux kératines "molles" telles que celles de l'épiderme qui desquament et qui se caractérisent par un taux de lipides plus élevé et par un taux de soufre nettement inférieur à 3 %.

La richesse en soufre des kératines se traduit au niveau de la composition en acides aminés par une richesse en L-cystine qui, par les ponts disulfure qu'elle contient participe à l'élaboration d'un édifice moléculaire particulièrement structuré et solide. La richesse relative en cystine des kératines dures et des kératines molles est illustrée sur le tableau I où nous avons rassemblé les compositions que nous avons établies et qui nous permettent de comparer la composition en amino-acides du cheveu et de la laine d'une part et de l'épiderme humain d'autre part.

- 4 -

# Composition en acides aminés en Résidus pour 100 résidus

	Cheveu	Laine	Peau <sup>•</sup>
Asp	5,9	6,1	6,6
Glu	13,8	12,1	14,0
Ser	10,6	10,6	16,0
Thr	6,8	6,4	4,0
Pro	8,1	7,9	2,4
Gly	6,0	8,8	20,9
Ala	3,9	5,4	5,4
Val	5,2	5,4	3,1
Ile	2,4	2,8	2,8
Leu	5,8	7,2	5,1
Phe	1,9	2,6	2,5
Tyr	2,6	3,7	2,8
Cys/2	17,0	10,8	1,3
Met	0,6	0,4	0,5
His	0,8	0,7	3,6
Lys	2,3	2,2	3,7
Arg	6,2	6,8	4,9
% Soufre <sup>••</sup>	4,4	2,8	0,6

- Fragment de peau desquamée
- D'après le contenu en cystine et méthionine



TABLEAU I

Il faut signaler que, contrairement à d'autres protéines de structure, les kératines ne contiennent pas d'acides aminés "particuliers" (type hydroxyproline ou desmosines du collagène et de l'élastine).

La richesse en ponts disulfure étant une des causes essentielles de l'insolubilité des kératines, la caractérisation de ces protéines en solution ne pourra se faire qu'après rupture des ponts disulfure (S-S) soit par oxydation, soit par réduction.

Nous avons utilisé la réduction des ponts disulfure suivie de la carboxyméthylation des groupes thiols (-SH) formés, ce qui ne modifie que les résidus de cystine\*, alors que les réactions d'oxydation modifient également les résidus de méthionine, tryptophane et tyrosine.

Le passage en solution d'une partie des kératines peut être réalisé par réduction au thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 10.5 sous azote ; les groupements thiols ainsi formés sont bloqués par le monoiodoacétate à un pH compris entre 8,5 et 9. Les S-carboxyméthylkératines (SCMK) ainsi obtenues peuvent être fractionnées par précipitation à pH 4,4 en milieu de force ionique 0,5 selon la technique de O'DONNELL et coll. (3) en SCMK-A qui précipitent et en SCMK-B qui restent en solution.

Nous avons réalisé le fractionnement en SCMK-A et SCMK-B par filtration sur gel de Sephadex G 200 en milieu urée 4 M selon la technique décrite par MOSCHETTO (4). En effet, les SCMK-A ont des tailles moléculaires égales ou supérieures à 70 000, les SCMK-B des tailles moléculaires comprises entre 10 000 et 30 000 ce qui rend possible leur séparation.

---

\* La carboxyméthylation réalisée dans les conditions de CRESTFIELD et coll. (2) empêche une conversion importante des résidus de méthionine en sel de carboxyméthyl sulfonium.

La figure 1 représente la séparation que nous avons obtenue pour les SCMK du cheveu et celle obtenue par MOSCHETTO (4) pour les SCMK de laine.

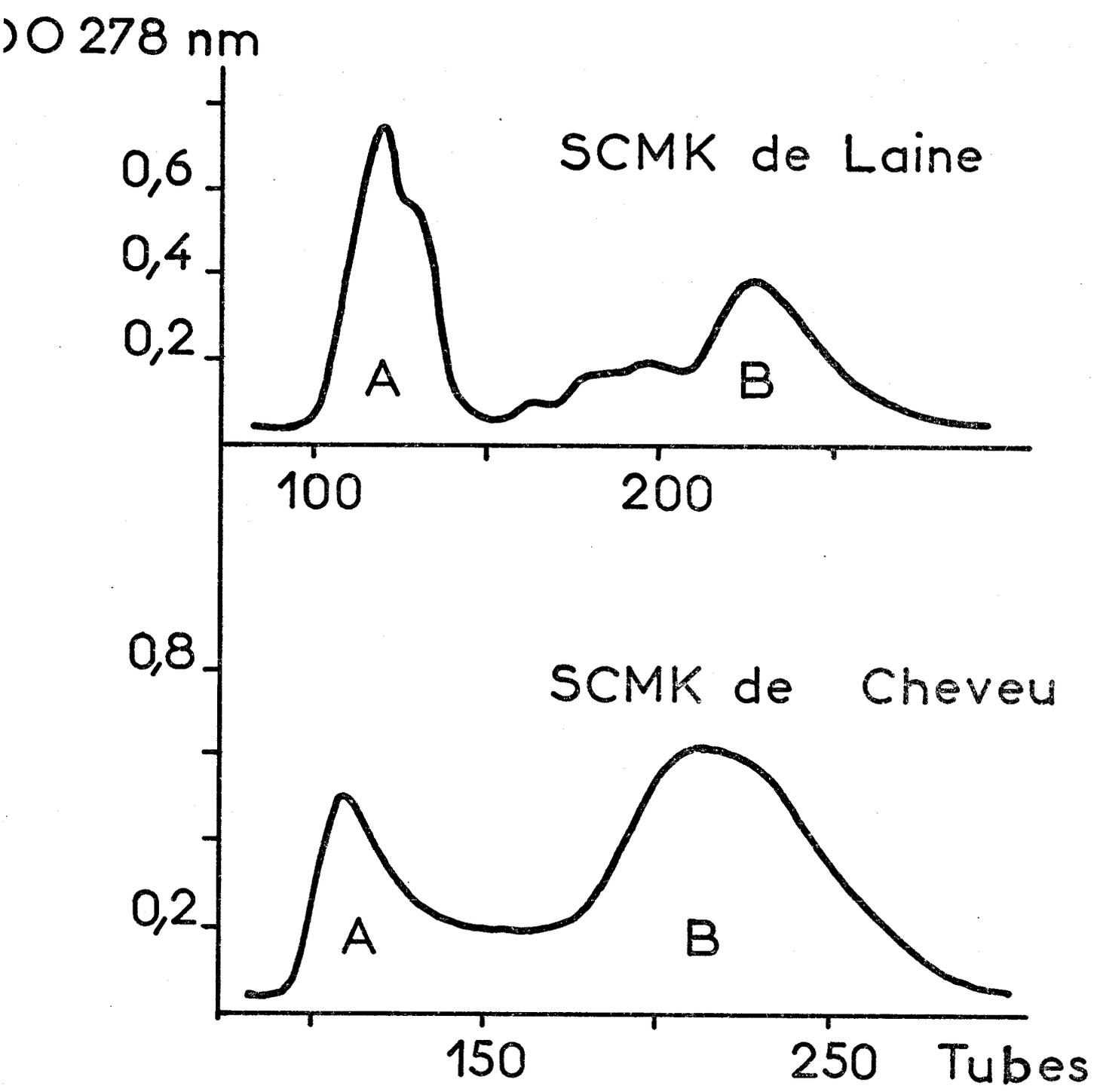
Nous avons rassemblé dans le tableau II les compositions en amino-acides des SCMK-A et SCMK-B de cheveu et de laine préparées par cette filtration sur Sephadex G 200.

Les SCMK-A sont riches en acides dicarboxyliques (24 résidus pour 100 résidus d'amino-acides) et relativement pauvres en cystine (5 résidus de 1/2 cystine pour 100 dans le cas de la laine, 9 dans le cas du cheveu).

Les SCMK-B sont pauvres en acides dicarboxyliques (11 et 12 résidus pour 100 pour la laine et le cheveu respectivement). La chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 4,5 permet de fractionner les SCMK-B de laine ou de cheveu (RUFFIN et MOSCHETTO, 5) et d'obtenir dans le cas du cheveu une fraction homogène en électrophorèse sur gel d'amidon (Fig. 2) et en ultracentrifugation analytique, le coefficient de sédimentation ramené aux conditions standard est  $S^{\circ}_{20,w} = 1,2$ .

Le tableau III rassemble les compositions en amino-acides des 4 fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose à partir des SCMK-B du cheveu et aussi celles de SCMK-B de laine que SWART et coll (6) ont purifié par un protocole expérimental utilisant la gel filtration sur Sephadex G 100, la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose et l'électrophorèse de zone en colonne et dont la structure primaire a été déterminée (HAYLETT et SWART, 7) (HAYLETT et coll, 8) ; (SWART et HAYLETT, 9).

Une grande similitude de composition apparaît entre la fraction F2 DEAE que nous avons préparée à partir du cheveu et la fraction SCMK-B III-B2 de laine préparée par SWART et coll. En effet, le contenu en acides aminés basiques (Lys + His + Arg) et le contenu en proline sont les mêmes ou très voisins dans les deux cas. La plus grande richesse de la fraction issue du cheveu en SCMC est le reflet de la plus grande teneur en cystine du cheveu par rapport à celle de la laine.



Séparation des SCMK de laine et de cheveu sur Sephadex G 100  
Colonne: 4,1x108 cm - débit: 18 ml/Heure  
Tampon: tris 0,076M - acide citrique 0,005M  
EDTA 0,01M - urée 4M - pH 8,6  
Collection: 4ml par tube

Figure 1



Compositions en résidus pour 100rés.

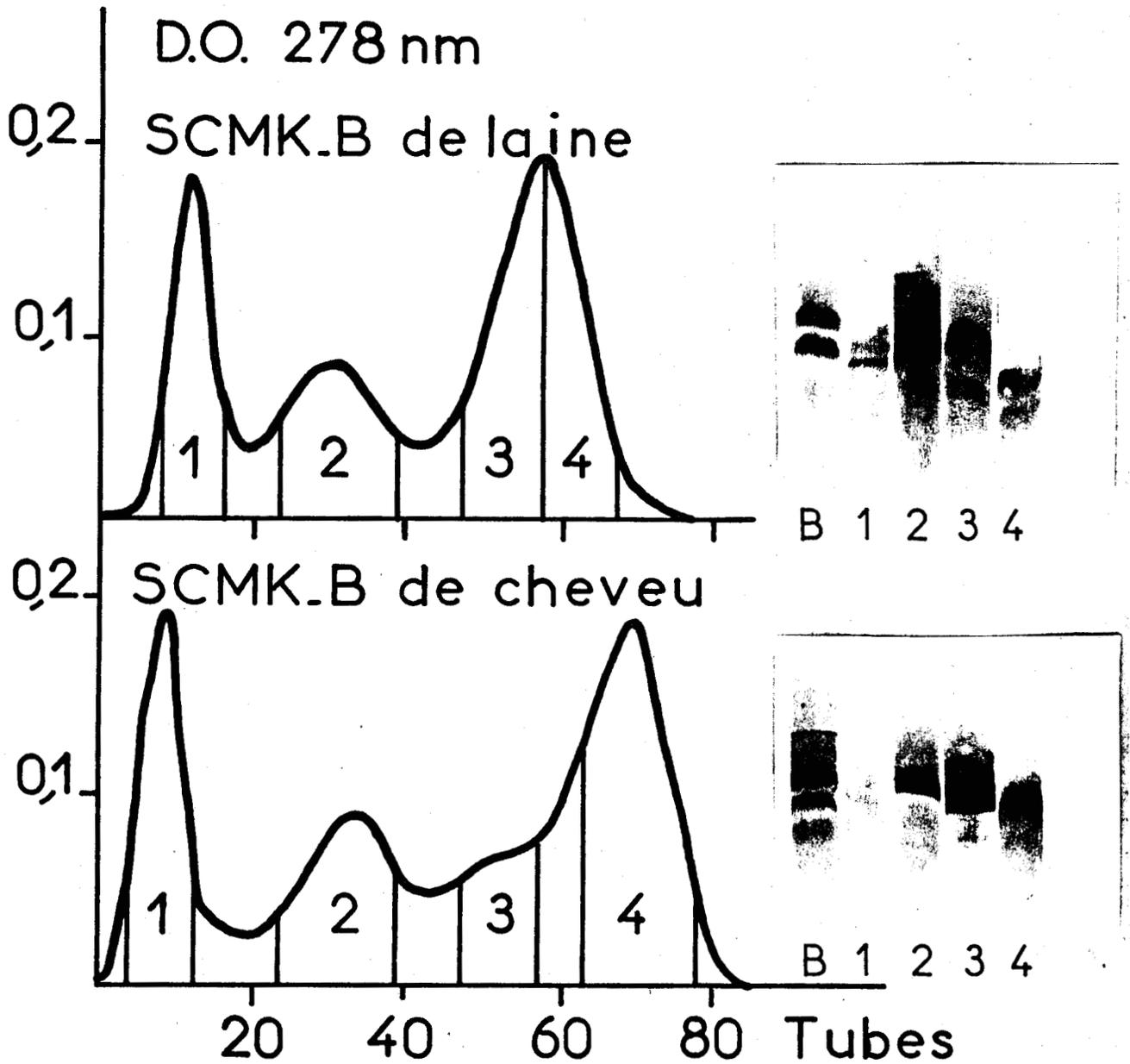
	LAINE		CHEVEU	
	SCMK-A	SCMK-B	SCMK-A	SCMK-B
Asp	9,5	2,8	8,7	4,5
Glu	14,7	8,0	15,3	7,8
Ser	8,5	14,2	11,2	13,4
Thr	4,9	11,1	6,5	9,8
Pro	3,6	13,5	3,9	10,1
Gly	7,1	6,5	6,5	7,5
Ala	6,9	2,8	6,4	3,3
Val	5,7	5,4	4,9	4,6
Ile	3,9	3,4	3,1	2,5
Leu	10,2	3,7	7,8	4,4
Phe	2,9	1,8	2,3	1,5
Tyr	3,7	2,0	2,9	1,7
Trp	n.d. °	n.d.	n.d.	n.d.
SCMC °	5,3	17,8	9,1	20,4
Cys/2	0	0	0	0
Met	0	0	traces	traces
His	0,8	0,8	1,1	1,4
Lys	4,2	0,6	3,4	1,5
Arg	5,6	5,6	6,3	4,9

° SCMC : S-carboxyméthyl cystéine

° n.d. : non déterminé



TABLEAU II



A GAUCHE Chromatographie sur DE32 des SCMK\_B de laine et de cheveu

Colonne: 2,5 x 30 cm - Collection: 4 ml / tube

Elution : gradient 0,25M à 0,8M en NaCl dans du tampon acétate 0,02M pH 4,5

A DROITE Electrophorèses sur gel d'amidon dans un tampon tris borate, urée 8M, pH 8,6

Figure 2



Compositions en résidus pour 100 rés.

	CHEVEU Résultats personnels				LAINE (Swart et coll. 6)		
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	<sup>III</sup> B <sub>2</sub>	<sup>III</sup> B <sub>3</sub>	<sup>III</sup> B <sub>4</sub>
Asp	4,3	5,8	1,8	2,1	8,2	3,1	3,1
Glu	7,4	7,7	9,5	10,3	4,1	6,3	6,3
Ser	13,0	10,0	13,1	14,0	9,3	12,5	11,5
Thr	10,6	10,9	12,4	10,9	10,3	11,5	11,5
Pro	11,4	13,7	10,5	9,5	13,4	15,6	16,7
Gly	7,6	5,3	5,5	5,9	5,2	2,1	2,1
Ala	3,4	2,5	1,9	1,7	3,1	3,1	3,1
Val	5,1	4,5	5,4	3,7	6,2	5,2	4,2
Ile	2,2	2,3	1,5	1,2	4,1	3,1	4,2
Leu	4,2	7,6	2,1	1,4	7,2	8,3	7,3
Phe	1,9	1,7	0,7	1,1	3,1	2,1	3,1
Tyr	1,6	1,3	1,3	1,9	2,1	2,1	1,0
Trp	nd	nd	nd	nd	0	1,0	1,0
SCMC	19,1	19,1	25,8	28,2	16,5	17,7	18,8
Cys/2	0	0	0	0	0	0	0
Met	0,1	0,4	0	0	0	0	0
His	1,5	1,7	0,7	1,1	1,0	1,0	1,0
Lys	1,3	1,3	0,4	0,5	2,1	2,1	2,0
Arg	5,1	3,9	7,2	5,3	4,1	3,1	3,1

Analyse de fractions DEAEcellulose de cheveu et de laine

TABLEAU III



L'étude aux rayons X de la laine et du cheveu a montré que les diagrammes obtenus correspondaient, par la distance des plans de réflexion, à une structure en hélice  $\alpha$ .  
(10)

Les mesures faites sur la fibre native de laine ou de cheveu indiquent une structure plus compacte que celle obtenue avec des polypeptides synthétiques hélicoïdaux, ce qui peut s'expliquer par l'enroulement en super hélice de plusieurs hélices  $\alpha$ .

Dans le cas des kératines, les mesures faites avec les rayons X indiquent que deux hélices  $\alpha$  seraient enroulées en super hélice pour constituer une protofibrille de 20 Å de diamètre ayant 200 ou 400 Å de longueur. Les protofibrilles elles-mêmes sont assemblées en microfibrilles de 75 Å de diamètre qui constitue la fibre élémentaire des kératines observées en microscopie électronique (CREWTHER et coll, 11).

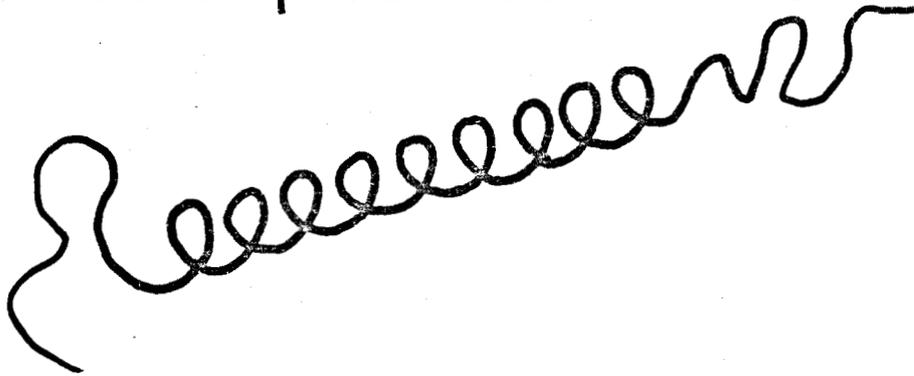
Au niveau moléculaire, on peut dire que ce sont les molécules pauvres en soufre (et aussi pauvres en proline) qui sont enroulées en hélice  $\alpha$ , alors que les protéines riches en soufre ( et également riches en proline) constituent la matrice servant à stabiliser l'architecture fibrillaire.

En effet, les travaux en dispersion optique rotatoire de HARRAP (12) ont montré que les SCMK-A ont dans l'eau à pH 9,1 un pourcentage d'hélicité de 50 % alors que les SCMK-B ne présentent pas de structure organisée. Par ailleurs, les SCMK-A soumises à l'action de la pronase, perdent environ la moitié de leurs amino-acides pour donner un noyau ayant 85 % d'hélicité.

Les peptides détachés par la pronase n'ont pas de structure hélicoïdale et renferment la majeure partie du soufre (CREWTHER et HARRAP, 13). Selon FRASER (14), les parties hélicoïdales de plusieurs molécules de protéines pauvres en soufre s'assembleraient bout à bout pour former un brin de protofibrille.

Les parties non hélicoïdales rempliraient les interstices entre les différentes protofibrilles d'une microfibrille (Fig. 3). Les protéines riches en soufre auraient pour rôle de lier entre elles les différentes microfibrilles au sein de la fibre kératinique.

# Protéines pauvres en Soufre



Modèles de protofibrilles d'après FRASER

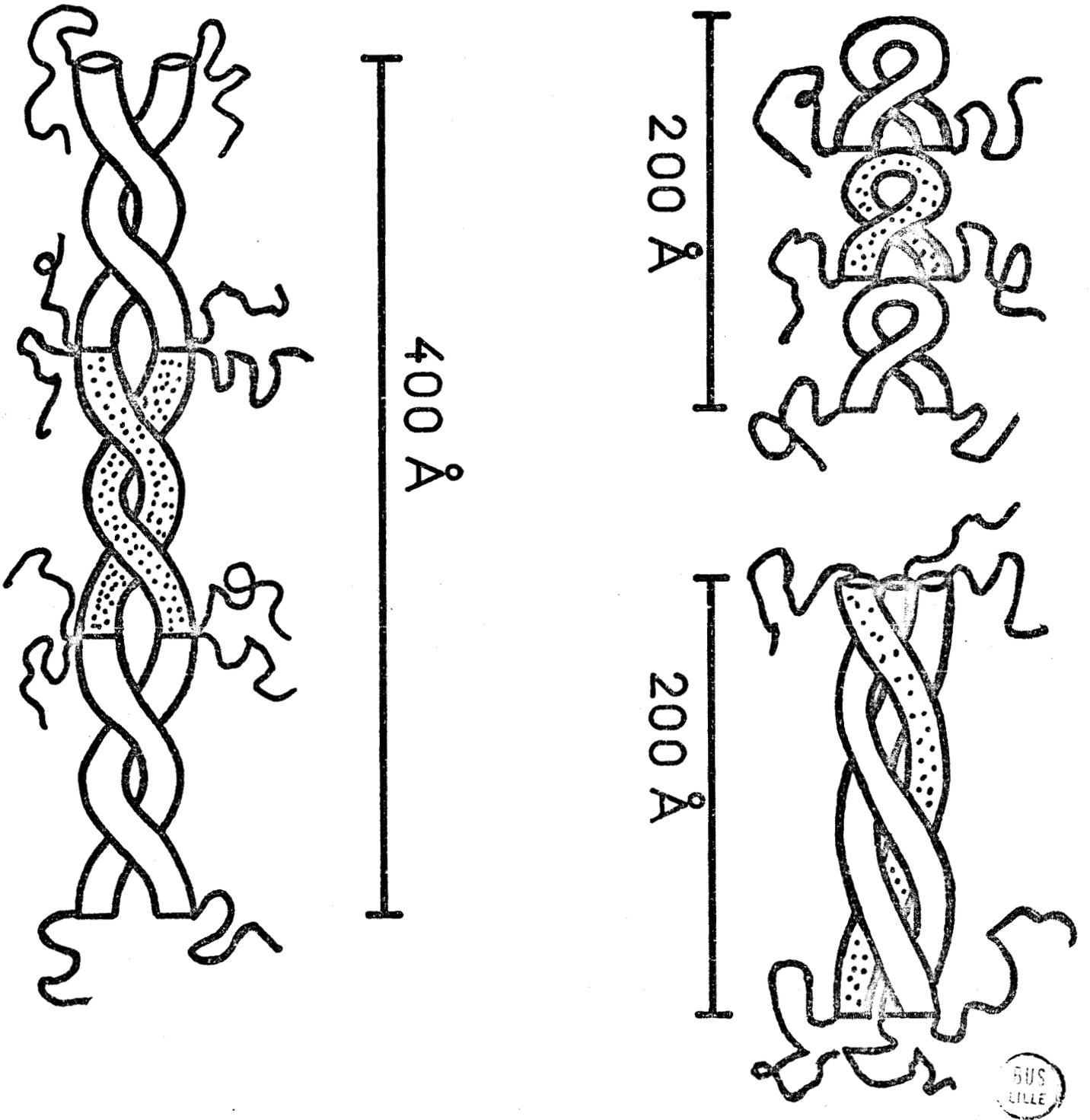


Figure 3

CHAPITRE II

KERATINOMYCES AJELLOI

Keratinomyces ajelloi est un dermatophyte géophile cosmopolite très occasionnellement pathogène. Il a été isolé de nombreuses régions du globe et notamment d'Amérique par AJELLO (15).

Ce champignon est suffisamment kératinophile pour qu'on puisse l'isoler en mettant des poils ou des cheveux dans le sol. K. ajelloi comme tous les dermatophytes, se développe très bien sur milieu de Sabouraud (glucose brut : 2 %, peptone 1 %, gélose : 2 %) et se caractérise alors par des colonies poudreuses, ocre brun, libérant un pigment rouge qui diffuse dans la gélose (VANBREUSEGHEM, 16).

K. ajelloi qui est un champignon imparfait, se reproduit sous forme de macroconidies longues et fuselées, divisées par des cloisons transversales (Figure 4).

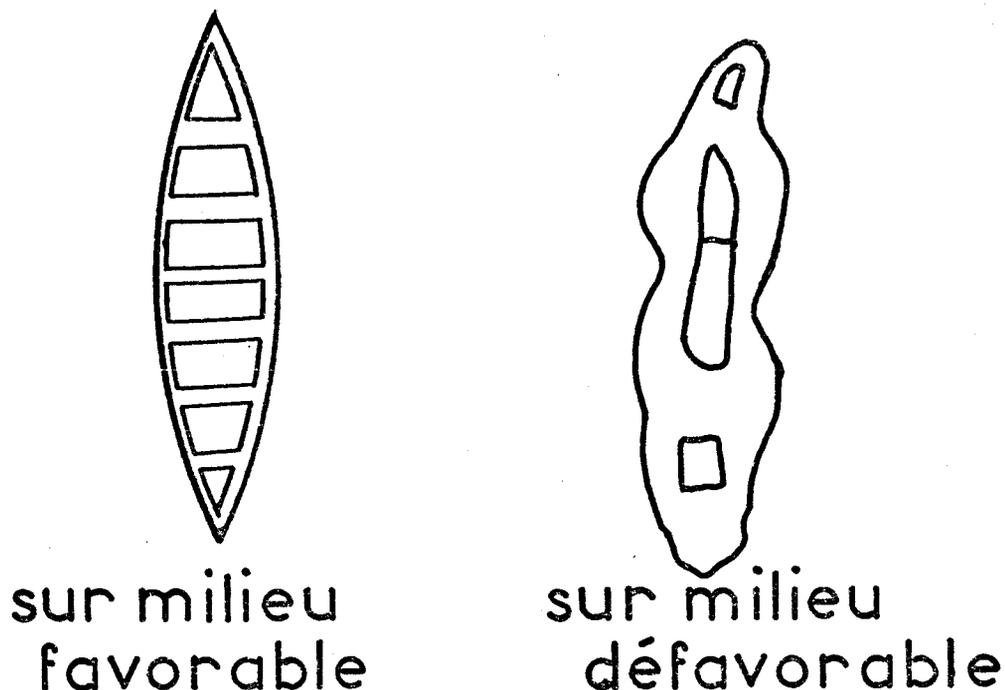


Figure 4  
d'après RAGOT

Les conditions de croissance et les exigences nutritionnelles de K. ajelloi ont été intensivement étudiées par RAGOT (17). Parmi les résultats obtenus par cet auteur, il est à noter que les cultures réalisées en milieu liquide donnent lieu à un développement important du champignon accompagné d'une sporulation abondante lorsque le milieu "minéral de base" (°) contient 0,4 % de glucose et 0,021 % d'azote organique ; à condition que cet azote organique soit apporté sous une forme qui convienne au champignon.

La meilleure source d'azote est constituée par la peptone Chapoteaut, mais certains acides aminés peuvent aussi être une bonne source d'azote pour K. ajelloi : il s'agit des acides aspartique et glutamique et plus encore de la phénylalanine.

D'autres amino-acides sont moins favorables : glycocolle, alanine, valine, leucine, arginine, tyrosine, proline ; d'autres enfin sont défavorables : sérine, thréonine, tryptophane, lysine, histidine, méthionine, cystéine.

Par ailleurs, K. ajelloi est capable de se développer sur des kératines telles que la laine ou le cheveu. Dans le cas des cultures sur laine, en présence de glucose, K. ajelloi sécrète beaucoup moins de protéases, mais la laine n'est pratiquement pas détruite (RAGOT, 18). Ceci peut s'expliquer, selon RAGOT, par l'inhibition de la synthèse des enzymes protéolytiques par le glucose ou un métabolite, car le glucose ne gêne pas la mesure de l'activité protéolytique et favorise la libération dans le filtrat de la faible quantité d'enzymes alors synthétisée.

---

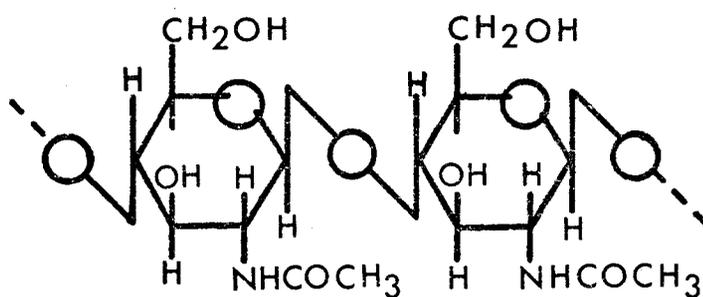
(°) Milieu minéral de base :  $\text{Ca} (\text{PO}_4\text{H}_2)_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  : 0,8 g -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,5 g -  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,5g -  $\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,04 g -  $\text{Mn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,02 g -  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,02g eau qsp 1 000 ml.

Nous avons fait des constatations analogues : dans le cas du cheveu : pas ou peu d'attaque et faible taux de synthèse en présence de glucose, il se confirme donc que le glucose est défavorable à la kératinolyse et c'est pour cette raison que nous avons fait des cultures sur milieu sans glucose\*.

Dans ce milieu, le champignon se développe plus rapidement en présence de caséine que sur le cheveu (Fig.6 ). Il convient de noter que la mesure du développement du champignon est difficile à apprécier ; car on ne peut pas, comme dans le cas d'un milieu entièrement soluble, peser le mycélium après filtration, rinçage et dessiccation à 110°C pendant 15 heures.

Les mesures faites avec les rayons X (BLANK, 19) confirmées par l'action des chitinases (FOSTER et WEBBER, 20) ont prouvé l'existence de chitine dans la paroi des dermatophytes.

Or, la chitine est un polymère linéaire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine liées par des ponts~~β~~1-4 glycosidiques (analogue acétamidé de la cellulose).



## CHITINE

\* Composition du milieu : (tamponné à pH 7,4 par les phosphates) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O : 0,497 g - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2,486 g - MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O : 0,106 g - eau qsp 1 000 ml. On ajoute suivant les expériences 1,2 g de caséine traitée selon HAMMARSTEN ou 500 mg de cheveu pour 100 ml de milieu.

Nous avons donc pensé que la mesure du contenu en glucosamine provenant de l'hydrolyse acide de la chitine pouvait permettre l'évaluation indirecte de la quantité de mycélium développé (RUFFIN et coll, 21). La figure 5 montre qu'il existe une bonne corrélation entre le poids sec de mycélium et le contenu en osamines dans le cas d'une croissance de K. ajelloi sur un milieu contenant de la caséine.

De plus, la figure 6 confirme de façon quantitative que la production de mycélium est nettement plus importante dans un milieu contenant de la caséine que dans celui contenant du cheveu. Dans les deux cas, on observe cependant 2 phases de croissance : une phase exponentielle qui dure de 7 à 10 jours et une phase stationnaire au delà.

L'activité protéolytique (°°°) des filtrats de culture est nettement plus élevée pendant la phase stationnaire que pendant la phase exponentielle (Figure 7) ; c'est pourquoi nous avons étudié l'activité protéolytique développée que dans les milieux obtenus plus de 12 jours après la mise en culture.

---

(°°°) Mesurée sur caséine traitée selon HAMMARSTEN

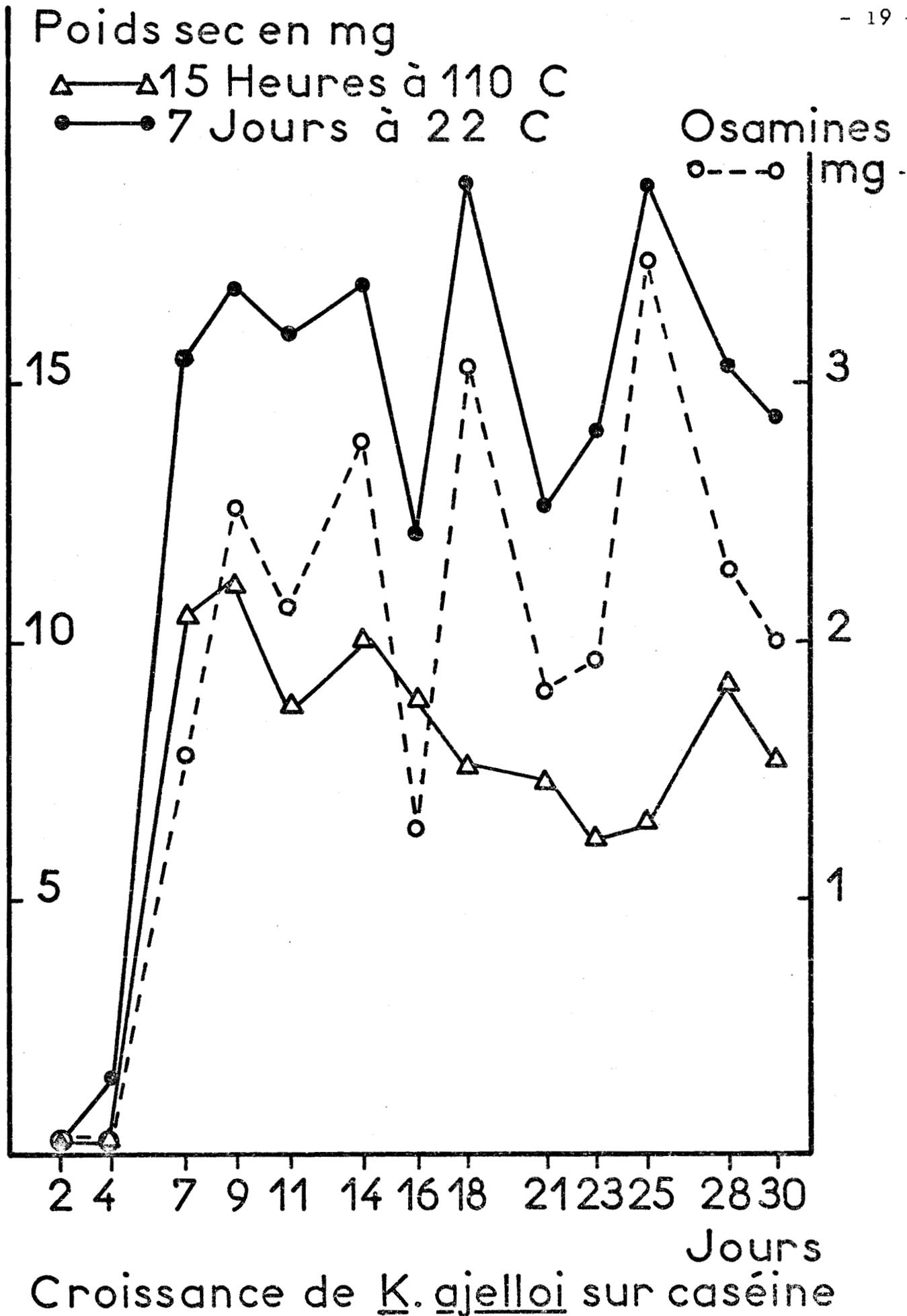
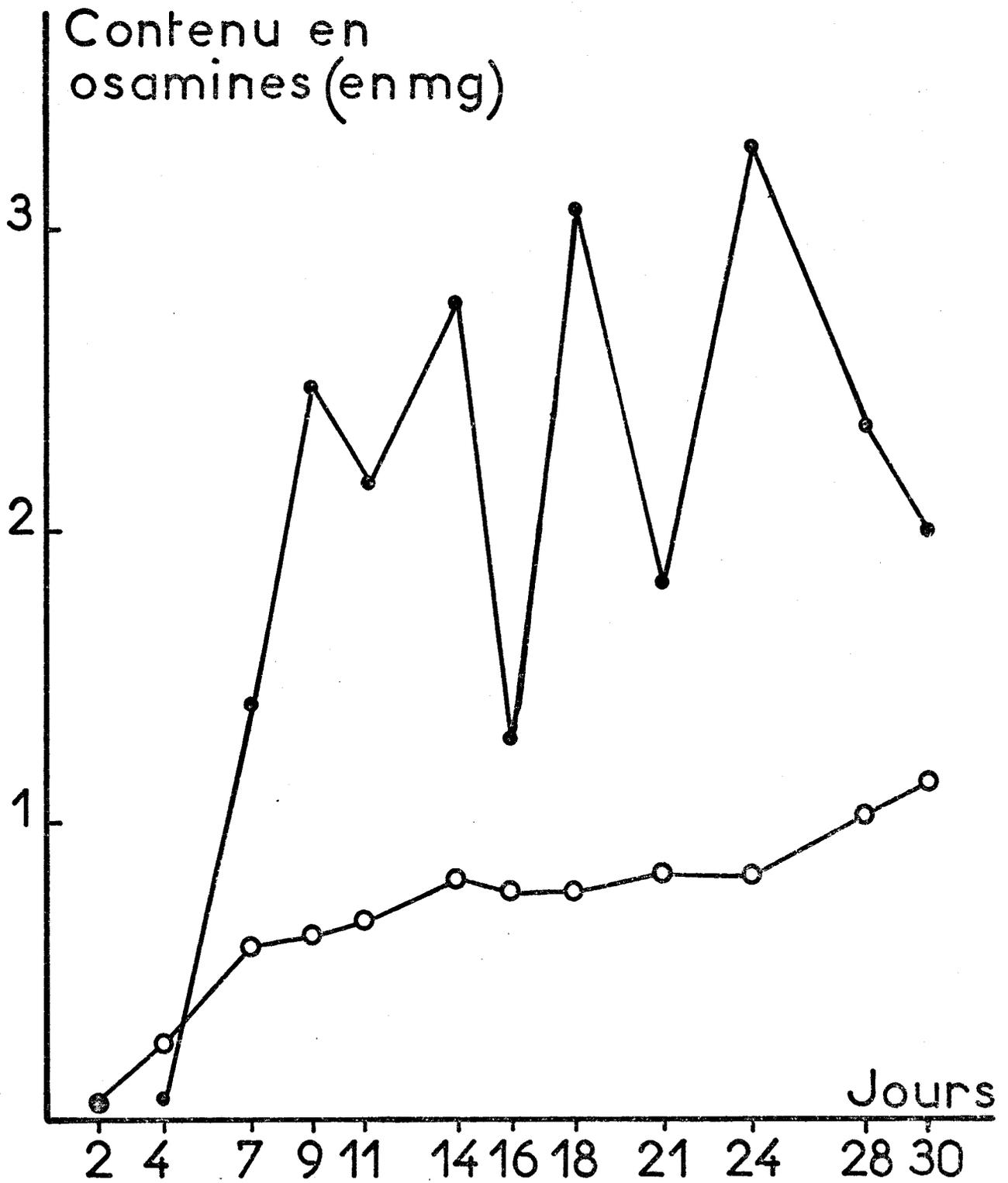


Figure 5



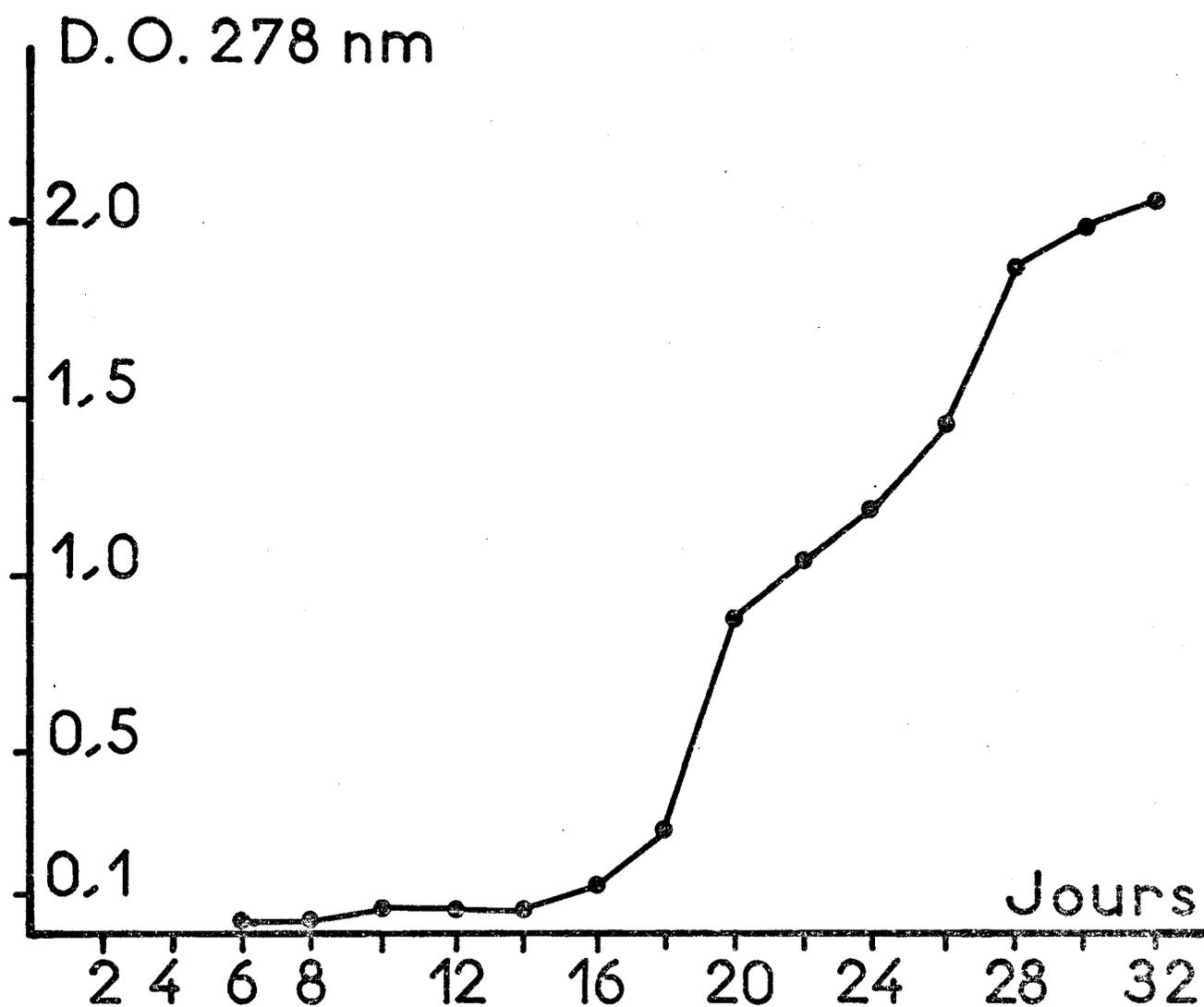


### CROISSANCE DE K. AJELLO I

●—● sur caséine    ○—○ sur cheveu



Figure 6



### ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES CULTURES SUR CHEVEU EN FONCTION DU TEMPS

L'activité est mesurée de la façon suivante:  
à 1ml de filtrat on ajoute 2ml de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 et 1ml de caséine à 1%.  
Après 1 heure à 40°C, l'hydrolyse est arrêtée par addition de 0,5ml d'acide trichloracétique à 45 %



Figure 7

CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE DE LA KERATINOLYSE  
DE LA FIBRE DE CHEVEU PAR K. AJELLOI

La culture de K. ajelloi sur cheveu se fait dans un milieu minéral tamponné à pH 7,4 par les ions sulfate. Les sources de carbone, d'azote et de soufre sont exclusivement contenues dans les kératines du cheveu, ajouté dans le milieu. La kératinolyse se manifeste de plusieurs façons :

1°) Au niveau de la fibre

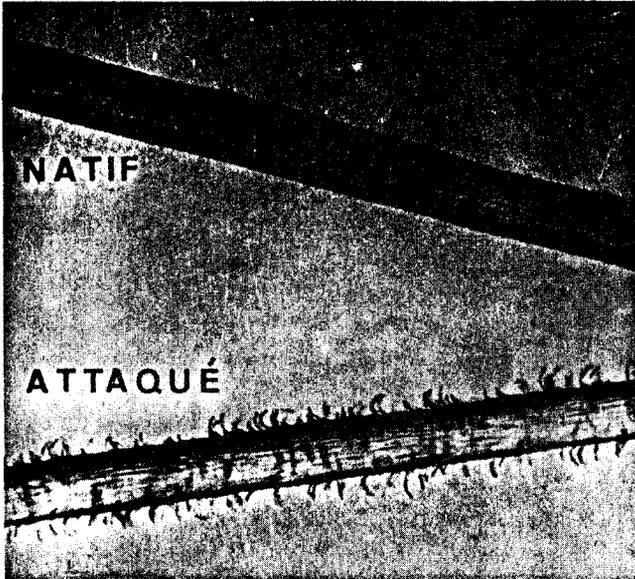
La destruction de la fibre apparait à l'examen microscopique de 2 façons : la cuticule se hérisse et des perforations apparaissent dans le cheveu (Fig. 8). Par ailleurs, après attaque des cheveux par K. ajelloi, il est possible d'isoler après réduction et alkylation des quantités de SCMK 2 à 3 fois supérieures à celles que l'on isole à partir des cheveux non attaqués (Fig. 9).

2°) Formation de sulfates

Après attaque des kératines du cheveu par le champignon, on note l'apparition d'ions sulfate dans les filtrats de culture. Le dosage de ces ions par le réactif de gélatine chlorure de baryum selon la technique de CHOPRA (22) nous a permis d'établir que la quantité de sulfate obtenu correspond en moyenne à la transformation de 5 à 15 % du soufre kératinique (c'est-à-dire en majeure partie de soufre cystéinique). Dans le cas de certaines cultures, le taux de soufre transformé en sulfate atteint 22 %. La présence de sulfate dans les filtrats de culture semble générale chez les dermatophytes se développant sur kératine, car KUNERT (23) en a trouvé dans les filtrats de culture de Microsporum gypseum (17 % de soufre transformé) et CLERIVET (24) dans ceux de Trichophyton verrucosum : (10 % de soufre transformé).

3°) Sulfitolyse

Les ions sulfate ne sont pas les seuls produits d'oxydation du soufre présents dans les filtrats de culture ; en effet, la transformation des ponts disulfure se traduit aussi par l'apparition de S-sulfocystéine (CyS-SO<sub>3</sub>H) ce qui a priori indique une rupture par sulfitolyse. La sulfitolyse a été proposée par KURNET (25) pour rendre compte de la protéolyse du cheveu par Microsporum gypseum.

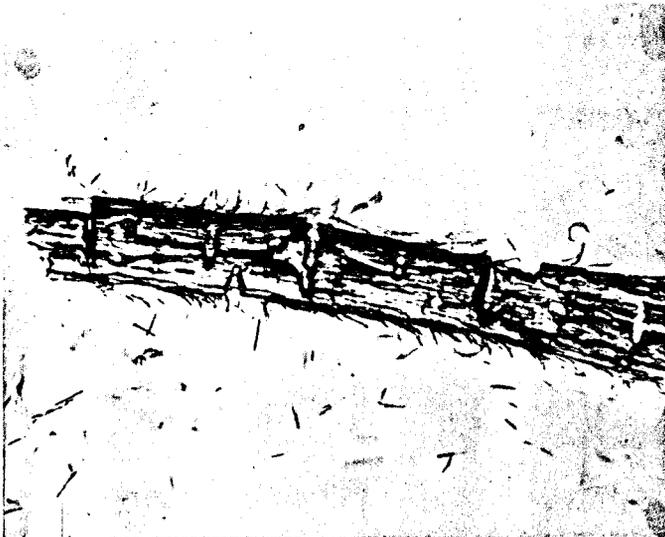


ATTAQUE de la  
CUTICULE

G = 160

ORGANE PERFORATEUR

G = 400



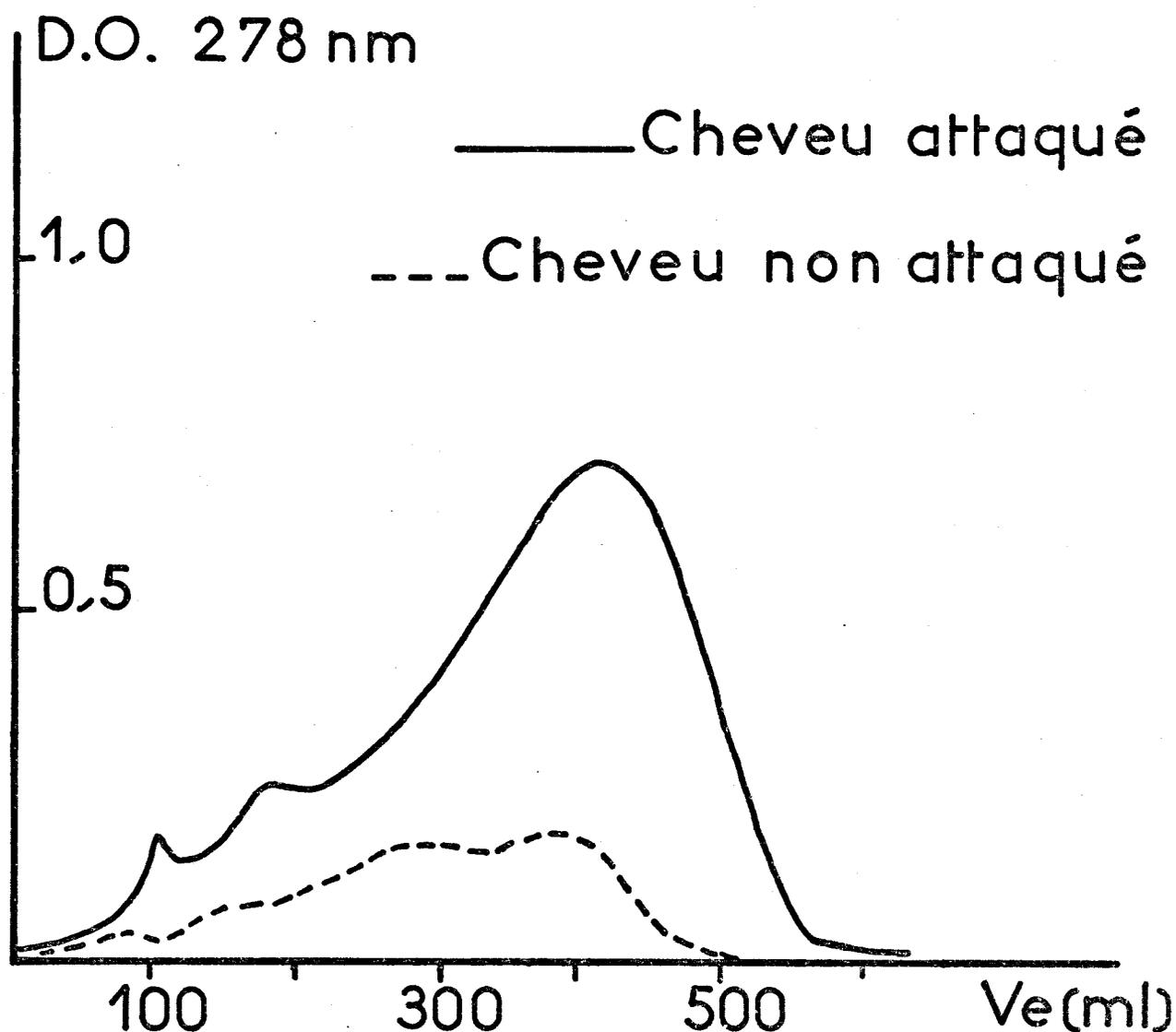
CHEVEU ATTAQUÉ

G = 160

Attaque du cheveu par K. ajelloi

Figure 8





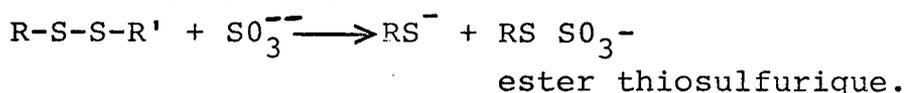
Chromatographie sur Séphadex G 200 des  
SCMK de 700 mg de cheveu non attaqué et de  
700 mg de cheveu attaqué par K.ajelloi

La colonne (4,8x108cm) est éluée par du  
tampon Tris 0,076M \_ acide citrique 0,005M  
EDTA 0,01M \_ urée 4M \_ pH 8,6



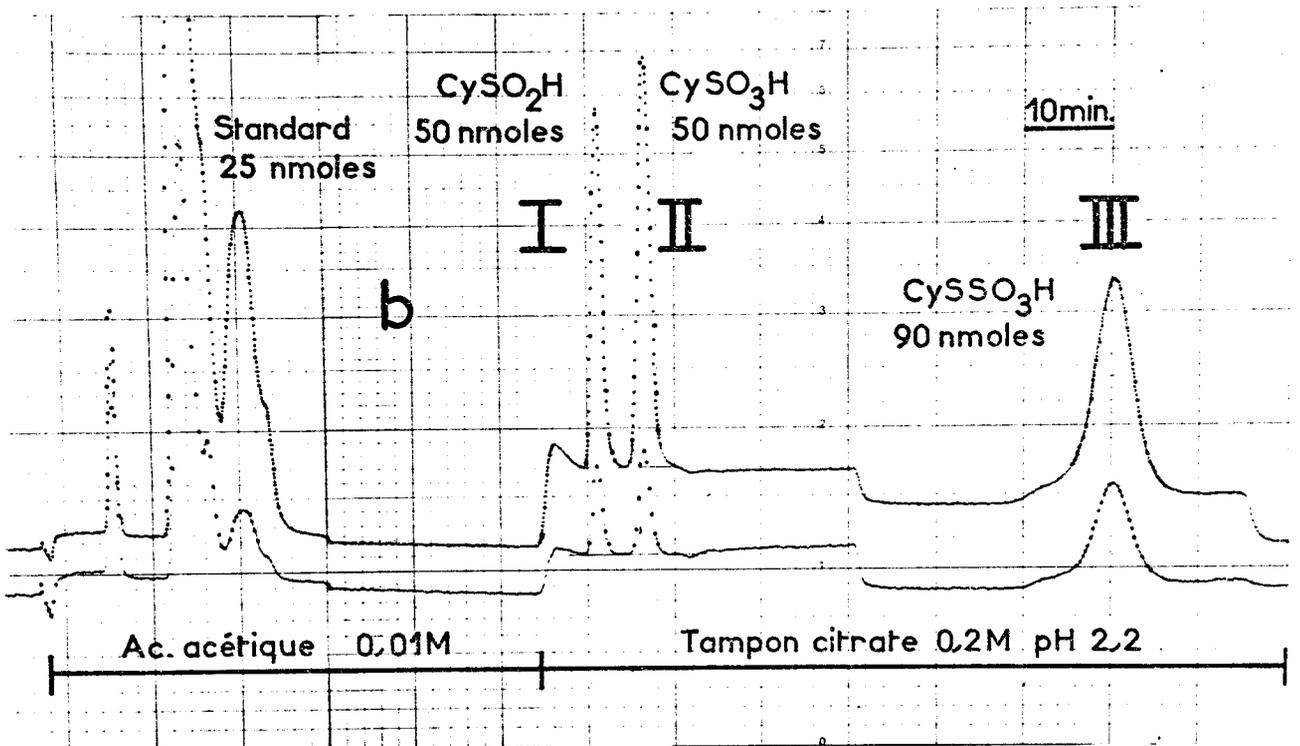
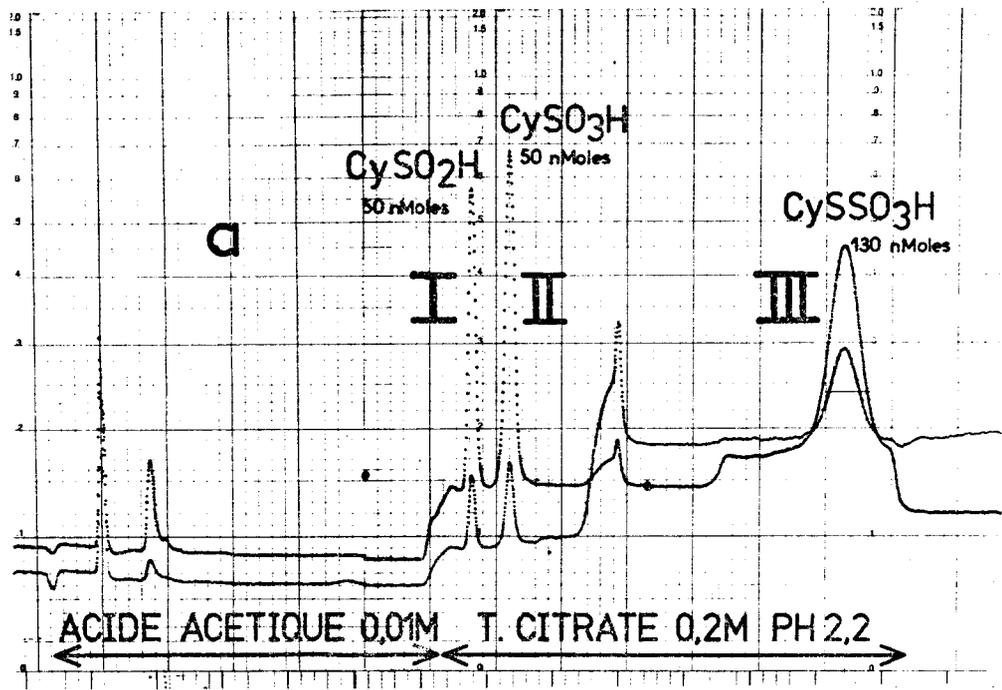
Figure 9

Cet auteur a mis en évidence la présence d'esters thiosulfuriques au niveau des perforations par la réaction à la benzidine de BRACCO et CURTI (26) et par la méthode au tétrazonium de GEYER (27). Ces deux réactions qui sont positives disparaissent si on élimine au préalable de façon spécifique les esters thiosulfuriques. La sulfitolysse se ferait selon le schéma réactionnel proposé par SWAN (28).



Nous avons pu démontrer la présence de S-sulfocystéine dans les filtrats de K. ajelloi cultivé sur cheveu en mettant au point la séparation et l'analyse de cet acide aminé particulier sur résine échangeuse d'anions (voir appendice technique) (RUFFIN et BISERTE, 29) et en appliquant cette technique aux filtrats de culture de K. ajelloi (RUFFIN et coll, 30).

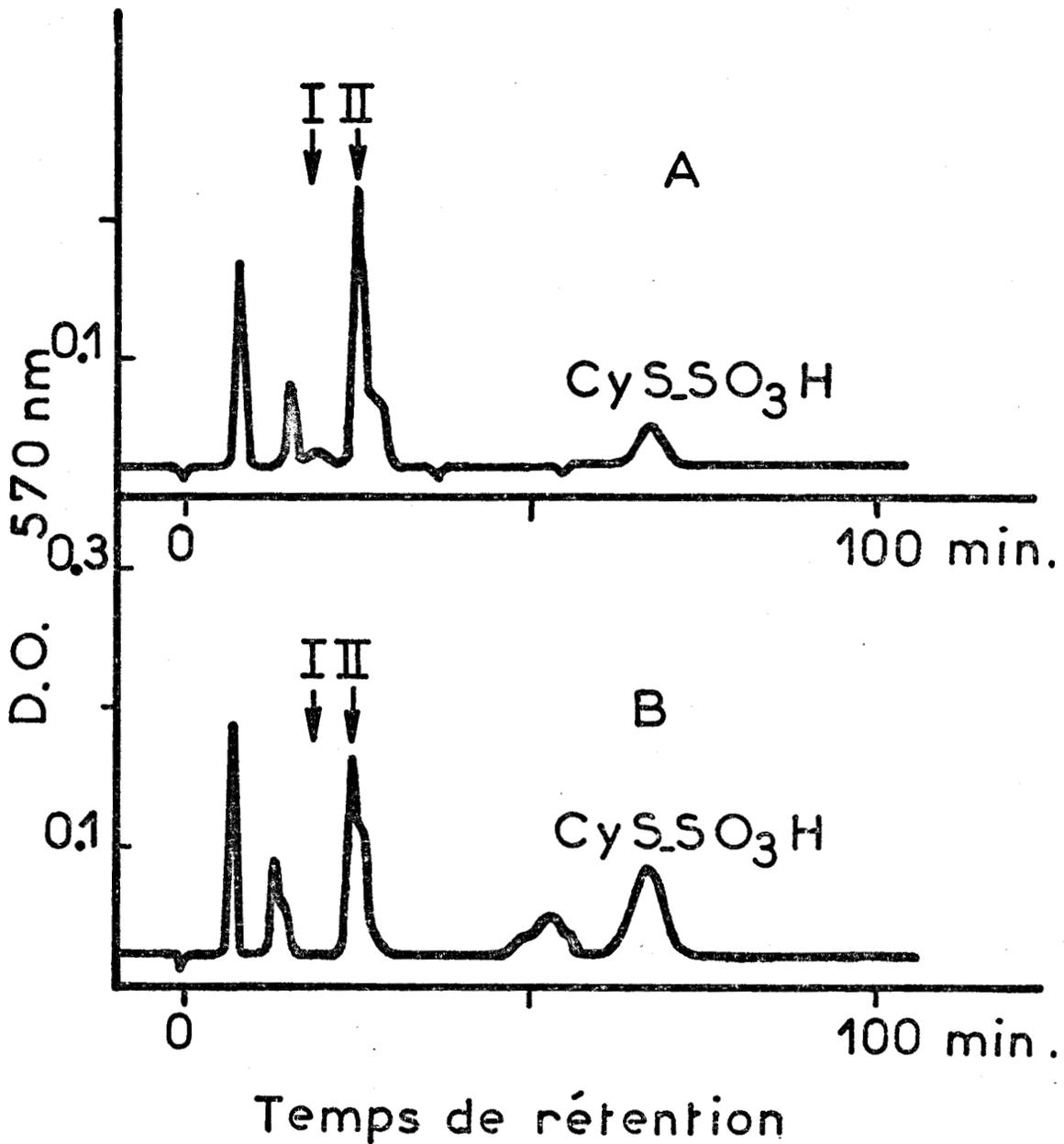
La figure 10 représente deux analyses typiques obtenues dans notre système chromatographique ; d'une part la séparation de 3 composés d'oxydation de la cystine : l'acide cystéine sulfinique (CySO<sub>2</sub>H), l'acide cystéique (Cy SO<sub>3</sub>H), le S-sulfocystéine (CyS-SO<sub>3</sub>H) en absence d'autres acides aminés et d'autre part la séparation des 3 mêmes composés d'oxydation de la cystine en présence de tous les acides aminés habituellement présents dans les protéines. La figure 11 rassemble deux chromatogrammes relatifs aux filtrats de culture montrant la présence de S-sulfocystéine. L'un des chromatogrammes correspond à l'analyse d'un ultrafiltrat obtenu par passage d'un filtrat de culture au travers d'une membrane UM<sub>2</sub> laquelle laisse passer les espèces moléculaires d'une taille inférieure à 2 000 daltons. L'analyse de cet ultrafiltrat, sans hydrolyse préalable, indique la présence de S-sulfocystéine à l'état libre. Les calculs montrent que la S-sulfocystéine à l'état libre représente moins de 1 % du soufre kératinique.



CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS (Bio-Rad. A25) DE L'ACIDE CYSTEINE SULFINIQUE, DE L'ACIDE CYSTEIQUE ET DE LA S-SULFOCYSTEINE.



Figure 10



A - Analyse d'un filtrat ultrafiltré

B - Analyse d'un filtrat hydrolysé



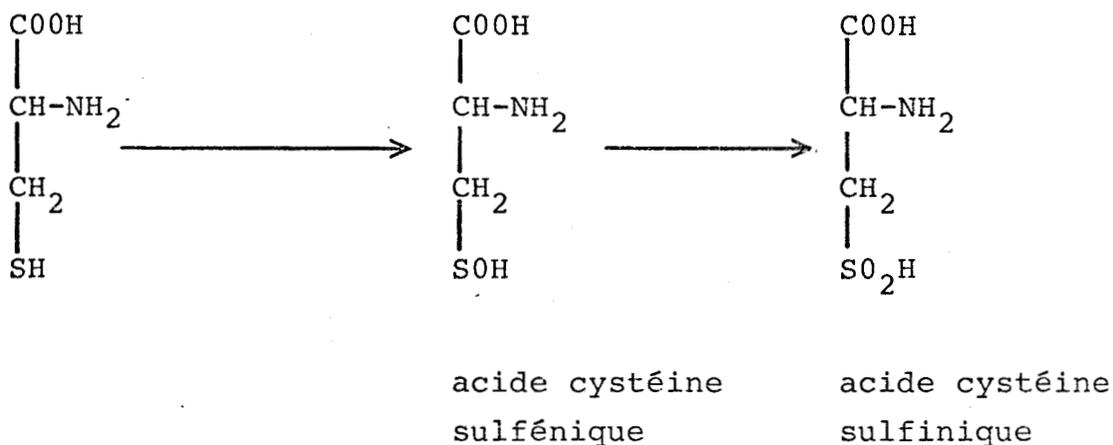
Figure 11

Le second chromatogramme correspond à un filtrat de culture dialysé, lyophilisé puis hydrolysé d'abord par la pronase, puis par la leucine aminopeptidase de rein de Porc\*.

La présence de S-sulfocystéine sur ce chromatogramme indique qu'elle se trouve aussi dans le filtrat de culture, engagé dans des peptides adialysables. Ces résultats prouvent qu'il y a bien eu sulfitolyse du cheveu.

4°) Interprétation

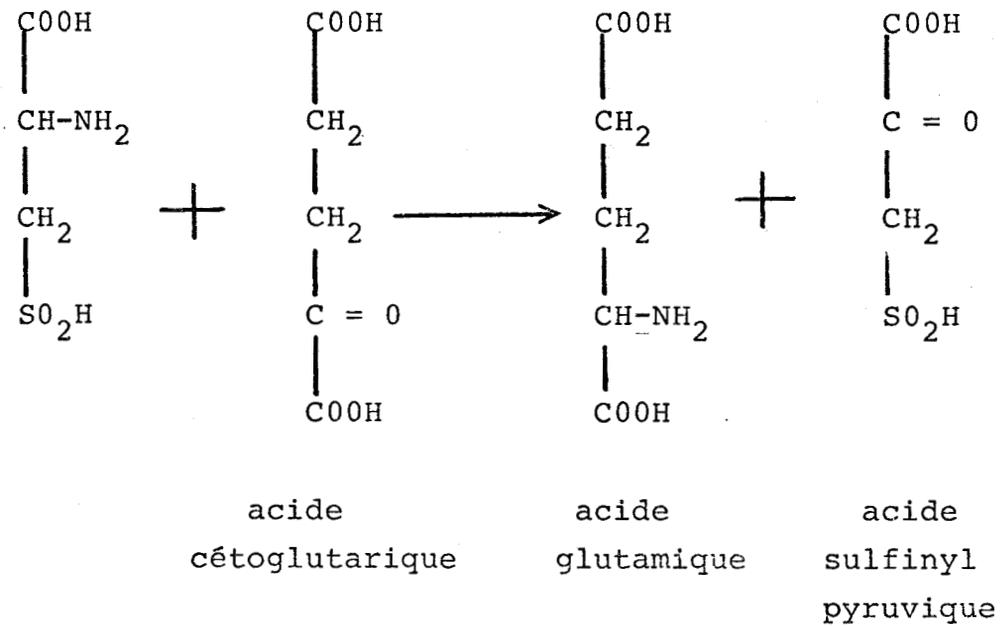
la formation des ions sulfate peut s'expliquer par une réduction de ponts disulfure en groupements thiols qui seraient ensuite oxydés en acide cystéine sulfinique selon un mécanisme proposé par PIRIE (31) pour l'oxydation de la cystéine.



L'acide cystéine sulfinique peut être tansaminé en acide β-sulfinyl pyruvique (FROMAGEOT et coll.31') qui se décompose spontanément en acide pyruvique et anhydride sulfureux.

---

\* Une hydrolyse enzymatique est nécessaire car l'hydrolyse acide détruit complètement la S-sulfocystéine. L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 24 heures en présence de pronase puis à nouveau pendant 24 heures en présence de LAP de rein de Porc.



L'acide cystéine sulfinique peut aussi se décomposer directement en alanine et anhydride sulfureux (SODA et coll, 32).

Les ions sulfites ainsi formés s'oxyderaient en solution en sulfates pour une large part et pour une faible part attaquaient les ponts disulfure pour former des esters thiosulfuriques et en particulier de la S-sulfocystéine.

CHAPITRE IV

ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ET KERATINOLYTIQUE

DE K. AJELLOI

## I - MISE EN EVIDENCE

K. ajelloi au cours de sa croissance sur cheveu développe une activité protéolytique et une activité kératinolytique qui diffusent en partie dans les filtrats de culture.

En nous inspirant des travaux effectués par YU et coll (33) sur un autre dermatophyte, Trichophyton mentagrophytes, nous avons fractionné les cultures en 2 parties : le filtrat et la fraction liée (L).

La filtration de la culture brute sur un verre fritté de porosité 2 permet de séparer le filtrat de l'ensemble cheveu + mycélium. Cet ensemble, agité pendant une heure à température ambiante dans un tampon phosphate de pH 6,8 contenant du NaCl 1 M conduit, après filtration, sur verre fritté, à une solution correspondant au matériel "lié" au mycélium et au cheveu que nous désignerons dans la suite du texte par le terme de "fraction L".

1°) L'activité protéolytique est déterminée après hydrolyse d'une solution de caséine (traitée selon HAMMARSTEN) par les solutions actives, par la mesure de la densité optique (D.O.) à 278 nm des peptides qui restent en solution dans l'acide trichloacétique à 5 % (voir appendice technique). Une unité d'activité protéolytique (U.P.) correspond à la quantité d'enzyme libérant par minute une quantité de peptides dont la D.O. 278 nm équivaut à 1  $\mu$ g de tyrosine.

L'activité protéolytique spécifique est l'activité protéolytique d'une solution enzymatique contenant 1 mg de protéine (dosée par la méthode de LOWRY). Elle s'exprime en unités protéolytiques par mg (U.P./mg).

Les mesures effectuées à 37°C indiquent des valeurs d'activité spécifique variant selon les cultures de 30 à 300 U.P./mg pour les filtrats et de 100 à 600 U.P./mg pour les fractions L. Ces activités protéolytiques spécifiques sont très nettement supérieures à celles mesurées par NARAHASHI et coll (34) pour la pronase de Streptomyces griseus qui est de 45 U.P./mg.

2°) L'activité kératinolytique est mesurée selon la technique décrite par NOVAL et NICKERSON (35), mais en remplaçant le poil de cobaye utilisé par ces auteurs par du cheveu délipidé du même lot que celui mis dans le milieu de culture de K. ajelloi.

50 mg de cheveu sont mis à incuber en présence des solutions actives dans 4 ml de tampon phosphate 0,025 M de pH 7,4 pendant 1 heure à 37°C.

La valeur de l'activité est obtenue par la mesure de la D.O. à 278 nm des peptides libérés par hydrolyse protéolytique des cheveux. Une unité d'activité kératinolytique (U.K.) correspond à la quantité d'enzyme qui donne à la solution du test ci-dessus une D.O. à 278 nm de 0,100. L'activité kératinolytique spécifique est l'activité kératinolytique d'une solution enzymatique contenant 1 mg de protéine (dosée par la méthode de LOWRY) ; elle s'exprime en unités kératinolytiques par mg (U.K./mg).

Les mesures effectuées à 37°C indiquent des valeurs d'activité kératinolytique spécifique variant selon les cultures de 0,5 à 2 U.K./mg pour les filtrats et de 10 à 35 U.K./mg pour les fractions L. Les valeurs publiées pour un autre dermatophyte, Trichophyton mentagrophytes sont de 1.35 U.K./mg pour le filtrat (36,37) et de 19,9 U.K./mg pour la fraction L (33). Les résultats obtenus sont donc très comparables.

Le domaine des activités tant protéolytique que kératinolytique se situe entre pH 6,5 et pH 8,5. Toutefois, on observe un maximum caractéristique à pH 7,4 pour l'activité protéolytique et à pH 6,8 pour l'activité kératinolytique (voir figure 12).

L'étude du filtrat et de la fraction L en électrophorèse en film liquide (voir appendice technique) à pH 8,6 fait apparaître deux familles de protéases ayant des mobilités électrophorétiques différentes. (Figure 13). A ce pH de 8,6, l'une a donc un comportement anodique, l'autre un comportement cathodique.

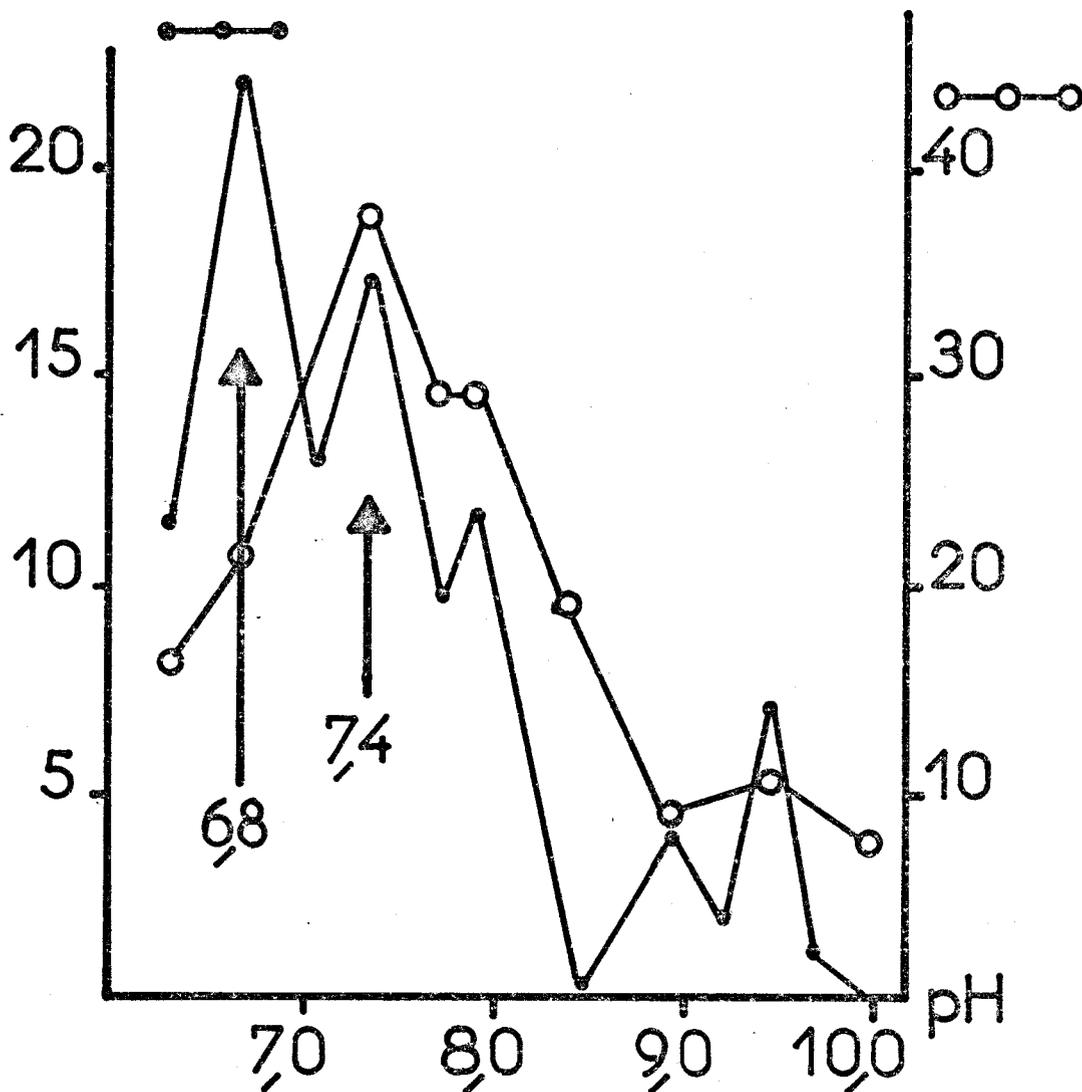
## II - PURIFICATION DES ENZYMES DU FILTRAT ET DE LA FRACTION L

La fraction filtrée et la fraction L sont dialysées contre du tampon phosphate 0,010 M pH 7,4 de force ionique 0,002 pendant 24 heures, puis lyophilisées. Les produits obtenus sont redissous dans du tampon 0,001 M de pH 7,4 et dialysés contre ce même tampon pendant 24 heures. Les solutions ainsi équilibrées sont déposées sur une colonne de DEAE-cellulose (DE 32 Whatman) de 1,9 cm de diamètre et de 9 cm de hauteur équilibrée dans du tampon phosphate 0,025 M pH 7,0 force ionique 0,025. Nous avons trouvé que l'équilibration de la solution à chromatographier dans un tampon de force ionique inférieure à celle de la colonne assure une meilleure fixation des enzymes et des pigments. La chromatographie a été réalisée de la façon suivante : après dépôt de la solution à purifier, les protéines non fixées (Fraction A) sont recueillies par passage d'un volume de tampon phosphate 0,001 M de pH 7,4 égal au volume mort de la colonne. Les protéines retenues sur la colonne sont ensuite éluées successivement par du tampon phosphate 0,028 M pH 7,4 (Fraction B) par NaCl 0,5 M dans ce même tampon (Fraction C) et enfin deux fois de suite par NaCl 1 M dans le même tampon (Fractions D et E).

ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ET KERATINOLYTIQUE EN FONCTION DU pH

Activité kératinolytique  
spécifique (U.K./mg)

Activité protéolytique  
spécifique (U.P./mg)

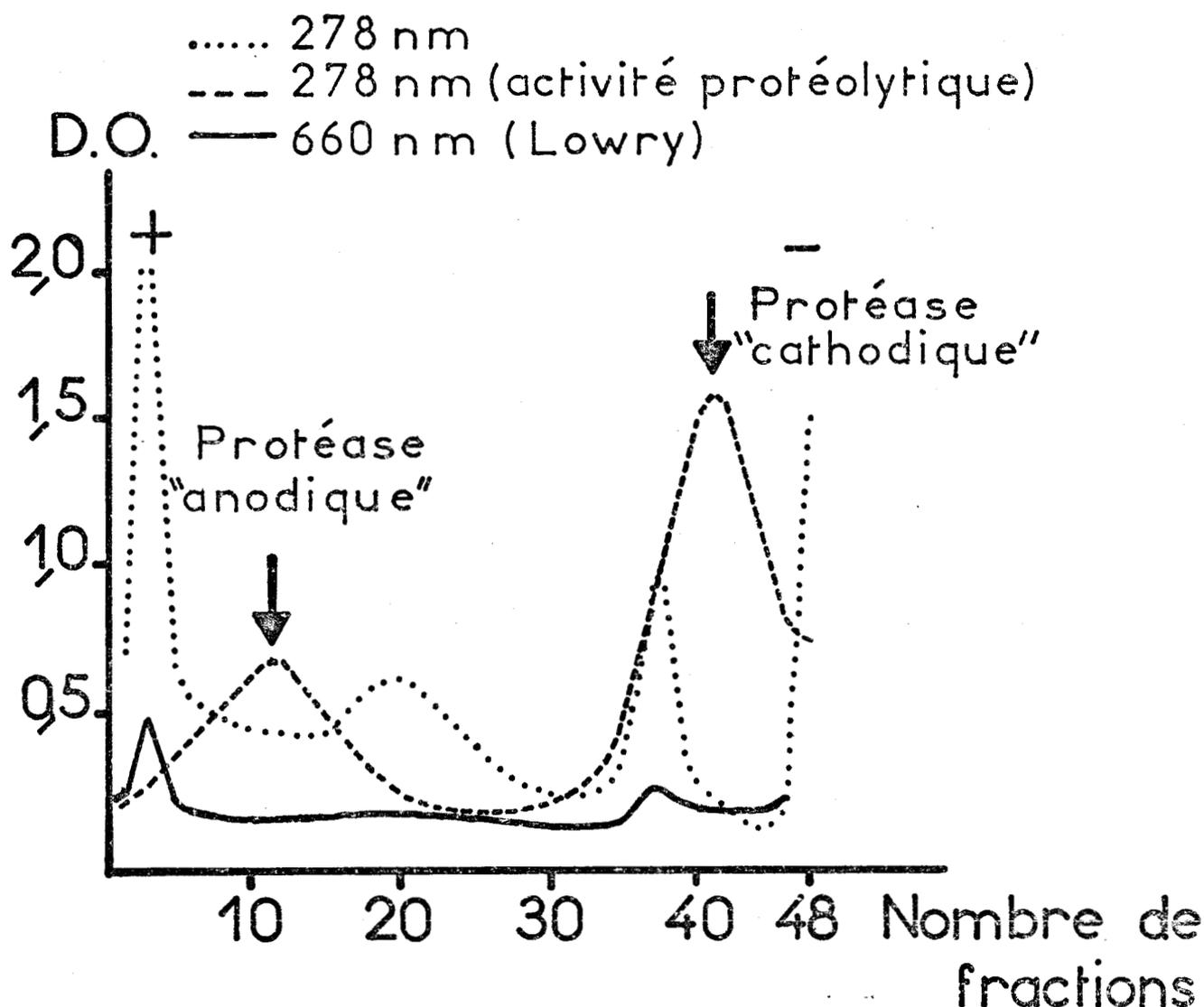


Maximum pour l'activité protéolytique : pH 7,4  
Maximum pour l'activité kératinolytique : pH 6,8

Figure 12



# ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE D'UN FILTRAT DE CULTURE



## Conditions opératoires

Appareil: Elphor VAP

Température: + 5°C \_ Tension: 2200 Volts

Intensité: 160 mA \_ Force ionique: 0,002

Tampon: acide citrique: 0,008M \_ Tris: 0,08M

pH 8,6 \_ Point d'injection: tube 38

Figure 13



Nous avons caractérisé ces fractions par leurs activités protéolytiques spécifiques et kératinolytiques spécifiques et par leur composition en acides aminés.

Les tableaux IV et V rassemblent les valeurs d'activités spécifiques des différentes solutions respectivement préparées à partir du filtrat et de la fraction L.

Les tableaux VI et VII présentent les compositions en acides aminés pour les solutions provenant respectivement du filtrat et de la fraction L.

On peut remarquer que parmi les fractions obtenues à partir du filtrat, c'est la fraction A qui possède à la fois la plus forte activité protéolytique (126 U.P./mg) et la plus forte activité kératinolytique (13,4 U.K./mg).

Par contre, parmi les fractions obtenues à partir de la fraction L, si la fraction A a toujours la plus forte activité protéolytique (1 040 U.P./mg) c'est la fraction C éluee par NaCl 0,5 M qui a la plus forte activité kératinolytique (226 U.K./mg).

la valeur de 1 040 U.P./mg mesurée pour la fraction non retenue (tableau V) est pratiquement la même que celle mesurée par SEKINE (38) pour une protéase neutre extraite des cultures de Aspergillus sojae (1 050 U.P./mg) et purifiée par gel filtration sur Sephadex G 100 et par passage sur hydroxyapatite.

La fraction d'activité kératinolytique maximale (226 U.K./mg) est nettement plus active que les kératinases purifiées à partir des cultures de I. mentagrophytes.

En effet, la kératinase I du filtrat a une activité spécifique de 30,1 U.K./mg (36) et les kératinases II et III issues de la fraction L ont des activités spécifiques de 36,4 et 39,4 U.K./mg.

Activités Protéolytique (en U.P.) et  
Kératinolytique (en U.K.) des fractions de  
Filtrat obtenues par chromatographie  
sur DEAE-cellulose DE 32

Solution étudiée	Contenu protéique (en mg)	U. P.	U.P./mg	U.K./mg
Filtrat	19,90	1330	67	2,0
Fraction A*	3,97	503	<u>126</u>	<u>13,4</u>
Fraction B*	3,50	229	65	0,9
Fraction C*	3,12	170	54	0,9
Fraction D*	3,37	150	47	0,7
Fraction E*	5,80	209	3	1,3

\* Voir page 34

TABLEAU IV



Activités Protéolytique (en U.P.) et  
Kératinolytique (en U.K.) des fractions  
de la Fraction L obtenues par  
chromatographie sur DE 32

Solution étudiée	Contenu protéique (en mg)	U.P.	U.P./mg	U.K./mg
Fraction L	3,43	608	177	31,2
Fraction A*	0,20	208	<u>1040</u>	0
Fraction B*	0,30	71	236	96
Fraction C*	0,33	49	148	<u>226</u>
Fraction D*	0,50	165	330	61
Fraction E*	0,85	44	49	26

\* Voir page 34

TABLEAU V



Composition en acides aminés des fractions  
obtenues sur DE 32 à partir du Filtrat  
(en résidus pour 100 résidus)

	Filtrat	A	B	C	D	E
Asp	8,7	0,8	6,9	6,9	8,9	11,2
Glu	10,0	7,1	6,7	7,3	8,8	14,9
Ser	9,0	5,3	14,9	8,9	10,1	11,3
Thr	8,6	3,2	11,7	12,7	11,1	6,6
Pro	12,1	19,5	10,3	13,2	13,5	19,3
Gly	10,6	16,5	13,8	10,6	9,9	11,1
Ala	6,2	11,1	8,0	8,3	6,7	2,9
Val	6,4	6,0	4,1	5,4	6,5	5,0
Ile	2,1	2,9	2,2	2,7	2,6	1,5
Leu	3,4	4,8	2,9	5,0	3,7	1,8
Phe	1,7	0	0	2,4	1,6	0,6
Tyr	4,6	13,1	10,5	6,7	5,1	2,2
Cys/2	3,4	0	0	0,7	1,7	3,5
Met	1,3	1,5	0	1,6	1,4	0,3
His	2,4	1,8	2,4	2,3	1,6	1,7
Lys	5,9	3,2	5,7	3,0	4,6	3,8
Arg	3,7	3,1	0,1	2,3	2,4	2,3

TABLEAU VI

Composition en acides aminés des fractions obtenues sur DE 32 à partir de la Fraction L (en résidus pour 100 résidus)

	Fract. L	A	B	C	D	E	K.1* T.m.
Asp	11,3	11,4	8,7	8,4	9,6	11,3	12,9
Glu	8,2	8,2	5,0	8,9	10,0	10,9	5,0
Ser	9,3	8,2	9,8	7,3	7,1	11,3	8,2
Thr	9,5	7,9	9,5	7,8	7,3	6,2	7,6
Pro	7,8	5,9	6,4	6,3	7,0	8,4	4,5
Gly	11,4	12,5	15,7	11,0	10,9	13,9	11,0
Ala	7,8	10,2	9,9	10,9	11,0	6,9	10,5
Val	6,6	4,6	5,8	6,5	6,0	6,8	5,6
Ile	3,0	3,2	3,0	3,8	3,3	2,6	4,2
Leu	3,6	4,9	4,6	6,8	6,9	4,1	5,2
Phe	5,0	2,4	4,0	3,2	3,8	1,7	2,9
Tyr	2,2	5,2	2,0	3,4	4,4	1,9	3,9
Trp	0	0	0	0	0	0	2,0
Cys/2	2,8	0	0	0,1	0,1	2,6	1,3
Met	1,3	0	2,0	1,9	1,1	0	1,6
His	2,4	2,5	2,3	2,5	2,0	2,9	2,4
Lys	4,1	4,2	6,0	4,9	4,9	5,0	4,8
Arg	3,6	8,8	5,0	4,7	4,8	3,5	5,5

\* K.1 T. m.: kératinase 1 isolée des filtrats de Trichophyton mentagrophytes par YU et coll.(43)

TABLEAU VII



Il faut remarquer (Tableau VII) que les compositions en acides aminés de la fraction C (qui possède la plus forte activité kératinolytique) et de la kératinase de T. mentagrophytes sont voisines.

L'activité des fractions les plus actives : fraction A obtenue à partir du filtrat et fractions A et C obtenues à partir de la fraction L, n'est pas stable. Après 4 jours de conservation à + 4°C, on ne retrouve que 10 à 15 % de l'activité mesurée juste après la purification sur DEAE-cellulose.

### III - SPECIFICITE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

La détermination de la nature des liaisons peptidiques que les enzymes de K. ajelloi hydrolysent peut expliquer éventuellement son activité "kératinolytique".

Nous avons donc étudié l'action des enzymes de la fraction L non purifiée qui renferme les enzymes directement impliquées dans l'attaque du cheveu sur des protéines dont la structure primaire est connue afin de connaître le potentiel protéolytique des enzymes synthétisées par le champignon.

Nous avons donc utilisé l'histone H<sub>4</sub> (GAR-histone) du thymus de Porc dont la structure primaire a été déterminée par SAUTIERE et coll. (39) et le peptide N-terminal de la myoglobine de Boeuf obtenu après coupure au bromure de cyanogène dont la structure primaire a été déterminée par HAN et coll. (40).

L'hydrolyse enzymatique est réalisée de la façon suivante : 100 mg de substrat sont mis en solution dans 18 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,4, et on ajoute 6 ml de solution enzymatique qui, d'après dosage par la méthode de LOWRY, représentent 1 mg de protéine et on laisse incuber 2 heures à 40°C.

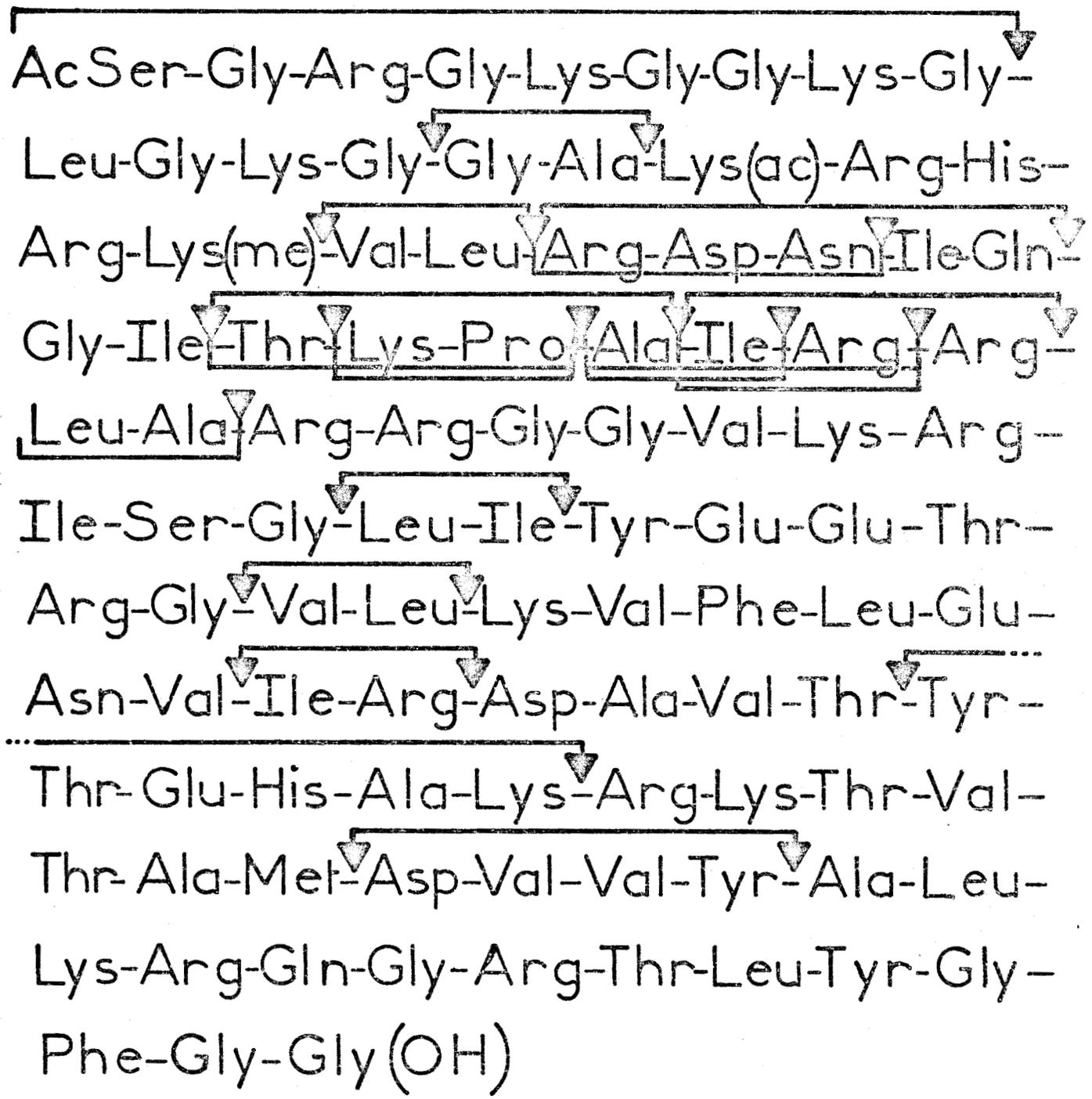
L'hydrolyse est arrêtée par addition d'acide formique en quantité suffisante pour ajuster le pH à 3. La solution est ensuite évaporée à sec puis reprise par 2 ml d'acide acétique à 20 p. 100 et cette solution de peptides est chromatographiée sur une colonne de résine "Chromobeads P" équilibrée en tampon pyridine-acide formique pH 2,9 et maintenue à 60°C.

L'élution des différents peptides est réalisée par un double gradient linéaire en molarité de pyridine allant de 0,1 M à 2 M et linéaire en pH de 2,9 à 5,0 puis par un tampon de 2 M en pyridine de pH 5,0.

Les fractions obtenues sont ensuite purifiées par électrochromatographie sur papier selon un protocole défini par SAUTIERE et coll (41). La composition en acides aminés des peptides purifiés a permis, pour le plus grand nombre d'entre eux, de les replacer dans la protéine et de déduire la nature des liaisons peptidiques rompues. Pour d'autres peptides, la détermination de l'extrémité N-terminale par la méthode de dansylation de GRAY et HARTLEY (42) a été nécessaire.

Sur les tableaux VIII et IX qui représentent les structures primaires de l'histone H<sub>4</sub> de thymus de Porc et du peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf, nous avons indiqué les points d'hydrolyse et la structure des peptides isolés. Les différentes coupures de liaisons peptidiques sont rassemblées dans le tableau X ; il apparaît que les enzymes de la fraction L sont capables de déterminer des coupures analogues à celles qui sont classiquement obtenues par la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine. Mais, de nombreuses autres liaisons peptidiques sont coupées.

# Hydrolyse de l'Histone H4 de Thymus de Porc par les enzymes de K. ajelloi

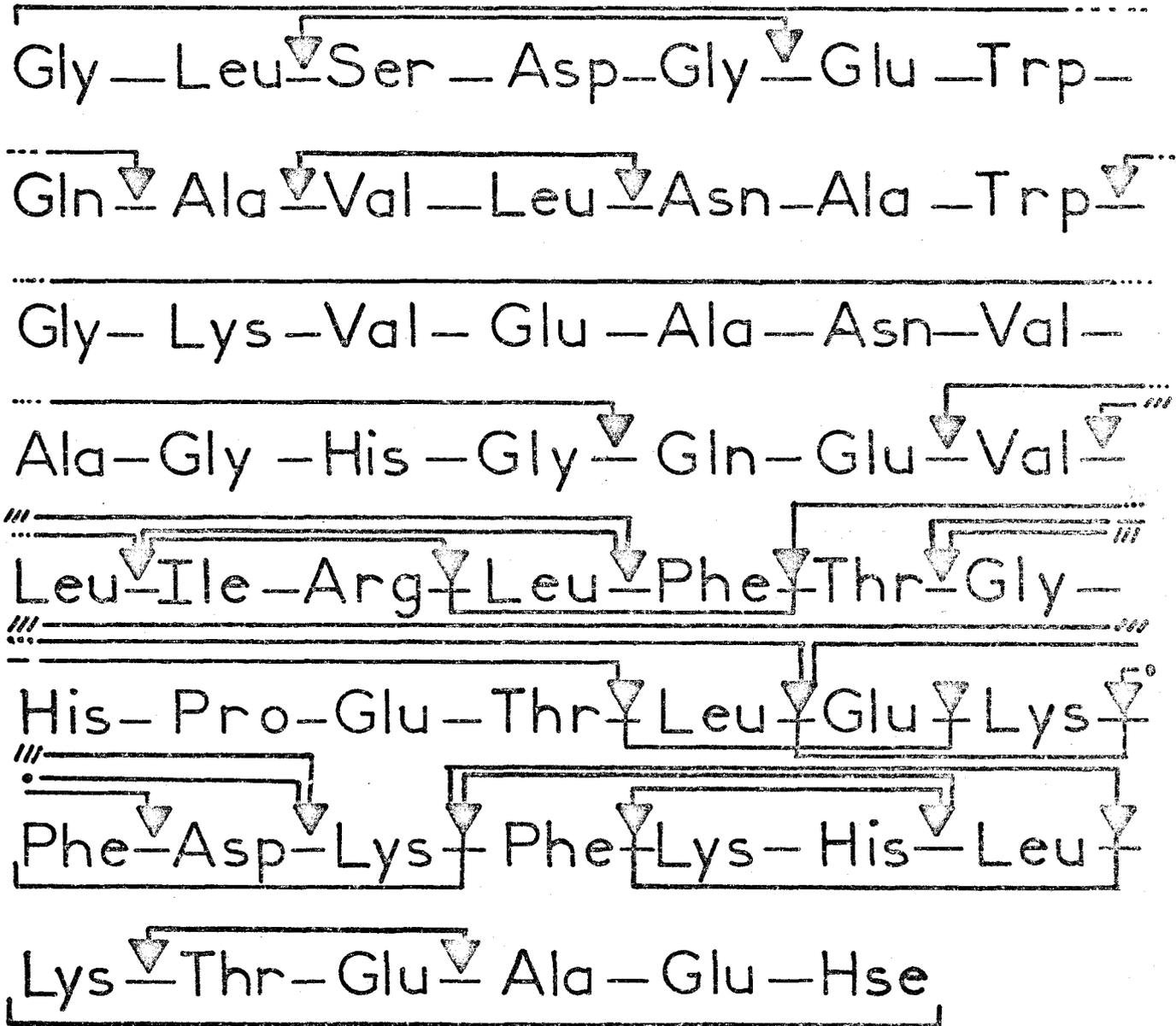


▼ Point de coupure  
 ┌ Peptide isolé



TABLEAU VIII

Hydrolyse d'un peptide N-terminal (55 AA) de Myoglobine de Boeuf par les enzymes de K. ajelloi



▼ Point de coupure

— Peptide isolé



TABLEAU IX

## LIAISONS PEPTIDIQUES COUPEES PAR LES

## ENZYMES DE K. AJELLOI

	Coupures observées sur l'histone H4 du Thymus de Porc	Coupures observées sur le peptide N-terminal de Myoglobine de Boeuf
Hydrolyse de type trypsique	Lys-(méthyl)-Val Arg-Arg Arg-Leu (*)	Arg-Leu (*) Lys-Phe Lys-Thr
Hydrolyse de type chymotrypsique	Phe-Thr Phe-Asp Phe-Lys	Tyr-Ala
Hydrolyse de type thermolytique	Gly-leu (**) Asn-Ile Ala-Ile Gly-Leu Gly-Val Val-Ile	Ala-Val (**) Glu-Val Val-Leu Leu-Ile Thr-Leu His-Leu
Autres coupures de liaisons peptidiques observées	Gly-Gly Ala-Lys (acetyl) Leu-Arg Gln-Gly Ile-Thr Pro-Ala Ile-Arg Ala-Arg Ile-Tyr Leu-Lys (*) Thr-Tyr Met-Asp	Leu-Ser    Glu-Ala Gly-Glu Gln-Ala Leu-Asn Trp-Gly Gly-Gln Leu-Phe Thr-Gly Leu-Glu Glu-Lys Asp-Lys Leu-Lys (*)

\* coupures observées sur les deux substrats

\*\* coupures observées également par YU et coll. (43) après hydrolyse de peptides synthétiques par la kératinase I extraite des cultures de Trichophyton mentagrophytes

Sur cet ensemble de résultats on peut faire les remarques suivantes :

- 1 - On observe beaucoup de coupures de liaisons peptidiques où se trouve engagé soit le groupement carboxyle, soit le groupement aminé des leucines.
- 2 - Les coupures Gly-Leu et Ala-Val que nous observons ont été aussi observées par YU et coll (43) sur des peptides synthétiques incubés en présence de la kératinase I de T. mentagrophytes

Cette kératinase qui hydrolyse de nombreuses protéines : caséine, collagène, élastine, fibrine, gélatine, hémoglobine, insuline, ovalbumine et de très nombreux peptides et amides de peptides a en outre la particularité de couper la liaison peptidique Ala-Val mais de ne pas couper Val-Ala. En fait, les enzymes de la fraction L de K. ajelloi coupent Ala (9)-Val (10) du peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf, mais ne coupent pas la liaison Val (21)-Ala (22) de ce même peptide. L'analogie constatée entre les enzymes de la fraction L de K. ajelloi et la kératine I de T. mentagrophytes au sujet de la composition en acides aminés (tableau VII) se retrouve aussi au niveau de certaines spécificités de coupures.

Par ailleurs, les enzymes de la fraction L libèrent, à partir de l'histone H<sub>4</sub> ou du peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf, les acides aminés suivants à l'état libre : valine, isoleucine, phénylalanine, arginine et surtout tyrosine et leucine. Ces mêmes acides aminés se retrouvent aussi à l'état libre lorsque l'on incube du cheveu en présence des enzymes de K. ajelloi. Le grand nombre de coupures observées d'une part et le fait que l'hydrolyse va jusqu'au stade des acides aminés nous fait supposer la co-existence dans les cultures du champignon d'activités endopeptidasiques et d'activités exopeptidasiques. Nous avons donc axé nos travaux vers la mise en évidence, avec des substrats de synthèse, d'activités exopeptidasiques.

CHAPITRE V

ACTIVITE EXOPEPTIDASIQUE DES EXTRAITS

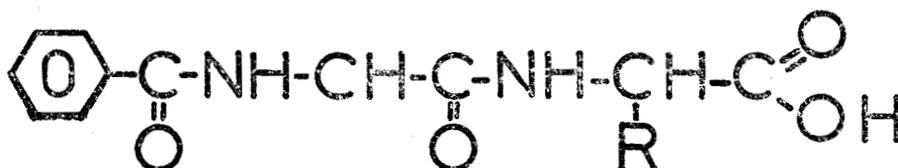
DE CULTURE

## I - MISE EN EVIDENCE

La recherche d'activités exopeptidasiques a été réalisée en utilisant des substrats synthétiques dont on peut suivre l'hydrolyse par la mesure de la densité optique de l'un des produits formés.

### 1°) Recherche d'activité carboxypeptidasique avec les hippuryl-amino-acides

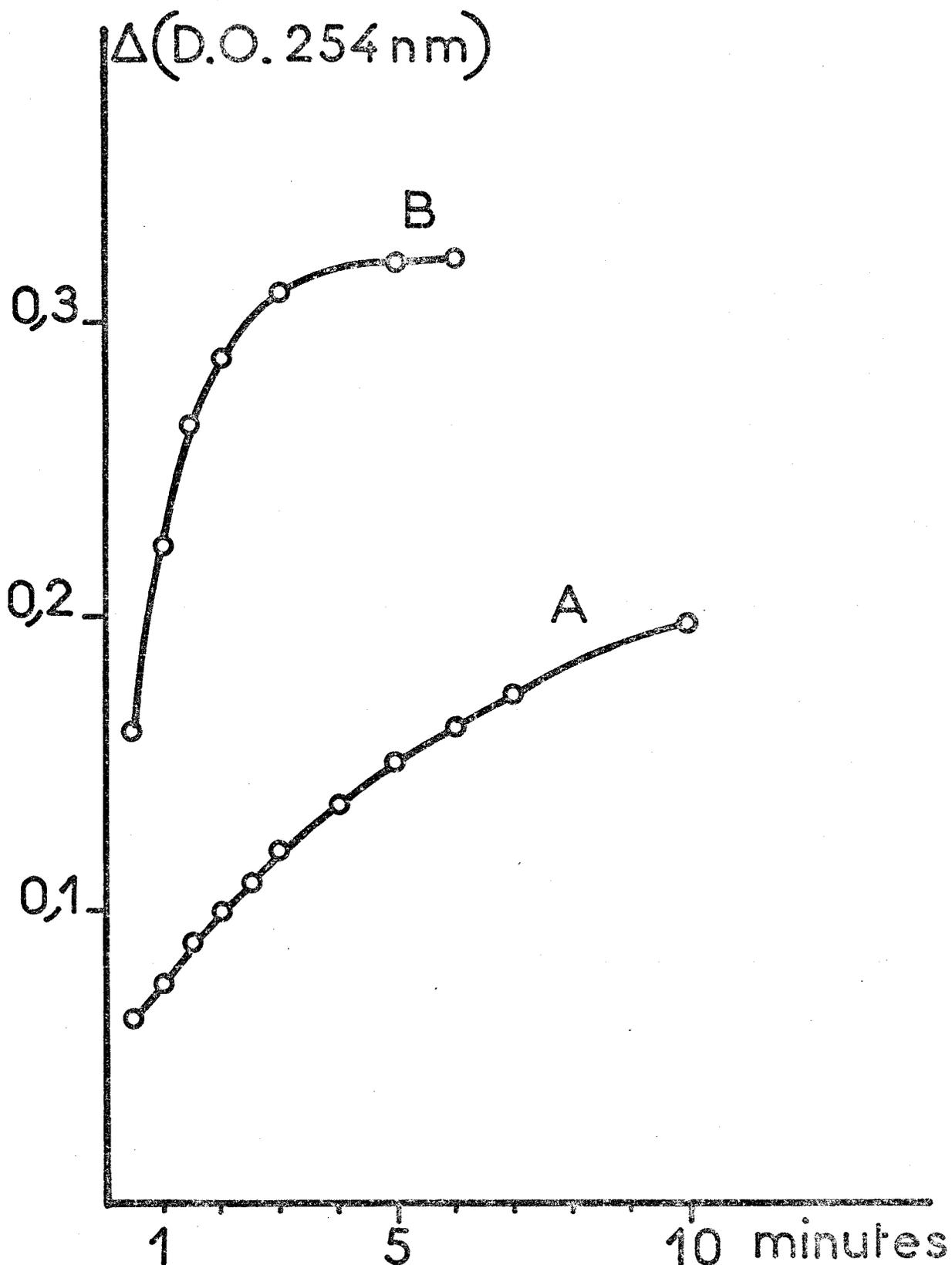
Les hippuryl-amino-acides sont des composés où le groupement aminé de l'amino-acide est amidifié par le groupement carboxyle de l'acide hippurique (ou benzoyl glycolle). Leur formule développée peut s'écrire :



La carboxypeptidase A (CPA) hydrolyse la N-hippuryl-L-phénylalanine en phénylalanine et acide hippurique qui absorbe à 254 nm (44). La carboxypeptidase B (CPB) hydrolyse la N-hippuryl-L-arginine en arginine et acide hippurique (45).

La courbe A de la figure 14 représente l'augmentation de la D.O. à 254 nm résultant de l'action à 23°C de 50 µl de CPA Worthington à 1,5 unités par mg sur 2 ml d'hippuryl-phénylalanine en concentration m Molaire dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (1 unité est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µ mole de substrat par minute).

La courbe B de la même figure 14 correspond à l'action de 20 µl de CPB Merck à 150 unités/mg sur 2 ml d'hippuryl-arginine en concentration m Molaire dans le même tampon.



Hydrolyse d'hippuryl-AA

Courbe A: Hipp.-Phe par CPA

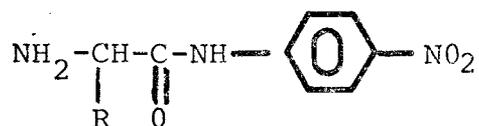
Courbe B: Hipp.-Arg par CPB

Figure 14

On observe dans les conditions utilisées une inactivation rapide des carboxypeptidases qui est totale pour la CPB après 4 minutes d'incubation. Cette inactivation est sans doute due à l'action des produits d'hydrolyse qui renferment des groupements -COOH connus pour inhiber les carboxypeptidases (46). Les extraits de K. ajelloi : filtrat et fraction L incubés en présence d'hippuryl-phénylalanine ou d'hippuryl-arginine ne provoquent pas d'augmentation de la D.O. à 254 nm et apparaissent donc dépourvus d'activité carboxypeptidasique A et B.

2°) Recherche d'activité aminopeptidasique avec les para-nitro-anilides d'acides-amino

Les p-nitro-anilides sont des composés dans lesquels le groupement carboxyle de l'acide-amino est amidifié par le groupement amine de la p-nitroaniline. Leur formule développée peut s'écrire :



ERLANGER et coll. (47) ont montré que de tels composés pouvaient être des substrats pour les aminopeptidases dont l'action entraîne la libération de la p-nitroaniline, produit jaune absorbant fortement à 405 nm ( $\epsilon_M^{405} = 10\ 000$  litre x Mole<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>).

Les filtrats de culture comme les solutions L hydrolysent très rapidement la L-leucine-p-nitroanilide (Leu-p-NA).

L'utilisation de ce substrat nous a permis de suivre les essais que nous avons entrepris dans le but de purifier les aminopeptidases de K. ajelloi. L'activité aminopeptidasique des différentes solutions est mesurée en unités aminopeptidasiques. Une unité aminopeptidasique (U.A.) correspond à l'activité qui libère 1  $\mu$  mole de p-nitroaniline par minute.

L'activité aminopeptidasique spécifique est l'activité d'une solution enzymatique contenant 1 mg de protéine. Elle s'exprime en U.A./mg. L'activité aminopeptidasique des différentes solutions actives est mesurée de la façon suivante :

à  $x \mu\text{l}$  de la solution essayée, on ajoute  $(2\ 300 - x) \mu\text{l}$  de solution tampon de pH choisi et  $200 \mu\text{l}$  de Leu-p-NA 16 m Molaire en solution dans un mélange diméthyl formamide/eau (1/2 vol./vol.) (voir appendice technique).

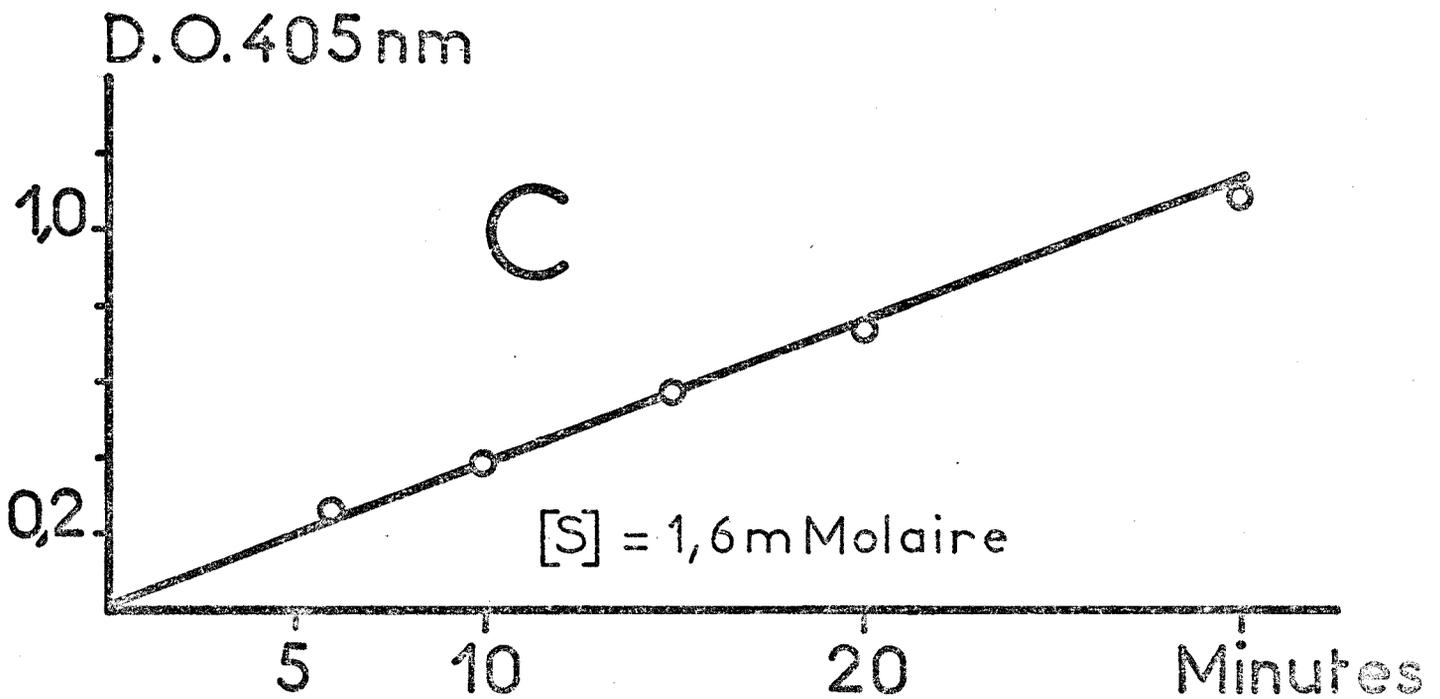
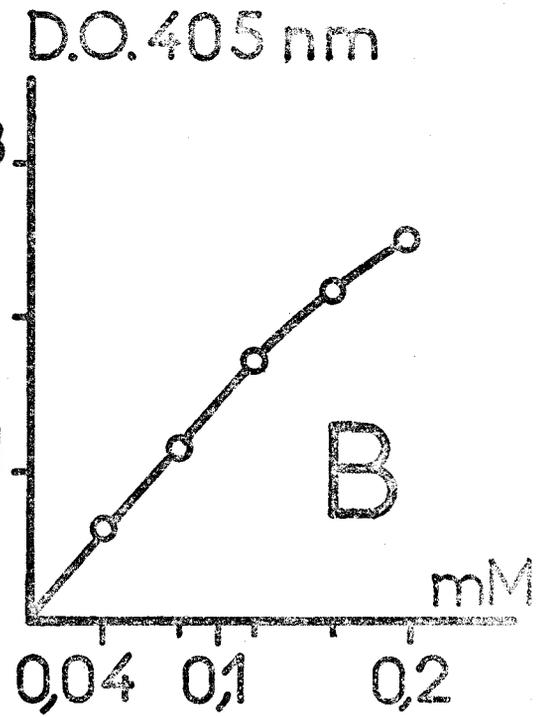
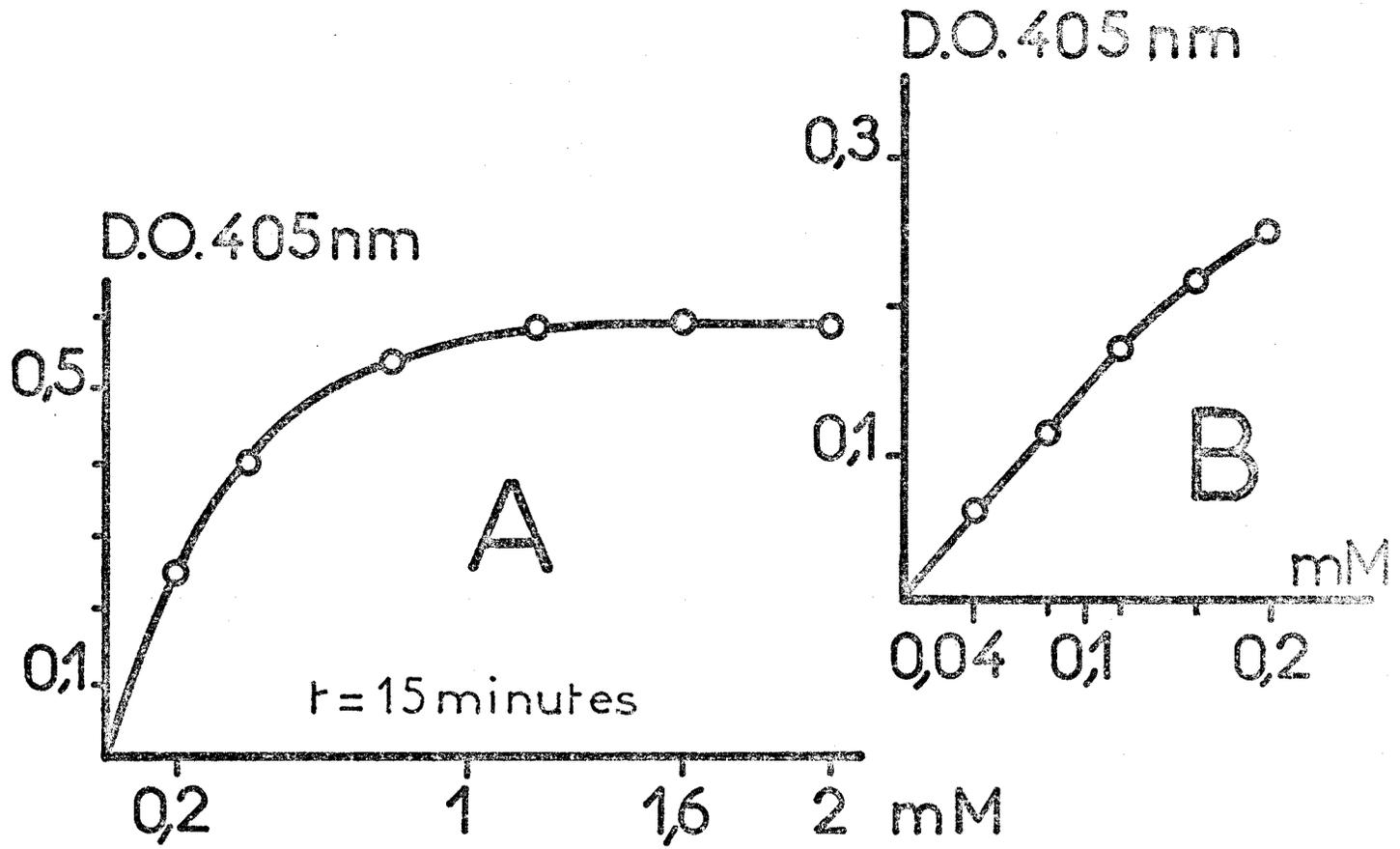
Après 15 minutes d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ , la réaction est arrêtée par addition de  $500 \mu\text{l}$  d'acide acétique à 20 %. La D.O. à 405 nm, corrigée de celle du tube témoin (sans enzyme) est convertie en unités aminopeptidasiques U.A. par la relation numérique suivante :

$$\text{Nombre de U.A.} = \frac{0,30 \times \text{D.O. à } 405 \text{ nm}}{\text{nombre de minutes}}$$

relation qui peut s'écrire, dans le cas d'une incubation de 15 minutes

$$\text{Nombre de U.A.} = 0,02 \times \text{D.O. à } 405 \text{ nm.}$$

La figure 15 qui représente les variations de l'activité Leu-p-NA en fonction de la concentration en Leu-p-NA d'une part (courbes A et B) et du temps d'incubation d'autre part (courbe C) montre que les conditions utilisées pour la mesure de l'activité des différentes préparations enzymatiques sont justifiées. En effet, on observe sur la courbe A que la saturation en substrat est atteinte pour une concentration finale de 1,2 m Molaire alors que toutes les mesures sont faites à une concentration finale en substrat de 1,28 m Molaire.



Activité aminopeptidasique des filtrats de culture à 30°C, en tampon borate de pH 9,35

1°) En fonction de  $[S]$  (courbes A et B)

2°) En fonction du temps (courbe C)



Figure 15

Par ailleurs, la courbe C indique que le temps de 15 minutes que nous avons retenu pour nos mesures se situe dans la partie linéaire de la courbe : activité = f(t)

Le tableau XI donne, à titre d'exemple les valeurs d'activité aminopeptidasique spécifique d'un filtrat de culture, d'une solution L et de quelques enzymes commerciales. Les valeurs qu'il renferme situent l'activité aminopeptidasique spécifique des sécrétions de K. ajelloi au niveau de celle de la pronase E (MERCK) de Streptomyces griseus ; au dessus de celle de la L.A.P. de rein de Porc et nettement en dessous de l'aminopeptidase K (MERCK) de Tritirachium album

## II - ESSAIS DE PURIFICATION DES AMINOPEPTIDASES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La chromatographie d'affinité apparaît, à priori, une méthode de choix pour isoler dans un mélange une protéine telle qu'une enzyme qui, par sa nature possède une affinité très sélective vis à vis d'un substrat ou d'un inhibiteur.

### 1) Avec la D-leucine HMDA Sepharose

L'hydrolyse du substrat Leu-p-NA indique une "reconnaissance" de la leucine par les aminopeptidases de K. ajelloi. Nous avons donc pensé à purifier les aminopeptidases en fixant la leucine par son groupe carboxyle sur une matrice insoluble portant des groupes  $-NH_2$ .

Nous avons utilisé la D-leucine susceptible d'être "reconnue", mais dont la liaison amide avec la matrice insoluble ne devrait pas être hydrolysée. Comme matrice insoluble, nous avons utilisé l'hexaméthylène-Sépharose 4B (HMDA-Sépharose) que nous avons fabriquée à partir de Sépharose 4 B et d'héxaméthylène diamine selon une technique décrite par CUATRECASAS (48) (voir appendice technique).

ACTIVITES AMINOPEPTIDASIQVES SPECIFIQUES

Les mesures sont faites en tampon borate-KCl  
de pH 9,3 ; Incubation de 15 minutes à 30°C.

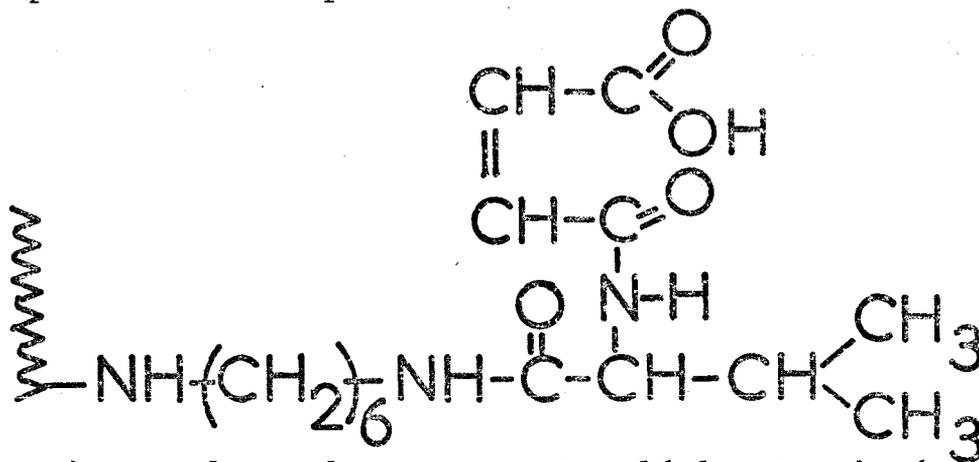
Produit essayé	Activité spécifique en m U.A./mg
Filtrat (1)	1 900
Solution L (1)	2 600
Pronase (2)	1 614
Trypsine (3)	0
Thermolysine (4)	8
Protéinase K (5)	25
Aminopeptidase K (6)	19 680
L.A.P. rein de Porc (7)	946
Aminopeptidase M (8)	126

- (1) Culture de 16 jours (les conditions de culture et de préparation de la solution L sont décrites dans l'appendice technique)
- (2) Pronase E de Streptomyces griseus (MERCK)
- (3) Trypsine CALBIOCHEM
- (4) Thermolysine cristallisée (MERCK)
- (5) Protéinase K de Tritirachium album (BOEHRINGER)
- (6) Aminopeptidase K de Tritirachium album (MERCK) à 12 000 m U.A./mg à pH 8,0 (sur Leu-p-NA)
- (7) Leucine aminopeptidase de rein de Porc type IV (SIGMA) à 6 600 m U.A./mg à pH 7,2 (sur Leu-p-NA)
- (8) Aminopeptidase M du pancréas (MERCK) à 1 600 m U.A./mg à pH 7,0 (sur Leu-p-NA)

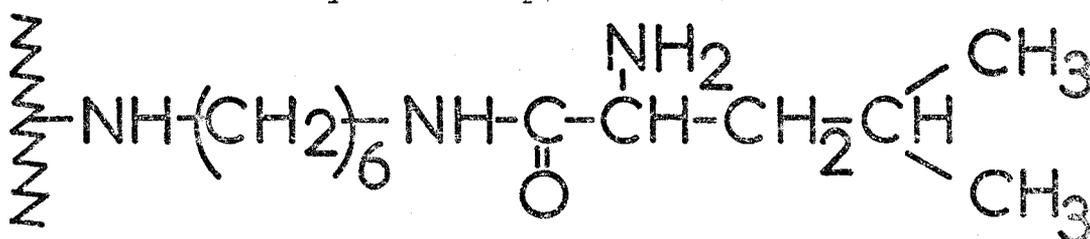
TABLEAU XI

Le couplage D-leucine-HMDA-Sépharose a été réalisé par une carbodiimide R-N=C=N-R' selon une méthode introduite par SHEEHAN et HESS (49) après blocage du groupe -NH<sub>2</sub> par l'anhydride maléique (50) afin d'éviter la synthèse de poly-D-leucine (voir appendice technique). Les carbodiimides les plus utilisées sont : la N-éthyl,N' (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide qui est hydrosoluble et la dicyclohexylcarbodiimide qui est soluble en milieu organique mais qui peut être utilisée par exemple dans un milieu eau/dioxane (1/1).

Le meilleur résultat, en quantité de D-leucine fixée pour un ml de gel, a été obtenu en faisant réagir pendant 24 heures à + 4°C la N-maléyl-D-leucine et la HMDA-Sépharose dans un mélange composé en parties égales d'eau et de dioxane en présence de dicyclohexylcarbodiimide à pH 5. Le produit obtenu peut s'écrire :



Après couplage, le groupement maléyl est enlevé par déblocage spontané à pH 3,5 et à 37°C pendant 2 heures ; on obtient ainsi la D-leucyl-HMDA-Sépharose.



qui sera utilisée pour essayer de purifier les aminopeptidases.

Une partie du gel obtenu est soumise à une hydrolyse acide par HCl 5,6 N pendant 24 heures à 105°C. Le contenu en amino-acides de l'hydrolysate évaporé à sec, repris par du tampon citrate 0,2 M pH 2,2 et filtré est déterminé en utilisant un analyseur automatique BECKMAN de type MULTICHROM.

On a trouvé ainsi que un ml de gel transformé contient 10 nanomoles de D-leucine. Ce faible rendement en fixation peut s'expliquer par le déblocage d'une partie de la maléyl-D-leucine et par la formation de poly-D-leucine au détriment du couplage de la maléyl-D-leucine sur la HMDA-Sépharose.

Néanmoins, si on admet qu'une mole de D-leucine fixée sur le gel peut retenir une mole d'enzyme, un ml de gel pourrait retenir 200  $\mu$ g d'une aminopeptidase de masse moléculaire de 20 000 daltons. Or expérimentalement nous avons constaté que ce gel de D-leu-HMDA-Sépharose ne retient pas les aminopeptidases de K. ajelloi, la configuration D de la leucine doit jouer un rôle important dans ce résultat.

## 2) Avec la méthyl-L-leucine fixée sur Sépharose -SH

Une fixation de L-leucine analogue à celle utilisée pour la D-leucine ne peut en principe être utilisée car la liaison amide entre la L-leucine et la partie HMDA-Sépharose serait coupée par les aminopeptidases puisque ces enzymes coupent la liaison amide du Leu-p-NA. Il convient donc d'attacher le radical L-leucyl par un autre type de liaison qui ne sera pas coupé par les aminopeptidases.

Nous avons choisi de transformer la L-leucine en chloro-méthyl-L-leucine selon une technique décrite par BIRCH et coll. (51)

---

La synthèse de la chloro-méthyl-L-leucine à partir de t-butyloxycarbonyl-L-leucine et de diazo méthane a été réalisée par KOKEL dans le service du Professeur Charles LESPAGNOL (U.E.R. de Pharmacie, rue du Pr LAGUESSE à Lille).

Nous avons couplé cette chlorométhyl-L-leucine sur du SH-Sépharose que nous avons préparé à partir de HMDA-Sépharose et de N-acétyl-homocystéinethiolactone selon une technique décrite par CUATRECASAS (48) (voir appendice technique). On obtient ainsi un gel modifié sur lequel le radical leucyl est fixé à l'agarose par l'intermédiaire d'un bras à 13 atomes (tableau XII).

La capacité de ce gel à retenir l'activité aminopeptidasique est essayée de la façon suivante : une petite colonne de gel (1 cm de diamètre x 8 cm de hauteur) est équilibrée dans du tampon phosphate 0,025 M pH 7,4 ; après dépôt d'un volume de 10 ml de filtrat de culture, la colonne est rincée par le tampon phosphate 0,025 M de pH 7,4. Le matériel fixé est ensuite élué par NaCl 0,5 M dans le même tampon. On observe que la majeure partie du matériel protéique et de l'activité enzymatique n'est pas fixée sur la colonne. Cependant, la fraction éluee par NaCl 0,5 M dans le tampon a une activité aminopeptidasique spécifique 7 à 8 fois plus élevée que celle du filtrat de départ et une activité kératinolytique spécifique 7 fois supérieure à celle du filtrat de départ.

Par ailleurs, on observe que la fraction non fixée a une activité protéolytique spécifique supérieure à celle du filtrat de départ (Tableau XIII). Ceci peut s'expliquer par une "re-conformation" des enzymes lors du passage sur la colonne de S-méthyl-L-leucyl-Sépharose.

### 3) Avec la HMDA-Sépharose

L'hexaméthylène diamine Sépharose 4B a été utilisée par VOSBECK et coll. (52) pour isoler la trypsine contenue dans la pronase de Streptomyces griseus.



CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR

S-METHYL-L-LEUCYL-SEPHAROSE

	Protéines totales (en $\mu$ g)	activité aminopepti- dasique spé- cifique (en m U.A./mg)	activité protéolyti- que spéci- que (en U.P/mg) *	activité kératinoly- tique spé- cifique (en U.K./mg) *
Filtrat brut	660	120	140	12
Matériel non fixé	546	200	208	10
Matériel élué par NaCl 0,5 M	42	<u>670</u>	24	<u>91</u>

(\*) pour la définition des unités U.P./mg et U.K./mg voir chapitre IV - paragraphe I.

TABLEAU XIII



Ces auteurs ont constaté que ce gel retenait également deux composants ayant une activité aminopeptidasique. Nous avons donc finalement essayé la HMDA-Sépharose non modifiée que nous avons préparée soit selon CUATRECASAS (48) soit selon MARCH et coll. (53) (voir appendice technique).

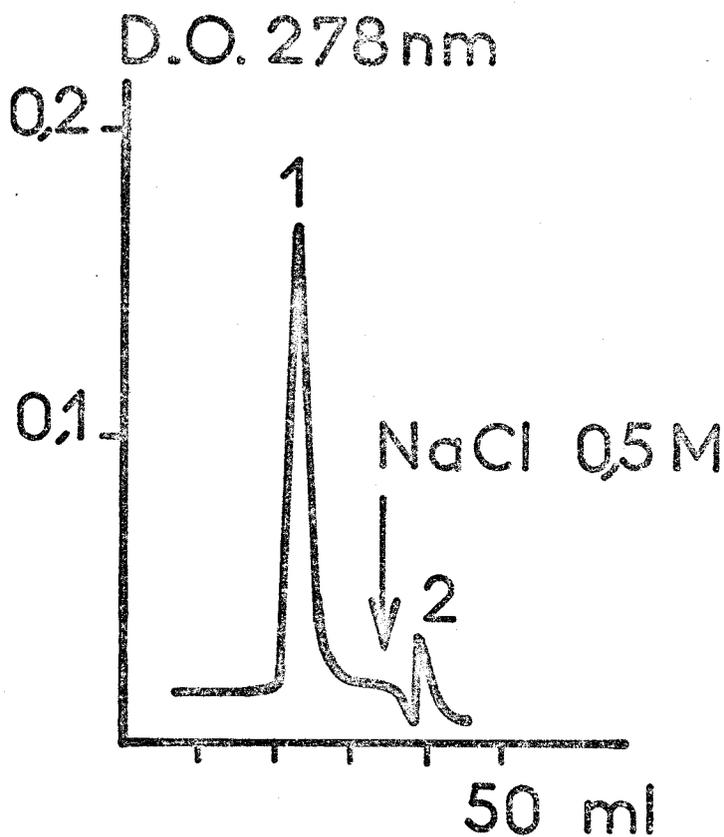
Ce support a nettement plus d'affinité pour les aminopeptidases que les 2 autres synthétisés l'un à partir de la N-maléyl-D-leucine, l'autre à partir de la chlorométhyl-L-leucine. Cette observation s'explique facilement si l'on considère qu'en réalité seule la structure HMDA est de nature à retenir les aminopeptidases dans les conditions utilisées.

Le même mode opératoire que celui décrit précédemment pour la S-méthyl-L-leucyl-HMDA-Sépharose donne une purification nettement supérieure (Figure 16).

La fraction non retenue est évidemment très hétérogène et contient la plupart des constituants protéiques qui existent dans le filtrat. La fraction éluee par NaCl 0,5 M a une activité spécifique de 6,6 U.A./mg le degré de purification est de 11 et le rendement en activité est de 97 %.

Cette fraction est également hétérogène en électrophorèse sur polyacrylamide (Figure 17) mais le nombre de fractions est nettement diminué.

Lorsque la migration s'effectue dans un gel de polyacrylamide à 12 % sous une tension de 10 volts/cm pendant 2 heures, la révélation avec Leu-p-NA (voir appendice technique) permet de visualiser deux aminopeptidases dont les vitesses de migration par rapport à celle d'un marqueur de migration, le bleu de bromophénol, sont de 0,6 et 0,7. Nous les désignerons dans la suite du texte respectivement par AP<sub>1</sub> (aminopeptidase 1) et AP<sub>2</sub> (aminopeptidase 2).



	Filtrat	Pic 1	Pic 2
Protéines en µg	494	215	40
Act. spéc. en U.A./mg	0,6	0,1	6,6
Rdt : 97 %	Purification: 11		

Chromatographie d'affinité d'un Filtrat  
sur HMDA\_Sépharose



Figure 16



Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12 % à pH 8,6 d'un filtrat de culture (F) et des fractions obtenues par chromatographie sur HMDA-Sépharose à partir de ce filtrat : fraction non retenue (NR) et fraction éluée par NaCl 0,5 M (E).

L'électrophorèse est réalisée dans le système de DAVIS (54) avec un appareillage et une technologie décrits par KERCKAERT (55).

FIGURE 17

Cette différence de migration nous est apparue suffisante pour que nous tentions d'intégrer une étape d'électrophorèse préparative dans notre protocole de purification.

### III - PROTOCOLE DE PURIFICATION DE AP<sub>1</sub> ET DE AP<sub>2</sub>

En effet, la meilleure purification de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub> a été obtenue en utilisant successivement la chromatographie d'affinité sur HMDA-Sépharose, l'électrophorèse préparative sur polyacrylamide et la gel-filtration sur Séphadex G 100.

#### 1) Première étape : chromatographie d'affinité.

Cette étape est réalisée comme suit : sur une colonne de HMDA-Sépharose (1,5 x 20 cm) équilibrée dans du tampon phosphate 0,025 M de pH 7,4 et maintenue à + 6°C, on dépose 200 ml de filtrat de culture. Après pénétration de cette solution et rinçage par le tampon d'équilibre, les aminopeptidases qui sont retenues sur la colonne dans ces conditions sont éluées par NaCl 0,5 M dans le tampon phosphate 0,025 M pH 7,4.

#### 2) Seconde étape : Electrophorèse préparative

La fraction active est ensuite concentrée par ultrafiltration sur membrane Diaflo UM 10, puis soumise à l'électrophorèse préparative sur un gel de polyacrylamide à 12 % sous une tension de 8 volts/cm pendant 6 heures (Technique de KERCKAERT - voir appendice technique).

Les bandes actives correspondant à AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> sont mises dans du tampon phosphate 0,025 M pH 7,4 de concentration 1 M en NaCl et broyées pendant 2 minutes à 15 000 tours par minute dans un "WARING BLENDOR". Le gel est ensuite éliminé par passage de l'homogénat au travers d'un filtre Millipore 0,45 µ.

### Troisième étape : Filtration sur gel de Séphadex G 100

Afin d'éliminer d'éventuels contaminants tels que produits d'autolyse ou particules de gel de taille inférieure à  $0,45 \mu$ ; les préparatives de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> issues de l'électrophorèse préparative sont soumises à une chromatographie de gel filtration sur Séphadex G 100 ( $40-120 \mu$ ).

La colonne utilisée (2,5 x 50 cm) est équilibrée et éluée par du tampon phosphate 0,025 M pH 7,4 de concentration 0,15 M en NaCl. La filtration est faite à 6°C sous une pression de 60 cm d'eau. Ce protocole en 3 étapes nous a permis d'obtenir l'aminopeptidase AP<sub>1</sub> avec un rendement de 16 % et un taux de purification de 50 et l'aminopeptidase AP<sub>2</sub> avec un rendement de 42 % et un taux de purification de 78 (Tableau XIV).

Les activités spécifiques au pH optimum de 9,35 et à 30°C sont de 95 U.A./mg pour AP<sub>1</sub> et de 148 U.A./mg pour AP<sub>2</sub>, c'est-à-dire nettement au dessus de celle de la L.A.P. de rein de Porc type IV SIGMA (4 à 8 U.A./mg) et celles de deux aminopeptidases de Tineola bisselliella (56) qui sont de 1,4 et 6,8 U.A./mg. Elles sont par contre inférieures à celles d'une aminopeptidase isolée de Penicillium roqueforti (57), laquelle est de 461 U.A./mg.

#### IV - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE AP<sub>1</sub> ET AP<sub>2</sub>

##### 1) Homogénéité

Les aminopeptidases AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> se caractérisent en électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide à 12 % et à pH 8,6 par une seule bande active sur le Leu-p-NA, correspond à la seule bande importante de protéine révélée par le bleu de Coomassie (Figure 18).

Par ailleurs, le profil d'activité Leu-p-NA obtenu après gel filtration sur Séphadex G 100 est constitué d'un seul pic symétrique (Figure 19).

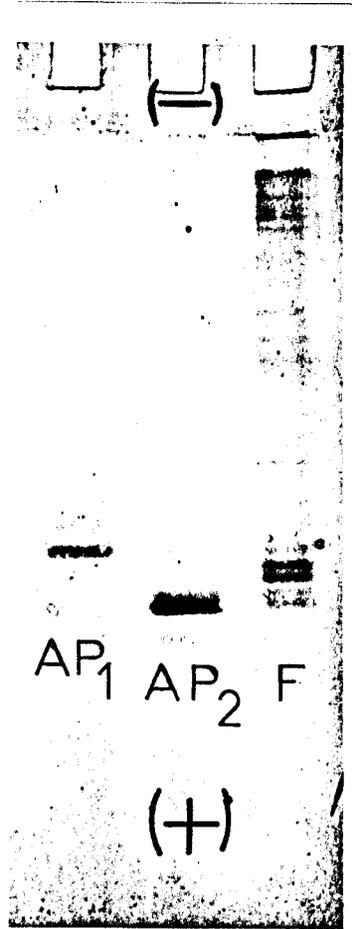
# Purification des aminopeptidases de *K.ajelloi*

	Activité totale	Protéines en µg	Activité spécifique	Rdt en%	Purification
Filtrat de culture concentré sur UM10	22.6	11890	1.9	100	1
HMDA Sepharose	19.7	2460	8.0	87	4.2
Electrophorèse AP <sub>1</sub>	3.8	98	38	16	20.4
Préparative AP <sub>2</sub>	14.5	156	93	64	49
Gel filtration de AP <sub>1</sub> sur G100	3.7	39	95	16	50
Gel filtration de AP <sub>2</sub> sur G100	9.5	64	148	42	78



TABLEAU XIV

Les valeurs du tableau correspondent à 1 litre de filtrat



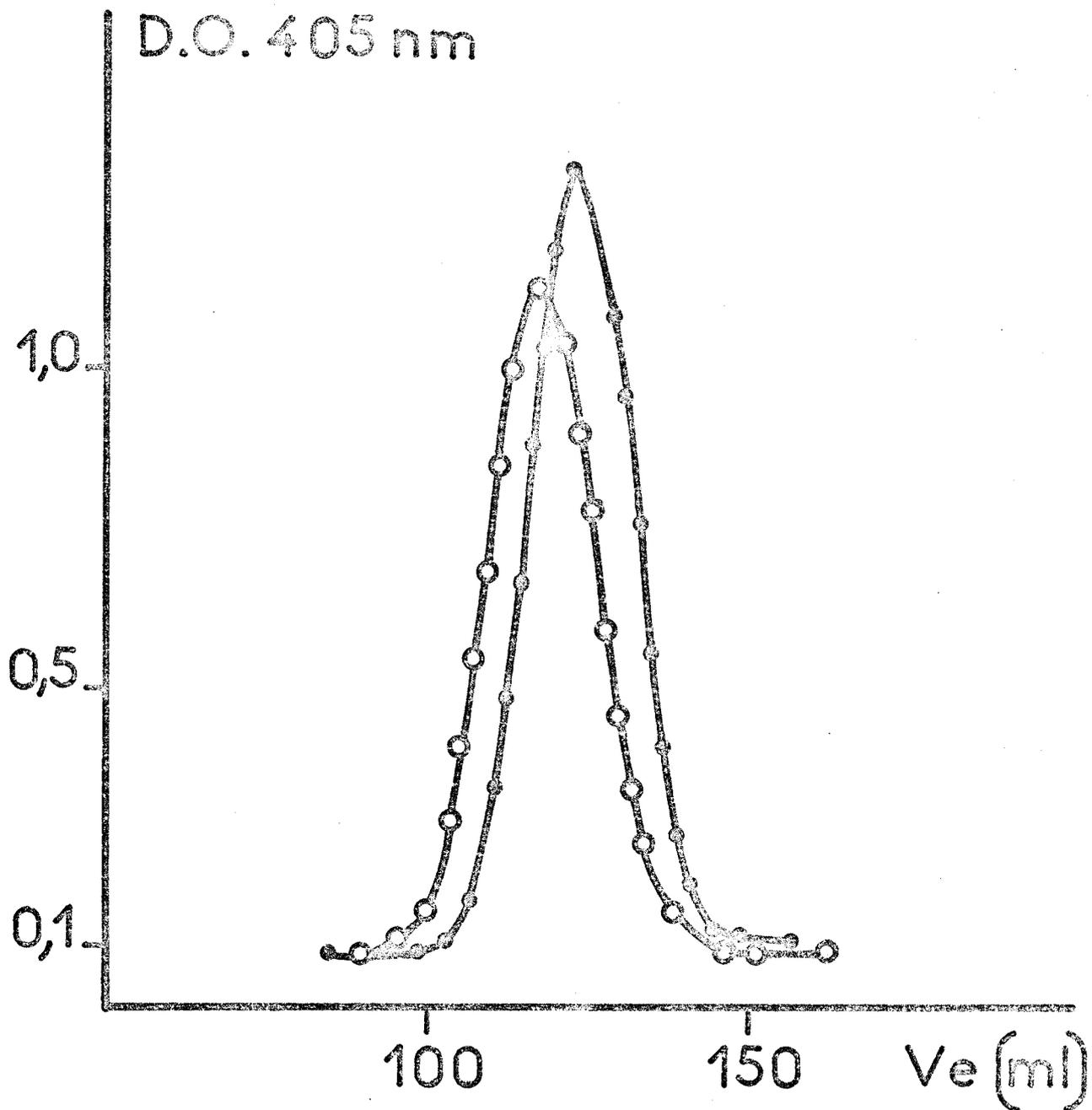
Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12 %, à pH 8,6 du filtrat brut (F), de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub>.

Les bandes de l'électrophorégramme correspondent aux protéines colorées au bleu de Coomassie.

Les petits trous indiquent la position de l'activité aminopeptidasique révélée avec le Leu-p-NA avant coloration des protéines.

Figure 18





Profil d'activité Leu<sub>p</sub>-NA en gel filtration sur Sephadex G 100 des aminopeptidases AP<sub>1</sub> ○—○ et AP<sub>2</sub> ●—●

Figure 19

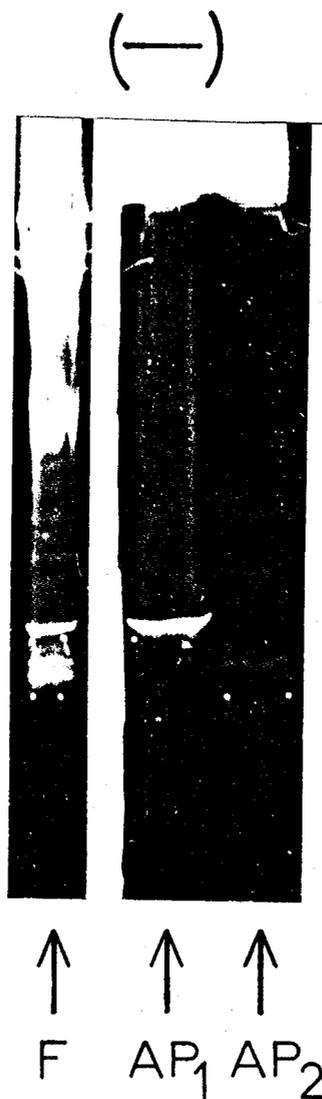


Cependant, on peut observer sur l'électrophorégramme de la figure 18, en plus de la bande majeure correspondant à l'aminopeptidase, d'autres bandes, certes très mineures, mais dont la présence est indiscutable.

Ces bandes correspondent soit à l'hydrolyse des aminopeptidases par des endopeptidases, car les préparations les plus pures d'aminopeptidases ont encore une légère activité sur la caséine ; soit à l'autolyse des aminopeptidases, soit encore aux endopeptidases elles-mêmes.

L'activité "caséinolytique" n'est pas le fait des aminopeptidases comme le montre l'électrophorèse réalisée sur un gel de polyacrylamide contenant de la caséine (Figure 20) selon une technique décrite par KAMINSKI et BUSHUK (voir appendice technique).

Il apparaît clairement sur le gel que l'activité sur le Leu-p-NA et l'activité sur la caséine se situent à des endroits différents du gel. On peut remarquer en outre que l'activité caséinolytique des préparations de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub> est très faible par rapport à celle du filtrat brut.



Electrophorèse selon KAMINSKI d'un filtrat brut (F) d'une préparation de AP<sub>1</sub> et d'une préparation de AP<sub>2</sub>.

Les zones blanches correspondent à l'activité caséinolytique.  
Les points blancs correspondent à l'activité aminopeptidasique révélée avec le Leu-p-NA avant que ne soit révélée l'activité caséinolytique.



Figure 20

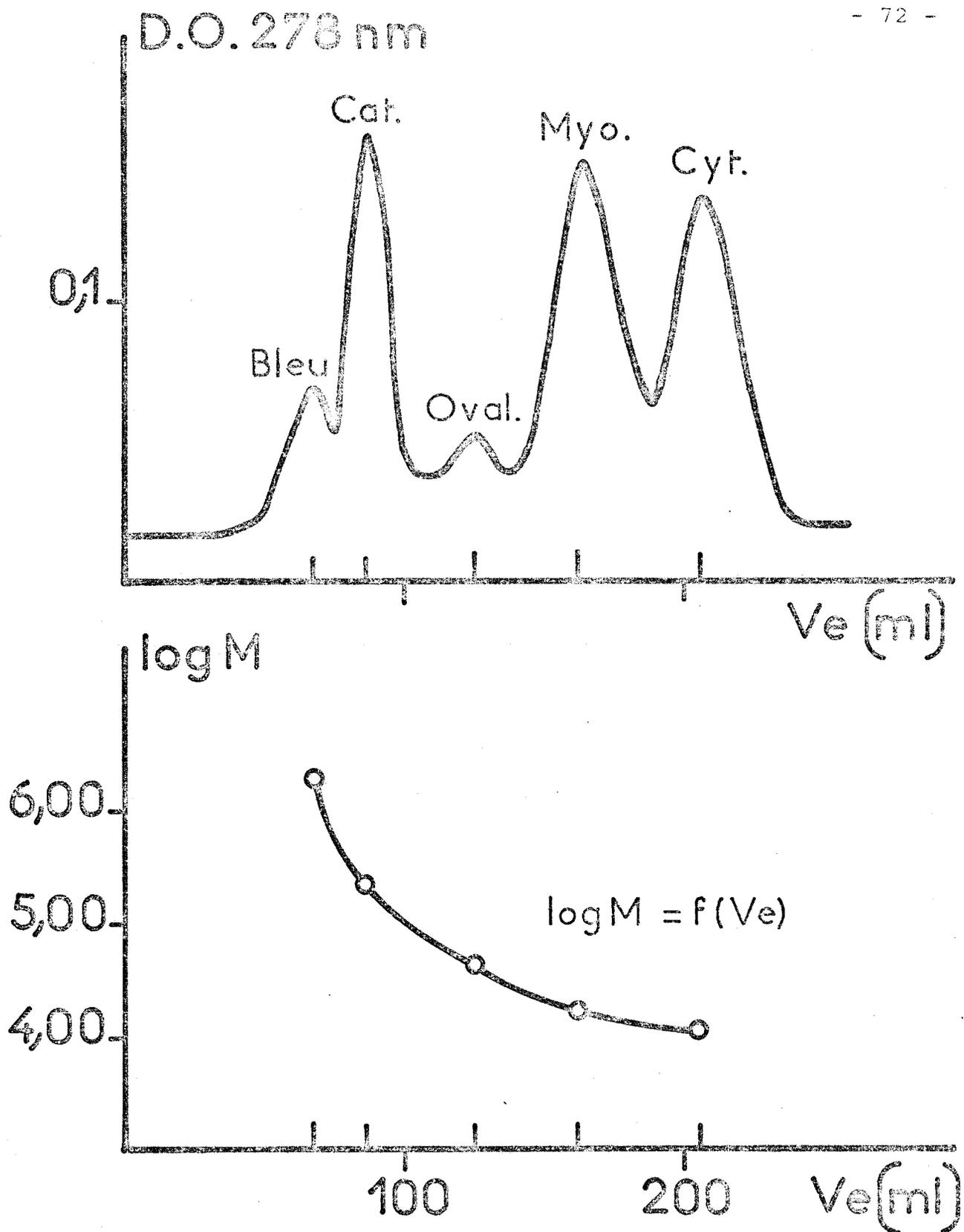
## 2°) Masse moléculaire

La masse moléculaire a été déterminée par deux techniques différentes : gel filtration d'une part et électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS d'autre part.

a - Gel filtration (58). la gel filtration est réalisée à + 6°C sur une colonne de Séphadex G 100 dont la taille des grains varie de 40 à 120 $\mu$  (2,5 cm de diamètre et 50 cm de hauteur) sous une pression hydrostatique de 60 cm d'eau. L'éluat de la colonne est recueilli dans un collecteur muni d'un système compte-gouttes : ce qui permet une évaluation simple du volume d'éluat  $V_e$  (le volume de la goutte est constant puisque la pression est constante). La colonne est calibrée avec un mélange constitué de bleu dextran 2 000 ( $M = 2\ 000\ 000$ ) et de plusieurs protéines de masse moléculaire connue : catalase ( $M = 240\ 000$ ), ovalbumine ( $M = 45\ 000$ ), myoglobine ( $M = 17\ 800$ ), cytochrome C ( $M = 12\ 400$ ). Dans ces conditions on peut donc construire la courbe  $\log M = f(V_e)$  (Figure 21).

Le volume d'éluat des aminopeptidases est déterminé en traçant la courbe : activité Leu-p-NA en fonction du volume d'éluat (voir Figure 19). La masse moléculaire obtenue par interpolation sur la courbe  $\log M = f(V_e)$  est de 27 500 pour  $AP_1$  et de 21 700 pour  $AP_2$ .

b - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS : la masse moléculaire a été également déterminée sur gel de polyacrylamide à 12 % contenant 0,1 % de SDS. les échantillons sont mis en contact pendant 15 heures à 22°C dans une solution qui contient 5 % de SDS ; 2 % de 2-mercaptoéthanol et 10 % de glycérol.



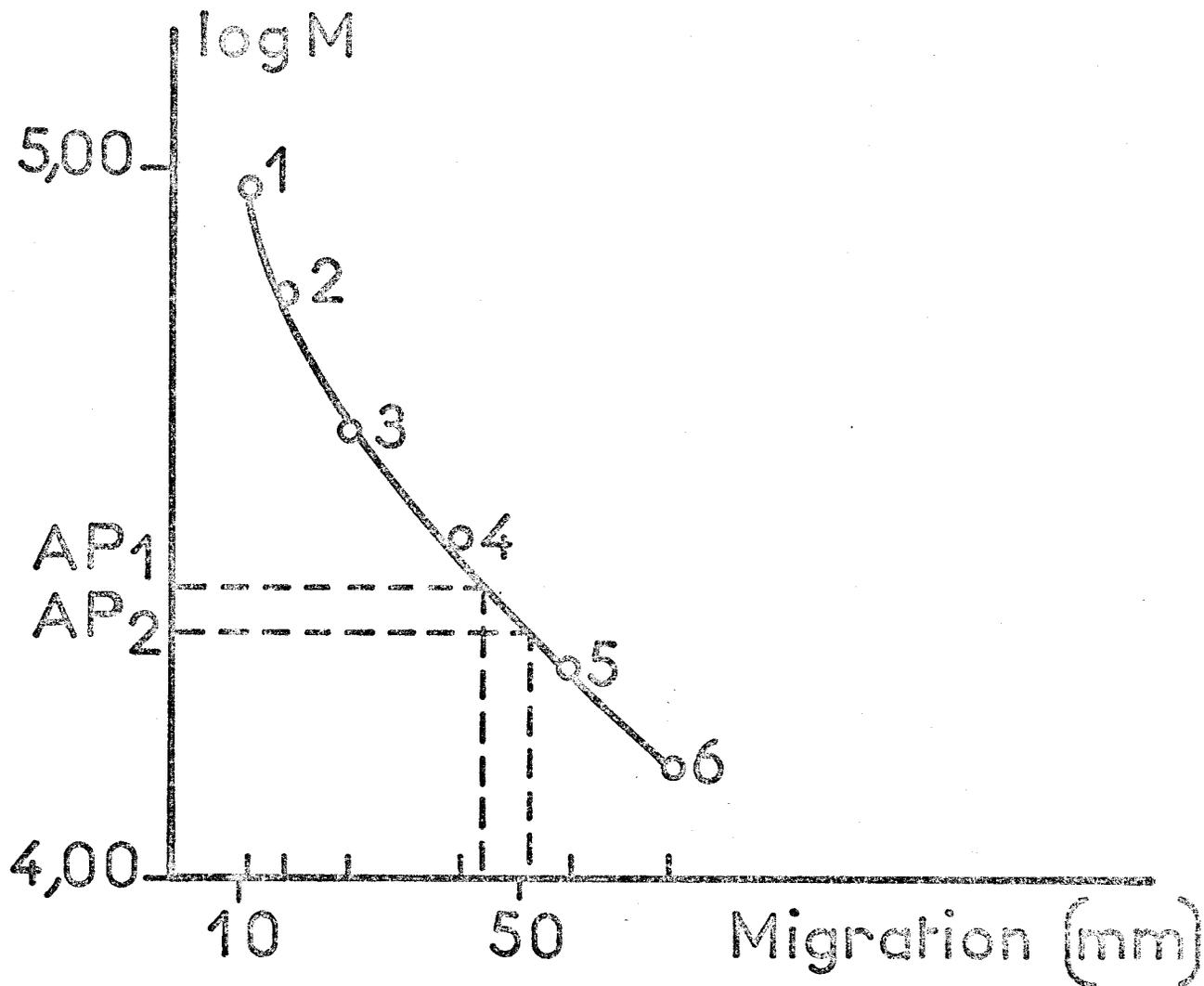
Gel filtration sur Sephadex G100 d'un mélange contenant 50 $\mu$ g de Bleu dextran, 1mg de catalase, 1mg d'ovalbumine, 750 $\mu$ g de myoglobine, 750 $\mu$ g de cytochrome C  
Colonne: 2,5x50 cm



Figure 21

La migration des protéines ayant subi ce traitement est pratiquement la même que celle des protéines traitées deux minutes à 80°C par un mélange glycérine-SDS-2-mercaptoéthanol (59). Le traitement à la température ambiante présente l'avantage de ne pas inactiver complètement les aminopeptidases : ce qui permet de les situer en tant que telles sur le gel au SDS.

Comme dans le cas de la gel filtration, un mélange de protéines de masses moléculaires connues permet de construire une courbe d'étalonnage  $\log M = f(\text{distance de migration})$ . Les valeurs obtenues pour les deux aminopeptidases sont de 26 600 pour AP<sub>1</sub> et de 23 000 pour AP<sub>2</sub> (Figure 22).



Electrophorèse sur polyacrylamide-SDS. Système de DAVIS : Gel à 12 % + 0,1 % SDS. Dimensions de la plaque 130 x 85 x 1mm. Durée 90 minutes. Ampérage constant : 30 m A. Les marqueurs numérotés 1 à 6 sont la phosphorylase B PM = 94 000-(1), la sérum albumine bovine PM = 67 000-(2), l'ovalbumine PM = 43 000-(3), l'anhydrase carbonique PM 30 000-(4), l'inhibiteur tryptique du soja PM 20 100-(5) et l'alactalbumine PM 14 400-(6).



Figure 22

### 3°) Détermination de l'extrémité N-terminale

Une nanomole de chaque enzyme est traitée par le chlorure de dansyl à pH 8,5 selon la technique de GRAY (voir appendice technique).

L'identification des dansyls-amino-acides libérés après hydrolyse acide (15 heures à 105°C) est réalisée en chromatographie sous couche mince de polyamide à l'aide des systèmes de solvants de WOOD et WANG (60).

Nous avons observé pour les deux enzymes un dansyl-amino-acide majeur qui correspond au glyocolle. Mais nous avons aussi observé des taches chromatographiques mineures correspondant à certains acides aminés comme les thréonine, sérine, phenylalanine, leucine, isoleucine et valine. Bien que le mode opératoire comporte une précipitation de la protéine dansylée, on ne peut pas exclure que du glyocolle provenant du tampon Tris-glyocolle se soit fixé sur la protéine au cours de l'électrophorèse préparative, quant au fait que l'on observe plusieurs autres dansyl-amino-acides en quantités mineures, on peut envisager une autolyse des enzymes durant leur préparation et leur conservation.

### 4°) Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés des deux aminopeptidases sont très comparables. Le tableau XV présente les compositions exprimés en nombre de résidus d'acides aminés pour 100 résidus d'une part et en nombre de résidus par mole d'enzyme d'autre part, en utilisant les valeurs de masse moléculaire obtenues par électrophorèse sur polyacrylamide en milieu SDS (26 600 pour AP<sub>1</sub> et 23 000 pour AP<sub>2</sub>). Ces compositions ont été étudiées sur une quantité de cent microgrammes d'enzyme qui ont été hydrolysés par HCl 5,6 N pendant 24 heures.

	AP <sub>1</sub>		AP <sub>2</sub>	
	R/100R	R/Mol.	R/100R	R/Mol.
Asp	11,0	19,4	10,3	21,8
Glu	11,7	20,8	12,9	27,4
Ser	7,9	14,1	7,2	15,2
Thr	6,3	11,1	5,9	12,7
Pro	5,7	10,1	4,6	9,8
Gly	12,0	21,2	10,4	22,0
Ala	11,3	20,1	11,1	23,5
Val	6,9	12,2	6,4	13,5
Ile	3,9	6,9	4,5	9,5
Leu	5,0	9,0	6,2	13,1
Phe	3,5	6,2	3,9	8,4
Tyr	2,5	4,5	3,2	6,7
Trp	0	0	0	0
CySO <sub>3</sub> H	1,6	2,9	1,2	2,6
Met	1,7	3,0	1,6	3,4
His	2,1	3,8	2,8	5,5
Lys	5,3	9,4	5,8	12,4
Arg	1,6	2,8	1,3	2,7

Composition en acides aminés de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> en résidus pour 100 résidus (R/100R) et en résidus par mole (R/Mol.)

TABLEAU XV



Le contenu en cystine a été déterminé sous la forme d'acide cystéique après oxydation performique de 50 µg d'enzyme (voir appendice technique).

Le contenu en tryptophane a été déterminé après hydrolyse de 100 µg d'enzyme par l'acide méthane-sulfonique 4 N en présence de tryptamine selon la technique préconisée par SIMPSON et coll. (61).

Les acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse classique (HCl 5,6 N - 24 heures) représentent 70 % du matériel hydrolysé dans le cas de AP<sub>1</sub> et 95 % dans le cas de AP<sub>2</sub>.

La partie non protéique est au moins en partie de nature glucidique, puisque le dosage des oses neutres à l'orcinol sulfurique indique un rapport sucres neutres/protéines de 12 % pour AP<sub>1</sub> et de 3 % pour AP<sub>2</sub>.

Il faut aussi noter que les hydrolysats contiennent des osamines : 2,6 moles de glucosamine et 1,2 moles de galactosamine par mole de AP<sub>1</sub> ; 1,6 moles de glucosamine et 0,9 moles de galactosamine par mole de AP<sub>2</sub>.

Ces résultats nous ont incité à examiner le comportement de ces enzymes sur une lectine comme la Concanavaline A.

#### 5°) Comportement de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub> vis à vis de la Concanavaline A

Nous avons étudié le comportement d'affinité des deux enzymes pour la Concanavaline A selon le protocole expérimental décrit par BAYARD et KERCKAERT (62) en utilisant la lectine immobilisée sur Sépharose - 4B.

Nous avons constaté que l'enzyme AP<sub>1</sub> était retenue sur la colonne de Con-A Sépharose 4B équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 7,6 ; 0,1 M en NaCl ; 1 mM en MgCl<sub>2</sub> et 1 mM en CaCl<sub>2</sub>.

L'élution de la fraction AP<sub>1</sub> est obtenue par le D-glucose 0,1 M dans le même tampon. On peut donc considérer que l'enzyme AP<sub>1</sub> se comporte comme une glycoprotéine classique.

Par contre, la fraction AP<sub>2</sub> n'est pas retenue sur la colonne et n'a donc pas d'affinité pour la Concanavoline A dans les conditions utilisées.

Puisque les dosages précédemment rapportés au paragraphe 4 montrent que la fraction AP<sub>2</sub> contient d'une part de la glucosamine et de la galactosamine (2,5 moles d'osamines par mole de AP<sub>2</sub> après hydrolyse chlorhydrique de 24 heures) et d'autre part 3 % d'oses neutres, AP<sub>2</sub> renferme également une copule glucidique mais dont la structure n'a pas d'affinité pour la Concanavoline A.

#### V - PARAMETRES ENZYMATIQUES DE AP<sub>1</sub> ET AP<sub>2</sub>

##### 1°) Influence du pH

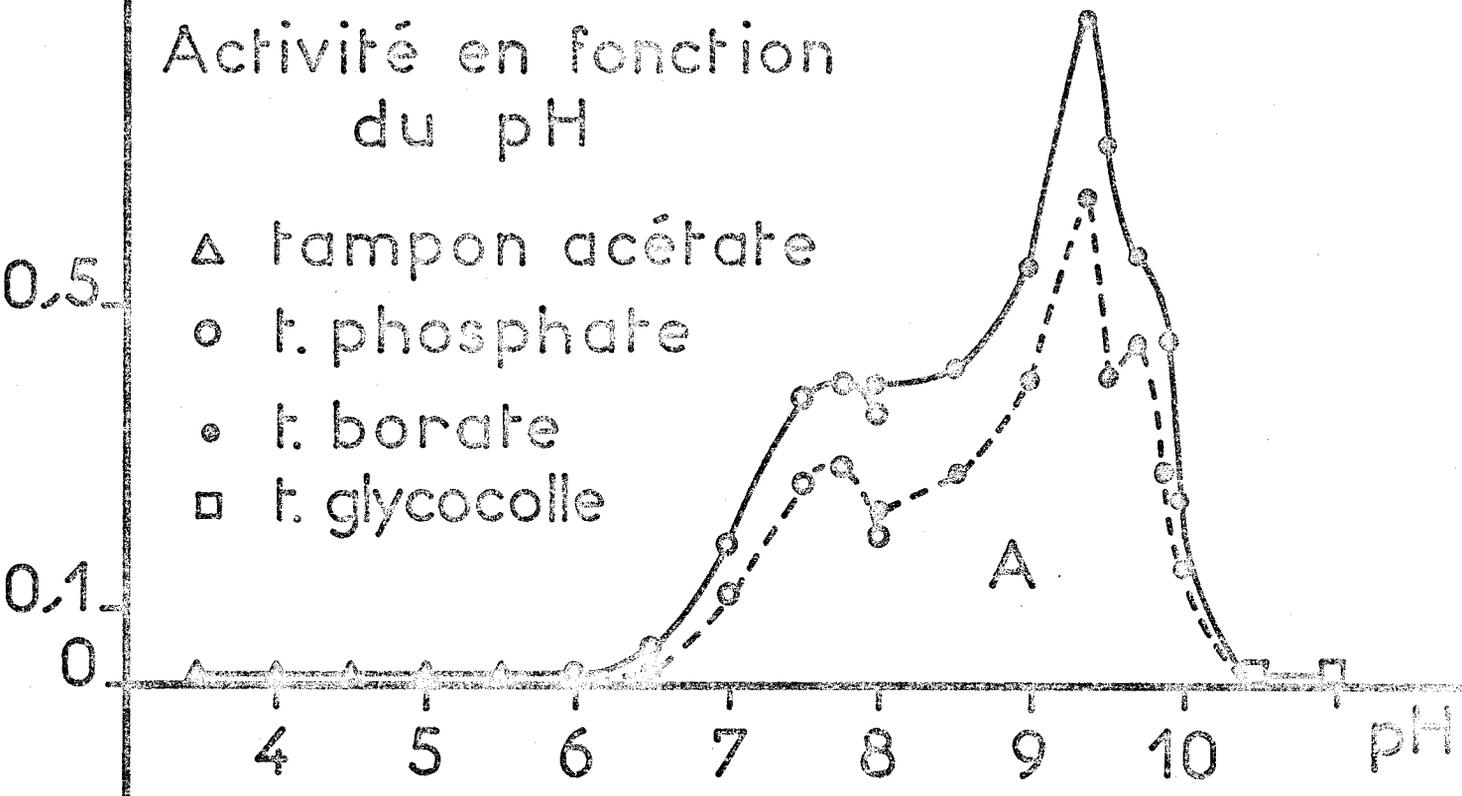
Le domaine d'activité de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub> sur le Leu-p-NA se situe entre pH 7 et pH 10.

L'activité est maximale à pH 9,35, mais la courbe n'est pas symétrique. On observe notamment un épaulement à pH 7,35 et un autre moins net à pH 9,7 (Figure 23-A). La mesure de l'activité à pH 9,35, après incubation des enzymes 30 minutes à 30°C à des différents pH, montre que le domaine de stabilité maximale des deux enzymes se situent entre pH 7 et pH 8,5 (Figure 23-B).

D.O. 405 nm

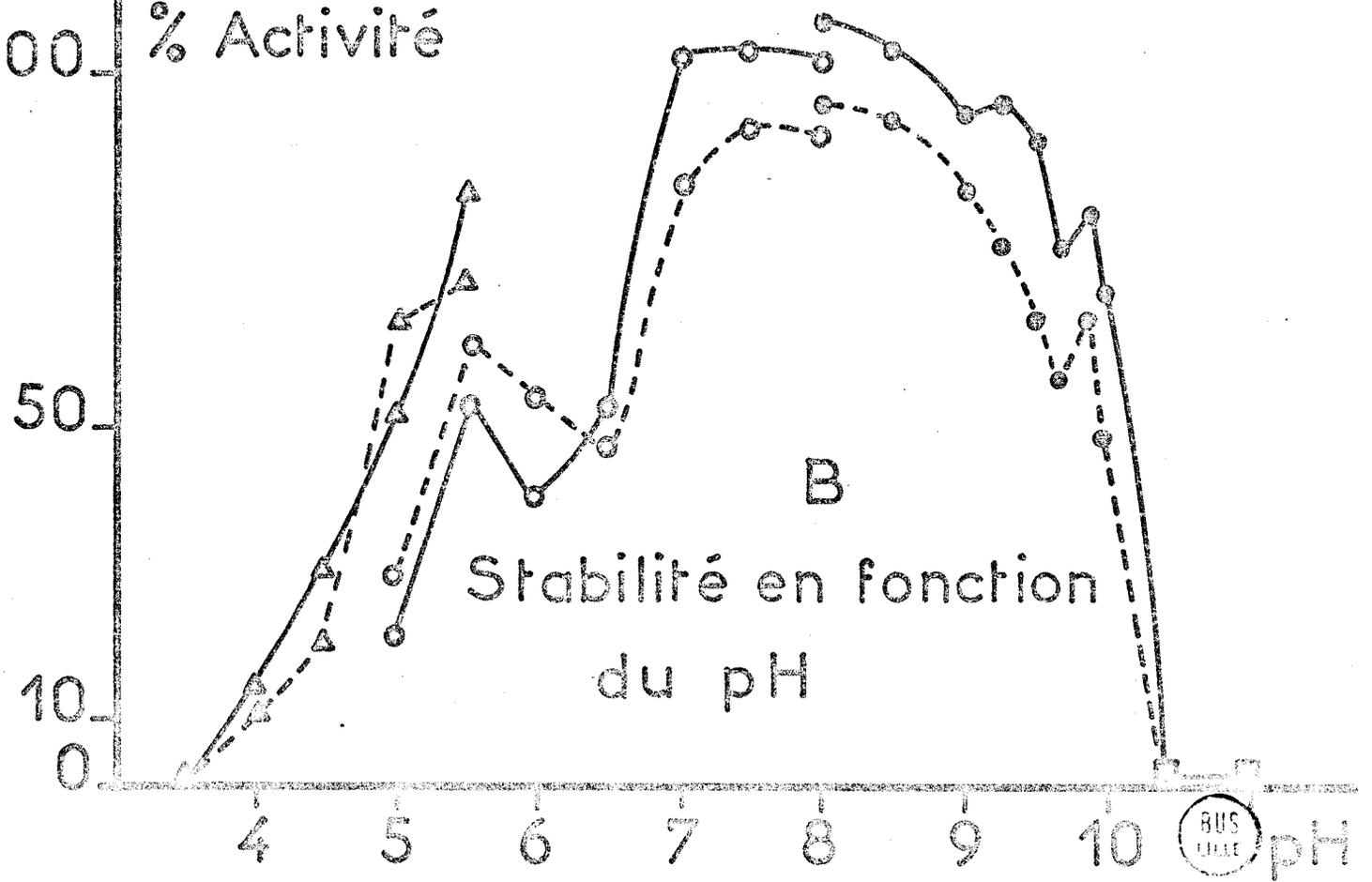
Activité en fonction du pH

- △ tampon acétate
- t. phosphate
- t. borate
- t. glycocole



% Activité

Stabilité en fonction du pH



Effet du pH sur l'activité de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>

Figure 23

2°) Influence de divers réactifs sur l'activité de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>

L'activité sur le Leu-p-NA est mesurée après pré-incubation de l'enzyme à pH 9,35 pendant 15 minutes à 25°C.

L'activité des deux enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> est inhibée de façon très importante par le 2-mercaptoéthanol, le dithiothréitol, le chlorure mercurique, l'o-phénanthroline, l'EDTA et les ions cuivrique aux concentrations  $10^{-3}$  M et  $10^{-4}$  M (Tableau XVI).

L'inhibition par l'EDTA et l'o-phénanthroline permet de considérer que ces enzymes appartiennent au groupe des métallo enzymes.

Les ions  $Co^{++}$  et  $Zn^{++}$  qui, à la concentration de  $10^{-4}$  M, augmentent l'activité de AP<sub>2</sub> peuvent être considérés comme des co-enzymes possibles de AP<sub>2</sub>, mais ne semblent pas pouvoir jouer ce rôle pour AP<sub>1</sub>.

Le cation du site actif se trouve certainement dans une "poche hydrophobe" au niveau de la conformation de la molécule car l'o-phénanthroline (OP) inhibe nettement plus que l'EDTA pour un même temps de pré-incubation (15 minutes). L'inhibition par l'OP peut être levée par dialyse, suivie d'une addition de  $Zn^{++}$  à la concentration  $10^{-4}$  M.

Par contre, l'inhibition obtenue par l'EDTA  $10^{-3}$  M qui devient totale après 24 heures d'incubation à +4°C, ne peut être levée par dialyse suivie de l'addition d'un cation tel que  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ou  $Zn^{++}$  à la concentration de  $10^{-4}$  M ou  $10^{-3}$  M.

Effet de différents réactifs sur l'activité de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>

Réactif 10 <sup>-3</sup> M	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>	Réactif 10 <sup>-4</sup> M	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>
Témoin	100	100	Témoin	100	100
EDTA	76	89	EDTA	77	87
OP	0,3	0,5	OP	24	30
2-ME	1,9	3,3	2-ME	2,5	3,0
DTT	0	0,3	DTT	0,7	2,5
HgCl <sub>2</sub>	0	0	HgCl <sub>2</sub>	0,3	0,8
DTNB	103	115	DTNB	101	111
P-CMB	150	125	P-CMB	173	189
P-CMPS	145	135	P-CMPS	205	209
Co <sup>++</sup>	55	66	Co <sup>++</sup>	75	105
Zn <sup>++</sup>	66	90	Zn <sup>++</sup>	86	130
Cu <sup>++</sup>	0,3	0	Cu <sup>++</sup>	17	20

TABLEAU XVI

Parmi les autres résultats du Tableau XVI on peut remarquer que les réactifs des groupes -SH comme le DTNB, le p-CMB et le p-CMPS ne sont pas inhibiteurs.

Au contraire, on observe une augmentation de l'activité de AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> pour des concentrations en p-CMB et p-CMPS de 10<sup>-3</sup> et 10<sup>-4</sup> M.

Cette augmentation d'activité peut s'expliquer par la présence dans la structure de l'enzyme d'un groupe -SH n'appartenant pas au site actif, mais susceptible de couper un pont disulfure selon un mécanisme équilibré d'échange thiol-disulfure. En effet, un ou plusieurs ponts disulfure assurent le maintien d'une "conformation active", puisque l'activité des enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> est inhibée par le DTT et le 2-mercaptoéthanol aux concentrations 10<sup>-3</sup> M et 10<sup>-4</sup> M.

L'inhibition par le chlorure mercurique ne peut pas correspondre à un blocage des groupes -SH, mais peut s'expliquer par la coupure d'un pont disulfure par attaque électrophile en milieu légèrement alcalin comme cela a été décrit par DANNO et coll. (63).

### 3°) Influence de la température sur l'activité de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub>.

Pour chaque enzyme, nous avons mesuré l'activité en fonction de la température dans un tampon borate de pH 9,35 d'une part et l'activité à 30°C dans le même tampon borate après une incubation de l'enzyme pendant 30 minutes à différentes températures dans un tampon phosphate de pH 7,4, pH où les enzymes sont stables à 30°C.

La figure 24-A nous montre que les deux profils d'activité en fonction de la température sont très comparables pour les deux enzymes.

Par contre, la figure 24-B nous montre des profils d'inactivation quelque peu différents pour les deux aminopeptidases.

En effet, si les profils présentent tous deux plusieurs extrema, nous constatons que AP<sub>2</sub> perd 50 % de son activité après incubation de 30 minutes à 30°C, alors que dans les mêmes conditions AP<sub>1</sub> voit son activité croître légèrement (10 %).

Nous constatons par ailleurs que AP<sub>1</sub> voit également son activité croître de 10 % après une incubation de 30 minutes à 45°C, alors qu'une incubation de 30 minutes à 40°C lui fait perdre 15 % de son activité.

Dans le domaine de température étudié (30°-70°) l'enzyme AP<sub>1</sub> apparaît nettement plus stable que l'enzyme AP<sub>2</sub>.

#### 4°) Spécificité des enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>

Les enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> au niveau de l'hydrolyse des nitroanilides, ont une spécificité importante pour le radical leucyl, car d'autres nitroanilides d'acides aminés tels que Ala-p-NA ; Pro-p-NA, Lys-p-NA ne sont pas hydrolysés.

De même, le benzoyl-arginine-4-NA, substrat classique de la trypsine n'est pas hydrolysé ; le glutaryl phenylalanine-4-nitroanilide et le N-acétyl-tyrosine-4-nitroanilide, tous deux substrats de la chymotrypsine, ne sont pas hydrolysés.

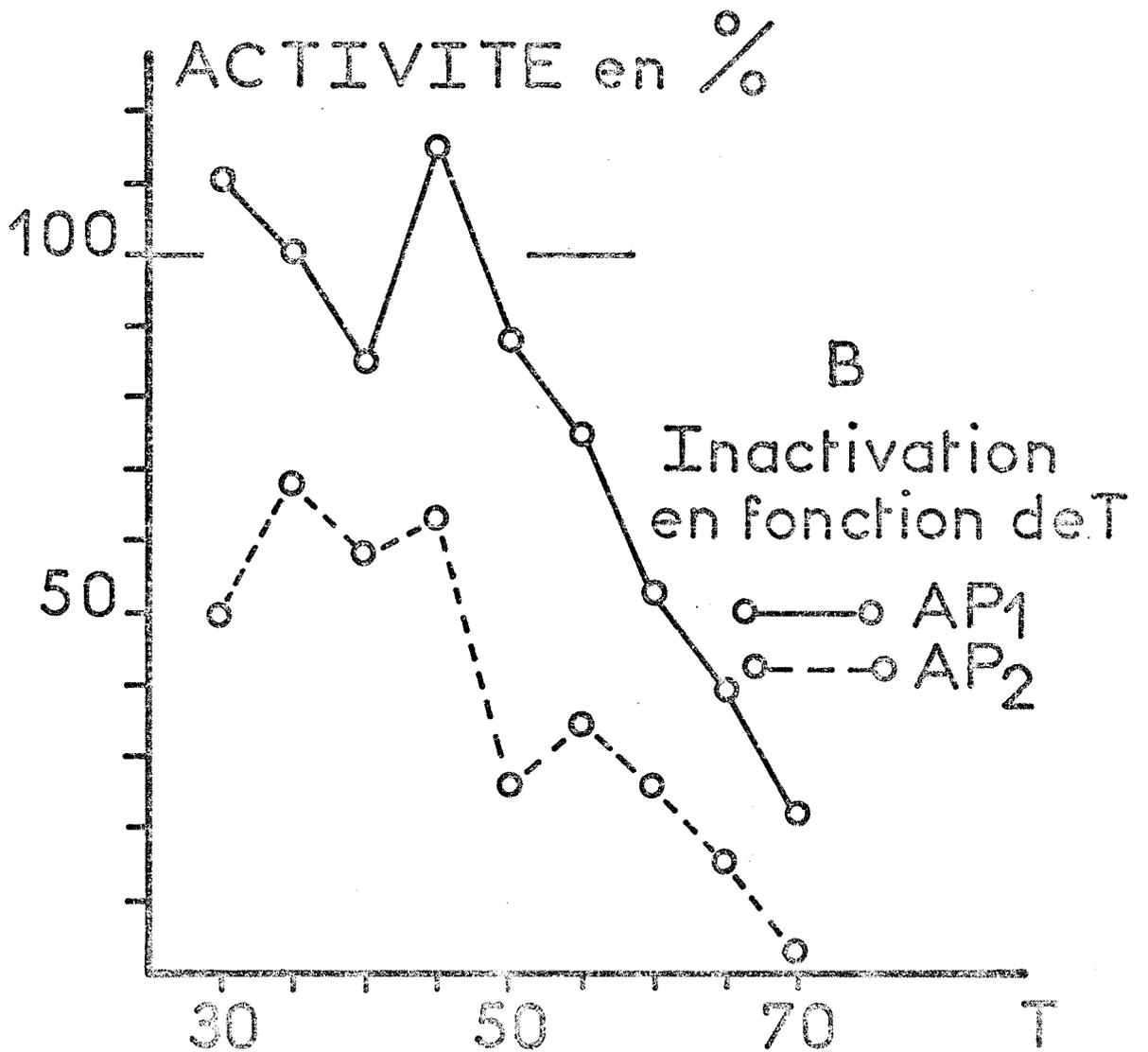
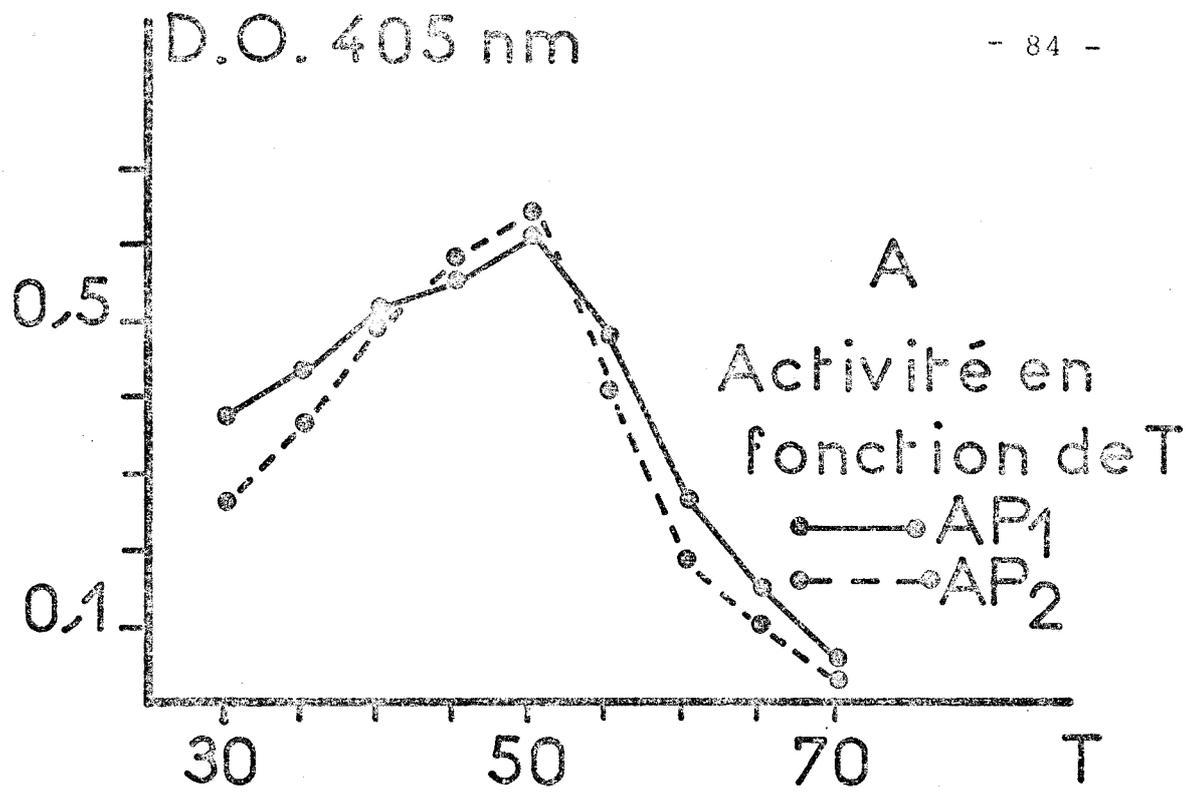


Figure 24

Par contre, les enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> hydrolysent de nombreux dipeptides tels que : Leu-Ala ; Leu-Val ; Val-Ala ; Leu-Leu ; Leu-Trp ; Trp-Leu et hydrolysent aussi la leucinamide.

En effet, avec les dipeptides cités, après une heure d'incubation à 37°C et à pH 9,35 avec AP<sub>1</sub> ou avec AP<sub>2</sub> on constate, par chromatographie sur papier ou sur silice, une hydrolyse des dipeptides cités.

Par contre, d'autres dipeptides comme Leu-Tyr ; Tyr-Leu et Ala-Leu ne sont pas hydrolysés.

Le tétrapeptide Leu-Trp-Met-Arg est aussi hydrolysé et libère les 4 acides aminés. Le tripeptide Leu-Tyr-Leu ne libère que de la leucine.

Le fait que Ala-Leu ne soit pas hydrolysé alors que Leu-Ala l'est, indique une spécificité très nette quant à l'acide aminé qui se trouve en position N-terminale et permet de définir une spécificité assez remarquable des deux enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>.

5°) Mesures des constantes cinétiques : les mesures sont faites directement dans la cuve d'un spectrophotomètre (ZEISS PMQ II) dont le porte cuvé est thermostaté.

La solution du substrat (Leu-p-NA) dans un tampon borate de pH 9,35 est équilibré à 30°C avant l'addition de la solution d'enzyme (conservée dans l'eau glacée).

Les concentrations en substrat que nous avons retenues sont 100  $\mu$  Molaire, 300  $\mu$  Molaire, et 500  $\mu$  Molaire.

Pour chaque cinétique, la quantité d'enzyme utilisée correspond à 200 ng de protéine. Le volume total du mélange réactionnel est de 2,5 ml.

L'augmentation de densité optique à 405 nm est suivie pendant 10 minutes. Cette augmentation est ensuite convertie en activité spécifique ( $\mu$ Moles de p-nitroaniline libérées par minute et par mg d'enzyme) sachant que  $\epsilon^{405} = 10\ 000\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  dans nos conditions expérimentales.

Les différentes constantes sont ensuite mesurées en utilisant soit le diagramme des doubles inverses de LINEWEAVER et BURK (64) soit celui de MERINO (65), diagramme établi à partir des propriétés géométriques de l'hyperbole équilatère et qui utilise les mesures sans les transformer (Figure 25).

Le tableau XVII rassemble les valeurs de  $(S)$ ,  $V$ ,  $\frac{1}{(S)}$  et  $\frac{1}{V}$  pour les enzymes  $AP_1$  et  $AP_2$ .

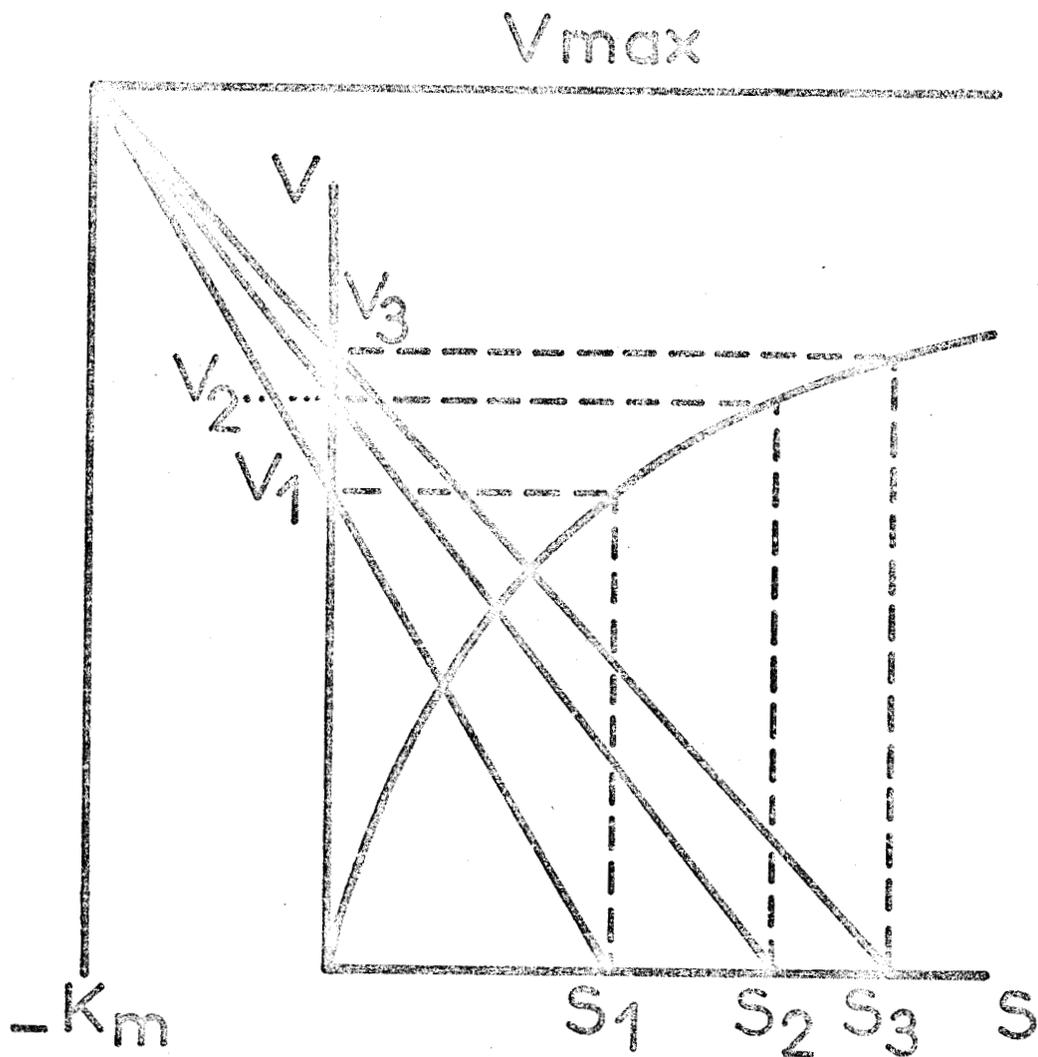
La figure 26 montre à titre d'exemple le diagramme suivant LINEWEAVER et BURK obtenu pour  $AP_1$  et la figure 27 le diagramme de MERINO pour la même enzyme.

Le tableau XVIII présente les valeurs de  $K_m$ ,  $V_M$ ,  $k_{cat}$  et du rapport  $k_{cat}/K_m$  (constante de spécificité) obtenues pour  $AP_1$  et  $AP_2$  par le diagramme de MERINO et par celui de LINEWEAVER et BURK.

Les valeurs de  $k_{cat}/K_m$  sont obtenues en utilisant les masses moléculaires obtenues par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (26 600 pour  $AP_1$  et 23 000 pour  $AP_2$ ).

- 87 -

# DIAGRAMME DE MERINO POUR LE CALCUL DE $V_M$ ET $K_m$



Dans le cas d'une cinétique michaélienne la courbe  $V=f(S)$  est une hyperbole équilatère et le point I, concours des asymptotes a pour coordonnées:  $-K_m$  et  $V_M$

Pour obtenir I on joint les couples de points  $S_1V_1, S_2V_2, S_3V_3 \dots$

Figure 25

	(S) Molaire	V $\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times$ $\text{mg}^{-1}$		1 ( $\bar{S}$ )	1 $\bar{V}$
AP <sub>1</sub>	100	29,5		0,0100	0,034
	300	63,0		0,0033	0,016
	500	81,5		0,0020	0,012
AP <sub>2</sub>	100	30,5		0,0100	0,003
	300	67,5		0,0033	0,015
	500	88,5		0,0020	0,011

TABLEAU XVII

Données de base permettant le calcul des constantes cinétiques des aminopeptidases AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>.



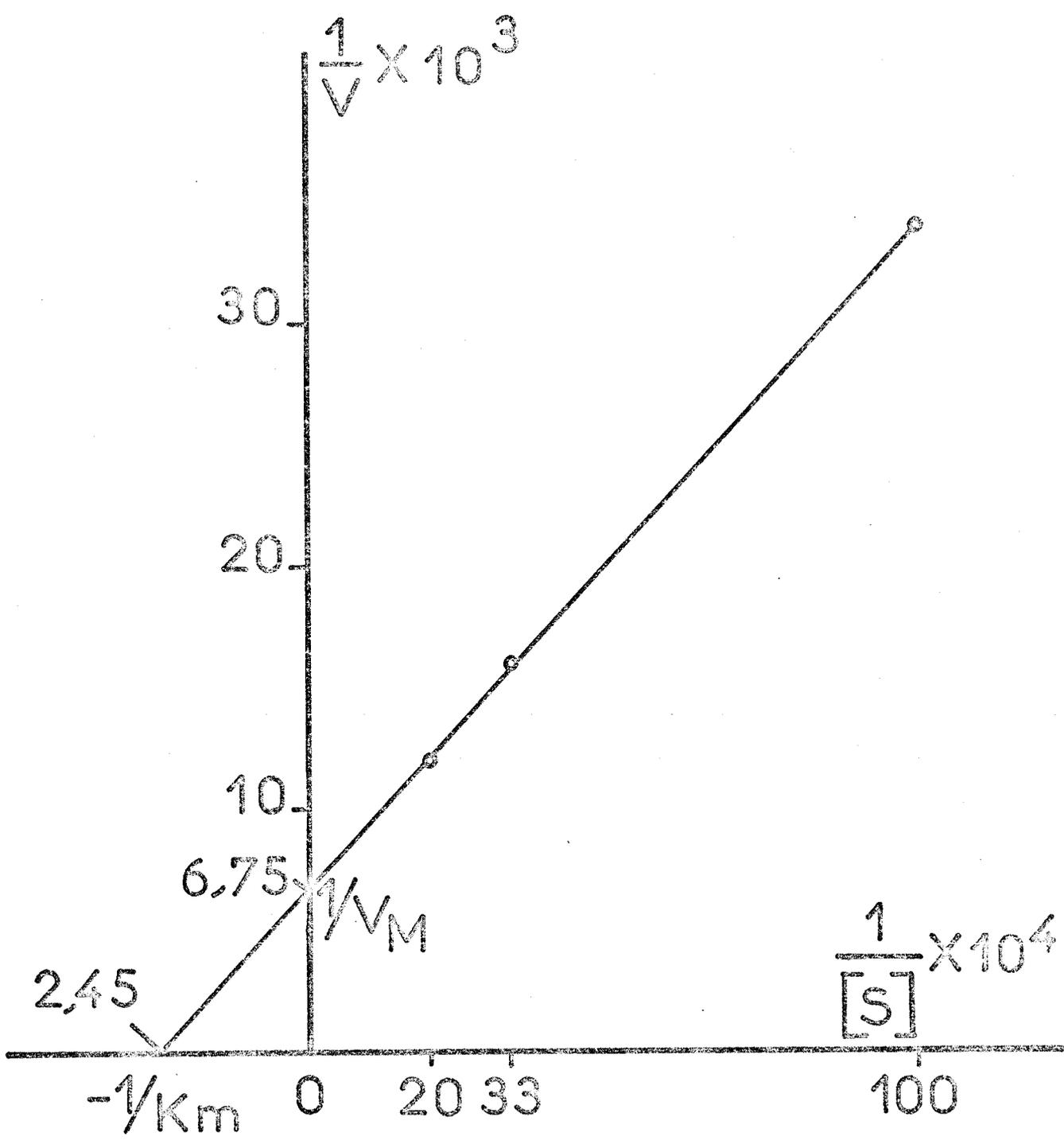


Diagramme de Lineweaver et Burk  
pour AP<sub>1</sub>



Figure 26

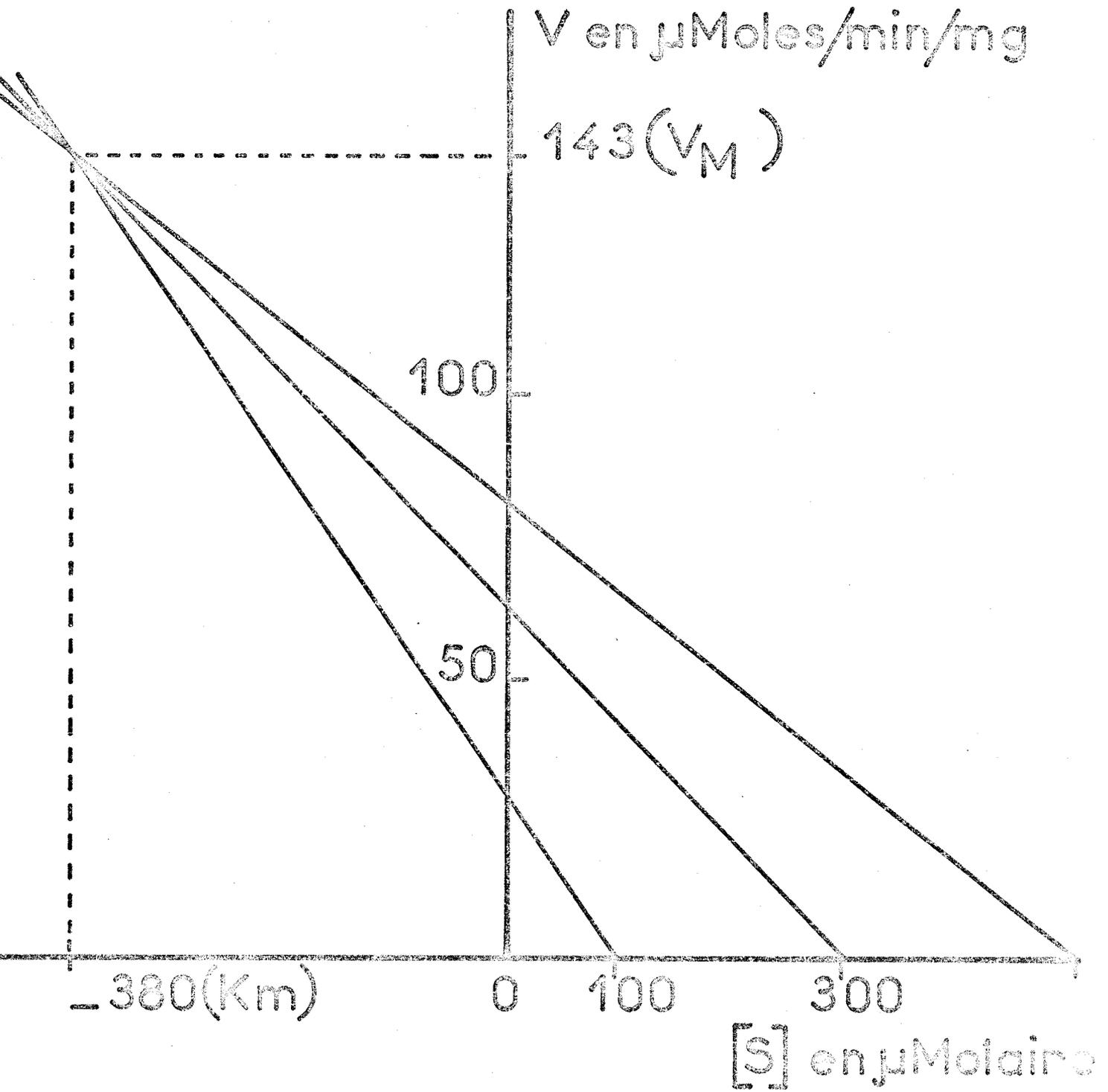


Diagramme de Mérino pour  $AP_1$



Figure 27

M.	$K_m$ $\mu M$	$V_M$ en $\mu M \times \text{min.}^{-1}$ $\times \text{mg}^{-1}$	$k_{\text{cat}}$ en $\text{min.}^{-1}$	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ en $M^{-1} \times \text{min.}^{-1}$
AP <sub>1</sub>	380	143	3 820	$10,0 \times 10^6$
AP <sub>2</sub>	430	164	3 770	$8,7 \times 10^6$

L.B.	$K_m$ $\mu M$	$V_M$ en $\mu M \times \text{min.}^{-1}$ $\times \text{mg}^{-1}$	$k_{\text{cat}}$ en $\text{min.}^{-1}$	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ en $M^{-1} \times \text{min.}^{-1}$
AP <sub>1</sub>	408	148	3 950	$9,7 \times 10^6$
AP <sub>2</sub>	476	174	4 000	$8,4 \times 10^6$

TABLEAU XVIII

Constantes cinétiques de AP<sub>1</sub> et de AP<sub>2</sub> mesurées à pH 9,35 30°C sur le Leu-p-NA selon le diagramme de MERINO (M.) et selon celui de LINEWEAVER et BURK (L.B.)



Les valeurs obtenues par les deux diagrammes sont quelque peu différentes (5 à 10 %). On peut remarquer que la représentation de LINEWEAVER et BURK, qui est la plus utilisée, n'est pas la meilleure, car c'est la plus petite valeur de  $V$  (donc la moins précise) qui, après inversion donne la valeur la plus élevée, donc la plus déterminante dans le tracé de la droite.

De plus, le diagramme de MERINO est plus simple et plus rapide à construire. D'après ce diagramme, les valeurs obtenues pour les nombres de rotation ( $k_{cat}$ ) sont de 3 820  $\text{min.}^{-1}$  pour  $AP_1$  et de 3 770  $\text{min.}^{-1}$  pour  $AP_2$  et celles obtenues pour les constantes de spécificité ( $k_{cat}/K_m$ ) sont de  $10,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$  pour  $AP_1$  et de  $8,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$  pour  $AP_2$ .

De cette étude, concernant l'activité exopeptidasique, il ressort que les filtrats de K. ajelloi sont dépourvus d'activité de type carboxypeptidase A et carboxypeptidase B, mais qu'ils possèdent une activité aminopeptidasique très élevée.

Cette activité est le fait de deux aminopeptidasases  $AP_1$  et  $AP_2$  dont le nombre de rotation ( $k_{cat}$ ) mesuré à 30°C et à pH 9,35 est de l'ordre de 3 800  $\text{min.}^{-1}$  pour le substrat synthétique L-leucine-p-nitroanilide.

Les deux enzymes  $AP_1$  et  $AP_2$  ont des propriétés catalytiques très semblables (pH optimum, température optimum, inhibiteurs communs) ; elles se différencient par leur taille moléculaire : 26 600 pour  $AP_1$  et 23 000 pour  $AP_2$ , et aussi par l'affinité que présente la molécule  $AP_1$  pour la concanavaline A, affinité que ne présente pas  $AP_2$ .

Les préparations de  $AP_1$  et de  $AP_2$  que nous avons obtenues ont des activités spécifiques élevées : 95 U.A./mg pour  $AP_1$  et 148 U.A./mg pour  $AP_2$  à 30°C et à pH 9,35.

Elles possèdent cependant encore une légère activité caséinolytique. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant de la caséine montre que cette légère activité n'est pas une propriété des molécules AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>, mais est le fait d'autres enzymes que nous n'avons pas pu éliminer au cours de nos préparations.

DISCUSSION

## I - KERATINOLYSE

L'attaque, in vitro des kératines par les dermatophytes se manifeste au point de vue microscopique par la désintégration de la fibre : destruction de la structure cuticulaire, dispersion des cellules corticales de laine, perforations du cheveu.

Parmi les travaux réalisés sur ce sujet, citons ceux de VANBREUSEGHEM (66), RAUBITSCHER (67), ZIEGLER et BÖHME (68) ENGLISH (69), BENEDEK (70), THURNER (71), KUNERT (72), RAGOT (17) CLERIVET (24). Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer la kératinolyse.

### 1°) Désintégration mécanique

RAUBITSCHER (73) pense que la fibre serait désintégrée par le développement du champignon dans la matrice non fibreuse. Cette hypothèse est infirmée par les résultats obtenus en microscopie électronique par MERCER et VERMA (74) qui montrent que les perforations faites par Trichophyton mentagrophytes dans le cheveu ont un diamètre nettement supérieur à celui des filaments.

### 2°) Réduction enzymatique des ponts disulfure puis digestion de la kératine réduite

Un tel mécanisme a été décrit par LINDERSTRÖM-LANG et DUSPIVA (75) dans le cas de la digestion de la laine dans l'intestin moyen de la mite.

Le pH du milieu (pH 10) et le potentiel d'oxydo-réduction (-250 mV) sont compatibles avec la réduction des ponts disulfure.

De plus, POWNING et IRZYKIEWICZ (76) ont mis en évidence une cystine réductase dans l'intestin moyen de la mite.

La réduction peut être une étape déterminante dans le processus de kératinolyse, car GODDARD et MICHAELIS (77) ont montré que la laine réduite par le thioglycolate était hydrolysée de façon importante par des protéases classiques : trypsine, chymotrypsine, pepsine, papaïne.

Ce mécanisme avec réduction préalable des ponts disulfure ne semble pas pouvoir s'appliquer aux dermatophytes. En effet, CHESTERS et MATHISON (78) ne trouvent dans les filtrats de K. ajelloi que de faibles quantités de thiols et constatent en outre que le potentiel d'oxydo-réduction est trop élevé pour permettre la réduction des ponts disulfure.

### 3°) Hydrolyse enzymatique sans réduction préalable.

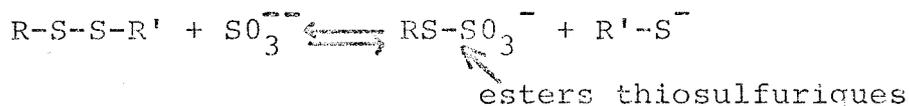
D'après ZIEGLER et RICHTER (79), la kératinolyse serait due à l'action synergique d'une série d'enzymes dont l'une, plus spécifique, la kératinase, rendrait la kératine attaquable par les autres.

YU et coll. (33, 36, 37, 43) ont isolé des cultures de Trichophyton mentagrophytes trois kératinases qui se différencient par leurs déterminants antigéniques et par leur taille moléculaire (48 000 pour la kératinase I, 440 000 pour la kératinase II et 20 300 pour la kératinase III).

Au point de vue kératinolytique, la kératinase I est capable en 9 heures, à 37°C, d'hydrolyser complètement la medulla du poil de Cobaye et d'en fissurer le cortex.

#### 4°) Sulfitolyse

Selon KUNERT (25), la kératinolyse serait en fait une sulfitolyse qui oxyderait les ponts disulfure en esters thiosulfuriques selon la réaction



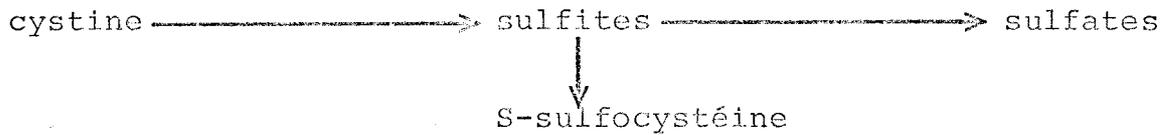
En effet, au niveau des perforations faites dans la cheveu par Microsporum gypseum, cet auteur a mis en évidence des esters thiosulfuriques par l'épreuve à la benzidine de BRACCO et CURTI (26).

Dans les filtrats de K. ajelloi, nous avons démontré, en utilisant la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions, la présence de S-sulfocystéine : ce qui indique une similitude dans le mode d'action des deux dermatophytes.

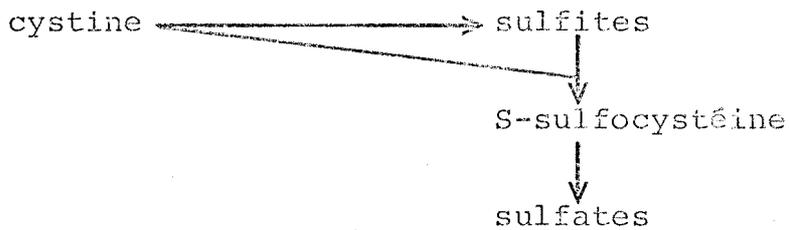
Cependant, il faut signaler que la quantité de S-sulfocystéine libérée dans les filtrats de K. ajelloi représente au plus 1 % du soufre contenu dans le cheveu, alors que les ions sulfate, autres produits d'oxydation du soufre, sont présents en quantités plus importantes (5 à 15 % selon les cultures).

Le mécanisme d'oxydation apparait complexe puisque les ions sulfite, responsables de la formation des ions sulfate et de la S-sulfocystéine, doivent nécessairement être synthétisés par le champignon à partir du cheveu puisque le milieu de culture ne contient pas de soufre minéral.

Globalement, l'oxydation de la cystine peut se faire selon le schéma suivant :



ou selon un autre schéma :



En effet, la S-sulfocystéine, comme les thiosulfates peut s'oxyder en sulfate.

La disparition des ponts disulfure qui sont responsables pour une large part de l'insolubilité du cheveu est de nature à faciliter l'hydrolyse enzymatique du cheveu par les protéases sécrétées par K. ajelloi.

## II - ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES CULTURES DE KERATINOMYCES AJELLOI

Le champignon développe au cours de sa croissance sur cheveu une activité protéolytique importante : les filtrats ont sur la caséine une activité spécifique supérieure à celle de la pronase. Par ailleurs, l'attaque des protéines de structure primaire connue (histone, myoglobine) nous a montré que de nombreux acides aminés étaient libérés : ce qui a conduit à penser que les filtrats possèdent non seulement une activité endopeptidasique, mais aussi une activité exopeptidasique.

De fait, les filtrats de K. ajelloi possèdent une activité très forte envers le substrat synthétique des aminopeptidases, le L-leucine-p-nitroanilide.

Nous avons pu isoler deux aminopeptidases AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> ayant des activités spécifiques de 95 U.A./mg et 148 U.A./mg respectivement, valeurs qui se situent nettement au dessus de celles de la leucine aminopeptidase de rein de Porc type IV SIGMA (4 à 8 U.A./mg) ou de deux aminopeptidases de Tineola bisselliella (56) qui sont de 1,4 et 6,8 U.A./mg, mais qui se situent en dessous de celle d'une aminopeptidase isolée de Penicillium roqueforti (57) qui est de 461 U.A./mg.

Les deux aminopeptidases de K. ajelloi se rapprochent de deux aminopeptidases isolées de la pronase de Streptomyces griseus (52) par leur taille moléculaire (23 000 et 27 000 pour K. ajelloi ; 23 000 et 25 000 pour S. griseus). Elles s'en rapprochent aussi par leur profil d'activité en fonction du pH qui dans l'un et l'autre cas présente au moins deux maxima et aussi le comportement de l'enzyme de plus faible taille moléculaire (23 000) vis à vis des ions Zn<sup>++</sup> : VOSBECK et coll. (80) ont montré que l'aminopeptidase de S. griseus est une enzyme à zinc, alors que l'activité de l'aminopeptidase de K. ajelloi, dont la taille moléculaire est la même, est augmentée en présence de Zn<sup>++</sup> à la concentration 10<sup>-4</sup>M.

Au niveau des propriétés physico-chimiques, les deux aminopeptidases se différencient par leur mobilité électrophorétique et par leur taille moléculaire, mais ont des compositions en acides aminés très voisines et renferment toutes deux de la glucosamine et de la galactosamine.

Les différences de mobilité électrophorétique d'une part et de taille moléculaire d'autre part, sont peut-être dûes à des différences au niveau de la composition glucidique. En effet, l'aminopeptidase AP<sub>1</sub> est retenue sur colonne de Sépharose Concanavoline A et est donc une glycoprotéine, alors que l'aminopeptidase AP<sub>2</sub> n'est pas retenue sur la même colonne et ne semble pas être une glycoprotéine, bien que l'affinité sur les lectines du type Concanavoline A soit conditionnée non seulement par l'existence de certains oses, mais aussi par la conformation complète de la copule glycanique.

Il n'est pas impossible que la molécule AP<sub>2</sub> dont la taille moléculaire (23 000) est inférieure à celle de AP<sub>1</sub> (26 600) puisse dériver de la molécule AP<sub>1</sub> par modification de la copule glycanique : ce qui pourrait expliquer la différence de masse moléculaire, alors que la composition en acides aminés est très comparable.

Selon cette hypothèse, le champignon synthétiserait l'aminopeptidase AP<sub>1</sub> qui serait ensuite en partie transformée en AP<sub>2</sub>.

Il faut noter que deux aminopeptidases de nature glycoprotéique ont aussi été isolées des filtrats de Aspergillus oryzae par LABBE et REBEYROTTE (81), ces deux enzymes ayant, dans ce cas, des tailles moléculaires nettement différentes (40 000 et 140 000).

Si les deux aminopeptidases AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> que nous avons isolées de K. ajelloi se différencient au niveau de leurs propriétés physico-chimiques, elles apparaissent par contre, très semblables au niveau de leur activité enzymatique.

En effet, les variations de l'activité en fonction du pH et de la température sont les mêmes, les inhibiteurs sont les mêmes et les constantes cinétiques sont voisines.

La seule différence dont nos résultats font état à ce sujet, concerne le comportement des deux enzymes vis à vis des ions Zn<sup>++</sup> qui, à la concentration de 10<sup>-4</sup> M dans un tampon borate pH 9,35 diminuent l'activité de AP<sub>1</sub> de 15 % et augmentent celle de AP<sub>2</sub> de 30 %.

Ces deux aminopeptidases ont une activité spécifique élevée, et contribuent d'une façon importante à la dégradation de la kératine du cheveu par Kératinomyces ajelloi. Leur association avec l'activité protéolytique et l'activité kératinolytique décrites dans le chapitre IV, permet incontestablement l'attaque morphologique du cheveu.

## RESUME

Le dermatophyte Keratinomyces ajelloi est capable de se développer sur le cheveu, kératine typiquement fibreuse.

L'attaque du cheveu se traduit au niveau microscopique par une désintégration de la fibre : destruction de la cuticule, perforations du cortex. L'attaque du cheveu se traduit aussi par l'apparition de sulfates et d'esters thiosulfuriques dans les filtrats de culture, ce qui implique une destruction des ponts disulfure, lesquels sont en majeure partie responsables de la dureté et de l'insolubilité de la kératine.

Au cours de sa croissance sur cheveu, K. ajelloi développe une activité protéolytique importante que l'on retrouve dans les filtrats de culture.

A l'analyse, il apparait que les filtrats renferment une activité endopeptidasique importante, et une activité aminopeptidasique très élevée, que nous avons mis en évidence par le substrat synthétique : le L-leucine-p-nitroanilide (Leu-p-NA).

En utilisant notamment la chromatographie d'affinité et l'électrophorèse préparative, nous avons purifié deux aminopeptidases de propriétés voisines AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub>, ayant des nombres de rotation ( $k_{cat}$ ) de 3 800 par minute pour le substrat Leu-p-NA.

L'activité de deux enzymes AP<sub>1</sub> et AP<sub>2</sub> sur ce même substrat est maximale à pH 9,35 et à 50°C. L'activité est inhibée par les chélateurs tels que l'EDTA et l'o-phé-nanthroline par les réducteurs des ponts disulfure, tels que le DTT et le 2-mercaptoéthanol et par le chlorure mercurique.

L'enzyme AP<sub>1</sub> présente une affinité très nette pour la Concanavaline A et apparait de ce fait être une glycoprotéine.

L'enzyme AP<sub>2</sub> n'a pas d'affinité pour la Concanavaline A et se différencie sur ce point de l'enzyme AP<sub>1</sub>.

Les deux enzymes se différencient aussi par leur masse moléculaire : 26 600 pour AP<sub>1</sub>, 23 000 pour AP<sub>2</sub> mais il n'est pas impossible que AP<sub>2</sub> dérive de AP<sub>1</sub> par modification de la copule glucidique.

LES DEUX AMINOPEPTIDASES DECRITES PARTICIPENT EN CONJONCTION AVEC LES ENDOPEPTIDASES ET AVEC LES ENZYMES RESPONSABLES DE L'OXYDATION DE LA CYSTINE A LA DIGESTION DU CHEVEU PAR KERATINOMYCES AJELLOI.

BIBLIOGRAPHIE

- 01 - MERCER E.H., "Keratin and Keratinization"  
Pergamon Press, 1961, page 64
- 02 - CRESTFIELD A.M., MOORE S. and STEIN W.H.  
J. Biol. Chem., 1963, 238, 622-627
- 03 - O'DONNELL I.J., THOMPSON E.O.P. and INGLIS A.S.  
Aust. J. Biol. Sci., 1962, 15, 732-739
- 04 - MOSCHETTO Y.  
Thèse de Doctorat es Sciences Physiques, LILLE, 1966 N°139
- 05 - RUFFIN P. et MOSCHETTO Y.  
C.R. Acad. Sci. PARIS (Série D), 1973, 276, 2403-2405
- 06 - SWART L.S., HAYLETT T. and JOUBERT F.J.  
Text. Res. J., 1969, 39, 912-916
- 07 - HAYLETT T. and SWART L.S.  
Text. Res. J., 1969, 39, 917-929
- 08 - HAYLETT T., SWART L.S. and PARRIS D.  
Biochem. J., 1971, 123, 191-200
- 09 - SWART L.S. and HAYLETT T.  
Biochem. J., 1971, 123, 201-210
- 10 - PERUTZ M.F.  
Nature (London) 1951, 167, 1053-1054
- 11 - CREWETHER W.G., FRASER R.D.B., LENNOX F.G. and LINDLEY H.  
Advances in Protein Chemistry, 1965, 20, 191-346
- 12 - HARRAP B.S.  
Biopolymers 1969, 8, 187-198

- 13 - CREWTER W.G. and HARRAP B.S.  
J. Biol. Chem. 1967, 242, 4310-4319
- 14 - FRASER R.D.B.  
Scientific American, 1969, 221, 86-96
- 15 - AJELLO L.  
J. Invest. Derm., 1953, 21, 157-171
- 16 - VANBREUSEGHEM R.  
Acad. R. Belg. Bull. Cl. Sci., 1952, 38, 1068-1077
- 17 - RAGOT J.  
Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles  
TOULOUSE 1968, N°315
- 18 - RAGOT J.  
C.R. Acad. Sci. PARIS (Série D) 1967, 265, 493-496
- 19 - BLANK F.  
Biochem. Biophys. Acta, 1953, 10, 110-113
- 20 - FOSTER A.B. et WEBBER J.M.  
Advances in Carbohydrate Chemistry, Academic Press  
1960, 15, 371-393
- 21 - RUFFIN P., ANDRIEU S., MOSCHETTO Y.  
Sabouraudia, 1974, 12, 18-21
- 22 - CHOPRA S.L.  
Indian J. Chem. 1964, 2, 78-79
- 23 - KUNERT J.  
Z. Allg. Mikr. 1973, 13, 489-498

- 24 - CLERIVET A.  
Thèse de Doctorat en Spécialité en Mycologie  
TOULOUSE 1971, N°1164
- 25 - KUNERT J.  
Sabouraudia 1972, 10, 6-13
- 26 - BRACCO M. et CURTI D.C.  
Biologia Latina, 1953, 6, 412
- 27 - GEYER G.  
Acta Histochemica, 1962, 14, 307-314
- 28 - SWAN J.M.  
Nature (London), 1957, 180, 643-645
- 29 - RUFFIN P. and BISERTE G.  
Anal. Biochem. 1976, 76, 233-238
- 30 - RUFFIN P., ANDRIEU S., BISERTE G. and BIGUET J.  
Sabouraudia, 1976, 14, 181-184
- 31 - PIRIE N.W.  
Biochem. J., 1934, 28, 305-312
- \*  
32 - SCDA K., NOVOGRODSKY A. and MEISTER A.  
Biochemistry, 1964, 3, 1450-1454
- 33 - YU R.J., HARMON S.R., GRAPPEL S.F. and BLANK F.  
J. Invest. Dermatol. 1971, 56, 27-32
- 34 - NARAHASHI Y., SHIBUYA K. and YANAGITA M.  
J. Biochem (Jap.), 1968, 64, 427-437
- 35 - NOVAL J.J. and NICKERSON W.J.  
J. Bacteriol. 1959, 77, 251-263
- \* 31' - FROMAGEOT C., CHATAGNER F. et BERGERET B.  
Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 294-301.

- 36 - YU R.J., HARMON S.R. and BLANK F.  
J. Bacteriol., 1968, 96, 1435-1436
- 37 - YU R.J., HARMON S.R., GRAPPEL S.F. and BLANK F.  
J. Invest. Dermatol., 1969, 53, 166-171
- 38 - SEKINE H.  
Agric. Biol. Chem., 1972, 36, 198-206
- 39 - SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et  
BISERTE G.  
Biochimie, 1971, 53, 711-715
- 40 - HAN K.K., DAUTREVAUX M., CHAILA X. et BISERTE G.  
Europ. J. Biochem. 1970, 16, 465-471
- 41 - SAUTIERE P., MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M. et BISERTE G.  
Europ. J. Biochem, 1970, 12, 222-226
- 42 - GRAY W.R. et HARTLEY B.S.  
Biochem. J., 1963, 89, 59p
- 43 - YU R.J., HARMON S.R., WACHTER P.E. and BLANK F.  
Arch. Biochem. Biophys., 1969, 135, 363-370
- 44 - FOLK J.E. et SCHIRMER E.W.  
J. Biol. Chem., 1963, 238, 3884-3894
- 45 - WOLFF E.C., SCHIRMER E.W. et FOLK J.E.  
J. Biol. Chem. 1962, 237, 3094-3099
- 46 - NEURATH H. "The enzymes" (P.D. Boyer, H. Lardy and  
K. Myrbäch Eds). 1960, Vol 4, p 11, Acad. Res. Press N.Y.
- 47 - ERLANGER B.F., KOKOWSKY N. et COHEN W.  
Arch. Biochem. Biophys. 1961, 95, 271-278

- 48 - CUATRECASAS P.  
J. Biol. Chem., 1970, 245, 3059-3065
- 49 - SHEEHAN J.C. et HESS G.P.  
J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1067-1068
- 50 - BUTLER P.J.G., HARRIS J.I., HARTLEY B.S et LEBERMAN R.  
Biochem. J., 1969, 112, 679-689
- 51 - BIRCH P.L., EL-OBLEID H.A. et AKHTAR M.  
Arch. Biochem. Biophys., 1972, 148, 447-451
- 52 - VOSBECK K.D., CHOW K.F. et AWAD W.M. Jr  
J. Biol. Chem., 1973, 248, 6029-6034
- 53 - MARCH S.C., PARIKH I et CUATRECASAS P.  
Anal. Biochem., 1974, 60, 149-152
- 54 - DAVIS B.J.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427
- 55 - KERCKAERT J.P.  
Anal. Biochem., 1978, 84, 354-360
- 56 - WARD C.W.  
Aust. J. Biol. Sci., 1975, 28, 447-455
- 57 - GRIPON J.C.  
Biochimie, 1977, 59, 679-686
- 58 - ANDREWS P.  
Biochem. J. 1964, 91, 222-233
- 59 - KERCKAERT J.P., BAYARD B., DEBRAY H., SAUTIERE P. et BISERTE G.  
Biochem. Biophys. Acta, 1977, 493, 293-303

- 60 - WOOD K.R. et WANG K.T.  
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 133, 369-370
- 61 - SIMPSON R.J., NEUBERGER M.R. et LIU T.Y.  
J. Biol. Chem., 1976, 251, 1936-1940
- 62 - BAYARD B. et KERCKAERT J.P.  
Bioch. Biophys. Res. Com., 1977, 77, 489-495
- 63 - DANNO G., KANAZAWA K. et NATAKE M.  
Agric. Biol. Chem., 1975, 39, 1379-1384
- 64 - LINEWEAVER H. et BURK D.  
J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 658-666
- 65 - MERINO F.M.  
Biochem. J., 1974, 143, 93-95
- 66 - VANBREUSEGHEM R.  
Mycologia, 1952, 44, 176-182
- 67 - RAUBITSCHKE F.  
J. Invest. Dermatol., 1957, 29, 161-164
- 68 - ZIEGLER H. et BÖHME H.  
Derm. Wschr, 1963, 148, 429-454
- 69 - ENGLISH M.P.  
Sabouraudia, 1963, 2, 115-130
- 70 - BENEDEK T.  
Mycopath. Mycol. Applicata, 1963, 21, 179-203
- 71 - THURNER J.  
Arch. Klin. Experim. Dermatol., 1966, 225, 49-66

- 72 - KUNERT J.  
Československá Dermatologie, 1967, 42, 33-36
- 73 - RAUBITSCHKEK F.  
Sabouraudia, 1961, 1, 87-90
- 74 - MERCER E.H. et VERMA B.S.  
Arch. Dermatol., 1963, 87, 357-360
- 75 - LINDERSTRØM-LANG K. et DUSPIVA F.  
C.R. Trav. Lab. Carlsberg (Ser Chim.), 1936, 21, 53-85
- 76 - POWNING R.F. et IRZYKIEWICZ H.  
Aust. J. Biol. Sci., 1960, 13, 59-68
- 77 - GODDARD D.R. et MICHAELIS M.  
J. Biol. Chem., 1934, 106, 605-614
- 78 - CHESTERS C.G.C. et MATHISON G.E.  
Sabouraudia, 1963, 2, 225-237
- 79 - ZIEGLER H. et RICHTER K.  
Derm. Wschr., 1965, 151, 744-749
- 80 - VOSBECK K.D., GREENBERG B.D., OCHOA M.S., WHITNEY P.L.  
et AWAD Jr W.M.  
J. Biol. Chem., 1978, 253, 257-260
- 81 - LABBE J.P. et REBEYROTTE P.  
Biochimie, 1974, 56, 839-844.

APPENDICE TECHNIQUE

## A - TECHNIQUES ELEMENTAIRES

### 1°) Nettoyage de la verrerie

Toute la verrerie est nettoyée avec un détergent ordinaire (TEEPOL), puis après rinçages à l'eau du robinet, elle est immergée 2 à 4 heures dans une solution de polyphosphates minéraux à 2 % dans l'eau déminéralisée (RBS 25). Enfin, la verrerie est rincée à l'eau déminéralisée et séchée.

### 2°) Dialyse

Les sacs à dialyse NOJAX sont portés pendant 5 minutes au bain marie bouillant dans une solution de carbonate de sodium à 2 % puis rincés à l'eau déminéralisée et stockés à + 4°C dans une solution d'azide de sodium à 0,2 g par litre.

### 3°) Eau pour les solutions

Toutes les solutions sont faites avec de l'eau déminéralisée puis distillée. La distillation élimine au moins en partie les résidus organiques que la permutation sur résines n'enlève pas.

### 4°) Ultrafiltration

Les ultrafiltrations ont été réalisées dans un ultrafiltreur DIAFLO équipé d'une membrane AMICON (soit UM<sub>2</sub>, soit UM<sub>10</sub>).

## B - EXTRACTION DES KERATINES

La solubilisation partielle des kératines a été effectuée selon la technique de GODDARD et MICHAELIS (T1) modifiée par GILLESPIE (T2).

L'étape de carboxyméthylation est faite dans les conditions de CRESTFIELD et coll. (2) pour éviter au maximum la conversion de la méthionine en sels de carboxyméthyl sulfonium.

2 g de kératine (cheveu d'enfant) dégraissée à l'éther de pétrole 40-60° sont mis en suspension à + 4°C dans 150 ml de tampon 0,01 M Tris ; 0,001 M en EDTA de pH 9,0.

L'extraction se fait sous légère agitation et en atmosphère d'azote par le thioglycolate de potassium : 1,4 ml d'acide thioglycolique et 6 ml de KOH 5M sont ajoutés dans la suspension de kératine. Une addition supplémentaire de KOH 5M (0,2 à 0,5 ml) peut être nécessaire pour obtenir un pH compris entre 10 et 10,5.

Après 20 heures d'extraction, les groupements thiols formés sont carboxyméthylés de la façon suivante : 7 g d'acide monoiodoacétique sont dissous dans 50 ml de Tris 3 M et 0,5 ml de KOH 5M sont ajoutés pour que le pH soit entre 8,5 et 9.

Cette solution est ajoutée aux kératines réduites à la température du laboratoire, sous azote et à l'obscurité pour éviter l'apparition d'iode. Après 40 minutes, la carboxyméthylation est complète. L'absence de groupes -SH est alors contrôlée par le dithiobisnitrobenzoate (DTNB) comme suit : 100  $\mu$ l du milieu réactionnel sont mis dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 8,2 ; l'addition de 20  $\mu$ l de DTNB 10 m Molaire dans du tampon phosphate 0,1 M pH 8,2 provoque une coloration jaune en présence de -SH. 100  $\mu$ l d'acide thioglycolique sont ajoutés à nouveau pour bloquer le monoiodoacétate pouvant encore se trouver dans le mélange réactionnel, puis le mélange est filtré sur verre fritté N°2 puis sur Millipore 0,45 $\mu$ . La solution de S-carboxyméthyl kératine obtenue est alors dialysée contre de l'eau et lyophilisée.

## C - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

Le Sephadex (G 200 ou G 100) est mis à gonfler dans l'eau à raison de 40 ml d'eau pour 1 g de Sephadex sec sous faible agitation pendant 3 jours à la température du laboratoire.

Après décantation, les particules surnageantes sont éliminées et le gel déposé dans le tampon utilisé pour la chromatographie.

La colonne de Sephadex G 200 utilisée a les dimensions suivantes : 4,1 cm de diamètre et 102 cm de hauteur ; les chromatographies sont faites dans le sens ascendant sous un débit de 18 ml à l'heure. La colonne de Sephadex G 100 utilisée a les dimensions suivantes : 2,5 cm de diamètre et 50 cm de hauteur. Les chromatographies sont faites dans le sens descendant sous une pression constante de 60 cm d'eau ; le débit mesuré dans le cas d'une chromatographie faite à + 6°C dans du tampon phosphate 0,025 M de pH 7,4 + 0,15 M en NaCl est de 20 ml à l'heure.

## D - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

La DEAE-cellulose (DE 32) est préparée selon les instructions du manuel WHATMAN : la résine sèche est mise en suspension dans HCl 0,5 M pendant une heure sous agitation modérée. Après décantation et élimination des particules surnageantes, la suspension est filtrée puis soumise à 2 cycles de traitement NaOH 0,5 M, 1/2 heure, eau, HCl 0,5 M, 1/2 heure, eau, puis équilibrée dans le tampon de début de chromatographie (tampon phosphate 0,025 M pH 7,4). Les chromatographies sont faites dans le sens descendant par gravité. L'élution des protéines fixées sur la colonne équilibrée dans du tampon phosphate 0,025 M pH 7,4 est réalisée par des concentrations croissantes de NaCl dans le tampon phosphate 0,025 M pH 7,4 : soit selon un gradient linéaire en concentration de 0 à 1 M en NaCl, soit successivement par NaCl 0,5 M et par NaCl 1 M.

E - CULTURES DE KERATINOMYCES AJELLOI

La souche de K. ajelloi est conservée sur milieu de Sabouraud (glucose brut 2 % - peptone 1 % - gélose 2 %) Huit à dix jours avant l'ensemencement, la souche est repiquée sur milieu de Sabouraud. L'inoculum est préparé en mettant le champignon contenu dans un tube en suspension dans 10 ml de sérum physiologique stérile. Un ml de cette solution est ajouté dans chaque fiole de culture. Le milieu de culture est tamponné à pH 7,4 par les phosphates et contient par litre :

0,496 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
 2,486 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
 0,040 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (= 0,2 m Molaire)  
 0,010 g de  $\text{ZnCl}_2$  (= 0,1 m Molaire)  
 0,010 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (= 0,05 m Molaire)

En fait, le zinc précipite en partie sous forme de phosphate de zinc, sa concentration dans le milieu n'est donc pas définissable avec certitude. Le milieu est filtré sur Millipore 0,45 $\mu$  puis distribué dans les fioles de culture (boîtes de Roux) à raison de 80 ml par fiole.

Les fioles sont ensuite stérilisées à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C sous une pression de 1Kg/cm<sup>2</sup>.

Le cheveu est préparé de la façon suivante :

1) Délipidation par extraction continue pendant 24 heures par l'éther de pétrole (40-60°) dans un appareil de Soxhlet. Les cheveux sont placés dans des cartouches en carton en forme de doigt de gant. Après cette extraction, les cheveux subissent 2 bains successifs de 1/2 heure dans l'alcool absolu, les doigts de gant sont ensuite fermés par un morceau de papier d'aluminium préalablement flambé et séchés pendant 2 jours à 40°C.

Dans chaque fiole stérilisée, on ajoute 500 mg de cheveu et l'inoculum de K. ajelloi. La culture est faite à l'obscurité et à 25°C. Les fioles demeurent au repos pendant toute la durée de la culture.

#### F - DOSAGE DES SULFATES

Les sulfates sont dosés par la méthode turbidimétrique de CHOPRA (T<sub>3</sub>).

##### 1°) Réactifs utilisés

a- Réactif gélatine/chlorure de baryum

2 g de gélatine Bacto Difco sont dissous dans 400 ml d'eau distillée à 60-70°C. La solution est mise 15 à 20 heures à +4°C. On ajoute alors 2 g de BaCl<sub>2</sub>. Il faut ensuite attendre 2 heures avant l'utilisation.

b- Acide trichloracétique à 3 % dans l'eau

##### 2°) Dosage

Mélanger :

100 µl de la solution à doser

1,9 ml de la solution d'acide trichloracétique

0,5 ml de réactif gélatine-chlorure de baryum.

Laisser 10 minutes à la température du laboratoire. Lire la D.O. à 360 nm. La courbe d'étalonnage est construite à partir de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dont les concentrations vont de 0,125 mg/ml à 1 mg/ml, zone où la D.O. à 360 nm est proportionnelle à la concentration en sulfates.

#### G - DOSAGE DES OSAMINES

Le dosage des osamines est effectué par la technique de NEUHAUS et LETZRING (T<sub>4</sub>). Cette technique qui nécessite une extraction des chromogènes par l'alcool iso-amylique présente l'avantage de permettre une estimation en présence des pigments du cheveu.

1°) Réactifs

a- Réactif à l'acétyl acétone

Il est obtenu en mélangeant 94 ml de tampon carbonate de pH 10,2 (15 g de bicarbonate de sodium et 172 g de carbonate de sodium par litre) et 10 ml d'acétyl acétone.

b- Réactif d'Ehrlich (préparation extemporanée)

- p-diméthylaminobenzaldéhyde 400 mg
- HCl concentré (32 %) 1,5 ml
- alcool iso-amylque 13,5 ml

2°) Dosage des osamines contenus dans le mycélium de K. ajelloi

a- Hydrolyse

Le matériel à étudier est hydrolysé par HCl 4 N pendant 4 heures à 105 °C à raison de 1 ml d'HCl 4 N pour 2 mg de matériel à hydrolyser.

Après hydrolyse, l'HCl est évaporé à sec. Le résidu est repris par l'eau et ré-évaporé à sec et enfin dissous dans 16 ml d'eau.

b- Formation des chromogènes

4 ml de la solution précédente sont ajoutés à 1 ml de réactif à l'acétyl acétone. Le mélange est chauffé 20 minutes à 100°C. Après refroidissement, on ajoute 4 ml d'alcool iso-amylque afin d'extraire les chromogènes. Après agitation et centrifugation, on prélève 4 ml de surnageant.

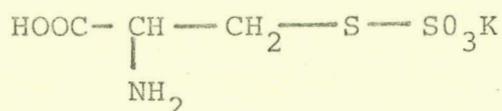
c- Condensation avec le réactif d'Ehrlich.

Aux 4 ml de surnageant, on ajoute 1 ml de réactif d'Ehrlich ; on laisse 15 minutes à l'obscurité à la température du laboratoire, puis on mesure la D.O. à 530 nm en mettant de l'alcool iso-amylque dans la cuve de référence.

L'étalonnage est fait avec une gamme de solutions de glucosamine dont les concentrations varient de  $12,5\mu$  g/ml à  $200\mu$ g/ml.

#### H - PREPARATION DE S-SULFOCYSTEINE

Elle a été réalisée selon la technique de INGLIS et LIU (T<sub>5</sub>). La technique, comme nous l'avons utilisée, conduit à l'obtention du sel de potassium anhydre.



#### Mode opératoire

6,5 g de tétrathionate de potassium sont dissous dans 60 ml d'eau sous agitation magnétique à la température du laboratoire.

On ajoute ensuite 2,42 g de cystéine et on laisse en contact pendant 1 heure à la température du laboratoire sous agitation magnétique modérée.

On met ensuite le mélange 15 heures à + 4°C, puis on filtre sur Millipore  $0,45\mu$ .

Au filtrat, on ajoute de l'éthanol pur pour obtenir une concentration en alcool de 70 % et on laisse à + 4°C. la S-sulfocystéine précipite sous forme de fines aiguilles. Le précipité recueilli par filtration est redissous dans un peu d'eau et la S-sulfocystéine re-précipitée par l'éthanol à 70 % à + 4°C.

Les cristaux sont lavés avec de l'éthanol à 70 % vol/vol et séchés au dessiccateur sous vide.

La pureté est contrôlée par l'analyse élémentaire : le contenu en carbone, l'hydrogène et l'azote est mesuré après combustion dans un appareil Perkin Elmer 240

et le contenu en potassium par spectrométrie de flamme.

Les pourcentages mesurés correspondent aux valeurs théoriques (voir tableau ci-après)

	C	H	N	K
% Théorique	15,06	2,51	5,86	16,32
% Trouvé	15,10	2,61	5,77	16,52
Ecart en %	0,6	4	1,5	1,2

Par ailleurs, le diagramme obtenu sur un analyseur automatique d'acides aminés de type Multichrom BECKMAN muni d'une colonne échangeuse de cations type M 72 ne comporte qu'un seul pic homogène et révèle l'absence d'autres acides aminés, notamment l'absence de cystine et de cystéine.

Le comportement de la S-sulfocystéine sur résine d'échangeuses d'anions est décrit dans le chapitre : "Analyse automatique d'acides aminés".

#### I - ANALYSES AUTOMATIQUES D'ACIDES AMINES

=====

##### 1°) Acides aminés constitutifs des protéines et des peptides

###### a- Hydrolyse

Les protéines et peptides sont hydrolysés sous vide (dans un tube préalablement purgé de son air par un courant d'azote) par HCl 5,6 N à 105°C pendant 24 heures à raison de 1 ml de HCl 5,6 N par mg de protéide.

L'hydrolysate est ensuite dilué 3 fois par de l'eau déminéralisée et distillée, évaporé sous vide dans un appareil EVAPOMIX réglé à 35°C, repris une fois par de l'eau et ré-évaporé à sec dans les mêmes conditions et enfin, repris par du tampon citrate de sodium 0,2 M, pH 2,2.

Lorsque l'on veut doser le tryptophane, il est indispensable d'ajouter 2 mg de tryptamine par ml d'acide chlorhydrique 5,6 N ; on peut remplacer l'HCl 5,6 N par l'acide méthane sulfonique 4 M (AMS), ce qui représente l'avantage de supprimer l'évaporation. En effet, il suffit d'ajouter de la soude pour remonter le pH entre 2 et 5 (environ 0,9 ml de soude 4 M par ml d'AMS 4 M) et de diluer 4 fois avec le tampon citrate 0,2 M pH 2,2 avant de déposer l'échantillon sur la colonne échangeuse de cations de l'analyseur. La dilution par le tampon citrate est nécessaire pour obtenir une bonne résolution des premiers acides aminés élués de la colonne (de l'acide aspartique à la proline).

Cette dilution apparaît comme le seul inconvénient de cette méthode d'hydrolyse qui, cependant, présente l'avantage d'assurer une meilleure libération des acides aminés hydrophobes tels que la valine, isoleucine, leucine.

#### b- Analyses automatiques

Les analyses ont été effectuées par des analyseurs automatiques soit JEOL 5AH, soit Multichrom BECKMAN selon la technique de SPACKMAN et coll. (T7). La seule différence notable entre le JEOL 5AH et le Multichrom BECKMAN réside dans le fait que le "JEOL" utilise deux colonnes : l'une pour les acides aminés acides et neutres et l'autre pour les acides aminés basiques, alors que le "BECKMAN" n'utilise qu'une seule colonne ne nécessitant qu'un seul dépôt. La séparation des acides aminés est réalisée par une colonne échangeuse de cations ; leur élution est assurée par un système de tampons citrates.

A titre d'exemple, nous donnons ci-dessous les conditions d'analyse sur le Multichrom BECKMAN.

Résine : M 72 Beckman

Colonne : 0,9 cm de diamètre intérieur et 55 cm de hauteur

Température de la colonne : 45°C pendant 47 minutes puis 55°C pendant 153 minutes, puis 65°C pendant 80 minutes.

Tampons utilisés :

- 1er tampon : tampon citrate pH 3,22 ; 0,2 M en Na<sup>+</sup> pendant 108 min.
- 2è tampon : tampon citrate pH 4,25 ; 0,2 M en Na<sup>+</sup> pendant 29 min.
- 3è tampon : tampon citrate pH 5,28 ; 0,35 M en Na<sup>+</sup> pendant 18 min.
- 4è tampon : tampon citrate pH 6,28 ; 1,2 M en Na<sup>+</sup> pendant 96 min.

La colonne est ensuite régénérée par la soude 0,2 M pendant 20 minutes puis ré-équilibrée avec le tampon citrate pH 3,22 pendant 40 minutes.

La durée totale d'une analyse est de 310 minutes.

## 2°) Analyse de la S-sulfo-cystéine et d'autres acides aminés dérivés de l'oxydation de la cystine

La S-sulfocystéine (Cy-S-SO<sub>3</sub>H), l'acide cystéique (CySO<sub>3</sub>H) et l'acide cystéine sulfinique (Cy-SO<sub>2</sub>H) ne sont pas retenus sur la colonne échangeuse de cations et se retrouvent, dans les conditions d'analyse standard décrites ci-dessus, dans un même pic.

Nous avons essayé de fixer et de séparer ces acides aminés en utilisant une colonne échangeuse d'anions. De fait, nous avons obtenu une excellente séparation de ces trois composés d'oxydation de la cystine à la fois lorsque ces produits sont seuls présents dans l'échantillon et lorsque tous les acides aminés constitutifs des protéines existent dans l'échantillon. (RUFFIN et BISERTE) (29).

Les analyses sont réalisées sur le Multichrom BECKMAN dans les conditions opératoires suivantes :

Résine : Aminex A 25 : c'est un polystyrène ponté par des groupements divinyl benzène et portant des groupes ammonium quaternaire. La taille des grains est 17,5 ± 2 μ.

Colonne : 0,8 cm de diamètre intérieur et 35 cm de hauteur.

Température de la colonne : 30°C pendant toute l'analyse

Nous avons mis au point deux programmes de travail P1 et P2 :

Programme P1 : Il permet le dosage de l'acide cystéine sulfinique, de l'acide cystéique et de la S-sulfo cystéine, si aucun autre acide aminé n'est présent dans l'échantillon et il permet en outre le dosage de la S-sulfo-cystéine quand tous les acides aminés "standard" sont présents dans l'échantillon (Figure F1).

Ce programme utilise un seul tampon d'éluion : le tampon citrate 0,2 M en Na<sup>+</sup> de pH 2,2. L'analyse proprement dite dure 80 minutes. La régénération de la colonne par la soude 0,2 M dure 20 minutes et le ré-équilibrage par le tampon citrate 0,2 M pH 2,2 dure 40 minutes. La durée totale d'une analyse est de 140 minutes.

Programme P2 : Il permet le dosage de l'acide cystéine sulfinique, de l'acide cystéique et de la S-sulfo-cystéine lorsque tous les autres acides aminés sont présents (Figure F2).

Ce programme P2 est plus complexe et plus long que P1 ; en effet, le temps complet d'une analyse est de 240 minutes. Ce programme peut être mis en oeuvre après régénération, ré-équilibrage et rinçage de la colonne. Il se décompose de la façon suivante :

1er éluant : acide acétique 0,01 M pendant 60 minutes.

2è éluant : tampon citrate 0,2 M pH 2,2 pendant 80 minutes.

Puis régénération par la soude 0,2 M pendant 20 minutes

Puis ré-équilibrage par la tampon citrate pH 2,2 pendant 40 minutes.

Enfin, rinçage par l'acide acétique 0,01 M pendant 40 minutes avant le dépôt de l'échantillon suivant.

Il est important de noter que la S-sulfocystéine et l'acide cystéine sulfinique ne résistent pas à l'hydrolyse acide.

Le dosage de ces deux acides aminés présents dans les protéines ne peut donc se faire qu'après hydrolyse enzymatique.

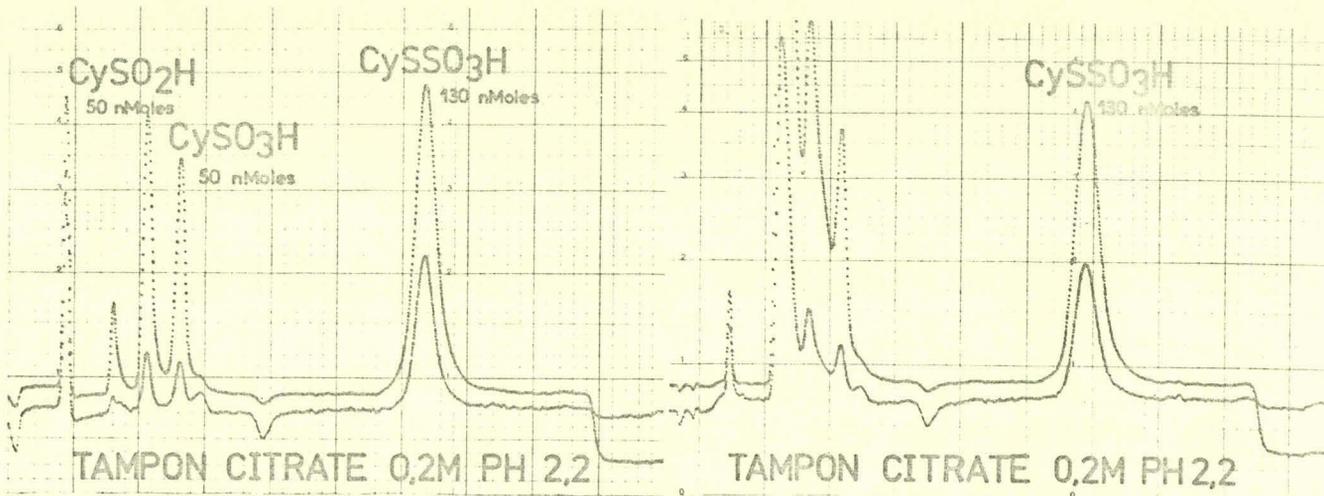


Figure F<sub>1</sub>

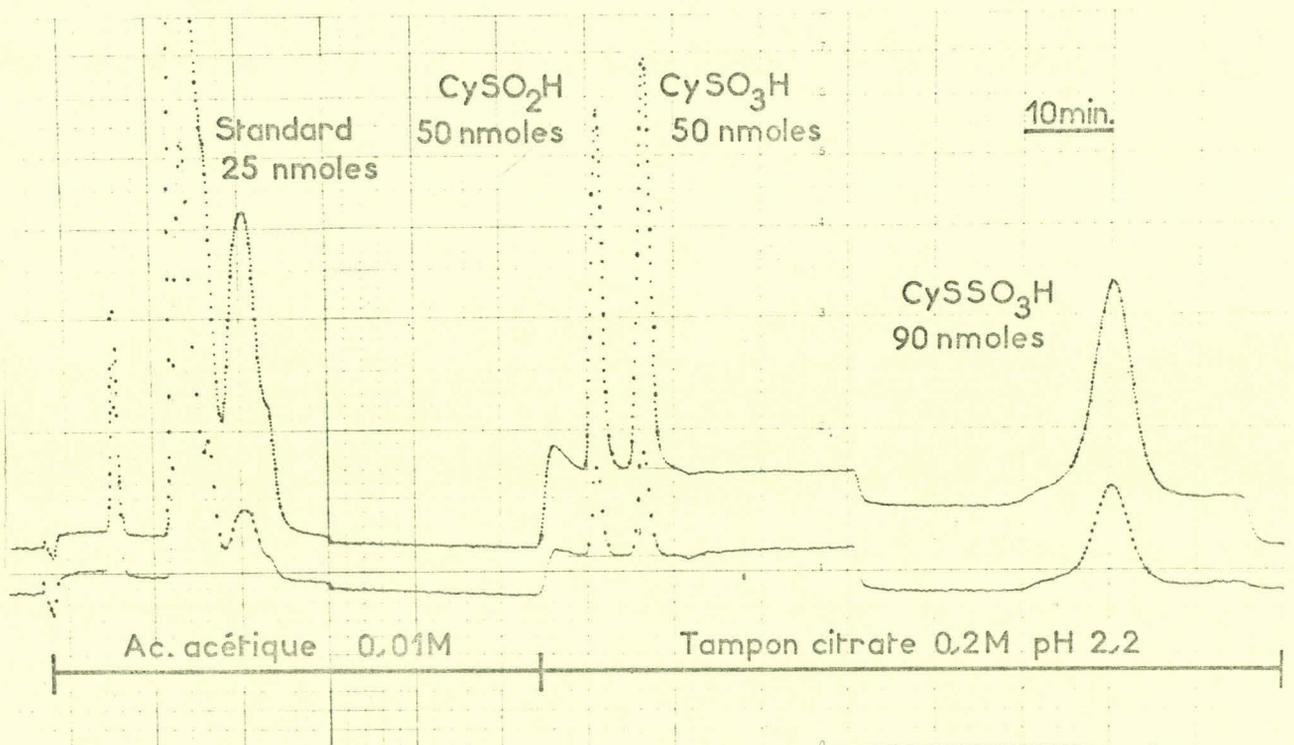


Figure F<sub>2</sub>



La protéine à hydrolyser est mise en solution dans du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4 (1 mg de protéine pour 2 ml de tampon), cette solution est portée 3 minutes au bain marie bouillant afin de détruire toute l'activité de la solution. Après refroidissement, on ajoute 20  $\mu$ l d'une solution à 1 mg/ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 de pronase E MERCK à 18 U.P./mg. Le mélange est maintenu pendant 24 heures, puis on inactive la pronase en portant le mélange 5 minutes au bain marie bouillant. On refroidit et on ajoute 20  $\mu$ l de leucineaminopeptidase de rein de Porc type IV SIGMA à 2 mg/ml et à 6,6 U.A./mg. On porte à nouveau à 37°C pendant 24 heures. On arrête alors l'hydrolyse en amenant le pH à 2 par HCl N

L'hydrolysate est dilué 2 fois avec du tampon citrate 0,2 M de pH 2,2 puis déposé sur la colonne de l'analyseur automatique d'acides aminés.

## J - ELECTROPHORESES

### 1°) Electrophorèse en film liquide

Les électrophorèses en film liquide ont été réalisées selon la technique de HANNIG (T8). L'appareil utilisé est un ELPHOR VAP N°1 (BENDER et HOBEIN). Les conditions opératoires retenues sont les suivantes :

Différence de potentiel	:	2 200 volts
Intensité	:	160 m A
Température	:	+5°C
Tampon de la chambre	:	acide citrique 0,008 <u>M</u> , Tris 0,08 <u>M</u> pH 8,6
Tampon des électrodes	:	acide citrique 0,0256 <u>M</u> , Tris 0,24 <u>M</u> pH 8,6

L'appareil permet de recueillir 48 fractions réparties de l'anode à la cathode sur lesquelles on effectuera différents dosages.

## 2°) Electrophorèses sur gel de polyacrylamide

Toutes les électrophorèses sur gel de polyacrylamide sont faites sur des plaques rectangulaires. Les compositions des gels et du tampon électrode sont celles données par DAVIS (T9).

L'appareillage et la méthodologie utilisés sont ceux décrits par KERCKAERT (T10).

Le gel comprend 2 parties : une partie gel de séparation où la concentration en acrylamide est relativement élevée (10 % ou 12 %) et une partie constituée par le gel de concentration nettement moins concentré en acrylamide (4,8 %). Dans cette seconde partie, on place dans le gel, avant polymérisation, un peigne en matière plastique qui délimitera des petits puits dans lesquels seront faits les dépôts.

### a- Constitution des gels

Les gels sont préparés à partir de différentes solutions que l'on peut conserver à la température du laboratoire pendant une semaine ; il s'agit des solutions suivantes :

- solution 1A : 36,6 g de Tris + 40 ml d'eau + HCl 32 % au 1/2 pour amener le pH à 8,9 + eau pour amener le volume à 100 ml.
- Solution 2A : 48 g d'acrylamide monomère + 1,28 g de bis-acrylamide + eau pour amener le volume à 100 ml.
- Solution 3A : persulfate d'ammonium : 0,5 g + 4,5 ml d'eau
- Solution 1B : 5,7 g de Tris + 40 ml d'eau + acide sulfurique à 60% pour amener le pH à 6,7 + eau pour amener le volume à 100 ml.

Pour faire 20 ml de gel de séparation à 12 % de pH 8,6 il faut : 2,5 ml de solution 1A ; 5 ml de solution 2A ; 12,4 ml d'eau ; 100 µl de solution 3A et 10 µl de N,N,N',N' tétraméthylènediamine (TEMED).

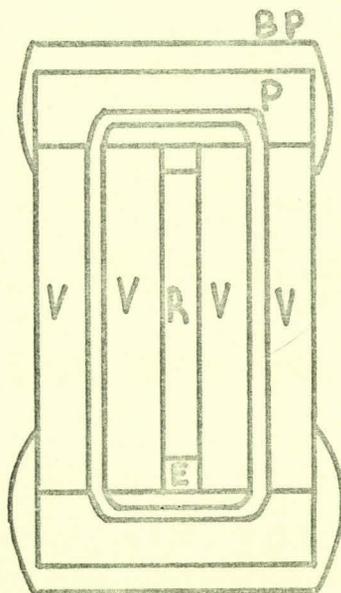
Pour faire 10 ml de gel de concentration à 4,8 %, il faut 1,25 ml de solution 1B ; 1 ml de solution 2A ; 7,65 ml d'eau ; 100 µl de solution 3A et 5 µl de TEMED.

b- Préparation des gels

Le réservoir qui contiendra le gel polymérisé est constitué par deux plaques de verre, rectangulaires, de dimension 100 x 150 mm, maintenues écartées de 1 mm par des entretoises en matière plastique et placées dans un sac étanche en matière plastique.

Ce sac est lui-même maintenu appliqué sur le réservoir par deux autres plaques de verre (100 x 150 mm).

Les plaques sont maintenues serrées par la pose à chaque extrémité d'une bande en matière plastique, profilée en U. La vue de dessus du montage est présentée sur le schéma 1

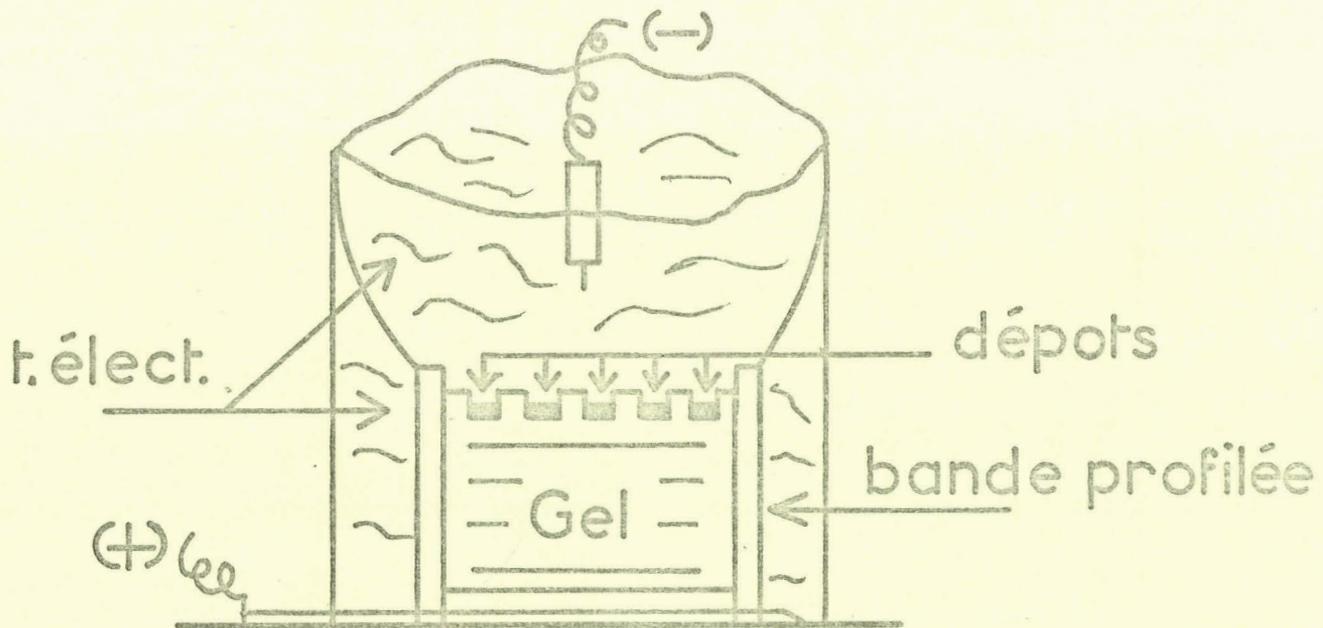


- P = sac en matière plastique
- BP = bande profilée en U
- V = plaque de verre
- R = réservoir d'acrylamide
- E = entretoise

Vue de dessus de l'appareil à électrophorèse de  
KERCKAERT.

SCHEMA 1

Quand l'acrylamide est polymérisé, on coupe le fond du sac en plastique et on place l'appareil verticalement dans une cuve en matière plastique dont les dimensions sont 190 mm de longueur, 50 mm de largeur et 190 mm de hauteur. La partie supérieure du sac en matière plastique qui dépasse les plaques, constitue le bac supérieur ; le bac inférieur est constitué par toute la partie de la cuve non occupée par l'appareil (voir SCHEMA 2)



SCHEMA 2

## Vue de face de l'appareil de KERCKAERT

Le tampon mis dans les 2 bacs a la composition suivante : Tris = 3 g ; glycoColle = 14,4 g, on ajoute de l'eau pour obtenir un volume de 1 500 ml. Le pH de ce tampon est de 8,3.

c- Réalisation des électrophorèses.

Les échantillons contiennent 10 % de glycérine et sont obtenues si possible dans la solution 1A diluée 10 fois.

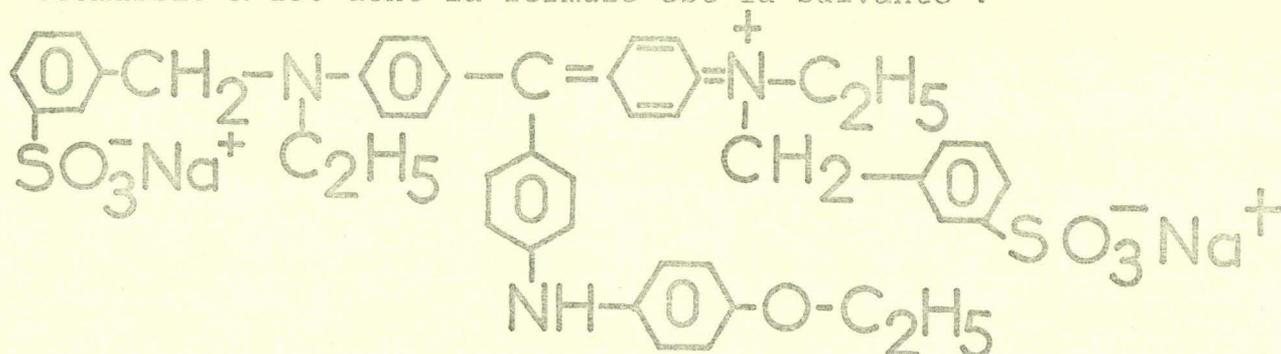
L'addition du glycérol alourdit l'échantillon et permet de faire le dépôt à la seringue après avoir rempli le bac supérieur avec le tampon des électrodes. Les échantillons contiennent en outre du bleu de bromophénol qui sert de marqueur de migration au cours de l'électrophorèse.

- Les électrophorèses analytiques se font sous une différence de potentiel de 200 volts maintenue constante. Au cours de l'expérience, la cuve à électrophorèse est placée dans une chambre à +6°C.
- Les électrophorèses préparatives se font aussi sous une différence de potentiel constante : soit 200 volts pendant 5 à 6 heures, soit 90 volts pendant 15 heures. La cuve est également placée dans une chambre à + 6°C. Les entretoises utilisées (voir SCHEMA 1) ont ici une épaisseur de 5 mm, ce qui permet des dépôts renfermant jusqu'à 20 mg de protéine.
- Electrophorèses en milieu SDS pour déterminer les masses moléculaires. Le gel et le tampon électrodes contiennent du SDS à la concentration de 0,1 %. Les protéines dont on veut déterminer la masse moléculaire sont mises dans une solution qui contient 2 % de SDS ; 2 % de 2-mercaptoéthanol et 10 % de glycérol et incubées 2 minutes à 80°C avant d'être déposées sur le gel. L'électrophorèse est dans ce cas faite avec ampérage constant (20 mA pour une plaque de section 13 x 1 mm) et dure 2 heures.
- Electrophorèses sur gel contenant la caséine. Des électrophorèses ont été faites selon la technique décrite par KAMINSKI et BUSHUK (T11). Le gel de séparation à 12 % en acrylamide et le gel de concentration à 4,8 % contiennent de la caséine à raison de 1 ml de caséine à 1 % pour 10 ml de gel.

Après l'électrophorèse proprement dite, on procède à la révélation de l'activité protéolytique de la façon suivante : le gel est placé dans une solution tampon approprié (tampon phosphate 0,1 M pH 7,4) pendant 1/2 heure à 40°C, ce qui entraîne la digestion de la caséine par les protéases se trouvant dans le gel, il suffit ensuite de colorer la caséine non digérée par un colorant des protéines (bleu de Coomassie) pour révéler la présence de protéases sous forme de bandes claires (incolores) sur fond coloré (caséine non digérée).

## d- Colorations et révélations

- Protéines : elles sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R 250 dont la formule est la suivante :



La solution utilisée pour la coloration est la suivante :

5 g de bleu de Coomassie sont dissous dans 450 ml d'éthanol, on ajoute ensuite 100 ml d'acide acétique et 450 ml d'eau

La coloration doit durer au moins deux heures à la température du laboratoire.

La solution utilisée pour décolorer le gel est la suivante :  
éthanol = 250 ml ; acide acétique = 100 ml ; eau = 450 ml.

La longueur du gel après décoloration est la même qu'à la fin de l'électrophorèse ; ce qui est très intéressant dans le cas des électrophorèses en milieu SDS pour évaluer avec précision la masse moléculaire des protéines.

- Révèlation de l'activité aminopeptidasique avec le L-leucine-p-nitroanilide (Leu-p-NA). Après l'électrophorèse, le gel est déposé sur un papier WHATMAN 3 MM, imbibé d'une solution de Leu-p-NA 4 mMolaire dans le tampon borate 0,2 M pH 9,3. Les bandes de gel contenant une aminopeptidase se colorent en jaune à cause de la libération de p-nitroaniline ; cette coloration diffuse très rapidement et il faut donc l'interpréter immédiatement. Cette révélation permet de colorer ensuite le gel au bleu de Coomassie pour localiser l'ensemble des fractions protéiques.
- Révèlation de l'activité aminopeptidasique avec le L-leucine-β-naphtylamide et le sel de diazonium de l' o-amino-azotoluène (FAST GARNET G.B.C.). Le gel est déposé sur un papier WHATMAN 3 MM, imbibé d'une solution de L-leucine-β-Naphtylamide 4 mM dans le tampon borate 0,2 M pH 9,3. Ce substrat est décomposé par les aminopeptidases en libérant de la β-naphtylamine dans le gel.

Après un temps de contact de 1/4 d'heure, le gel est immergé dans une solution de FAST GARNET G.B.C. à 0,1 % dans du tampon acétate 1 M de pH 4,5. Le colorant se couple à la naphtylamine pour donner un produit rouge foncé. Les bandes rouges ainsi obtenues apparaissent rapidement (1 à 2 minutes) et ne diffusent pas contrairement aux bandes de p-nitroaniline. Les enzymogrammes obtenus restent visibles au moins pendant un mois lorsqu'ils sont conservés dans le tampon acétate 0,33 M de pH 4,5.

#### K - DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage est effectué par la méthode de LOWRY (T12) selon une modification décrite par SCHACTERLE et POLLACK (T13).

##### 1°) Réactifs

###### a- Réactif au cuivre

Dissoudre 1 g de tartrate double de K et Na et 0,5 g de  $\text{CuSO}_4$  dans 250 ml d'HCl mMolaire, ajouter 500 ml de soude N, puis 100 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , agiter pour dissoudre, ajouter de l'eau pour amener à 1 litre, attendre une journée avant de l'utiliser. Ce réactif conserve 3 mois à la température du laboratoire.

###### b- Réactif au phénol.

On dilue le réactif de FOLIN commercial qui est 2 N d'abord 2 fois, puis 9 fois avec de l'eau.

##### 2°) Réaction

a- Mélanger 0,5 ml de "réactif au cuivre" et 0,5 ml d'échantillon contenant de 0 à 100  $\mu\text{g/ml}$ . Laisser reposer 10 minutes.

b- Ajouter ensuite 2 ml de réactif au phénol" et porter 5 minutes au bain marie à 55°C.

c- Refroidir pendant 5 minutes dans l'eau glacée

d- Lire la D.O. à 650 nm

Les résultats sont exprimés en équivalent sérumalbumine bovine qui est utilisée pour faire la courbe d'étalonnage.

La zone de linéarité s'étend de 0 à 125  $\mu\text{g/ml}$  en concentration initiale de protéines dans l'échantillon. Cette méthode est très sensible puisqu'une solution de sérumalbumine bovine à 100  $\mu\text{g/ml}$  donne une D.O. corrigée voisine de 0,35 c'est-à-dire 2 à 3 fois plus que la D.O. obtenue pour un " LOWRY " réalisé à température ambiante par une chaîne automatique TECHNICON.

#### L - DOSAGE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

Les mesures sont faites en utilisant une solution à 1 % de caséine HAMMARSTEN : 1 g de caséine est mis dans 80 ml d'eau ; en maintenant la suspension sous agitation, on ajoute un peu de soude 1 N pour obtenir la dissolution complète, puis on ajoute de l'acide acétique 2 N jusqu'à un léger trouble que l'on fait disparaître par 1 goutte de soude 0,1 N

Dosage : dans un tube à essai, on mélange x ml d'échantillon (x varie de 0 à 0,5) (3 - x) ml de tampon choisi pour la mesure (tampon phosphate 0,025 M pH 7,4) et 1 ml de solution de caséine.

Après incubation pendant une heure à 40°C, l'hydrolyse de la caséine est arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique à 45 % (p/v) pour précipiter la caséine non digérée. On centrifuge et on mesure la D.O. à 278 nm qui traduit principalement le contenu en tyrosine du surnageant ; la concentration de tyrosine qui donnerait la même D.O. est calculée sachant que son  $\epsilon_M^{278} = 1\ 260$  en milieu acide ou neutre.

La quantité de tyrosine libérée dans le tube à hémolyse est convertie en unités protéolytiques. Une unité protéolytique (U.P.) est la quantité d'enzyme qui, dans les conditions indiquées, libère par minute l'équivalent de 1  $\mu$ g de tyrosine. L'activité spécifique est exprimée en unités protéolytiques par mg de protéines (U.P./mg).

#### M - MESURE DE L'ACTIVITE KERATINOLYTIQUE

La technique utilisée est celle décrite par NOVAL et NICKERSON (T14) modifiée par YU et coll. (T15). Cependant, au poil de cobaye utilisé par YU et coll., nous avons préféré utiliser le cheveu du même lot que celui sur lequel K. ajelloi s'est développé.

Mode opératoire : 50 mg de cheveu délipidé à l'éther de pétrole sont mis en suspension dans 4 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, on ajoute l'enzyme (50  $\mu$ l correspondant à 1 ou 2  $\mu$ g de protéine) et on porte au bain marie à 40°C pendant une heure. L'attaque du cheveu est arrêtée en plongeant les tubes dans l'eau glacée ; puis on sépare la solution des cheveux par filtration sur laine de verre préalablement lavée à l'acide chlorydrique concentré et rincée à l'eau. La D.O. 278 nm de la solution, corrigée de la D.O. de deux témoins (cheveu dans le tampon et enzyme dans le tampon) est convertie arbitrairement en activité kératinolytique. L'unité kératinolytique (U.K.) est la quantité d'enzyme qui, dans les conditions décrites, correspond à une D.O. 278 nm, corrigée de 0,100. L'activité spécifique sera exprimée en unités kératinolytiques par mg de protéine (U.K./mg).

#### N - ACTIVITE AMINOPEPTIDASIQUE

L'activité aminopeptidasique est mesurée en utilisant L-leucine-p-nitroanilide (Leu-p-NA). Ce substrat libère sous l'action des aminopeptidases de K. ajelloi, de la p-nitroaniline qui absorbe fortement à 405 nm ( $\epsilon_M = 10\ 000$ ). La solution de substrat utilisée est une solution 16 mMolaire dans un mélange diméthylformamide/eau (1/2).

### 1°) Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse, on met :

- x  $\mu$ l de préparation enzymatique
- (2 300 - x)  $\mu$ l de tampon choisi pour la mesure
- 200  $\mu$ l de solution de (Leu-p-NA) (16 mMolaire).

Après 15 minutes d'incubation à 30°C, la réaction est stoppée par addition de 500  $\mu$ l d'acide acétique à 20 % (v/v) et on lit la D.O. 405 nm que l'on convertit en unités aminopeptidasiques. Une unité aminopeptidasique (U.A.) est la quantité d'enzyme qui libère, dans les conditions décrites, 1  $\mu$ mole de p-nitroaniline. L'activité spécifique sera exprimée en unités aminopeptidasiques par mg de protéine (U.A./mg).

### 2°) Activité en fonction du pH

Pour connaître les variations de l'activité aminopeptidasique en fonction du pH, nous avons utilisé les solutions tampon suivantes :

- tampon acétate de sodium 0,1 M de pH 3,6 à pH 5,6
- tampon phosphate (monopotassique et disodique) 0,1 M de pH 5,0 à pH 8,2.
- tampon borate de sodium 0,1 M de pH 7,8 à pH 10,0
- tampon glycoColle 0,1 M de pH 9,0 à pH 12,0.

### 3°) Activité en présence d'effecteurs

Pour mesurer l'activité des aminopeptidases de K. ajelloi en présence de réactifs divers, nous avons effectué une pré-incubation de 15 minutes à 25°C avant de procéder à la mesure de l'activité comme décrit au paragraphe 1.

### 4°) Activité des aminopeptidases sur des dipeptides

Les dipeptides sont mis en solution 10 mMolaire dans du tampon borate 0,1 M pH 9,3 (pH optimum des aminopeptidases de K. ajelloi)

Les mesures d'activité sont faites suivant le protocole suivant :

10  $\mu$ l de solution d'aminopeptidase sont ajoutés à 200  $\mu$ l de solution de dipeptide et le mélange est incubé pendant une heure à 30°C. 10  $\mu$ l de ce mélange sont ensuite déposés sur une plaque de silice 60 MERCK et chromatographiés en même temps que les acides aminés constitutifs des peptides et que les témoins (peptides et enzymes) dans un des systèmes suivants :

- n-butanol/acide acétique/eau 4/1/5
- n-butanol/pyridine/eau 6/4/3
- benzène/méthanol 95/5

En ce qui concerne la leucinamide ; la séparation de la leucine et de la leucinamide est réalisée par le solvant n-butanol/pyridine/eau (6/4/3), mais sur papier WHATMAN 3 MM

#### 5°) Mesures de cinétique (voir chapitre U)

0 - ETUDE DES COUPURES DES LIAISONS PEPTIDIQUES DE PROTEINES DE STRUCTURE PRIMAIRE CONNUE : Histone H<sub>4</sub> de thymus de Porc et peptide N-terminal de myoglobine de Boeuf.

#### 1°) Hydrolyse

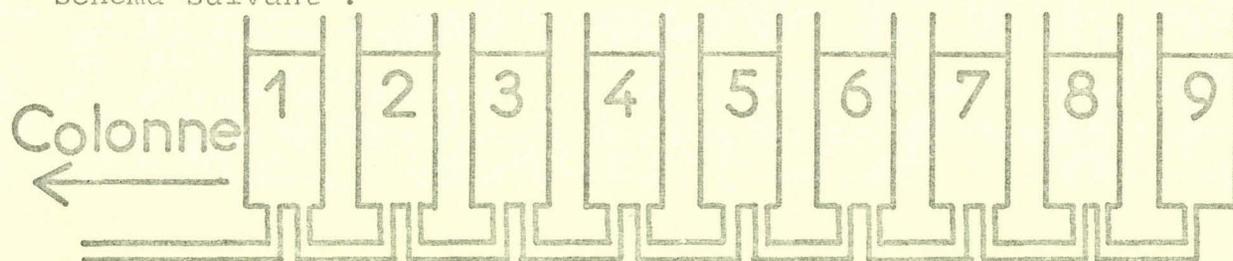
Les protéines sont hydrolysées par les enzymes de K. ajelloi (enzymes de la fraction L) selon le protocole suivant : 100 mg de substrat (Histone H<sub>4</sub> ou peptide N-terminal de myoglobine) sont mis en solution dans 18 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,4. On ajoute 6 ml de solution enzymatique qui d'après le dosage représentent 1 mg de protéine. On laisse incuber pendant 2 heures à 40°C. L'hydrolyse est alors arrêtée par addition d'acide formique pour amener le pH à 3.

#### 2°) Séparation de peptides obtenus par chromatographie

La solution obtenue est évaporée à sec puis reprise par 2 ml d'acide acétique à 20 % et déposée sur une colonne de résine TECHNICON CHROMOBEADS P, équilibrée en tampon pyridine 0,1 M, acide formique 0,8 M de pH 2,9 et maintenue à 60°C.

Les dimensions de la colonne sont les suivantes : 140 cm de hauteur et 0,635 cm de diamètre intérieur. L'élution des différents peptides est réalisée par un double gradient linéaire en pyridine allant de 0,1 M à 2 M et linéaire en pH de 2,9 à 5,0 puis par du tampon 2 M en pyridine de pH 5,0.

Le gradient d'élution est obtenu à l'aide d'un vase à gradient à 9 chambres de 200 ml disposés comme l'indique le schéma suivant :



La composition des chambres est la suivante

Chambre N°	volume de tampon 1	volume de tampon 2	volume de tampon 3	volume de tampon 4	Molarité en pyridine
1	200				0,1
2	150	50			0,2
3	100	100			0,3
4	50	150			0,4
5		200			0,5
6		200			0,5
7		100	100		0,75
8			200		1
9				200	2

Tampon 1 : Pyridine, acide formique pH 2,90 0,1 M en pyridine dont la composition est la suivante :

- 16 ml de pyridine redistillée sur baryte
- 40 ml d'acide formique (R.P.)
- eau distillée : 1 500 ml

On ajuste le pH à 2,90 et on complète à 2 litres avec de l'eau distillée.

Tampon 2 : Pyridine, acide acétique pH 5,00 0,5 M en pyridine obtenu en diluant le tampon 4.

Tampon 3 : Pyridine, acide acétique pH 5,00 1 M en pyridine obtenu en diluant le tampon 4

Tampon 4 : Pyridine, acide acétique pH 5,0 2 M en pyridine dont la composition est la suivante :

- |                        |          |
|------------------------|----------|
| - pyridine redistillée | 322,5 ml |
| - acide acétique       | 200 ml   |
| - eau                  | 1 300 ml |

On amène le pH à 5,0 et on complète à 2 litres avec de l'eau.

Après passage du gradient, on termine l'élution par le tampon 4. Le débit utilisé au cours de l'élution est de 33 ml/heure et on collecte 6 tubes à l'heure.

Sur chaque tube, on repère la présence de peptides par la réaction à la ninhydrine ; celle des peptides à arginine par la réaction de SAKAGUCHI ; celle des peptides à histidine (et à tyrosine) par la réaction de PAULY. Ces trois réactions sont réalisées de façon automatique sur une chaîne de dosage TECHNICON.

#### Réaction à la ninhydrine

Préparation de la solution de ninhydrine. La solution fabriquée conservée et utilisée sous azote est obtenue en mélangeant les solutions A et B.

<u>Solution A</u>	- ninhydrine.....	60 g
	- hydrindantine.....	1,5 g
	- méthylcellosolve.....	500 ml

<u>Solution B</u>	- méthylcellosolve.....	2 150 ml
	- eau distillée.....	2 000 ml
	- tampon acétate de sodium 4 M....	350 ml
	pH 5,51	

Le tampon acétate 4 M de pH 5,51 a la composition suivante :

- CH <sub>3</sub> COONa, 3H <sub>2</sub> O.....	2 720 g
- acide acétique.....	500 ml
- eau distillée.....	qsp 5 litres

### Réaction de Sakaguchi

Réactifs utilisés :

- 1°) solution aqueuse de N-bromosuccinimide à 3 g/litre
- 2°) solution de 8-hydroxyquinoléine, préparée extemporanément en mélangeant :

- 20 ml d'une solution à 1 % de 8-hydroxyquinoléine dans le méthanol
- 364 ml de soude 8 M
- 626 ml d'eau distillée

### Réaction de Pauly

Réactifs utilisés :

- acide sulfanilique 0,5 % dans HCl 0,5 N
- carbonate de sodium 2 M
- Nitrite de sodium à 0,35 % (préparé extemporanément).

Les figures F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> indiquent les montages automatiques utilisés respectivement pour les réactions à la ninhydrine de Sakaguchi et de Pauly.

3°) Analyse des peptides issus de la séparation sur "chromobeads P" par électrochromatographie

a- Electrophorèses

Elles sont faites sur feuille de papier WHATMAN 3 MM (46 x 57 cm). L'électrophorèse est effectuée dans un appareil GILSON DW sous une tension de 2 200 volts pendant 90 minutes ; le tampon utilisé de pH 3,6 a la composition suivante ;

- pyridine R.P. Prolabo redistillée sur baryte : 10 ml
- acide acétique R.P. Prolabo : 100 ml
- eau : 2 890 ml

A la fin de l'électrophorèse, la feuille est séchée, puis soumise à une chromatographie descendante.

b- Chromatographie

La feuille de papier WHATMAN est mise à saturer dans la cuve de chromatographie pendant 5 à 6 heures. La migration dure 15 à 16 heures. Le solvant utilisé est : n-butanol, pyridine acide acétique, eau 15/10/3/12 (v/v).

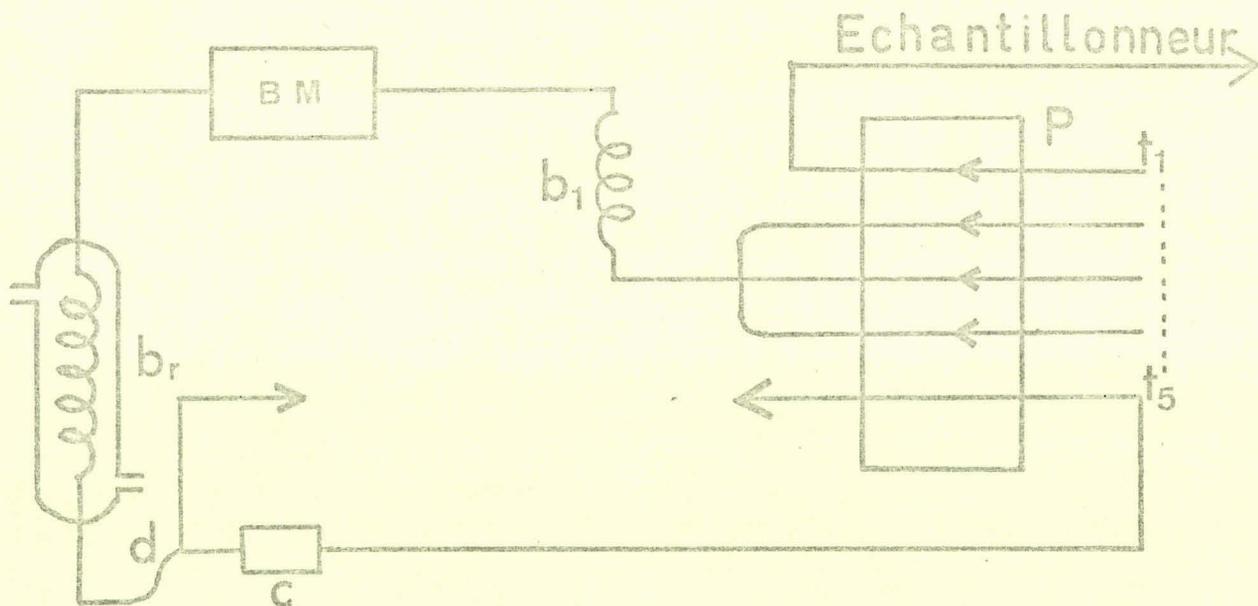
Après la chromatographie, la feuille est de nouveau séchée et on procède à la coloration des peptides par la réaction à la ninhydrine de la façon suivante :

1°) on chauffe la feuille pendant 30 minutes à 90°C pour éliminer toute trace de solvant ou d'ammoniac.

2°) on immerge la feuille dans le réactif ninhydrine-cadmium.

3°) on replace la feuille dans l'étuve dont la température est descendue à 40°C et on chauffe à nouveau jusqu'à 100°C ; les produits réactifs donnent des colorations stables qui sont roses ou jaunes.

## Réaction à la ninhydrine



P Pompe Technicon

BM Bain Marie 95°C

$b_r$  Bobine de refroidissement

$b_1$  Bobine de mélange

d Débulleur

C Colorimètre à 570 nm

$t_1$  Eau

$t_2$  Echantillon 0,60 ml/mn

$t_3$  Azote 0,32 ml/mn

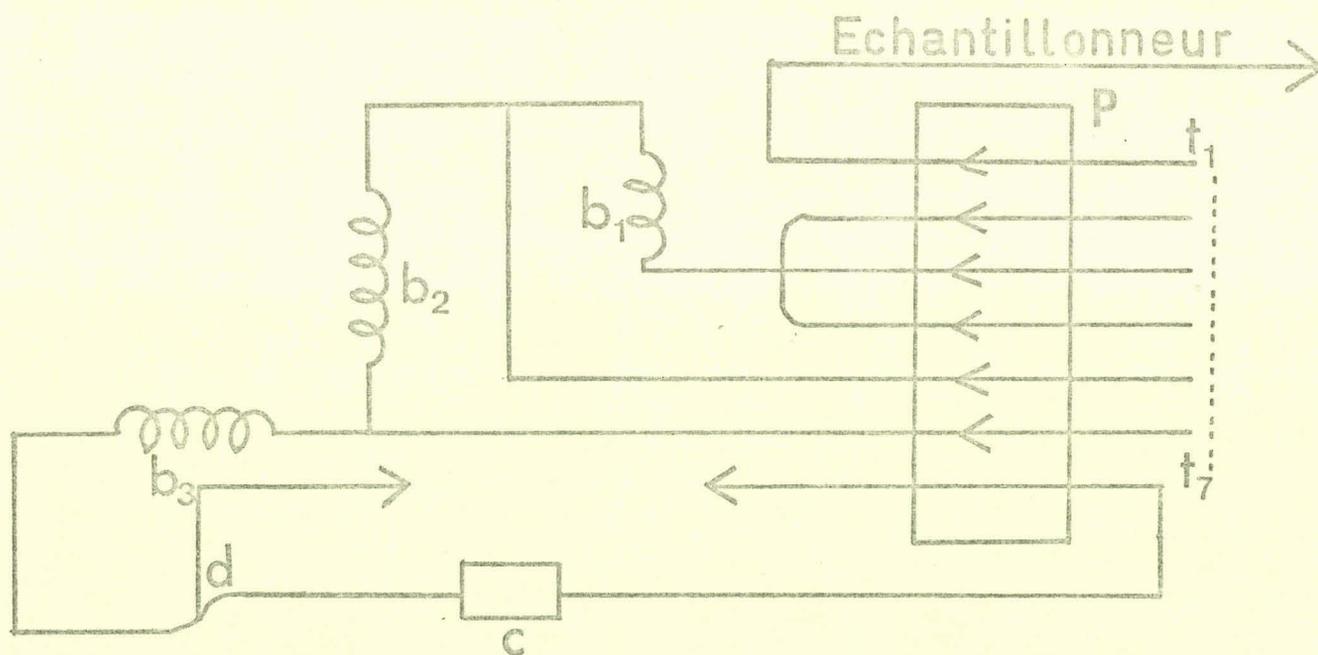
$t_4$  Ninhydrine 0,56 ml/ml

$t_5$  Retour 1,06 ml/ml



Figure F<sub>3</sub>

## Réaction de SAKAGUCHI



**P** Pompe Technicon

**b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>** Bobines de mélange

**d** Débulleur

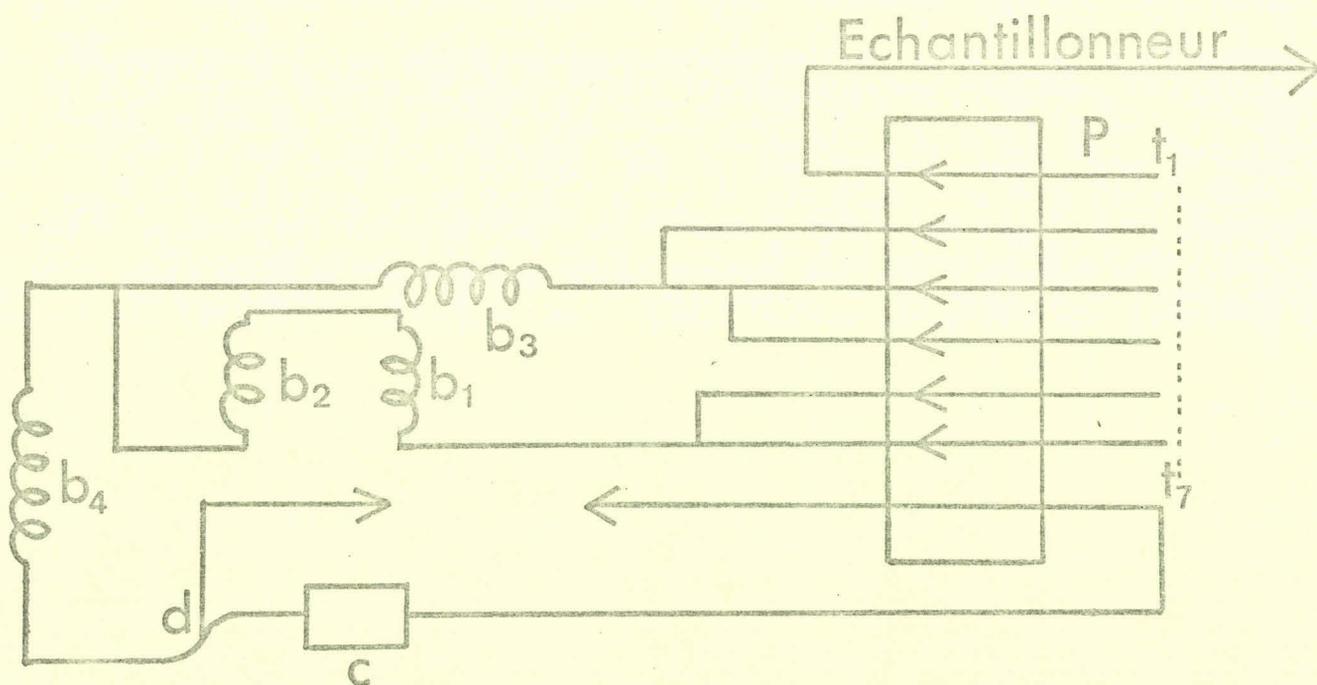
**C** Colorimètre à 505 nm

<b>t<sub>1</sub></b>	Eau		<b>t<sub>5</sub></b>	Hydroxyquinoléine	0,80 ml/mn
<b>t<sub>2</sub></b>	Eau	0,32 ml/mn	<b>t<sub>6</sub></b>	N.bromosuccinimide	0,42 ml/mn
<b>t<sub>3</sub></b>	Air	0,42 ml/mn	<b>t<sub>7</sub></b>	Retour	1,20 ml/mn
<b>t<sub>4</sub></b>	Echantillon	0,32 ml/mn			



Figure F<sub>4</sub>

## Réaction de PAULY



P Pompe Technicon

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> Bobines de mélange

d Débulleur

c Colorimètre à 505 nm

t <sub>1</sub>	Eau		t <sub>5</sub>	NaNO <sub>3</sub>	0,80 ml/mn
t <sub>2</sub>	Air	0,42 ml/mn	t <sub>6</sub>	Acide sulfanilique	0,80 ml/mn
t <sub>3</sub>	Echantillon	0,32 ml/mn	t <sub>7</sub>	Retour	2,00 ml/mn
t <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,00 ml/mn			

Figure F<sub>5</sub>



"Réactif ninhydrine-cadmium"

- Ninhydrine	10 g
- Acétone	1 000 ml
- Acétate de cadmium	1 g
- Acide acétique	50 ml
- Eau	100 ml

On dissout la ninhydrine dans l'acétone et l'acétate de cadmium dans l'acide acétique. Après dissolution de l'acétate on ajoute l'eau et on mélange les deux solutions.

4°) Purification des peptides

Selon la position des taches obtenues en électrochromatographie analytique, la purification des peptides a été effectuée, soit en électrophorèse, soit en chromatographie. Le dépôt se fait le long d'une ligne perpendiculaire à la direction de migration. Après migration, on révèle une bande de chaque côté du dépôt ; les bandes transversales correspondant à la présence de peptides sont éluées par l'acide acétique (R.P.) dilué au dixième avec de l'eau déionisée.

P - PREPARATION DE L'HEXAMETHYLENEDIAMINE SEPHAROSE 4B  
(HMDA-SEPHAROSE) SELON LA TECHNIQUE DE MARCH et coll. (53)

1°) Réactifs

Pour traiter 125 ml de Sépharose 4B décanté, il faut :

- a- 3 litres d'eau déminéralisée
- b- 2,5 litres de tampon bicarbonate de sodium 0,1 M  
pH 9,5
- c- 2,5 litres de tampon bicarbonate de sodium 0,2 M  
pH 9,5 (tampon de couplage)
- d- 250 ml de carbonate de sodium 2 M
- e- 5 litres de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,0 +  
NaCl 0,5 M

- f- 5 litres d'urée 2 M + NaCl 0,5 M
- g- 5 litres de tampon bicarbonate de sodium 0,1 M pH 10  
+ NaCl 0,5 M
- h- 12,5 ml d'acétonitrile (MERCK)
- i- 25 g de bromure de cyanogène (BrCN)
- j- 58 g de HMDA (MERCK)

## 2°) Préparations

a- Préparer les solutions a, b, c, d et les mettre à + 4°C pendant 15 heures

b- Préparer une suspension de Sépharose dans un Bécher en polyéthylène de 2 litres en mélangeant 125 ml de Sépharose, 125 ml d'eau et 125 ml de carbonate de sodium 2 M. Mettre à + 4°C pendant 15 heures.

c- Dissoudre les 58 g de HMDA dans 250 ml de tampon bicarbonate de sodium 0,2 M de pH 9,5 (dans un récipient en polyéthylène). La solution obtenue est nettement alcaline et il est nécessaire de la ramener à pH 10 avec l'acide chlorydrique (environ 200 ml d'HCl au 1/2). Ajouter 2,8 g de NaCl pour ramener à 0,2 M la concentration en sodium. Mettre à + 4°C pendant 15 heures, conserver aussi l'acétonitrile à + 4°C.

## 3°) Activation et couplage (sous une hotte bien ventilée)

Les manipulations se font à la température du laboratoire, mais avec les solutions équilibrées à + 4°C.

a- Mettre sous agitation la suspension de Sépharose (2 - b).

b- Dissoudre les 25 g de BrCN dans les 12,5 ml d'acétonitrile.

c- Activation - Ajouter la solution du BrCN dans la suspension de Sépharose et agiter vigoureusement pendant 2 minutes.

d- Verser le mélange précédent dans un entonnoir muni d'un verre fritté N°1 et laver rapidement (sous vide) successivement par 2,5 litres de bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 9,5 ; par 2,5 litres d'eau et enfin par 2,5 litres de bicarbonate de sodium 0,2 M de pH 9,5.

e- couplage - Mettre la Sépharose activée dans la solution de HMDA et mettre le mélange pendant 16 heures à + 4°C sous agitation lente (10 tours par minute).

f- Après couplage, faire deux cycles de rinçage, chaque cycle comprenant le passage successif de 2,5 litres d'acétate de sodium 0,1 M pH 4,0 + 0,5 M en NaCl 2,5 litres d'urée 2 M + 0,5 M en NaCl et 2,5 litres de bicarbonate de sodium 0,1 M pH 10 + 0,5 M en NaCl.

L'HMDA-Sépharose est alors conservé dans l'azide de sodium à 0,2 g/litre à + 4°C. L'HMDA-Sépharose est utilisé pour le couplage de la D-leucine, par la fabrication de S-méthyl L-leucine-Sépharose et aussi, sans transformation préalable, pour une chromatographie d'affinité comme décrit ci-après.

#### Q - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR HMDA-SEPHAROSE

Sur une petite colonne (1 cm de diamètre x 8 cm de hauteur) équilibrée dans du tampon phosphate 0,025 M de pH 7,4, 10 ml de filtrat de culture sont déposés (filtrat préparé comme décrit p.32). Le matériel non retenu est récupéré par rinçage. avec le tampon d'équilibre, il ne contient pas d'activité aminopeptidasique. Les aminopeptidases sont ensuite éluées de la colonne par NaCl 0,5 M dans le tampon 0,025 M de pH 7,4. Il est possible d'obtenir le même résultat en déposant 200 ml de filtrat de culture sur une colonne de dimensions supérieures (1,5 cm de diamètre x 20 cm de hauteur).

#### R - COUPLAGE DE D-LEUCINE SUR HMDA-SEPHAROSE

Ce couplage a été fait selon la méthode de SHEEHAN et HESS (49) en utilisant comme agent couplant la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI).

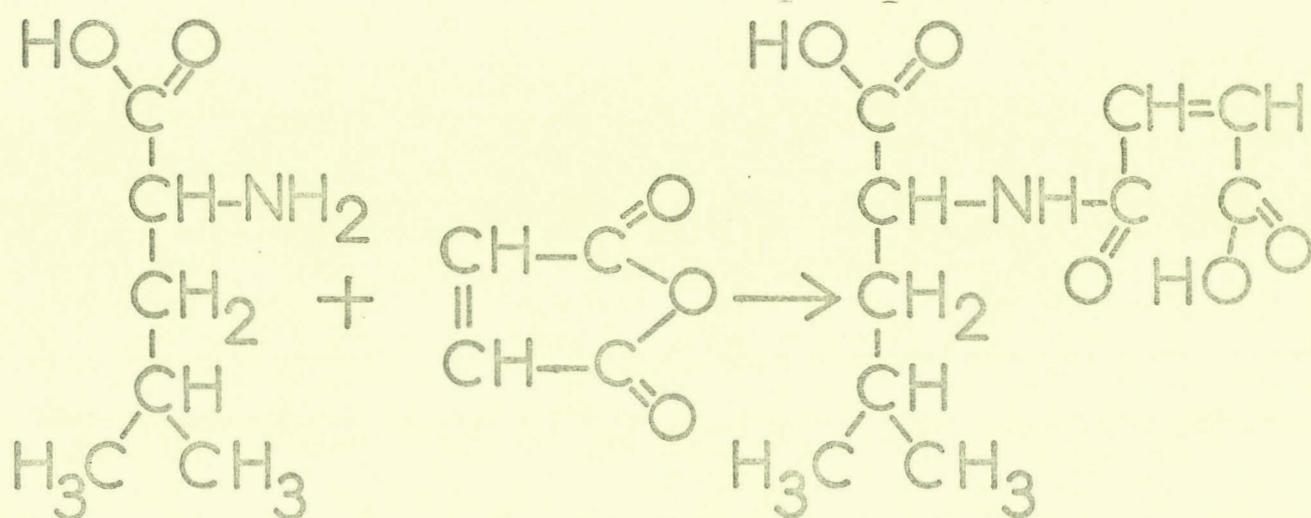
Le groupement - NH<sub>2</sub> de la D-leucine est au préalable bloqué par l'anhydride maléique afin d'éviter la synthèse de poly-D-leucine.

1°) Maléylation de la D-Leucine

Dans un Bécher contenant 20 ml d'eau, on ajoute 60 mg de D-leucine. Le Bécher est placé dans un cristalliseur contenant de l'eau et des glaçons dans le but de maintenir une température de l'ordre de 3°C.

65 mg d'anhydride maléique sont dissous dans un ml de dioxane. On amène le pH de la solution de D-leucine à pH 9,0 avec de la soude 0,1 M et on ajoute l'anhydride maléique goutte à goutte en maintenant le pH entre 8,5 et 9 avec la soude 0,1 M. Après trois heures de contact à pH 8,5-9, le blocage est complet : en effet, la D-leucine ne réagit plus avec la fluorescamine, réactif fluorescent des groupements NH<sub>2</sub>. L'essai à la fluorescamine est fait comme suit : dans un tube à hémolyse, on met 100 µl de solution à essayer et on ajoute 200 µl de tampon borate 0,2 M pH 9,0 puis, en agitant vigoureusement le tube sur Vortex, on ajoute 100 µl d'une solution de fluorescamine à 20 mg dans 50 ml d'acétone. La présence de groupements NH<sub>2</sub> dans la solution à essayer provoque une fluorescence jaune.

Le schéma réactionnel de la maléylation est le suivant :



D-Leucine

N-Maléyl-D-Leucine

2°) Couplage de la maléyl-D-leucine sur HMDA-Sépharose

10 ml de HMDA-Sépharose sont mis en suspension dans 40 ml de dioxane sous légère agitation et à + 4°C. La solution de maléyl-D-leucine brute amenée à pH 5 par HCl M est ajoutée à la suspension. 200 mg de DCCI sont dissous dans 1,5 ml de diméthylformamide (DMF) et ajoutés par petites portions pendant une heure puis on laisse sous agitation pendant 24 heures à +4°C.

Puis le gel est lavé successivement par :

- 100 ml de dioxane/eau (1/1)
- 100 ml de DMF/eau (1/1)
- 250 ml de méthanol/eau (1/1)
- 250 ml d'eau
- 250 ml de NaCl 1 M
- 500 ml d'eau.

Un ml de gel est soumis à l'action de HCl 5,6 N pendant 24 heures à 105°C. L'hydrolysate débarrassé du gel par filtration est évaporé, repris par 1 ml de tampon citrate de pH 2,2 et analysé sur un analyseur automatique d'acides aminés Multichrom BECKMAN. Le dosage ainsi réalisé montre que 10 nanomoles de D-leucine se sont fixées sur un ml de gel. Avant son utilisation pour la chromatographie d'affinité, le gel est incubé 2 heures à 37°C à pH 3,5 pour enlever le groupe maléyl et libérer ainsi le groupe NH<sub>2</sub> de la D-leucine. La chromatographie d'affinité est conduite comme avec le gel d'HMDA-Sépharose.

S - PREPARATION DE S-METHYL-L-LEUCINE-SEPHAROSE

Ce gel modifiée est obtenu par addition de chlorométhyl-L-leucine sur du SH-Sépharose.

1°) Préparation de la chlorométhyl-L-leucine sous forme chlorhydrate (3-amino-1-chloro-5-méthyl-hexane 2-one, HCl)

Ce dérivé de la L-leucine est préparé selon la technique de BIRCH et coll. (51). (voir schéma 3)



2 g de tertio-butyloxycarbonyl-L-leucine (t-boc-L-leucine) sont mis en solution dans 70 ml d'éther sec. On ajoute 1,6 g de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI).

La solution est agitée à la température du laboratoire pendant 30 minutes. Il se forme un précipité de dicyclohexylurée par addition du peu d'eau se trouvant dans le milieu réactionnel sur la DCCI.

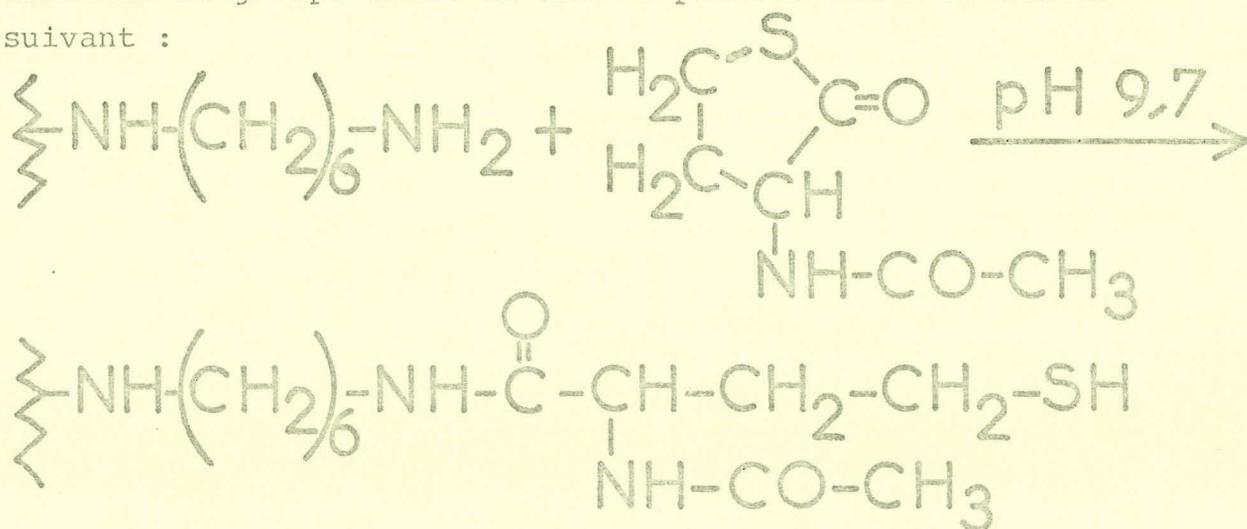
On porte ensuite le mélange à -15°C et on ajoute en excès du diazométhane en solution dans l'éther à -15°C. On laisse ce mélange 30 minutes à 0°C, on obtient ainsi la diazocétone. La solution est filtrée, évaporée à sec sous vide et le résidu est redissous dans 30 ml d'éther sec à 0°C. On fait ensuite passer un courant d'HCl sec qui transforme la diazocétone en chlorométhylcétone et qui débloque la fonction -NH<sub>2</sub>.

La chlorométhyl-L-leucine est obtenue sous forme de chlorydrate à l'état cristallisé après 15 heures à -10°C.

2°) Préparation du Sépharose-SH (48)

Dans un Erlenmeyer à jaquette de 100 ml maintenu à +4°C par circulation d'eau réfrigérée, on met 100 ml de HMDA-Sépharose et 10 ml de bicarbonate de sodium 1 M de pH 9,7 et on fait passer l'azote pendant 1/2 heure.

On ajoute ensuite 1 g de N-acétylhomocystéine thiolactone et on laisse les réactants en contact pendant 24 heures à +4°C sous azote et sous légère agitation magnétique. La lactone s'ouvre en libérant un groupe thiol et un groupe carboxyle qui amidifie le groupe aminé du HMDA-Sépharose selon le schéma suivant :





Le gel est ensuite rincé successivement avec :

- 500 ml de tampon bicarbonate de sodium 0,1 M pH 9,5
- 500 ml d'eau
- 500 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5,0
- 500 ml d'eau

Ce gel est ensuite utilisé en chromatographie d'affinité comme le gel HMDA-Sépharose.

#### T - OXYDATION PERFORMIQUE

L'oxydation performique des protéines a été faite pour doser la cystine avec plus de précision après hydrolyse acide totale. En effet, la cystine est transformée en acide cystéique qui apparait sur le chromatogramme en un pic très homogène. En plus la méthionine qui se situe sur le chromatogramme juste après un changement du tampon 5,28, est transformé en méthionine sulfone qui se situe sur le chromatogramme entre l'acide aspartique et la thréonine. Nous avons utilisé la technique de HIRS (T16).

##### 1°) Obtention d'acide performique

Un ml d'eau oxygénée à 30 % est ajouté à 9 ml d'acide formique à 88 %. On laisse 1 heure à la température du laboratoire puis on met cette solution au bain marie glacé.

##### 2°) Oxydation performique

La protéine lyophilisée ou évaporée est dissoute dans 2 ml d'acide performique et on laisse en contact pendant 4 heures à +4°C.

Ensuite, l'acide performique est détruit par addition de 300 µl d'acide bromhydrique à 48 % et le mélange réactionnel évaporé à sec, repris par l'eau et évaporé à sec de nouveau. La protéine ainsi modifiée est conservée à -20°C.

U - DETERMINATION DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DES PEPTIDES ET PROTEINES PAR LE CHLORURE DE DANSYL

1°) Peptides

Selon la technique de GRAY et HARTLEY (42). La solution de peptides (1 à 2 nanomoles) est placée dans un tube en verre de 5 mm de diamètre et de 7 cm de hauteur ; elle est évaporée à sec. Ensuite, on ajoute dans le tube 10  $\mu$ l d'une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et 20  $\mu$ l d'une solution acétonique de chlorure de dansyl à 1 mg/ml. Le tube est bouché avec du parafilm et on laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant une heure à 37°C.

Les produits de la réaction sont évaporés à sec à 55°C sur  $P_2O_5$  et sous vide. On introduit ensuite dans le tube de réaction 50  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 6 N, on scelle et porte à 105°C pendant quinze heures. L'hydrolysats est ensuite séché au dessiccateur, à température ambiante, en présence de pastilles de soude.

Le produit sec obtenu qui comprend le dansylaminoacide correspondant à l'acide aminé en position N-terminale, les autres amino-acides et des produits de transformation du chlorure de dansyl en excès est repris par 25  $\mu$ l de mélange acide acétique-acétone (2 : 3). 2  $\mu$ l de cette solution sont déposés sur une feuille de polyamide de forme carrée (5 x 5 cm).

On effectue une chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes suivants :

- 1ère dimension : acide formique à 1,5 % dans l'eau
- 2ème dimension : benzène/acide acétique (9/1)

Les taches de dansyl-amino-acides sont localisées par fluorescence à 340 nm. Dans une seconde opération, on fait une étude en plaçant sur une face la même solution que précédemment et sur l'autre le dansyl-amino-acide qui a été identifié au cours du premier essai.

## 2°) Protéines

La dansylation des protéines est faite selon la technique de GRAY (T17).

La protéine oxydée par l'acide performique (1 à 2 nanomoles) est mise dans un petit tube à centrifuger en verre on ajoute 50  $\mu$ l de SDS à 1 % dans l'eau et on porte au bain marie pendant 2 à 5 minutes pour dissoudre la protéine.

Après refroidissement, on ajoute 50  $\mu$ l de N-éthylmorpholine (qualité pour séquence) et on mélange sur agitateur Vortex.

On ajoute 75  $\mu$ l d'une solution fraîche de chlorure de dansyl à 25 mg/ml dans la DMF anhydre, on laisse une heure à la température du laboratoire et à l'obscurité.

On précipite ensuite la protéine dansylée par addition de 500  $\mu$ l d'acétone, on bouche le tube avec un parafilm et on mélange en retournant plusieurs fois.

Enfin, on centrifuge, lave le précipité par 800  $\mu$ l d'acétone à 80 %, centrifuge de nouveau et sèche. La protéine dansylée est ensuite hydrolysée par HCl 5,6 N pendant 15 heures.

L'hydrolysate est ensuite séché, repris par le mélange acide acétique/acétone (2/3) et chromatographié sur polyamide comme décrit pour les peptides.

## V. - MESURES DE CINÉTIQUES ENZYMATIQUES

Les mesures de cinétiques sont faites en utilisant le substrat synthétique L-leucine-p-nitroanilide dont l'hydrolyse par les aminopeptidases de K. ajelloi libère la p-nitroaniline qui absorbe à 405 nm.

Les mesures de  $K_m$  et  $V_M$  sont faites directement dans la cuve du spectrophotomètre.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre ZEISS type PMQ II dont le compartiment cuve est thermostaté par une circulation d'eau dans sa partie inférieure : ce qui permet d'obtenir dans la cuve de mesure une température constante à 0,1°C près.

Nous avons mesuré les vitesses d'apparition de la p-nitroaniline résultant de l'action des aminopeptidases de K. ajelloi sur Leu-p-NA à 30°C pour des concentrations en substrat se situant dans le domaine de concentration allant de 8 à 800  $\mu$ Molaire, valeurs qui encadrent bien celles trouvées pour le  $K_m$  des deux aminopeptidases.

Pour chaque mesure de vitesse, nous avons opéré comme suit : x  $\mu$ l de solution enzymatique correspondant à 200 ng de protéine sont ajoutés dans la cuve du spectrophotomètre à (2 500 - x)  $\mu$ l d'une solution, équilibrée à 30°C, de substrat dans un tampon borate 0,1 M de pH 9,35. On suit la variation de la D.O. 405 nm pendant 10 minutes.

La pente de la droite est convertie en  $\mu$ moles de nitroaniline par minute, sachant que  $\epsilon_M^{405} = 10\ 000$ . Pour le calcul de  $V_M$  et  $K_m$  à partir des mesures de vitesses, nous avons utilisé deux types de construction graphique.

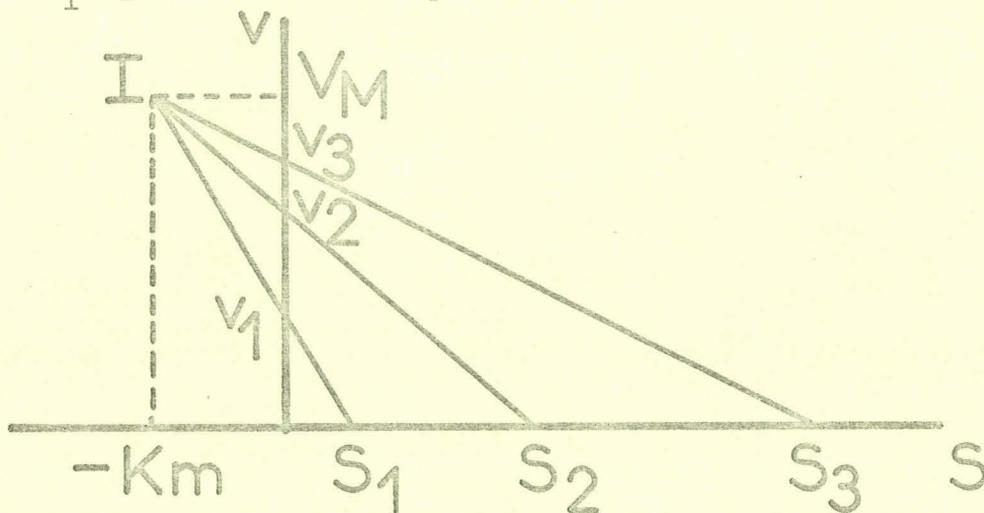
1°) Le diagramme des doubles inverses de LINEWEAVER et BURK (60) obtenu en portant  $\frac{1}{V}$  en fonction de  $\frac{1}{(S)}$ . La courbe obtenue est une droite coupant les axes en  $-\frac{1}{K_m}$  et  $\frac{1}{V_M}$

2°) Le diagramme de MERINO (61) qui utilise directement les données et qui détermine un point dont les coordonnées sont  $-K_m$  et  $V_M$ . Le principe du diagramme de MERINO est le suivant :

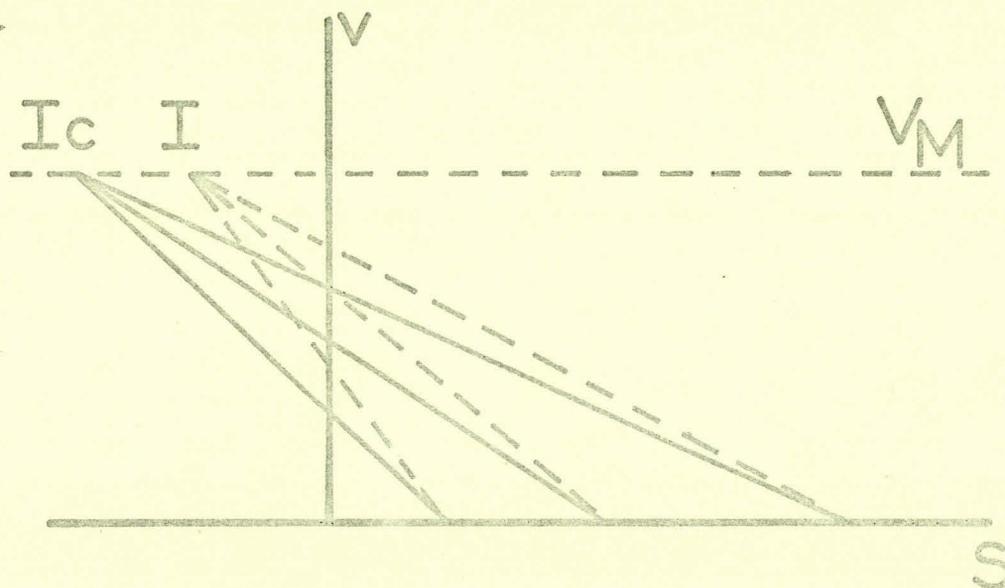
L'équation  $v = \frac{V_M \times (S)}{(S) + K_m}$  à laquelle satisfait la

vitesse d'une réaction enzymatique de type michaélien est l'équation d'une hyperbole équilatère dont les asymptotes sont  $-K_m$  et  $+V_M$ . Or, une propriété géométrique de l'hyperbole équilatère veut que les droites joignant les couples de points  $(v_i, (S)_i)$  passent toutes par le point de concours I des 2 asymptotes, qui a pour coordonnées  $-K_m$  et  $V_M$ .

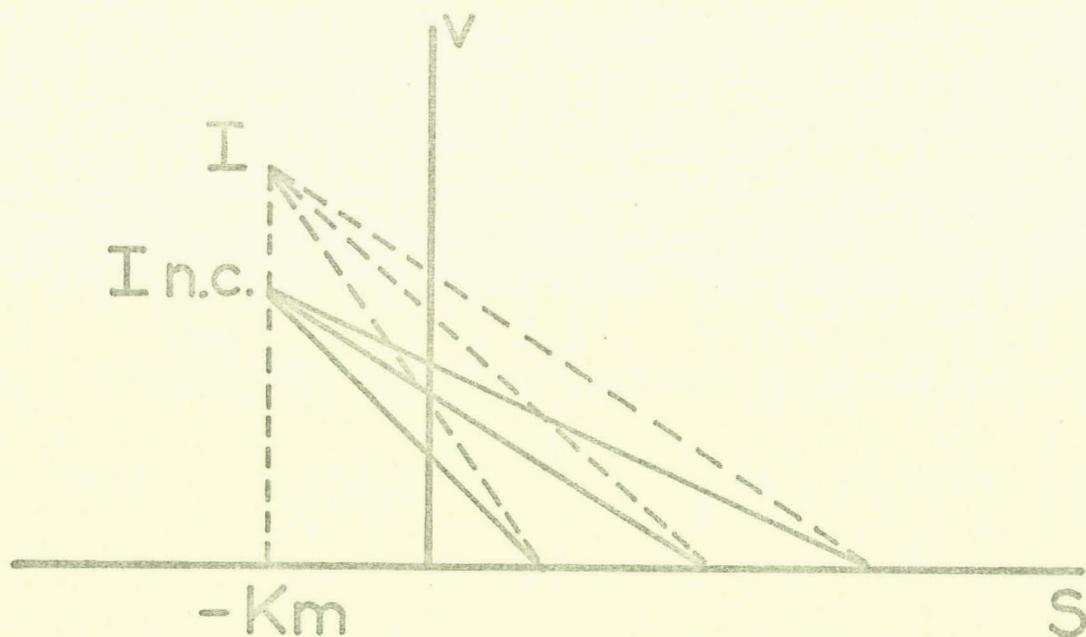
Il n'est pas nécessaire de construire l'hyperbole ou de faire une double inversion pour obtenir  $K_m$  et  $V_M$ , il suffit de tracer les droites passant par les couples de points  $(v_i, (S)_i)$  pour obtenir le point de concours.



Dans le cas de la présence d'un inhibiteur de type compétitif, la valeur de  $K_m$  se trouve augmentée alors que celle de  $V_M$  ne change pas, cela se traduira sur le diagramme de MERINO par un glissement du point de concours  $I_c$ , le long de l'asymptote  $V_M$ .



Par contre, dans le cas d'un inhibiteur non compétitif, la valeur de  $K_m$  ne change pas, mais  $V_M$  diminue, on observe sur le diagramme de MERINO un glissement du point de concours  $I_{n.c.}$  le long de l'asymptote  $-K_m$



BUS  
LILLE

BIBLIOGRAPHIE

- T1 - GODDARD D.R. et MICHAELIS L.  
J. Biol. Chem., 1934, 106, 605-614
- T2 - GILLESPIE J.M.  
Aust. J. Biol. Sci., 1960, 13, 81-103
- T3 - CHOPRA S.L.  
Indian J. Chem., 1964, 2, 78-79
- T4 - NEUHAUS O.W. et LETZRING M.  
Anal. Chem., 1957, 29, 1230-1233
- T5 - INGLIS A.S. et LIU T.Y.  
J. Biol. Chem., 1970, 245, 112-116
- T6 - LIU T.Y. et CHANG Y.H.  
J. Biol. Chem., 1971, 246, 2842-2848
- T7 - SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S.  
Anal. Chem., 1958, 30, 1190-1206
- T8 - HANNING K.J.  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1964, 338, 221-227
- T9 - DAVIS B.J.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427
- T10 - KERCKAERT J.P.  
Anal. Biochem. 1978, 84, 354-360
- T11 - KAMINSKI E. et BUSHUK W.  
Can. J. Biochem., 1968, 46, 1317-1320
- T12 - LOWRY H.O., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J.  
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275

- T13 - SCHACTERLE G.R., POLLACK R.L  
Anal. Biochem., 1973, 51, 654-655
- T14 - NOVAL J.J. et NICKERSON W.J.  
J. Bacter., 1959, 77, 251-263
- T15 - YU R.J., HARMON S.R. et BLANK F.  
J. Invest. Dermatol., 1969, 53, 166-171
- T16 - HIRS C.H.W.  
Methods in Enzymology (Hirs Ed.) Acad. Press. N.Y.  
San Francisco, London, 1967, 11, 59-62
- T17 - GRAY W.R.  
Methods in Enzymology 1972, 25, 121-138, Acad. Press N.Y.

