50376 1982 213

Nº d'ordre: 959

50376 1982 213

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Jean-Luc BAERT

ETUDE DE LA COMPOSITION EN SOUS-UNITES DE $L' \propto$ -L FUCOSIDASE DU FOIE DE RAT



Membres du Jury : MM.

J. MONTREUIL J. KREMBEL G. BISERTE

M. PORCHET A. CHERON

Rapporteur

Président

Examinateurs

Présenté le

30 mars 1982

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

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, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

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 - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. M. M. M. Mme	DURCHON Maurice GABILLARD Robert HEUBEL Joseph MONTREUIL Jean PARREAU Michel SCHWARTZ Marie-Hélène	Biologie Expérimentale Electronique Chimie Minérale Biochimie Analyse Géométrie
["]. N.4	NONTDENTI 1	
М.	MUNIREUIL Jean	Biochimie
М.	PARREAU Michel	Analyse
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
Μ.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
Μ.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
М.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - lère Classe

Μ.	BACCHUS Pierre	Astronomie
Μ.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
Μ.	BECART Maurice	Physique Atomiq
М.	BIAYS Pierre	Géographie
Μ.	BILLARD Jean	Physique du Sol
Μ.	BONNOT Ernest	Biologie Végéta

ique Atomique et Moléculaire raphie ique du Solide ogie Végétale

..../...

.../...

BOUGHON Pierre Μ. BOURIQUET Robert Μ. CELET Paul Μ. Μ. COEURE Gérard CONSTANT Eugène Μ. CORDONNIER Vincent Μ. DEBOURSE Jean-Pierre DELATTRE Charles Μ. Μ. Μ. ESCAIG Bertrand FAURE Robert Μ. Μ. FOCT Jacques FOURET René Μ. GRANELLE Jean-Jacques Μ. Μ. GRUSON Laurent GUILLAUME Jean Μ. Μ. HECTOR Joseph LABLACHE-COMBIER Alain Μ. M. LACOSTE Louis M. LANSRAUX Guy M. LAVEINE Jean-Pierre Μ. LEHMANN Daniel Mme LENOBLE Jacqueline M. LHOMME Jean M. LOMBARD Jacques LOUCHEUX Claude Μ. LUCQUIN Michel Μ. MAILLET Pierre Μ. PAQUET Jacques Μ. POUZET Pierre Μ. Μ. PROUVOST Jean Μ. SALMER Georges М. SEGUIER Guy STANKIEWICZ François Μ. М. TILLIEU Jacques Μ. VIDAL Pierre M. ZEYTOUNIAN Radyadour

Algèbre Biologie Végétale Géologie Générale Analyse Electronique Informatique Gestion des Entreprises Géologie Générale Physique du Solide Mécanique Génie Mécanique Physique du Solide Sciences Economiques Algèbre Microbiologie Géométrie Chimie Organique Biologie Végétale Physique Atomique et Moléculaire Paléontologie Géométrie Physique Atomique et Moléculaire Chimie Organique Biologique Sociologie Chimie Physique Chimie Physique Sciences Economiques Géologie Générale Analyse Numérique Minéralogie Electronique Electrotechnique Sciences Economiques Physique Théorique Automatique Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

Algèbre

Μ. AL FAKIR Sabah Μ. ANTOINE Philippe Μ. BART André Mme BATTIAU Yvonne Μ. BEGUIN Paul BELLET Jean М. Μ. BKOUCHE Rudolphe BOBE Bernard Μ. Μ. BODARD Marcel Μ. BOILLY Bénoni BOIVIN Jean-Claude Μ. BONNELLE Jean-Pierre Μ. BOSCQ Denis Μ. BREZINSKI Claude Μ. Μ. BRIDOUX Michel Μ. BRUYELLE Pierre Μ. CAPURON Alfred Μ. CARREZ Christian Μ. CHAMLEY Hervé Μ. CHAPOTON Alain

Analyse Biologie Animale Géographie Mécanique Physique Atomique et Moléculaire Algèbre Sciences Economiques Biologie Végétale Biologie Animale Chimie Minérale Catalyse Probabilités Analyse Numérique Chimie Physique Géographie Biologie Animale Informatique Géotechnique Electronique

COQUERY Jean-Marie Μ. Mme CORSIN Paule M. CORTOIS Jean M. COUTURIER Daniel CRAMPON Norbert Μ. **CROSNIER** Yves Μ. Mle DACHARRY Monique DEBRABANT Pierre М. DEGAUQUE Pierre Μ. DELORME Pierre Μ. DEMUNTER Paul Μ. DE PARIS Jean-Claude Μ. DEPREZ Gilbert Μ. М. DERIEUX Jean-Claude Mle DESSAUX Odile DEVRAINNE Pierre Μ. DHAINAUT André Μ. Mme DHAINAUT Nicole DORMARD Serge Μ. DOUKHAN Jean-Claude Μ. DUBOIS Henri Μ. DUBRULLE Alain Μ. DUEE Gérard Μ. Μ. DYMENT Arthur Mme EVRARD Micheline FLAMME Jean-Marie Μ. Μ. FONTAINE Hubert Μ. FONTAINE Jacques FOURNET Bernard Μ. GERVAIS Michel Μ. GLORIEUX Pierre Μ. Μ. GOBLOT Rémi Μ. GOSSELIN Gabriel GOUDMAND Pierre Μ. **GREVET Patrick** Μ. GUILBAULT Pierre Μ. HENRY Jean-Pierre Μ. HERMAN Maurice Μ. Μ. HOUDART René JACOB Gérard Μ. JACOB Pierre Μ. JACQUILLAT Bertrand Μ. JOURNEL Gérard Μ. Μ. **KREMBEL** Jean Μ. LAURENT François Mme LECLERCQ Ginette Mle LEGRAND Denise Mle LEGRAND Solange Mme LEHMANN Josiane M. LEMAIRE Jean LENTACKER Firmin Μ. M. LEROY Jean-Marie M. LEROY Yves LEVASSEUR Michel Μ. Μ. LHENAFF René M. LOCQUENEUX Robert LOSFELD Joseph Μ. LOUAGE Francis Μ. MACKE Bruno Μ.

Psychophysiologie Paléontologie Physique Nucléaire et Corpusculaire Chimie Organique Hydrogéologie et Environnement Electronique Géographie Géologie Appliquée Electronique Physiologie Animale Sociologie Analyse Physique du Solide et Cristallographie Microbiologie Spectroscopie de la Réactivité Chimique Chimie Minérale Biologie Animale Biologie Animale Sciences Economiques Physique du Solide Spectroscopie Hertzienne Spectroscopie Hertzienne Géologie Mécanique Chimie Appliquée Technologie de Construction Dynamique des Cristaux Electronique, Electrotechnique, Automatique Biochimie Structurale Gestion Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques Algèbre Sociologie Chimie Physique Sciences Economiques Physiologie Animale Génie Mécanique Physique Spatiale Physique Atomique et Moléculaire Informatique Probabilités et Statistiques Gestion Spectroscopie Hertzienne Biochimie Automatique Catalyse Algèbre Algèbre Analyse Spectroscopie Hertzienne Géographie Méthodologie Electronique, Electrotechnique, Automatique Sciences Economiques Géographie Physique Théorique Informatique Electronique Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

.../...

- 3 -

MAHIEU Jean-Marie Μ. MAIZIERES Christian Μ. Mle MARQUET Simone M. MESSELYN Jean М. MIGEON Michel MIGNOT Fulbert Μ. M. MONTEL Marc M. MONTUELLE Bernard Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. NICOLE Jacques M. NOTELET Francis PARSY Fernand Μ. Mle PAUPARDIN Colette PECQUE Marcel PERROT Pierre Μ. Μ. Μ. PERTUZON Emile PETIT Francis PONSOLLE Louis PORCHET Maurice M Μ. Μ. М. POVY Lucien Μ. RACZY Ladislas RAOULT Jean-François Μ. RICHARD Alain Μ. M. RIETSCH François M. ROGALSKI Marc M. ROUSSEAU Jean-Paul М. ROY Jean-Claude SALAMA Pierre Μ. Mme SCHWARZBACH Yvette SCHAMPS Joël Μ. Μ. SIMON Michel SLIWA Henri Μ. SOMME Jean Μ. Mle SPIK Geneviève STERBOUL François TAILLIEZ Roger М. Μ. THERY Pierre Μ. TOULOTTE Jean-Marc VANDORPE Bernard Μ. М. М. VERBERT André VILETTE Michel Μ. WALLART Francis Μ. WATERLOT Michel Μ. WERNER Georges Μ. Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Physique Atomique et Moléculaire Automatique Probabilités Physique Atomique et Moléculaire Chimie Physique Analyse Numérique Physique du Solide Biologie et Biochimie Appliquées Géographie Chimie Analytique Electronique, Electrotechnique, Automatique Mécanique Biologie Physiologie Végétales Chimie Organique Chimie Appliquée Physiologie Animale Chimie Organique, Minérale et Analytique Chimie Physique Biologie Animale Automatique Electronique Géologie Structurale Biologie Animale Physique des Polymères Analyse Physiologie Animale Psychophysiologie Sciences Economiques Géométrie Spectroscopie Moléculaire Sociologie Chimie Örganique Géographie Biochimie Informatique Génie Alimentaire Electronique, Electrotechnique, Automatique Automatique Chimie Minérale Biochimie Résistance des Matériaux Spectrochimie Infrarouge et Raman Géologie Générale Informatique Fondamentale Appliquée Algèbre

4 -

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de l'Université de Lille I (Professeur J. MONTREUIL) sous la direction du Professeur J. KREMBEL. Les résultats présentés dans ce mémoire feront partie de la publication suivante :

Hétérogénéité de l' α -L fucosidase lysosomale du foie de rat Manuscrit en préparation.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS

P•1 ·

p. 24

INTRODUCTION

Purification	р.	3
Propriétés	р.	4
Masse moléculaire et structure sous-unitaire p	р.	4
Différentes formes enzymatiques p	р.	6
Fucosidose	р.	10
Conclusion p	ρ.	11.

I PURIFICATION ET CONTROLE DE LA PURETE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE

A - <u>Purification de l'α-L fucosidase</u>	p.	12
B - Contrôle de la pureté de la préparation enzymatique	р.	12
1 - ¹ Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non denaturant	р.	12
2 - <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en</u> milieu dénaturant	p.	15
3 - Electrofocalisation_en_milieu_non_dénaturant	р.	15
C - Conclusion	p.	15
ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE L'~-L FUCOSIDASE EN MILIEU DENATUR	ANT	
A - <u>Analyse par électrophorèse monodimensionnelle en gel de</u> polyacrylamide	1. T	10
	p.	19
1 - en présence d'urée	p.	19
2 - en_présence_de_SDS	p.	19

3 - Conclusion

Π

B - <u>Hétérogenéité des sous-unités de l'enzyme</u>	Ρ.	24
1 - Seconde analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS	p.	24
2 - Analyse par électrophorèse bidimensionnelle	p.	25
C - Conclusion	р.	29

III REPARTITION DES SOUS-UNITES DANS LES FORMES ISOENZYMATIQUES DE L'a-L FUCOSIDASE

A - Séparation des formes isoenzymatiques de l'enzyme	p.	32
1 - Procédés_chromatographiques	р.	32
2 - Procédés électrophorétiques	р.	32
 B - <u>Structure sous-unitaire des différentes formes</u> <u>isoenzymatiques</u> 1 - <u>Analyse par électrophorèse en gel de</u> 	p.	35
polyacrylamideSDS	p.	35
2 - Analyse par électrophorèse bidimensionnelle	р.	35
C - Conclusion	п.	38

IV ANALYSE STRUCTURALE DES SOUS-UNITES DE L'∝-L FUCOSIDASE

А	-	Cartes peptidiques "monodimensionnelles"	р.	41
В	-	Cartes peptidiques "bidimensionnelles"	р.	43
С	-	Conclusion	p.	45
		DISCUSSION	р.	48
		CONCLUSION	р.	51
		MATERIEL ET METHODES		
А	-	Purification de l'a-L fucosidase	р.	52
В	-	Détermination de l'activité enzymatique	p.	52
С	-	Dosage des proteines	p.	53
D	-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	р.	53
		1 - Electrophorèse en milieu non dénaturant	p.	53
		2 - Electrophorèses en milieu dénaturant	р.	53
E	-	Réduction et alkylation de l'α-L fucosidase	р.	54
F	-	Electrofocalisation	p.	55
		1 - Electrofocalisation en milieu non dénaturant	р.	55
		2 - Electrofocalisation en milieu dénaturant	p.	55
G	-	Chromatofocalisation	р.	56

H <u>Cartes</u> peptidiques

1	-	Cartes peptidiques "monodimensionnelles"	р.	56
2	-	Cartes_peptidiques "bidimensionnelles"	р.	57

I Produits utilisés

p. 58

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

DTT : Dithiothreitol

Tris : 2 - amino - 2 - hydroxymethyl - propanediol - 1,3

Te : Triéthanolamine

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

g : Accélération au rayon maximum

Abréviations utilisées pour désigner la composition des solutions utilisées pour purifier l' α -L fucosidase

E : Ethylène diamine tétra-acétique

 $0,25S Te_{50} K_{25} M_3$ désigne une solution de saccharose 0,25 M dans le tampon Triéthanolamine-HCL 50 mM, pH 7,6, KCL 25 mM, Mg SO₄ 3mM.

AVANT PROPOS

Une méthodologie, mise au point dans notre laboratoire par DISSOUS et al. (1 - 2), permet de purifier les différentes classes de polyribosomes du foie de rat. L'étude du rôle de ces "catégories" de polyribosomes dans la biosynthèse d'une enzyme lysosomale, l' α -L fucosidase, a été entreprise. Ce travail nécessitant des informations d'ordre structural sur la protéine, nous avons étudié la composition en sous-unités de l' α -L fucosidase lysosomale du foie de rat.

INTRODUCTION

L'α-L fucosidase (fucoside fucohydrolase, EC 3.2.1.51) est largement distribuée dans la nature. Localisée dans les lysosomes, aucune autre forme de cette enzyme n'a été mise en évidence à ce jour en fonction de la localisation subcellulaire (3-4).

2 -

L'α-L fucosidase est une exoenzyme qui libère des unités de L-fucose à partir de l'extrémité non réductrice de glycoproteines, d'oligosaccharides, et de glycolipides d'où le rôle important de cette enzyme dans le catabolisme de ces composés à fucose. Son importance est particulièrement mise en évidence par le déficit de l'activité enzymatique dans la fucosidose (caractérisée par l'accumulation neuroviscerale des composés à fucose (5).

De nombreux travaux sur l' α -L fucosidase ont été entrepris à la suite de la mise au point d'un procédé simple pour la purification de cette enzyme.

PURIFICATION

L' α -L fucosidase a été partiellement purifiée à partir de nombreux tissus d'origines différentes en particulier de l'épididyme de rat (6), du rein de porc (7), du cortex cérébral de rat (8), ainsi que du rein, placenta et foie humain (9).

3 -

Ces purifications furent réalisées par l'utilisation de méthodes conventionnelles faisant intervenir principalement le relargage par le sulfate d'ammonium, la chromatographie d'échange d'ions et la filtration sur gel. Ces méthodes n'ont permis d'obtenir que de faibles rendements (12-13 %) en enzyme.

En 1974, ALHADEFF et al introduisirent la chromatographie d'affinité comme technique de purification de l' α -L fucosidase du placenta humain (10). Ces auteurs tirèrent parti de l'affinité de l'enzyme pour le fucose (support agarose - ε -aminocaproyl fucosylamine). En une seule étape, l'enzyme est purifiée 670 fois avec un rendement de 57 %. Dans le même temps, ROBINSON et THORPE utilisèrent le même support pour la purification de l' α -L fucosidase du foie humain (11). Cependant dans les deux cas, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant de l'enzyme purifiée montre la trace de constituants mineurs, non enzymatiques.

En 1975, ALHADEFF et al isolèrent l' α -L fucosidase du foie humain par double passage sur le support d'affinité (12). L'enzyme purifiée 6300 fois avec un rendement de 66 % est ainsi obtenue en absence de contaminants protéiques. L'utilisation de cette méthode a permis de purifier l' α -L fucosidase du sérum et du rein humain (13-14).

D'autres auteurs ont utilisé la centrifugation différentielle pour obtenir une fraction subcellulaire riche en α -L fucosidase. Ainsi OPHEIM et TOUSTER, à partir d'une fraction enrichie en lysosomes, isolèrent l' α -L fucosidase du foie de rat après relargage par le sulfate d'ammonium suivi d'un seul passage sur le support d'affinité. Cette technique permet d'obtenir l' α -L fucosidase purifiée 27000 fois avec un rendement de 20 % et possède l'avantage d'être rapide (15).

PROPRIETES

L'activité *a*-L fucosidasique est généralement mesurée avec des substrats synthétiques tels que le paranitrophenyl *a*-L fucoside et le 4 methylumbelliferyl *a*-L fucoside. Le pH optimum d'action de cette enzyme est compris entre 4,5 et 6 pour le dérivé paranitrophenylé (7-16) et entre 5,5 et 6 pour le 4 methylumbelliferyl *a*-L fucoside (16-17). - 4 -

Les dérivés paranitrophenylés du β -L fucoside, β -D fucoside et α -L rhamnoside ne sont pas hydrolysés par l' α -L fucosidase (9-10). De la même manière, aucune activité n'est décelable sur les glycoprotéines contenant du fucose, cependant l'enzyme est active sur les glycopeptides dérivés de ces protéines (6-15). L' α -L fucosidase est également active sur de nombreux oligosaccharides contenant du fucose et hydrolyse le fucose lié en (α ,1+3), (α ,1+4)et (α ,1+6) à la N-acetylglucosamine (4-14).

Des études cinétiques ont mis en évidence l'action de nombreux éffecteurs sur l'activité α -L fucosidasique. Le L-fucose et les sels de métaux lourds (Ag+,Hg++) sont les principaux inhibiteurs de l'activité enzymatique (12-15).

MASSE MOLECULAIRE ET STRUCTURE SOUS UNITAIRE DE L'a-L FUCOSIDASE

Les valeurs de masse moléculaire attribuées aux α -L fucosidases animales isolées à partir de différentes sources sont assez divergentes. Cependant les résultats obtenus apparaissent essentiellement liés aux méthodes de détermination utilisées (voir tableau I). La filtration sur gel donne les valeurs de masse moléculaire les plus contradictoires (160.000 à 300.000). Dans ce cas, la variation de la teneur en acide sialique de l'enzyme peut être invoquée. Il est en effet reconnu que les glycoprotéines, et en particulier les sialoglycoprotéines, groupe dans lequel se trouve l' α -L fucosidase (15-18), ont un comportement particulier lors de la filtration sur gel (19-20). Par contre l'utilisation de méthodes basées sur la centrifugation permet d'obtenir des valeurs de masse moléculaire assez similaires (160.000 à 230.000).

				Origine	de l'α-L	-Fucosidas	n		
		Foie h	umain	Sérum humain	Placenta humain	Rate humaine	Foie de rat	Epidyme de rat	Thyroĭde de porc
		(12)	(21)	(22)	(23)	(4)	(15)	(9)	(24)
	Filtration sur gel	175 000	200 000	296 000	300 000	160 000	300 000		255 000
aupinio	Ultracentrifugation analytique	230 000	1	I	1	1	217 000	215 000	1
вT	Centrifugation en gradient de sacch a rose	I	I	I	180 000	I	160 000	Ι	192 000

Tableau I : Masses moléculaires de l'α-L fucosidase d'origines diverses.

RUS

.

- 5

Bien qu'une masse moléculaire moyenne de 200.000-220.000 peut être attribuée à l' α -L fucosidase, la structure sous-unitaire de cette enzyme reste encore très incertaine. En effet, les données concernant la composition en sous-unités de l' α -L fucosidase isolée de sources diverses demeurent contradictoires et parfois l'enzyme isolée d'un matériel biologique déterminé est trouvée composée d'un seul type de sous-unités , ou de deux sous-unités non identiques (voir tableau II).

6 -

Si l'ensemble des résultats obtenus à ce jour permettent de définir l' α -L fucosidase comme résultant de l'association de quatre monomères, la composition exacte en sous-unités de cette enzyme reste à déterminer.

DIFFERENTES FORMES ENZYMATIQUES

Dans un premier temps, deux formes d' α -L fucosidase, désignées I et II, ont été caractérisées à partir de différents tissus par filtration sur gel (9-29) et chromatographie d'échange d'ions (29). Une forme macromoléculaire (fucosidase I) est exclue sur gel de sephadex G 200 alors que la fucosidase II est éluée avec une masse moléculaire proche de 50.000. Ces deux formes ont un pH optimum d'action identique mais possèdent une courbe d'activité en fonction du pH différente. De même certaines différences de thermostabilité et de spécificité de substrat ont été mises en évidence (9-17-29).

Cependant des divergences de résultats ont été obtenues lors de la chromatographie de l' α -L fucosidase sur gels de sephadex. Ainsi 3 et 4 formes ont été séparées, respectivement sur sephadex G 200 et G 150 à partir du cerveau de singe (25) et du foie humain (30) alors qu'une seule forme macromoléculaire a été obtenue pour l' α -L fucosidase isolée du foie humain (12) et de rat (15).

Les travaux de THORPE et ROBINSON (21) et de TURNER (23) ont mis en évidence l'influence du pH et de la concentration en électrolytes du tampon d'élution utilisé lors de la filtration sur gel sur l'agrégation de l' α -L fucosidase (voir Tableau III).

	Cerveau de singe	(25)	-	73 500
	idyme rat	(27)	۲	54 000
	Epid de	(6)	2	53 700 49 700
	Foie de rat	(15)	~	55 000
	Rein humain	(4)	· .	20 000
enzyme	Placenta humain	(23)	, m	55 000 51 400 25 000
de 1'	Serum humain	(22)	7	56 400 54 500
Origine		(27)	7	57 000 (majeure) 51 000 (mineure)
	ntmain	(26)	2	59 000 54 000
	Fole	(21)	۲.	54 000
		(22)	2	53 000 49 000
		(12)	6	50 100
			Nombre de sous-unités différentes [•]	Masse moléculaire

Tableau II : Détermination par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de la composition en sous-unités de l' α -L-fucosidase d'origines diverses

($^{\bullet}$ L' α^{-} L fucosidase résulte de l'association de 4 monomères).

- 7 -

BUS

masse moléculaire	1 forme majeure (200.000) 1 forme mineure (50.000)	1 forme de masse moléculaire intermédiaire (100.00-150.000)	1 forme (305 000)	1 forme majeure (305 000) 1 forme mineure (145 000)	2 formes (63 000 et 150 000)	1 forme (63000)	
Conditions d'élution	Tampon acétate (0,005 M, pH5)	Tampon acétate (0,005 M, pH5) + NaCL(0,1M)	Tampon phosphate 0,2 M pH5	Tampon phosphate 0,2 M pH6	Tampon phosphate 0,2 M pH7	Tampon phosphate 0,2 M pH7,5	
Référence		(21)		(EC)			
Support		6 200	:	UC U		· ·	
. Origine de l'enzyme	Foie	humain		Placenta	humain		

Tableau III : Variation de la masse moléculaire de l'a-L fucosidase en fonction des conditions chromatographiques.

ers Rygg Latar

8 ---

-

Ainsi il semblerait que l'ensemble des résultats obtenus doit être attribué; au fait que l'α-L fucosidase résulte de l'association de quatre monomères dont l'état d'agrégation dépend des conditions physico-chimiques du milieu, conditions conduisant à leur dissociation partielle ou totale en dimères et monomères également actifs. Par ailleurs, DI MATTEO <u>et al</u> (16) ont obtenu par électrofocalisation un profil identique entre les deux formes I et II de l'α-L fucosidase,montrant ainsi une interconversion possible entre ces deux formes.

L'application de la technique d'électrofocalisation, ainsi que de l'électrophorèse en gel d'amidon, a montré l'existence de multiples formes enzymatiques de l' α -L fucosidase humaine. Six à neuf formes ont ainsi pu être séparées dont quatre majeures de pI 6,4,6,2,5,9 et 5,6 représentant 75 % de l'activité totale (31-32-33). La même hétérogenéité a été observée pour l' α -L fucosidase du foie de rat (15) contrairement à l'enzyme de l'épididyme de rat où une seule forme a été mise en évidence (6). Le profil obtenu à partir de l' α -L fucosidase sérique diffère de façon significative, résultat probable d'une plus grande proportion d'acide N-acetylneuraminique par molécule (16,32). En effet, l'action de la neuraminidase sur des préparations partiellement purifiées d' α -L fucosidases humaines provoque une altération de la mobilité électrophorétique de certaines formes enzymatiques. Ainsi les formes les plus acides semblent dériver des formes basiques parsialylation de celles-ci, pour l' α -L fucosidase du foie (31-35), du placenta (16) et du sérum humain (22-34).

Les différentes formes enzymatiques de l' α -L fucosidase du foie humain ont été partiellement caractérisées. Ainsi celles-ci possèdent des propriétés différentes : valeurs du Km pour les substrats synthétiques, activité en fonction du pH et thermostabilité : la forme la moins acide étant la moins thermostable (13-16-35). Cependant la nature des multiples formes de l' α -L fucosidase reste inexpliquée. En effet, si certaines variations dans la présence d'acides sialiques ont été évoquées, ce phénomène ne peut à lui seul définir les relations entre les différentes formes enzymatiques de l'enzyme.

- 9

MALADIE LYSOSOMALE : LA FUCOSIDOSE

L'absence d'une activité hydrolasique lysosomale donnée constitue un type de déficience métabolique connue sous le nom de "maladie lysosomale". La fucosidose est caractérisée par un déficit de l'activité α -L fucosidasique et une accumulation de fucoglycolipides, glycopeptides et oligosaccharides dans les tissus et les urines (3).

Au moins cinq possibilités pourraient permettre d'expliquer le déficit de l'activité de cette enzyme :

- a) le manque d'un effecteur indispensable à l'activité enzymatique,
- b) l'absence de la biosynthèse de l'enzyme,
- c) une dégradation rapide de la proteine synthetisée,
- d) la disparition d'une ou de plusieurs formes enzymatiques, .
- e) la biosynthèse d'une enzyme altérée.

De nombreux travaux ont montré que l'absence d'activité α -L fucosidasique n'était pas due au manque d'activateurs ou à la présence d'inhibiteurs de l'enzyme (34-36). Par contre l' α -L fucosidase de l'hépatocyte d'un patient atteint de fucosidose a été partiellement purifiée par. chromatographie d'affinité et caractérisée (ALHADEFF et ANDREWS-SMITH, 36). Cette enzyme est inactive dans la zone de pH 3 à 4, moins thermostable que l' α -L fucosidase normale et possède une valeur de Km pour les substrats synthétiques, supérieure à la normale. De plus une seule forme enzymatique majeure est mise en évidence en électrofocalisation. Des résultats similaires ont été observés pour l' α -L fucosidase sérique de 2 patients atteints de fucosidose (DI MATTEO et al, 34).

Les propriétés de l'enzyme purifiée de l'hépatocyte du patient atteint de fucosidose, sont très proches de celles de la forme enzymatique la plus neutre obtenue par électrofocalisation de l'enzyme hépatique normale d'où l'hypothèse de la subsistance d'une seule forme enzymatique de l' α -L fucosidase dans la fucosidose (36).

CONCLUSION.

L'a-L fucosidase joue un rôle important dans le métabolisme des composés à L-fucose. Cette enzyme est caractérisée par l'existence de multiples formes enzymatiques dont la nature exacte est encore inconnue. La détermination du (des) site (s) intracellulaire(s) de synthèse de l'a-L fucosidase devrait permettre de préciser le rôle des différentes classes de polyribosomes dans la biosynthèse d'enzymes lysosomiaux, et par là même permettre une approche quant aux relations existant entre les différentes formes enzymatiques de cette protéine. 11

Une étude préliminaire de la biosynthèse de l' α -L fucosidase a montré que la majeure partie de celle-ci est effectuée par les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique, mais que les polyribosomes libres participeraient également à cette synthèse (C.DISSOUS, 37). Cependant, la mise en évidence dans les produits de traduction <u>in vitro</u> des mRNA de trois chaines peptidiques ne permet pas de conclure de façon certaine à la présence de trois sous-unités différentes dans la molécule d' α -L fucosidase. En effet, le manque d'information concernant la composition exacte en sous-unités de l' α -L fucosidase limite l'interprétation de ces résultats, la comparaison précurseurs-produits ne pouvant être tirée. De même, la confirmation de cette étude, nécessitant la mise en oeuvre de techniques immunologiques, pourrait être réalisée par l'utilisation d'antisérums spécifiques de chaque sous-unité.

Notre travail a donc consisté à déterminer le nombre de sous-unités différentes de l'α-L fucosidase lysosomale du foie de rat.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

PURIFICATION

et

CONTROLE DE LA PURETE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE

A - PURIFICATION DE L'a-L FUCOSIDASE

Nous avons purifié l'enzyme en utilisant la méthode décrite par OPHEIM et TOUSTER (15) qui fait intervenir l'affinité de l'α-L fucosidase pour l'agarose-ε- aminocaproyl fucosylamine. Cette technique possède l'avantage d'être à la fois efficace et rapide, minimisant ainsi les effets possibles des autres hydrolases lysosomales sur l'enzyme.

Les données obtenues lors des différentes étapes de la purification sont rassemblées dans la tableau IV. Celles-ci sont tout à fait similaires à celles publiées par OPHEIM et TOUSTER bien que nous ayons pris en compte dans ce tableau la concentration de l' α -L fucosidase par centrifugation, étape qui n'avait pas été effectuée par ces auteurs.

La détermination de l'activité enzymatique de l'homogénat étant généralement peu précise, nous avons calculé le facteur de purification par rapport à la fraction riche en lysosomes (voir matériel et méthodes, paragraphe "Purification de l' α -L fucosidase"). Cependant, on peut estimer que celle-ci contient environ 60 % de l'activité totale de l'homogénat, ce qui conduit à un rendement proche de 16 % et un facteur de purification global de l'ordre de 39000. Ce dernier chiffre est très révélateur quant à l'efficacité de la méthode employée ; il est tout à fait compatible avec l'ensemble des analyses de OPHEIM et TOUSTER ayant montré que la préparation d' α -L fucosidase obtenue était exempte de toute autre activité glycosidasique.

B - CONTROLE DE LA PURETE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE.

1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant.

La pureté de l'α-L fucosidase a été contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant dans des conditions particulièrement adaptées. Inactive au delà de pH 8, l'α-L fucosidase est en outre caractérisée par une très faible mobilité électrophorétique à pH5 (migration vers la cathode) et à pH7 (migration vers l'anode) dans des gels de polyacrylamide de 7 ou 5 %. Les meilleurs résultats ont été obtenus à pH 7,4 (gel à 5 %, voir figure 1). Dans ces conditions, une seule bande protéique est observée qui possède l'activité enzymatique.

- 12

TABLEAU IV

Purification de l'a-L fucosidase lysosomale du foie de Rat.

585 g de foie (112 g de protéines) sont homogénéisés dans le milieu 0,25S $T_{50}K_{25}M_3$ et une fraction purifiée de fucosidase est préparée comme il est décrit dans Matériel et Méthodes à partir d'une fraction riche en lysosomes. L'éluat de la colonne d'affinité est ajusté à une concentration en EDTA de 20 mM (pH 6) puis centrifugée dans le rotor 60 Ti pendant 12 h à 60 000 t/mn à 2°C. Le sédiment est resuspendu dans le tampon EDTA 2 mM, pH 6, MgSO₄ o,1 mM, β -mercaptoethanol 0,1mM. L'unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1µmole de paranitrophenyl- α -L fucopyrannoside par mn à 37° C.

Fraction	Volume en ml	Protéines en mg	Activité spécifique U/mg de protéines	Facteur de purification	Rendement en %
Fraction riche en lysosomes	820	15 192	0,0026	1	100
Extrait soluble	377	640	0,0524	20,19	85,00
Précipité (NH ₄) ₂ SO ₄	39	299	0,110	42,3	83,2
Fucoŝidase	0,1	0,440	23-24	8 846	26,0

ω



Figure 1 : Electrophorèse en milieu non dénaturant de l'α-L Fucosidase du foie de rat.

> Deux parties aliquotes (10 μ g de protéine) de la solution d'enzyme sont analysées en gel de polyacrylamide à 5 pour cent (voir matériel et méthodes). Après 36 heures de migration (5mA), une bande de gel est colorée par le bleu de coomassie tandis que l'autre est découpée en tranches de 1mm qui sont incubées dans la solution de substrat pour détecter l'activité α -L fucosidasique.

14

2) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant.

15

De nombrewx contrôles de la préparation enzymatique ont été effectués par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Comme le montre la figure 2, l'analyse électrophorétique de 20 µg d'enzyme ne permet pas de mettre en évidence la présence de contaminants protéiques. Cette absence de contamination a été observée même lorsque des quantités assez importantes d'enzyme (50 µg) ont été analysées.

3) Electrofocalisation en milieu non dénaturant.

Quand l'a-L fucosidase purifiée est soumise à l'électrofocalisation non dénaturante en veine liquide, quatre formes isoenzymatiques majeures sont séparées comme le montre la figure 3. Plusieurs formes mineures, plus acides, sont également observées, représentant globalement 30 % de l'activité enzymatique retrouvée.

L'hétérogénéité de la préparation enzymatique est similaire à celle observée par OPHEIM et TOUSTER, ces auteurs ayant montré que la méthode de purification ne privilégiait pas l'isolement de certaines formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase du foie de rat (15). Par ailleurs, les travaux réalisés à ce jour sur les α -L fucosidases d'origines diverses, ont toujours mis en évidence l'existence de multiples formes isoenzymatiques caractérisées par des points isoélectriques différents (16-31-32).

C - CONCLUSION.

La méthode décrite par OPHEIM et TOUSTER nous a permis de purifier l' α -L fucosidase lysosomale du foie de rat. La préparation de l'enzyme purifiée est exempte de contaminants protéiques et apparaît homogène comme le montrent les résultats des différentes analyses électrophorétiques. Cependant, une grande hétérogénéité est observée lors de l'analyse par électrofocalisation de la préparation enzymatique. Si cette hétérogénéité semble similaire à celle observée pour les α -L fucosidases d'origines diverses, il est cependant possible qu'elle ne reflète pas celle de l'enzyme *in vivo*.

La présence de nombreuses formes isoenzymatiques semble peu compatible avec la présence de traces d'hydrolases dans l'enzyme purifiée. En effet, outre l'absence de contaminants protéiques, la préparation enzymatique



Α

В

 $\frac{\text{Figure 2}}{\text{SDS de 1'}\alpha\text{-L fucosidase du foie de rat.}}$

L'analyse est réalisée dans un gel d'acrylamide à 12,5 % (15 cm de longueur et 1 mm d'épaisseur).

A - Protéines "marqueurs"

B - α -L fucosidase (20 µg de protéine). Le gel est coloré par le bleu de coomassie.



30

 $PM \times 10^{-3}$

- 16 -





100 μ g de la solution d'enzyme sont analysés par électrofocalisation en veine liquide. 1 p. cent d'ampholines (pH 3,5-10)sont utilisées dans un gradient de saccharose (voir matériel et méthodes).

- 17 ·

est remarquablement stable. Elle peut être conservée pendant plusieurs semaines à 4°C sans perte notable d'activité. Cependant, en dépit de la rapidité de la méthode de purification, il demeure possible que la structure de l'enzyme ait été modifiée pendant la préparation. Il a particulièrement été montré que l'existence de multiples formes isoenzymatiques pouvait, au moins partiellement, s'expliquer par l'action de la neuraminidase au niveau des sialoglycoprotéines (38). Cependant, la pureté de l'enzyme nous a semblé satisfaisante pour étudier la composition sous-unitaire de cette protéine.

- 18 ·

CHAPITRE II

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE L'∝-L FUCOSIDASE EN MILIEU DENATURANT
Un grand nombre de travaux sur les α -L fucosidases d'origines diverses ont montré la nature tétramérique de cette enzyme (15-20-24). Cependant, la détermination de la composition sous-unitaire de la protéine n'a pu être déterminée avec exactitude, les résultats étant souvent divergents (voir introduction, tableau II, page 7).

La détermination de la composition en sous-unités d'une protéine doit faire intervenir des techniques performantes pouvant permettre, le cas échéant, de séparer des sous-unités non identiques. Les techniques électrophorétiques restent à ce jour les plus adaptées. Nous avons donc étudié le comportement électrophorétique de l' α -L fucosidase dans des conditions permettant la dissociation de l'enzyme en sous-unités.

A - ANALYSE PAR ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

1) en présence d'urée

L'analyse de l'a-L fucosidase par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M a été réalisée dans le système de DAVIS (39). Les conditions adoptées (urée 8 M, pH8,7 - voir matériel et méthodes) permettent d'étudier le comportement électrophorétique en fonction de la charge des sousunités de l'enzyme.

Un résultat représentatif est présenté figure 4. Une seule bande protéique est observée dans ce système d'électrophorèse. Cette bande, relativement large est obtenue quelque soit la concentration en urée de l'échantillon (jusqu'à 10 M).

2) en présence de SDS

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS a été réalisée dans le système de LAEMMLI (40). Il est bien connu qu'en présence de SDS, les protéines sont dissociées en leurs sous-unités et que la séparation de celles-ci s'effectue en fonction de leur poids moléculaire.

a - de l'enzyme native

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de l'a-L fucosidase purifiée par chromatographie d'affinité permet de mettre en évidence une seule bande protéique évoir figure 2, page 16). Cependant, on peut constater que cette bande

19



Figure 4 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-urée de l' α -L fucosidase du foie de rat.

- 20 -

Une partie aliquote de la solution d'enzyme (10 μ g de protéine) est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée, dans les conditions ioniques décrites par DAVIS (voir matériel et méthodes). présente la particularité d'être large et diffuse : le poids moléculaire des sous-unités de l'enzyme est déterminé dans l'intervalle de 50 à 62000. Ce résultat n'est pas lié à une surcharge en matériel protéique lors de l'analyse. En effet, lorsqu'une gamme de dilution de l' α -L fucosidase, effectuée dans le tampon d'échantillon de LAEMMLI en absence de β mercaptoethanol, est analysée par électrophorèse, cette bande caractéristique est observée quelque soit la quantité d'enzyme (jusqu'à 0,25 µg, voir figure 5,A). En présence de β -mercaptoethanol, le profil obtenu pour la protéine réduite est identique (figure 5,B). Les bandes fines, observées au dessus et au même niveau que la protéine sont un artefact du système.(•)

Aucune modification n'a pu être obtenue par l'addition d'urée 8 M dans le système d'électrophorèse (Résultats non montrés). En outre, un nombre limité d'analyses corroborantes ont été effectuées dans le système d'électrophorèse de WEBER et DSBORN (41) (résultats non montrés).

b - de l'enzyme préalablement réduite et alkylée

Comme nous l'avons montré précédemment, la réduction des ponts disulfures au niveau de la protéine avant l'analyse électrophorétique ne modifie pas la résolution des sous-unités de l'enzyme. Cependant, un travail récent a montré qu'un début de séparation en 2 bandes a été obtenu pour l'a-L fucosidase du foie humain lorsque la protéine réduite est carboxyméthylée avant l'électrophorèse (ALHADEFF et ANDREWS-SMITH, 26). Pour l'enzyme isolée du foie de rat, la réduction des ponts disulfures en présence de chlorure de guanidine 7 M suivie de l'alkylation des groupements-SH ne permet pas d'améliorer la résolution (voir figure 6).

(*) Des bandes artefactuelles sont observées après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS aussi bien lors d'une analyse où l'enzyme est présente ou omise. Ce phénomène, reproductible quelque soit le système d'électrophorèse (tampon Tris-glycine de LAEMMLI ou phosphate de WEBER et OSBORN), n'a pu être éliminé ni par l'utilisation de SDS de différentes origines (BDH, MERCK, BIORAD), ni par la substitution du saccharose par du glycerol, éléments présents dans le tampon d'échantillon. Seule l'élimination du β-mercaptoethanol et non sa substi tution par du DTT a permis de supprimer ces bandes artéfactuelles. Ce phénomène est plus particulièrement mis en évidence par l'utilisation des méthodes de révélation à base d'argent, récemment mises au point.

- 21



Figure 5 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS d'une gamme de dilution de l' α -L fucosidase du foie de rat en absence (A) et en présence de **B**-mercaptoethanol (B).

Deux parties aliquotes de la solution d'enzyme (4 μ g de protéine) sont diluées dans 100 μ l final du tampon 62,5 mM Tris-HCL pH 6,8, SDS 2%, saccharose 10 % pour l'une (A) et d'un même tampon à 5 % B-mercaptoethanol pour l'autre (B). Dans les deux cas, 50 μ l de la solution sont prélevés et additionnés d'un volume égal du tampon de dilution correspondant et ainsi de suite, permettant d'obtenir par dilution successive, des concentrations de 2 μ g (1), 1 μ g (2), 0,5 μ g (3), 0,25 μ g (4), 0,1 μ g (5), 0,05 μ g (6) et 0,025 μ g (7) dans un volume final de 50 μ l. Les échantillons, chauffés 5 mn à 100°c, sont analysés par électrophorèse dans des gels à 12,5% d'acrylamide. Après la migration, les gels sont colorés par l'argent. Les flèches indiquent la position dans le gel des différentes protéines "marqueurs".

- 22 -



B

 $\underbrace{Figure \ 6}_{fucosidase \ du \ foie \ de \ rat, \ préalablement \ réduite \ et \ alkylée}$

A - ∝-L fucosidase native (5 µg de protéine)
B - ∝-L fucosidase réduite et alkylée (5 µg de protéine, voir matériel et méthodes).

Le gel est coloré par le bleu de coomassie. La flèche indique la position dans le gel de bandes artefactuelles (voir page 21). - 23 -

Le blocage des groupements NH₂ de la protéine par l'anhydride citraconique a également été entrepris avant l'analyse électrophorétique de l'α-L fucosidase préalablement réduite et alkylée. Aucune modification du comportement électrophorétique n'a pu être observée (résultat non montré).

Conclusion

Nous avons abordé l'étude de la composition en sous-unités de l' α -L fucosidase du foie de rat par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant. Une seule bande protéique, large, a été obtenue après électrophorèse de l'enzyme en présence d'urée ou de SDS. Dans ce dernier système, nous avons montré que la résolution des sous-unités (poids moléculaire de 50 à 62000) n'est pas liée à la quantité d'enzyme analysée. Il semble de même, à la vue des traitements avant électrophorèse (réduction en présence de chlorure de guanidine et alkylation des groupements SH, blocage des groupements NH₂) que le comportement électrophorétique particulier de ces sous-unités ne soit pas dû à un manque de dénaturation de l'enzyme.

L'ensemble de ces résultats ne permet pas de préciser si la molécule d'enzyme est constituée d'un ou de plusieurs types de sous-unités. Cependant, la possibilité demeure que la bande large et diffuse obtenue soit le résultat de la présence de sous-unités de poids moléculaires trop proches pour être séparées lors d'une analyse électrophorétique en présence de SDS. Nous avons donc cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle une hétérogénéité pourrait exister au niveau des composants de l' α -L fucosidase.

B - HETEROGENEITE DES COMPOSANTS DE L'ENZYME

1) Seconde analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS.

Dans un premier temps, pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'enzyme pourrait être constituée de sous-unités d'un poids moléculaire très proche, nous avons étudié le comportement électrophorétique de la bande large obtenue par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, dans une deuxième dimension du même type.

Pour réaliser cette expérience, la bande obtenue dans la première dimension est excisée du gel. Sept sous bandes fines y sont découpées dans le sens de la mobilité électrophorétique. Celles-ci, après stabilisation sur le tampon d'échantillon de LAEMMLI, sont ensuite analysées individuellement par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

- 24

La réinvestigation de ces fractions par électrophorèse met en évidence des bandes dont les mobilités relatives correspondent aux positions d'origine dans le gel (figure 7, B à H). Ce résultat montre que chaque fraction est caractérisée par une mobilité électrophorétique propre et par la même confirme l'hypothèse d'une hétérogénéité des composants de l'enzyme. En conséquence, la séparation des sous-unités de l'α-L fucosidase ne pouvant être obtenue sur le seul critère du poids moléculaire, nous avons cherché à séparer celles-ci préalablement en fonction d'un autre facteur : la charge des composants de l'enzyme.

25

2) Analyse par électrophorèse bidimensionnelle selon O'FARREL (42)

L'analyse par électrophorèse bidimensionnelleselon la méthode d'O'FARREL fait intervenir deux paramètres dans la séparation des sous-unités d'une protéine : la charge et le poids moléculaire. Ainsi, la protéine est analysée dans une première dimension par électrofocalisation en présence d'urée puis dans un deuxième temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

L'électrofocalisation de l' α -L fucosidase, réalisée dans un gel d'acrylamide à 3,8 % en présence d'urée 9,5 M (voir matériel et méthodes), montre l'hétérogénéité des sous-unités de l'enzyme (figure 8,A). Cinq composants majeurs sont mis en évidence, caractérisés par des points isoélectriques (pI) de 6,5 à 6,15. Le nombre de bandes observées semble dépendre de la quantité de protéine analysée. Nous avons ainsi pu trouver dix composants de l'enzyme entre le pI de 6,5 et de 5,8. Ce résultat n'est pas affecté par la concentration en urée de l'échantillon (9 à 9,95 M urée). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS permet de caractériser les différents composants de l'enzyme par leur poids moléculaire apparent (figure 8,B). On peut constater que l'augmentation du poids moléculaire semble fonction de la charge, les éléments les plus lourds étant les plus "acides".

Le traitement de l'enzyme par la neuraminidase avant l'analyse "bidi-"mensionnelle ne modifie pas le comportement électrophorétique des composants de l'a-L fucosidase (figure 9). Cependant, l'intensité relative des bandes est modifiée. Ce résultat suggère que les composants les plus "acides" dérivent des plus "basiques" par sialylation de ceux-ci, aucune forme nouvelle n'ayant pu être mise en évidence (comparer figure 9, A et B).

.



PM × 10⁻³

Figure 7 : Mise en évidence de l'hétérogénéité des sous-unités de l'α-L fucosidase du foie de rat lors d'une analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

> L'X-L fucosidase est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (A). La zone de migration des sous-unités de l'enzyme est découpée en 7 fractions dans le sens de la mobilité. Les sept fractions sont re-analysées par électrophorèse (B,C,D,E,F,G et H).

L'analyse est réalisée dans un gel d'acrylamide à 12,5 p.cent. Le gel est coloré par l'argent.

Les flèches indiquent la position d**a**ns le gel des protéines "marqueurs".



Figure 8 : Séparation bidimensionnelle des sous-unités de l'α-L fucosidase du foie de rat.

Deux parties aliquotes de la solution d'enzyme (25 µg de protéine) sont analysées par électrofocalisation (pH 5-7) dans un gel d'acrylamide à 3,8 % en présence d'urée 9,5 M. Après 16 heures de migration, un gel est coloré par le bleu de coomassie (A), l'autre étant équilibré dans un tampon contenant 2,3 % de SDS puis analysé dans une deuxième dimension par électrophorèse dans un gel d'acrylamide à 12,5 % en présence de SDS (B) (voir matériel et méthodes). Une électrophorèse monodimensionnelle en SDS de l'≪-L fucosidase est réalisée en même temps que la deuxième dimension de l'analyse "bidimensionnelle". Ces deux gels sont colorés par le bleu de coomassie.

Les flèches indiquent la position dans les gels des defférentes protéines "marqueurs".

- 27 -



figure 9 : Electrophorèse bidimensionnelle de l'α-L fucosidase du foie de rat en milieu dénaturant.

A - Avant traitement à la neuraminidase

B - Après traitement à la neuraminidase

2 parties aliquotes de la solution d'enzyme (22 µg de protéine) sont ajustées en EDTA 10 mM, pH5. Après incubation 2 heures à 37°C en présence (B) ou en absence (A) de neuraminidase, celles-ci sont analysées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant (voir matériel et méthodes).

Après la migration, le gel est coloré par le bleu de coomassie.

C - CONCLUSION

L'étude de la composition en sous-unités de l'α-L fucosidase isolée du foie de rat a été entreprise par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Une bande caractéristique, large et diffuse, est obtenue dans ce système d'électrophorèse. Ce résultat est similaire à celui obtenu par ORHEIM et TOUSTER pour l'enzyme du foie de rat (15). Ces auteurs avaient déterminé l'α-L fucosidase comme étant un tétramère formé de quatre sous-unités identiques à la seule vue de l'analyse électrophorétique. Cependant, le comportement électrophorétique propre de chaque fraction obtenue à partir de la bande large suggère l'existence d'une hétérogénéité des composants de l'enzyme sur la base du poids moléculaire (voir figure 7, page 26). Il semble donc impossible de conclure à la présence d'un ou de plusieurs types de sous-unités dans la molécule.

Dans le présent travail, nous avons pu séparer les sous-unités de l' α -L fucosidase en dix formes par électrofocalisation en milieu dénaturant. Toutes les formes ainsi séparées selon leur pI sont trouvées de poids moléculaires différents compris dans l'intervalle de valeur déterminé par l'électrophorèse monodimensionnelle de l'enzyme en gel de polyacrylamide-SDS (5D à 62000). Ce résultat confirme l'hétérogénéité des sous-unités de l' α -L fucosidase et laisse supposer une relation entre la charge et le poids moléculaire au niveau de ces formes multiples.

Les formes "acides" plus lourdes semblent être converties par le traitement à la neuraminidase, en formes plus "basiques", de surcroit plus légères et migrant aux mêmes positions que celles en absence de traitement (voir figure 9, page 28). Sur la base de ce résultat qui s'accorde à la nature sialo-glycoprotéique de l'a-L fucosidase du foie de rat (voir tableau V); nous pouvons suggérer qu'une variation de la teneur en acides sialiques de la partie glycannique des sous-unités de l'enzyme puisse être, au moins partiellement, à l'origine de la grande hétérogénéité observée selon la charge et le poids moléculaire. En effet, si la présence d'acides sialiques confère à une protéine un pI plus acide, elle occasionne une diminution anormale de la mobilité électrophorétique de cette même protéine en gel de polyacrylamide-SDS (43). Cependant, en ce qui concerne le nombre de sous-unités non identiques, l'interprétation de ce résultat reste limitée étant donné la persistance de plusieurs formes "basiques" majeures. Cette hétérogénéité persistante peut s'expliquer :

- dans l'hypothèse d'un seul type de sous-unités, par une désialy**l**ation non totale, les multiples formes dérivant toutes d'une forme unique par la

- 29 -

	Résidus en moles	Résidus en moles
	pour 55000g de	pour 220000 g de
	protéine	protéine
GLUCOSE	2,2	. 9
GALACTOSE	1,9	8
MANNOSE	8,0	32
FUCOSE	0,7	4
GLUCOSAMINE	7,9	32
ACIDE SIALIQUE	2,0	8

Tableau V : Composition en monosaccharides de l'x-L fucosidase lysosomale du foie de rat (d'après OPHEIM et TOUSTER,15).

30 -

variation de la teneur en acides sialiques ;

- dans l'hypothèse de plusieurs types de sous-unités, par une valeur différente du pI de celles-ci.

- 31 -

En outre, dans les deux cas présentés, une hétérogénéité de charge au niveau d'une même sous-unité protéique peut être liée à des variations locales de certains acides aminés au niveau de la chaîne polypeptidique. Une protéolyse limitée lors de la préparation, ne peut être exclue. Cependant, l'hétérogénéité des sous-unités de l'enzyme n'est pas sans rappeler celle observée pour la préparation enzymatique (dix isoenzymes actives séparées par électrofocalisation, voir figure 3, page 17). Cette hétérogénéité a été mise en évidence, non seulement pour l'enzyme du foie de rat, mais pour les α -L fucosidases d'origines diverses, et particulièrement pour celle du foie humain où les différentes isoenzymes ont été caractérisées par des propriétés différentes (13-35).

L'existence de multiples formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase du foie de rat, en relation avec l'hétérogénéité des sous-unités mise en évidence, suggère une variation probable de la composition sous-unitaire de ces différentes isoenzymes. Nous avons donc entrepris l'étude de la structure sous-unitaire des isoenzymes de l' α -L fucosidase dans le but de contribuer à la détermination du nombre de sous-unités différentes dans la molécule d'enzyme.

CHAPITRE III

REPARTITION DES SOUS-UNITES DANS LES FORMES ISOENZYMATIQUES DE L'~-L FUCOSIDASE

A - SEPARATION DES FORMES ISOENZYMATIQUES DE L'α-L FUCOSIDASE

L'étude de la composition en sous-unités des différentes formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase nécessite la séparation préalable de celles-ci. L'électrofocalisation de l'enzyme en veine liquide a permis de montrer la grande hétérogénéité de la préparation enzymatique. Cependant les différentes formes isoenzymatiques ainsi mises en évidence apparaissent trop peu séparées pour être analysées individuellement (voir figure 3, page 17). La séparation des "isoenzymes" de l' α -L fucosidase a donc été entreprise par l'utilisation de deux types de procédés ; chromatographiques et électrophorétiques.

1) procédés chromatographiques

Les procédés chromatographiques sur échangeur d'ions sont couramment utilisés pour séparer et préparer des "isoglycosidases". Cependant leurs utilisations n'ayant jamais permis de séparer toutes les formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase (29-30), nous avons employé une technique chromatographique, récemment mise au point, permettant de séparer les protéines sur la base de leur pI : la chromatofocalisation (44-45). L'application de cette technique nouvelle à la séparation des différentes formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase du foie de rat reste limitée. En effet, seules deux formes isoenzymatiques actives sont mises en évidence (voir figure 10). Une forte inhibition de l'activité enzymatique (30 %), observée en présence du tampon d'élution utilisé ("polybuffer 74" de Pharmacia) semble pouvoir être à l'origine du résultat obtenu.

2) procédés électrophorétiques

La séparation des différentes formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase a été entreprise par l'électrofocalisation de l'enzyme en gel de polyacrylamide, technique à pouvoir de résolution élevée pour la séparation de protéines de pI différents.

L'utilisation de ce procédé a nécessité la mise au point de conditions particulièrement adaptées. En effet, l' α-L fucosidase migre difficilement dans un gel à 5 % d'acrylamide, par contre dans un gel à 2,7 % d'acrylamide - 0,5 % agarose aucune forme isoenzymatique n'a pu être mise en évidence. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans un gel à 3, 8 % d'acrylamide (pH 5-7, voir figure 11). Dans ces conditions les différentes



Figure 10 : Chromatofocalisation de l'a-L fucosidase du foie de rat

Une partie aliquote (100 μ g de protéine) de la préparation d'enzyme est chromatographiée sur le gel "Polybuffer exchanger PBE 94" comme il est décrit en matériel et méthodes. Après élution, la mesure de l'activité α -L fucosidasique et du pH est effectuée sur chaque fraction.



Figure 11 : Electrofocalisation en gel de polyacrylamide de l' α -L fucosidase du foie de rat.

2 parties aliquotes de la solution d'enzyme (20 μ g de protéine) sont analysées par électrofocalisation en gel de polyacrylamide (pH5-7, voir matériel et méthodes). Après la migration, un gel est coloré par le bleu de coomassie. Le deuxième est découpé en tranches de 1 mm. qui sont incubées dans la solution de substrat pour mesurer l'activité enzymatique. formes isoenzymatiques actives de l'a-L fucosidase sont nettement séparées. Cinq bandes protéiques majeures sont observées dans le gel, correspondant aux formes isoenzymatiques les moins acides et les plus actives. Ces cinq isoenzymes majeures sont appelées EF_1 , EF_2 , EF_3 , EF_4 et EF_5 dans le sens de leur acidité croissante.

B - STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DES DIFFERENTES FORMES ISOENZYMATIQUES

1) analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est réalisée directement à partir de boudin d'électrofocalisation non dénaturante. Cette électrophorèse bidimensionnelle permet ainsi d'étudier la composition en sous-unités de toutes les formes isoenzymatiques de l'a-L fucosidase.

Comme le montre la figure 12, chaque isoenzyme donne une seule bande protéique par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. On peut également constater que les sous-unités de chaque isoenzyme sont caractérisées par des poids moléculaires légèrement différents : plus une forme isoenzymatique est "acide", plus ses sous-unités sont lourdes. Nous avons précédemment montré que les sous-unités de l'a-L fucosidase, séparées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant, subissaient une variation du même type (voir figure 8, page 27). Ce résultat tend donc à montrer l'existence d'une relation étroite entre isoenzyme et sous-unité(s) de pI déterminé. Cependant, bien que les spots obtenus par l'analyse des formes enzymatiques les moins acides, EF_1 EF_2 , EF_3 , EF_4 et EF_5 , ne changent pas de comportement lors d'une deuxième analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (figure 13), une certaine hétérogénéité peut être suspectée au niveau des sous-unités de chacune de ces formes.

2) analyse par électrophorèse bidimensionnelle selon O'FARREL

Chaque isoenzyme pouvant être composée de plusieurs sous-unités de pl différent, nous avons séparé celles-ci préalablement par électrofocalisation en milieu dénaturant. Une analyse par électrophorèse bidimensionnelle selon la méthode d'O'FARREL a été réalisée sur les trois formes isoenzymatiques majeures de l'a-L fucosidase (EF_1 , EF_2 et EF_3 , figure 14). L'isoenzyme la moins acide, EF_1 , apparaît composée de trois sous-unités dont les pl correspondent à ceux des trois sous-unités les moins acides séparées à partir de l'a-L fucosidase non fractionnée en ses formes isoenzymatiques

- 35 -



Figure 12 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des formes isoenzymatiques de l'α-L fucosidase du foie de rat

1

Deux parties aliquotes de la solution d'enzyme (20 µg de protéine) sont analysées par électrofocalisation en gel de polyacrylamide (pH5-7, voir matériel et méthodes). Après la migration, un gel est coloré par le bleu de coomassie (A). Le deuxième est équilibré sur un tampon contenant 2,3 % de SDS puis analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (B) (gel à 12,5 % d'acrylamide, voir matériel et méthodes).

Les flèches indiquent la position des différentes protéines "marqueurs" dans le gel. - 36 -





PM x 10⁻³

Figure 13 : Seconde analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des isoenzymes majeures de l'α-L fucosidase

A à E :
$$EF_1 - EF_2 - EF_3 - EF_4$$
 et EF_5
F : protéines "marqueurs"

Les spots, obtenus par l'analyse des isoenzymes par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (figure 12, page 36), sont excisés du gel. Après lavage sur de l'eau, les tranches de gel sont équilibrées sur le tampon échantillon de LAEMMLI et analysées dans un gel à 12,5 % d'acrylamide en présence de SDS (voir matériel et méthodes).

- 37 -

(comparer figure 14, A et B). EF_2 , quant à elle, apparaît composée des trois sous-unités suivant la moins acide alors que EF_3 serait un polymère dont la composition ferait intervenir les trois sous-unités suivant les deux les moins acides (comparer A, C, D, figure 14). Ce résultat montre donc la présence de plusieurs sous-unités de pI différent au niveau des isoenzymes majeures, celles-ci étant caractérisées dans le sens d'une acidité croissante par des sous-unités qui évoluent progressivement vers des pI acides.

C - CONCLUSION

Les différentes formes isoenzymatiques de l' α -L fucosidase ont pu être séparées par électrofocalisation en gel de polyacrylamide et l'étude de leur composition sous-unitaire entreprise. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des "isoenzymes" séparées a permis de suggérer une relation entre la charge des isoenzymes et des sous-unités devant les composer. Cette relation a pu être caractérisée par une analyse électrophorétique bidimensionnelle en milieu dénaturant des isoenzymes majeures. Il semble en effet que ces formes isoenzymatiques les moins acides (EF, , EF $_2$ et EF₃) proviendraient de l'association différente de trois sous-unités parmi les cinq moins acides (A, B, C, D et E) séparées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant de l' α-L fucosidase totale non fractionnée en ses isoenzymes. Ces formes isoenzymatiques seraient des polymères de type ABC pour EF_1 , BCD pour EF_2 et CDE pour EF_3 avec pour toutes une des sous-unités en double exemplaire, l' α-L fucosidase étant tétramérique (15-20-24). Pour les isoenzymes plus acides, EF4, et EF5, une même évolution de leur composition sous-unitaire a été observée (résultat non montré).

Dans l'hypothèse d'un seul type de sous-unité, chaque isoenzyme serait un homopolymère composé de quatre sous-unités identiques mais chargées différemment. Il est cependant surprenant qu'aucune forme isoenzymatique ne soit, dans ces conditions, trouvée composée de quatre sous-unités de même charge. Il semble donc assez probable que différents types de sous-unités constituent la molécule d'enzyme tétramérique. Aucune sous-unité de même pI n'étant commune à toutes les formes isoenzymatiques, il est possible de suggérer, dans cette hypothèse, que les sous-unités non identiques soient toutes hétérogènes sur la base du pI suite à des variations de la teneur en acides sialiques. - 38 •



Figure 14 : Electrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant des "isoenzymes" de l'α-L fucosidase du foie de rat. A = témoin α-L fucosidase native

> B,C et D : "isoenzymes" majeures de l' α -L fucosidase (A : EF₁, B : EF₂, C : EF₃)

Les bandes correspondant à EF_1 , EF_2 et EF_3 séparées par électrofocalisation en gel de polyacrylamide (figure 11,P.34) sont excisées du gel après décoloration de celui-ci. Après lavage sur de l'eau, les tranches de gel sont séchées sous vide puis rehydratées dans le tampon d'échantillon d'O'FARREL. Après l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant, les gels de polyacrylamide-SDS sont colorés par le nitrate d'argent. Sur la droite de chaque gel se situent les protéines "marqueurs" (67 000 -43 000 - 30 000).

- 39 -

Chaque isoenzyme étant en outre composée de trois sous-unités, l'existence de trois sous-unités non identiques peut être supposée dans la molécule d'α-L fucosidase. - 40 -

Une caractérisation de la partie protéique de ces sous-unités pourrait permettre de tester cette hypothèse. Nous avons donc entrepris une étude structurale des sous-unités de l' α -L **fu**cosidase.

CHAPITRE IV

ANALYSE STRUCTURALE DES SOUS_UNITES DE L'x-L FUCOSIDASE

L'identité de protéines séparées peut être établie par l'étude de leur structure primaire. Cette étude peut être abordée par l'utilisation de méthodes permettant de comparer les peptides issus d'une protéolyse des protéines à étudier. L'utilisation du procédé original de "Finger printing" d'INGRAM permet de séparer ces peptides par une électrochromatographie bidimensionnelle sur papier. Cependant cette méthode nécessite des quantités importantes de protéines en solution. Nous avons donc utilisé les procédés des cartes peptidiques "mono" et "bidimensionnelles" qui, sur le même principe d'une protéolyse et d'une séparation des peptides, s'appliquent à de faibles quantités de protéines (quelques µg) insolubilisées dans un gel de polyacrylamide. La comparaison de cartes peptidiques "mono" et "bidimensionnelles" a permis principalement jusqu'à présent, de déterminer les relations existant entre des protéines virales (46-47), des isoenzymes (48) et des protéines d'origine différente (49).

A - CARTES PEPTIDIQUES "MONODIMENSIONNELLES"

Cette méthode est basée sur une digestion protéolytique partielle des protéines à étudier, dans un tampon contenant du SDS. Les peptides, produits de l'hydrolyse, sont ensuite séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Le profil des bandes obtenues est caractéristique de la protéine étudiée pour une enzyme protéolytique déterminée.

Les cartes peptidiques "monodimensionnelles" des six sous-unités de pI les moins acides séparées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant (voir figure 8, page 27), ont été effectuées après une digestion par la protéase V8 de staphylocoque <u>Aureus</u> selon la méthode de CLEVELAND et al (50). Un résultat représentatif est présenté figure 15.

Les profils polypeptidiques obtenus après digestion enzymatique des six sous-unités majeures sont similaires. Les polypeptides de bas poids moléculaires semblent identiques pour toutes les sous-unités. En outre, pour chacune d'entre elles, un seul polypeptide plus lourd est observé mais dont le comportement électrophorétique varie légèrement d'une sous-unité à l'autre. Cette variation semble suivre celle observée pour les sous-unités non hydrolysées. L'analyse du même type sur l'ensemble des sous-unités de l' α -L fucosidase met en évidence un profil identique à celui observé pour chaque sous-unité séparée (figure 15, 7). Ce résultat suggère donc fortement une analogie structurale des sous-unités de pI et de poids moléculaires différents.

- 41



Figure 15 : Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des peptides obtenus par hydrolyse limitée des sous unités de l'α-L fucosidase du foie de rat.

Les six sous-unités les moins acides (A, B, C, D, E et F), séparées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant (voir figure 8, page 27) sont excisées du gel. Les tranches de gel contenant les protéines, sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (gel d'acrylamide à 15%) en présence de protéase V8 (voir matériel et méthodes).

-1à_6_: sous-unités A à F respectivement.

-_7: une partie aliquote de la préparation d' α -L fucosidase (2 µg de protéine) est analysée dans les mêmes conditions. Après la migration, le gel est coloré par l'argent.

Les flèches indiquent la position dans le gel des différentes protéines "marqueurs".

- 42 -

Les sous-unités de l' α -L fucosidase ont été hydrolysées pendant des intervalles de temps différents et avec des concentrations variables en protéase V8 (cette protéase coupe au niveau des résidus aspartiques et glutamiques du coté COOH-terminal (51). Le même nombre de polypeptides ainsi générés a toujours été observé. L'utilisation d'autres protéases actives dans le SDS n'a pas permis, soit d'obtenir des produits d'hydrolyse assez lourds pour être nettement séparés (papaine, protéinase K), soit d'hydrolyser la protéine (chymotrypsine). Les cartes peptidiques n'ayant pu être obtenues à partir de l'action d'autre protéases, nous avons cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle les sous-unités de pI différent seraient de structure analogue en utilisant une autre méthode d'analyse : les cartes peptidiques "bidimensionnelles".

B - CARTES PEPTIDIQUES BIDIMENSIONNELLES

Cette méthode, décrite par ELDER <u>et al</u> (52) est particulièrement adaptée pour l'analyse de protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les protéines, excisées du gel, sont iodées directement dans la tranche de gel puis hydrolysées à la trypsine. Les peptides ¹²⁵ I ainsi obtenus sont ensuite séparés sur couche mince de cellulose par électrophorèse dans une première dimension puis par chromatographie dans la seconde.

La figure 16 montre le relevé des autoradiogrammes des cartes peptidiques obtenues après une digestion à la trypsine des six sous-unités les moins acides séparées par électrophorèse bidimensionnelle pn milieu dénaturant de l' α -L fucosidase. Environ 9 à 11 peptides apparaissent majeurs sur les six cartes peptidiques. Quelques différences d'intensité peuvent être observées pour ces spots comparables, cependant la similitude dans la distribution des peptides à tyrosine 125 I est réellement apparente pour toutes les sous unités étudiées. Certains spots mineurs sont également observés. Ceux-ci représentent certainement des produits incomplètement hydrolysés par la trypsine ou encore des peptides sans tyrosine mais pouvant contenir un (des) acide animé(s) (His-Trp) qui peuvent faiblement s'ioder (46).

Parallèlement à cette expérience, les quatre isoenzymes les moins acides (EF_1 , EF_2 , EF_3 et EF_4) analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (voir figure 12, page **36**) ont été iodées dans les tranches de gel.

43 -



Figure 16 : Cartes peptidiques "bidimensionnelles" des sous-unités de l' α -L fucosidase du foie de rat.

Les six sous-unités les moins acides (A, B, C, D, E et F) séparées par électrophorèse bidimensionnelle en milieu dénaturant (voir figure 8, page 27) sont excisées du gel. Les protéines sont iodées à l'.¹²⁵ I dans les tranches de gel puis re-analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les protéines iodées contenues dans les tranches de gel excisées, sont hydrolysées 24 heures par la trypsine. Les peptides, issus de l'hydrolyse, sont séparés par électro-chromatographie sur couches minces de cellulose et détectés par autoradiographie après 6 à 7 jours d'exposition (voir matériel et méthodes).

Les traits pleins ou discontinus délimitent les spots majeurs. Les pointillés délimitent les spots mineurs. Les peptides, issus d'une hydrolyse trypsique ont été soumis à une analyse "bidimensionnelle" du même type que précédemment. Les cartes peptidiques obtenues à partir de ces isoenzymes sont présentées figure 17. La même ¹²⁵ I est observée pour chaque isoenzyme étudiée. Cette distribution est similaire à celle des peptides obtenus après hydrolyse de chaque sous-unité séparée (comparer figures 16 et 17). Seul un peptide majeur, présent au niveau de toutes les sous-unités est absent pour toutes les isoenzymes, résultant de l'association différente de trois sous-unités de pI différents parmi les six les moins acides, il est possible qu'une modification de la conformation des sous-unités en mélange ait affecté le marquage à l'¹²⁵I d'une partie de la chaine polypeptidique correspondant au peptide incriminé (46).

C - CONCLUSION

L'analyse de la structure de la partie protéique des sousunités de l' α -L fucosidase a été entreprise par l'utilisation des procédés de cartes peptidiques.

Les cartes peptidiques "monodimensionnelles" ont été obtenues par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des peptides issus d'une hydrolyse des sous-unités par la protéase V8 en présence de SDS. La comparaison de celles-ci a montré la similitude des profils polypeptidiques des sous-unités majeures (voir figure 15, page 42). Cependant pour chacune de celles-ci, un seul peptide est caractérisé par une mobilité électrophorétique variable. Cette variation suit celle des sous-unités natives qui est partiellement liée à un taux différent d'acide sialique (voir figure 9, page 28). De ce fait, il est probable que ce peptide soit identique pour toutes les sous-unités mais que son hétérogénéité provienne en partie d'une glycosylation variable. Une hydrolyse par la trypsine de ces sous-unités et des isoenzymes majeures préalablement iodées, a permis d'établir les cartes peptidiques "bidimensionnelles" par électro- chromatographie des peptides à tyrosine ¹²⁵I sur couches minces de cellulose. La similitude de ces cartes a pu être observée aussi bien pour les sous-unités séparées que pour celles

en mélange dans les isoenzymes.

Ces résultats montrent l'analogie de la structure peptidique des sous-unités de pI différents et suggèrent que l'hétérogénéité de celles-ci est liée à une glycosylation variable d'une même chaine polypeptidique.

- 45



<u>Figure 17</u> : Cartes peptidiques "bidimensionnelles" des isoenzymes de l' α -L fucosidase du foie de rat.

Les spots correspondant aux isoenzymes analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (EF_1 , EF_2 , EF_3 et EF_4 , voir figure 12,P.36). sont excisés du gel. L'analyse bidimensionnelle sur couche mince des peptides marquées à l'¹²⁵ I, obtenus par hydrolyse à la trypsine, est réalisée comme il est décrit figure 16, page 44. Les peptides sont détectés par autoradiographie après trois jours d'exposition. La flèche indique la position du peptide majeur commun aux sousunités analysées figure 16 et absent dans le cas présent. Dans ce cas, il peut paraître surprenant qu'aucune différence notoire n'ait pu être mise en évidence dans les cartes peptidiques "bidimensionnelles". En effet, l'hydrolyse trypsique des sous-unités différentes par la partie glycannique (variation du taux d'acide sialique et éventuellement glycannes de différents types) devrait permettre de caractériser, après séparation des produits de l'hydrolyse, des glycopeptides de mobilités différentes. Il est cependant possible que ceux-ci n'aient pu, soit migrer dans le système de séparation utilisé, soit être révélés par autoradiographie à cause d'une absence de tyrosine. 47 -

DISCUSSION

L'étude de la composition sous-unitaire des α -L fucosidases d'origines diverses isolées à ce jour a généralement été entreprise par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Des résultats divergents ont été obtenus sur le nombre de sous-unités différentes, l' X-L fucosidase ayant été determinée comme un tétramère composé soit de quatre sous-unités identiques, soit de deux paires de sous-unités non identiques et parfois comme possédant des sous-unités de trois types ou encore de deux types en quantités différentes (voir tableau II, page 7). Pour l' x-L fucosidase isolée du foie de rat par chromatographie d'affinité, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS montre une seule bande protéique caractéristique large et diffuse. Cependant, quand les sous-unités de l'enzyme sont préalablement séparées par électrofocalisation dénaturante, la présence d'une dizaine de sous-unités de pI et de poids moléculaire différents est mise en évidence. Il apparaît donc que la présence et le nombre de sous unités non identiques dans la molécule d' «-L fucosidase ne puissent être déterminés par électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide-SDS, l'hétérogénéité de celles-ci étant vraisemblablement à l'origine des divergences de résultats obtenus jusqu'alors.

Le manque d'informations concernant la base biochimique de l'hétérogénéité des sous-unités de l'enzyme est dû au fait que celle-ci, à notre connaissance, n'a jamais été mise en évidence. Cependant la présence de l'∝-L fucosidase sous forme d'isoenzymes a souvent été signalée dans de nombreux tissus. Ainsi plusieurs auteurs ont montré que les isoenzymes "acides" dérivaient des formes isoenzymatiques plus neutres par la présence d'acide sialique pour l' \propto -L fucosidase du foie (31-35), du sérum et du placenta humain (16). Nous avons montré dans ce travail qu'une relation de conversion identique à celle des isoenzymes semblait exister pour les sous-unités séparées de l' «-L fucosidase du foie de rat. Il apparaît donc que les acides sialiques participent à l'existence d'une hétérogénéité au niveau des sous-unités de l'enzyme. Pourtant après l'action de la neuraminidase, les sous-unités les moins acides persistent (voir figure 9, page 28). La répartition des sous-unités de l'enzyme dans les différentes formes isoenzymatiques isolées par électrofocalisation en gel de polyacrylamide montre que ces sous-unités persistantes composent les isoenzymes les moins acides. Celles-ci, semblant résulter de l'association de trois sous-unités de pI différent, il est possible de soupçonner la présence de sous-unités non identiques dans la molécule de l'enzyme.

- 48 -

Cette considération nous a conduit à entreprendre l'étude de la composition en sous-unités de l' \propto -L fucosidase selon une approche différente : la caractérisation de la structure protéique de chaque sousunité de pI différent par les méthodes de protéolyse limitée. Cependant aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par comparaison des cartes peptidiques "mono- et bidimensionnelle" des sousunités de l'enzyme, montrant ainsi l'analogie structurale de celles-ci. 49

Si une seule sous-unité protéique existe sous des formes multiples de pI différents, ceci suggère que si l'hétérogénéité est liée exclusivement à une variation de la teneur en acide sialique de la partie glycannique de la chaine peptidique, certains de ces oses ne peuvent être détachés par l'action de la neuraminidase. Cependant la persistance de plusieurs formes de pI différent après désialylation peut également trouver son origine au niveau même de la chaine peptidique par une amidation variable des résidus glutamyls et asparagyls, variations qui ne peuvent pas, bien souvent, être mises en évidence par les méthodes des cartes peptidiques. Dans ce cas, suite à la sialylation durant le transport intracellulaire, l'hétérogénéité primaire serait accentuée par une désialylation variable ayant lieu dans les lysosomes sur la sous-unité mature. Il reste cependant possible que cette hétérogénéité ne reflète pas celle de la sous-unité existant <u>in vivo</u>, une désialylation partielle pouvant avoir lieu lors de la purification de l'enzyme.

Une sialylation variable de la seule sous-unité protéique présumée est également au moins partiellement responsable de l'obtention d'une bande large par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de 1 k-L fucosidase (poids moléculaire 50 - 62 000). La présence d'acides sialiques étant à l'origine d'une diminution de la mobilité électrophorétique. il semble qu'une valeur de poids moléculaire de 50 000 puisse être attribuée à la sous-unité. Cependant outre la présence d'acides sialiques, la partie glycannique d'une protéine, ne fixant pas (ou peu) de SDS, occasionne une diminution de la mobilité électrophorétique de la glycoprotéine par rapport à la protéine vraie (43). Il semble donc que la valeur de 50 000 estimée pour le poids moléculaire de la sous-unité, soit élevée. Une valeur proche de 40 000 a pu être déterminée par l'analyse en filtration sur gel de l'**<-**L fucosidase dissociée à pH basique (chromatographie haute performance sur colonne I 250 (WATERS) résultat non montré). Une variation de 10 000 daltons n'est pas inconcevable à la vue des résultats obtenus après déglycosylation de glycoprotéines (53 - 54). Plusieurs essais de déglycosylation de l'**«**-L fucosidase ont été réalisés par des moyens chimiques (acide fluoridrique) ou enzymatiques (emploi de glycosidases), mais n'ont pas jusqu'à présent, donnés de résultats concluants. - 50 -

La mise en évidence d'un seul type de sous-unité dans la molécule d' \propto -L fucosidase ne peut être complétée par une valeur précise du poids moléculaire de cette sous-unité protéique. Cependant l'étude de la biosynthèse de cette enzyme peut s'appuyer sur la connaissance de la composition sous-unitaire de la protéine. En effet, bien qu'une étude préliminaire avait montré trois chaines peptidiques dans les produits de traduction <u>in vitro</u> des mRNA isolés à partir des différentes fractions de polyribosomes du foie de rat (DISSOUS, 37), une étude plus approfondie semble montrer l'existence d'un seul précurseur supposé de l' \propto -L fucosidase (DELPLACE, 55).

CONCLUSION
L'étude de la composition en sous-unités de l' \propto -L fucosidase lysosomale du foie de rat a permis de montrer l'hétérogénéité de charge des sous-unités de l'enzyme et la répartition de celles-ci au niveau des multiples formes isoenzymatiques de la protéine. L'identité de ces sous-unités différemment chargées n'a pu être établie que par une étude spécifique de leur structure protéique.

- 51 -

L'existence d'une seule sous-unité protéique hétérogène par variation du taux de glycosylation pourra ultérieurement être confirmée par l'étude de la partie glycannique des multiples sous-unités et isoenzymes de l' $\boldsymbol{\propto}$ -L fucosidase. Cependant la mise en évidence d'un seul type de sousunités dans la molécule de l'enzyme permet, dès à présent, de contribuer à l'étude de la biosynthèse de cette protéine.

MATERIEL et METHODES

A - PURIFICATION DE L'∝-L FUCOSIDASE DU FOIE DE RAT

250 à 500 g de foie provenant d'un lot de rats de même sexe sont homogénéisés dans trois volumes du tampon 0,25S Te₅₀ K₂₅ M₃. L'homogénat, dilué pour obtenir une concentration de 16p.cent, est centrifugé à basse vitesse dans le rotor JA14 de la centrifugeuse J21B. Une fraction riche en lysosomes est alors préparée à partir du surnageant obtenu par centrifugation dans le rotor JA10. Celle-ci est lavée une fois dans le milieu0,25S Te₅ K₂₅ E₂ (6ml/g de foie). Elle est rehomogénéisée dans le tampon acétate 10mM, pH6, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol 1mM (1,4ml/g de tissu) par 20 allers-retours de piston serré dans un homogénéiseur de DOUNCE. La suspension est centrifugée à 40 000 g_{max} pendant 20 mm. Les opérations suivantes sont celles décrites par OPHEIM et TOUSTER (15)

Le surnageant est décanté puis soumis à un relargage par le sulfate d'ammonium (63 % de saturation à pH6) à 0-2°C. Le sédiment obtenu est dissous dans le tampon acétate 10 mM, pH6, MgSO4 1mM, ß -mercaptoéthanol 1mM et ensuite déposé sur une colonne de sepharose 4B (10-15 ml de gel, seringue de 50 ml), connectée à une colonne composée de 3ml de Biogel P10, recouverts par 6ml d'Agarose-E-aminocaproyl-fucosylamine (seringue de 10ml). Les deux colonnes sont stabilisées dans le tampon acétate 10mM, pH6, NaCl 0,7 M, MgSO4 1mM, ß-mercaptoéthanol 1mM (tampon A). La colonne de Sepharose 4B est lavée par 30 ml de cette solution et les deux colonnes sont ensuite déconnectées. Le support d'affinité est alors encore lavé par 200ml de tampon A, puis par 40ml de tampon acétate 10 mM,pH6, NaCl 0,15M, MgSO4 1mM, ß-mercaptoéthanol 1mM (tampon B). L'enzyme est ensuite éluée par 20 ml de fucose 0,1M dans le tampon B, puis centrifugée dans le rotor 60 Ti pendant 12 heures à 60 000t/mn à 2°C. Le sédiment est repris par 100 l de tampon EDTA 2mM, pH6, 0,1mM, MgSO4, 0,1mM, ß-mercaptoéthanol.

B - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Pour la mesure de l'activité de l' \propto -L fucosidase, 0,1ml de fraction à doser sont additionnés de 0,4ml de paranitrophenyl- -L fucopyrannoside 2mM dans le tampon acétate 62,5mM, pH6, contenant 250 µg/ml de sérum albumine bovine. Lorsqu'il s'agit de fractions purifiées, la réaction est arrêtée par 0,5ml de tampon alcalin (glycine 0,133M, NaCl 67mM, Na₂CO₃83mM - 52 -

ajusté à pH 10,7 avec NaOH) et la densité optique est mesurée à 400nm contre un témoin non incubé. Dans le cas de fractions brutes, la réaction est arrêtée par l'addition de 0,1ml d'acide trichloroacétique à 20 p.cent et une partie aliquote de l'acido-soluble est ensuite additionnée d'un volume du réactif alcalin.

C - DOSAGE DES PROTEINES

Celui-ci est effectué selon la méthode de LOWRY <u>et al</u> (56) en utilisant la <u>sérum</u> albumine bovine comme référence.

Dans le cas des préparations d'**¤**-L fucosidase purifiée, la la quantité de protéine est déterminée selon la méthode de BRADFORD (57). A 0,8ml d'échantillon sont additionnés 0,2ml de réactif "Biorad". Après 15mn, la densité optique est mesurée à 595 nm contre un témoin. La quantité de protéine est calculée par rapport à une courbe étalon de sérum albumine bovine "Biorad".

D - ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

1) électrophorèse en milieu non dénaturant

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée dans un gel à 5% d'acrylamide (plaque de 0,5 mm d'épaisseur et de 13 cm de longueur) contenant du tampon phosphate 0,2M, pH7,4.

Après 36 heures de migration à 20°C (tampon phosphate 10mM, pH7,4; 5mA), le gel est coloré par le bleu de coomassie à 0,02% dans l'isopropanol 25%-acide acétique 10% puis décoloré par de l'acide acétique à 10%.

Pour la mesure de l'activité, le gel est découpé en tranches de 1mm qui sont ensuite incubées dans la solution de substrat. La réaction est arrêtée par un volume de réactif alcalin.

2) Electrophorèses en milieu dénaturant

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est effectuée selon la méthode de LAEMMLI (40). Des gels de 1mm d'épaisseur (15cm X 15cm, 16 dépots) sont utilisés. Le gel de séparation est généralement constitué d'un gel homogène à 12,5% d'acrylamide. Le gel de concentration contient 5% d'acrylamide. La protéine est traitée 5mn au bain marie bouillant dans le tampon d'échantillon Tris-HCL 62,5mM, pH6,8, SDS 2%, **B**-mercaptoéthanol 5%, saccharose 10%.

- 53 -

Après 15-20 heures de migration (6-8mA), les gels sont colorés

54 -

soit :

- par l'argent après oxydation par le bichromate de potassium selon la méthode de MERRIL et al (58).
- par le bleu de coomassie à 0,02 % dans l'isopropanol 25 %-acide acétique 10 % pendant 2 heures sous agitation constante, puis décolorés par l'acide acétique à 10 % avant d'être sechés sous vide sur papier Whatman III.

Dans le cas particulier d'une seconde analyse, les bandes sont excisées du gel décoloré, seché ou non **puis** lavées sur de l'eau. Celles-ci sont ensuite équilibrées sur 50 µl du tampon d'échantillon et chauffées 5 mn à 100°C. L'analyse est ensuite réalisée comme il est décrit précèdemment.

- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée est réalisée selon la méthode de DAVIS (39). Un gel de 1 mm d'épaisseur (15 cm X 15 cm) est utilisé. Le gel de séparation est constitué d'acrylamide à 10 % contenant 0,375M Tris-HCL, pH8,7, 8M urée et le gel de concentration par de l'acrylamide à 2,5 % contenant 31,25mM Tris-HCL, pH8,7, 8M urée.

Après 16-20 heures de migration (tampon Tris 0,025M, glycine 0,192M pH8,3; 6-8mA), le gel est coloré par le bleu de coomassie à 0,02% dans l'isopropanol 25 %-acide acétique 10 % puis décoloré par l'acide acétique à 10 %.

E - REDUCTION ET ALKYLATION DE L'X-L FUCOSIDASE

Une partie aliquote de la solution d'enzyme (20 g de protéine) est additionnée de 0,6 ml de tampon Te-HCL 0,7M, pH8,4, 7M chlorure de guanidine 0,12 M B-mercaptoéthanol avant d'être chauffée 2 heures à 40°C. Elle est ensuite alkylée par l'addition de 50 µl d'une solution d'acide iodoacétique à 2,68g/ml de NaOH N, le pH étant maintenu à 8 par l'addition de NaOH N. Après 15 minutes, la protéine réduite et alkylée est dialysée sur de l'eau, puis lyophilisée avant d'être solubilisée dans le tampon d'échantillon de LAEMMLI.

F - ELECTROFOCALISATION

1) électrofocalisation en milieu non dénaturant

- en veine liquide

L'électrofocalisation est réalisée dans une colonne LKB n°8101 (110ml). 1% d'ampholines (pH3,5-10) sont utilisées dans un gradient de saccharose. La solution d'enzyme est introduite dans la colonne avec la solution de saccharose.

Après 48 heures de migration (400 V) à 4°C, le gradient de saccharose est fractionné. Le volume des fractions collectées est de 1ml. Le pH de chaque fraction est mesuré et l'activité enzymatique est déterminée comme il est décrit dans le paragraphe "Détermination de l'activité enzymatique".

- en gel de polyacrylamide

L'électrofocalisation est réalisée dans des tubes de verre de 2,7 mm de diamètre et de 14 cm de longueur. Le gel est constitué d'acrylamide à 3,8% contenant 4% de NP40 et 2% d'ampholines (pH5-7). La solution d'enzyme est introduite dans les tubes avec la solution d'acrylamide. L'électrofocalisation est conduite à un voltage constant de 700 V pendant 17 heures à 4°C (solution d'éthylène diamine à 5% à l'anode et d'acide phosphorique à 5% à la cathode).

Après la migration, le gel est coloré par le bleu de coomassie à 0,02% dans une solution isopropanol 25%, acide acétique 10% puis décoloré sur l'acide acétique à 10%.

Pour la mesure de l'activité, le gel est congelé puis découpé en tranches de 1 mm qui sont ensuite incubées dans la solution de substrat.

2) électrofocalisation en milieu dénaturant

L'électrofocalisation en milieu dénaturant est réalisée dans des tubes de verre (diamètre intérieur : 2,7 mm, hauteur : 14 cm) selon la méthode d'O'FARREL (42). Des gels de polyacrylamide sont utilisés, contenant 3,8 % d'acrylamide, 9,5 M urée, 4 % NP40 et 2 % d'ampholines (1,6 % ampholines pH5-7-0,4 % ampholines pH3,5-10). Les échantillons, préalablement lyophilisés, sont repris par 50 μ l du tampon 9,5 M urée, 4 % NP40, 5% 8-mercaptoéthanol, 2 % ampholines.

L'électrofocalisation est réalisée à 400 V pendant 16 heures puis à 800 V pendant une heure à 28°C. Après la migration, les gels sont - 55 -

colorés par le bleu de coomassie.

Pour une analyse bidimensionnelle, les gels sont équilibrés une heure, sous agitation constante, sur 20 ml du tampon 62,5 mM Tris, pH6,8 2,3 % SDS, 10 % glycerol puis déposés, dans de l'agarose à 1 % dans le même tampon, sur un gel de polyacrylamide-SDS. L'électrophorèse est réalisée selon la méthode de LAEMMLI (40). - 56 -

Dans le cas particulier du traitement à la neuraminidase, l'**X**-L fucosidase (22 μ g de protéine) est reprise par 20 μ l du tampon 10 mM EDTA pH5. Après addition de 810⁻⁴ U de neuraminidase (de <u>clostridium perfringens</u>), l'enzyme est incubée 1 heure à 37°C. Après une nouvelle addition de neuraminidase suivie, comme précèdemment d'une incubation d'une heure à 37°C, l'échantillon est congelé puis lyophilisé. L'analyse "bidimensionnelle" est alors réalisée comme il est décrit plus haut.

G - CHROMATOFOCALISATION

La chromatofocalisation de l' \bigwedge -L fucosidase est réalisée sur le gel "polybuffer exchanger PBE 94" (14 ml de gel, colonne de 1 cm de diamètre) conformèment aux instructions données par Pharmacia Fine Chemicals. Le gel est stabilisé par 15 volumes du tampon 0,025 M Imidazole-HCL, pH 7,4 (tampon I). Après passage de 3 volumes du tampon "polybuffer 74", pH 4 dilué au huitième (tampon II), l' \propto -L fucosidase (100 µg de protéine) est déposée dans un volume de 2,5 ml du tampon I. L'enzyme est ensuite éluée par 160 ml du tampon II, des fractions de 1 ml étant collectées.

La mesure du pH est réalisée sur toutes les fractions ainsi que la mesure de l'activité enzymatique comme il est décrit dans le paragraphe "détermination de l'activité enzymatique".

H - CARTES PEPTIDIQUES

1) cartes peptidiques "monodimensionnelles"

Les cartes peptidiques monodimensionnelles sont préparées selon la méthode de CLEVELAND <u>et al</u> (50). Des bandes de gel, contenant 2 à 4 μ g de protéine, sont excisées d'un gel de polyacrylamide-SDS après coloration par le bleu de coomassie et décoloration par l'acide acétique à 10 %. Ces bandes sont rincées par de l'eau puis séchées sous-vide. Après rehydratation dans un tampon Tris-HCL 0,125 M, pH6,8, SDS 0,1%, saccharose 20 %, celles-ci sont placées dans les dents d'un gel de polyacrylamide-SDS à 15 % d'acrylamide selon la méthode de LAEMMLI (40), et recouvertes d'une partie aliquote de protease V8 (10 μ g de protéine) dans le même tampon 10 % saccharose. L'électrophorèse est ensuite réalisée normalement, excepté le fait que celle-ci est interrompue 30 minutes quand le front de migration atteint le bas du gel de concentration pour permettre la protéolyse.

Après 5-6 heures de migration (25 mA), le gel est coloré par l'argent selon la méthode de MERRIL et al (58).

2) cartes peptidiques "bidimensionnelles"

Les cartes peptidiques bidimensionnelles sont préparées selon la méthode de ELDER <u>et al</u> (52) modifiée comme suit. Des bandes de gel, excisées d'un gel de polyacrylamide-SDS séché sous vide sur papier Whatman III, sont rehydratées dans 10 l de tampon phosphate 0,25M, pH 7,5, contenant 0,25 mCi Na ¹²⁵I. Après 30 minutes, 150 µl de tampon phosphate 0,25M, pH7,5, sont additionnés et les protéines sont iodées dans les tranches de gel par la méthode de GREENWOOD <u>et al</u> (59). La réaction est alors arrêtée par l'addition de 50 l d'une solution de tyrosine saturée et les tranches de gel <u>sont</u> lavées sur du méthanol à 10%, puis sur de l'eau.

L' ¹²⁵ libre résiduelle est éliminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des protéines insolubilisées dans les tranches de gel (gel à 12,5 % d'acrylamide selon la méthode de LAEMMLI). Les protéines marquées à l' ¹²⁵I sont visualisées par autoradiographie sur papier X OMAT AR (KODAK) et les bandes de gel correspondantes sont excisées. Celles-ci sont \div ensuite découpées en tranches fines et incubées 6 heures à 37°C dans 0,2 ml d'une solution à 50 µg/ml de TPCK-trypsine dans le bicarbonate d'ammonium 0,05M, pH8. Après une seconde addition de la solution de trypsine, l'incubation est prolongée de 18 heures. Les peptides marqués à 1¹²⁵I i issus de l'hydrolyse trypsique sont concentrés par lyophilisation du surnageant obtenu (80 à 90 % de la radioactivité avant hydrolyse) et repris dans le tampon d'électrophorèse (acide acétique-acide formique-eau: 15-5-80).

Des parties aliquotes $(2 \ a \ 5 \ \mu 1)$ contenant 1,5 $a \ 3 \ 10^5$ cpm sont déposées sur couche mince de cellulose (20 X 20 cm, Merck) et soumises à une électrophorèse de une heure à 1 300 V et à une chromatographie dans la deuxième dimension sur un tampon butanol, pyridine acide acétique, eau (32: 25 : 5 : 20). - 57 -

Les couches minces séchées sont mises en contact le papier KODAK pendant 3 à 7 jours à -70°C en présence d'écrans renforcateurs Cronex (Dupont De Nemours and Co.) selon la méthode de SWANSTROM et SHANK (60). - 58 -

I - Produits utilisés

L'acrylamide, le SDS et le NP40 sont des produits B.D.H. Le bisacrylamide est un produit de l'Eastman Organic Chemicals.

L'urée provient de chez Biorad et les ampholines de L.K.B.

L'agarose-**E**-aminocaproyl fucosylamine et la protéase V8 sont des produits de chez MILES et la T.P.C.K. trypsine est un produit WORTHINGTON.

Le paranitrophényl -L fucopyrannoside provient de chez Koch Light Laboratories.

Le Na ¹²⁵I sans entraineur est un produit du Radiochemical Centre (Amersham, England).

BIBLIOGRAPHIE

1. - DISSOUS, C., VERWAERDE, C., LEMPEREUX, C., KREMBEL, J. (1978) Eur. J. Biochem., 83, 5-15 2 - DISSOUS, C., LEMPEREUR, C., VERWAERDE, C., KREMBEL, J. (1978) Eur. J. Biochem., 83, 17-27 3 - VAN HOFF, F. (1973) Lysosomes and Storage Diseases (Hers, H.G., VAN HOFF, F., Eds) Academic Press, New York, p. 277-290 4 - DAWSON, G., TSAY, G. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 18H, 12-23 5 - VAN HOFF, F., HERS, H.G. (1968) Eur. J. Biochem., 7, 34-44 6 - CARLSEN, R.B., PIERCE, J.G. (1972) J. Biol. Chem., 247, 23-32 7 - WIERDERSCHAIN, G.Y., ROSENFELD, E.L. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1008-1014 8 - BOSMANN, H.B., HEMSWORTH, B.A. (1971) Biochem. Biophys. Acta., 242, 152-171 9 - WIEDERSCHAIN, G.Y., KOLIGABA, L.G., ROSENFELD, E.L. (1973) Clin. Chim. Acta., 46, 305-310 10 - ALHADEFF, J.A., MILLER, A.L., O'BRIEN, J.S. (1974) Anal. Biochem., 60, 424-430 11 - ROBINSON, D., THORPE, R. (1974) FEBS lett., 45, 191-193 12 - ALHADEFF, J.A., MILLER, A.L., WENAAS, H., VEDVICK, T., O'BRIEN, J.S. (1975) J. Biol. Chem., 250, 7106-7113 13 - ALHADEFF, J.A., ANDREWS-SMITH, G.L. (1980) Biochem. Biophys. Acta., 614, 466-475 14 - CHIEN, S.F., DAWSON, G. (1980) Biochem. Biophys. Acta., <u>614</u>, 476-488 15 - OPHEIM, D.J., TOUSTER, O. (1977) J. Biol. Chem., 252, 739-743 16 - DI MATTED, G., ORFED, M.A., ROMEO, G. (1976) Biochem. Biophys. Acta., 429, 527-537 17 - ROBINSON, D., THORPE, R. (1974) Clin. Chim. Acta., 55, 65-69 18 - ALHADEFF, J.A., FREEZE, H. (1977) Mol. Cell. Biochem., 18, 33-37

19 - ANDREWS, P. (1965) Biochem. J., 96, 595-606 20 - ALHADEFF, J.A. (1978) Biochem. J., 173, 315-319 21 - THORPE, R., ROBINSON, D. (1978) Clin. Chim. Acta., 86, 21-30 22 - ALHADEFF, J.A., JANOWSKY, A.J. (1978) Clin. Chim. Acta., 82, 133-140 23 - TURNER, B.M. (1979) Biochem. Biophys. Acta., 578, 325-336 24 - GROVE, D.S., SERIF, G.S. (1981) Biochem. Biophys. Acta, 662, 246-255 25 - ALAM, T., BALASUBRAMANIAN, A.S. (1978) Biochem. Biophys. Acta., 524, 373-384 26 - ALHADEFF, J.A., ANDREWS-SMITH, G.L. (1979) Biochem. J., 177, 753-756 27 - KRESS, B.C., FREEZE, H.H., HERD; J.K., ALHADEFF, J.A., MILLER, A.L. (1980) J. Biol. Chem., 255, 955-961 28 - WRIGHT, K., NORTHCOTE, D.H., DAVEY, R.M. (1976) Carbohyd. Res., 47, 141-150 29 - ROBINSON, D., THORPE, R. (1973) Clin. Chim. Acta., 47, 403-407 30 - CHESTER, M.A., HULTBERG, B., SJOBLAD, S. (1977) Biochem. Biophys. Acta., 485, 147-155 31 - ALHADEFF, J.A., MILLER, A.L., WENGER, D.A., O'BRIEN, J.S. (1974) Clin. Chim. Acta., 57, 307-313 32 - TURNER, B.M., BERATIS, N.G., TURNER, V.S., HIRSCHHORN, K. (1974) Clin. Chim. Acta., 57, 29-35 33 - THORPE, R., ROBINSON, D. (1975) FEBS Lett., 54, 89-92 34 - DIMATTEO, G., DURAND, P., GATTI, R., MARESCA, A., ORFEO, M., URBANO, F., ROMEO, G. (1976) Biochem. Blophys. Acta., 429, 538-545 35 - ALHADEFF, J.A., CIMINO, G., JANOWSKY, A. (1978) Mol. Cell. Biochem., 19, 171-179 36 - ALHADEFF, J.A., ANDREWS-SMITH, L. (1980) Biochem. J., 187, 45-51

37 - DISSOUS, C. (1979) Thèse de Doctorat d'Etat, Université de LILLE I. 38 - NEEDLEMAN, S.B., KOENIG, H. (1974) biochem. Biophys. Acta., 379, 43-56 39 - DAVIS, B.J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 40 - LAEMMLI, U.K. (1970) Nature, 227, 680-685 41 - WEBER, K., OSBORN, M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406-4412 42 - O'FARREL, P.H. (1975) J. Biol. Chem., 250, 4007-4021 43 - LEACH, B.S., COLLAWN, J.F., FISH, W.W. (1980) Biochemistry, 19, 5734-5741 44 - SLUYTEMAN, L.A., ELGERSMA, O. (1978) J. Chromatogr., 150, 17-30 45 - SLUYTERMAN, L.A., WIJDENES, J. (1978) J. Chromatogr., 150, 31-44 46 - BRYANT, M.L., NALEWAIK, R.P., TIBBS, V.L., TODARO, G.J. (1979) Anal. Biochem., 96, 84-89 47 - SPRAGUE, J., ERON, L.J., SEIFRIED, A.S., NILSTIEN, J.B. (1979) J. Virology, 32, 688-691 48 - SAHEKI, S., SAHEKI, K., TANAKA, T. (1978) FEBS Lett., 93, 25-28 49 - KAO, W.W., FOREMAN, C.A. (1980) Eur. J. Biochem., 106, 41-48 50 - CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W., LAEMMLI, U.K., (1977) J. Biol. Chem., 252, 1102-1106 51 - HOUMARD, J., DRAPEAU, G.R. (1972) Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A., 69, 3506-3509 52 - ELDER, J.H., JENSEN, F.C., BRYANT, M.L., LERNER, R.A. (1977) Nature, 266, 23-27 53 - SAIRAN, M.R. (1980) Arch. Biochem. Biophys., 204, 199-206 54 - CHU, F.K., MALEY, F., TARENTINO, A.L. (1981) Anal. Biochem., 116, 152-160

55 - DELPLACE, P. Thèse de 3ème Cycle, en préparation
56 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem., <u>193</u>, 265-275
57 - BRADFORD, M.M. (1976) Anal. Biochem., <u>72</u>, 248
58 - MERRIL, C.R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S.A., EBERT, M.H. (1981) Science, <u>211</u>, 1437-1438
59 - GREENWOOD, F.C., HUNTER, M., GLOVER, J.S. (1963) Biochem. J., <u>89</u>, 114-123
60 - SWANSTROM, R., SHANK, P.R. (1978) Anal. Biochem., <u>86</u>, 184-192

RESUME

Plusieurs formes isoenzymatiques et une dizaine de sous-unités de points isoélectriques et de poids moléculaires différents sont séparées par électrofocalisation et électrophorèse bidimensionnelle de l'-L-fucosidase lysosomale du foie de rat. L'étude de la répartition de ces sous-unités dans les formes isoenzymatiques de l' α -L-fucosidase montre que chaque isoenzyme est composée de trois sous-unités de pI différents, l'une d'entre elles devant être en double exemplaire.

Les résultats de l'action de la neuraminidase sur l'enzyme et de l'analyse des cartes peptidiques de ces sous-unités démontrent en partie que l'hétérogénéité des sous-unités de l'a-L-fucosidase est liée à un degré différent de glycosylation d'une même chaîne polypeptidique.

MOTS CLEFS

- α-L-fucosidase. Foie. Rat. Sous-unités
- Isoenzyme. Sous-unités. Cartes peptidiques. α -L-fucosidase
- Sous-unité. Isoenzymes. α-L-fucosidase.

