

50376  
1980  
88

N° d'ordre : 828

50376  
1980  
88

# MEMOIRE

présenté à

L UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Jean Francois ANSART

PURIFICATION ET COMPOSITION EN SOUS-UNITES DE

L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE DE L'HEPATOCYTE DE RAT



Membres du Jury	MM	J MONTREUIL	Président
		J KREMBEL	Rapporteur
		J GUILLAUME	} Examineurs
		G STRECKER	
		C DISSOUS	

présenté le 26 juin 1980

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 - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. 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. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
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.	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.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
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 - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mme	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale

M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
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
Mme	EVARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLANME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Mathématiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEMAIRE Jean	Physique
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	NESSÉLYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M.	NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	PARSY Fernand	Mécanique
Mlle	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PECQUE Marcel	Chimie Organique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	PORCHET Maurice	Biologie
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	RICHARD Alain	Biologie

M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SCHAMPS Joël	Physique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Chimie
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire  
de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de l'Univer-  
sité de LILLE I (Professeur J. MONTREUIL) sous la direction  
du Professeur J. KREMBEL.

Les résultats présentés dans ce mémoire font partie des  
publications suivantes :

Biosynthesis of lysosomal proteins : intracellular sites of synthesis  
of  $\alpha$ -L fucosidase

C. DISSOUS, A. CHERON, J.F. ANSART, et J. KREMBEL  
soumis à J. Mol. Biol.

Subunit composition of rat liver  $\alpha$ -D glucosidase

C. DISSOUS, J.F. ANSART, A. CHERON, et J. KREMBEL  
Manuscrit en préparation

TABLE DES MATIERES



## INTRODUCTION

LES DEUX TYPES D' $\alpha$ -GLUCOSIDASES	p. 3
PURIFICATION DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE ACIDE	p. 5
PROPRIETES DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE	p. 9
COMPOSITIONS EN SOUS-UNITES	p. 10
STES CATALYTIQUES	p. 11
MALADIE LYSOSOMALE	
CONCLUSION	p. 13
I- TENTATIVES DE PURIFICATION SEQUENTIELLE DE PLUSIEURS HYDROLASES LYSOSOMALES	p. 17
A- PURIFICATION DE L' $\alpha$ -L FUCOSIDASE	p. 17
B- PURIFICATION DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE	p. 19
C- PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE ACIDE	p. 21
D- CONCLUSION	p. 23
II- PURIFICATION DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE	p. 25
A- INTERET DE L'UTILISATION DE L' $\alpha$ -D METHYL GLUCOSIDE	p. 25
B- ETUDE DE LA STABILITE DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE DANS DIFFERENTES CONDITIONS IONIQUES	p. 27
C- RECHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-100 DE LA FRACTION D' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE	p. 33
D- COMPORTEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE LORS D'UN RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM	
E- ISOLEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE	p. 36

III- COMPOSITION EN SOUS-UNITES DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE	p. 43
A- MISE EN EVIDENCE DES SOUS-UNITES DE L'ENZYME PAR DES TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES	p. 43
B- ANTICORPS ANTI- $\alpha$ -D GLUCOSIDASE ET STRATEGIE EMPLOYEE POUR CONFIRMER L'EXISTENCE DE DEUX SOUS- UNITES DANS LA MOLECULE D' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE	p. 45
C- CONCLUSION	p. 47
IV- MATERIEL ET METHODES	p. 49
A- GENERALITES	p. 49
B- PURIFICATION DE PLUSIEURS HYDROLASES LYSOSOMALES	p. 49
1°) Préparation de la fraction C <sub>II</sub> L	
2°) Purification de l' $\alpha$ -L fucosidase	
3°) Purification de l' $\alpha$ -D glucosidase	p. 50
4°) Purification de la phosphatase acide	p. 50
5°) Intérêt de l'utilisation de l' $\alpha$ -D méthyl glucoside	p. 51
C- ISOLEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE	p. 52
D- DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	p. 53
E- PREPARATION D'ANTICORPS ANTI- $\alpha$ -D GLUCOSIDASE	
1°) Obtention des antisérums	
2°) Purification des IgG	p. 54
a) précipitation par le sulfate d'ammonium	
b) chromatographie sur DEAE et CM Cellulose	
F- PREPARATION DU SUPPORT D'AFFINITE BIOGEL P 300-IgG	
G- ISOLEMENT $\alpha$ -D GLUCOSIDASE SUR IMMUNOADSORBANT	p. 55

H- ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

p. 56

1°) *Electrophorèse en milieu non dénaturant*

2°) *Electrophorèse en milieu dénaturant*

I- DOSAGE DES PROTEINES

p. 57

J- PRODUITS UTILISES

p. 58

BIBLIOGRAPHIE

## ABREVIATIONS

- $g_{\max}$  : Accélération au rayon maximum
- t/mn : tours par mn
- DTT : Dithiothreitol
- SDS : Dodécyl sulfate de sodium
- EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
- Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-propanediol-1,3
- Te : Triéthanolamine
- TCA : Acide trichloracétique
- DEAE Cellulose : Diéthylaminoéthyl cellulose
- CM Cellulose : Carboxyméthyl cellulose

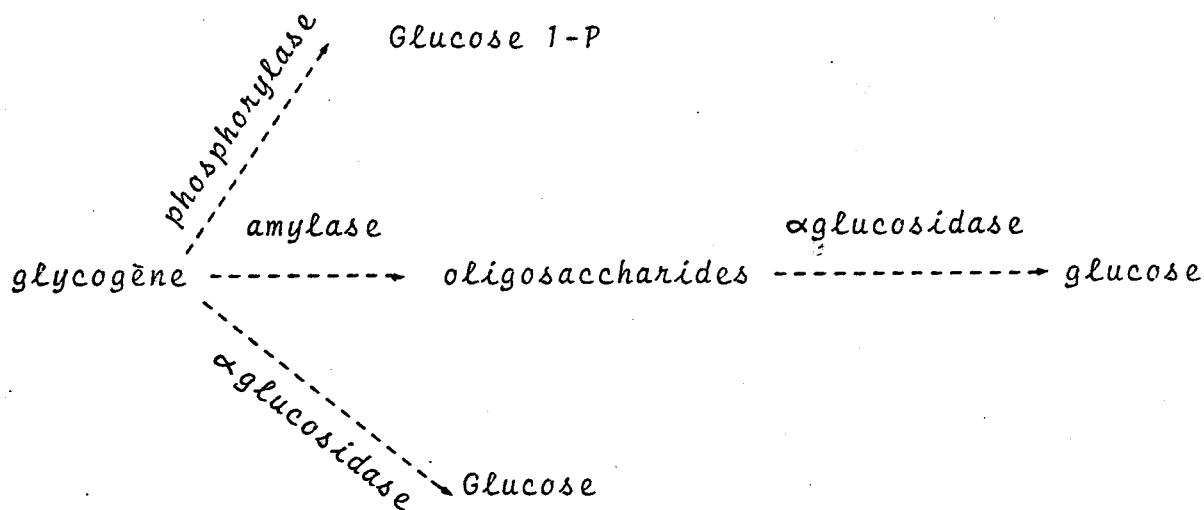
Abréviations utilisées pour désigner la composition des différents tampons.

- Imi : Imidazole
- Mal : Maléate
- 0,25S  $Te_{50}K_{25}M_3$  désigne une solution de saccharose 0,25M dans le tampon Triéthanolamine-HCl 50mM, pH7,6, KCl 25mM,  $Mg(CH_3COO)_2$  3mM.

## INTRODUCTION

Deux voies de dégradation du glycogène cellulaire sont définies depuis longtemps. Catalysées par la phosphorylase et l'amylase, elles se caractérisent respectivement par la formation de glucose 1-P et la libération d'oligosaccharides de la série du maltose (1-2).

La découverte des  $\alpha$ glucosidases ou  $\gamma$  amylases a permis de distinguer une nouvelle voie hydrolytique de dégradation du glycogène. Ces  $\alpha$ glucosidases des tissus animaux sont un groupe d'exo-enzymes qui libère des unités de glucose à partir de l'extrémité non réductrice d' $\alpha$ glycannes de longueur variée.



Ces enzymes sont classés en deux groupes. Selon leur pH optimum d'action. Le groupe des  $\alpha$ glucosidases acides présentant un pH optimum de 4 à 5 et celui des  $\alpha$ glucosidases neutres un pH de 6 à 7.

ORIGINE	pH OPTIMUM	LIAISONS HYDROLYSEES		ACTIVITES TRANS- GLUCOSYLASIQUES
		des DISACCHARIDES	du GLYCOGENE	
Muscle et foie humain (4)	7	1→4	pas d'action	-----
Foie de rat (3)	7	1→4	1→4	-----
Foie de lapin et muscle (16)	6,8	1→4	pas d'action	1→4 1→3 et 1→6
Foie de chien (18)	7	1→2, 1→3 1→4 et 1→6		1→4 1→3 et 1→6

Tableau Ia : Spécificité d'action des  $\alpha$  glucosidases neutres.



## LES DEUX TYPES D' $\alpha$ GLUCOSIDASES

Les  $\alpha$  glucosidases neutres et acides sont très dissemblables. Alors que l' $\alpha$ -D glucosidase acide est présente dans tous les organes et liquides biologiques, l'existence de l' $\alpha$ -D glucosidase neutre n'a pu encore être montrée dans tous les tissus.

Des études de spécificité des  $\alpha$ -D glucosidases du foie de rat, chien, du lapin, du boeuf et humain, furent réalisées sur le glycogène et des disaccharides présentant différents types de liaisons. Les résultats, présentés dans les tableaux Ia et Ib, montrent une spécificité d'action réduite de l' $\alpha$ -D glucosidase neutre pour les liaisons (1-4), tandis que l' $\alpha$ -D glucosidase acide possède une spécificité d'action plus large vis à vis des liaisons (1-4) et (1-6).

Ces enzymes ont un comportement différent vis à vis des dextrans et de la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE (voir tableau II). Nous verrons plus loin que ces propriétés ont une grande importance lorsqu'il s'agit de purifier l' $\alpha$ -D glucosidase acide.

Les deux types d' $\alpha$ -D glucosidases présentent également une distribution subcellulaire différente. De nombreux auteurs ont montré la présence de l' $\alpha$ -D glucosidase acide dans les lysosomes (3,4,5) et de l' $\alpha$ -D glucosidase neutre dans les microsomes et le cytosol (5,6).



ORIGINE	pH OPTIMUM	LIAISONS HYDROLYSEES		ACTIVITES TRANS- GLUCOSYLASIQUES
		des DISACCHARIDES	du GLYCOGENE	
Foie de rat (3) (12)	4 4-4,5	1→4 1→4 et 1→6	1→4 1→4 et 1→6	1→4 1→4
Foie humain, coeur et muscle (16)	4	1→4	1→4	1→4 1→4
Foie humain (17)	4	1→4, 1→6	1→4, 1→6	
Foie et muscle de lapin (14)	4-4,9	1→4, 1→3 1→4 et 1→6		
Foie de boeuf (11)	4,5	1→4, 1→6	1→4, 1→6	1→4 1→4
Rate de porc (15)	4	1→4, 1→6	1→4, 1→6	

Tableau Ib : Spécificité d'action des a-glucosidases acides.

## PURIFICATION DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE ACIDE

Les premiers essais de purification de l'  $\alpha$ -D glucosidase acide furent effectués directement à partir d'homogénat de tissus. La présence simultanée de plusieurs hydrolases, capables de dégrader le glycogène, rendait difficile la détermination des activités respectives de ces enzymes et donc la mise au point de méthodes de purification.

En 1964, une méthode, généralement appelée "éthanol-amidon" utilisant l'absorption spécifique de l'  $\alpha$ -amylase sur l'amidon de pomme de terre en suspension dans l'éthanol, permet de séparer l'  $\alpha$ -amylase des  $\gamma$  amylases (7). Cependant, la purification obtenue demeurait relativement limitée.

Des méthodes plus élaborées utilisèrent ensuite le relargage par le sulfate d'ammonium suivi de précipitations alcoolique et acétonique et d'une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose. Des travaux, effectués sur la rate de boeuf (8), permirent d'obtenir une fraction enzymatique purifiée 2 000 fois par rapport à l'homogénat. Cet enzyme est cristallisable dans l'acétone à 20p. cent, mais le rendement de toutes les opérations effectuées est faible (8,9p.cent) (voir tableau III). L'utilisation des techniques de chromatographie a permis, depuis lors, d'isoler les  $\alpha$ -D glucosidases lysosomales de nombreux tissus d'espèces animales. Ainsi, une méthode originale d'isolement de l'  $\alpha$ -D glucosidase acide du foie de rat fut apportée par AURICCHIO (9-10). Tirant parti de l'affinité de l'enzyme pour les dextrans, l'auteur montra que, dans certaines conditions, l'élution de l'enzyme s'effectue bien après celle de la majeure partie des protéines. L'enzyme est ainsi purifiée 700 fois par rapport à l'homogénat avec un rendement de 20p.cent (voir tableau III).

PROPRIETES	GLUCOSIDASE ACIDE	GLUCOSIDASE NEUTRE
Localisation subcellulaire	Lysosomes	microsomes et cytoplasme
Ph Optimum	4 - 5	6 - 7
Stabilité à T°	55° 30mn pH 4,8	45° C pH 7
Absorption sur DEAE cellulose	oui	non
Hydrolyse des dextrans	oui	non
jeûne des animaux	active	inhibe

Tableau II : propriétés générales des  $\alpha$ glucosidases (7)



Le principe de cette méthode fut appliqué à différents tissus animaux. A partir d'un homogénat de foie de boeuf, deux chromatographies sur séphadex G-100, combinées à la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose, conduisent à une fraction enzymatique purifiée possédant une masse moléculaire de 107.000 (BRUNI et al 1969) (111).

D'autres auteurs ont utilisé la centrifugation différentielle pour purifier l' $\alpha$ -D glucosidase acide à partir d'une fraction subcellulaire. Ainsi, JEFFREY et al (112) isolent l' $\alpha$ -D glucosidase d'hépatocyte de rat à partir d'une fraction riche en lysosomes après relargage par le sulfate d'ammonium, suivi de chromatographies d'ads-finité et d'échange d'ions. L'enzyme, purifiée 1.300 fois par rapport à la fraction lysosomale initiale, n'est toute-fois pas homogène en électrophorèse non dénaturante.

En 1972, la purification de l' $\alpha$ -D glucosidase acide du foie humain et de rat s'effectue par un relargage par le sulfate d'ammonium, suivi d'une seule chromatographie sur séphadex G-100. L'addition de maltose dans le tampon d'élution permet de recueillir l'enzyme dans un plus faible volume (DE BARSY et al) (113).

ROSENFELD et al isolent, par cette même méthode, les  $\alpha$ -D glucosidases de foie de lapin (1972) (114), de la rate de porc (1975) (115) et du foie humain (1975) (116). Cependant, l'élution spécifique de l'enzyme est provoquée par l'addition d'un inhibiteur compétitif : le méthyl  $\alpha$ -D-glucopyrannoside. Ces enzymes semblent homogènes lors d'une électrophorèse en milieu non dénaturant. L'analyse électrophorétique en présence de SDS n'a été réalisée que pour l' $\alpha$ -D glucosidase humaine, l'enzyme apparaît alors hétérogène (voir paragraphe : composition en sous-unités). Des travaux plus récents, effectués sur le même tissu, confirment cette hétérogénéité de l' $\alpha$ -D glucosidase en électrophorèse en milieu dénaturant (MURRAY et al 1978) (117).

ORIGINES DE L' " -D GLUCOSIDASE LYSSOMALE

	Foie humain (17) (16) (13)	Foie de rat (9) (12) (13)	Rate de boeuf (8)	Foie de boeuf (11)	Rate de porc (15)	Muscle de lapin (20)	Foie de lapin (14)
Purification (par rapport à l'homogénat)	2 400 720 10 400	700 1 300* 13 400	2 400	5 100	2 200	3 500	---
Rendement (par rapport à l'homogénat)	41 30 30	20 15* 20	8,9	43	30	22	---
Masse Moléculaire	110 000	114 000		107 000	105 000		---
Centrifugation analytique	oui oui	---	---	oui	oui	---	oui
Electrophorèse en milieu non dénaturant	oui oui	non	---	oui	oui	oui	oui
Electrophorèse en milieu dénaturant	non non	---	---	---	---	---	non

\* par rapport à la fraction L (riche en lysosomes)

TABLEAU III : Purification de diverses *α* glucosidases lysosomales d'origines animales.



En résumé à l'exception de l'  $\alpha$ -D glucosidase de l'hépatocyte de rat (12), tous les enzymes purifiés montrent une homogénéité en électrophorèse en milieu non dénaturant. Des études électrophorétiques en milieu dénaturant n'ont été réalisées jusqu'à présent que pour les  $\alpha$ -D glucosidases du foie humain et de l'hépatocyte de lapin. Les résultats obtenus montrent une certaine hétérogénéité de ces deux enzymes (voir tableau III).

#### PROPRIETES DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE

L'  $\alpha$ -D glucosidase acide peut hydrolyser indifféremment le maltose, l'isomaltose, le nigérose et le glycogène (18). Le fait que l'enzyme puisse hydrolyser les liaisons (1→4) et (1→6) du glycogène permet la totale conversion du polysaccharide en glucose (12-13). Son pH optimum d'action est compris entre 4 et 4,3 pour le maltose et entre 4,8 et 5 pour le glycogène (9-13). L'enzyme semble également capable de catalyser in vitro le transfert d'unités glucosidasiques vers les accepteurs (12-17-18-19).

Pour certains auteurs, la présence des cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) stimule l'activité de l'enzyme (12-20). Sous certaines conditions expérimentales, la stimulation de l'activité glycogénolytique est plus importante que pour le maltose.

Des études cinétiques ont mis en évidence l'action de nombreux inhibiteurs, soit sur les deux activités (turano-érythriol) (21-22), soit sur l'une ou l'autre de celles-ci. Les  $\alpha$ -tréhalose et  $\alpha$ méthyl glucoside inhibent l'activité glycogénolytique (22), tandis que le fluorure de sodium inhibe l'activité maltasique (7).

## COMPOSITION EN SOUS-UNITES

Les  $\alpha$ -D glucosidases animales, isolées à ce jour à partir de différentes sources, semblent posséder des masses moléculaires similaires : 106.000 pour la rate de porc (15), 107.000 pour celle du foie de boeuf (11), 110.000 pour le foie humain (17) et 114.000 pour celle de l'hépatocyte de rat (12).

Les  $\alpha$ -D glucosidases acides semblent être composées de plusieurs sous-unités polypeptidiques. GOLDSTONE et al (23) affirment que la plupart des hydrolases lysosomales du rein de rat apparaissent sous plusieurs formes moléculaires. Dans le cas de l' $\alpha$ -D glucosidase du foie de lapin (14), une dissociation de la protéine en deux sous-unités sous l'action de l'urée 3 M a pu être mise en évidence. Les deux composants de l'enzyme diffèrent par leur mobilité électrophorétique et leur spécificité de substrat : l'un pour le maltose, l'autre pour le glycogène. Cette méthode appliquée à d'autres tissus est restée infructueuse.

L' $\alpha$ -D glucosidase acide du foie de boeuf a pu être dissociée en présence de 5M guanidine-HCl en quatre sous-unités de masses moléculaires similaires de 25 000 (11). Enfin, les résultats des analyses par électrophorèse en milieu dénaturant de l' $\alpha$ -D glucosidase du foie humain sont assez contradictoires. En effet, MURRAY et al (17) montrent une dissociation de la protéine en deux sous-unités de masse moléculaire de 76 000 à 88 000, tandis que ROSENFELD et al (16) la dissocient dans les mêmes conditions expérimentales en trois composants de masses moléculaires différentes.

En conclusion, les  $\alpha$ -D glucosidases semblent bien composées de plusieurs chaînes polypeptidiques, mais les résultats obtenus à ce jour sont assez contradictoires.

## SITES CATALYTIQUES

Les réponses différentes aux inhibiteurs pH et aux cations des deux activités enzymatiques de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale, semblent indiquer, à certains auteurs, la présence de sites catalytiques différents : l'un pour le maltose, l'autre pour le glycogène (12-20-24). Cependant, d'autres auteurs suggèrent l'existence d'un site élargi, commun pour l'hydrolyse des deux substrats (25).

## MALADIE LYSOSOMALE

L'absence d'une activité hydrolasique lysosomale donnée constitue un type de déficience métabolique connue sous le nom de "maladie lysosomale". Plus de 10 cas sont répertoriés dans l'ouvrage correspondant à la référence 26.

La glycogénose de type II est l'un des exemples les mieux connus. Elle se caractérise par une absence d'activité glucosidasique provoquant une accumulation du glycogène dans les tissus (27-28). La dégradation du glycogène cytoplasmique par la phosphorylase, l' $\alpha$  amylase et l' $\alpha$ -D glucosidase neutre ne semble pas affectée, mais on observe, cependant, une hyperactivité de quelques hydrolases lysosomales.

Plusieurs formes cliniques de la glycogénose de type II ont été décrites. Une forme infantile de la maladie fut décrite, dès 1932, par ROMPE. Elle se manifeste, dès les premiers mois de la vie, par une absence quasi-totale d'activité glucosidasique dans tous les tissus. Récemment, deux formes de la maladie furent mises en évidence chez des adolescents et des adultes. En général; le tissu musculaire semble être le siège principal des manifestations cliniques de ces deux dernières formes, l'activité de l'enzyme y est très diminuée, mais jamais nulle comme dans le cas de la forme infantile.



NOMBRE D'HEURES APRES INJECTION	TAUX DE GLYCOGENE DANS LES TISSUS (% DU POIDS SEC)		GLUCOSIDASE mU/g		
	FOIE	MUSCLE	PLASMA	FOIE	MUSCLE
0	10,2	5,5	0	6	0
1	---	---	2,3	-	-
7	---	---	0,4	-	-
32	7,3	---	---	40	-
142	5,8	8,8	---	22	3
Valeur normale	3	0,9	<0,2	700	50

Tableau IV : Essai de thérapeutique de la glycogénose de type II par injection d' $\alpha$ glucosidase exogène (31).



Deux formes cliniques différentes de la maladie n'ont pu être mises en évidence dans une même famille. Ceci semble indiquer vraisemblablement une origine génétique de la glycogénose de type II (26-29). Par des techniques d'hybridation, des travaux récents (1979) ont permis de localiser le gène exprimant la synthèse de l' $\alpha$ -D glucosidase acide sur le chromosome 17 (30).

Des essais de traitement de la glycogénose de type II, par injection intra-musculaire de préparations d' $\alpha$ -glucosidase commerciale d'*Aspergillus Niger* à de jeunes malades, ont été tentés (26). Cependant, l'étude post-mortem n'a montré aucune diminution du taux de glycogène hépatique. En 1972, de nouvelles tentatives de thérapeutique furent effectuées, cette fois-ci, par injection intra-veineuse d' $\alpha$ -glucosidase de placenta humain à un enfant de 5 mois. Aucune intolérance physiologique durable n'est observée et 32 heures après la dernière injection, une partie de l'enzyme est localisée au niveau du foie, mais peu ou pas d'enzyme est détecté dans les muscles et leucocytes (voir tableau IV) (8).

Une thérapeutique de la maladie par injection d'enzyme exogène semble possible. Cependant, le problème de sa pénétration dans les muscles apparaît difficile à résoudre.

### CONCLUSION

L' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale joue un rôle très important dans le métabolisme du glycogène. Cependant, l'étendue exacte de ses fonctions reste encore mal définie.

Les travaux effectués jusqu'à présent n'ont pu encore prouver si la glycogénose de type II était due à l'absence de la protéine ou à un assemblage incomplet de l'enzyme. Ce dernier résulterait, soit d'une incapacité de la cellule à synthétiser une ou plusieurs sous-unités, soit à l'absence d'un (des) facteur (s) responsable (s) de l'assemblage de

la protéine. (32) La détermination du (des) site (s) intracellulaire (s) de synthèse de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale devrait donc permettre une meilleure approche du problème.

Des méthodes de purification des différentes classes des polyribosomes de l'hépatocyte de rat, mises au point dans notre laboratoire par DISSOUS et al (33-34) permettent d'envisager la spécialisation fonctionnelle de ces différentes catégories et en particulier, le rôle du réticulum endoplasmique dans les mécanismes de synthèse des protéines lysosomales.

L'étude de la biosynthèse des protéines, constituant les organites cellulaires, nécessite la mise en oeuvre de techniques immunologiques. Celles-ci requièrent la préparation d'antisérums spécifiques, c'est-à-dire la purification préalable de la protéine étudiée.

Les méthodes de purification de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale du foie de rat présentées à ce jour dans la bibliographie, ne semblent pas permettre d'obtenir un enzyme possédant un haut degré de pureté. Notre travail a donc consisté, dans un premier temps, en la mise au point d'une méthode de purification de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale. Celle-ci nous a permis d'aborder ensuite le problème de la composition en sous-unités de la protéine.

TRAVAUX PERSONNELS

La principale difficulté, devant être surmontée lors de l'étude d'enzymes lysosomales, réside dans le fait que ceux-ci ne représentent qu'une infime partie de la totalité des protéines tissulaires.

Différentes analyses morphologiques ont pu estimer que le volume, occupé par les lysosomes, était de l'ordre de quelques microlitres (2,4 à 4  $\mu$ l/g de tissu) (35,36) et l'activité spécifique relative des enzymes lysosomales (qui excède difficilement 5 dans la fraction L, préparée par centrifugation différentielle classique, voir références 37,38) devrait, selon BEAUFAY (39), être d'environ 150 dans une fraction lysosomale complètement purifiée. Un travail récent, visant à approcher ce maximum théorique en purifiant la fraction L de DUVE et al (37) par centrifugation isopycniqne en métrizamide, conduit à estimer que l'ensemble des protéines lysosomales pourrait représenter 1 à 1,4 % des protéines totales du tissu (40).

Il s'ensuit que des quantités importantes de matériel vivant, sont nécessaires si l'on désire purifier les protéines lysosomales afin d'obtenir des anticorps monospécifiques. Nous avons donc essayé, dans un premier temps, de purifier de manière séquentielle, à partir d'un même extrait tissulaire, différentes hydrolases lysosomales.

Les résultats, présentés dans le chapitre suivant, apportent des arguments concrets permettant d'établir quels sont les enzymes lysosomales dont l'étude de la biosynthèse cellulaire paraît la plus accessible à l'expérience.

CHAPITRE 1

TENTATIVES DE PURIFICATION SEQUENTIELLE

DE PLUSIEURS HYDROLASES LYSOSOMALES •

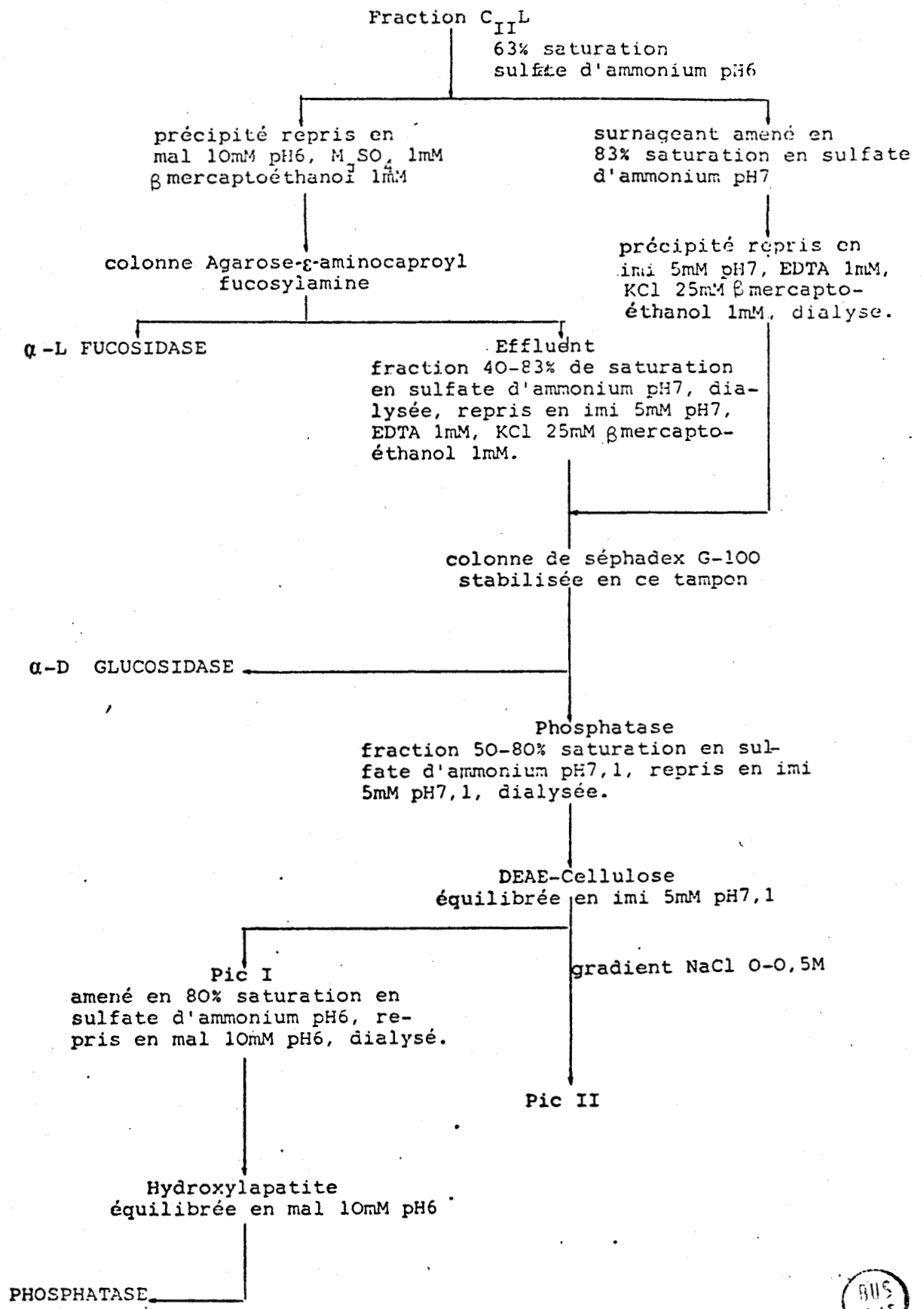


FIGURE 1 ; Schéma des différentes opérations effectuées lors de la purification de plusieurs hydrolases lysosomales.



Jusqu'à présent, les études effectuées sur les enzymes lysosomaux ont porté principalement sur l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. A partir de fractions partiellement purifiées, de nombreux auteurs ont ainsi cherché à déterminer quelle était la spécificité d'action de ces enzymes vis à vis de nombreux substrats.

Il en résulte que, jusqu'à ce jour, peu d'enzymes lysosomaux de l'hépatocyte de rat ont été hautement purifiées. Notre choix s'est donc orienté vers les trois enzymes lysosomaux suivants qui semblaient à priori les plus faciles à obtenir avec un bon degré de purification :

- L'  $\alpha$ -L fucosidase qui peut être purifiée selon la méthode décrite par OPHEIM et TOUSTER (41) par chromatographie d'affinité sur agarose -  $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine.

- L'  $\alpha$ -D glucosidase qui, d'après JEFFREY et al (12) peut être "retardée" sur gel de dextran.

- La phosphatase acide que IGARASHI et HOLLANDER (42) ont obtenue en 1968 sous forme cristalline.

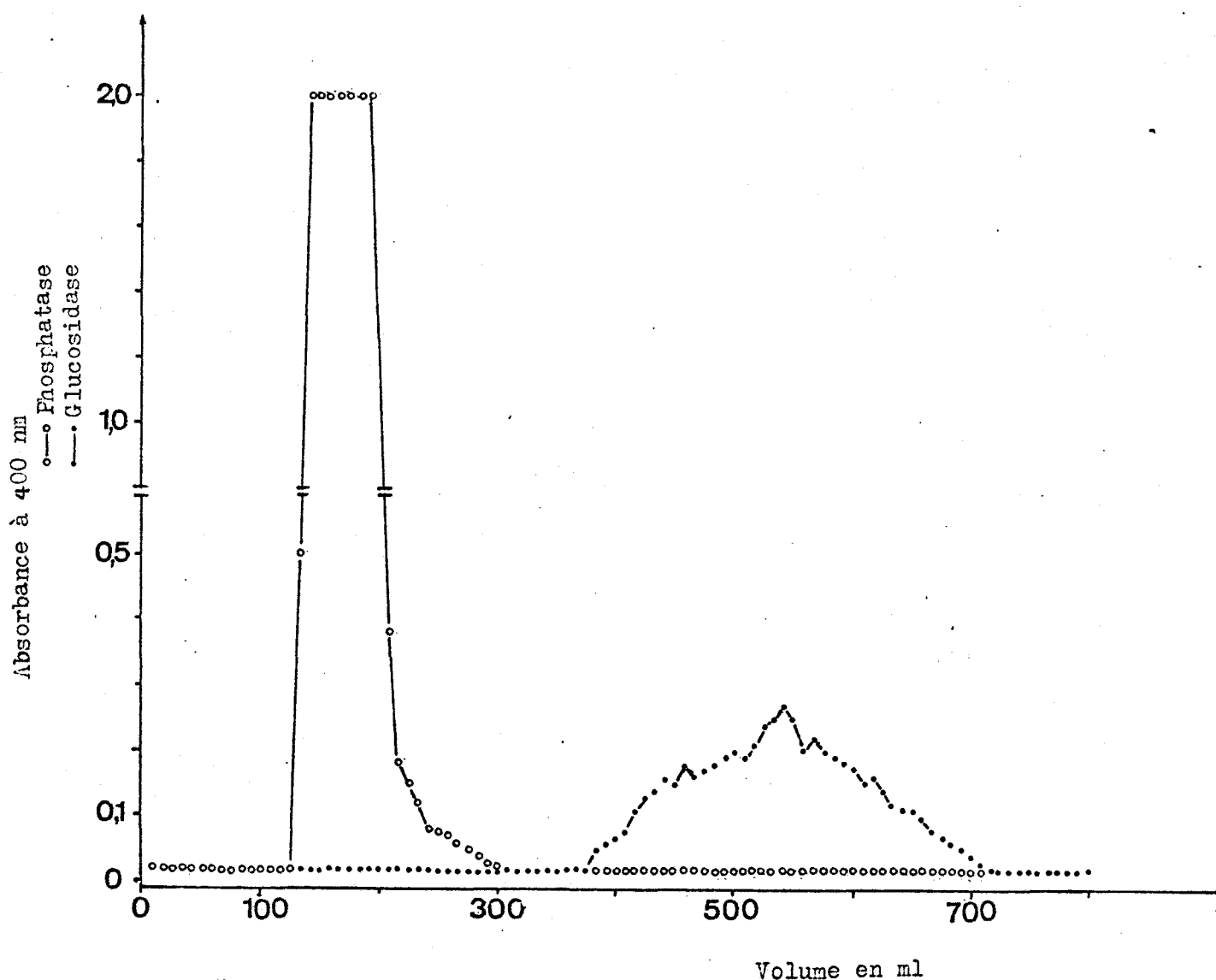
Nous avons donc essayé de purifier ces trois enzymes à partir d'une même fraction tissulaire selon le schéma expérimental décrit dans la figure 1 p. 16

#### A - PURIFICATION DE L' $\alpha$ -L FUCOSIDASE

L'extrait soluble de la fraction C<sub>II</sub><sup>\*</sup> est amené à 63 p. cent de saturation en sulfate d'ammonium. Le sédiment obtenu est alors soumis à une chromatographie sur

\* fraction riche en lysosomes contenant une partie des mitochondries et du réticulum endoplasmique.





**FIGURE 2** : Diagramme d'élution de la phosphatase acide et de l'  $\alpha$ -D glucosidase après chromatographie sur G-100.

Un extrait soluble de la fraction C<sub>II</sub>L est préparé à partir de 230g de foie. Il est soumis à une précipitation par le  $(NH_4)_2SO_4$  (63% sat;). Le précipité, solubilisé dans le tampon BFI, est déposé sur une colonne d'Agarose- $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine. L'effluent, renfermant la majeure partie de l'activité phosphatasique et glucosidasique, est alors soumis à un double relargage par le sulfate d'ammonium (40-63% sat, pH7). Le sédiment, solubilisé dans le tampon imi 5mM, pH7, EDTA 1mM, KCl 25mM, mercapto-éthanol 1mM, est ajouté à celui obtenu lors du relargage par le sulfate d'ammonium (83% sat, pH7) du surnageant 63% de saturation de la fraction C<sub>II</sub>L. La solution enzymatique dialysée, est déposée sur une colonne de séphadex G-100. La suite des opérations est identique à celle décrite dans Matériel et Méthodes. Le graphique représente la mesure de l'activité de la phosphatase acide et de l'  $\alpha$ -D glucosidase au cours de l'élution.

BUS  
LILLE

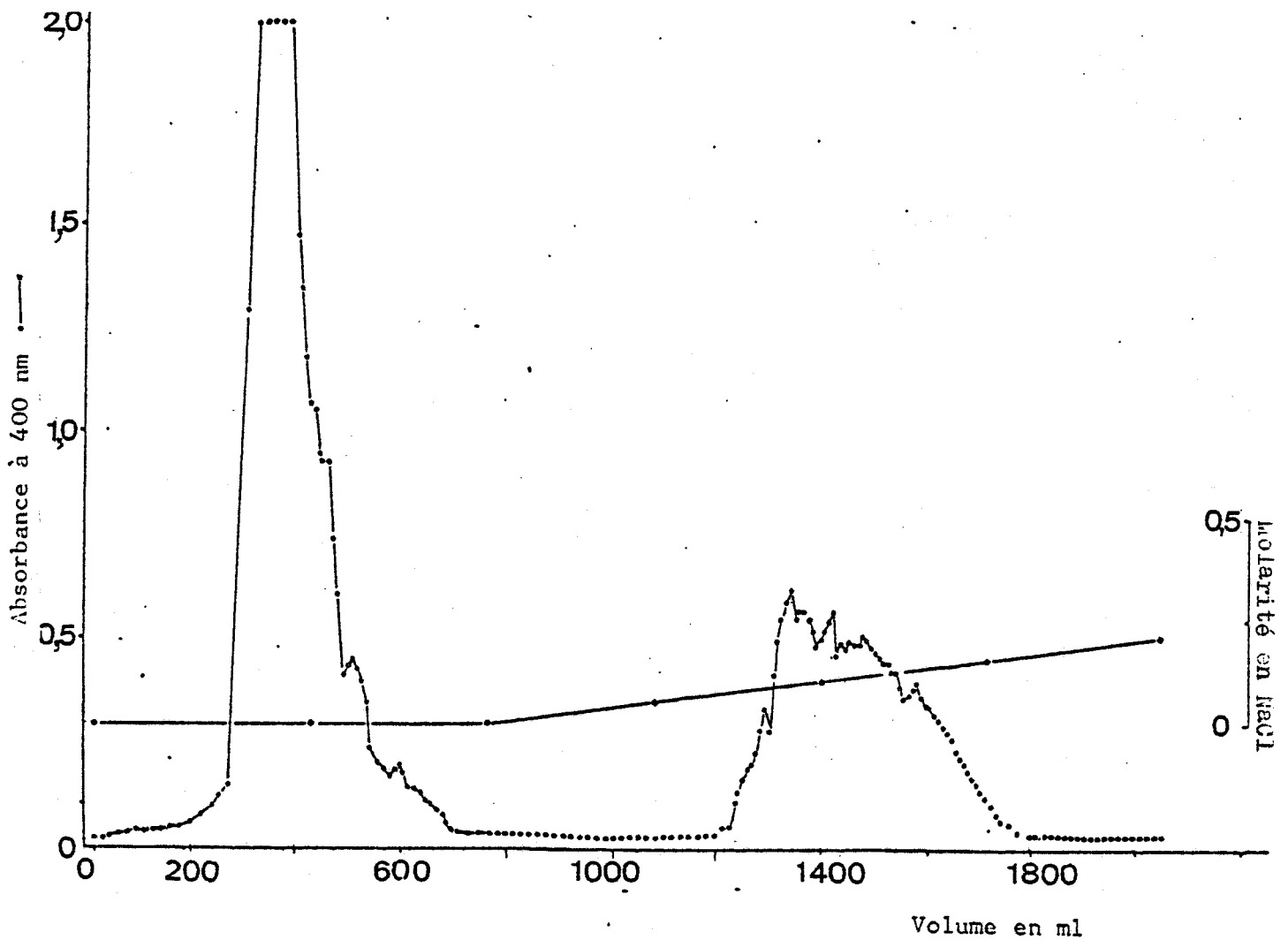
une colonne d'Agarose- $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine. Le tampon de lavage permet de récupérer les activités phosphatase et glucosidasique. L' $\alpha$ -L fucosidase est ensuite éluée par un tampon contenant du fucose.

Le calcul du facteur de purification, réalisé par rapport à l'homogénat, conduit à une purification de l'ordre de 39 000 avec un rendement de l'ordre de 16p.cent.

Les différentes analyses de l'enzyme, réalisées par électrophorèse sur différents supports et dans différentes conditions, ont montré que celui-ci était homogène (fig.5 A, p. 24).

#### B - PURIFICATION DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE

L'effluent de la colonne précédente est soumis à une double précipitation par le sulfate d'ammonium à pH7 (40-83 % sat), le précipité, qui en résulte, est ajouté à celui obtenu lors du relargage par le sulfate d'ammonium du surnageant 63p.cent de saturation de l'extrait soluble de C<sub>11</sub>L (voir figure 1 p.16). La fraction, ainsi préparée, dialysée, est soumise à une chromatographie sur une colonne de séphadex G-100. Le graphique de la figure 2 p.18 présente les diagrammes d'éluion respectifs de la phosphatase acide et de l' $\alpha$ -D glucosidase. Ce dernier enzyme est élué de la colonne dans un grand volume, comme en témoigne la distribution étalée de l'activité enzymatique. Le calcul du rendement, par rapport à la fraction C<sub>11</sub>L, est inférieur à 10p.cent. L'analyse de la protéine, réalisée par électrophorèse en milieu dénaturant, montre l'hétérogénéité de l'enzyme (voir figure 5 B p.24). Ceci est compatible avec les résultats de JEFFREY et al (12), qui complètent la purification par une chromatographie sur DEAE cellulose et une lyophilisation. Nous avons essayé, dans une série d'expériences, d'effectuer ces étapes supplémentaires avec, toutefois, des rendements très faibles (très inférieurs à ceux



**FIGURE 3** : Diagramme d'élution de la phosphatase acide après chromatographie sur DEAE cellulose.

Les fractions renfermant la majeure partie de l'activité phosphatasique, éluées de la colonne de sēphadex G-100, sont soumises à une double précipitation par le sulfate d'ammonium (50-80% sat. pH7,1). Le sēdiment solubilisé dans le tampon imidazole 5mM, pH7,1, dialysē, est déposē sur une colonne de DEAE cellulose stabilisée en ce tampon. Le graphique représente la mesure de l'activité enzymatique au cours de l'élution par le tampon imi 5mM, pH7,1 puis par un gradient linēaire de NaCl (0-0,5M) dans ce mēme tampon.



obtenus par JEFFREY et al (12). Nous avons donc été contraints de rechercher une autre méthode de purification de l' $\alpha$ -D glucosidase acide (voir chapitre II p.25).

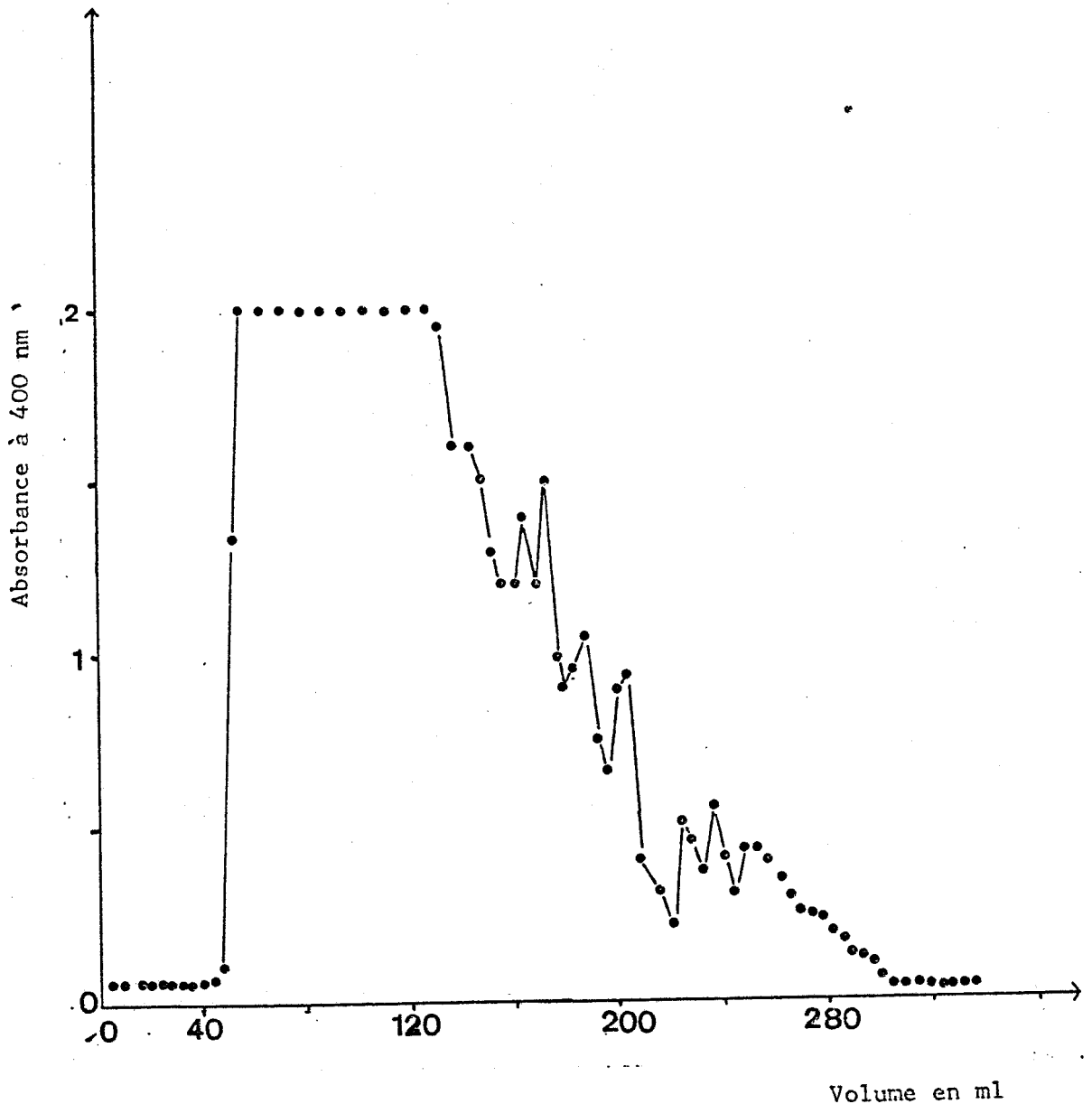
### C - PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE ACIDE

A l'issue de la chromatographie sur séphadex G-100, les fractions, contenant la majeure partie de l'activité phosphatasique, sont soumises à un double relargage par le sulfate d'ammonium (50-80 % sat pH 7,1) (voir figure 1 p.16). Le sédiment dialysé est déposé sur une colonne de DEAE cellulose stabilisée dans le tampon de chromatographie. Comme le montre le diagramme d'élution, représenté dans la figure 3 p.20, une partie importante de l'activité enzymatique (60 % de l'activité initiale) n'est pas retenue par la colonne et constitue le pic I d'activité phosphatasique. Un gradient linéaire de NaCl (0-0,5M) permet d'éluer un deuxième pic d'activité lorsque la concentration en sel atteint 0,095M.

Les étapes suivantes de purification n'ont été effectuées sur la fraction du pic I de la phosphatase car seule cette forme de l'enzyme avait pu être cristallisée par IGARASHI et HOLLANDER (42). Les fractions, correspondant à plusieurs expériences, ont été rassemblées, puis soumises à une précipitation par le sulfate d'ammonium (80 % sat pH 6). Le sédiment obtenu a été dialysé avant d'être chromatographié sur une colonne d'hydroxylapatite. Une élution par le sulfate d'ammonium permet de récupérer 90 % de l'activité phosphatasique chromatographiée (voir figure 4 p.22).

Une ultime étape de purification consistant à obtenir une forme cristalline de l'enzyme par des relargages successifs par le sulfate d'ammonium (voir Matériel et Méthodes), ne nous a permis d'obtenir que 1 % de l'enzyme sous cette forme.

Le résultat par électrophorèse en gel de



**FIGURE 4** : Diagramme d'élution du Pic I de la phosphatase acide après chromatographie sur hydroxylapatite.

Les fractions de la phosphatase acide (Pic I), provenant de plusieurs expériences, sont rassemblées et amenées à 80% de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité solubilisé dans le tampon maléate 10mM, pH6, dialysé, est déposé sur une colonne d'hydroxylapatite stabilisée en ce même tampon. Le graphique représente la mesure de l'activité enzymatique au cours de l'élution par le sulfate d'ammonium 100mM.



polyacrylamide-SDS de l'enzyme cristalline est présent dans la figure 5C p. 24. On peut constater, qu'en dépit d'une purification poussée, l'enzyme apparait hétérogène.

#### D - CONCLUSION

Lors des tentatives de purification séquentielle de plusieurs hydrolases lysosomales, nous avons pu obtenir des fractions pures d'  $\alpha$ -L fucosidase. Il semble donc possible d'envisager l'étude de la biosynthèse de cet enzyme.

Les fractions d'  $\alpha$ -D glucosidase et de phosphatase acide que nous avons isolées, ne sont que partiellement purifiées.

La phosphatase acide cristalline, considérée comme homogène par IGARASHI et HOLLANDER (42) après électrophorèse en milieu non dénaturant, se révèle hétérogène en gel de polyacrylamide-SDS. Si l'on considère d'une part, que le rendement global de la purification est très faible et que d'autre part, les relations structurales, pouvant exister entre les formes multiples de l'enzyme, restent à établir, il apparait que la phosphatase acide ne constitue pas un modèle de choix pour l'étude de la biosynthèse d'enzymes lysosomaux.

En revanche, les résultats obtenus pour l'  $\alpha$ -D glucosidase (voir figure 5 B p. 24) nous ont incité à poursuivre la mise au point d'une méthode de purification.

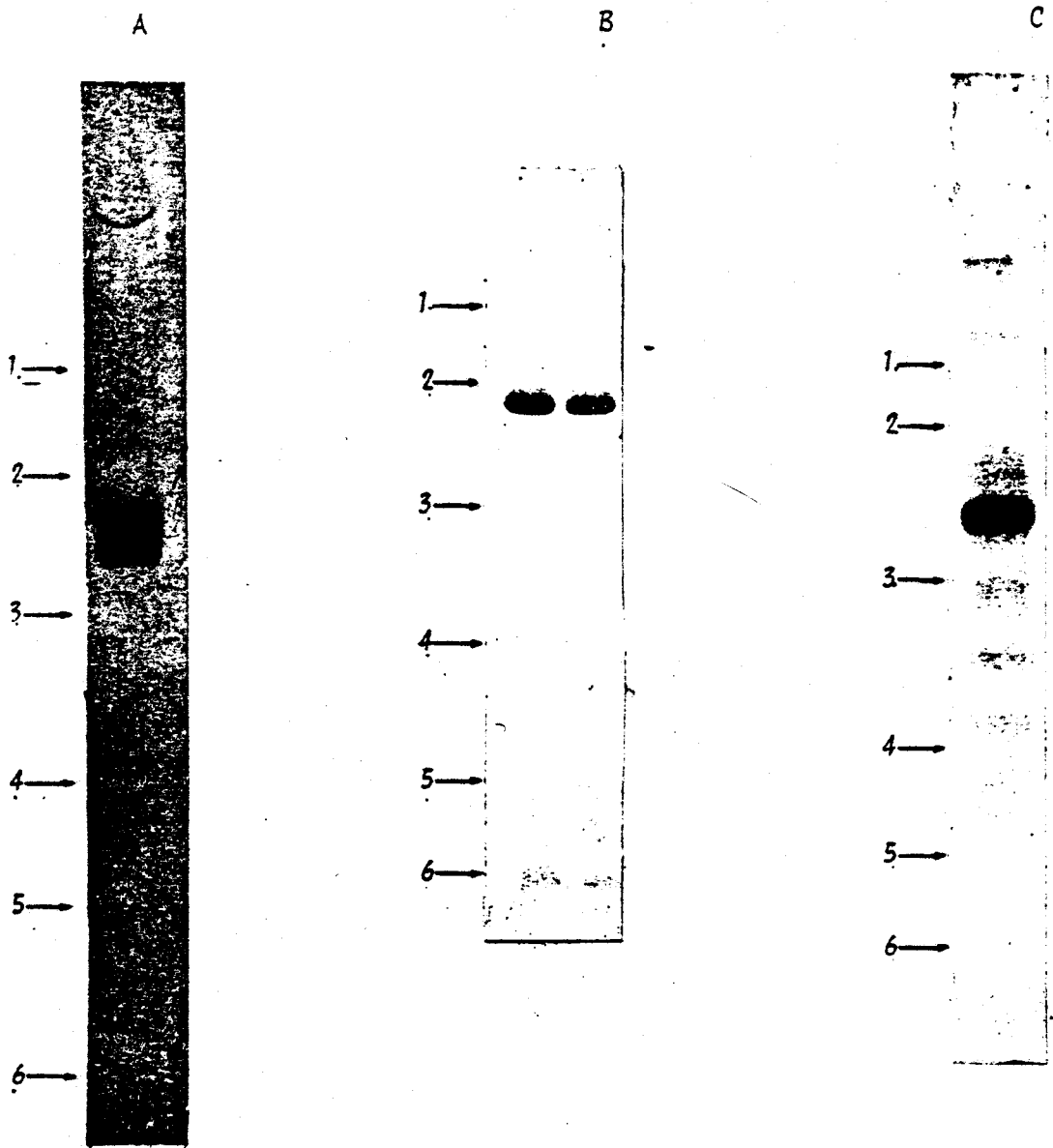


FIGURE 5 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l' $\alpha$ -L fucosidase, de l' $\alpha$ -D glucosidase et de la phosphatase acide.

A - Les différentes fractions, possédant l'activité  $\alpha$ -L fucosidasique après élution d'une colonne d'Agarose - $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine, sont rassemblées. Une fraction aliquote (30 $\mu$ g) est analysée en gel de polyacrylamide-SDS.

B - Les fractions, possédant l'activité glucosidasique après élution d'une colonne de séphadex G-100, sont rassemblées. Une partie aliquote (15 $\mu$ g de protéine) est prélevée, concentrée sur aquacide II et dialysée contre le tampon Tris-HCl 62,5mM, pH6,8 avant d'être analysée en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-18p.cent; gel de 1mm d'épaisseur et de 15cm de longueur).

C - Une fraction aliquote (20 $\mu$ g de protéine) de la forme cristalline de la phosphatase est analysée en gel de polyacrylamide-SDS.

Les flèches indiquent la position, dans le gel, des différentes protéines "marqueurs" (1 : 94 000 ; 2 : 67 000 ; 3 : 43 000 ; 4 : 30 000 ; 5 : 20 000 ; 6 : 14 400).



CHAPITRE II

PURIFICATION

DE L'  $\alpha$ -DGLUCOSIDASE LYSOSOMALE



La méthode de purification, utilisée dans les expériences du Chapitre I, ne nous a permis d'obtenir qu'une fraction partiellement purifiée d' $\alpha$ -D glucosidase avec un rendement faible. On pourrait expliquer ces résultats en considérant que :

a) la chromatographie sur séphadex G-100 permet de séparer efficacement l'enzyme des protéines de haut poids moléculaire, mais augmente en contrepartie la probabilité d'une dégradation de l' $\alpha$ -D glucosidase par des enzymes protéolytiques, car ceux-ci sont de bas poids moléculaire (43).

b) L'élution de l'enzyme dans un grand volume est un inconvénient sérieux de la méthode, favorisant les pertes d'activité.

Nous décrivons, dans ce chapitre, les expériences ayant permis la mise au point d'une nouvelle méthode de purification de l' $\alpha$ -D glucosidase.

#### A - INTERET DE L'UTILISATION DE L' $\alpha$ -D METHYL GLUCOSIDE

Dans une première série d'essais, nous avons donc tenté d'améliorer les résultats obtenus précédemment en effectuant deux chromatographies successives sur séphadex G-50 et G-100 respectivement. D'autre part, dans le but de supprimer les inconvénients qu'entraîne l'élution de l'enzyme dans un grand volume, nous avons ajouté de l' $\alpha$ -D méthyl glucoside au tampon d'élution. Cet inhibiteur déplace l'enzyme de son support d'affinité et réduit, de ce fait, la dilution constatée à l'issue de la chromatographie. Il fut utilisé pour la première fois par ROSENFELD (14).

La figure 6 p.26 représente un diagramme des opérations effectuées. L'extrait soluble de la fraction

Fraction soluble de C<sub>11</sub>-L soumise à une double précipitation par (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40-83% sat. pH7). Le sédiment est solubilisé dans le tampon EDTA 1mM pH5, KCl 25mM, β-mercaptoéthanol 1mM, puis dialysé contre ce même tampon.

Chromatographie sur séphadex G-50 stabilisé dans le même tampon

α-D glucosidase précipitée par le sulfate d'ammonium (83% sat. pH7) est solubilisée, puis dialysée contre le tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM, β-mercaptoéthanol 1mM

Chromatographie sur séphadex G-100 stabilisée en ce même tampon

Elution par tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM, β-mercaptoéthanol 1mM  
α-D méthylglucoside 100mM

α-D GLUCOSIDASE

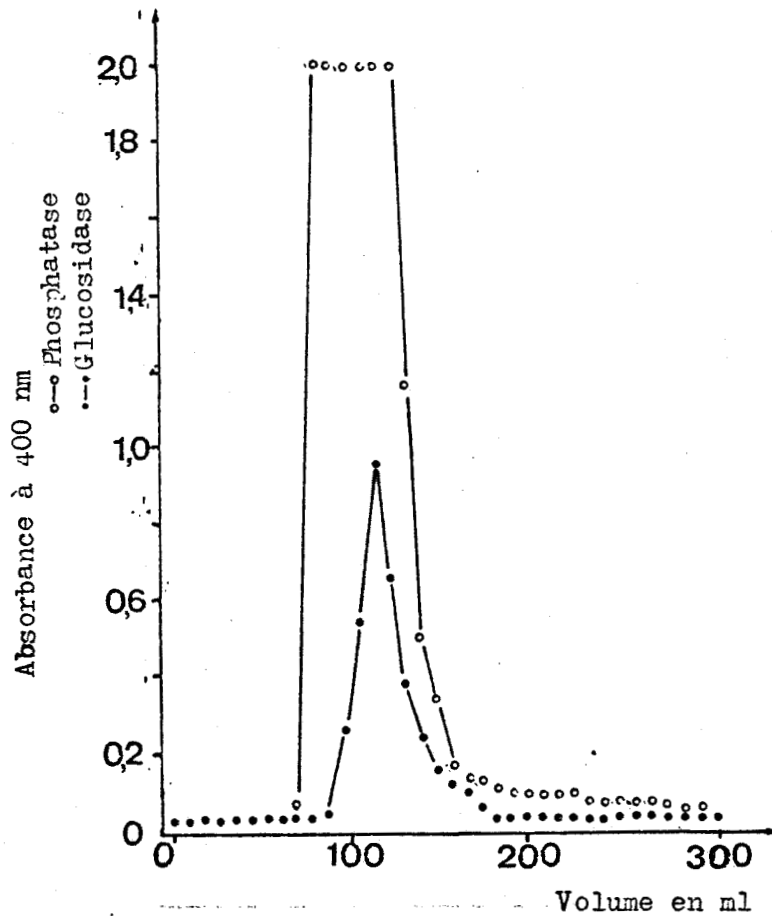
FIGURE 6 : Diagramme des différentes opérations effectuées lors de la purification de l'α-D glucosidase lysosomale (voir figures 7 et 8).

$C_{II}^L$  est soumis à une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium à pH7 (40-83 % sat). Le précipité est dialysé, puis déposé sur une colonne de séphadex  $G_{50}$  (voir figure 7 p 28); le but de cette chromatographie est d'éliminer la majeure partie des protéines de bas poids moléculaire. Comme le montre la figure 7, l'enzyme est exclu du gel avec la plupart des protéines. Les fractions, contenant de l'activité glucosidase, sont rassemblées et soumises à un relargage par le sulfate d'ammonium (83 % sat pH7). Le sédiment obtenu est solubilisé, puis déposé sur une colonne de séphadex G-100 (voir figure 8, p 29). La chromatographie est développée par un tampon contenant de l' $\alpha$ -D méthyl glucoside. Ainsi que l'on peut le constater dans le diagramme de la figure 8, l'enzyme est élué dans un plus faible volume (comparer avec fig. 2 p. 18). Cependant, le rendement obtenu demeure faible (10 p. cent par rapport à  $C_{II}^L$ ).

Nous avons donc supposé que les pertes d'activités constatées étaient essentiellement dues à une dégradation par protéolyse. Les expériences, décrites dans le paragraphe suivant, confirment cette hypothèse.

## B - ETUDE DE LA STABILITE DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE DANS DIFFERENTES CONDITIONS IONIQUES

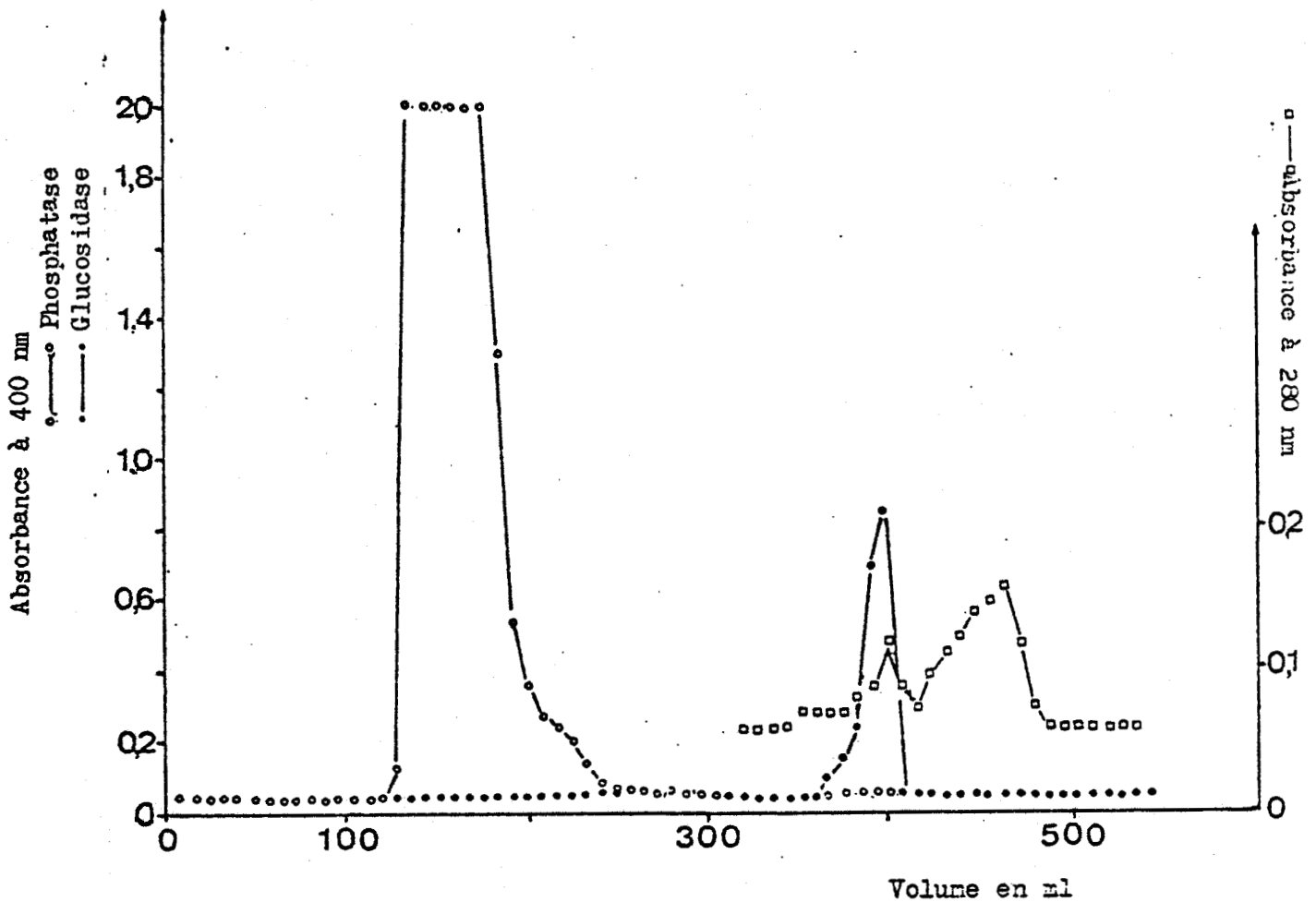
Des fractions aliquotes d' $\alpha$ -D glucosidase, provenant de la préparation précédente, sont préincubées à 37° C pendant 30 mn en présence de concentrations croissantes en KCl ou en présence d'EDTA. Un témoin est préincubé, pendant le même temps, à 4° C en présence de 25mM KCl. Des parties aliquotes sont alors prélevées pour la détermination de l'activité enzymatique et le reste des échantillons est fixé immédiatement par le formaldéhyde pour être analysé en électrophorèse.



**FIGURE 7** : Diagramme d'élution de l'  $\alpha$ -D glucosidase, après chromatographie sur séphadex G-50.

Un extrait soluble de la fraction C<sub>III</sub>L est préparé à partir de 275g de foie. Il est soumis à un double relargage par le sulfate d'ammonium (40-83% sat. pH7). Le sédiment est repris dans le tampon EDTA 1mM, pH<sub>5</sub>, KCl 25mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1mM. La solution enzymatique, dialysée, est déposée sur une colonne de séphadex G-50 stabilisée dans ce même tampon. Le graphique représente la mesure de l'activité enzymatique de l'  $\alpha$ -D glucosidase et de la phosphatase acide au cours de l'élution effectuée par ce même tampon.

BUS  
LILLE



**FIGURE 8** : Chromatographie sur séphadex G-100 de l' $\alpha$ -D glucosidase.

Les fractions, contenant la majeure partie de l'activité glucosidasique, éluées de la colonne de séphadex G-50, sont soumises à une précipitation par le sulfate d'ammonium (83% sat. pH7). Le sédiment solubilisé dans le tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1mM, est dialysé contre ce même tampon. La solution enzymatique est ensuite déposée sur une colonne de séphadex G-100. Le graphique représente la mesure de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -D glucosidase et de la phosphatase acide; et la mesure de la densité optique au cours de l'éluion par le tampon contenant de l' $\alpha$  méthyl glucoside 100mM.



Les résultats, consignés dans le tableau I, p. 31 montrent que quelle que soit la concentration en sel de potassium, environ 30 % de l'activité sont perdues durant la pré-incubation. La présence de 20mM EDTA permet de préserver 85 % de l'activité enzymatique. Ceci est confirmé par l'analyse de ces mêmes fractions en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (voir figure 9 p. 32)

La comparaison des résultats obtenus lors de l'analyse de la fraction enzymatique initiale fixée par le formaldéhyde avant dialyse (n°1) ou non fixée (n°2) permet de mettre en évidence une perte importante du matériel protéique pendant la dialyse dans le cas de l'échantillon non fixé. De même, la comparaison de l'échantillon témoin de la série pré-incubée à 37° C (n°4) avec l'échantillon non pré-incubé (n°3) suggère qu'une grande partie de la fraction protéique se dégrade à 37° C. L'augmentation de la concentration en KCl dans l'échantillon semble limiter ce phénomène (comparer échantillons n°4, 5 et 6). Lorsque la pré-incubation à 37° C est effectuée en présence d'EDTA (n°7), l'intensité de coloration du matériel de haut poids moléculaire n'est plus que légèrement inférieure à celle observée pour l'échantillon n°3, cependant que le produit de bas poids moléculaire (déjà observé dans l'échantillon n°3) peut être retrouvé en plus grande quantité.

Nous interprétons ces résultats comme signifiant que les échantillons n° 3, 7, 6, 5 et 4 correspondent à des stades de protéolyse de plus en plus poussée de la préparation. Les conditions ioniques de l'échantillon n°7 (20 mM EDTA) semblent donc être les plus adaptées pour la préservation de la structure et de l'activité de l'enzyme pendant la préparation.

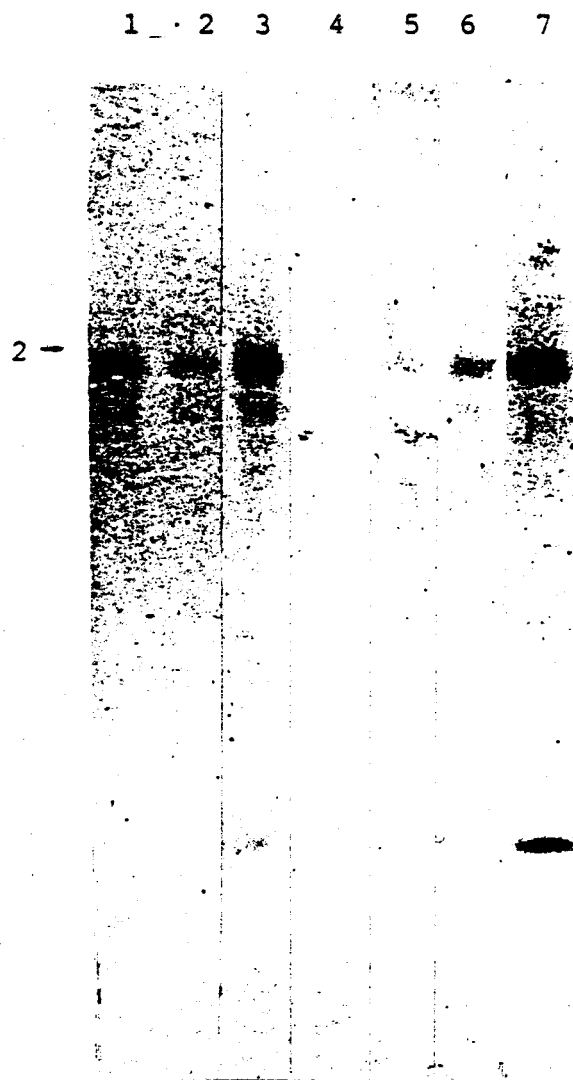
On peut remarquer, en outre, que l'intensité de coloration, par le bleu de coomassie, des différents échantillons analysés par électrophorèse de la figure 9 semble peu en rapport avec l'activité enzymatique mesurée

Numéro des échantillons dans l'électrophorèse de la figure 9	3	4	5	6	7
Molarité en KCl (mM)	25	25	200	600	25
Molarité en EDTA (mM)	--	--	--	---	20
Préincubation 30mn	4°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Activité en %	100	71	70	69	85

TABLEAU I

Stabilité de l'  $\alpha$ -D glucosidase dans différentes conditions ioniques.

Des fractions aliquotes de 1ml, provenant de la préparation d'  $\alpha$ -D glucosidase de la figure 8, sont préincubées à 37°C pendant 30 mn en présence de concentrations croissantes en KCl (échantillons n°4, 5 et 6), ou en présence de 20mM EDTA (échantillon n°7). Une fraction (échantillon n°3) est préincubée, pendant le même temps, à 4°C en présence de 25mM KCl. Après 30 mn, 100  $\mu$ l sont alors prélevés dans chaque fraction et incubés 30 mn à 37°C en présence de substrat pour déterminer l'activité enzymatique, tandis que le reste est immédiatement fixé par le formol à 1 p.cent (concentration finale) (voir figure 9 p.32)



**FIGURE 9 :** Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fractions d'  $\alpha$ -D glucosidase préincubées dans différentes conditions ioniques.

Des fractions initiales (non préincubées) d'  $\alpha$ -D glucosidase, fixées (échantillon n°1) ou non (échantillon n°2) par le formaldéhyde à 10p.cent dans le tampon triéthanolamine 10mM, pH7,4 pendant 30 mn à 4°C, ainsi que les fractions préincubées en présence de concentrations en KCl (échantillon n°3, 4,5 et 6) ou en présence d'EDTA (échantillon n°7), fixées par le formaldéhyde, sont dialysées contre de l'eau distillée à 4°C. Ces différentes fractions sont ensuite analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (10-18%) comme il est décrit dans matériel et méthodes. Après 18 heures de migration, le gel est coloré par le bleu de coomassie.



- 33 -

pour chacun de ceux-ci (voir tableau I p.31). Ceci suggère que, dans la préparation utilisée pour ces expériences, la protéine catalysant l'hydrolyse du paranitrophényl  $\alpha$ -D glucopyranoside n'est que le composant mineur d'un mélange.

#### C - RECHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-100 DE LA FRACTION D' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE

Le diagramme, présenté dans la figure 10 p.34, confirme l'hypothèse selon laquelle l'  $\alpha$ -D glucosidase purifiée dans les conditions décrites plus haut, n'est que le composant mineur d'un mélange. En effet, une nouvelle chromatographie sur séphadex G-100 en présence de 20mM EDTA (pH5), permet d'affirmer qu'une très faible proportion du matériel absorbant les U.V possède l'activité enzymatique.

#### D - COMPORTEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE LORS D'UN RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

La préparation, simultanée de l'  $\alpha$ -L fucosidase et de l'  $\alpha$ -D glucosidase acide, nous oblige à de nombreuses utilisations du relargage par le sulfate d'ammonium, car les conditions de pH recommandés pour la précipitation de la fucosidase par OPHEIM et TOUSTER (41) sont différentes de celles qui furent utilisées par JEFFREY et al pour purifier l'  $\alpha$ -D glucosidase (12) (voir diagramme de la figure 1, chapitre I p. 16).

Nous avons donc essayé de réduire le nombre d'opérations à effectuer en étudiant le comportement de l'  $\alpha$ -D glucosidase lors d'un relargage par le sulfate d'ammonium à pH6 (conditions utilisées pour l'  $\alpha$ -L fucosidase). Comme le montre le tableau II, 88 à 90 % de l'activité  $\alpha$ -D glucosidasique sont retrouvées dans le précipité contenant l'  $\alpha$ -L fucosidase. D'autre part, à pH6 comme à pH7, l'  $\alpha$ -D glucosidase est soluble dans le sulfate d'ammonium

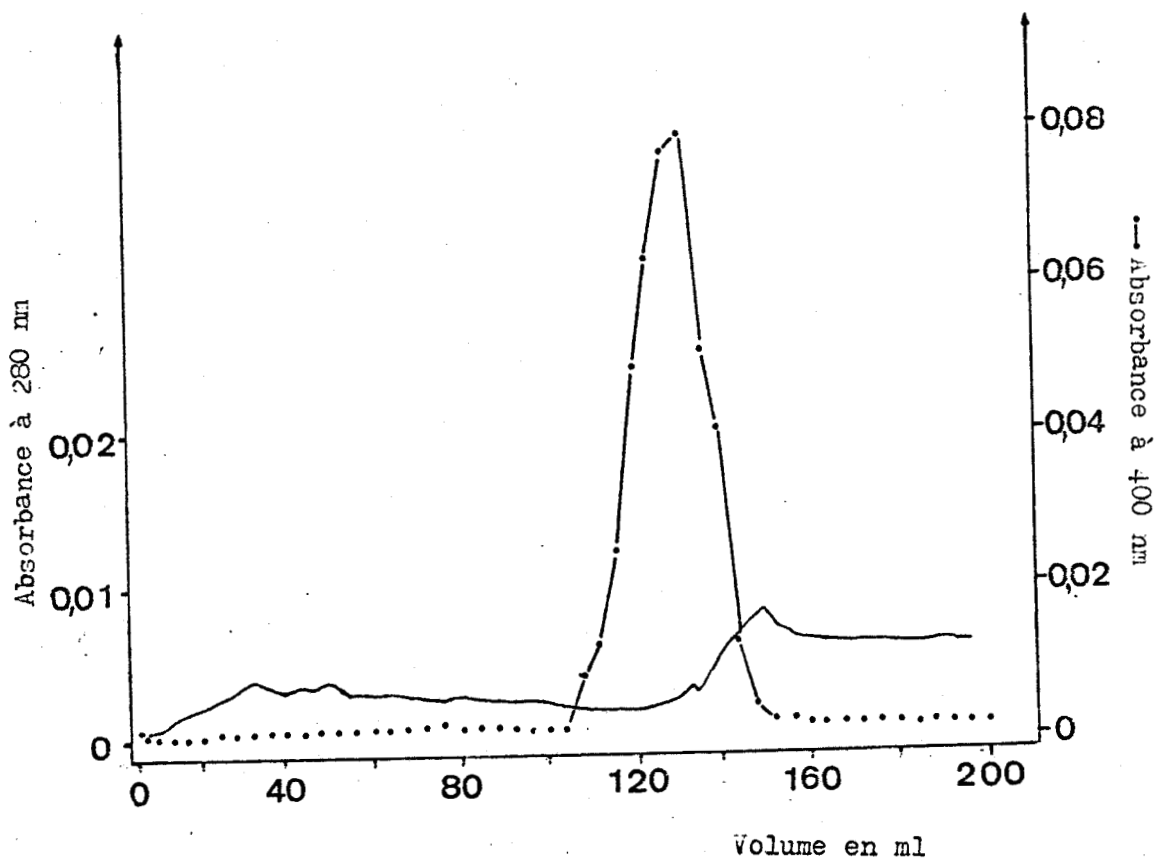


FIGURE 10 : Chromatographie sur sephadex G-100 de l' $\alpha$ -D glucosidase.

Une fraction aliquote de 5ml de glucosidase provenant de la préparation de la figure 8, est amenée en 20mM EDTA, pH5, avant d'être déposée sur une colonne de sephadex G-100 stabilisée en EDTA 20mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$ mercaptoéthanol 1mM. Le graphique représente l'enregistrement de la densité optique et la mesure de l'activité enzymatique au cours de l'élution par ce même tampon contenant 0,1M méthyl glucoside.



Fraction soluble de C <sub>II</sub> L précipité par le (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à	Rendement en %
40% sat.pH6	0
40% sat.pH7	0
40-63% sat.pH6	90
40-63% sat.pH7	88
40-83% sat.pH6	100
40-83% sat.pH7	100

TABLEAU II

Comportement de l'  $\alpha$ -D-glucosidase lors d'un relargage par le sulfate d'ammonium.

Des fractions aliquotes de 5ml d'un extrait soluble de C<sub>II</sub>L sont soumises, successivement, à des précipitations par le sulfate d'ammonium à pH6 ou à pH7 (40% sat, 63% sat et 83% sat). Les sédiments respectifs sont solubilisés dans le tampon EDTA 20mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$  mercaptoéthanol 1mM.

Des fractions de 10 et 20  $\mu$ l sont alors prélevées et incubées en présence de substrat 30mn à 37°C pour déterminer l'activité enzymatique. La lecture à 400 nm est effectuée contre un témoin non incubé.

à 40 % de saturation.

Les protéines, précipitant entre 63 et 83 % de saturation pH6, étant principalement de bas poids moléculaire, nous avons donc pensé qu'il était avantageux de délaissier cette fraction ne contenant que 10 % environ de l'activité totale pour simplifier et rendre plus rapide la préparation de l' $\alpha$ -D glucosidase.

L'ensemble des expériences, décrites dans les paragraphes précédents, nous a permis de déterminer de meilleures conditions de préparation de l' $\alpha$ -D glucosidase. Dans le paragraphe suivant, nous présentons la méthode améliorée ayant permis l'obtention de fractions très purifiées de l'enzyme lysosomal.

#### E - ISOLEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMAL.

L'extrait soluble de la fraction C<sub>II</sub>L est préparé dans les conditions ioniques optimales déterminées précédemment (voir paragraphe B). Les premières étapes de purification de l' $\alpha$ -L fucosidase et de l' $\alpha$ -D glucosidase sont communes. Les données, recueillies au cours de ces étapes, sont rassemblées dans le tableau III. Celles-ci montrent que les deux enzymes sont purifiées avec des rendements similaires. 56 % de l'activité  $\alpha$ -L fucosidasique et 50 % de l'activité  $\alpha$ -D glucosidasique sont obtenues dans le précipité 63 % de saturation pH6 par rapport à l'homogénat.

Ce précipité est soumis à une chromatographie d'affinité sur Agarose- $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine pour obtenir l' $\alpha$ -L fucosidase. La fraction, non retenue, contient l' $\alpha$ -D glucosidase. La fraction 40-63 % de saturation en sulfate d'ammonium à pH6 est préparée. Le précipité obtenu est solubilisé et dialysé contre le tampon de chromatographie (tampon B). La solution enzymatique est ensuite concentrée sur membrane "amicon" XM50 dans le but d'éliminer la majeure partie des protéines de bas poids moléculaire.

Fractions	Rendement en % <sup>*</sup>	
	L Fucosidase	D glucosidase
Homogénat	100	100
PNS	86	92
C <sub>III</sub> L	72	65
Extrait soluble de C <sub>II</sub> L	61	55
Précipité (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (63% sat.pH6)	56	50

\*moyenne de 3 expériences

TABLEAU III

Comparaison des rendements obtenus pour les deux enzymes lysosomaux lors des étapes communes de purification.



TABLEAU IV

Purification de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale du foie de rat

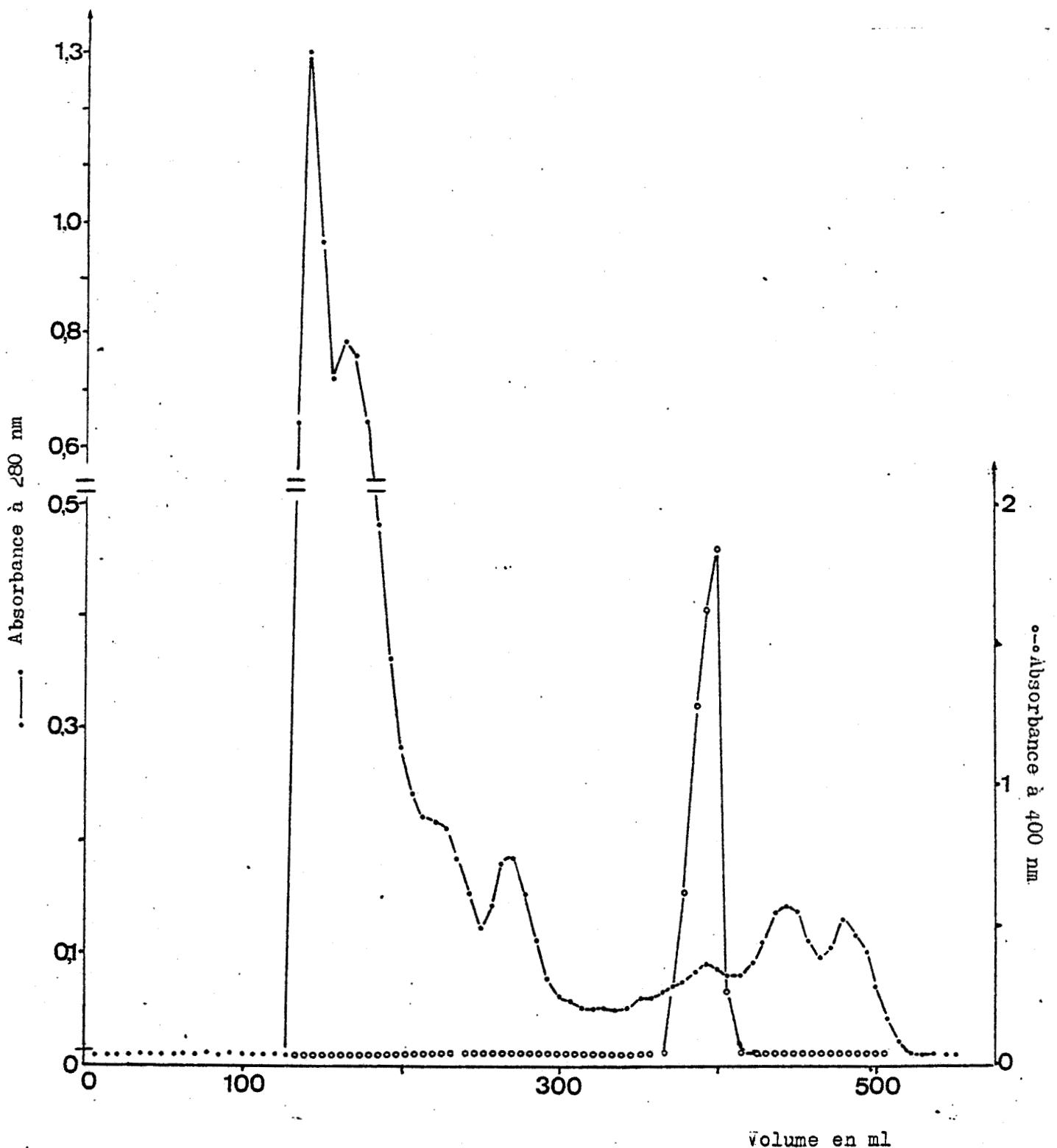
618g de foie sont homogénéisés dans le milieu 0,25S  $T_{50}K_{25}M_3$  et une fraction purifiée de glucosidase est préparée comme il est décrit dans matériel et méthodes. L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 pmole de paranitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside par mn à 37°C.

Fractions	Volume en ml	Protéines en mg	Activité spécifique U/mg de protéines	Facteur de purification	Rendement en %
Homogénat	2 800	124 333	0,00029		
C II L	870	16 000	0,0015	1	100
Extrait soluble de C II L	400	4 904	0,0042	2,8	85,8
Précipité (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (63% sat.)	45	1 350	0,013	8,7	76,3
Fraction 40-63% sat. dialysé après XM50	12,5	145	0,096	64	58,4
1ère chromatographie sur séphadex G-100	40	4,58	2,62	1 746	50
2e chromatographie sur séphadex G-100	8	1,9	4,42	2 946	35

Elle est ensuite déposée sur une colonne de séphadex G-100, stabilisée dans le tampon B. L'élution de l' $\alpha$ -D glucosidase est effectuée par le tampon contenant de l' $\alpha$ -D méthyl glucoside. Le diagramme d'élution, représenté dans la figure 11, p.40, montre qu'un pic d'activité enzymatique est obtenu dans une zone de faible teneur en protéines. Cependant, la présence voisine de pics protéiques, ne possédant pas d'activité  $\alpha$ -D glucosidasique, semble indiquer une contamination probable de l' $\alpha$ -D glucosidase.

La purification de l'enzyme est donc poursuivie par une chromatographie de tamisage moléculaire réalisée sur la même colonne que précédemment, après que celle-ci ait été lavée par deux volumes de tampon glucoside. Comme le montre le diagramme de la figure 12, p.41, l'activité  $\alpha$ -D glucosidasique coïncide avec un pic d'absorbance en U.V. L'analyse de la protéine, effectuée par électrophorèse en milieu non dénaturant (voir figure 13, p.42), montre que la préparation obtenue est homogène.

Les données, que nous avons obtenues lors des différentes étapes de purification de l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale, sont rassemblées dans le tableau IV, p.38. Le facteur de purification, calculé par rapport à la fraction C<sub>11</sub>L, est de l'ordre de 3000 et le rendement de 35 p.cent. Ces résultats sont très sensiblement supérieurs à ceux obtenus par JEFFREY et al (12) qui, calculés par rapport à la même fraction, donnaient une purification de l'ordre de 1300 fois avec un rendement de 15 p.cent.

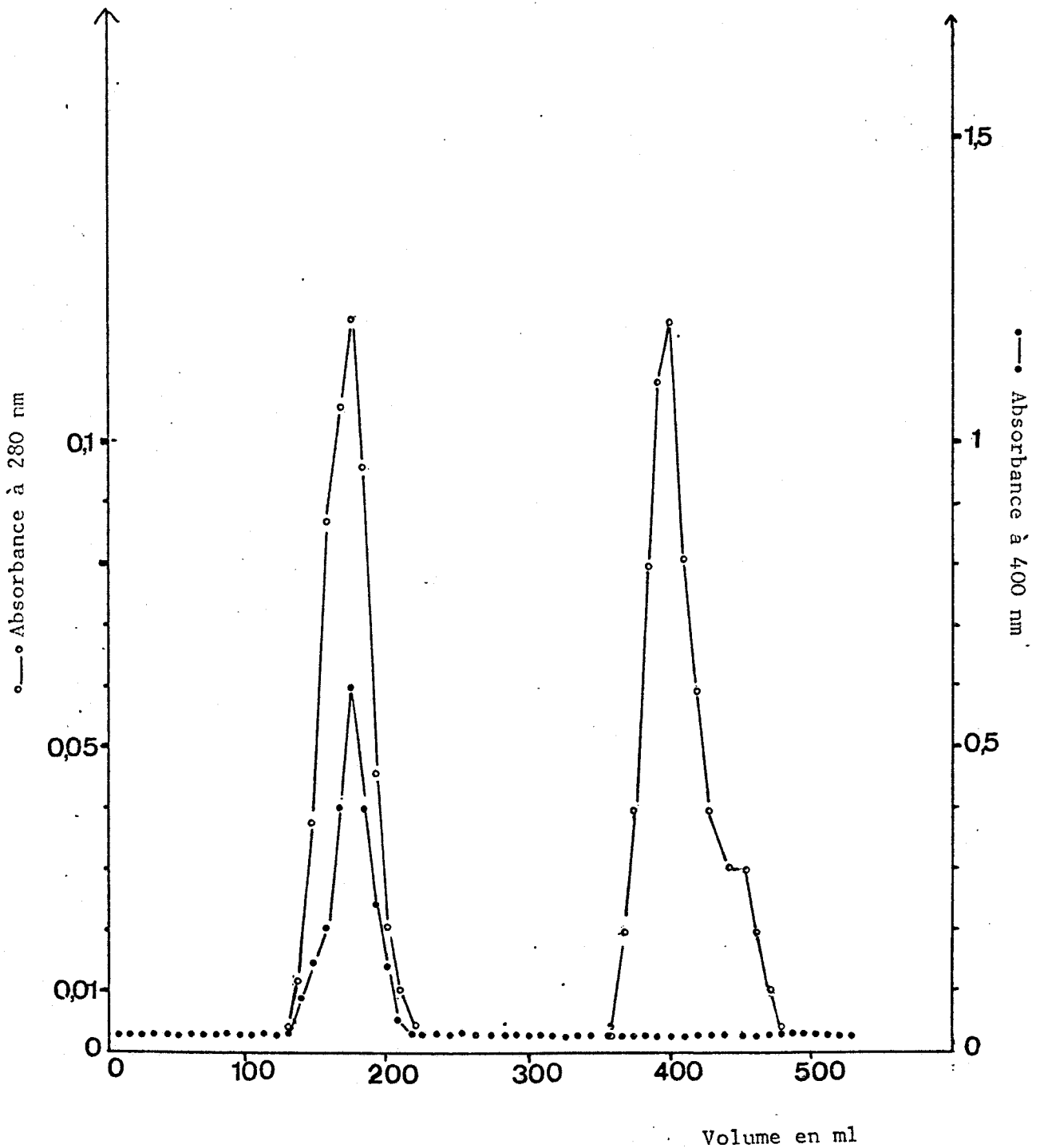


**FIGURE 11** : Isolement de l'  $\alpha$ -D glucosidase.  
Première chromatographie sur séphadex G-100.

Un extrait soluble de la fraction C<sub>II</sub>L est préparé à partir de 618g de foie. Il est soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium (63% sat, pH6) et le précipité est solubilisé dans le tampon A. La solution est chromatographiée sur une colonne d'Agarose- $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine. L'effluent est alors soumis à un double relargage par le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40-63% sat, pH6). Le précipité, solubilisé dans le tampon B, dialysé contre ce même tampon, est déposé sur une colonne de séphadex G-100. La suite des opérations est identique à celle décrite dans Matériel et Méthodes. Le graphique représente l'enregistrement de la densité optique et la mesure de l'activité enzymatique au cours de l'élu-tion par le méthyl glucoside 0,1M dans le tampon B.

AINS  
LILLE





**FIGURE 12** : Isolement de l'  $\alpha$ -D glucosidase  
Deuxième chromatographie sur séphadex G-100.

Les fractions, contenant la majeure partie de l'activité glucosidasique, éluées de la colonne de séphadex G-100 précédente, sont rassemblées. Une fraction aliquote de 20ml est rechromatographiée sur cette même colonne, après que celle-ci ait été lavée par deux volumes de tampon B contenant 0,1M méthyl glucoside. Le diagramme représente l'enregistrement de la densité optique et la mesure de l'activité enzymatique au cours de l'éluion par ce même tampon.

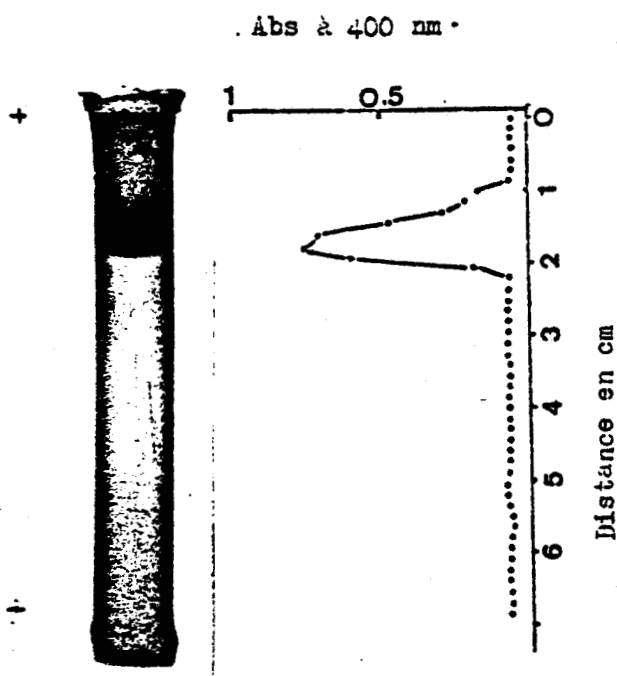


FIGURE 13 : Electrophorèse en milieu non dénaturant de l' $\alpha$ -D glucosidase.

Deux parties aliquotes (15 $\mu$ g de protéine) d' $\alpha$ -D glucosidase provenant de la préparation de la figure 12 sont analysées en gel de polyacrylamide à 7,5p.cent (voir Matériel et Méthodes). Après 3 heures de migration à 4 °C (2,5mA/gel), un gel est coloré par le bleu de coomassie, tandis que le second est découpé en tranches de 1mm qui sont incubées dans la solution de substrat pour détecter l'activité glucosidasique.

CHAPITRE III

COMPOSITION EN SOUS - UNITES

DE L'  $\alpha$ -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE

La méthode de purification, décrite dans le chapitre précédent (II, E), nous a permis d'obtenir une fraction enzymatique possédant un très haut degré de pureté. Au cours de nombreux contrôles, effectués par électrophorèse en milieu non dénaturant, aucun contaminant protéique n'a été mis en évidence, même lorsque des quantités assez importantes (30-40 $\mu$ g) d'enzyme ont été analysés. La pureté de l'enzyme nous a donc semblé satisfaisante pour envisager la production d'antisérums chez le lapin.

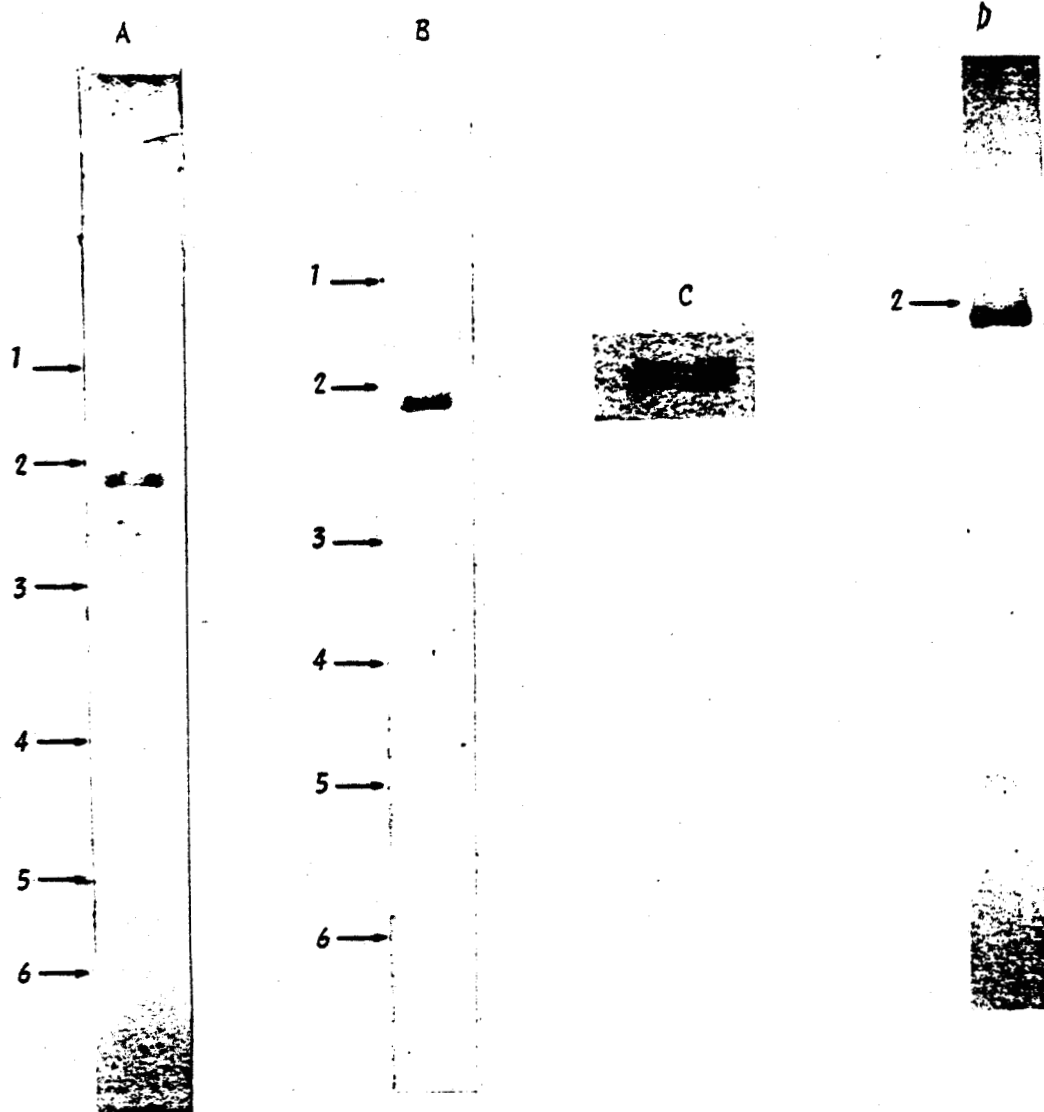
Les expériences, présentées dans ce chapitre, concernent le problème de la composition en sous-unités de l' $\alpha$ -D glucosidase.

#### A - MISE EN EVIDENCE DES SOUS-UNITES DE L'ENZYME PAR DES TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

Comme le montre la figure 14 p.44, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS permet de conclure que les sous-unités de l'enzyme ont un poids moléculaire de 62 à 64 000. On peut cependant soupçonner une certaine hétérogénéité parmi les sous-unités de la protéine au vu de l'agrandissement de la photographie A (fig 14 C). L'alkylation de la protéine réduite avant l'électrophorèse n'apporte aucune modification des résultats (fig 14D).

Ainsi, à l'issue de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, on ne peut exclure la possibilité que les deux sous-unités, composant la molécule d' $\alpha$ -D glucosidase, soient non identiques.

Nous avons donc poursuivi notre analyse en étudiant le comportement électrophorétique de la protéine dans d'autres conditions dénaturantes. Comme le montre la figure 15 p.46, l'électrophorèse en présence d'urée 8 M



**FIGURE 14** : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l' $\alpha$ -D glucosidase.

A, B - Deux parties aliquotes d' $\alpha$ -D glucosidase (10 $\mu$ g de protéine), provenant de la figure 12, sont analysées en gel de polyacrylamide-SDS (gradient de 10-18p.cent, gel de 15cm de longueur et de 1mm d'épaisseur).

C - Agrandissement de la photographie A.

D - Une fraction aliquote d' $\alpha$ -D glucosidase (20 $\mu$ g de protéine) est analysée après que celle-ci ait été, au préalable, réduite et alkylée (voir Matériel et Méthodes).

Les flèches indiquent la position dans le gel des différentes protéines "marqueurs" (1 : 94 000 ; 2 : 67 000 ; 3 : 43 000 ; 4 : 30 000 ; 5 : 20 000 ; 6 : 14 400).

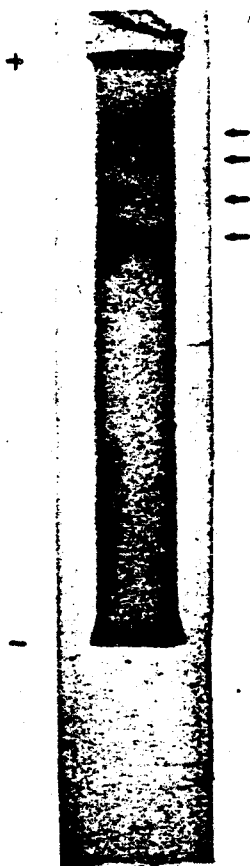
permet de visualiser quatre composants, dont deux majeurs.

Bien qu'il soit difficile d'interpréter de façon certaine la présence de composants mineurs dans l'enzyme purifiée (dégradation des sous-unités sous l'action d'hydrolases, existence de formes multiples etc.), ces résultats semblent confirmer l'existence de deux sous-unités non identiques dans la molécule d'enzyme.

#### B - ANTICORPS ANTI- $\alpha$ -D GLUCOSIDASE ET STRATEGIE EMPLOYEE POUR CONFIRMER L'EXISTENCE DE DEUX SOUS-UNITES DANS LA MOLECULE D' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE.

Nous avons appliqué la méthode de VAITUKATIS (44) pour obtenir des antisérums  $\alpha$ -D glucosidase. A partir de ceux-ci, nous avons isolé les IgG et préparé des supports d'affinité Biogel P 300-IgG (voir Matériel et Méthodes) de manière à isoler l'enzyme très rapidement et dans des conditions limitant fortement l'action possible d'hydrolases. Une fraction, contenant les organites de grandes tailles, est préparée en une seule étape de centrifugation à partir d'un homogénat de foie de rat. Cette fraction est rehomogénéisée en milieu hypotonique, à pH alcalin, avant d'être chromatographiée sur le support d'affinité (voir Matériel et Méthodes). Comme le montre la figure 16 p. 48, l'analyse, par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l' $\alpha$ -D glucosidase isolée sur immunoadsorbant, permet de mettre en évidence deux bandes protéiques très proches, possédant des masses moléculaires de 62 et 64.000.

Ces résultats confirment donc ceux obtenus précédemment (comparer figure 14 et 16) et suggèrent fortement -mais ne prouvent pas de manière absolue- que la molécule d' $\alpha$ -D glucosidase est constituée de deux sous-unités non identiques.



**FIGURE 15** : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-Urée de l'  $\alpha$ -D glucosidase.

Une partie aliquote (20  $\mu$ g de protéine) d' $\alpha$ -D glucosidase, provenant de la préparation, utilisée dans l'expérience de la figure 13, est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-Urée, dans les conditions ioniques décrites par REISFIELD (voir Matériel et Méthodes). Après 4 heures de migration (3mA/gel), le gel est coloré par le bleu de coomassie.

Les flèches indiquent la position des bandes dans le gel.



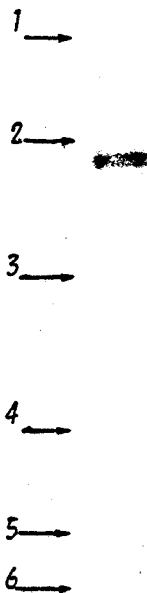
## CONCLUSION

La méthode de purification, décrite dans ce mémoire, permet d'isoler l' $\alpha$ -D glucosidase lysosomale de foie de rat avec un très haut degré de pureté (facteur de purification : 15.200 par rapport à l'homogénat) et avec un haut rendement (23 p.cent). Tirant parti des résultats obtenus lors de la recherche de conditions ioniques assurant une préservation de la structure et de l'activité de l'enzyme, ce procédé est simple (un seul support chromatographique) et rapide.

Les différentes analyses électrophorétiques de l' $\alpha$ -D glucosidase purifiée permettent de mettre en évidence deux chaînes polypeptidiques, de poids moléculaire différent, dans la fraction d'enzyme purifiée.

Les expériences ultérieures permettront d'interpréter, de façon plus certaine, les résultats que nous avons obtenus et d'entreprendre l'étude de la biosynthèse de l'enzyme.





**FIGURE 16** : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l' $\alpha$ -D glucosidase, isolée sur immunoadsorbant.

Les fractions, correspondant au pic protéique, éluées de la colonne de Biogel P300-IgG, sont rassemblées. Elles sont ensuite concentrées sur aquacide II, puis dialysées contre de l'eau distillée avant d'être analysées en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10-18p.cent, gel de 15cm de longueur et de 1cm d'épaisseur). Après 18 heures de migration, le gel est coloré par le bleu de coomassie.

Les flèches indiquent la position, dans le gel, des différentes protéines "marqueurs" (1 : 94 000 ; 2 : 67 000 ; 3 : 43 000 ; 4 : 30 000 ; 5 : 20 000 ; 6 : 14 400).

MATERIEL ET METHODES

## A - GENERALITES

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déminéralisée bidistillée et toutes les chromatographies sont effectuées à 4°C.

## B - PURIFICATION DE PLUSIEURS HYDROLASES LYSOSOMALES

### 1 - Préparation de la fraction C<sub>II</sub>L

200 à 300g de foie, provenant d'un lot de rats de même sexe, sont homogénéisés dans trois volumes de tampon 0,25S Te<sub>50</sub>K<sub>25</sub>M<sub>3</sub>. L'homogénat est dilué pour obtenir une concentration de 16 p.cent. Une fraction NC<sub>I</sub> est préparée par centrifugation dans le rotor JA-14 de la centrifugeuse J-21B, puis une fraction C<sub>II</sub>L dans le rotor JA-10. Celle-ci est lavée une fois dans le milieu 0,25S Te<sub>5</sub>K<sub>25</sub>E<sub>2</sub> (6ml/g de foie). Elle est rehomogénéisée dans le tampon maléate 10mM, pH6, MgSO<sub>4</sub> 1mM, β-mercaptoéthanol 1mM (1;4ml/g de tissu) par 20 allers-retour de piston, serré dans un homogénéiseur de DOUNCE. La suspension est centrifugée à 40.000g<sub>max</sub> pendant 20mn.



### 2 - Purification de l'α-L fucosidase

Le surnageant décanté est soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium (63 % de saturation à pH6) à 0-2°C. Le sédiment obtenu est dissous dans le tampon maléate 10mM, pH6, MgSO<sub>4</sub> 1mM, β mercaptoéthanol 1mM, puis déposé sur une colonne de sépharose-4B (10-15ml de gel, seringue de 50ml), connectée à une colonne composée de 3ml de Biogel P10, recouverts par 6ml d'Agarose-ε-aminocaproyl fucosylamine (seringue de 10ml). Les deux colonnes sont stabilisées dans le tampon maléate 10mM, pH6, NaCl 700mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, β mercaptoéthanol 1mM (tampon HFI). La colonne est lavée par 30ml de cette solution et les deux colonnes sont ensuite déconnectées. Le support d'affinité est encore lavé par 200ml

de tampon HFI, puis par 40ml de tampon maléate 10mM, pH6 NaCl 150mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, β mercaptoéthanol 1mM (tampon BFI). L'enzyme est ensuite élué par 20ml de fucose 0,1M dans le tampon BFI.

### 3 - Purification de l'α-D glucosidase

L'effluent de la colonne précédente, renfermant les activités phosphorylasiques et glucosidasiques, est soumis à une double précipitation par le sulfate d'ammonium (40-83% sat, pH7). Le précipité est ajouté à celui obtenu lors du relargage par le sulfate d'ammonium (83% sat pH7) du surnageant 63% de saturation de l'extrait soluble de C<sub>IT</sub>L. Le sédiment, repris dans le tampon imidazol 5mM, pH7, KCl 25mM, EDTA 1mM, β mercaptoéthanol 1mM, est dialysé contre ce même tampon avant d'être déposé sur une colonne de séphadex G-100 ( 2cm x 122cm) stabilisée en ce tampon. L'élution de la phosphatase acide et de l'α-D glucosidase est effectuée par ce tampon.

### 4 - Purification de la phosphatase acide

Les fractions, contenant la majeure partie de l'activité phosphorylasique, éluées de la colonne de séphadex G-100 précédente, sont rassemblées et soumises à un double relargage par le sulfate d'ammonium (50-80% sat pH7. Le sédiment, repris dans le tampon imidazol 5mM, pH7,1 est dialysé contre ce même tampon. La solution enzymatique est alors chromatographiée sur une colonne de DEAE-Cellulose (3,5 x 75cm), stabilisée dans le tampon imidazol 5mM, pH7,1. Ce tampon de chromatographie permet d'éluer le Pic I de la phosphatase acide. Un deuxième pic d'activité phosphorylasique est élué par un gradient linéaire de NaCl formé par un litre de tampon imidazol 5mM, pH7,1 et deux litres de tampon imidazol 5mM, pH7,1, NaCl 0,5M. Les fractions, contenant la majeure partie de l'activité phosphorylasique du Pic I, sont rassemblées et congelées à -20°C.

Les fractions de phosphorylase Pic I de plusieurs expériences sont ensuite soumises à une précipi-

tation par le sulfate d'ammonium (80% sat, pH6). Le précipité, repris dans le tampon maléate 10mM, pH6, est, après dialyse, déposé sur une colonne d'hydroxylapatite (2,5 x 30cm) stabilisé en ce tampon. L'élution de l'enzyme est effectuée par le tampon maléate 10mM, pH6, sulfate d'ammonium 100mM. Les fractions, contenant le maximum d'activité enzymatique, sont rassemblées et amenées à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium pH 7,1. Le précipité est repris dans le tampon imidazol-glycylglycine 5mM, pH 7,1, puis amené en 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Après une centrifugation à basse vitesse, le surnageant est amené lentement à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium. La solution, laissée 48 heures à 4°C, permet d'obtenir, après une centrifugation à basse vitesse, une forme cristalline de l'enzyme.

#### 5 - Intérêt de l'utilisation de l' $\alpha$ -D méthyl glucoside

275g de foie, provenant d'un lot de rats de même sexe, sont homogénéisés dans trois volumes de tampon 0,25S Te<sub>50</sub>K<sub>25</sub>M<sub>3</sub>. L'extrait soluble de la fraction de C<sub>11</sub>L est préparé comme il est décrit dans le paragraphe B1. Il est alors soumis à un relargage par le sulfate d'ammonium (40-83% sat pH7). Le précipité est repris dans le tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$  mercaptoéthanol 1mM. La solution enzymatique, dialysée contre ce tampon, est déposée sur une colonne de séphadex G-50 (3,5 x 22cm) stabilisée en ce tampon. Les fractions éluées, contenant la majeure partie de l'activité glucosidasique, sont rassemblées et amenées à 83 % de saturation en sulfate d'ammonium pH7. Le précipité, repris dans le tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$  mercaptoéthanol 1mM, dialysé, est déposé sur une colonne de séphadex G-100 (257 ml) recouvert de Biogel P10 (100 ml) stabilisée en ce tampon. L'élution de l'enzyme est effectuée par le tampon EDTA 1mM, pH5, KCl 25mM,  $\beta$  mercaptoéthanol 1mM,  $\alpha$  méthyl glucoside de 100mM.

Une fraction de 5 ml d'enzyme purifié est réajus-

tée en EDTA 20mM, pH5, avant d'être rechromatographiée sur une colonne, de séphadex G-100 (2x 30cm) recouvert de 7cm de Biogel P10, stabilisée dans le tampon EDTA 20mM, pH5, KCl 25mM, mercaptoéthanol 1mM. L'élution est effectuée par ce même tampon contenant 0,1M méthyl glucoside.

### C - ISOLEMENT DE L' -D GLUCOSIDASE LYSOSOMALE

Une fraction C<sub>II</sub>L est préparée, comme précédemment ( voir paragraphe B1), à partir de 290 à 618g de foie de rat de même sexe. Elle est ensuite homogénéisée dans le tampon EDTA 20mM, pH6, maléate 10mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, mercaptoéthanol 1mM (tampon A) par 20 allers-retour de piston serré dans un homogénéiseur DOUNCE. La suspension est centrifugée à 40.000 g<sub>max</sub> pendant 20mn. Le surnageant est soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium (63% saturation pH6). Le sédiment repris dans la tampon A est déposé sur une colonne de sépharose 4B couplée à une colonne d'Agarose - - aminocaproyl fucosylamine. L'effluent contenant l'activité glucosidasique ( 0,4ml/g de foie) est soumis à une double précipitation par le sulfate d'ammonium (40-63 % de sat. pH6) à 0-2°C. Le précipité obtenu est solubilisé dans le tampon EDTA 20mM, pH5, KCl 25mM, mercaptoéthanol 1mM, (tampon B), puis dialysé contre ce même tampon 12 h à 0-2°C. Après une centrifugation à basse vitesse qui permet d'éliminer un insoluble, la solution est concentrée sur membrane "Amicon" XM50. Elle est ensuite déposée sur une colonne de séphadex G-100 (357ml) recouvert de 40ml de Biogel P10 stabilisée dans le tampon B. La chromatographie est développée par le tampon B contenant 0,1M méthyl glucoside. Les fractions contenant la majeure partie de l'activité enzymatique sont rassemblées et des fractions de 20ml environ sont rechromatographiées sur cette même colonne après que celle-ci ait été lavée par deux volumes du tampon B contenant 0,1M méthyl glucosidase. L'élution est effectuée ensuite par ce même tampon. Les fractions éluées, renfermant la majeure partie de l'activité enzymatique, sont alors rassemblées et centrifugées dans le rotor 60 Ti pendant 72 h à 60.000t/mn.

D - DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

La mesure de l'activité des différents enzymes mysosomaux a été réalisée grâce à l'utilisation de substrats paranitrophényl- $\alpha$ -pyrannosides.

- Pour l' $\alpha$ -L fucosidase, le paranitrophényl  $\alpha$ -L fucopyrannosidē 2mM dans le tampon acétate 62,5mM pH6, contenant 250  $\mu$ g/ml de sērum albumine bovine.

- Pour l' $\alpha$ -D glucosidase, le paranitrophényl- $\alpha$ -D glucopyrannoside 5mM dans le tampon acétate 62,5mM pH4,5 KCl, 250mM, EDTA 1mM, sērum albumine bovine 250 $\mu$ g/ml.

- Pour la phosphatase acide, le paranitrophényl phosphate 5mM dans le tampon acétate 62,5mM pH5 contenant 250  $\mu$ g/ml de sērum albumine bovine.

0,1 ml de fractions à doser sont additionnées de 0,4 ml de paranitrophényl pyrannoside dans le tampon correspondant à l'enzyme dosé. Lorsqu'il s'agit de fractions purifiées, la réaction est arrêtée par 0,5 ml de tampon alcalin (glycine 133mM, NaCl 67mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 83mM, ajusté à pH10,7 avec de la soude) et la densité optique à 400nm est mesurée contre un témoin non incubé. Dans le cas de fractions brutes, la réaction est arrêtée par addition de 0,1 ml de TCA 10p.cent et une partie de l'acido-soluble est ensuite additionnée de un volume de tampon alcalin.

E - PREPARATION D'ANTICORPS ANTI- $\alpha$ -D GLUCOSIDASE

1 - Obtention des antisérums

Nous avons utilisé la méthode de VAITUKAITIS et al (44). A 600  $\mu$ g d'enzyme purifié, dissous dans 2 ml de NaCl 0,15M, on ajoute 10 mg de Bacillus Batyricum lyophilisé et 2 ml d'adjuvant complet de FREUND. Le mélange est agité vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable.

Des lapins néozélandais de 2,5 à 3 Kg, dont la fourrure a été rasée sur toute la région dorsale, reçoivent

vent chacun 2 ml d'émulsion (soit 300 µg d'enzyme) en 40 à 50 injections par voie intradermique, puis 1 ml de vaccin anti-coquelucheux Perthedral (Institut Pasteur) par voie sous-cutanée dans la cuisse. Après trois semaines, des prélèvements de sang sont effectués chaque semaine et la présence d'anticorps est contrôlée, de façon routinière, par la méthode d'immunodiffusion d'OUCHTERLONY.

## 2 - Purification des IgG

### a) Précipitation par le sulfate d'ammonium

La manipulation est effectuée à 0-2°C. Le sérum est dilué par 1 volume de tampon phosphate 50mM pH7,2 NaCl 150mM (tampon PS). On ajoute une solution 3,8M de  $(NH_4)_2SO_4$  pour obtenir une concentration finale de 1,6 M. Le précipité, obtenu après centrifugation, est dissous dans le tampon PS, le volume final de la solution étant égal à celui du sérum dilué. Une deuxième précipitation est effectuée de la même manière que précédemment. Le précipité est repris dans le tampon PS, le volume final de la solution étant égal à la moitié de celui du sérum initial. La solution est dialysée pendant 24 H contre le tampon PS. L'insoluble est éliminé par centrifugation à basse vitesse et le surnageant est filtré sur Millipore (0,45 µm).

### b) Chromatographie sur DEAE et CM Cellulose

Des colonnes d'un diamètre de 1,5 cm, composées de 10 cm de CM Cellulose, recouvert de 10 cm de DEAE Cellulose, sont utilisées. Elles sont stabilisées dans le tampon PS. Des parties aliquotes de 30 ml sont chromatographiées et la fraction, non retenue, est collectée.

## F - PREPARATION DU SUPPORT D'AFFINITE BIOGEL P300-IgG

Le Biogel P300, préalablement gonflé dans l'eau distillée, est activé par la glutaraldéhyde à 5 p.cent dans le tampon phosphate 50mM pH7 pendant 15 heures à tempé-



nature ambiante. Le gel est ensuite lavé sur verre fritté par 20 volumes de tampon phosphate, puis par 100 volumes d'eau distillée.

La fraction d'IgG (20mg) de l' $\alpha$ -D glucosidase est agitée pendant 18 heures à température ambiante avec 20 ml de gel activé dans un volume final de 34 ml en présence de tampon phosphate 50mM pH7,4 NaCl 0,15M. Le gel est ensuite agité pendant 12 heures dans l'éthanolamine 1M pH7, avant d'être abondamment lavé par de l'eau distillée. Il est enfin stabilisé dans le tampon Tris-HCl 50mM pH8,6 NaCl 150mM  $\text{NaN}_3$  3mM.

#### G - ISOLEMENT DE L' $\alpha$ -D GLUCOSIDASE SUR IMMUNOADSORBANT

12g de foie sont homogénéisés dans deux volumes du milieu 0,25M sucrose Tris-HCl 5mM pH7,6, aprotinine 100 U Ki/ml, par 5 coups de piston lâche. Une fraction, contenant les organites de grandes tailles, est préparée par centrifugation dans le rotor SW<sub>27</sub> à 22.000g<sub>max</sub> pendant 10 mn. Le sédiment est rehomogénéisé dans le tampon Tris-HCl 50mM pH8,6, aprotinine 100 U.Ki/ml par 15 allers-retour de piston serré dans un homogénéiseur DOUNCE. La suspension est centrifugée à 30.000 g<sub>max</sub> pendant 10 mn. Le surnageant est centrifugé de nouveau pendant 2 heures dans le rotor 60 Ti à 203.000g<sub>max</sub>. Le surnageant est alors filtré sur Millipore (GF83-0,45  $\mu$ m) avant d'être réajusté en Tris 50mM pH8,6 NaCl 0,15M, Triton X-100 1%, aprotinine 100 U.Ki/ml,  $\text{NaN}_3$  3mM. La solution est déposée ensuite sur une colonne de Biogel P300-IgG (8 ml de gel) stabilisé dans le même tampon. L'échantillon est recyclé pendant 24 heures à température ambiante. La colonne est alors lavée par 80 volumes du tampon initial, puis par 10 volumes du tampon Tris 50mM pH8,6 NaCl 0,15M. L'élution est alors effectuée par le tampon Glycocolle 0,2M pH2,8 NaCl 0,5M. Les fractions, correspondant au pic d'absorbance en U.V, sont immédiatement rassemblées et elles sont ensuite concentrées sur aquacide II<sub>a</sub>.

puis dialysées contre de l'eau distillée. Les échantillons sont alors additionnés d'un volume de tampon Tris-HCl 62,5mM pH6,8, SDS 4 %, DTT 0,2M, sucrose 20 % et chauffés 2 mn dans un bain-marie bouillant.

## H - ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

### 1 - Electrophorèses en milieu non dénaturant.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées selon la méthode de REISFELD (45). Elles sont réalisées dans des tubes de 5 mm de diamètre et de 7 cm de longueur. Le gel de séparation est constitué d'un gel d'acrylamide à 7,5 % contenant 60mM KOH-acétate pH4,3 et le gel de concentration par de l'acrylamide à 2,5 % contenant le tampon KOH-acétate 60mM pH6,7.

Après 3 heures de migration à 4°C (tampon alanine 35mM pH4,5 2,5mA/gel), les gels sont immergés dans le TCA 50 %, puis colorés par le bleu de coomassie à 0,2 % dans le TCA 50 % (10 mn) et décolorés par l'acide acétique à 7 %.

Pour la mesure de l'activité, les gels sont congelés, puis découpés en tranches de 1 mm qui sont ensuite incubées en présence de paranitrophényl- $\alpha$ -D glucopyranoside 5mM dans le tampon acétate 62,5mM pH4,5 KCl 250mM EDTA 1mM  $\beta$  mercaptoéthanol 1mM pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par un volume de réactif alcalin.

### 2 - Electrophorèses en milieu dénaturant

- Les électrophorèses en gel de polyacrylamide-SDS sont réalisées selon la méthode de LAEMMLI (46). Des gels de 1 mm d'épaisseur (15 cm x 15 cm, 16 dépôts) sont généralement utilisés. Le gel de séparation est constitué d'un gradient linéaire de 10-18 p.cent d'acrylamide et le gel de contraction contient 5 p.cent d'acrylamide.

Pour l'expérience de la figure 14D p.44, une fraction d' $\alpha$ -D glucosidase (20 $\mu$ g de protéines) est additionnée de 1 ml de tampon Tris-HCl 62,5mM pH6,8 2% SDS DTT 50mM avant d'être chauffée 2 heures dans un bain-marie à 37°C.

Elle est ensuite alkylée en présence de 0,1M Iodoacétamide (concentration finale) pendant 1 heure à 37°C. L'échantillon est alors additionné d'un volume de TCA 10 %. Le précipité de protéine, obtenu après centrifugation, est lavé dans l'éthanol/éther (V/V) et séché sous azote avant d'être solubilisé dans le tampon Tris-HCl 62,5 mM pH6,8, SDS 2 % DTT 1M, sucrose 10 % et chauffés 2 mn au bain-marie bouillant

Après 15-20 heures de migration (5-8 mA) les gels sont immergés dans le TCA 50 % (2-3 bains) pendant 1 à 2 heures. Ils sont ensuite colorés, sous agitation constante, par le bleu de coomassie à 0,2 % dans le tampon TCA 50 % (8 mn) décolorés par l'acide acétique à 7 % et séchés sous vide sur papier Whatman I.

- Les électrophorèses en gel de polyacrylamide-Urée-sont réalisées dans des tubes de 5 mm de diamètre sur 7 cm de longueur de l'appareil de "disc-électrophorésis" selon la méthode de REISFELD (45). Le gel de séparation est constitué d'acrylamide à 7,5 % et de 8M urée. Le gel de concentration contient de l'acrylamide à 2,5 % et 8M urée.

Après 3 à 4 heures de migration (3 mA/gel) les gels sont immergés dans le TCA 50 %, puis colorés par le bleu de coomassie à 0,2 % dans le TCA 50 %.

## I - DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de BRADFORD (47). A 0,8 ml d'échantillons à doser sont additionnés 0,2 ml de réactif "Biorad" sous agitation constante. Après 15 mn, la densité optique est mesurée à 595nm contre un témoin.

La quantité de µg. de protéines, contenues dans l'échantillon, est calculée par rapport à une courbe étalon de sérum albumine bovine "Biorad".

## J - PRODUITS UTILISES

Le Tris (Trizma base), la Triéthanolamine et le Dithiothréitol sont des produits SIGMA.

L'Éthanolamine, l'Acrylamide et le SDS proviennent de chez MERCK. Le SDS est repurifié par recristallisation dans l'éthanol.

La Glutaraldéhyde et le bis acrylamide sont des produits de l'Eastman Organic Chemicals et l'Agarose- $\epsilon$ -aminocaproyl fucosylamine de chez MILES.

Les gels de Séphadex G-100 et Biogel P10 sont des produits Pharmacia, la DEAE Cellulose provient de chez WHATMAN et l'hydroxylapatite de chez Biorad.

Les différents substrats utilisés proviennent de chez Koch Light Laboratories.

BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- OLAVARRIA J.M (1960)  
*J. Bio. Chem.* 235, 3058-3060
- 2- OLAVARRIA J.M, TORRES H.N (1962)  
*J. Biol. Chem.* 237, 1746-1751
- 3- LEJEUNE N., THINES-SEMPOUX D., HERS H. (1963)  
*Biochem. J.* 86, 16-23
- 4- BROWN B.I, BROWN D.H. (1965)  
*Biochem. Biophys. Acta.* 110, 124-132
- 5- SHIBKO S., TAPPEL A.L (1965)  
*Biochem. J.* 95, 730-741
- 6- LUKOMSKAYA I.S (1965)  
*Biochimica.* 30, 927-935
- 7- ROSENFELD E.L (1975)  
*Path. Biol.* 23, 71-84
- 8- FUJIMORI K. HIZURI S., NIKUNI Z. (1968)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 811-816
- 9- AURICCHIO F., BRUNI C. (1967)  
*Biochem. J.* 105, 35-38
- 10- AURICCHIO F., BRUNI C., SICA V. (1968)  
*Biochem. J.* 108, 161-169
- 11- BRUNI C., AURICCHIO F., COVELLI I. (1969)  
*J. Biol. Chem* 244, 4735-4742
- 12- JEFFREY P.L., BROWN D.H., BROWN B.I (1970)  
*Biochemistry.* 9, 1403-1415
- 13- DE BARSY T., JACQUEMIN P., DEVOS P., HERS H. (1972)  
*Eur. J. Biochem.* 31, 156-165

14. BELENKI D.M., ROSENFELD E.L (1972)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun* 46, 443-448
- 15 - MINAKOVA A.L., PREOBRAZHENSAYA M.E., ROSENFELD E.L (1975)  
*Biokhimiya*. 40, 127-136
- 16 - BELENKI D.M., TSUKERMAN D.B., ROSENFELD E.L (1975)  
*Biokhimiya*. 40, 927-933
- 17 - MURRAY A.K., BROWN B.I., BROWN D.H (1978)  
*Arch. Biochem. Biophys.* 185, 511-524
- 18 - TORRES N.H., OLAVARRIA J.M. (1964)  
*J. Biol. Chem.* 239, 2427 -2434
- 19 - BRUNTI C.B., SICA V., AURICCHIO F., COVELLI I. (1970)  
*Biochem. Biophys. Acta.* 212, 470-477
- 20 - PALMER T.N. (1971)  
*Biochem. J.* 124, 701-713
- 21 - KELLEMAN M.V., WHELAN W.I. (1966)  
*Arch. Biochem. Biophys.* 117, 423-428
- 22 - ROSENFELD E.L., BELENKI D.M. (1968)  
*Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1305-1312
- 23 - GOLDSTONE A., KONECNY P., KOENIG H. (1971)  
*Febs. Letters.* 13, 68-71
- 24 - KOSTER J.F., SLEE R.G. (1977)  
*Biochem. Biophys. Acta* 482; 89-97
- 25 - CHIBA S., INOMATA S., MATSUI H., SHIMOMURA T. (1977)  
*Agric. Biol. Chem.* 42, 241-245
- 26 - HERS H., VAN HOOFF F. (1973)  
*Lysosomes and storage diseases* Academic Press

- 27- HERS H. (1963)  
*Biochem. J.* 86, 11-16
- 28- BROWN B.I., BROWN D.H., JEFFREY P.L. (1970)  
*Biochemistry.* 9, 1423-1427
- 29- BIENVENU J., CARRIER H., FREYCON F., MATHIEU M. (1978)  
*Clinic. Chimica. Acta.* 84, 277-292
- 30- D'ANCONA G.G., WURM J., CROCE C.M. (1979)  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4526-4529
- 31- VANHOOF F., DE BARSY T.H., JACQUEMIN P., DEVOS P.,  
HERS H. (1972)  
*Biochimie.* 54, 745-751
- 32- BOURNE E., CLARKE K., PRIDHAM J., ROWE J. (1971)  
*Biochem. J.* 121, 663-666
- 33- DISSOUS C., VERWAERDE C., LEMPEREUR C., KREMBEL J. (1978)  
*Eur. J. Biochem.* 83, 5-15
- 34- DISSOUS C., LEMPEREUR C., VERWAERDE C., KREMBEL J. (1978)  
*Eur. J. Biochem.* 83, 17-27
- 35- LOUD A.V. (1968)  
*J. Cell. Biol.* 37, 27-46
- 36- LEIGHTON F., POOLE B., BEAUFAY H., BAUDHUIN P.,  
COFFEY J.W., FOWLER S., DE DUVE C. (1968)  
*J. Cell. Biol.* 37, 482-513
- 37- DE DUVE C., PRESSMAN B.B., GIANETTO R., WATTIAUX R.,  
APPELMANS F. (1955)  
*Biochem. J.* 60, 604-611
- 38- AMAR-COSTESECC A., BEAUFAY H., WIBO M., THINES-SEMPOUX D.,  
FEYTMANS E., ROBBI M., BERTHET J. (1974)  
*J. Cell. Biol.* 61, 201-212



- 39 - BEAUFAY H. (1972)  
Lysosomes (DINGLE J.T., Ed.) North-Holland, Amsterdam P.8
- 40 - WATTIAUX R., WATTIAUX-DECONNINCK S., RONVEAUX-DUPAL M.F.,  
DUBOIS F. (1978)  
J. Cell. Biol. 78, 349-368
- 41 - OPHEIM D.J., TOUSTER D. (1977)  
J. Biol. Chem. 252, 739-743
- 42 - HOLLANDER V.P., IGARASHI M. (1968)  
J. Biol. Chem. 243, 6084-6089
- 43 - BARRETT A.J. (1972)  
Lysosomes (DINGLE J.T., Ed.) North-Holland, Amsterdam  
p 46-109
- 44 - VAITUKATIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T (1971)  
J. Clin. Endocr. 33, 888-891
- 45 - REISFELD R.A., LEWIS U.J., WILLIAMS D.E (1962)  
Nature. 195, 281
- 46 - LAEMMLI U.K. (1970)  
Nature. 227, 680-685
- 47 - BRADFORD M.M (1976)  
Anal. Biochem, 72, 248

