

50376
1983
189

N° d'ordre : 1130

50376
1983
189

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Ossarath KOL



**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
ENDO-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASES : PURIFICATION
ET SPECIFICITE D'UNE ENZYME ISOLEE DE
*SPOROTRICUM DIMORPHOSPORUM***

Présenté le 1er Décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	S. BOUQUELET
Examineur :	G. SPIK

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

Je tiens à remercier :

- M. MONTREUIL pour m'avoir accueilli dans son laboratoire .
 - Mlle SPIK pour m' avoir donné les produits qui sont indispensables à la réalisation de ce travail .
 - M. BOUQUELET qui m' a dirigé tout au long de ce travail .
 - M. STRECKER pour les produits précieux qu'il m'a donnés .
 - MM. EL BATTARI et KARAMANOS pour leur amitié et les discussions qui me sont très utiles .
 - M. LEROY pour ses conseils en H.P.L.C.
 - Mme CELEN pour les travaux photo et photocopies .
- Tout le monde du 207 et de tout le C9 pour leur amitié et leur gentillesse .

A B R E V I A T I O N S

Asn	:	Asparagine
ASTF	:	Asialo-sérotransferrine
Con. A	:	Concanavaline A
Endo	:	Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase
Fuc	:	Fucose
Gal	:	Galactose
Gal-ase	:	Galactosidase
GlcNAc	:	N-acétylglucosamine
GlcNAc-ase	:	N-acétylglucosaminidase
GM ₁	:	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc)
H.A.	:	Hydroxyapatite
H.P.L.C.	:	Chromatographie liquide haute performance
LTB	:	Lactotransferrine bovine
Man	:	Mannose
Man-ase	:	Mannosidase
NeuAc	:	Acide N-acétylneuraminique
pNP	:	Para nitrophényl
Ser	:	Sérine
Thr	:	Thréonine
Xyl	:	Xylose

INTRODUCTION	p.	1
GENERALITES	p.	3
I - LES GLYCOPROTEINES	p.	3
A - LES O-GLYCOSYL PROTEINES	p.	4
B - LES N-GLYCOSYL PROTEINES	p.	4
1 - N-glycosyl protéines de type N-acétyllactosaminique	p.	7
2 - N-glycosyl protéines de type oligomannosidique	p.	7
3 - N-glycosyl protéines de type mixte	p.	12
4 - Structure des glycopeptides de l'ovalbumine	p.	13
C - CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES	p.	17
II - LES ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASES	p.	20
A - DEFINITION	p.	20
B - CHEZ LES MICROORGANISMES	p.	20
1 - <u>Diplococcus pneumoniae</u>	p.	20
2 - <u>Streptomyces griseus</u> - <u>streptomyces plicatus</u>	p.	24
a) L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H	p.	24
b) L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase L	p.	26
3 - <u>Clostridium perfringens</u>	p.	29
a) L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C _I	p.	29
b) L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C _{II}	p.	30
4 - <u>Bacillus circulans</u>	p.	31
5 - <u>Flavobacterium meningosepticum</u>	p.	31
C - CHEZ LES VEGETAUX	p.	33
1 - Extrait de figue	p.	33
2 - Sève de figuier	p.	33
D - CHEZ LES ANIMAUX	p.	34
1 - Foie de porc	p.	34

2 - Oviducte de poule	p.	34
3 - Foie de rat	p.	35
4 - Tissus humains	p.	36
E - CONCLUSION	p.	36
M A T E R I E L E T M E T H O D E S	p.	40
M A T E R I E L	p.	40
I - PRODUITS RADIOACTIFS	p.	40
II - SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE	p.	40
III - SUBSTRATS	p.	41
A - SUBSTRATS SYNTHETIQUES	p.	41
B - SUBSTRATS NATURELS	p.	41
1 - Glycoprotéines	p.	41
2 - Glycopeptides	p.	41
3 - Oligosaccharides	p.	42
IV - ENZYMES	p.	44
V - AUTRES MATERIELS	p.	44
M E T H O D E S	p.	45
I - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	p.	45
A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HYDROXYAPATITE-ULTROGEL ...	p.	45
B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-TRISACRYL M	p.	45
C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE BIOGEL-AGAROSE A 0.5 M ...	p.	45
D - ISOELECTROFOCALISATION EN VEINE LIQUIDE	p.	46
E - CHROMATOFOCALISATION	p.	47
F - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	p.	48
G - CHROMATOGRAPHIE SUR CONCANAVALINE A	p.	49
H - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER	p.	49
I - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	p.	50
J - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	p.	50

II PREPARATION DES SUBSTRATS RADIOACTIFS	p.	51
A - MARQUAGE PAR N-ACETYLATION	p.	51
B - MARQUAGE A LA GALACTOSE-OXYDASE ET REDUCTION AU BOROHYDRURE DE POTASSIUM TRITIE	p.	52
C - MARQUAGE A L'IODE [^{125}I]	p.	54
III - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	p.	55
A - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES PROTEASIQUES	p.	55
1 - Méthode de CHIBA	p.	55
2 - Hydrolyse des protéines marquées à l'iode 125	p.	55
3 - Hydrolyse des protéines non marquées	p.	56
B - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES NEURAMINIDASIQUES	p.	56
C - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES GALACTOSIDASIQUES	p.	57
1 - Hydrolyse de pNP-Gal	p.	57
2 - Hydrolyse des substrats marqués sur le galactose	p.	57
3 - Hydrolyse des oligosaccharides non radioactifs	p.	58
D - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES MANNOSIDASIQUES ET N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUES	p.	59
E - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENDO-N-ACETYL- β -D- GLUCOSAMINIDASIQUES	p.	59
1 - Hydrolyse des glycopeptides	p.	59
a) Hydrolyse analytique	p.	59
b) Hydrolyse préparative	p.	60
2 - Hydrolyse des glycoprotéines	p.	60
a) Hydrolyse de l'ovalbumine	p.	60
b) Hydrolyse de la lactotransferrine bovine	p.	61
IV - ACTION DES EXOGLYCOSIDASES	p.	61
A - ACTION DE LA GALACTOSIDASE	p.	62
B - ACTION DE LA N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE	p.	62

V - DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENZYME	p.	62
A - STABILITE A LA TEMPERATURE	p.	62
B - STABILITE AU PH	p.	63
C - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE	p.	63
R E S U L T A T S	p.	64
I - PURIFICATION DE L'ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE	p.	64
A - MOUT DE FERMENTATION	p.	64
B - ULTRAFILTRATION	p.	64
C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HYDROXYAPATITE-ULTRAGEL	p.	66
D - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-TRISACRYL M	p.	68
E - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE BIOGEL-AGAROSE A 0.5 M ...	p.	68
F - TENTATIVE DE SEPARATION DES DEUX ACTIVITES ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASIQUES	p.	71
1 - Chromatofocalisation	p.	71
2 - Isoélectrofocalisation en veine liquide	p.	71
3 - Chromatographie d'affinité	p.	74
G - DISCUSSION SUR LA PURIFICATION DE L'ENZYME	p.	77
II - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES CONTAMINANTES ...	p.	80
A - ACTIVITES PROTEASIQUES	p.	80
B - ACTIVITES NEURAMINIDASIQUES	p.	80
C - ACTIVITES GALACTOSIDASIQUES	p.	82
D - ACTIVITES N-ACETYLGLUCOSAMINIDASIQUES	p.	82
E - ACTIVITES MANNOSIDASIQUES	p.	85
F - DISCUSSION SUR LA PURETE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE ..	p.	89
III - DETERMINATION DES PROPRIETES ENZYMATIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES	p.	90
A - PROPRIETES ENZYMATIQUES	p.	90
1 - pH optimum	p.	90

2 - Température optimale	p.	90
3 - Paramètres cinétiques : Km et Vmax	p.	93
B - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p.	93
1 - Masse moléculaire	p.	93
2 - p <i>H</i> _i	p.	96
3 - Stabilité	p.	96
a) Stabilité au pH	p.	96
b) Stabilité à la température	p.	96
c) Stabilité au stockage	p.	99
C - DISCUSSION SUR LES PROPRIETES ENZYMATIQUES ET PHYSICO- CHIMIQUES	p.	100
IV - SPECIFICITE	p.	103
A - SPECIFICITE SUR LES SUBSTRATS DE TYPE N-ACETYL- LACTOSAMINIQUE	p.	103
1 - Glycopeptides et oligosaccharides	p.	103
2 - Glycoprotéines	p.	105
3 - Conclusion	p.	105
B - SPECIFICITE SUR LES SUBSTRATS DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE ET DE TYPE MIXTE	p.	106
1 - Hydrolyse d'un mélange de glycopeptides de la lactotransferrine bovine	p.	106
2 - Hydrolyse d'un mélange de glycopeptides de l'ovalbumine	p.	106
3 - Hydrolyse des glycopeptides de l'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2	p.	110
a) Hydrolyse des glycopeptides N-acétylés [¹⁴ C]	p.	111
b) Détermination de la nature des oligosaccharides libérés par chromatographie sur couche mince	p.	113

c) Analyse des produits d'hydrolyse par H.P.L.C.	p.	117
4 - Hydrolyse des glycoprotéines	p.	130
a) Hydrolyse de l'ovalbumine native	p.	130
b) Hydrolyse de la lactotransferrine bovine .	p.	132
C - DISCUSSION SUR LA SPECIFICITE	p.	136
1 - Spécificité sur les glycopeptides de type N-acétyl- lactosaminique	p.	136
2 - Spécificité sur les glycopeptides de type oligo- mannosidique et mixte	p.	137
3 - Spécificité sur les protéines	p.	138
V - Y-A-T'IL UNE OU DEUX ENZYMES	p.	141
CONCLUSION GENERALE	p.	144
BIBLIOGRAPHIE	p.	148

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

Les récents progrès en biologie cellulaire, ont démontré que la partie glycanique de certains glycoconjugués, jouaient un rôle clef, par exemple dans les mécanismes de reconnaissance . Ces progrès n'ont pu être réalisés que grâce à l'amélioration des techniques permettant la déglycosylation de ces molécules .

Pendant longtemps, les méthodes de déglycosylation furent des méthodes chimiques (hydrazinolyse par exemple) . Mais ces méthodes sont drastiques puisqu'elles détruisent la partie protéique, ne permettant l'étude que de la partie glycanique de la molécule .

L'introduction des méthodes enzymatiques de déglycosylation, ouvre une ère nouvelle dans l'étude des glycoconjugués .

Les premières enzymes utilisées sont les exoglycosidases (46), qui dégradent la copule glycanique d'une façon récurrente, et spécifiquement selon la nature et l'anométrie des monosaccharides .

D'autres enzymes furent ensuite introduites, comme les endo- β -D-mannanases (78), les endo- β -D-galactosidases (109, 27, 76), les endo-N-acétyl- β -D-galactosaminidases (22, 127), les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases (47, 111, 37, 13, 84, 117, 119, 92, 94, 95), et récemment les N-peptidases (107, 108, 120), qui libèrent les parties glycanique et protéique intactes .

L'utilisation de ces enzymes, nécessite une connaissance parfaite de leurs propriétés physico-chimiques et de leur spécificité .

La recherche des activités glycosidasiques dans le moût de fermentation du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum, fourni par la Société

La Rapidase, nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, active à la fois sur le mélange des glycopeptides de l'ovalbumine (structures de type oligomannosidique et mixte) et sur les glycopeptides de la sérotransferrine (structures de type N-acétyllactosaminique) .

L'introduction de cette enzyme au laboratoire, représente un outil très intéressant pour l'étude des glycoprotéines, aussi bien sur le plan structural que sur le plan biologique .

Nous avons donc entrepris sa purification, la détermination de ses propriétés physico-chimiques, et l'étude de sa spécificité . Les résultats que nous avons obtenus font l'objet de ce mémoire .

L'exposé de ces travaux sera précédé de généralités concernant la structure des glycoprotéines et la spécificité des différentes endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases décrites à ce jour dans la littérature .

GENERALITES

I - LES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines résultent de l'association par des liaisons covalentes, de protéines avec des monosaccharides (GlcNAc, Man, Gal...) plus ou moins conjugués, appelés glycannes . Pendant fort longtemps on leur a attribué un rôle secondaire par rapport à celui des acides nucléiques et des protéines . De ce fait, leur structure n'a été étudiée que très récemment . Cette méconnaissance est aussi due à la grande hétérogénéité des structures et au manque de méthodes fines d'exploration .

Ce n'est qu'à partir des années 68, que les glycoprotéines ont reçu leurs lettres de noblesse grâce à de nombreux travaux, et en particulier ceux réalisés au Laboratoire, qui ont pu démontrer qu'elles jouaient un rôle extrêmement important du point de vue biologique . Cette importance est vérifiée dans certains cas pathologiques (glycoprotéinoses) .

Grâce au développement des méthodologies chimiques, physiques et enzymatiques, la structure d'un grand nombre de glycannes a été déterminée, permettant de classer les glycoprotéines d'origines les plus diverses, animale , végétale , et bactérienne , en un petit nombre de familles au sein desquelles il existe des séquences oligosaccharidiques communes .

La liaison covalente qui relie le glycanne à la protéine peut être de deux types, conduisant à deux grands groupes :

- les O-glycosylprotéines
- les N-glycosylprotéines

A - LES O-GLYCOSYLPROTEINES

Dans ce groupe, la liaison glycanne-protéine est de type O-glycosidique entre un résidu de sérine ou de thréonine, d'une part, et un résidu de xylose, de N-acétylgalactosamine, de mannose, de fucose, ou de galactose d'autre part, ou entre un résidu d'hydroxylysine et un résidu de galactose .

Des exemples de structures de O-glycopeptides sont représentés sur la figure 1, page 5 .

B - LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Dans ce groupe, la liaison glycanne-protéine est de type N-glycosidique . Jusqu'à présent seule l'association entre un résidu d'asparagine et un résidu de N-acétylglucosamine a été caractérisée .

Toutes les N-glycosylprotéines, à quelques exceptions près, possèdent un noyau oligosaccharidique commun . Ce noyau est une séquence pentasaccharidique formée de l'association, par une liaison β -glycosidique d'un mannotriose et d'un résidu de N,N'-diacétylchitobiose, lié lui-même à l'asparagine (fig. 2, page 6) .

Au noyau pentasaccharidique, peuvent venir se greffer des motifs glucidiques qui confèrent aux copules polysaccharidiques, leur particularité . La nature de ces motifs glucidiques permet de classer les N-glycosylprotéines en trois grands types :

- N-acétyllactosaminique
- oligomannosidique
- oligomannosido-N-acétyllactosaminique (ou mixte)

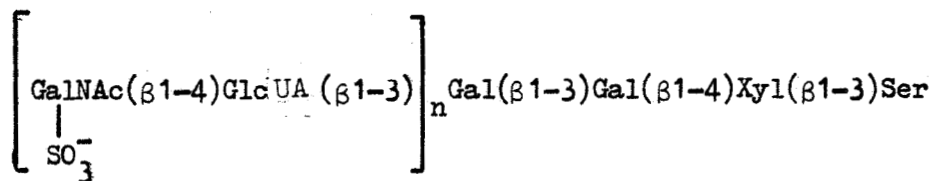


Figure 1 A : Structure du chondroïtine-4-sulfate (59)

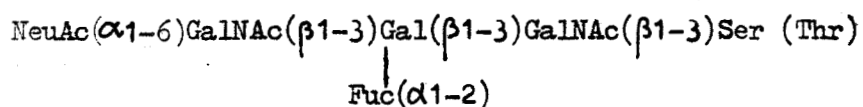


Figure 1 B : Structure du glycopeptide de glande sous
maxillaire de Porc (4)

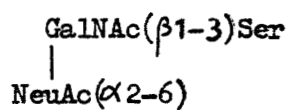


Figure 1 C : Structure du glycopeptide de glande sous
maxillaire de Mouton (5)

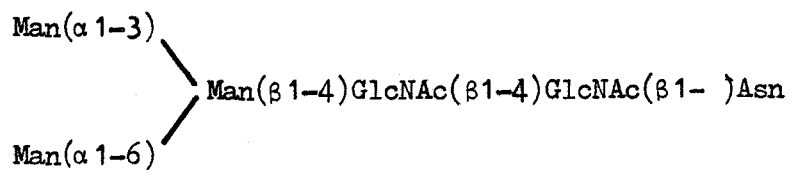


Figure 2 : Noyau pentasaccharidique des N-glycosylprotéines

1 - N-glycosylprotéines de type N-acétyllactosaminique

Dans ce type de N-glycosylprotéines, le noyau pentasaccharidique est substitué par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine, d'acide sialique et de fucose (fig. 3A, p. 8). La substitution par deux résidus de N-acétyllactosamine conduit aux glycanes biantennés . Comme exemples, nous pouvons citer les sérotransferrines : humaine (97) et de lapin (53) et l'orosomucoïde humain (20, 26) .

Les glycanes triantennés sont formés par la substitution de trois résidus de N-acétyllactosamine sur le noyau pentasaccharidique (orosomucoïde humain (20, 26), fétuine (83) virus de la stomatite vésiculaire (91) thyroglobuline de porc (51). La substitution par quatre résidus de N-acétyllactosamine conduit aux glycanes tétraantennés .

Sur la figure 4, page 9 , sont représentées les structures des asialoglycannes bi, tri, et tétraantennés de l'orosomucoïde humain .

2 - N-glycosylprotéines de type oligomannosidique

Les glycanes de cette famille, forment un groupe plus homogène puisqu'ils résultent de la substitution du noyau pentasaccharidique, uniquement par des résidus de mannose (fig. 3B, p. 8) . Toutes les structures semblent dériver d'une structure limite qui renferme neuf résidus de mannose (fig. 5, p. 10), comme dans la lactotransferrine bovine où les glycanes renferment de neuf à cinq résidus de mannose (127) .

Il existe cependant des exceptions, aussi bien dans le nombre de résidus de mannose, que dans la façon dont ils sont enchaînés, par exemple les glycanes de la lectine de soja (61) (fig. 6, p. 10), ou les mannanes de *Saccharomyces cerevisiae* (77), (fig. 7, p. 11) .

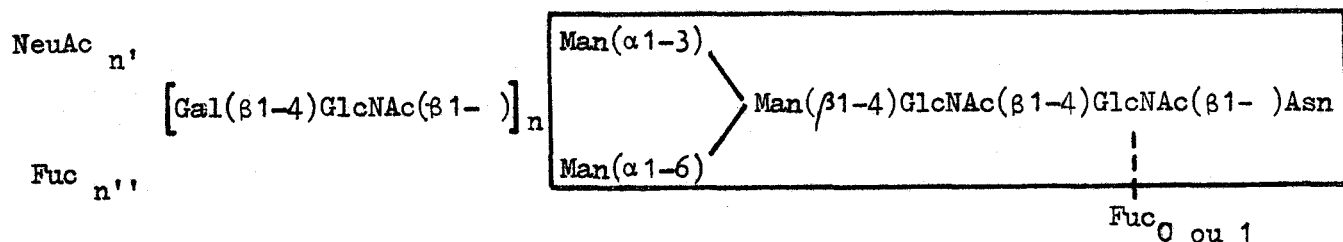


Figure 3A : Schéma général de structure des N-glycosylprotéines de type N-acétyllactosaminique

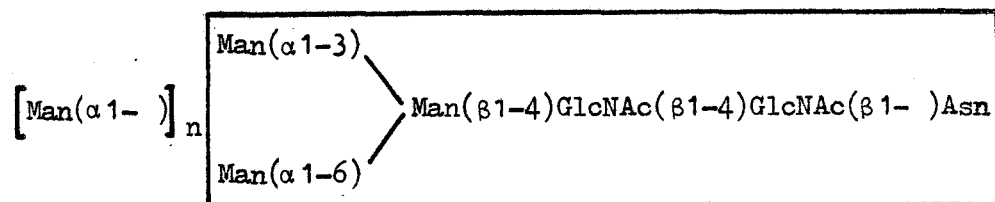


Figure 3B : Schéma général de structure des N-glycosylprotéines de type oligomannosidique



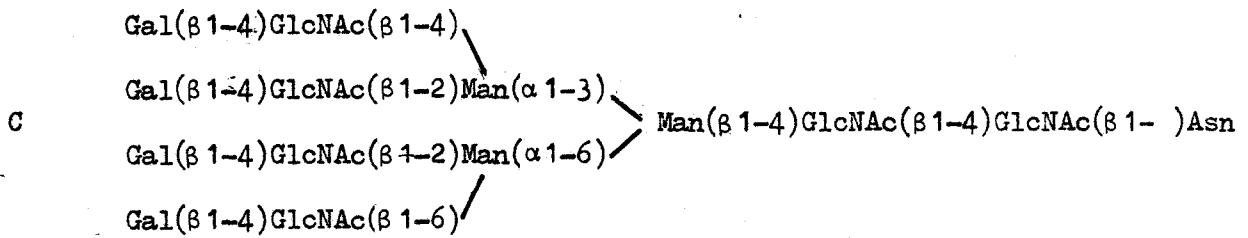
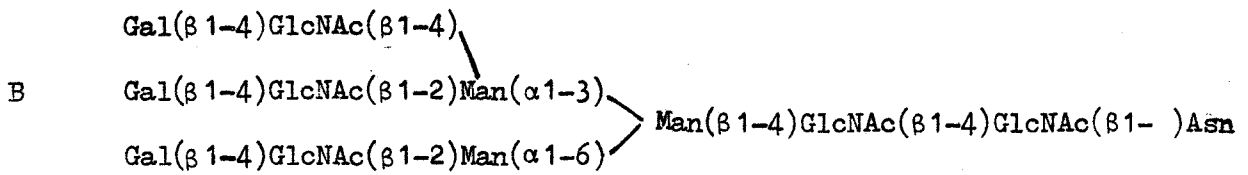
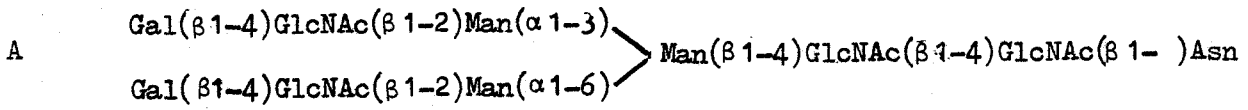


Figure 4 : Structure des asialo-glycannes bi, tri, et tétraantennés de l'orosomucoïde humain (20, 26)



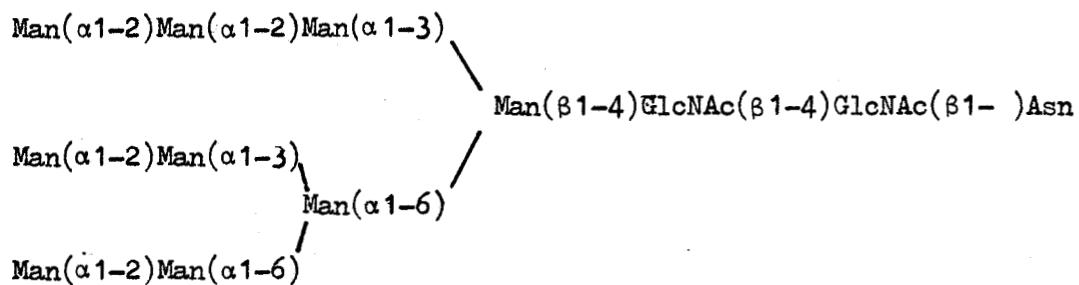


Figure 5 : Structure limite des glycanes de type oligomannosidique

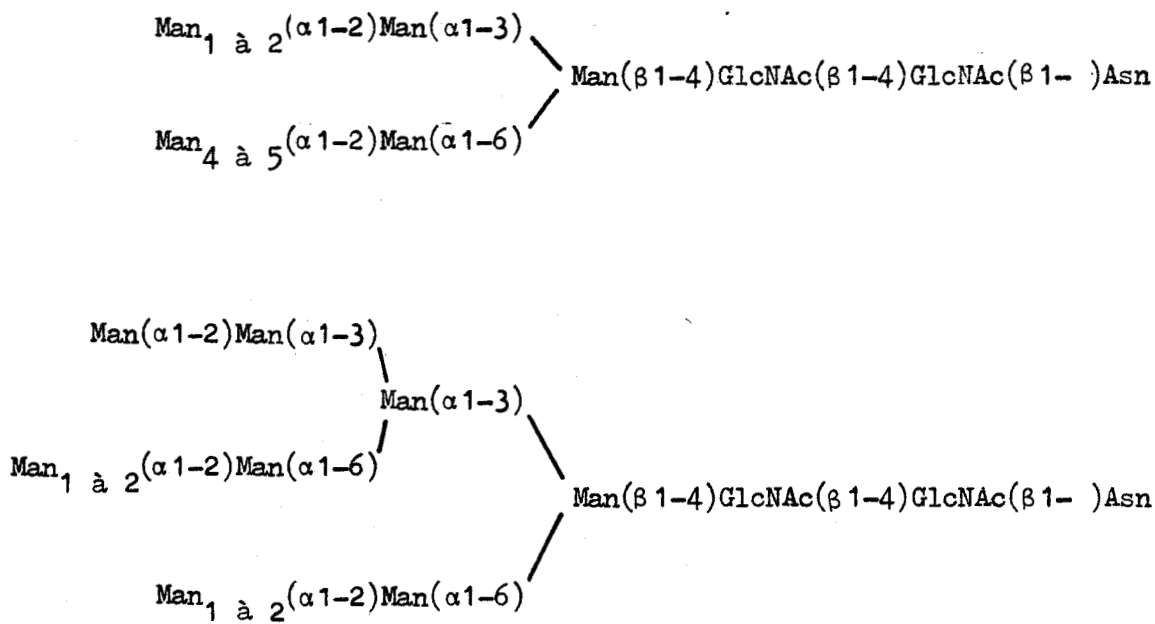


Figure 6 : Structure des glycanes de la lectine de soja (61.)



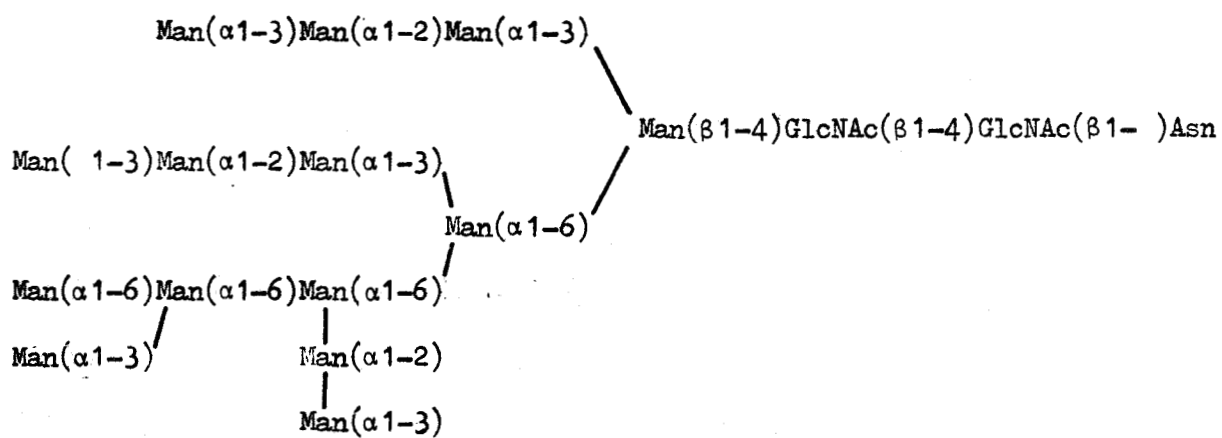


Figure 7 : Structure du mannane isolé de S. cerevisiae (77)



3 - N-glycosylprotéines de type mixte ou oligomannosido-N-acétyllactosaminique

Dans cette famille de N-glycosylprotéines, se trouvent sur le même noyau pentasaccharidique des enchaînements de mannose avec des résidus de N-acétylglucosamine et de N-acétyllactosamine .

Les structures de type oligomannosidique et de type mixte sont bien représentées par les glycanes de l'ovalbumine (35) qui est l'une des glycoprotéines les plus étudiées, et celle que nous avons choisie pour déterminer la spécificité de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase de Basidiomyces, décrite dans ce mémoire .

4 - Structure des glycopeptides de l'ovalbumine

L'isolement d'un glycopeptide à partir d'un hydrolysate tryptique d'albumine d'oeuf a été réalisé en 1938 par NEUBERGER (82) . A la fin des années 50, plusieurs auteurs ont déterminé la nature du point d'attache glycanne-protéine comme étant β GlcNAc-Asn (41, 43, 64, 130) . A l'époque les auteurs pensaient qu'il n'existait qu'un seul glycanne (18) dans l'ovalbumine et proposèrent des structures renfermant, 6 Man pour 3 GlcNAc (85, 42, 25), 4 Man pour 2 GlcNAc (41), 6 Man pour 3 GlcNAc (52), 6 Man pour 4 GlcNAc (31).

Les glycopeptides résultant de l'hydrolyse pepsique (118) ou pronasique (129) montrent une très grande hétérogénéité et peuvent être fractionnés par chromatographie sur résine échangeuse d'ions (85, 44) . En 1970, HUANG et al. (34) ont modifié cette méthode de fractionnement pour améliorer la séparation des fractions et ont obtenu cinq groupes de glycosyl-asparagines de compositions différentes .

Le profil d'élution type obtenu par cette méthode de fractionnement est représenté sur la figure 8, page 14 .

Plusieurs auteurs ont étudié la composition de chacune de ces fractions . Cette étude est rendue plus précise par les méthodes d'analyse modernes comme la R.M.N. (9) . La structure des différents glycopeptides est représentée dans le tableau I .

a) pic A

YAMASHITA et al. (131) n'ont détecté qu'un seul glycopeptide (GP-I) qui renferme du galactose . D'après CARVER et al. (8), cette fraction est sûrement hétérogène avec, cependant un glycopeptide majeur (AC-A₃) qui possède la même structure que GP-I . Ces auteurs n'ont pas donné la structure des autres composés .

b) pic B

Deux glycopeptides de structure mixte, GP-IIA et GP-IIB ont été caractérisés par YAMASHITA et al. (131) . GP-IIB contient du mannose et de la N-acétylglucosamine alors que GP-IIA renferme en plus du galactose . Dans la même fraction, NARASIMHAN et al. (79) ont isolé un glycopeptide semblable à GP-IIB .

c) pic C

Cette fraction est aussi hétérogène et d'après TAI et al. (104) elle renferme trois glycopeptides, GP-IIIA, GP-IIIB, et GP-IIIC . Comme le montre le tableau I, les structures de GP-IIIA et GP-IIIC sont de type mixte, ne renfermant pas de galactose, celle de GP-IIIB est de type oligomannosidique avec sept résidus de mannose . D'autres équipes ont trouvé les mêmes résultats (8, 79, 104, 17, 3) .

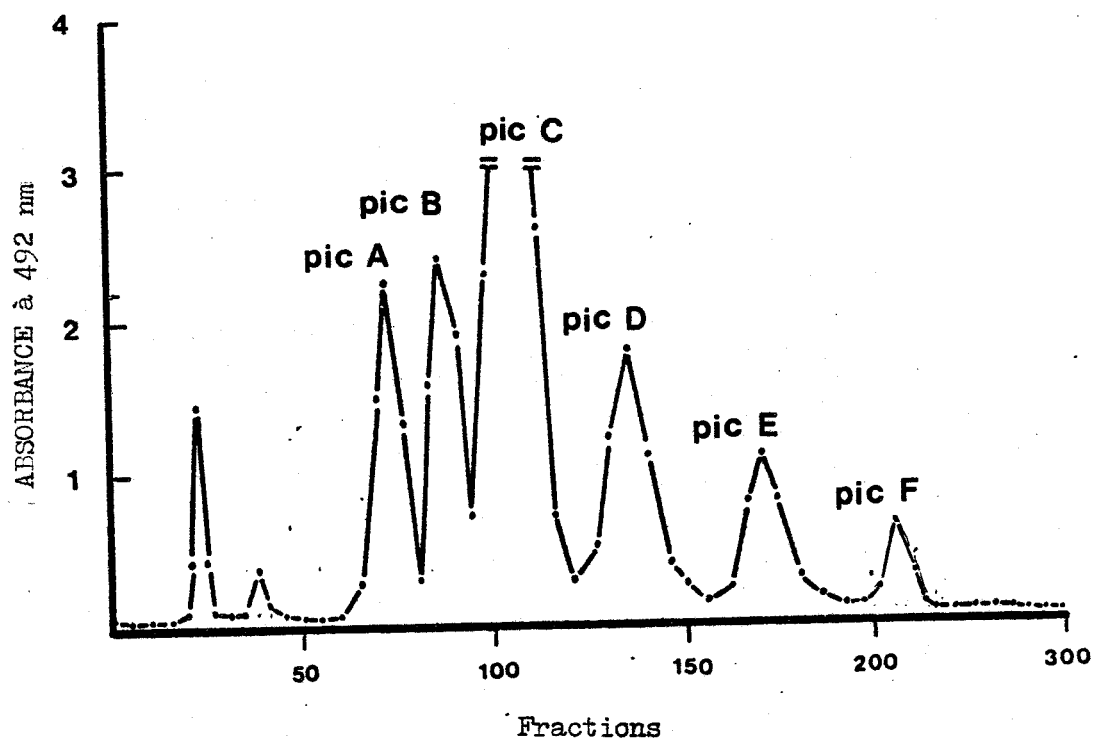


Figure 8 : Profil obtenu lors du fractionnement des glycopeptides de l'ovalbumine par chromatographie sur Dowex 50W x 2 selon la méthode de HUANG et al (34)

Tableau I : Structure des différents glycopeptides de l'ovalbumine, obtenus par fractionnement sur Dowex 50 W x 2 (34) .

Pics	Structures	Noms	Références
A	<p>Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-2) → Man(α1-3) → GlcNAc(β1-4)Man(β1-4)R Man(α1-3) → Man(α1-6) Man(α1-6)</p> <p>2 glycopeptides de structure non déterminée</p>	GP-I AC-A ₃ AC-A ₁ AC-A ₂	131 8 8 8
B	<p>Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-2) → Man(α1-3) → GlcNAc(β1-4)Man(β1-4)R Man(α1-3) — Man(α1-6)</p> <p>GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-2) → Man(α1-3) → GlcNAc(β1-4)Man(β1-4)R Man(α1-3) → Man(α1-6) Man(α1-6)</p>	GP-IIA GP-IIB	131 131, 79
C	<p>GlcNAc(β1-2) — Man(α1-3) → GlcNAc(β1-4)Man(β1-4)R Man(α1-3) → Man(α1-6) Man(α1-6)</p> <p>Man(α1-2) — Man(α1-3) → Man(β1-4)R Man(α1-3) → Man(α1-6) Man(α1-2)Man(α1-6)</p>	AC-C ₂ GP-IIIA AC-C ₁ GP-IIIB	3, 8, 17, 79, 105 3, 8, 17, 79, 105



C (suite)	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \diagup \quad \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-3) - \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \end{array} $	AC-C ₃	3, 8, 17,
		GP-IIIIC	79, 105
	(Man) ₃ (GlcNAc) ₆ Asn	AC-C ₁	3
	(Man) ₃ (GlcNAc) ₅ Asn	AC-C ₁	95
	(Man) ₆ (GlcNAc) ₄ Asn	AC-C ₂	95
D	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2) - \text{Man}(\alpha 1-3) \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \diagdown \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \end{array} $	GP-IV	3, 95,
		AC-D ₂	103
	(Man) ₃ (GlcNAc) ₅ Asn	GnGn(Gn)	79
	(Man) ₄ (GlcNAc) ₄ Asn	AC-D ₁	3, 95
	4 glycopeptides de structure non déterminée		3; 79
E	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \diagup \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \end{array} $	GP-V	3, 95, 103
	2 glycopeptides de structure non déterminée		3
F	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) - \text{Man}(\alpha 1-6) \diagup \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array} $	GP-VI	79, 105
	1 glycopeptide de structure non déterminée		79



Mais d'après ATKINSON et al. (3), il existe un autre glycopeptide qui est $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_6 \text{Asn}$ (AC-C₁). SHEPHERD et MONTGOMERY (95) ont trouvé, pour cette même fraction, des résultats différents : il ont caractérisé deux glycopeptides, $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_5 \text{Asn}$ et $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_4 \text{Asn}$.

d) pic D

D'après TAI et al. (103), cette quatrième fraction est pure et renferme uniquement le glycopeptide $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ (GP-IV). ATKINSON et al. (3) et SHEPHERD et al. (95) ont caractérisé un autre glycopeptide qui est $(\text{Man})_4 (\text{GlcNAc})_4 \text{Asn}$ (AC-D₁) et en ont détecté trois autres (3), mais leurs structures restent à déterminer. Tandis que NARASIMHAN et al. (79) ont caractérisé $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_5 \text{Asn}$ qu'ils ont appelé GN GN (GN) et un autre glycopeptide non identifié.

e) pic E

Le glycopeptide majeur de cette cinquième fraction est $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, il a été caractérisé par tous les auteurs. Et là encore, une hétérogénéité a été démontrée par ATKINSON et al. (3) en utilisant la R.M.N., mais les structures n'ont pas été déterminées.

f) pic F

TAI et al. (105) ont caractérisé une sixième fraction qui renferme uniquement $(\text{Man})_4 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ (GP-VI). Le même glycopeptide a été aussi caractérisé par NARASIMHAN et al. (79).

C - CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES ET GLYCOPROTEINOSES

Il est connu que les lysosomes jouent un rôle essentiel dans la dégradation des glycoprotéines. En effet, ces organites cellulaires renferment une collection complète d'enzymes capables d'hydrolyser aussi

bien la partie glycanne que la partie protéique d'une glycoprotéine . Cette dégradation libère des monosaccharides et des acides aminés qui passent la membrane lysosomiale pour être dégradés ou recyclés dans le cytoplasme .

Mais ce mécanisme peut être profondément perturbé dans les cas de glycoprotéinoses où une déficience en enzymes lysosomiales provoque une accumulation de produits dans les tissus et les urines des malades (fig 9 p. 19) . Ces maladies apportent une information supplémentaire à la compréhension du catabolisme des glycannes des glycoprotéines qui n'est encore que fragmentaire .

En effet, l'analyse des produits, dans les urines des malades, montre d'une part, qu'il y a une accumulation d'oligosaccharides qui possèdent un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice auquel est lié en position 4, un résidu de β mannose ; d'autre part, dans certaines maladies comme l'asparaginyl-N-acétylglucosaminurie (40), on observe une accumulation de résidus d'asparaginyl-N-acétylglucosamine .

Sur la base de ces observations, une hypothèse est émise, que le catabolisme des glycannes des N-glycosylprotéines, commence par l'action d'une enzyme qui hydrolyse au niveau du résidu de N,N'-diacétylchitobiose du noyau pentasaccharidique, en libérant la copule polysaccharidique, qui est ensuite dégradée par les exoglycosidases (100, 67, 68) . Cette enzyme est l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase .

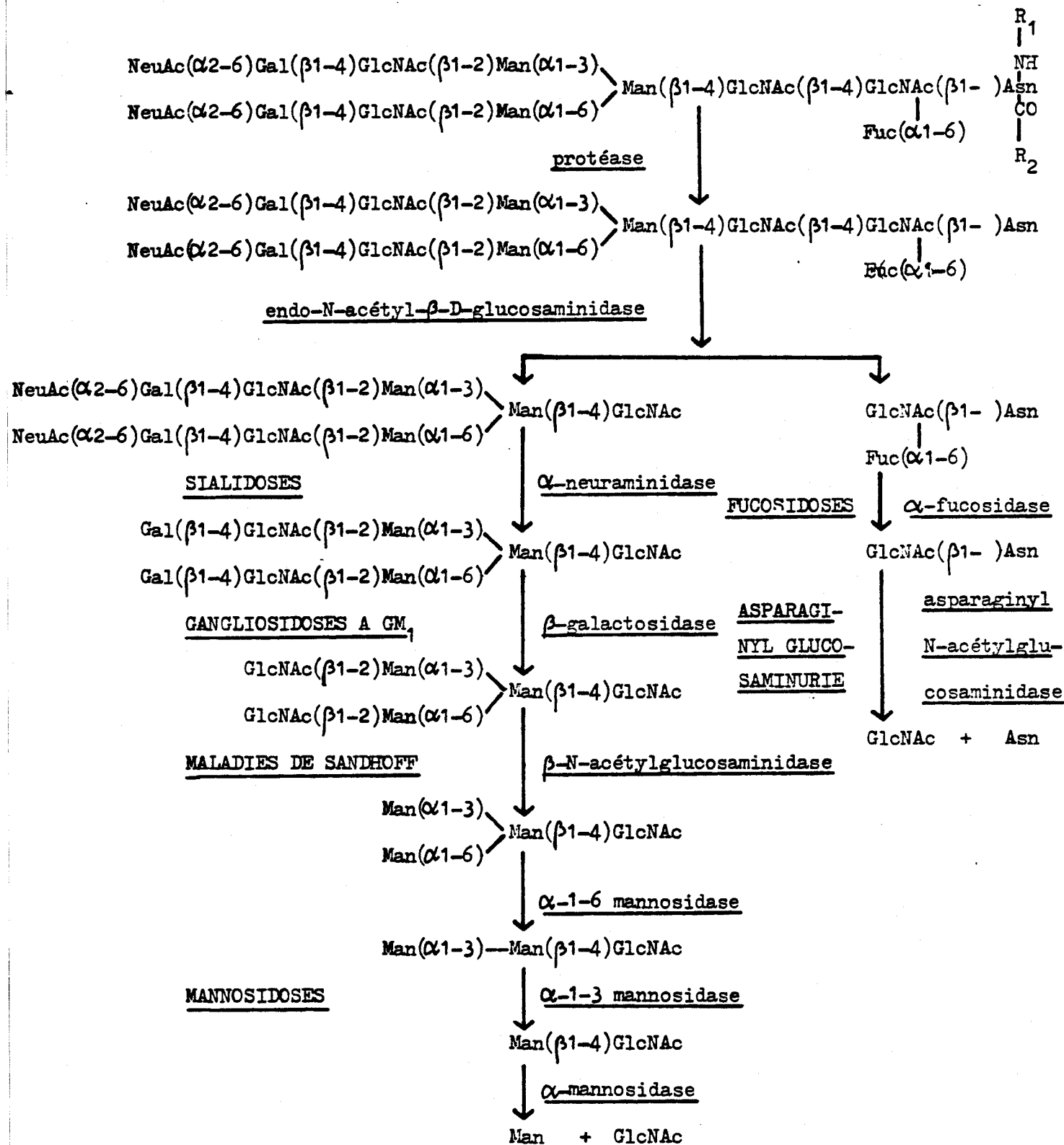


Figure 9 : Schéma général du catabolisme des N-glycosylprotéines (100)

II - LES ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASES

A - DEFINITION

Les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases (EC 3. 2. 1. 96) hydrolysent la liaison β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc du noyau pentasaccharidique des N-glycosylprotéines en libérant une partie glycanique qui renferme un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, et un autre résidu de N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice, lié lui-même à un résidu d'asparagine de la chaîne protéique .

La réaction catalysée par les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases est représentée figure 10 page 21 .

B - CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

1 - Diplococcus pneumoniae

En 1971, MURAMATSU (70) a caractérisé une activité endo-glycosidasique dans une culture de Diplococcus pneumoniae type I, qui libère un oligosaccharide contenant du mannose et de la N-acétylglucosamine, à partir des gamma-globulines myélomateuses de souris . A l'époque, l'activité exacte de l'enzyme n'était pas définie, d'où son appellation d'endo-glucosaminidase . Ce n'est qu'en 1974, que KOIDE et MURAMATSU (47) ont purifié et déterminé les propriétés d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, qu'ils ont baptisée endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase D (endo D) (47, 74) . La purification de l'enzyme a été améliorée en 1978 par les mêmes auteurs (75) .

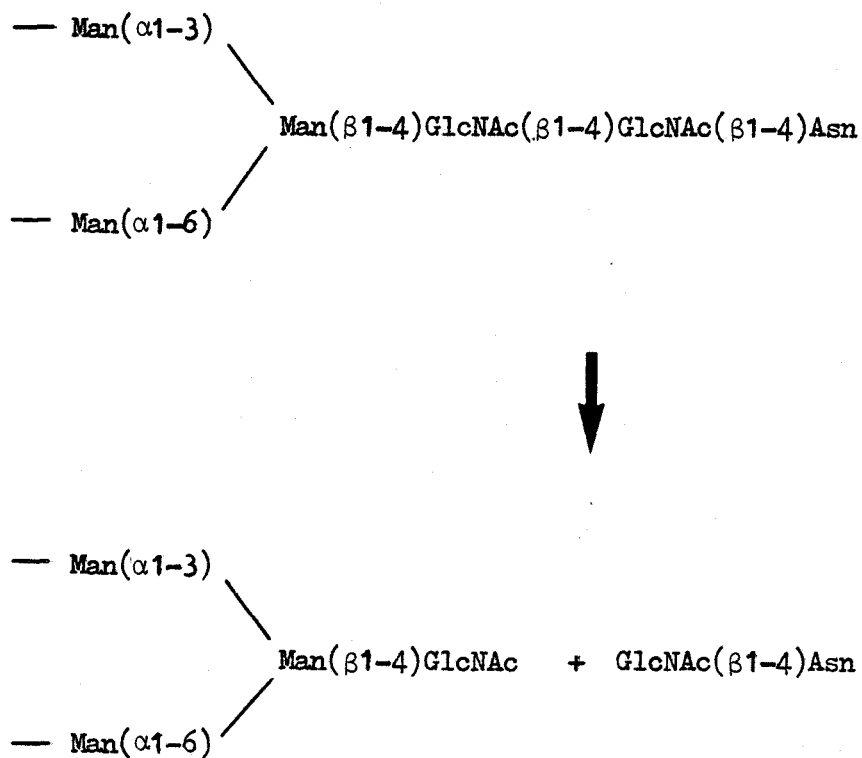


Figure 10 : Réaction catalysée par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase

8115
LILLE

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, l'enzyme donne une bande homogène correspondant à une masse moléculaire de 280 000, mais en milieu dénaturant, cette bande passe à 130 000, montrant que la molécule enzymatique est formée de deux sous-unités (tableau V page 37) .

L'étude de la spécificité de l'enzyme montre qu'elle est active sur les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique monoantennés fucosylés ou non (47) . Les glycopeptides biantennés des IgG bovines doivent être, au préalable, dégradés par les exoglycosidases : neuraminidase, β -galactosidase, et N-acétyl- β -D-glucosaminidase (45, 102) Les travaux de ITO et al. (36) ont montré que si le résidu de α -Man (souligné sur le tableau II page 23) branché sur le C₃ du β -mannose du noyau pentasaccharidique est enlevé, le glycopeptide n'est plus hydrolysé . D'après TAI et al. (103), ce résidu de α -mannose doit rester libre . L'enzyme n'hydrolyse pas le glycopeptide (Man)₁ (GlcNAc)₂ Asn mais elle hydrolyse (Man)₃ (GlcNAc)₂ Asn (113) .

Quant aux structures de type oligomannosidique et de type mixte, seul (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn est hydrolysé, le mélange de glycopeptides d'ovalbumine n'est hydrolysé qu'à 20 % (75) . Selon MURAMATSU (74) l'oligosaccharide (Man)₅ GlcNAc - GlcNAc est hydrolysé par l'enzyme, alors qu'il ne l'est pas d'après TARENTINO et MALEY (103) . D'après KOIDE et MURAMATSU (48), l'activité enzymatique est inhibée par le mannose et ses dérivés, comme le p. nitrophénylmannoside ou le méthylmannose .

L'Endo D est la première enzyme commercialisée qui soit capable d'hydrolyser les structures de type N-acétyllactosaminique . Mais sa spécificité reste limitée car elle n'hydrolyse pas les structures biantennées . Le glycopeptide (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn est hydrolysé par

Tableau II : Glycopeptides hydrolysés par les Endo D, C_I, et F_I

TYPE	STRUCTURES	NOMS
oligo-mannosidique	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} $ $ \begin{array}{c} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn} \end{array} $	GP-V (ovalbumine)
mixte	néant	
N-acétyllactosaminique	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} $	
lactosaminique	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array} $	IgG
structure générale	$ \begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)-\text{R}_3 \\ \diagup \quad \\ \text{R}_1-\text{Man}(\alpha 1-6) \quad \text{R}_2 \end{array} $	
	R ₁ = H, Man ou Gal(β1-4)GlcNAc	
	R ₂ = H ou Fuc(α1-6)	
	R ₃ = H, peptide, ou protéine	



l'enzyme . Le rapport entre l'activité sur les glycopeptides monoantennés des IgG, et celle sur $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ est de $1 / 0,83$ (47) .

Elle a été utilisée par de nombreux auteurs, pour l'étude des relations structure - fonction des glycoprotéines (71, 114, 72, 73, 49, 89, 23, 56)

Les glycopeptides hydrolysés par l'endo D, ainsi que leur structure générale, sont représentés sur le tableau II page 23 .

2 - Streptomyces griseus - Streptomyces plicatus

En 1972 TARENTINO et al. (105) ont caractérisé une enzyme répondant à la définition d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase dans une préparation commerciale de chitinase produite à partir de Streptomyces griseus (A.T.C.C. No 27800) . En 1974, deux activités enzymatiques ont été fractionnées et purifiées à partir d'un filtrat de culture de ce même micro-organisme (111) . Une fraction renferme une enzyme active sur les substrats du type $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ ou "High mannose type" d'où son appellation d'Endo H . L'autre fraction renferme une enzyme active sur les substrats de type $(\text{Man})_4 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ ("Low mannose type") , d'où l'appellation d'Endo L .

En 1976, la souche a été caractérisée comme étant un Streptomyces plicatus (A.T.C.C. No 27800) (116) .

a) l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H-

La masse moléculaire de l'Endo H est de 27 000 (111). L'analyse en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, donne une seule bande possédant l'activité enzymatique .

Comme indiqué dans le tableau III p. 27 et 28, l'étude de la spécificité de l'Endo H montre que cette enzyme est surtout active sur les substrats de type oligomannosidique et de type mixte, et complètement inactive sur les structures de type N-acétyllactosaminique, même partiellement dégradées (2, 111, 114) .

L'enzyme n'hydrolyse pas ou très peu le glycopeptide $(\text{Man})_1 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ (2, 111), et d'après KOBATA (45) elle n'est pas active sur $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$; alors que selon TRIMBLE et al. (123), l'enzyme dégrade les glycopeptides de $(\text{Man})_2 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ à $(\text{Man})_9 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, avec une vitesse maximale d'hydrolyse pour $(\text{Man})_4 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ (63, 50, 110) .

Toutes les structures mixtes contenues dans l'ovalbumine sont hydrolysées (104,131) . D'après TARENTINO et al. (117) l'enzyme est aussi active sur les oligosaccharides présentant un résidu de N,N'-diacétylchitobiose à l'extrémité réductrice .

L'activité de l'enzyme a été aussi testée sur des glycoprotéines . Certaines de ces glycoprotéines sont hydrolysées sous leur forme native comme la ribonucléase B, la déoxyribonucléase A, ou l'unité A de la thyroglobuline . D'autres, doivent être dénaturées pour être hydrolysées comme l'ovalbumine, les IgM, ou l'invertase (15, 112,) . Certaines autres, comme la β -glucuronidase, ne sont que partiellement déglycosylées sous leur forme native (80) .

L'hydrazinolyse de ces glycoprotéines après action de l'Endo H, libère des glycannes qui sont habituellement hydrolysés par l'enzyme à partir de glycopeptides (32) . La chaîne peptidique joue donc un rôle de protection des groupements glycanniques vis à vis de l'enzyme .

Les applications de cette enzyme, dans l'étude des structures et fonctions des glycanes des glycoprotéines sont citées dans les références 14, 29, 33, 93, 121, 122 .

Les glycopeptides hydrolysés par l'Endo H, et leur structure générale, sont représentés dans le tableau III page 27 .

b) l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase L

L'Endo L donne une seule bande en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, pour une masse moléculaire de 49500, alors qu'elle en donne deux en isoélectrofocalisation, aux points isoélectriques de 4,20 et 4,25 (118, 124) .

L'étude de sa spécificité, montre qu'elle est active sur des petits substrats, de type $(\text{Man})_1 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$; $(\text{Man})_2 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ est faiblement hydrolysé, alors que $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ est résistant à l'enzyme . En 1979, TRIMBLE et al. (124) ont montré que les oligosaccharides tels que $(\text{GlcNAc})_3$ ou $(\text{GlcNAc})_4$ sont de meilleurs substrats que le glycopeptide $(\text{Man})_1 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$. En effet, pour ce dernier glycopeptide K_m et V_{max} sont respectivement 0,7 mM, et 3,8 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines, alors que pour l'oligosaccharide $(\text{GlcNAc})_3$ ces valeurs sont respectivement de 0,23 mM et de 5,1 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines . L'enzyme n'est pas active sur le N,N'-diacétylchitobiose ni sur $(\text{GlcNAc})_3$ réduit en $(\text{GlcNAc})_2 \text{GlcNAc-itol}$ mais elle est active sur l'oligosaccharide $(\text{GlcNAc})_4$ réduit en $(\text{GlcNAc})_3 \text{GlcNAc-itol}$.

L'Endo L est donc plutôt spécifique des oligosaccharides que des glycopeptides .

Tableau III : Glycopeptides hydrolysés par l'Endo H

(R = GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-)Asn)

TYPE	STRUCTURES	NOMS	
oligo-mannosidique	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3)-\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-VI (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-V (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IV (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IIIB (ovalbumine)	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \left[\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array} \right]$	unité A de la thyro-	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	globuline	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	de veau	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$		
	mixte	$\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IIIA (ovalbumine)
		$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$		GP-IIIC (ovalbumine)	



	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{Man}(\beta 1-4) \text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\}$	GP-IIB (ovalbumine)
mixte (suite)	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{Man}(\beta 1-4) \text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-3) - \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\}$	GP-IIA (ovalbumine)
	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{Man}(\beta 1-4) \text{R} \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\}$	GP-I (ovalbumine)
:N-acétyllac- : tosaminique:	néant	
structure générale	$\begin{array}{l} \text{R}_1-(-3) \\ \text{R}_2-(-4) \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-)-\text{R}_4 \\ \text{R}_3-\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\}$	
	R ₁ = H, Man, ou oligosaccharide	
	R ₂ = H, ou GlcNAc	
	R ₃ = H, ou oligosaccharide	
	R ₄ = H, peptide ou protéine	



3 - Clostridium perfringens

En 1975, CHIEN et al. (12) ont mis en évidence dans une préparation commerciale de neuraminidase, extraite de Clostridium perfringens une contamination par des activités endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique et protéasique. La même année, ITO et al. (37) ont fractionné deux formes d'enzymes qu'ils ont appelées endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C_I (Endo C_I) et endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C_{II} (Endo C_{II}), à partir d'une culture de Clostridium perfringens (A.T.C.C. No 10873).

a) l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C_I

La spécificité de l'Endo C_I a été très peu étudiée. Elle est capable d'hydrolyser les substrats de type N-acétyllactosaminique monoantennés fucosylés ou non ; elle hydrolyse en outre le glycopeptide (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn (45). Le rapport entre l'activité sur les substrats de type N-acétyllactosaminique monoantennés et celle sur (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn est de 1 / 0,63 (37). L'enzyme n'est capable de dégrader ni (Man)₆ (GlcNAc)₂ Asn ni (Man)₁ (GlcNAc)₂ Asn. Comme pour l'Endo D, le résidu de α mannose (souligné dans le tableau II page 23), substitué sur le C₃ du résidu de β mannose du noyau pentasaccharidique, doit rester libre (45).

Les glycopeptides hydrolysés par l'Endo C_I, sont les mêmes que ceux hydrolysés par l'Endo D et sont représentés dans le tableau II page 23.

b) l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase C_{II}

La spécificité de l'Endo C_{II} a été étudiée plus en détail et a été comparée à celle de l'Endo H .

Elles sont toutes deux inactives sur les structures de type N-acétyllactosaminique, même monoantennées .

D'après TAI et al. (106) , aucune de ces deux enzymes n'hydrolyse le glycopeptide (Man)₃ (GlcNAc)₂ Asn, alors que TRIMBLE et al. montrent que ce glycopeptide peut être dégradé par l'Endo H (124), (tableau page 27) . Par contre elles hydrolysent toutes les deux, le glycopeptide Man (α 1-3) (Man)₃ (GlcNAc)₂ Asn, montrant le rôle essentiel que joue le résidu de mannose supplémentaire dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme . Il existe cependant une différence dans les vitesses d'hydrolyse : pour l'Endo H, l'ordre des vitesses d'hydrolyse est,

(Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn > (Man)₆ (GlcNAc)₂ Asn > (Man)₉ (GlcNAc)₂ Asn, alors que pour l'Endo C_{II}, cet ordre est le suivant :

(Man)₆ (GlcNAc)₂ Asn > (Man)₉ (GlcNAc)₂ Asn > (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn .

Les deux enzymes n'ont pas non plus la même spécificité sur les substrats de type mixte . D'après TAI et al. (105,106) , l'Endo C_{II} n'hydrolyse pas toutes les structures de type mixte contenues dans l'ovalbumine, alors que l'Endo H les hydrolyse toutes . D'après les mêmes auteurs, le résidu de mannose (souligné dans le tableau IV page 32) substitué sur le C₃ du mannose du noyau pentasaccharidique doit être, soit libre comme dans GP-VI, soit uniquement substitué sur le C₂ comme dans GP-IIIA ou l'unité A de la thyroglobuline de veau (38) . La substitution de ce résidu de mannose sur le C₄, comme dans GP-IIIC, GP-II et GP-I, rend ces glycopeptides résistants à l'activité de l'enzyme (pour la structure des glycopeptides, voir pages 15 et 16) .

Ces résultats démontrent bien que l'Endo H et l'Endo C_{II} n'ont pas la même spécificité .

Les glycopeptides hydrolysés par l'Endo C_{II}, ainsi que leur structure générale, sont représentés dans le tableau IV page 32 .

4 - Bacillus circulans

En 1974, NIKAJIMA et BALLOU (79) ont cultivé une bactérie sur le mannane extrait d'un mutant de Saccharomyces cerevisiae (X 2180 - 1A - 5) . Cette bactérie, appelée aussi par ces auteurs, "Mannan-degrading bacterium", est identifiée comme étant un Bacillus circulans , bien que l'absence de spores la rapproche plutôt du groupe d'Achromobacter .

L'analyse des produits de dégradation du mannane, dans le milieu de culture laisse supposer l'existence d'une enzyme, répondant à la définition d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, qui serait secrétée par la bactérie . En effet celle-ci hydrolyse le mannane extrait de S. cerevisiae (figure 7, page 11), entre les deux résidus de GlcNAc du noyau pentasaccharidique .

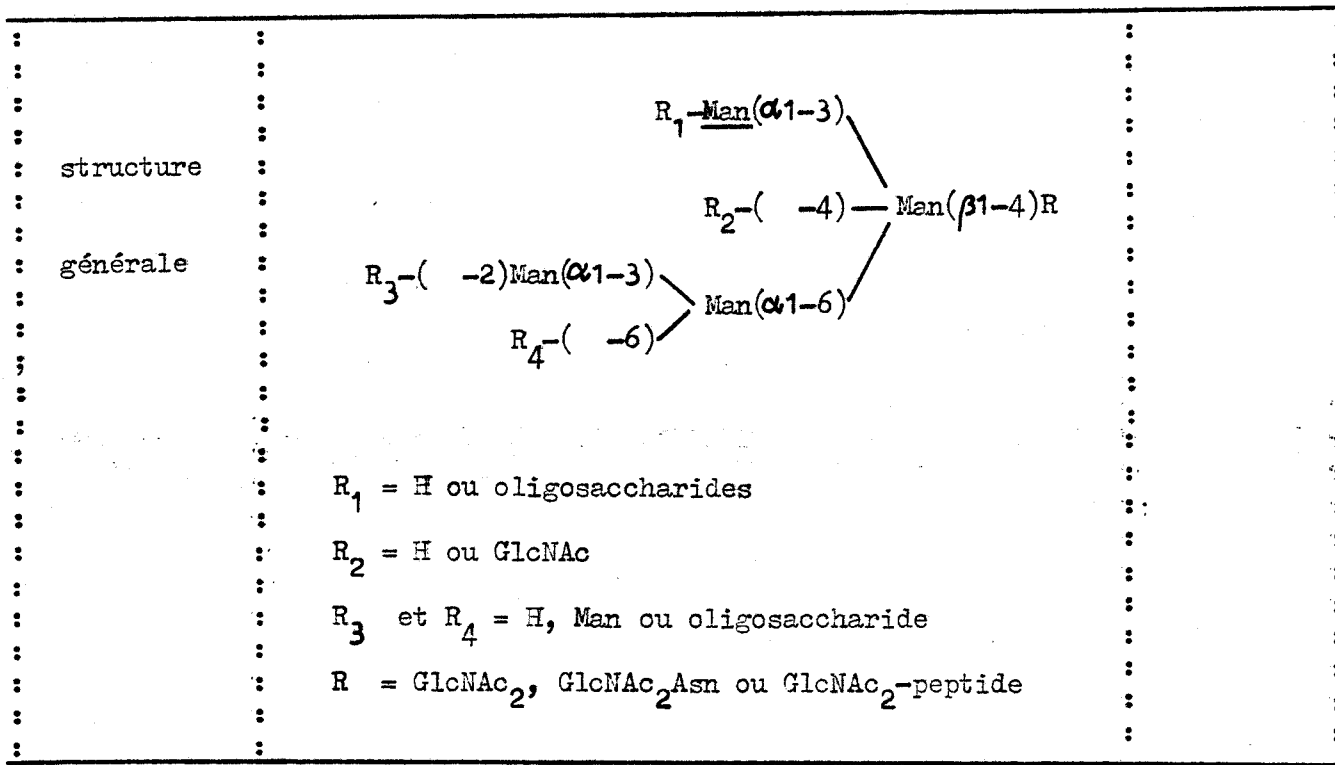
5 - Flavobacterium meningosepticum

Récemment, ELDER et al. ont décrit une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique produite par cette bactérie . Ces auteurs (30), l'ont appelée Endo F . Son activité n'a été testée que sur des glycoprotéines . Certaines de ces glycoprotéines sont dégradées sous leur forme native, d'autres (ovalbumine, fétuine, ovomucoïde, orosomucoïde, par exemple), ne sont déglycosylées que sous leur forme dénaturée .

Tableau IV : Glycopeptides hydrolysés par les Endo C_{II} et F_{II}
 (R = GlcNAc(1-4)GlcNAc(1-)Asn

TYPE	STRUCTURES	NOMS	
oligo- mannosidique	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3)-\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-VI (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-V (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IV (ovalbumine)	
	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IIIIB (ovalbumine)	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \left[\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array} \right.$	unité A de la thyro-	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-2) - \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R}$	globuline	
	$\text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagup \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R}$	de veau	
	mixte	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}(\beta 1-2) - \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	GP-IIIA (ovalbumine)
		$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \\ \diagdown \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{R} \end{array}$	
	N-acétyllac- tosaminique	néant	





C - CHEZ LES VEGETAUX

1 - Extrait de figue

Dans le règne végétal, seul le figuier a été étudié jusqu'à présent. En 1977, OGATA-ARAKAWA et al. (86) ont mis en évidence une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique dans un extrait de figue.

Ces auteurs n'ont caractérisé qu'une seule enzyme, active sur les substans de type oligomannosidique comme $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, le glycopeptide de l'unité A de la thyroglobuline de veau, et une partie du GP-III de l'ovalbumine. Ni les structures mixtes de l'ovalbumine (GP-I et GP-II), ni les structures de type N-acétyllactosaminique intactes ou partiellement dégradées ne sont hydrolysées, montrant que cette enzyme a la même spécificité que l'Endo C_{II}.

2 - Sève de figuier

La même année, CHIEN et al. ont isolé deux formes enzymatiques qu'ils ont appelées endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase F_I (Endo F_I) et endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase F_{II} (Endo F_{II}). L'Endo F_I hydrolyse le glycopeptide $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ plus vite que $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, alors que l'Endo F_{II} hydrolyse ces deux derniers glycopeptides mais pas le premier (13).

En 1981, LI et al. (57) ont légèrement amélioré la purification de ces deux enzymes et ont retrouvé les mêmes spécificités que celles décrites par CHIEN et al. (13).

Les substrats hydrolysés par l'Endo F_I sont les mêmes que pour l'Endo D et C_I et sont représentés dans le tableau II page 23. L'Endo F_{II} possède la même spécificité que l'Endo C_{II} (tableau IV page 32).

D - CHEZ LES ANIMAUX

1 - Foie de porc

La démonstration d'une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique dans les tissus animaux (foie, rate et rein de rat ou de porc), a été apportée en 1974 par NISHIGAKI et al. (84) . Ces auteurs ont partiellement déterminé la spécificité de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase de foie de porc .

Cette enzyme est active sur les glycopeptides $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_4 \text{Asn}$; elle n'hydrolyse ni les glycopeptides de l'unité A de la thyroglobuline de veau, ni les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique même partiellement dégradés, ce dernier résultat ayant été récemment contredit par la même équipe (101), qui n'a pas apporté de précisions supplémentaires .

2 - Oviducte de poule

En 1976, TARENTINO et al. (115) ont isolé et étudié la spécificité d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase d'oviducte de poule .

Cette enzyme est active sur les glycopeptides $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_4 \text{Asn}$. En outre l'enzyme est capable d'hydrolyser les glycopeptides $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{Fuc}) (\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$.

D'après ces résultats, l'Endo d'oviducte de poule possède une spécificité semblable à celle de l'Endo D et à celle de l'Endo H . Grâce à une étude de compétition entre les substrats $(\text{Man})_6 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{Fuc}) (\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, les même auteurs ont conclu qu'il n'existait

qu'une seule enzyme possédant à la fois les activités oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, mais ils obtiennent plusieurs bandes protéiques en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

3 - Foie de rat

Dans notre laboratoire, PIERCE et al. (89,90) ont caractérisé une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase active sur les substrats de type N-acétyllactosaminique biantennés, dans le foie de rat. TACHIBANA et al. (101) ont confirmé ces résultats et ont détaillé la spécificité surtout sur les substrats de type oligomannosidique et mixte.

Les substrats de type oligomannosidique sont hydrolysés de $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ à $(\text{Man})_9 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$. Les glycopeptides $(\text{Man})_2 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$, $\text{Man} (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ et $(\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ ne sont pas, ou très peu hydrolysés par l'enzyme.

Les structures de type N-acétyllactosaminique sont hydrolysées mais à une vitesse nettement inférieure à celle des substrats de type oligomannosidique. L'enzyme est capable de dégrader l'oligosaccharide $(\text{Gal})_2 (\text{GlcNAc})_2 (\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2$, mais pas quand celui-ci est réduit enitol. Le substrat fucosylé, $\text{Fuc} (\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ est très faiblement hydrolysé par rapport à $(\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$.

Les glycopeptides de type mixte de l'ovalbumine, GP-I et GP-IIIB, ne sont pratiquement pas hydrolysés (respectivement à 0,7 et à 1,6 p. 100). Le glycopeptide GP-IIIA est dégradé à 20 p. 100 et GP-IIIC à 7,9 p. 100 (la structure de ces glycopeptides est représentée dans le tableau I page 15).

Avec les résultats donnés par ces auteurs (107), il est difficile de comparer la spécificité de l'Endo de foie de rat, avec celle des autres enzymes, mais il semble qu'elle est plus proche de l'Endo C_{II} que de l'Endo H, en ce qui concerne l'hydrolyse des substrats de type oligomannosidique et de type mixte .

En effet, l'hydrolyse de GP-I est trop faible pour être significative et l'hydrolyse de GP-IIB et de GP-IIIC pourraient s'expliquer par une dégradation de ces substrats par des exo-N-acétylglucosaminidases : la solution enzymatique utilisée par ces auteurs, est un extrait brut de foie de rat et l'absence d'exo-N-acétylglucosaminidase n'a été vérifiée que sur un oligosaccharide renfermant un résidu de GlcNAc lié en position 3, alors que GP-IIB et GP-IIIC possèdent des GlcNAc liés en position 2 et en position 4 .

4 - Tissus humains

En 1975, BOERSMA et al. (6) ont détecté une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique dans le foie humain . Et en 1981, OVERDIJK et al. (87) ont signalé la présence du même type d'enzyme dans le rein humain . Mais ces enzymes n'ont pas été étudiées plus en détail .

D - CONCLUSION

Nous avons rassemblé dans le tableau V page 37, l'activité des principales endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases sur les trois types de N-glycosylprotéines, ainsi que leur pH optimum et leur masse moléculaire . D'après ce tableau, nous pouvons remarquer :

STRUCTURES HYDROLYSEES

E N D O	OLIGOMANNOSIDIQUE	MIXTE	N-ACETYLLACTOSAMINIQUE DESIALYLE		PII OPTIMUM	MASSE MOLECULAIRE
			monoantennés	biantennés		
D	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂ Asn	aucune	toutes	aucune	6,5	280 000 (2 X 150 000)
H	toutes	toutes les structures de l'ovalbumine	aucune	aucune	5,5	27 200
C _I	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂ Asn	aucune	toutes	aucune	6,5	non déterminé
C _{II}	toutes	GP-III A (ovalbumine)	aucune	aucune	7,0	non déterminé
F _I	(Man) ₅ ou 6 (GlcNAc) ₂ Asn	aucune	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Asn	aucune	4,0 (13) 5,9 (57)	52 000
F _{II}	toutes	GP-III A (ovalbumine)	aucune	aucune	6,0 (13) 5,4 (57)	17 500
oviducte de poule	toutes	aucune	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ Asn (Fuc) ₀ ou 1	aucune	5,5	56 000
foie de porc	(Man) ₅ ou 6 (GlcNAc) ₂ Asn	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂ Asn	aucune (84) certaines (101)	aucune (R4) certaines (101)	7,0	non déterminé
foie de rat	toutes	GP-III A et GP-III C (ovalbumine)	non déterminé	toutes	7,0	non déterminé

Tableau V : Spécificité et propriétés des principales Endo .



1 - D'après leur spécificité, les endo-N-acétylglucosaminidases peuvent être classées en trois groupes :

a) groupe de l'Endo D : appartiennent à ce groupe, toutes les enzymes capables d'hydrolyser les substrats de type N-acétyllactosaminique monoantennés . Elles ne dégradent, ni les substrats de type oligomannosidique (sauf $(\text{Man})_5 (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$), ni les substrats de type mixte . Avec l'Endo D, on peut classer l'Endo C_I , et l'Endo F_I .

b) groupe de l'Endo C_{II} : les enzymes de ce groupe hydrolysent tous les substrats de type oligomannosidique . Les substrats de type N-acétyllactosaminique mono ou biantennés ne sont pas du tout dégradés, tandis que les glycopeptides de type mixte ne sont hydrolysés que si le résidu de α mannose branché en position 3 sur le β mannose, est soit libre soit substitué uniquement en position 2 . Dans ce groupe, on peut également classer l'Endo F_{II} .

c) groupe de l'Endo H : dans ce groupe, les enzymes dégradent tous les substrats de type oligomannosidique et, à la différence du groupe de l'Endo C_{II} , elles hydrolysent tous les glycopeptides de type mixte de l'ovalbumine . Les substrats de type N-acétyllactosaminique ne sont pas hydrolysés . Dans ce groupe, on ne peut classer, pour l'instant que l'Endo H .

La spécificité des autres endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases n'est pas encore assez bien définie, pour permettre leur classement dans un de ces trois groupes .

2 - D'après les valeurs de pH optimum, on peut constater que l'activité sur les substrats de type N-acétyllactosaminique nécessite un pH plus acide que l'activité de type oligomannosidique .

3 - D'après les masses moléculaires : les enzymes actives sur les substrats de type oligomannosidique ont des masses moléculaires plus faibles que les enzymes qui hydrolysent les substrats de type N-acétyllactosaminique .

Les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases deviennent un outil de travail de plus en plus utilisé pour la détermination de la structure ou de la fonction de la partie glycanique des glycoprotéines (46) .

Dans notre laboratoire, la caractérisation d'une activité enzymatique de ce type dans un moût de fermentation de Basidiomycète (Sporotricum dimorphosporum) nous a amené à purifier l'enzyme, et à déterminer ses propriétés physico-chimiques et sa spécificité .

Ces résultats font l'objet du présent mémoire .

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

M A T E R I E L

I - PRODUITS RADIOACTIFS

L'anhydride acétique [^{14}C] (11 mCi / mmole), le borohydrure de potassium [^3H] (20 Ci / mmole) et l'iode [^{125}I] nous ont été fournis par le C.E.A. .

II - SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE

Les résines échangeuses d'ions, Dowex 1 x 2 (200-400 mesh, sous forme CH_3COO^-), Dowex 50 W x 8 (50-100 mesh, sous forme H^+), Dowex 1 x 8 (50-100 mesh, sous forme HCOO^-) et Dowex 50 W x 2 (200-400 mesh, sous forme CH_3COO^-) ainsi que les Biogels agarose-A 0.5 M et 1.5 M P_4 et P_2 sont des produits Bio-Rad .

L'hydroxyapatite-Ultrogel, la DEAE-trisacryl M et la CM-trisacryl M sont fournis par I.B.F. .

Le support de chromatofocalisation PBE 94, la concanavaine A-Sepharose 4B et le Sepharose CL 4B sont des produits Pharmacia .

La colonne de chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.) est une colonne analytique Micropak AX-10 (0,4 x 30 cm) de Varian .

Les papiers de chromatographie Whatman 3 sont fournis par Whatman et les plaques de Silicagel G (20 x 20 cm) par Merck .

III - SUBSTRATS

A - SUBSTRATS SYNTHETIQUES

Les p-nitrophényl-2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranoside (pNP-GlcNAc), p-nitrophényl- α -D-mannopyranoside (pNP-Man), p-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (pNP-Gal) sont des produits Koch Light .

B - SUBSTRATS NATURELS

1 - Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont toutes préparées au laboratoire à l'exception de l'ovalbumine grade III qui est un produit Sigma .

La sérotransferrine humaine est purifiée à partir de la fraction IV de COHN (92) . La sérotransferrine de lapin est préparée selon la méthode de LEGER et al. (53) .

La lactotransferrine humaine et la lactotransferrine de vache sont préparées respectivement selon les méthodes décrites par SPIK et al. (98) et CHERON et al. (10) .

L'orosomucoïde humain est obtenu selon la méthode de SCHMID et al. (94) .

2 - Glycopeptides *

Les glycopeptides que nous avons utilisés ont été préparés par hydrolyse pronasique des glycoprotéines selon la méthode décrite par MONSIGNY et al. (66) .

Les disialoglycoasparagines de la sérotransferrine sont obtenus par la méthode de SPIK et MONTREUIL (96) . Les monosialo et les asialoglycoasparagines sont obtenus par hydrolyse partielle ou totale des glycoasparagines sialylés, soit par la neuraminidase (81), soit par H_2SO_4 .

Nous utilisons l'asialoglycoasparagine de la sérotransferrine comme substrat standard pour le type N-acétyllactosaminique ; sa structure est représentée dans la figure 11 page 43 .

Les glycopeptides de l'ovalbumine GP-I, GP-IIA, GP-IIB, GP-IIIA, GP-IIIB, et GP-IIIC nous ont été donnés par le Docteur A. KOBATA, et les glycopeptides B (GP-II) et C₂ (GP-IIIC) par le Docteur H. SCHACHTER . Les structures de ces glycopeptides sont parfaitement définies (8, 79, 131) et sont représentées dans le tableau I page 15 .

Les glycopeptides de l'ovalbumine (de GP-A à GP-E) sont préparés au laboratoire selon la méthode de HUANG et al. (9) .

Nous avons utilisé le mélange de tous les glycopeptides de l'ovalbumine comme substrat standard pour le type oligomannosidique et le type mixte .

Les glycopeptides de la lactotransferrine bovine sont obtenus selon la méthode de CHERON et al. (10) .

3 - Oligosaccharides *

Les mannosides de (Man)₂GlcNAc à (Man)₉GlcNAc sont isolés à partir des urines de malades atteints de mannosidose (99) .

L'oligosaccharide (Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₃GlcNAc est isolé à partir des urines de malades atteints de gangliosidose à GM 1 .

Les autres oligosaccharides sont aussi préparés au laboratoire à partir des urines de malades atteints de maladies métaboliques .

* Nous remercions vivement G. SPIK et G. STRECKER qui nous ont fourni les glycoprotéines, glycopeptides et oligosaccharides indispensables pour la réalisation de ce travail .

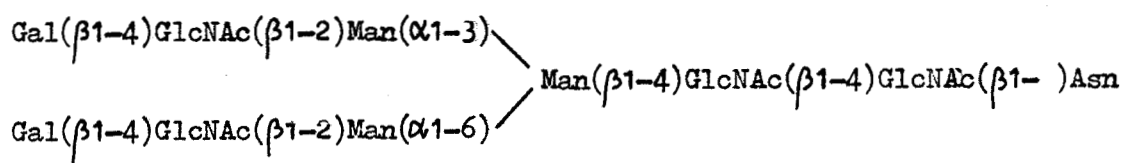


Figure 11 : Structure des glycopeptides de la sérotransferrine humaine ou de lapin désialylés



IV - ENZYMES

La pronase (EC 3. 4. 24. 4 et EC 3. 4. 21. 4) et la neuraminidase (EC 3. 2. 1. 18) sont des produits Sigma .

La β -D-galactosidase (EC 3. 2. 1. 23), la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (EC 3. 2. 1. 30) et l' α -mannosidase (EC 3. 2. 1. 24) sont préparées au laboratoire à partir de la fève Jack selon la méthode de LI et LI (54,55) modifiée par BOUQUELET (7) .

La galactose oxydase (EC 1. 1. 3. 9) nous est fournie par Kabi .

V - AUTRES MATERIELS

L'acétonitrile (U.V. grade) est un produit Fisons Scientific Apparatus .

Les appareils de chromatographie liquide haute performance sont des appareils Spectra Physic .

Les appareils d'isoélectrofocalisation sont fournis par L.K.B. .

Les témoins d'étalonnage pour filtration sur gel sont des produits Bio-Rad .

Le tampon d'élution de chromatofocalisation (polybuffer 74) est fourni par Pharmacia .

M E T H O D E S

I - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HYDROXYAPATITE-ULTROGEL

Une colonne (5,4 x 23,5 cm) contenant l'hydroxyapatite-Ultrogel (HA) est équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 . Après l'injection de la solution enzymatique, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration (1,5 l) avec un débit de 25 ml/h et des fractions de 15 ml sont recueillies .

Les produits adsorbés sont élués par un tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,8 .

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-TRISACRYL M

La solution enzymatique est chromatographiée sur une colonne de DEAE-trisacryl M (3,2 x 42 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 . La colonne est lavée par 1,5 l du même tampon . Les produits retenus sont élués par un gradient continu croissant de force ionique, formé par le mélange de 200 ml de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 et de 200 ml du même tampon contenant 1 M NaCl . Le débit d'éluion est de 25 ml/h . Les fractions recueillies sont de 15 ml .

C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE BIOGEL-AGAROSE A 0.5 M

La solution enzymatique est chromatographiée sur une colonne de Biogel-agarose A 0.5 M (2 x 130 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,2 M acide acétique 0,1 M pH 5,0 (62) contenant 0,1 M NaCl .

Le débit d'élution est de 15 ml/h et des fractions de 15 ml sont recueillies .

D - ISOELECTROFOCALISATION EN VEINE LIQUIDE

Les expériences sont réalisées selon la méthode de VESTERBERG et SVENSSON (128) . Les appareils d'isoélectrofocalisation et les solutions d'ampholine sont fournis par L.K.B. .

1 - Réactifs

a) solution dense

- 30 ml de glycérol 87 p. 100
- 22 ml d'eau distillée
- 2 ml de solution d'ampholine pH 2,5 - 7,0

b) solution légère

- 5 ml de solution enzymatique préalablement dialysée contre une solution de glycecolle 1 p. 100
- 48,3 ml d'eau distillée
- 0,7 ml de solution d'ampholine pH 2,5 - 7,0

c) solution anodique

- 10 ml d'eau distillée
 - 0,2 ml d'acide phosphorique
- pH 1,5

d) solution cathodique

- 15 g de saccharose
 - 10 ml d'eau distillée
 - 0,2 ml d'éthylène diamine
- pH 11,7

2 - Mode opératoire

La solution cathodique est introduite au fond de la colonne . Le gradient de densité est ensuite formé dans la colonne, en mélangeant la solution dense avec la solution légère, à l'aide d'un appareil à gradient L.K.B. . Puis on introduit la solution anodique . L'électrofocalisation est réalisée à 4°C avec une puissance constante de 11 watts (12 mA), pendant 24 h .

La colonne est éluée avec un débit de 85 ml/h . Des fractions de 4 ml sont recueillies et sur chacune sont mesurés le pH et l'absorbance à 280 nm .

E - CHROMATOFOCALISATION

1 - Principe

La chromatofocalisation permet, comme l'isoélectrofocalisation, de séparer les protéines suivant leur point isoélectrique . Les produits retenus sont élués par un gradient de pH . Ce dernier est réalisé par neutralisation progressive, grâce à un tampon (polybuffer 74 de chez Pharmacia), des groupements chargés portés par un support (polybuffer exchanger ou PBE) .

2 - Mode opératoire

Une colonne (1,5 x 22 cm) contenant 30 ml de support PBE 94 est équilibrée dans un tampon imidazole 0,025 M/HCl pH 7,1 . Un mélange, formé de 0,5 ml de solution enzymatique et de 1,5 ml du tampon précédent, est injecté sur la colonne . Après lavage par 100 ml de tampon d'équilibration, l'élution est effectuée avec 75 ml de polybuffer 74/HCl pH 4,0 avec un débit de 8 ml/h, et des fractions de 0,5 ml sont recueillies .

Les protéines encore adsorbées sur la colonne sont éluées par 30 ml d'une solution de NaCl 1 M .

F - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Nous avons utilisé le Sepharose 4B pour insolubiliser, soit les substrats (glycopeptides ou glycoprotéines), soit l'enzyme .

1 - Réactifs

- solution de bromure de cyanogène à 1 g/ml dans l'acétonitrile
- solution de carbonate de potassium 2 M
- solution de bicarbonate de sodium 0,2 M
- solution d'éthanolamine 0,1 M

2 - Mode opératoire

a) activation du Sepharose

20 g de Sepharose 4B sont lavés par 1 l d'eau préalablement refroidie à 4°C, le Sepharose est ensuite repris par 30 ml de carbonate de potassium 2 M . La solution est ensuite agitée et refroidie dans un bain de glace .

Quand la température se situe entre 4°C et 6°C, on ajoute sous agitation, 1 ml de la solution de bromure de cyanogène . Après 2 minutes, le gel activé est lavé par plusieurs litres d'eau à 4°C pour éliminer les traces de bromure de cyanogène .

b) couplage du ligand

Le ligand (1 mg de glycoprotéine , 0,5 mg de glycopeptides d'ovalbumine ou 0,173 mg d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase) est dissout dans 20 ml de bicarbonate de sodium 0,2 M, puis mélangé au Sepharose 4B activé, agité à 4°C pendant 48 h et lavé sur buchner par 500 ml de bicarbonate de

sodium 0,2 M . 100 ml d'éthanolamine 0,1 M sont ensuite ajoutés et la suspension est encore agitées pendant une nuit à 4°C . Après un nouveau lavage à l'eau, le gel est équilibré dans le tampon de chromatographie, puis monté dans la colonne .

Nous avons ainsi préparé :

- glycopeptides d'ovalbumine - Sepharose 4B (0,8 x 21 cm)
- glycopeptides de la sérotransferrine - Sepharose 4B (0,8 x 21 cm)
- endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase - Sepharose 4B (2,8 x 2,5 cm)

G - CHROMATOGRAPHIE SUR CONCAVALINE A

Une colonne de concanavaline A-Sepharose 4B (0,8 x 21 cm) est équilibrée en tampon acétate de sodium 5 mM pH 5,2 renfermant NaCl 0,1 M, MnCl₂, MgCl₂, et CaCl₂ 1 mM . Après l'injection, les produits non retenus sont éliminés par lavage avec le même tampon (60 ml) et les produits retenus sont élués par le tampon d'équilibration contenant de l' α -D-méthylglucoside 0,1 M . Le débit d'éluion est de 6 ml/h et des fractions de 1,5 ml sont recueillies .

Les protéines sont détectées par mesure de l'absorbance à 280 nm .

H - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le mélange des produits à analyser est déposé sur une feuille de papier Whatman 3 . La chromatographie descendante est effectuée dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:1:3 v/v) de FISCHER et NEBEL (24) à 20°C .

Les temps de migration sont de :

- 8 h pour les monosaccharides
- 18 h pour GlcNAc-Asn N-acétylé [¹⁴C]
- 5 à 10 jours pour les oligosaccharides

La feuille de chromatographie est ensuite séché sous une hotte ventilée pendant 2 à 3 h, découpée cm par cm et la radioactivité est mesurée en scintillation liquide . Les monosaccharides ou oligosaccharides non radioactifs sont révélés par pulvérisation d'une solution d'oxalate d'aniline (8 mg d'aniline dans 400 ml d'éthanol et 600 ml d'acide oxalique à 25 p. 1000) .

I - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les solutions à analyser sont déssalées par passage sur des colonnes de résines échangeuses d'ions Dowex 50 W x 8 (sous forme H^+) et Dowex 1 x 8 (sous forme $HCOO^-$) . La chromatographie ascendante peut être réalisée dans les deux systèmes solvants suivants :

- solvant rapide : n-butanol/éthanol/eau/acide acétique/pyridine (10:100:30:1:10 v/v)
- solvant lent : n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1 v/v)

La durée de migration varie entre 16 h (une seule migration) et 40 h (trois migrations successives) selon la nature des produits à séparer .

Les monosaccharides neutres sont révélés par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique et chauffage pendant 5 à 10 minutes à 110°C .

J - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (H.P.L.C.)

Les solutions à analyser sont d'abord filtrées sur une membrane Millipore de 0,45 μm avant d'être lyophilisées . Le résidu est repris par 0,05 ml d'eau . Des aliquotes de 0,02 ml sont injectées dans la colonne analytique Micropak AX-10 (0,4 x 30 cm) équilibrée en solvant

acétonitrile/eau (65:35 v/v) dégazé à l'hélium . L'élution est effectuée par un gradient acétonitrile/eau de la façon suivante :

- temps 0 min : 65:35 (65 p. 100 acétonitrile et 35 p. 100 eau)
- de 0 à 30 min : de 65:35 à 60:40
- de 30 à 60 min : de 60:40 à 50:50
- de 60 à 90 min : 50:50

Le débit est de 1 ml/min et des fractions de 1 ml sont recueillies . La détection des produits est effectuée par mesure de l'absorbance à 200 nm . Les différents appareils de chromatographie liquide haute performance sont des appareils Spectra Physics et l'acétonitrile (U.V. grade) est un produit Fisons Scientific Apparatus .

II - PREPARATION DES SUBSTRATS RADIOACTIFS

A - MARQUAGE PAR N-ACÉTYLATION

1 - Marquage des glycopeptides

Les résidus d'asparagine des substrats sont N-acétylés par l'anhydride acétique [^{14}C] selon la méthode de KOIDE et MURAMATSU (48) . Le protocole expérimental est le suivant :

A 5 mg de glycopeptides dans 0,2 ml de NaHCO_3 0,1 M, on ajoute 0,2 μCi d'anhydride acétique [^{14}C] repris à froid (-30°C dans un bain de carbo-
glace/acétone) par 0,1 ml de NaHCO_3 0,1 M . La réaction s'effectue à température ambiante pendant une heure . Elle est complétée par addition de 0,5 mg d'anhydride acétique froid et incubation pendant une heure à température ambiante . L'arrêt de la réaction se fait par addition de 0,8 ml de NaHCO_3 0,1 M puis congélation à -20°C .

Les glycoasparagines N-acétylées [^{14}C] sont ensuite purifiées par

chromatographie sur colonne de Biogel P₄ (2 x 150 cm), équilibrée en eau distillée, avec un débit de 8 ml/h . Des fractions de 1,5 ml sont recueillies . Les glycopeptides marqués sont repérés par comptage de la radioactivité en scintillation liquide et par révélation à l'orcinol-sulfurique ou au phénol-sulfurique (21) . Le profil d'élution type obtenu est représenté dans la figure 12-A, page 53 .

2 - Marquage de GlcNAc-Asn et de Fuc-GlcNAc-Asn

La N-acétylation est réalisée dans les mêmes conditions que pour les glycopeptides . Mais la purification des produits radioactifs se fait par électrophorèse préparative sur papier Whatman 3 MM sous une tension de 400 volts (7 volts/cm) pendant 1 heure dans le tampon pyridine/acide acétique/eau (3 : 1 : 387) à pH 5,4 . Après repérage de la radioactivité, le produit N-acétylé [¹⁴C] est élué par de l'eau distillée, filtré, lyophilisé et repris dans l'eau .

B - MARQUAGE A LA GALACTOSE OXYDASE ET REDUCTION AU BOROHYDRURE DE POTASSIUM TRITIE

Les substrats renfermant des résidus de galactose en position terminale non réductrice peuvent être marqués en effectuant une oxydation de ce résidu par la galactose-oxydase suivie d'une réduction de l'hexo-dialdose formé par le borohydrure de potassium tritié selon la méthode de MORELL et al (69) . Le protocole expérimental est le suivant :

2 mg de glycopeptides sont mélangés avec 50 U de galactose-oxydase et 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0 . Après une incubation de 2 heures à 37°C, le milieu réactionnel est amené à pH 9,0 par addition

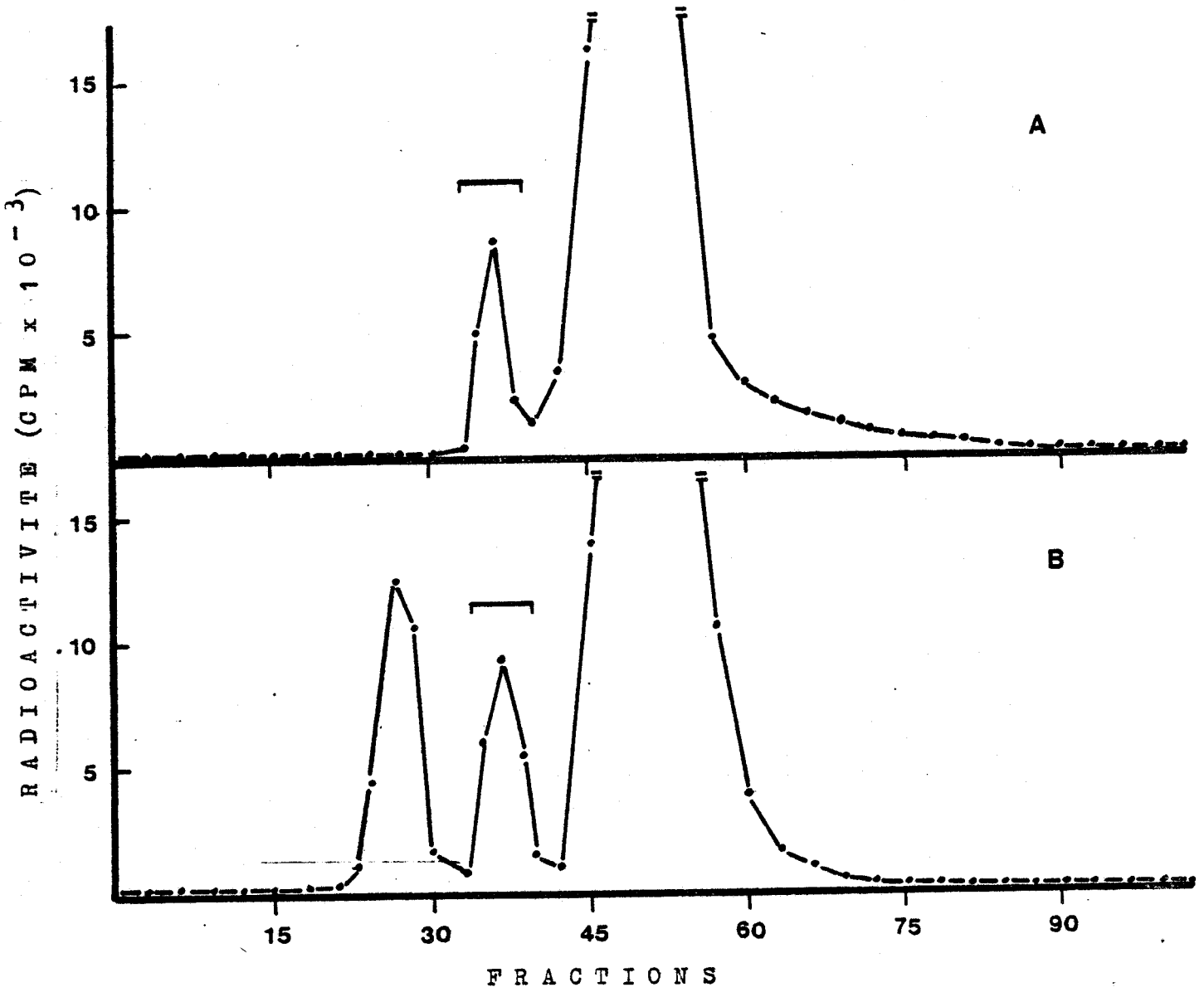


Figure 12 : Purification des substrats radioactifs

A : Substrats N-acétylés [¹⁴C]

B : Substrats marqués à la galactose oxydase puis
réduits au borohydrure tritié

— : Fractions recueillies



de KOH 10 mM . 0,8 mCi de borohydrure de potassium tritié en solution dans 0,05 ml de KOH 10 mM sont ensuite ajoutés . La réaction s'effectue à température ambiante pendant 2 heures . Afin de réduire les hexodioses restants éventuellement, 1 mg de borohydrure de potassium froid sont ajoutés et la réaction est poursuivie à 4°C pendant une nuit .

La purification et le repérage des produits radioactifs se fait comme dans le cas des glycopeptides N-acétylés [^{14}C].

Le profil d'élution type obtenu est représenté dans la figure 12 B page 53 .

C - MARQUAGE A L'IODE (^{125}I)

Nous utilisons la méthode de GREENWOOD et al. (28)

1 - Réactifs

- NaHCO_3 0,02 M
- $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (213 mCi / ml) sans entraîneur . 10 μl dans 0,99 ml de NaHCO_3 0,02 M
- NaI froid
- Chloramine T : 1 mg/ml dans NaHCO_3 0,02 M
- Metabisulfite de sodium : 1 mg/ml dans NaHCO_3 0,02 M
- KI : 10 mg/ml dans NaHCO_3 0,02 M

2 - Mode opératoire

A 1 mg de protéines à marquer, reprises par 0,5 ml de NaHCO_3 0,02 M, sont ajoutés 0,05 ml de $\text{Na } ^{125}\text{I}$, 0,02 ml de NaI froid et 0,10 ml de Chloramine T comme agent oxydant . Le mélange est agité pendant 2 minutes . 0,1 ml de metabisulfite de sodium sont alors ajoutés pour réduire l'iode libre en iodure qui est ensuite dilué par addition de 0,8 ml de KI . Les protéines marquées sont purifiées par chromatographie sur colonne de Sephadex G 25 (colonne PD-10 de Pharmacia) et éluées par l'eau distillée .

II - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES PROTEASIQUES

La présence des protéases est mise en évidence par trois méthodes :

- méthode de CHIBA et al (11)
- hydrolyse de protéines marquées à l'iode (^{125}I)
- hydrolyse de protéines non radioactives

1 - Méthode de CHIBA et al (11)

0,5 mg d'azocolle sont repris par 0,4 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 7,0 et 0,1 ml de fraction enzymatique . Le mélange est incubé pendant une heure à 37°C ou à 60°C . Après la réaction, l'azocolle qui n'a pas été hydrolysé est éliminé par centrifugation .

L'absorbance du surnageant est mesurée à 520 nm . La présence des protéases est déterminée qualitativement par comparaison avec le resultat obtenu pour un témoin ne contenant pas la fraction enzymatique .

2 - Hydrolyse des protéines marquées à l'iode (^{125}I)

0,4 mg de protéines marquées sont solubilisés dans 0,1 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 7,0 et 0,1 ml de fraction enzymatique . Le mélange est incubé à 37°C pendant des temps variant entre 1 et 72 h . La réaction est arrêtée par précipitation avec 0,4 ml d'acide phosphotungstique à 5 p. 100 dans HCl 2 M .

Après centrifugation, l'activité protéasique est déterminée par mesure de la radioactivité dans le surnageant et dans le précipité .

3 - Hydrolyse des protéines non marquées

0,2 mg de sérum-albumine bovine sont mélangés avec 0,1 ml de fraction enzymatique et 0,1 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 7,0 . Le milieu réactionnel est incubé à 37°C pendant 24 heures . Une aliquote de 0,02 ml est lyophilisée, puis analysée par électrophorèse sur plaque de polyacrylamide à 10 p. 100 en tampon Tris Glycine pH 8,6 (migration de 4 heures à 20 volts par centimètre) . Après coloration au bleu de Coomassie, l'activité protéasique est estimée en comparant le résultat obtenu avec celui d'un témoin sérum-albumine native .

B - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE

Les activités neuraminidasiques peuvent être déterminées soit en détectant le lactose libéré à partir du sialyllactose, soit en dosant l'acide sialique libéré par la méthode d'AMINOFF (1) . Nous décrivons la première méthode :

0,02 mg de sialyllactose sont solubilisés dans 0,02 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5,0 et 0,02 ml de solution enzymatique . Après incubation à 37°C ou 60°C pendant 1 heure, les produits d'hydrolyse sont analysés par chromatographie sur couche mince . Trois migrations successives sont réalisées dans le système solvant n-butanol/acide acétique/eau (2 : 1 : 1 v/v) . Les oses neutres sont révélés par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique (voir détails p.50) . L'activité neuraminidasique est déterminée par comparaison avec un témoin ne contenant pas l'enzyme, ainsi qu'avec un témoin lactose .

C - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE β -D-GALACTOSIDASIQUE

Cette activité peut être déterminée en utilisant trois types de substrats :

- le p. nitrophényl- β -D-galactoside (pNP-Gal)
- les asialoglycopeptides et oligosaccharides marqués sur les galactoses terminaux non réducteurs
- les oligosaccharides non marqués

1 - Hydrolyse du pNP-Gal

a) principe

Les β -galactosidases hydrolysent le pNP-Gal en galactose d'une part, et en p. nitrophénol d'autre part . Le p. nitrophénol libéré devient jaune en milieu alcalin .

b) mode opératoire

0,1 ml de pNP-Gal 5 mM sont mélangés avec 0,2 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5 et 0,1 ml de fraction enzymatique . Après incubation à 37°C ou 60°C pendant une heure, la réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml de carbonate de sodium 1 M . La densité optique de la solution est mesurée au spectrophotomètre à 400 nm .

2 - Hydrolyse des substrats marqués sur le galactose

a) principe

Dans ce cas, des substrats renfermant des résidus de galactose terminaux non réducteurs tritiés sont utilisés . La détermination de l'activité β -galactosidasique consiste à rechercher le Gal [^3H] libéré par l'enzyme .

b) mode opératoire

0,01 ml de glycopeptides ou d'oligosaccharides marqués (20 000 cpm) sont mélangés avec 0,02 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5,0 et 0,02 ml de fraction enzymatique . Après une incubation d'une heure à 37°C ou 60°C, les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie sur papier en solvant pyridine/acétate d'éthyle/ acide acétique/eau (5:5:1:3 v/v) . Après une migration de 8 heures, le galactose tritié est repéré par mesure de la radioactivité en scintillation liquide et par comparaison avec le galactose tritié libéré par la β -galactosidase isolée de la fève Jack et avec un témoin galactose .

3 - Hydrolyse des oligosaccharides non radioactifs

a) principe

Le principe est le même que celui de l'hydrolyse des substrats radioactifs . En effet, la détermination de l'activité de la β -galactosidase consiste à rechercher le galactose libéré, mais elle permet en plus de mettre en évidence la dégradation de l'oligosaccharide .

b) mode opératoire

0,02 mg d'oligosaccharides sont solubilisés dans 0,02 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5 et 0,02 ml de fraction enzymatique .

La réaction est effectuée à 37°C ou 60°C pendant une heure et les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie sur couche mince en solvant lent . Les oses neutres sont révélés par pulvérisation à l'orcinol-sulfurique .

D - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES α -MANNOSIDASIQUE ET
N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASIQUE

Pour détecter les activités α -mannosidasiques et N-acétyl- β -D-gluco-
saminidasique, nous avons utilisé deux types de substrats :

- les p. nitrophénylglycosides (pNP-Man ou pNP-GlcNac)
- les oligosaccharides renfermant des résidus de Man ou de GlcNac
en position terminale non réductrice

Le principe et le mode opératoire sont les mêmes que pour la détermination
des activités β -galactosidasiques

E - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASIQUES

1 - Hydrolyse des glycopeptides

Deux types d'hydrolyse ont été réalisés :

- hydrolyse analytique
- hydrolyse préparative

a) hydrolyse analytique

Nous avons utilisé des substrats soit radioactifs soit non
radioactifs .

1° - hydrolyse des substrats radioactifs

Le protocole expérimental est le suivant :

0,02 ml de fraction enzymatique sont mélangés avec 0,02 ml de tampon
phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5 et 0,01 ml de
glycopeptides radioactifs (20 000 cpm) . Après une incubation d'une
heure à 60°C, les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie
sur papier dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique
/eau (5:5:1:3 v/v) et détectés par comptage en scintillation liquide .

2° - hydrolyse des substrats non radioactifs

Le protocole expérimental est le suivant :

0,02 ml de fraction enzymatique sont mélangés avec 0,06 mg de glycopeptides et 0,02 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5,5 . Après incubation à 60°C pendant une heure, les produits d'hydrolyse sont chromatographiés sur couche mince (3 migrations successives en solvant n butanol/acide acétique/eau (2:1:1 v/v) . Les oses neutres sont révélés par pulvérisation à l'orcinol sulfurique .

b) hydrolyse préparative

Le protocole expérimental est le suivant :

1 mg de glycopeptide est repris par 0,05 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5,5 et 0,05 ml de solution enzymatique . Le mélange est incubé à 60°C pendant 8 heures , 0,05 ml de fraction enzymatique sont alors de nouveau ajoutés et l'hydrolyse se poursuit pendant 16 heures .

Les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie liquide haute performance . Chaque fraction collectée est analysée par chromatographie sur couche mince et les fractions renfermant des produits purs sont rassemblées . L'acétonitrile est éliminé par évaporation .

2 - Hydrolyse des glycoprotéines

a) hydrolyse de l'ovalbumine native

3 mg de glycoprotéine sont repris par 0,3 ml de tampon acétate de sodium 5 mM pH 5,2 renfermant NaCl 0,1 M, MnCl₂, CaCl₂, et MgCl₂ 1 mM et 0,05 ml de fraction enzymatique . Après incubation de 24 heures, à 50°C, en présence de toluène, l'hydrolysate est analysé par deux méthodes :

- précipitation des protéines par l'éthanol :

0,65 ml d'éthanol sont ajoutés à l'hydrolysate . Après centrifugation à 3500 tours par minute pendant 10 minutes, la composition en monosaccharides du précipité et du surnageant est déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation (133) .

- chromatographie sur colonne de concanavoline-A :

L'hydrolysate est chromatographié selon la méthode décrite page 49 .

b) hydrolyse de la lactotransferrine bovine

L'hydrolyse de la lactotransferrine bovine est réalisée dans les mêmes conditions que celle de l'ovalbumine ; les produits d'hydrolyse sont ensuite analysés comme précédemment ainsi que par chromatographie sur couche mince de silice dans le système solvant n butanol/acide acétique/eau (2:1:1 v/v) selon la méthode décrite page 50 .

IV - ACTION DES EXOGLYCOSIDASES DE LA FEVE JACK

Les glycopeptides de l'ovalbumine, renfermant des résidus de N-acétyl-lactosamine terminaux non réducteurs, qui sont résistants à une première action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sont soumis à l'action de la β -D-galactosidase et de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase isolées de la fève-Jack . Les glycopeptides qui ne renferment que des résidus de N-acétyl-glucosamine sont soumis directement à l'action de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase .

A - HYDRILYSE PAR LA β -GALACTOSIDASE

0,06 mg de glycopeptides solubilisés dans 0,02 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 3,5 sont mélangés à 70 mU de β -D-galactosidase et incubés à 37°C pendant 16 heures .

B - HYDROLYSE PAR LA N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE

Le mélange réactionnel obtenu précédemment est chromatographié sur Dowex 50 W x 8 et Dowex 10x 8 . A cette solution sont ajoutés 0,04 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5,0 et 95 mU de N-Acétyle- β -D-glucosaminidase . L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 16 heures .

V - DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENZYME

A - STABILITE A LA TEMPERATURE

0,5 ml de fraction enzymatique sont dilués dans 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 4,5 et pH 5,5 . Le mélange est chauffé à des températures comprises entre 40°C et 70°C . Après des temps variables d'incubation, des aliquotes de 0,05 ml sont prélevées et refroidies dans un bain de glace pendant 5 minutes . 0,01 ml de substrat (glycopeptides de la lactotransferrine bovine ou de la sero-transferrine) sont alors ajoutés et l'hydrolyse est réalisée à 60°C pendant une heure .

La dénaturation de l'enzyme est déterminée par rapport à l'activité d'une même quantité d'enzyme non chauffée .

B - STABILITE AU PH

0,5 ml de fraction enzymatique sont dilués dans 0,5 ml de différentes solutions tampon de pH compris entre 2,5 et 9,0 . Le mélange est stabilisé à 37°C pendant 30 minutes . Des aliquotes sont prélevées et ajoutées à 0,07 ml de tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 4,5 et 5,5 . Après l'addition de 0,01 ml de glycopeptides N-acétylés [¹⁴C] , l'hydrolyse est réalisée à 60°C pendant une heure .

La dénaturation de l'enzyme est déterminée par rapport à l'activité d'une même quantité d'enzyme stabilisée à pH 4,5 et 5,5 .

C - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

1 - Principe

La masse moléculaire de l'enzyme est déterminée graphiquement à partir d'une courbe étalon $\log M_m = f\left(\frac{V_e}{V_0}\right)$ où M_m , V_e et V_0 représentent respectivement la masse moléculaire, le volume d'élution et le volume mort de la colonne . La courbe étalon est obtenue en chromatographiant des protéines dont la masse est parfaitement connue .

2 - Mode opératoire

2,5 ml de fraction enzymatique (ou de témoins d'étalonnage) sont chromatographiés sur une colonne de Biogel agarose A 0.5 M (2 x 140 cm) . L'élution est effectuée par un tampon phosphate de sodium 0,2 M acide citrique 0,1 M pH 5 renfermant 0,1 M NaCl . Le débit est de 15ml/h et des fractions de 2,5 ml sont collectées .

L'activité endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidasique est déterminée avec 0,01 ml de fraction enzymatique et 0,01 ml de substrat radioactif . L'hydrolyse est effectuée à 60°C pendant une heure .

R E S U L T A T S

I - PURIFICATION DE L'ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASEA - MOÛT DE FERMENTATION

Comme nous le montre la figure 13 page 65 , l'incubation des glycopeptides de l'ovalbumine et des asialoglycopeptides de la sérotransferrine N-acétylés [^{14}C] , avec le moût de fermentation du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum, libère un produit qui commigre, en chromatographie sur papier dans la système solvant de FISCHER et NEBEL (24), avec GlcNAc - Asn - N-acétyl [^{14}C] témoin .

D'autre part, l'incubation avec les glycopeptides de la sérotransferrine renfermant des résidus de galactose tritiés en position terminale non réductrice, libère un produit qui commigre avec l'oligosaccharide biantenné [^3H] (Gal) $_2$ (GlcNAc) $_2$ (Man) $_3$ GlcNAc témoin .

Ces résultats montrent que le moût de fermentation renferme une enzyme répondant à la définition d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.96, voir définition page 20) .

En plus de cette enzyme, nous avons détecté des activités protéasiques, α -D-neuraminidasiques, α -D-mannosidasiques, β -D-galactosidasiques, N-acétyl- β -D-glucosaminidasiques, et β -D-glucosidasiques .

B - ULTRAFILTRATION

1,5 l de moût de fermentation sont concentrés à 300 ml par ultrafiltration dans une cellule Amicon équipée d'une membrane FM 10 (seuil de

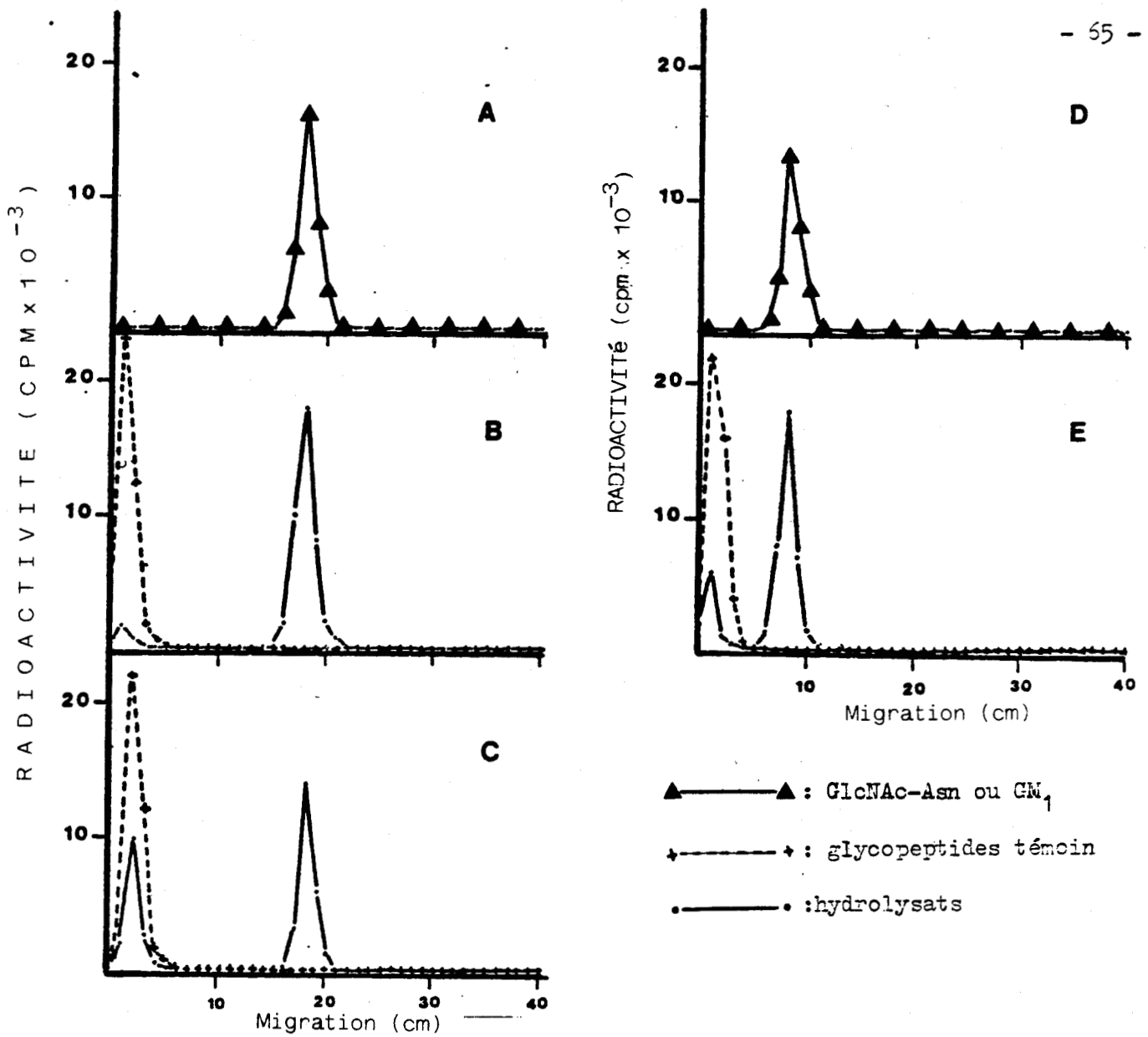


Figure 13 : Test d'activité Endo dans le moût de fermentation : analyse par chromatographie sur papier .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 59)

A : GlcNAc-Asn N-acétylé [¹⁴C] témoin

B : hydrolyse des asialoglycopeptides de la sérotransferrine [¹⁴C]

C : hydrolyse de glycopeptides de l'ovalbumine [¹⁴C]

D : [³H]Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc témoin

E : hydrolyse des asialoglycopeptides de la sérotransferrine [³H]



pour A, B, et C la migration est de 18 heures . Pour D et E elle est de 5 jours

rétenion 10 000 de masse moléculaire) . Cette solution est ensuite dialysée contre 2 l de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 .

C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HYDROXYAPATITE-ULTROGEL

50 ml de la solution précédente sont chromatographiés sur hydroxyapatite, comme décrit page 45. Le profil d'élution obtenu est représenté dans la figure 14 page 67.

A cette étape de purification, les activités Endo sur les substrats de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique sont éluées par un tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 6,8 , alors que la plupart des exoglycosidases, en particulier la β -D-glucosidase, la β -D-galactosidase et la N-acétyl- β -D-glucosaminidase ne sont pas adsorbées sur la colonne . Cependant, une partie des β -D-glucosidases, des α -D-mannosidases et des N-acétyl- β -D-glucosaminidases sont adsorbées et élues en même temps que l'Endo .

En conclusion, la chromatographie sur hydroxyapatite permet d'obtenir une fraction enzymatique renfermant l'Endo débarrassée en majeure partie des exoglycosidases contaminantes . Elle permet surtout d'éliminer la plupart des pigments contenus dans le moût de fermentation .

Les fractions renfermant l'activité Endo sont rassemblées, puis concentrées à 50 ml par ultrafiltration sur une membrane Amicon PM 10 et dialysées contre le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 .

A cette étape de purification, le facteur d'enrichissement est de 6,8 pour l'activité sur les substrats de type oligomannosidique et de 4,7 pour l'activité sur les substats de type N-acétyllactosaminique .

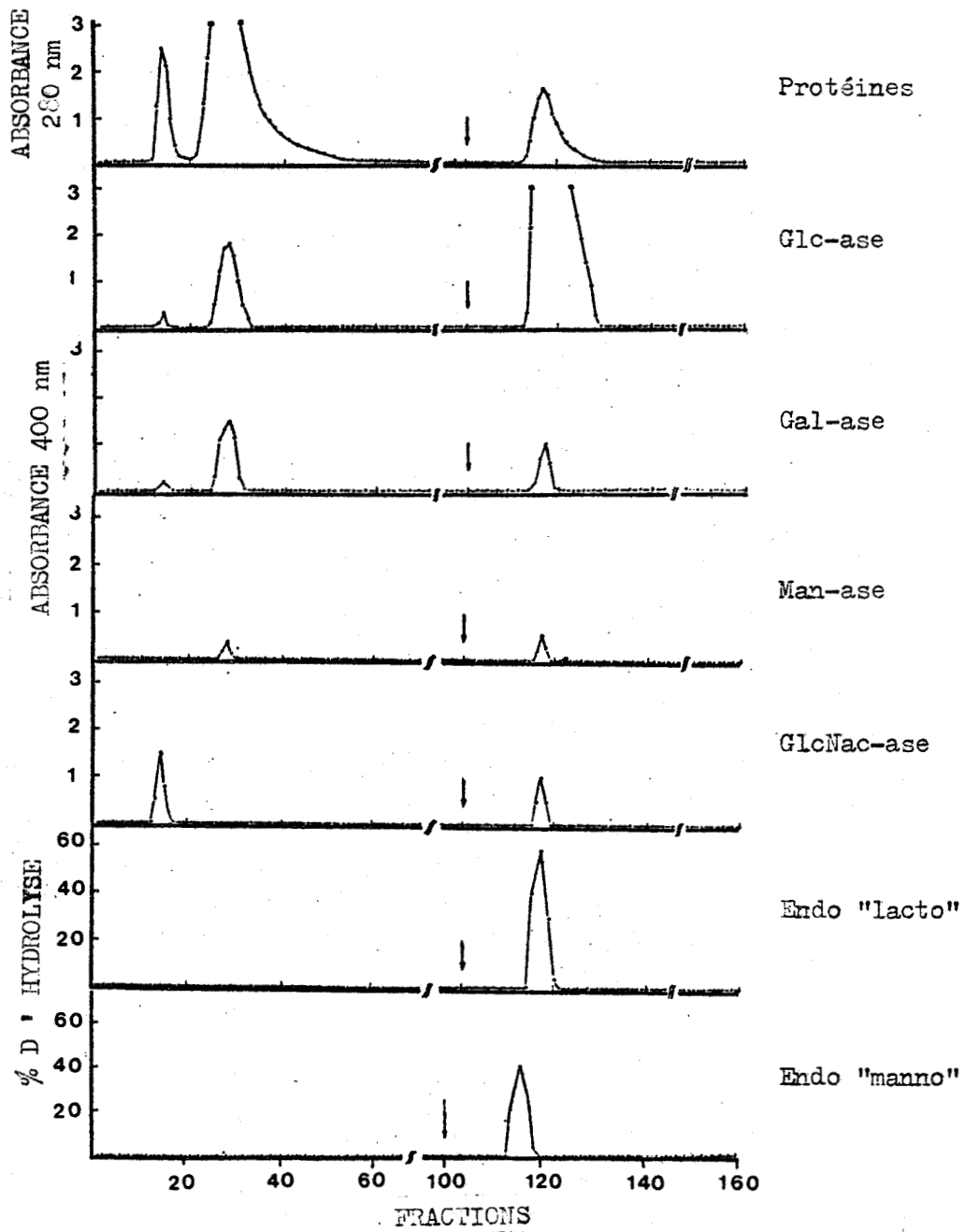


Figure 14 : Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite-Ultrogel .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 45)

Les flèches indiquent le changement de tampon phosphate de sodium 0,2 M , pH 6,8 .



D - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-TRISACRYL M

40 ml de la solution enzymatique obtenue à l'étape précédente, sont chromatographiés sur une colonne de DEAE-trisacryl dans les conditions décrites page 45 .

Comme le montre la figure 15 page 69, une partie des exoglycosidases, en particulier les glucosidases et certaines N-acétyl- β -D-glucosaminidases, sont éluées par le tampon d'équilibration . Une autre partie des exoglycosidases est éluee au début du gradient de force ionique .

Les activités Endo sont éluées par le gradient de force ionique, contaminées par une faible activité N-acétyl- β -D-glucosaminidasique . La β -galactosidase est éluee à la fin du gradient .

Les fractions renfermant les activités Endo, sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur une membrane PM 10 .

A cette étape de purification, le facteur d'enrichissement est de 120,8 pour l'activité sur les substrats de type oligomannosidique et de 145,6 pour l'activité sur les substrats de type N-acétyllactosaminique .

E - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE BIOGEL-AGAROSE A 0.5 M

5 ml de la fraction enzymatique obtenue précédemment sont chromatographiés sur Biogel-agarose dans les conditions décrites page 45 .

La figure 16 page 70, montre que les deux activités Endo sont éluées avant les activités exoglycosidasiques, mais celles-ci sont encore contaminées par une faible activité N-acétyl- β -D-glucosaminidasique .

Les fractions renfermant les activités Endo, sont rassemblées puis concentrées à 5 ml par ultrafiltration sur une membrane Amicon PM 10 .

A cette étape de purification, le facteur d'enrichissement est de 342,9 pour l'activité sur les substrats de type oligomannosidique et de 380,0 pour l'activité sur les substrats de type N-acétyllactosaminique .

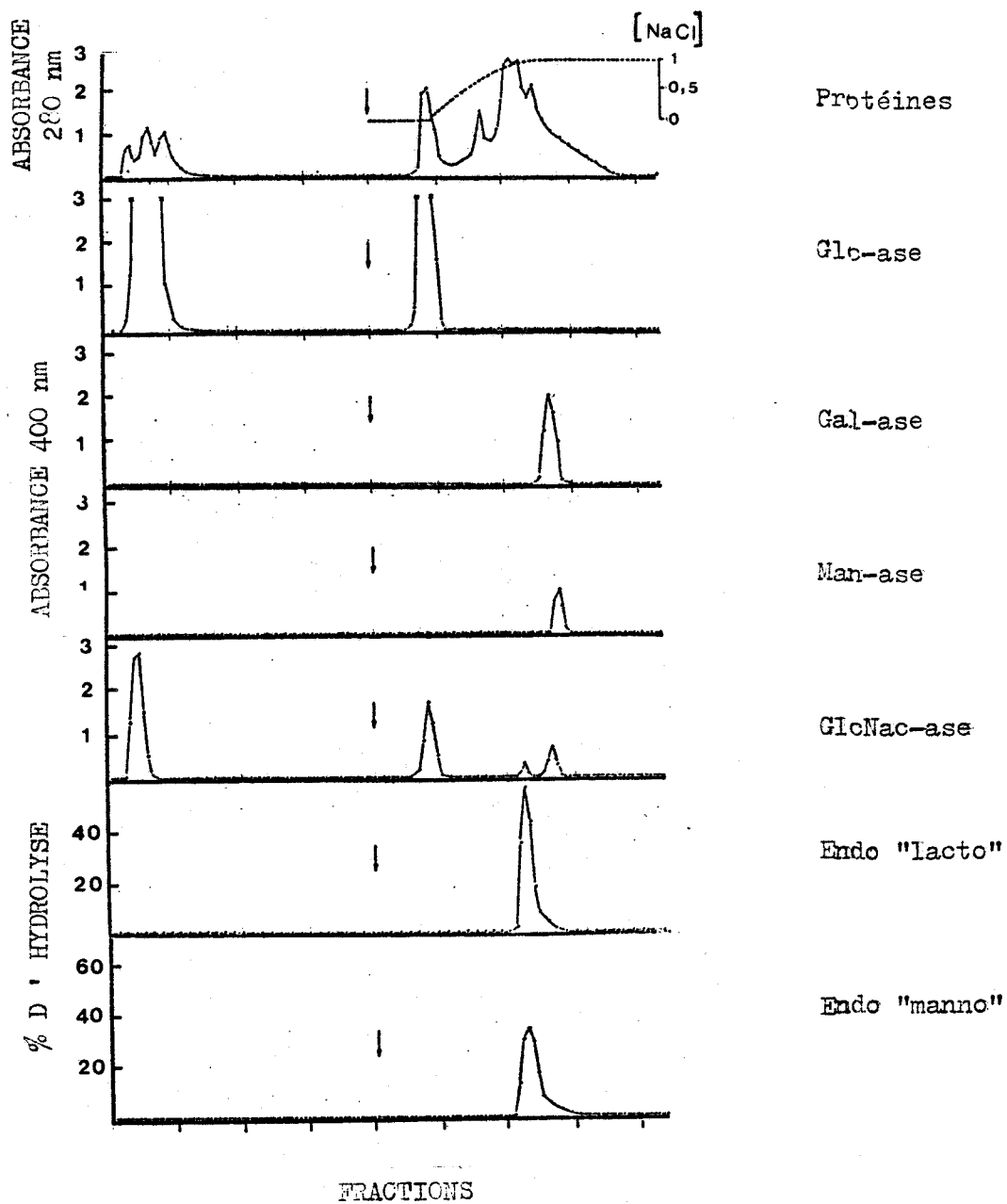


Figure 15 : Chromatographie sur colonne de DEAE-trisacryl M .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 45)

Les flèches indiquent l'application du gradient de NaCl

de 0 à 1 M .



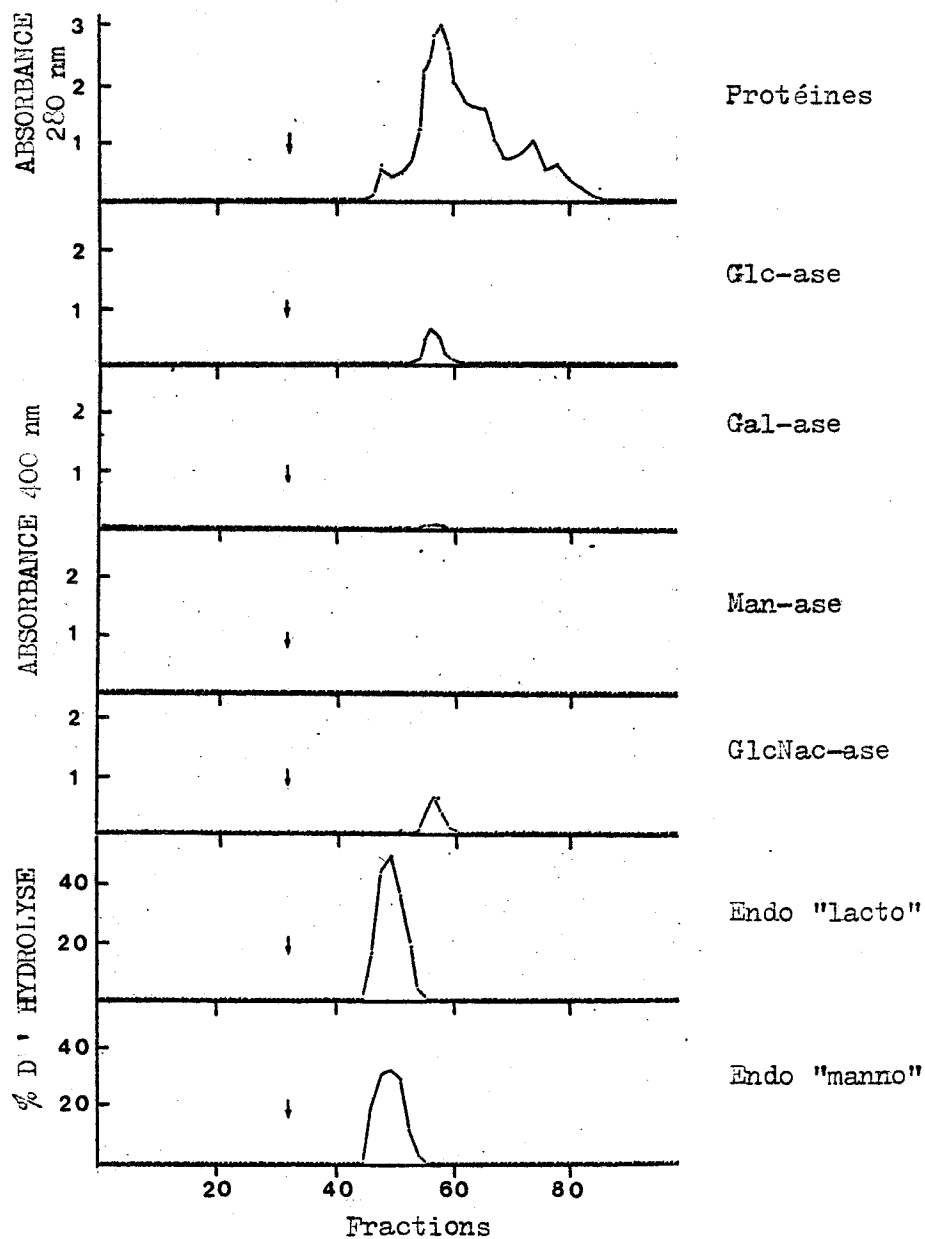


Figure 16 : Chromatographie sur colonne de Biogel-agarose A 0.5 M .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 45)

Les flèches indiquent le volume mort de la colonne .



F - TENTATIVE DE SEPARATION DES DEUX ACTIVITES ENDO-N-ACETYL- β -D-
GLUCOSAMINIDASIQUES

Les méthodes chromatographiques que nous venons de décrire ne permettent pas de séparer l'activité Endo sur les substrats de type oligomannosidique, de l'activité Endo sur les substrats de type N-acétyllactosaminique . Nous avons essayé 3 autres méthodes chromatographiques pour vérifier si celles ci sont dissociables :

1 - Chromatofocalisation

1 ml de la fraction enzymatique obtenue après chromatographie sur hydroxyapatite, sont soumis à une chromatofocalisation . Le principe et le protocole expérimental de cette technique sont décrits à la page 47.

Comme le montre la figure 17 page 72, plusieurs pics de protéines sont élués dans la zone de pH comprise entre 7,4 et 4,8 . Une faible activité Endo (inférieure à 7 p. 100 d'hydrolyse) sur les deux types de substrats est éluee sur toute l'étendue du gradient . La quasi totalité des deux activités Endo est adsorbée sur la colonne, et est éluee par une solution de NaCl 1 M .

Cette technique ne permet donc pas de séparer les deux activités Endo, mais elle permet de savoir que leur pH_1 est inférieur à 4,8 .

2 - Isoélectrofocalisation en veine liquide

2 ml de la fraction enzymatique obtenue après chromatographie sur hydroxyapatite, sont soumis à une isoélectrofocalisation selon la méthode décrite à la page 46 .

Le gradient de pH formé par les ampholines se situe entre pH 7,0 et pH 2,5 . Comme nous le montre la figure 18 page 72, les deux activités

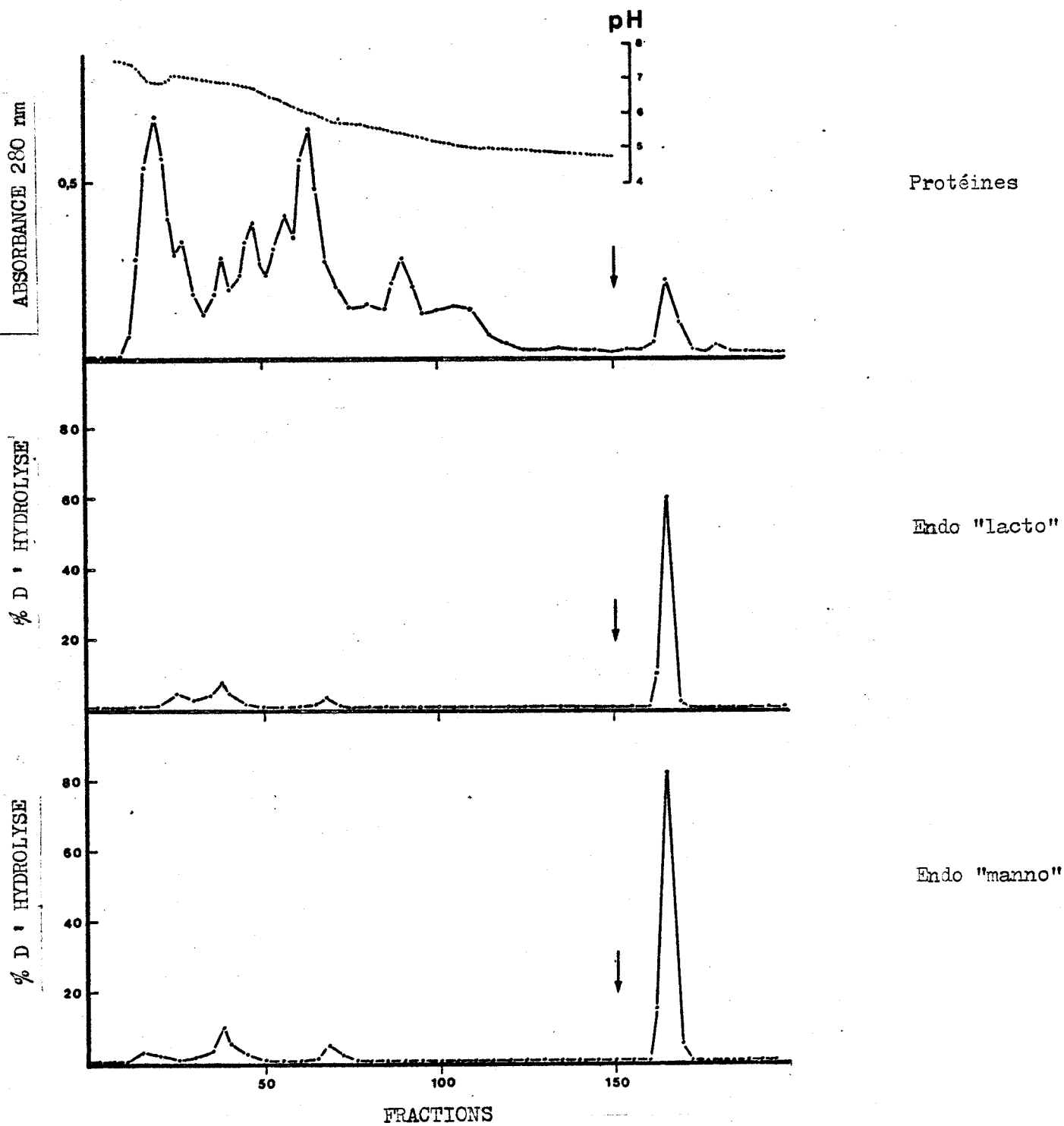


Figure 17 : Chromatofocalisation .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 47)

Les flèches indiquent l'application de solution de NaCl 1 M .



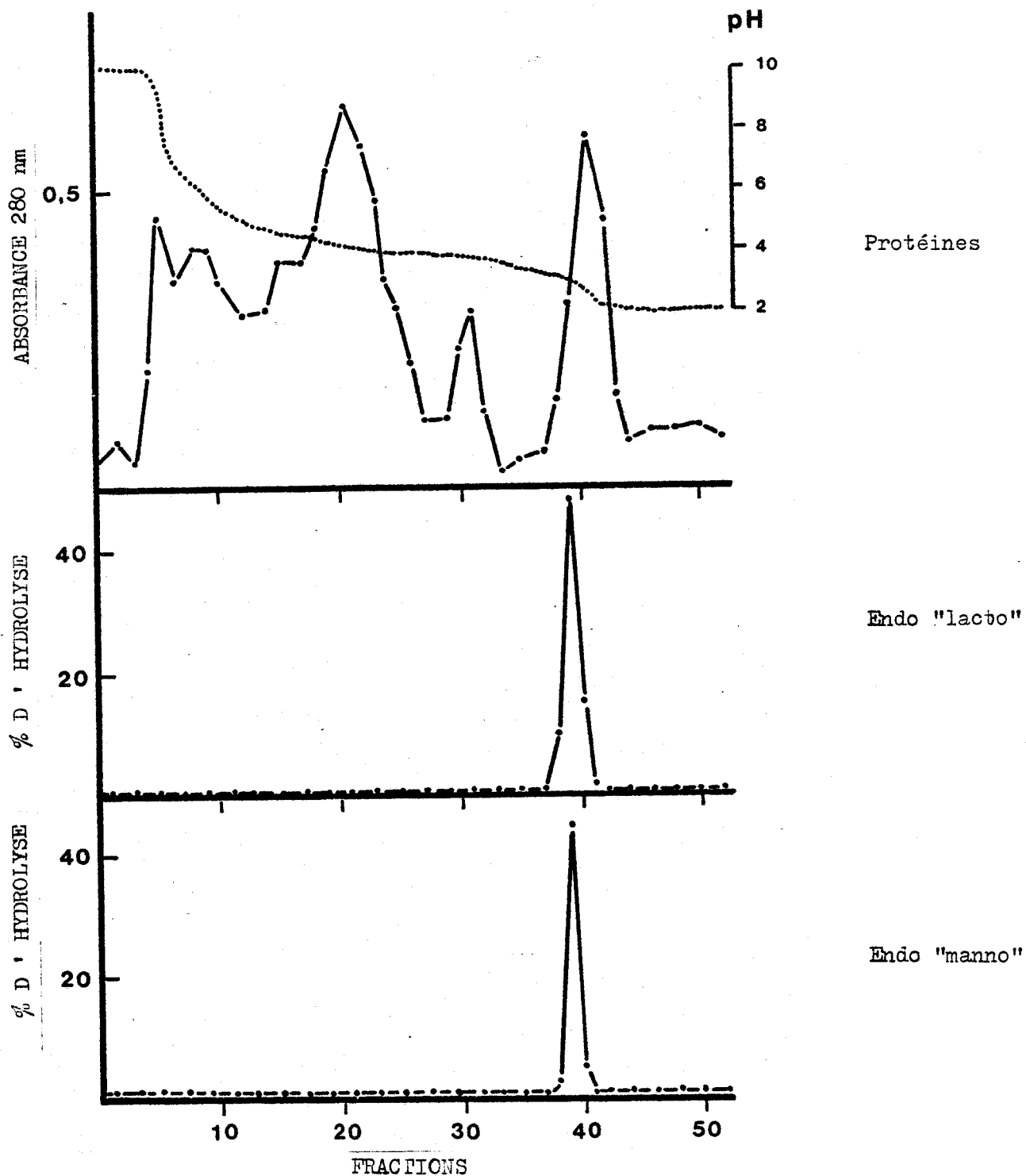


Figure 18 : Isoélectrofocalisation en veine liquide .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 46) .



oligomannosidique et N-acétyllactosaminique se retrouvent à l'anode, dans la zone de pH 2,9 . Cette valeur de pH est trop près de la zone de pH inférieur limite des ampholines, pour être considérée comme étant la valeur du pH_i de l'enzyme .

3 - Chromatographie d'affinité

Nous avons aussi tenté de séparer les deux activités Endo par chromatographie d'affinité sur glycopeptides de la sérotransferrine ou de l'ovalbumine, insolubilisé selon la méthode décrite page 48.

Pour cette expérience, il est nécessaire d'utiliser une préparation d'Endo débarrassée des exoglycosidases ; nous avons donc choisi la fraction enzymatique obtenue après chromatographie sur Biogel agarose A 0,5M .

Comme le montre la figure 19 page 75, les glycopeptides insolubilisés sur Sepharose 4B, peuvent encore être hydrolysés par l'Endo ; en effet l'incubation des Sepharose-4B-glycopeptides avec l'enzyme, libère des oligosaccharides qui migrent en chromatographie sur couche mince, soit comme $(Gal)_2(GlcNAc)_2(Man)_3GlcNAc$ dans le cas de la sérotransferrine (fig 19C et D), soit avec $(Man)_6GlcNAc$ dans le cas de l'ovalbumine (fig 19E et F) . Les figures 19A et H montrent bien l'absence de glycopeptides libres dans le milieu .

La figure 19 montre que le substrat insolubilisé est aussi reconnu par l'enzyme à 4°C, mais la vitesse d'hydrolyse est nettement plus faible qu'à 37°C . Afin de limiter la dégradation des substrats, nous avons réalisé les chromatographies sur colonne à 4°C .

Sur colonne de Sepharose 4B-asialoglycopeptides de sérotransferrine, les deux activités Endo sont éluées ensemble, avec un léger décalage par rapport au volume mort de la colonne (fig 20A, page 76) .

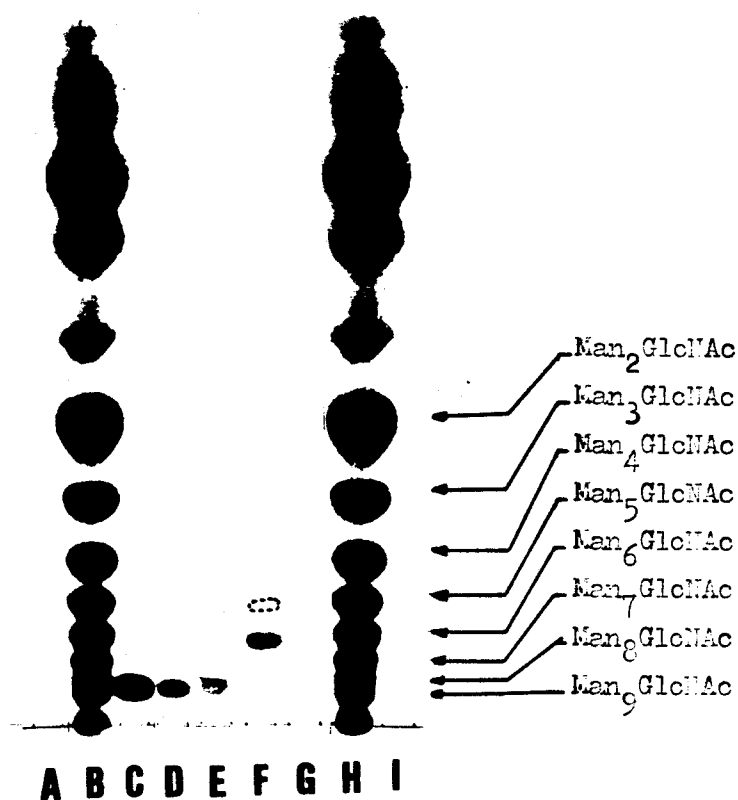


Figure 19 : Tests d'activité Endo sur les glycopeptides immobilisés sur Sepharose-4B : analyse par chromatographie sur couche mince .

- A : Eau de lavage de Sepharose-4B-glycopeptides de sérotransferrine
- B : $(Gal)_2(GlcNAc)_2(Man)_3GlcNAc$ témoin
- C : Sepharose-4B-glycopeptides de sérotransferrine + Endo à 37°C
- D : Sepharose-4B-glycopeptides de sérotransferrine + Endo à 4°C
- E : Sepharose-4B-glycopeptides d'ovalbumine + Endo à 37°C
- F : Sepharose-4B-glycopeptides d'ovalbumine + Endo à 4°C
- G : Mannosides témoins
- H : Eau de lavage de Sepharose-4B-glycopeptides d'ovalbumine



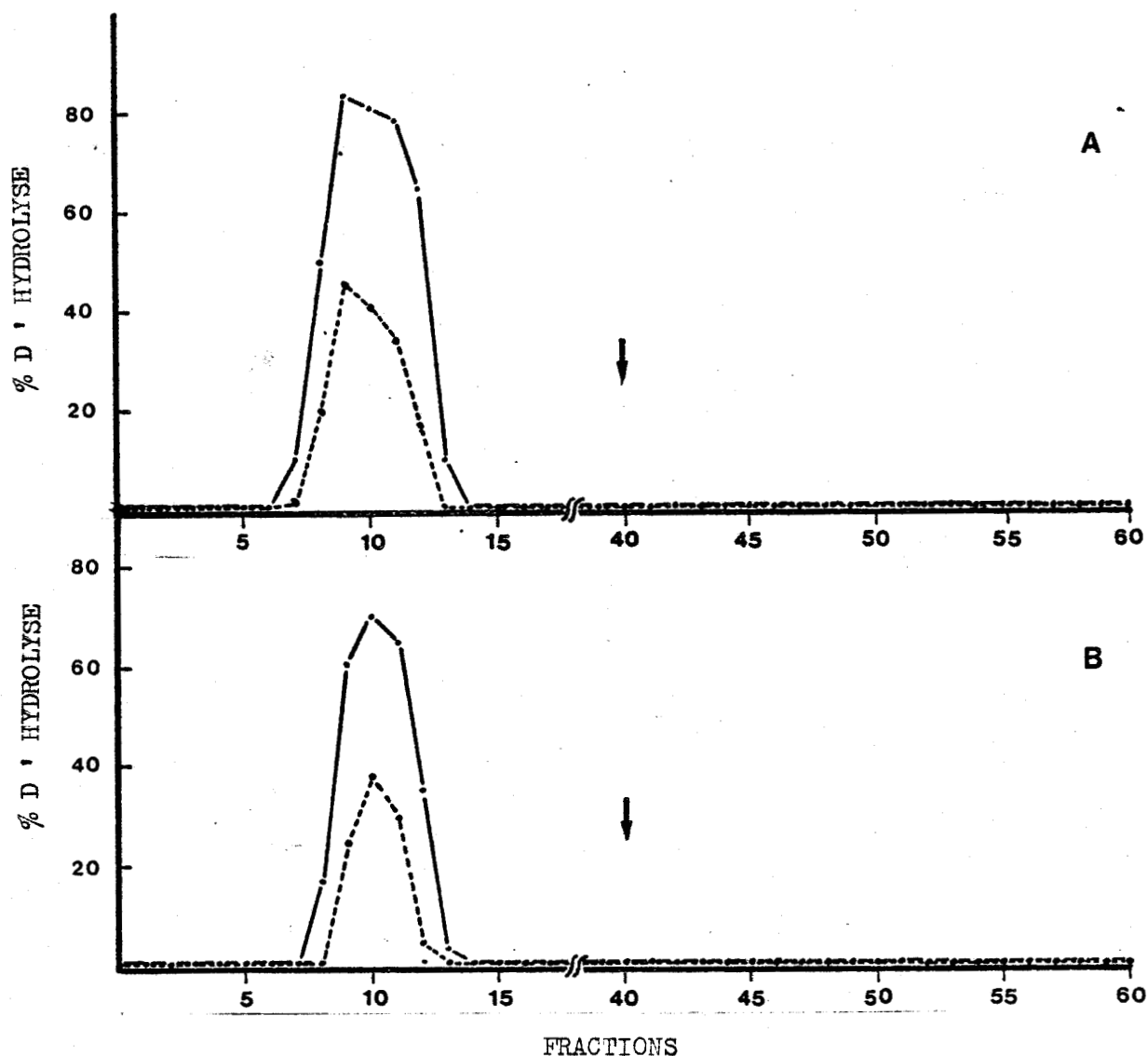


Figure 20 : Chromatographies d'affinité .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 48)

- ——— • : activité N-acétyllactosaminique
- - - - - • : activité oligomannosidique

A : colonne de Sepharose 4B-glycopeptides de la sérotransferrine

B : colonne de Sepharose 4B-glycopeptides de l'ovalbumine

Les flèches indiquent l'application du tampon contenant NaCl 0,5 M .



Les mêmes résultats sont obtenus avec la colonne de Sepharose 4B-glycopeptides d'ovabumine (fig 20B, page 76) .

G - DISCUSSION SUR LA PURIFICATION DE L'ENZYME

Comme nous venons de voir, les méthodes classiques de purification d'enzymes, nous ont permis d'éliminer la plupart des protéines contaminantes, afin d'obtenir une fraction enrichie en endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase .

L'étape de purification sur hydroxyapatite Ultrogel nous a permis d'éliminer les pigments qui gênent énormément la purification des produits d'hydrolyse .

Les exoglycosidases sont éliminées tout au long de la purification . Seule une faible activité exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique est éluee avec l'Endo . Cette contamination est toujours présente, même après une purification plus longue (39) ; elle est aussi observée dans d'autres préparations d'Endo, comme l'Endo F₁ et F₂ et l'Endo de l'oviducte de poule (57, 115) .

Les activités Endo sur les substrats de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique, sont toujours éluees ensemble avec un enrichissement semblable tout au long de la purification . Les autres méthodes de purification, comme la chromatofocalisation, l'isoélectrofocalisation, la chromatographie d'affinité et la chromatographie d'affinité à basse température réalisée par JAISON (39), n'ont pas permis de séparer ces deux activités . Ces premiers résultats sont donc en faveur d'une seule enzyme responsable des deux activités .

Les tableaux VI et VII pages 78 et 79, résument les étapes de la purification . Nous avons choisi la fraction obtenue après chromatographie sur Biogel agarose A 0,5 M, pour étudier les propriétés de l'Endo .

Tableau VI : Tableau de purification de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase : Activité oligomannosidique

	protéines (mg)	volumes (ml)	activité totale (mU)	activité spécifique (mU/mg)	purification	rendement %
milieu de culture	6750	5000	143,5	0,021	1	100
concentration sur PM 10	1160	200	116,1	0,100	4,7	81
HA-Ultrogel	470,9	125	68,1	0,145	6,8	47
DEAE-trisacryl M	13,46	57	34,5	2,56	120,8	24
agarose A 0,5 M	3,13	5	22,8	7,27	342,9	16



Tableau VII : Tableau de purification de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase : activité N-acétyllactosaminique

	protéines (mg)	volumes (ml)	activité totale (mU)	activité spécifique (mU/mg)	purification	rendement %
milieu de culture	6750	5000	324	0,048	1	100
concentration sur PM 10	1160	200	265,64	0,229	4,7	82
HA-Ultrogel	470,9	125	185,06	0,393	8,2	57
DEAE-trisacryl M	13,46	57	94,04	6,99	145,6	29
agarose A 0,5 M	3,13	5	57,10	18,24	380	18



II - MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES CONTAMINANTES

Avant d'étudier les propriétés de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosidase du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum, sur la fraction obtenue après chromatographie sur Biogel A 0.5 M, nous avons recherché les activités contaminant encore cette préparation .

A - ACTIVITES PROTEASIQUES

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour détecter l'activité protéasique ; les protocoles sont décrits à la page 55 .

En utilisant la sérotransferrine et l'ovalbumine natives, marquées à l'iode 125, comme substrat, nous avons détecté une activité protéasique inférieure à 1% d'hydrolyse après 45 heures d'incubation à 37°C ou 50°C .

L'analyse en électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'hydrolysât de la sérum albumine bovine par la préparation enzymatique, ne met pas en évidence de fragments peptidiques plus petits .

Ces résultats montrent que la préparation enzymatique ne renferme pas d'activité protéasique détectable .

B - ACTIVITES NEURAMINIDASIIQUES

Le dosage par la méthode d'AMINOFF (1), nous donne une activité neuraminidasique ayant une activité spécifique de l'ordre de 10^{-6} U / mg de protéines .

Comme le montre la figure 21 page 81, quand le sialyllactose est incubé avec la préparation enzymatique, l'analyse par chromatographie sur couche mince montre qu'il n'y a pas libération de lactose (fig 21 B), contrairement à ce que l'on observe quand le sialyllactose est incubé

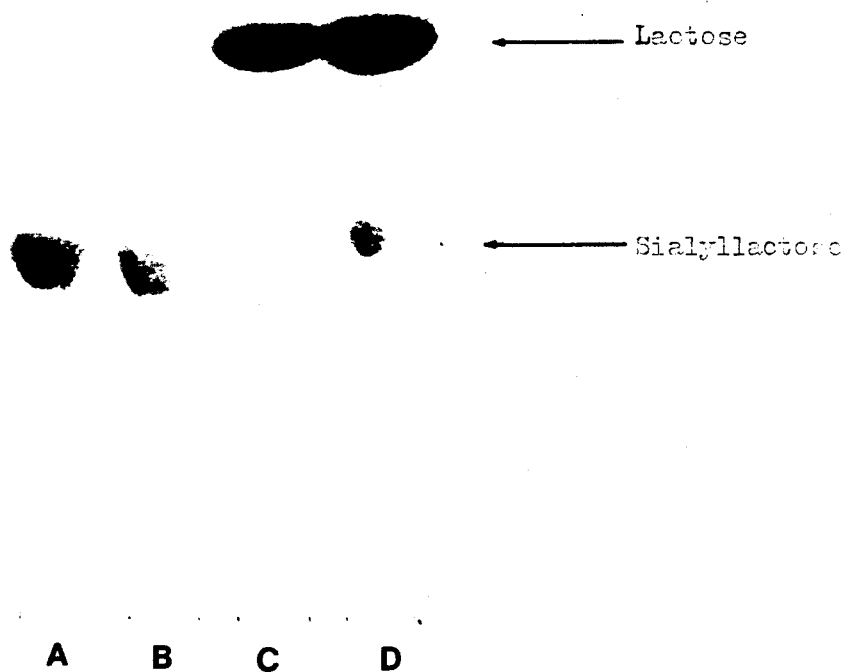


Figure 21 : Test d'activité α -neuraminidasique sur le
sialyllactose : analyse par chromatographie sur
couche mince .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 56)

- A : sialyllactose témoin
- B : sialyllactose + Endo
- C : lactose témoin
- D : sialyllactose + neuraminidase



avec $2,2 \cdot 10^{-6}$ U de neuraminidase isolée de vibrio cholerae (Boehringer), (fig 21 D) .

Ces résultats montrent que la fraction enzymatique renferme une quantité négligeable de neuraminidase .

C - ACTIVITES β -GALACTOSIDASIQUES

Pour rechercher les activités β -galactosidasiques, nous avons utilisé plusieurs méthodes dont les protocoles expérimentaux sont décrits à la page 37 .

Comme le montre le tableau VIII, page 83, nous n'avons détecté qu'une activité β -galactosidasique négligeable .

Quand l'oligosaccharide $[^3\text{H}] (\text{Gal})_2 (\text{GlcNAc})_2 (\text{Man})_3 \text{GlcNAc}$, ou les glycopeptides de la sérotransferrine renfermant des résidus de galactose tritiés en position terminale non réductrice, sont mélangés avec la préparation enzymatique, nous n'avons pas observé de libération de galactose radioactif, contrairement à ce que l'on observe lorsque ces mêmes substrats sont incubés avec la β -D-galactosidase isolée de la fève Jack (fig 22 p 84) .

Ces résultats montrent que la préparation enzymatique ne contient pas d'activité β -galactosidasique détectable .

D - ACTIVITES N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASQUES

Les conditions expérimentales sont décrites à la page .

Comme le montre le tableau VIII page 83 , avec le pNP-GlcNAc, nous avons détecté une faible activité N-acétyl- β -D-glucosaminidasique .

Cette activité est toujours présente dans la préparation d'Endo, même après une purification plus poussée . En effet, d'après les travaux de JAISSON (39), la chromatographie d'affinité sur ϵ -amino-caproyl-N-acétyl- β -D-glucosaminylamine couplée sur sepharose 4B, n'a pas permis d'éliminer cette contamination .

Tableau VIII : Test d'activité exoglycosidasique sur les
p-nitrophénylglycosides .

(les conditions expérimentales sont décrites
à la page 57)

	Gal-ase	GlcNac-ase	Man-ase
ACTIVITE SPECIFIQUE (U/mg)	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$0,15 \cdot 10^{-6}$



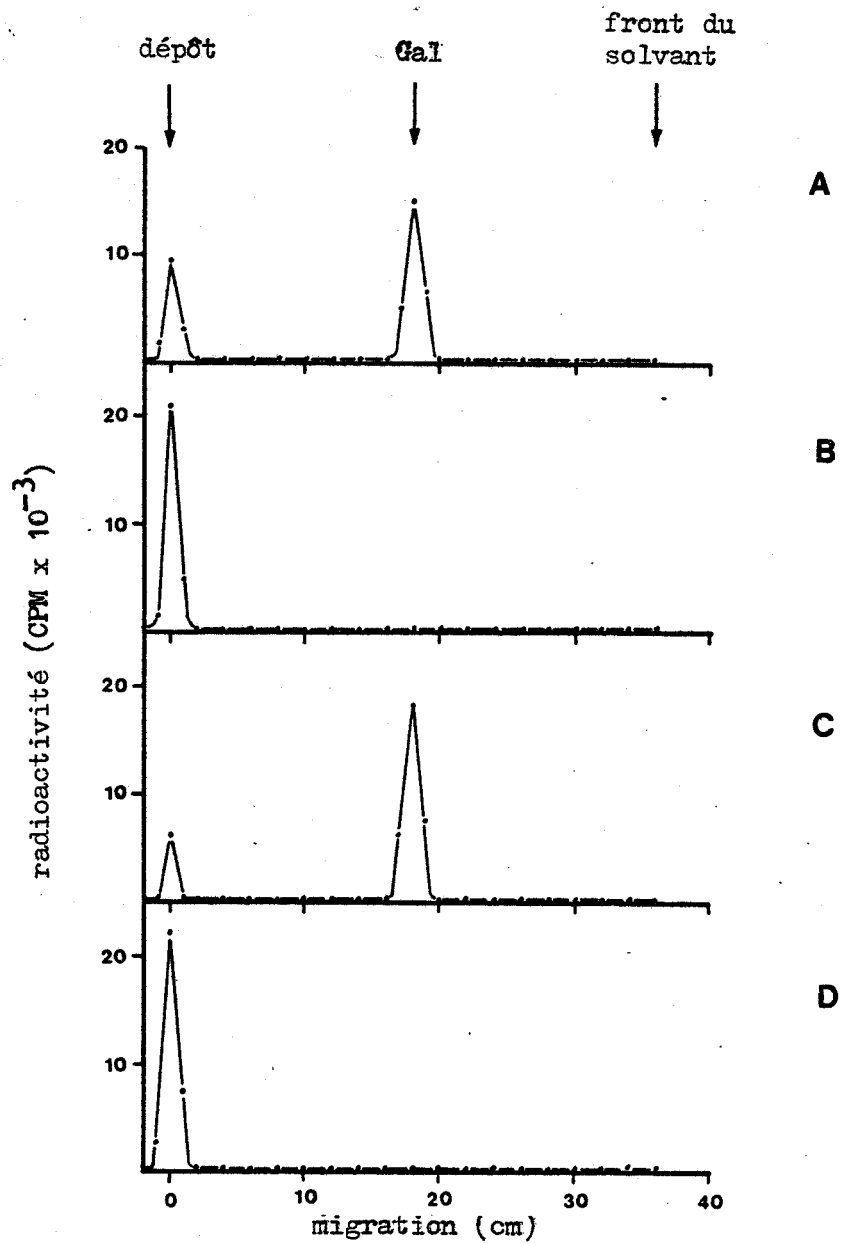


Figure 22 : Test d'activité galactosidasique : analyse par chromatographie sur papier .

(Les conditions expérimentales sont décrites à la page 57)

- A : $[^3\text{H}] (\text{Gal})_2(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$ + galactosidase
- B : $[^3\text{H}] (\text{Gal})_2(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$ + Endo
- C : Glycopeptides Gal $[^3\text{H}]$ + galactosidase
- D : Glycopeptides Gal $[^3\text{H}]$ + Endo



Cette activité $\text{exo-N-acétyl-}\beta\text{-D-glucosaminidasique}$ est particulière elle n'est que très peu inhibée par la $\text{N-acétyl-glucosaminolactone}$ qui est un inhibiteur puissant des $\text{N-acétyl-}\beta\text{-D-glucosaminidases}$ (tableau IX page 86).

Quand des oligosaccharides renfermant des résidus de $\text{N-acétylglucosamine}$ liés par des liaisons (1-4) ou (1-2) en position terminale non réductrice, sont incubés avec la préparation enzymatique, nous n'avons pas observé de dégradation (fig 23C p 87), alors que dans les mêmes conditions (même pourcentage d'hydrolyse du pNP-GlcNAc que la préparation d'Endo), l'exoglycosidase isolée de fève Jack libère des oligosaccharides plus petits (fig 23 A p 87) .

Ces résultats montrent que la préparation enzymatique renferme une activité $\text{exo-N-acétyl-}\beta\text{-D-glucosaminidasique}$, active uniquement sur le pNP-GlcNAc . Cette contamination ne sera donc pas gênante pour l'étude des spécificités de l' $\text{endo-N-acétyl-}\beta\text{-D-glucosaminidase}$, réalisée sur des substrats naturels .

E - ACTIVITES $\alpha\text{-D-MANNOSIDASIQUES}$

Pour détecter les activités $\alpha\text{-mannosidasiques}$, nous avons utilisé des substrats synthétiques (pNP-Man) et des substrats naturels (mannosides) . Les conditions expérimentales sont décrites à la page 59 .

Les résultats représentés dans le tableau VIII page 83 , montre que nous n'avons pas détecté d'activité $\alpha\text{-mannosidasique}$ sur le pNP-Man .

Les résultats de l'hydrolyse de l'oligosaccharide $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$ sont représentés dans la figure 24 page 88. Nous n'avons pas observé de dégradation de l'oligosaccharide quand il est incubé avec la préparation d'Endo, contrairement à ce que l'on observe avec l' $\alpha\text{-mannosidase}$ isolée de fève Jack .

Tableau IX : Influence de la N-acétylglucosaminolactone sur l'activité
 exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique de la préparation
 d'Endo et de l'exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase purifiée
 de fève Jack .

	exoglycosidases de la fève Jack	préparation d'Endo
témoin pNP-GlcNAc	0,036	0,036
témoin enzyme	0,012	0,010
enzyme + lactone	0,026	0,028
enzyme + pNP-GlcNAc	2,4	0,11
enzyme + pNP-GlcNAc + lactone	0,070	0,095



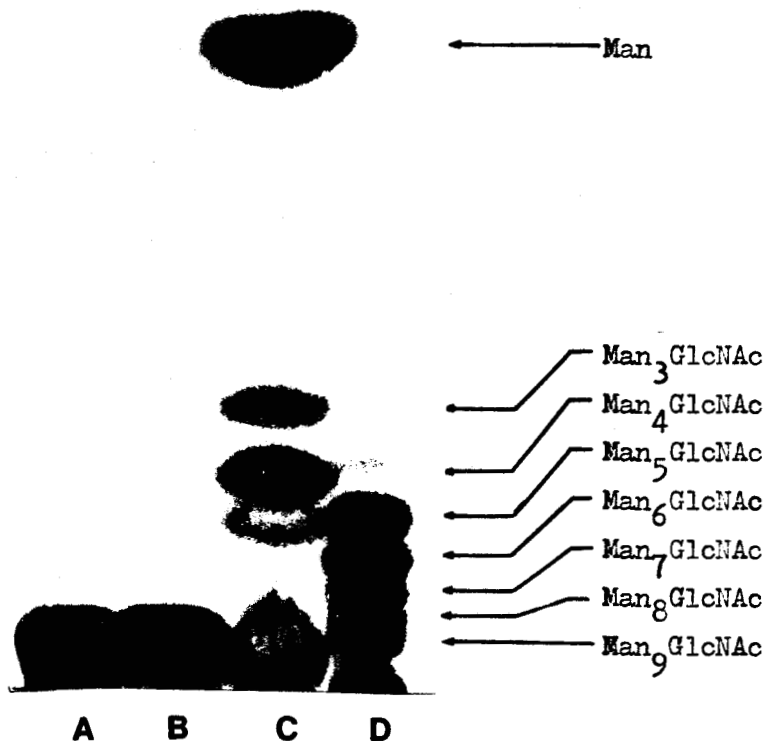


Figure 24 : Test d'activité α -mannosidasique sur $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$:

analyse par chromatographie sur couche mince .

(l'hydrolyse est effectuée avec 0,01 ml de préparation d'Endo ou 0,01 ml d' α -mannosidase de fève Jack et 0,06 mg d'oligosaccharides pendant 1 heure à 60°C .

La chromatographie est réalisée dans le solvant n butanol/acide acétique/eau (2:1:1) avec trois migrations successives)

- A : $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$ + Endo
 B : $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$ témoin
 C : $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$ + mannosidase de la fève Jack
 D : mannosides témoins



Ces résultats montrent que la préparation d'Endo ne renferme pas d'activité α -D-mannosidique détectable .

F - DISCUSSION SUR LA PURETE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE

La préparation d'Endo obtenue après chromatographie sur Biogel agarose A 0,5M est débarrassée des enzymes contaminantes suivantes : protéases, neuraminidases, β -galactosidases, α -mannosidases et glucosidases (ces dernières sont le but de la production de Basidiomyces par la société La Rapidase) .

Elle renferme encore une faible activité exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase active uniquement sur le pNP-GlcNAc et qui n'est pas éliminée après chromatographie d'affinité sur sepharose 4B- ϵ -aminocaproyl-N-acétyl- β -D-glucosaminyamine (39) . Cette activité est différente des activités exo-N-acétylglucosaminidases classiques car elle n'est pas inhibée par la N-acétylglucosaminolactone . Elle pourrait être une activité secondaire de l'Endo .

D'autres auteurs n'ont pas réussi à éliminer les contaminations par les exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases, en particulier dans le cas des Endo F_I et F_{II} isolées de la sève de figuier (58), de l'Endo d'oviducte de poule (115), et des préparations commerciales d'Endo D (75), mais ces auteurs n'ont pas étudié cette contamination plus précisément .

En conclusion, la préparation enzymatique est débarrassée des principales exoglycosidases et des protéases qui pourraient gêner l'étude des propriétés et de la spécificité de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase .

III - DETERMINATION DES PROPRIETES ENZYMATIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

A - PROPRIETES ENZYMATIQUES

1 - pH optimum

Le pH optimum d'activité sur les deux types de substrats a été déterminé à l'aide de plusieurs solutions tampons dans une zone de pH comprise entre pH 2,5 et pH 9,0 .

Comme le montre la figure 25 page 91 , l'activité enzymatique est optimale à pH 4,5 sur les substrats de type N-acétyllactosaminique, et à pH 5,5 pour les substrats de type oligomannosidique . Ces résultats montrent qu'il y a une différence assez importante entre les pH optimum des deux activités .

Les courbes obtenues montrent aussi que les activités sur les deux types de substrats diminuent rapidement pour des pH inférieurs à 4,0 .

Il est difficile de comparer les pH optimums obtenus avec ceux des autres Endos, cependant, il faut remarquer que l'activité de type N-acétyllactosaminique possède un pH optimum plus acide que l'activité oligomannosidique Ceci est aussi observé pour les autres Endos (voir tableau V, page 37) .

2 - Température optimale

Comme le montre la figure 26 page 92 , l'activité enzymatique est maximale à 60°C pour les deux types de substrats .

Nous ne pouvons pas comparer cette valeur à la température optimale des autres Endos, car aucune étude n'a été réalisée sur ce sujet jusqu'à présent . Les auteurs se limitent à utiliser les enzymes à 37°C .

Nous pouvons aussi constater que les vitesses d'hydrolyse augmentent rapidement pour des températures de 40°C à 60°C .

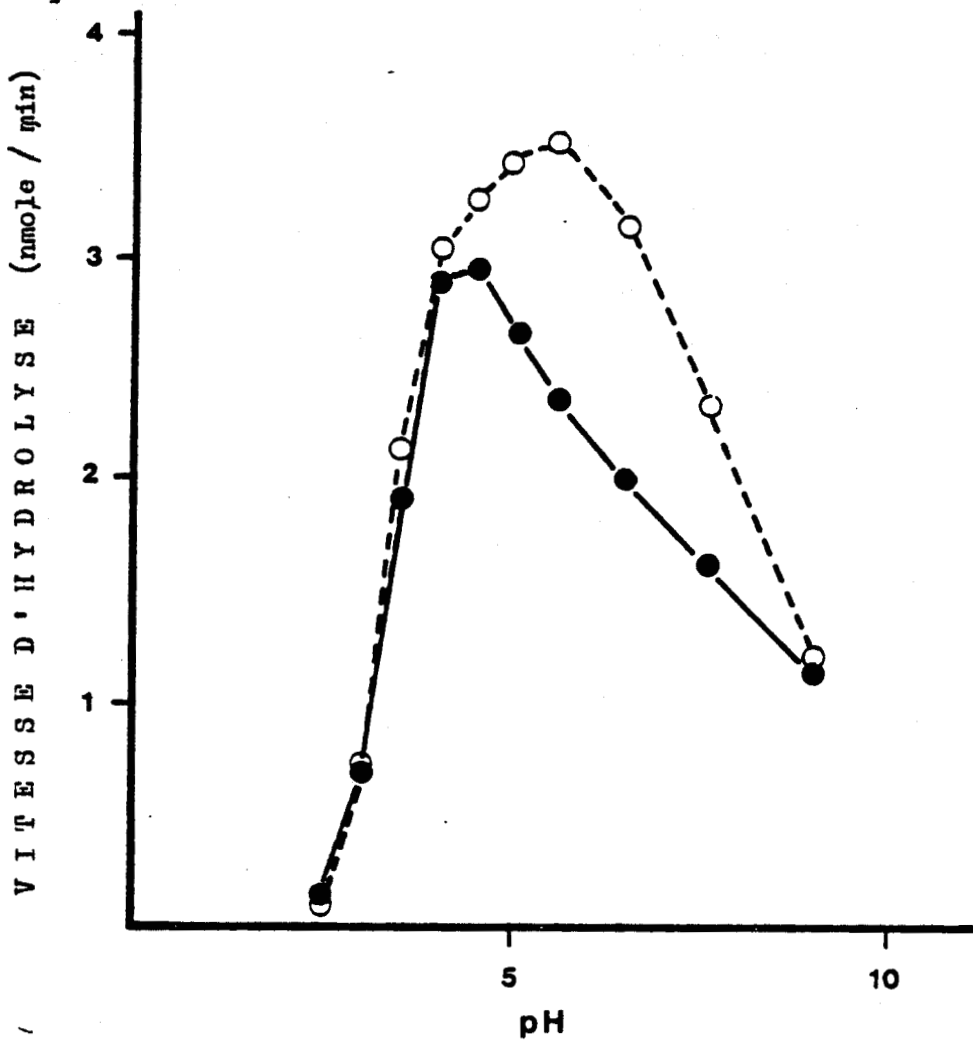


Figure 25 : Détermination du pH optimum

Le pH optimum d'activité Endo sur les substrats de type N-acétyllactosaminique et oligomannosidique est déterminé avec plusieurs solutions tampons dans une zone de pH comprise entre 2,5 et 9,0 . 0,01 ml de fraction enzymatique, préalablement dilués au 1/25^{ème} par les solutions tampon sont ajoutés à 5 nmoles de glycopeptides N-acétylés [¹⁴C] . Le mélange est porté à 37°C pendant 30 minutes . Les produits sont ensuite analysés par chromatographie sur papier .

- — ● : Activité N-acétyllactosaminique
- - - - ○ : Activité oligomannosidique



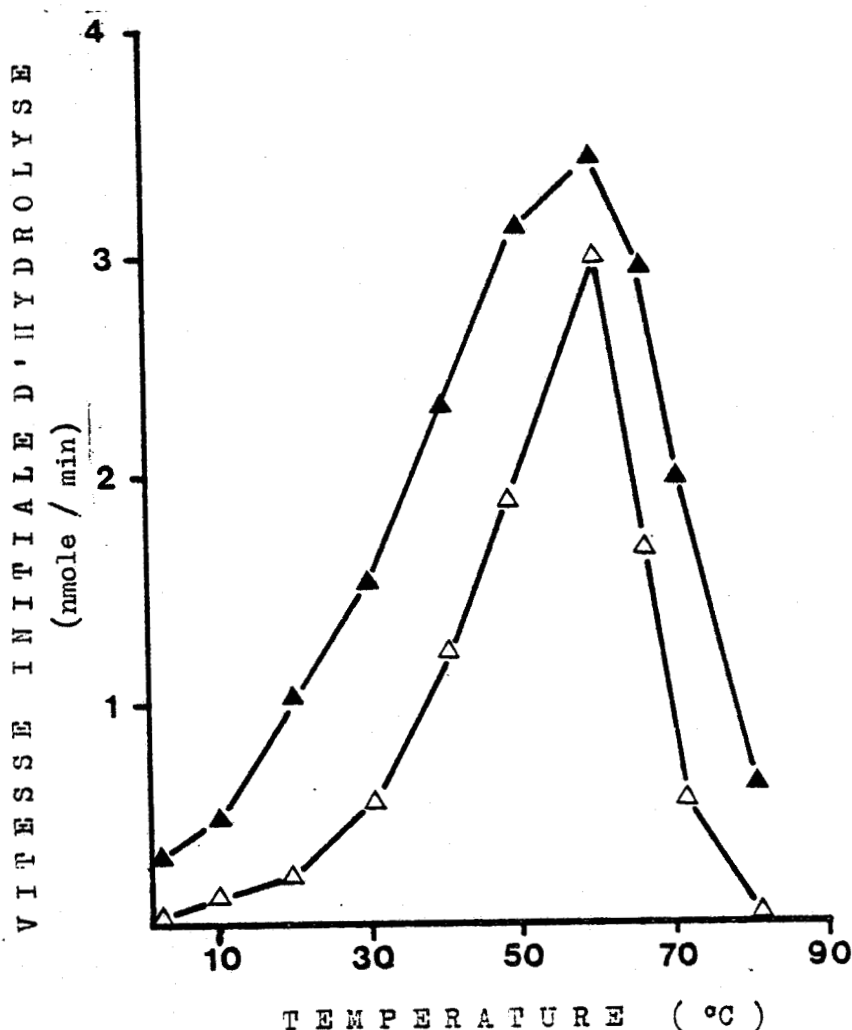


Figure 26 : Détermination de la température optimale d'activité .

0,1 ml de tampon de Mc ILVAINE (62) au pH optimum (4,5 pour l'activité N-acétyllactosaminique et 5,5 pour l'activité oligomannosidique) et 300 nmoles de glycopeptides N-acétylés. $[^{14}\text{C}]$ sont préincubés à différentes températures pendant 5 minutes . 0,05 ml d'enzyme sont alors ajoutés . Pendant des temps variables des aliquotes de 0,01 ml sont prélevés et la réaction est arrêtée par addition, à froid de 0,01 ml de HCl 0,1 N . Les produits d'hydrolyse sont ensuite analysés par chromatographie sur papier dans le solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:1:3) pendant 18 heures .

△—△ : activité N-acétyllactosaminique
▲—▲ : activité oligomannosidique



3 - Paramètres cinétiques : Km et Vmax

La constante de Michaelis (Km) et la vitesse maximale d'hydrolyse (Vmax) ont été déterminées à partir de la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (60) .

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Le Km et le Vmax sont respectivement de 0,67 mM et 0,28 μ mole / min / mg de protéines vis à vis du glycopeptide (Man)₆(GlcNAc)₂Asn .
- Vis à vis du glycopeptide (Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₃(GlcNAc)₂Asn, nous avons obtenu un Km de 0,91 mM et une Vmax de 0,05 μ mole / min / mg de protéines .

D'après ces résultats, nous voyons que l'enzyme présente une affinité et une vitesse d'hydrolyse plus grandes pour les substrats de type oligo-mannosidique .

B - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

1 - Masse moléculaire

La masse moléculaire de l'enzyme a été déterminée par gel-filtration dans les conditions décrites page 63 .

Comme le montre la figure 27 page 94 , les deux activités Endo sont éluées ensemble, entre le pic de l'ovalbumine (Mm 44 000) et le pic de la gamma globuline bovine (Mm 148 000) .

La détermination graphique d'après la droite $\log(Mm) = f\left(\frac{V_e}{V_0}\right)$ représentée dans la figure 28 page 95 , nous donne une masse moléculaire de 89 000 .

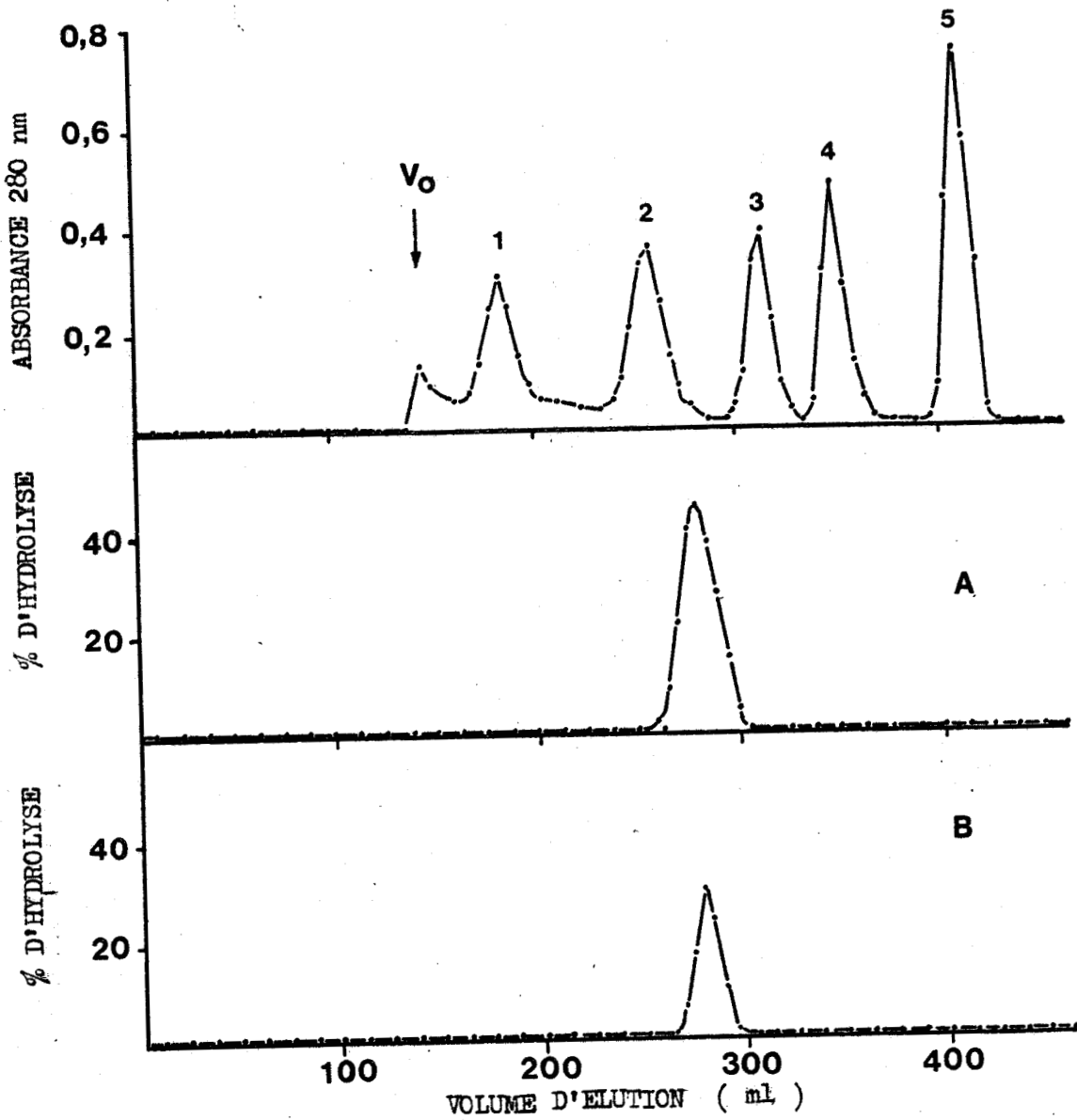


Figure 27 : Détermination de la masse moléculaire

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 63)

A : Témoins d'étalonnage - 1 : thyroglobuline (MM 670 000)

2 : gammaglobuline (MM 108 000) 3 : ovalbumine (MM 44 000)

4 : myoglobuline (MM 17 000) 5 : vitamine B₁₂ (MM 1 350)

B : activité oligomannosidique

C : activité N-acétyllactosaminique

BUS
LILLE

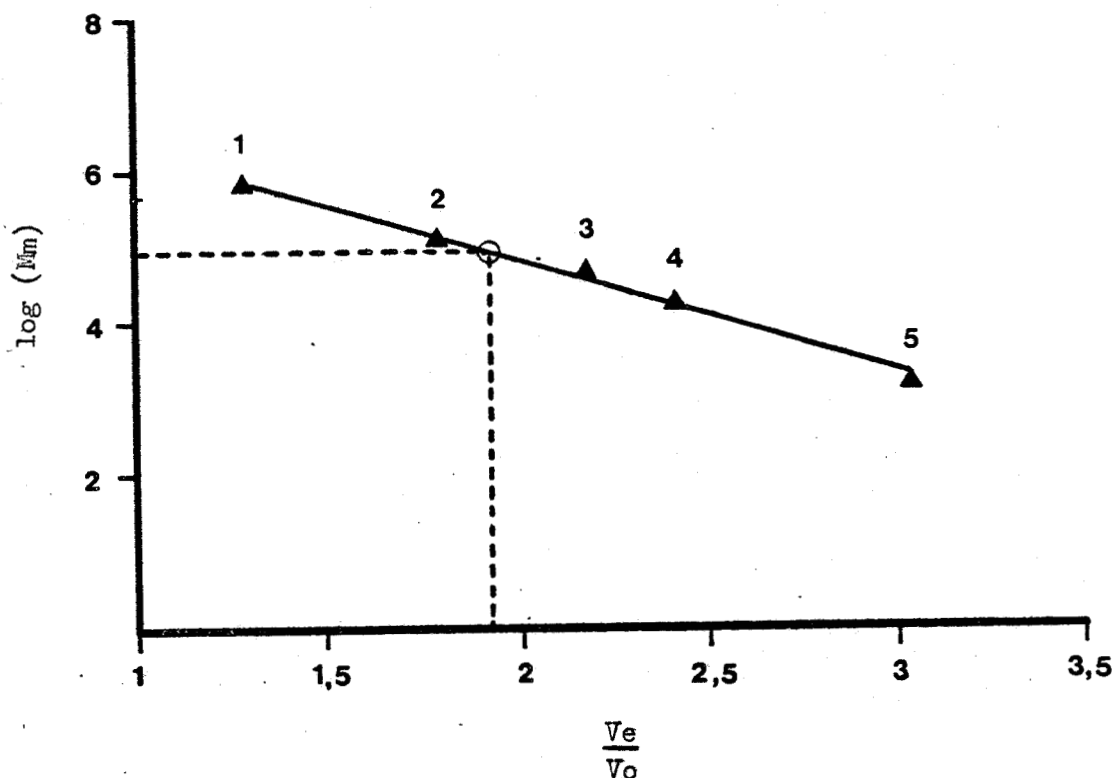


Figure 28 : Détermination de la masse moléculaire : représentation

graphique de $\log(M_m) = f\left(\frac{V_e}{V_o}\right)$

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 63) .

M_m : Masse moléculaire

V_e : Volume d'élution

V_o : Volume mort de la colonne



- | | |
|---|---|
| 1 : Thyroglobuline ($M_m = 670\ 000$) | 2 : Gammaglobuline ($M_m = 158\ 000$) |
| 3 : Ovalbumine ($M_m = 44\ 000$) | 4 : Myoglobuline ($M_m = 17\ 000$) |
| 5 : Vitamine B ₁₂ ($M_m = 1\ 350$) | |

2 - pH_i

Nous avons tenté de déterminer le pH_i de l'enzyme par isoélectro-focalisation en veine liquide dans la zone de pH comprise entre 7,0 et 2,5 .

Les conditions expérimentales sont décrites à la page 46 . Le résultat obtenu est représenté dans la figure 18 page 73 . Nous voyons que les deux activités, oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, migrent vers l'anode, dans la zone de pH 2,9 . Cette valeur reste cependant à vérifier car elle est trop proche de l'extrémité du gradient formé par les ampholine s qui est de 2,5 . Cependant, nous pouvons dire que l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du basidiomycète sporotricum dimorphosporum possède un pH_i extrêmement acide .

3 - Stabilité

a) stabilité au pH

La stabilité de l'enzyme au pH a été étudiée dans les conditions expérimentales décrites page 63 .

Comme le montre la figure 29 page 97 , les activités sur les deux types de substrats présentent la même courbe de stabilité entre pH 2,0 et pH 9,0 , avec une bonne stabilité entre pH 4,0 et pH 8,0, après incubation pendant 30 minutes à 37°C .

b) stabilité à la température

Afin de vérifier l'existence d'une ou deux enzymes, nous avons étudié la stabilité de l'activité enzymatique sur les deux types de substrats en fonction de la température, à la fois à pH 4,5 et à pH 5,5 .

Les conditions expérimentales sont décrites à la page 62 .

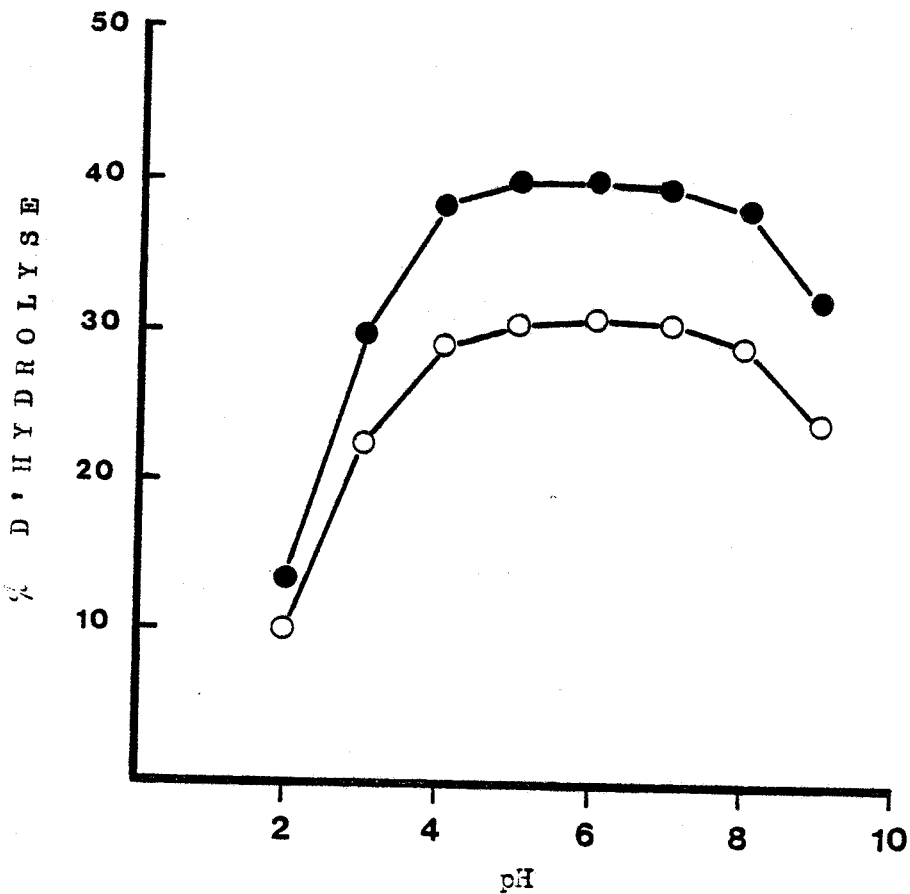


Figure 29 : Stabilité au pH .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 62)

● — ● : activité N-acétyllactosaminique

○ — ○ : activité oligomannosidique



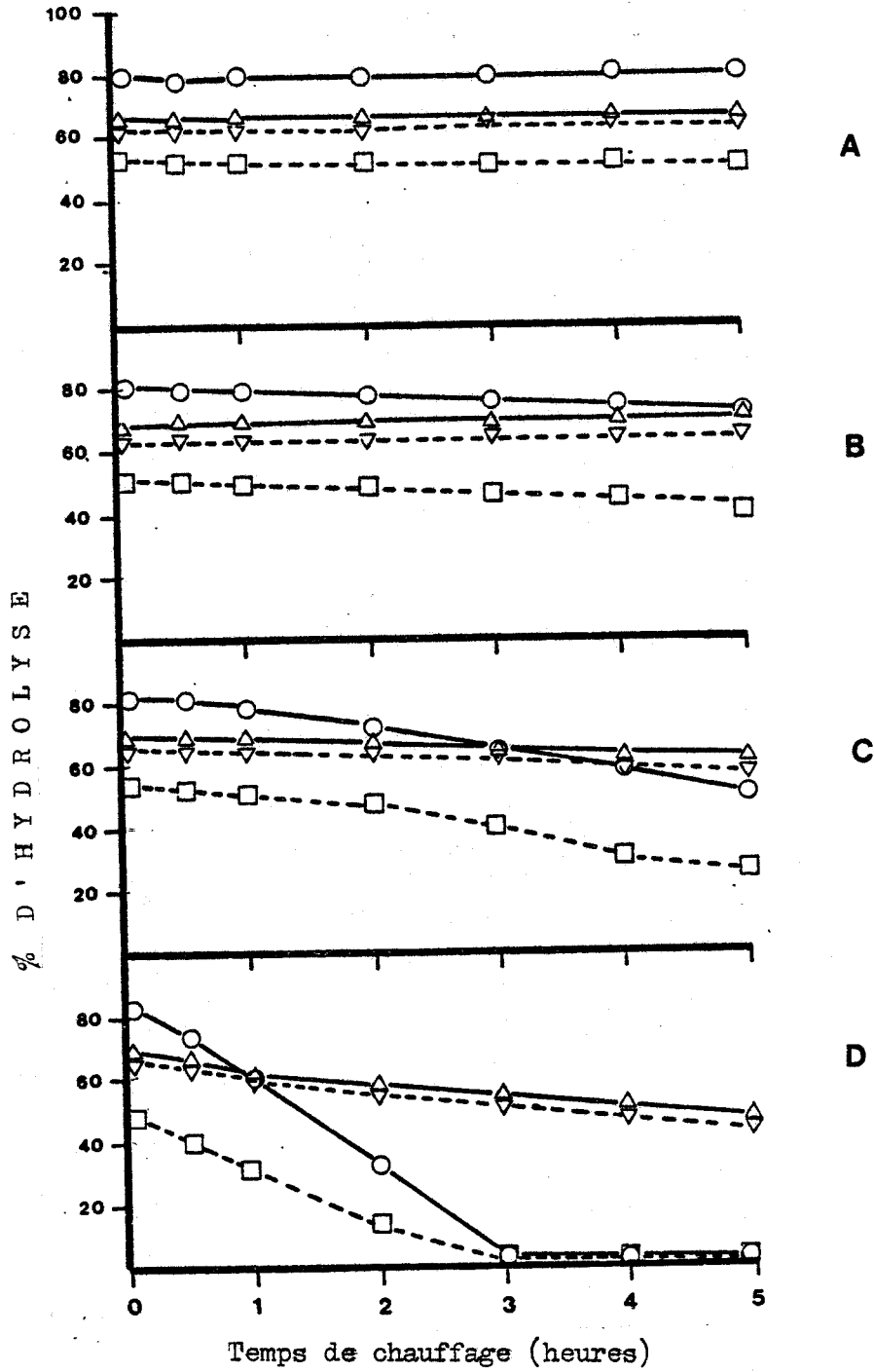


Figure 30 : Stabilité à la température

(les conditions expérimentales sont décrites
à la page 61)

A : 40°C et 50°C ; B : 60°C ; C : 65°C ; D : 70°C .

Activité N-acétyllactosaminique : ○—○ (pH 4,5); ▽—▽ (pH 5,5)

Activité oligomannosidique : □---□ (pH 4,5); △---△ (pH 5,5)



A pH 4,5 comme à pH 5,5 les deux activités sont stables jusqu'à 50°C (figure 30 A, page 98) .

A 60°C, il y a une légère dénaturation (environ 15%) pour les deux activités après une incubation de 5 heures à pH 4,5 . A pH 5,5 les deux activités restent stables (figure 30 B, page 98) .

A partir de 65°C (figures 30 C et D), la dénaturation est plus importante, avec cependant, la même cinétique pour les deux activités tant à pH 4,5 qu'à pH 5,5 . A 70°C, les deux activités sont complètement détruites après 3 heures de chauffage à pH 4,5 et après 9 heures de chauffage à pH 5,5 .

Ces résultats montrent que les deux activités sont sensibles à la température à partir de 65°C et que le pH joue un rôle très important dans la dénaturation de l'enzyme par la chaleur .

Nous pouvons aussi remarquer que les deux activités possèdent une stabilité identique à la température .

c) stabilité au stockage

A l'état soluble, avec une concentration en protéines de 0,07 mg/ml, et conservée à pH 5,0 à 4°C , les activités enzymatiques sur les deux types de substrats restent stables pendant plusieurs années sans addition d'agent stabilisateur .

Nous n'avons pas observé de perte d'activité de l'enzyme soluble après plusieurs congélations et décongélations successives .

Après lyophilisation, nous avons retrouvé 85 % d'activité sur les deux types de substrats .

Une colonne d'enzyme insolubilisée sur Sepharose 4B permet une utilisation continue à 20°C et 37°C pendant plusieurs mois .

C - DISCUSSION SUR LES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES ET PHYSICOCIMIQUES

Les résultats des principales propriétés enzymatiques et physico-chimiques sont résumés dans le tableau X page 101 .

- Les deux activités possèdent une même température optimale, une même masse moléculaire, un même pH_i , et présentent une stabilité au pH et à la température identique . Ceci est en faveur de l'hypothèse que les deux activités sont portées par une seule enzyme . La différence entre les pH optimum des deux activités peut être expliquée par une ionisation différente, soit des substrats, soit du site actif unique pour les deux substrats , soit des sites actifs différents pour les deux substrats .

- L'étude de la stabilité à la température nous a aussi permis de déterminer les conditions d'utilisation de l'enzyme : l'hydrolyse prolongée des substrats de type oligomannosidique peut être réalisée dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme (pH 5,5 et 60°C), alors que celle des substrats de type N-acétyllactosaminique doit être réalisée soit au pH optimum (pH 4,5) et à 50°C , soit à la température optimale (60°C) et à pH 5,5 afin de limiter la dénaturation de l'enzyme . Cette dénaturation peut aussi être compensée par addition d'enzyme toutes les 8 heures .

- L'enzyme que nous avons préparée possède une très grande stabilité, ce qui facilite beaucoup son stockage . Cette propriété est observée chez la plupart des Endos purifiées . En effet d'après TARENTINO et MALEY (112), l'Endo H présente une très grande stabilité après congélations et décon-gélations successives et lyophilisation . Elle se dénature rapidement à pH inférieur à 4,5 à 37°C mais reste stable à cette température entre pH 4,5 et pH 8,5 . Selon KOBATA (45), les Endo C_I et C_{II} restent stables à - 20°C pendant plus d'une année . Et selon TARENTINO et MALEY (116), l'Endo de l'oviducte de Poule peut être conservée à -70°C ou à +4°C avec

BUS
LILLE

Tableau X : Principales propriétés physico-chimiques de l'Endo
de Basidiomycète sporotricum dimorphosporum .

PROPRIETES	ACTIVITE	ACTIVITE
	N-ACETYLLACTOSAMINIQUE	OLIGOMANNOSIDIQUE
Km (mM)	0,91	0,67
pH optimum	4,5	5,5
température optimale (°C)	60	60
pH _i	2,9	2,9
masse moléculaire (dalton)	89000	89000

une goutte de toluène, pendant une année, mais conservée entre - 10°C et - 20°C, elle devient inactive .

- L'utilisation de l'enzyme immobilisée est très intéressante pour l'étude de la structure et de la fonction des parties glycaniques ou protéiques des N-glycosylprotéines . En effet, elle permet d'obtenir des produits d'hydrolyse non contaminés par les composés contenus dans la préparation enzymatique .

IV - SPECIFICITE

A - SPECIFICITE SUR LES SUBSTRATS DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE

1 - Glycopeptides et oligosaccharides

Différents glycopeptides possédant des structures de type N-acétyllactosaminique sont soumis à l'action de l'Endo . La structure de ces glycopeptides, ainsi que le résultat de leur hydrolyse, sont rassemblés dans le tableau XII page 104. .

Les glycopeptides biantennés, ne renfermant ni Fuc ni NeuAc, sont hydrolysés à 90 % par l'enzyme .

Les structures biantennées mono et difucosylées sont hydrolysées respectivement à 21 et à 15 % . La présence d'un ou deux résidus de Fuc ne semble donc pas inhiber l'activité de l'enzyme mais elle ralentit fortement la vitesse d'hydrolyse .

Le glycopeptide biantenné monosialylé est hydrolysé à 15 % alors que le même glycopeptide disialylé n'est pas hydrolysé par l'enzyme .

Les glycopeptides triantennés ne sont pas hydrolysés par l'enzyme quand la réaction est effectuée à 37°C pendant une heure . Mais si celle-ci est effectuée à 60°C, nous obtenons un taux d'hydrolyse de 25 % .

Les glycopeptides tétraantennés isolés de l'orosomucoïde ne sont pas hydrolysés par l'Endo, même à 60°C .

La vitesse d'hydrolyse de l'oligosaccharide $(Gal)_2(GlcNAc)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$ est beaucoup plus faible que celle du glycoasparagine de même structure . Ce qui montre que le résidu d'asparagine joue un rôle important pour l'hydrolyse par l'Endo . Cette propriété est aussi observée pour l'Endo H (118), pour l'Endo D (74), et pour l'Endo d'oviducte de poule (116) . Cependant, TACHIBANA et al. (102), ont trouvé que l'Endo de foie de rat

Tableau XI : pourcentage d'hydrolyse des substrats de type N-acétyllactosaminique

STRUCTURES	POURCENTAGE D'HYDROLYSE
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \end{array} \right.$	0
$\text{NeuAc}(\alpha 2-6) \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \end{array} \right.$	15
$(1) \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \end{array} \right.$	90
$\left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array} \right.$	21
$\left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array} \right.$	15
$\left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc} \end{array} \right.$	7
$\left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \end{array} \right.$	25
$\left\{ \begin{array}{l} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-) \text{Asn} \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right.$	0
<p>sérot transferrine humaine désialylée (2 glycanes identiques à (1))</p>	50
<p>sérot transferrine de lapin désialylée (1 seul glycanne identique à (1))</p>	100

hydrolyse les oligosaccharides et les glycoasparagines avec la même vitesse . D'après ces mêmes auteurs, l'enzyme n'hydrolyse plus les oligosaccharides lorsqu'ils sont réduits enitol .

2 - Glycoprotéines

La sérotransferrine humaine désialylée est hydrolysée à 50 % alors que la sérotransferrine de lapin est hydrolysée à 100 % . Cette différence d'activité sur le même type de chaîne glycanique montre bien le rôle important que joue la copule protéique dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme .

3 - Conclusion

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum est la première enzyme capable d'hydrolyser les structures N-acétyllactosaminiques biantennées . En effet, les autres enzymes comme l'Endo D, l'Endo F_I ou l'Endo C_I n'hydrolysent les glycopeptides biantennés que s'ils sont préalablement dégradés par les exoglycosidases jusqu'au Man lié sur le C₃ du Man du core pentasaccharidique .

Une autre enzyme du même type, isolée du foie de rat, a été ensuite décrite au laboratoire par PIERCE et al. (90 , 91) .

Il faut remarquer qu'aucune Endo décrite à ce jour, n'est capable d'hydrolyser des glycopeptides disialylés alors que des oligosaccharides disialylés ont été isolés de l'urine de malades atteints de sialidose .

B - SPECIFICITE SUR LES SUBSTRATS DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE ET MIXTE

1 - Hydrolyse d'un mélange de glycopeptides de la lactotransferrine bovine

Comme indiqué dans le tableau XII page 107, le mélange des glycopeptides de la lactotransferrine bovine N-acétylés [^{14}C] est hydrolysé à 92 % par l'enzyme . Les conditions expérimentales sont décrites page 59 .

L'analyse des oligosaccharides libérés à partir des glycopeptides non marqués (voir conditions expérimentales p.60) en chromatographie sur couche mince dans le solvant n. butanol / acide acétique / eau (2 : 1 : 1) a permis de mettre en évidence (fig 31 C p.108) cinq bandes d'oligosaccharides .

Pour identifier ces oligosaccharides, nous les avons comparés à des mannosides témoins, isolés de l'urine de malades atteints de mannosidose, dont la composition en monosaccharides est connue (fig 31 A et 31 F p.108) .

D'après les valeurs des rapports de migration de chaque bande oligosaccharidique, par rapport au mannose (R_{Man}), rassemblées dans le tableau XIII page 109, les produits libérés par l'hydrolyse enzymatique comigrent avec les mannosides témoins $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$, $(\text{Man})_8\text{GlcNAc}$, $(\text{Man})_7\text{GlcNAc}$, $(\text{Man})_6\text{GlcNAc}$ et $(\text{Man})_5\text{GlcNAc}$.

La structure des deux oligosaccharides les plus lourds a été décrite par G. SPIK et confirmée par R.M.N. (128) comme étant bien $(\text{Man})_9\text{GlcNAc}$ et $(\text{Man})_8\text{GlcNAc}$. La structure des autres oligosaccharides est en cours de détermination .

2 - Hydrolyse du mélange de glycopeptides de l'ovalbumine

Comme indiqué dans le tableau XII page 107, 60 % des glycopeptides N-acétylés [^{14}C] sont hydrolysés par l'enzyme . Ce taux d'hydrolyse est atteint après une heure d'incubation, et il reste constant après une

Tableau XII : Pourcentages d'hydrolyse des glycopeptides
N-acétylés [¹⁴C] de type oligomannosidique
et mixte .

(Les conditions expérimentales sont décrites
à la page 59) .

GP-E' est obtenu par traitement de GP-E par la N-acétyl-glucosaminidase .

SUBSTRATS	% D'HYDROLYSE
Mélange de glycopeptides de la lactotransferrine bovine	92
Mélange de glycopeptides de l'ovalbumine	60
GP-A	0
GP-B	45
GP-C	80
GP-D	87
GP-E	60
GP-E'	95
GP-I	0
GP-IIA	0
GP-IIB	0
GP-IIIA	90
GP-IIIB	80
GP-IIIC	0

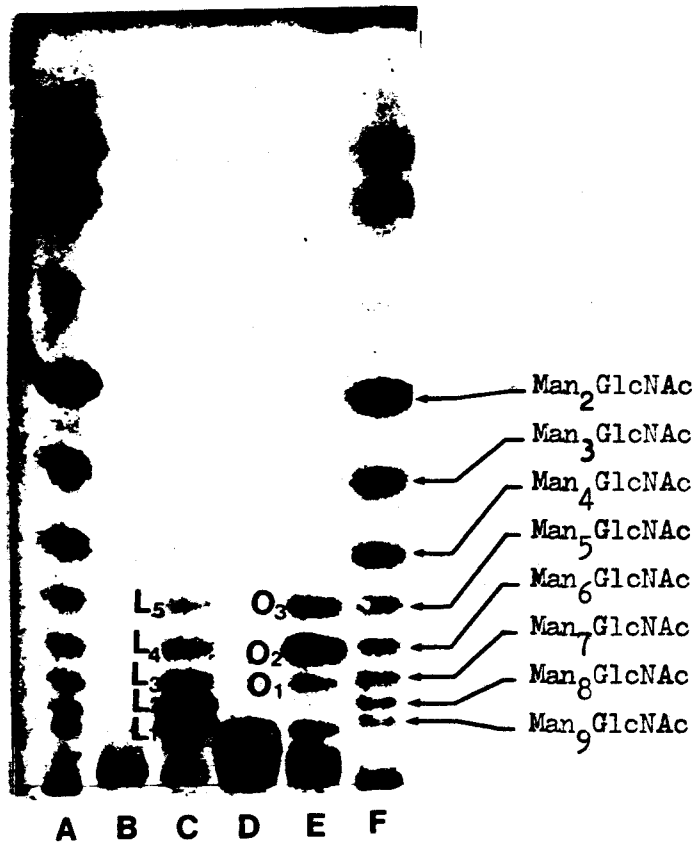


Figure 31 : Hydrolyse des glycopeptides de la lactotransferrine bovine et de l'ovalbumine par l' Endo : analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie sur couche mince .

(l'hydrolyse a été réalisée avec 0,02 ml de solution enzymatique, 0,06 mg de glycopeptides et 0,02 ml de tampon de Mc ILVAINE, pH 5,5 pendant une heure à 60°C . La chromatographie a été réalisée dans le système solvant n butanol/acide acétique/eau (2:1:1) avec 3 migrations successives .)

- A et F : mannosides témoins
- B : glycopetides de la lactotransferrine bovine
- C : glycopeptides de la lactotransferrine bovine + Endo
- D : glycopeptides de l'ovalbumine
- E : glycopeptides de l'ovalbumine + Endo

Tableau XIII : Valeurs de R_{Man} (migration par rapport au mannose en chromatographie sur couche mince) des différents mannosides témoins et des oligosaccharides libérés par action de l'Endo sur un mélange de glycopeptides de la lactotransferrine bovine (L_1 à L_5) et de l'ovalbumine (O_1 à O_3)

oligosaccharide	R_{Man}
$(Man)_9$ GlcNAc	0,09
$(Man)_8$ GlcNAc	0,12
$(Man)_7$ GlcNAc	0,16
$(Man)_6$ GlcNAc	0,22
$(Man)_5$ GlcNAc	0,28
L_1	0,09
L_2	0,12
L_3	0,16
L_4	0,21
L_5	0,28
O_1	0,15
O_2	0,21
O_3	0,27

incubation plus longue (24 heures et malgré l'addition d'enzyme) .

La figure 31 E page 108, montre l'analyse par chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse obtenus à partir de glycopeptides non marqués . Par comparaison avec les glycopeptides témoins non hydrolysés (fig 31 D), nous pouvons voir trois bandes d'oligosaccharides libérés par l'enzyme (oligosaccharides O_1 , O_2 , O_3) .

Comme pour l'hydrolyse des glycopeptides de la lactotransferrine bovine, ces oligosaccharides sont identifiés par rapport à des mannosides témoins . D'après les valeurs des R_{Man} rassemblées dans le tableau XIII page 109, l'oligosaccharide O_1 comigre avec $(Man)_5GlcNAc$ et l'oligosaccharide O_2 avec $(Man)_6GlcNAc$. Le R_{Man} de l'oligosaccharide O_3 est légèrement inférieur à celui de $(Man)_7GlcNAc$, et l'aspect de la bande montre qu'il existe une hétérogénéité . Cette bande est en fait un mélange, composé de $(Man)_7GlcNAc$ et d'un oligosaccharide plus lourd .

Nous pouvons aussi observer sur la figure 31 E, qu'il reste encore des produits au point de départ du chromatogramme . Ceci confirme l'hydrolyse incomplète obtenue avec les glycopeptides de l'ovalbumine N-acétylés [^{14}C] .

3 - Hydrolyse des glycopeptides de l'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2

Comme nous venons de le voir précédemment, l'hydrolyse des glycopeptides de l'ovalbumine n'est pas complète . Nous avons donc tenté de définir la spécificité de l'Endo en utilisant les glycoasparagines de l'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2 selon la méthode décrite par HUANG et al. (30) .

Nous avons utilisé deux groupes de glycopeptides obtenus par cette méthode :

Le premier groupe est celui des glycoasparagines témoins GP-I, GP-IIA, GP-IIB, GP-IIIA, GP-IIIB, GP-IIIC, dont les structures sont parfaitement définies (TAI et al. (104), YAMASHITA et al.(131), NARASIMHAN et al.(79) qui nous ont été données par les Professeurs A. KOBATA et H. SCHACHTER . Les structures de ces glycopeptides sont représentées dans le tableau I page 15 .

Le deuxième groupe est celui des glycoasparagines fractionnées au laboratoire . Le profil de fractionnement est le même que celui obtenu par les autres auteurs (figure 8 page 14) . Les cinq pics obtenus ont été appelés de GP-A à GP-E . Leurs compositions molaires en monosaccharides sont représentées dans le tableau XIV page 112 .

Pour chaque pic, nous avons déterminé :

- le pourcentage d'hydrolyse des glycoasparagines N-acétylés [^{14}C] .

- La nature des oligosaccharides libérés à partir de glycopeptides non marqués, par comparaison de leur migration en chromatographie sur couche mince, avec celle des mannosides témoins isolés des urines de malades atteints de mannosidose .

- La composition molaire en monosaccharides des oligosaccharides libérés par l'enzyme et des glycopeptides non hydrolysés fractionnés par chromatographie liquide haute performance .

a) Hydrolyse des glycoasparagines N-acétylées [^{14}C]

Les pourcentages d'hydrolyse des glycoasparagines N-acétylées [^{14}C] sont rassemblés dans le tableau XI page 107 .

L'Endo que nous avons caractérisée dans le moût de fermentation du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum est capable d'hydrolyser respectivement à 90 % et 80 % GP-IIIA et GP-IIIB . Les glycopeptides GP-I, GP-IIA,

**Tableau XIV : Rapports molaires en monosaccharides des différents pics
de glycopeptides d'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2 .**

monosaccharide :	Gal	GlcNAc	Man
pic			
A	0,85	3,27	3
B	0,29	2,01	3
C	traces	1,36	3
D	-	1,09	3
E	-	1,78	3

GP-IIB et GP-IIIC ne sont pas hydrolysés par l'enzyme .

Parmi les glycopeptides préparés au laboratoire, l'enzyme hydrolyse GP-B, GP-C, GP-D, et GP-E respectivement à 45, 80, 87, et 60 % . Ces taux d'hydrolyse sont atteints après une heure d'incubation et restent constants après une incubation plus longue (24 heures) avec une nouvelle addition d'enzyme , excepté pour GP-E où le taux d'hydrolyse peut atteindre 88 % après 72 heures d'incubation (fig 32 p 114) .

b) Détermination de la nature des oligosaccharides libérés par chromatographie sur couche mince .

Les différentes glycoasparagines préparées au laboratoire (de GP-A à GP-E) sont soumises à l'action de l'enzyme et les oligosaccharides libérés sont analysés par chromatographie sur couche mince dans le solvant n. butanol / acide acétique / eau (2 : 1 : 1) . Les protocoles expérimentaux sont décrits à la page 60 .

Les résultats sont rassemblés dans la figure 32 page 115. GP-A à l'état natif n'est pas hydrolysé par l'enzyme . L'hydrolyse des glycopeptides GP-B, GP-C, GP-D, et GP-E libèrent respectivement les oligosaccharides I et II, III et IV, V, VI et VII . La migration de chaque oligosaccharide est comparée à celle des mannosides témoins (tableau XV page 116) .

D'après ces résultats, nous voyons que les oligosaccharides I et IV comigrent avec le mannoside $(\text{Man})_6\text{GlcNAc}$, III et V avec $(\text{Man})_5\text{GlcNAc}$, et VI avec $(\text{Man})_4\text{GlcNAc}$. La valeur du R_{Man} de l'oligosaccharide II est légèrement inférieure à celle du mannoside $(\text{Man})_7\text{GlcNAc}$ et l'aspect de la bande montre une hétérogénéité . L'oligosaccharide VI migre entre les mannosides $(\text{Man})_4\text{GlcNAc}$ et $(\text{Man})_5\text{GlcNAc}$.

En conclusion, l'étude des hydrolysats par chromatographie sur couche mince permet de visualiser les oligosaccharides libérés par l'enzyme mais elle ne permet pas de déterminer leur structure exacte .

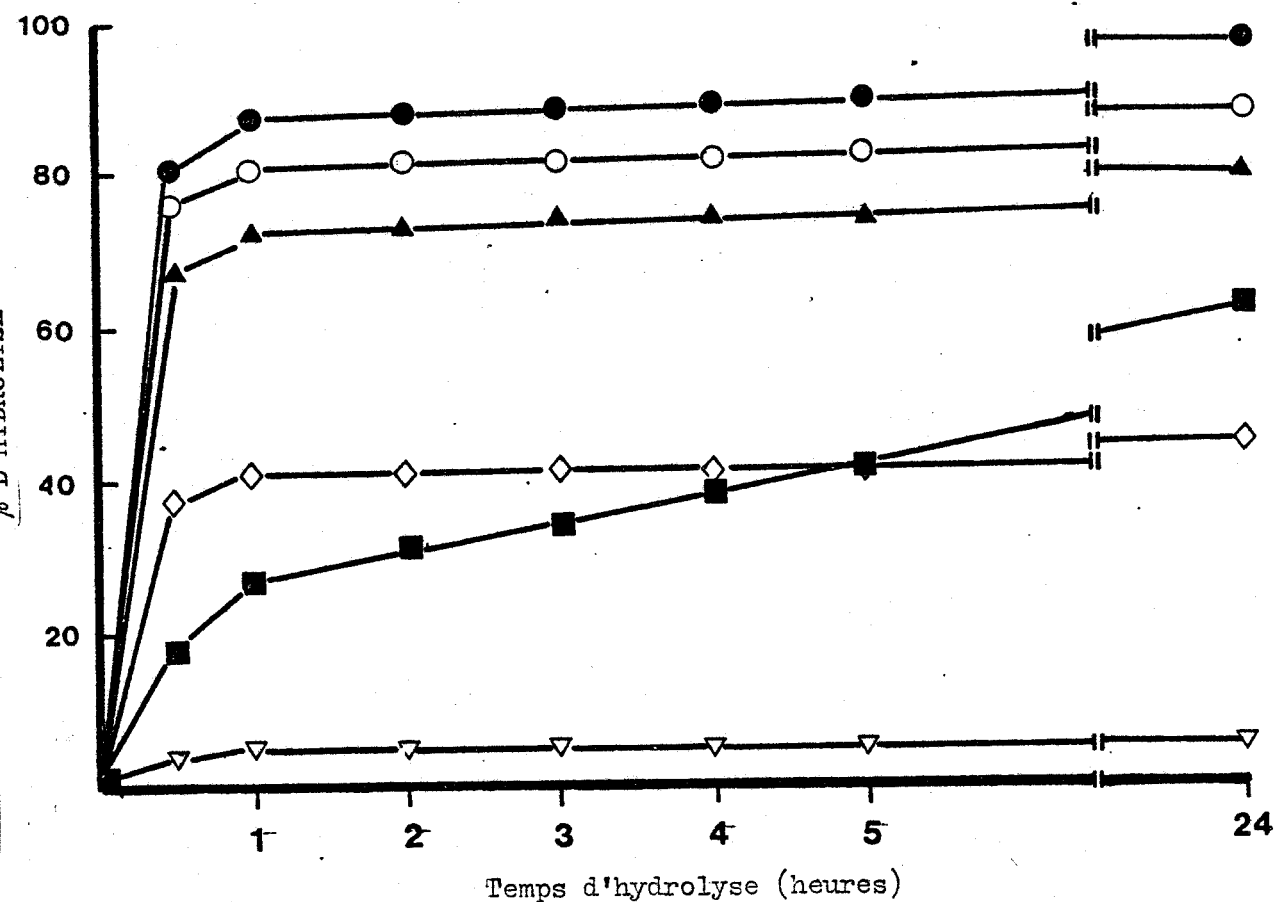


Figure 32 : Hydrolyse des glycopeptides [^{14}C] de l'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 59)

- ▽—▽ : GP-A ; ◇—◇ : GP-B ; ▲—▲ : GP-C ;
- : GP-D ; ■—■ : GP-E ;
- : GP-E traité par la N-acétylglucosaminidase

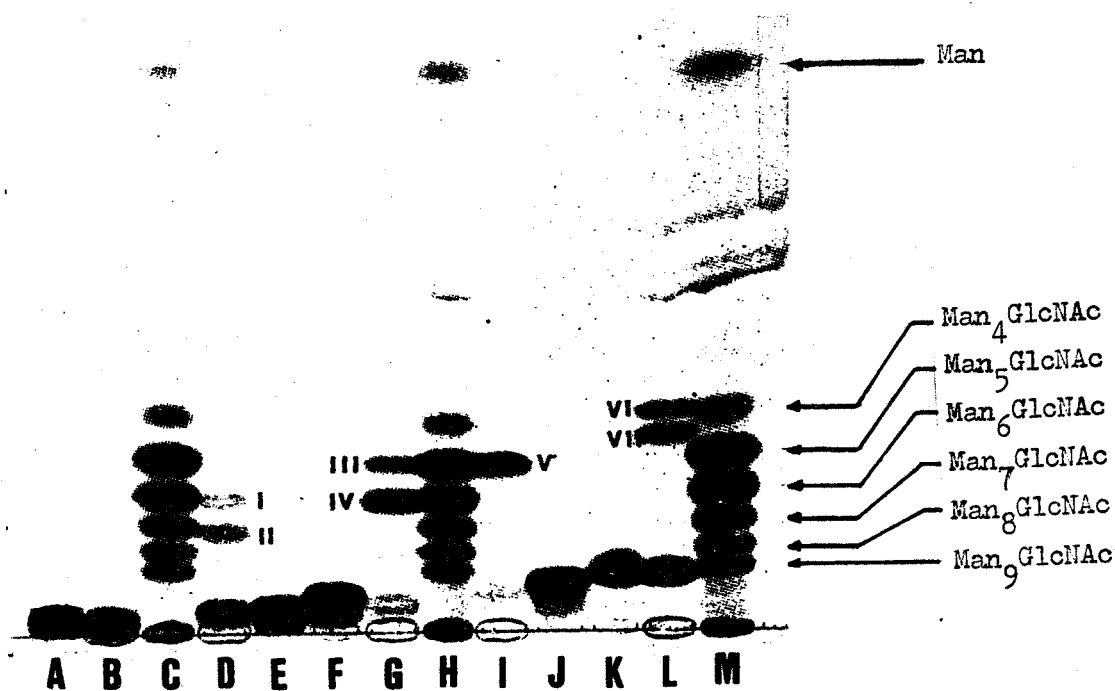


Figure 33 : Hydrolyse des glycopeptides de l'ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2 : analyse par chromatographie sur couche mince .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 60)

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| A : GP-A | F : GP-C |
| B : GP-A + Endo | G : GP-C + Endo |
| C, H et M : mannosides témoin | I : GP-D + Endo |
| D : GP-B + Endo | J : GP-D |
| E : GP-B | K : GP-E |
| | L : GP-E + Endo |

Tableau XV : Valeurs de R_{Man} (migration par rapport au mannose en chromatographie sur couche mince) des différents mannosides témoins et des oligosaccharides libérés par action de l'Endo sur les glycoasparagines de l'ovalbumine fractionnées sur Dowex 50 W x 2 .

I et II, III et IV, V, VI et VII, sont les oligosaccharides libérés respectivement à partir de GP-B, GP-C, GP-D et GP-E .

oligosaccharide	R_{Man}
(Man) ₉ GlcNAc	0,09
(Man) ₈ GlcNAc	0,12
(Man) ₇ GlcNAc	0,16
(Man) ₆ GlcNAc	0,22
(Man) ₅ GlcNAc	0,28
(Man) ₄ GlcNAc	0,37
I	0,15
II	0,22
III	0,22
IV	0,28
V	0,28
VI	0,33
VII	0,37

c) Analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie
liquide haute performance

Afin de déterminer avec précision la composition des oligosaccharides libérés par l'enzyme, nous avons utilisé la chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.) suivie de la méthanolyse . Les protocoles expérimentaux sont décrits à la page 118 . Dans les figures 34 A, 34 B, 34 C, 34 D et 34 E pages 118 à 122 , sont rassemblés les chromatogrammes obtenus pour les différentes glycoasparagines et leurs hydrolysats .

Chaque fraction collectée est analysée par chromatographie sur couche mince et révélée par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique . Les oligosaccharides sont séparés par trois migrations successives dans le système solvant n butanol / acide acétique / eau (2:1:1) . Les fractions renfermant des oligosaccharides purs (fig 35 p 123) sont rassemblées et leur composition est déterminée en chromatographie phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation .

Les rapports molaires en monosaccharides de ces oligosaccharides sont rassemblés dans le tableau XVI page 124 . Dans ce même tableau sont représentés les rapports molaires en monosaccharides des glycoasparagines avant l'hydrolyse par l'enzyme .

- hydrolyse de GP-A :

Comme le montre la figure 34 page 118 , GP-A est fractionné en trois glycoasparagines GP-A₁, GP-A₂, et GP-A₃ . GP-A₃ ne renferme pas de Gal mais possède cependant une structure de type mixte avec 5 résidus de GlcNAc pour 5 résidus de Man . Cette glycoasparagine correspond donc à GP-IIIB décrit par YAMASHITA et al. (131) .

GP-A₂ et GP-A₃ renferment toutes les deux un résidu de Gal et respectivement 5 résidus de GlcNAc pour 4 résidus de Man et 5 résidus de

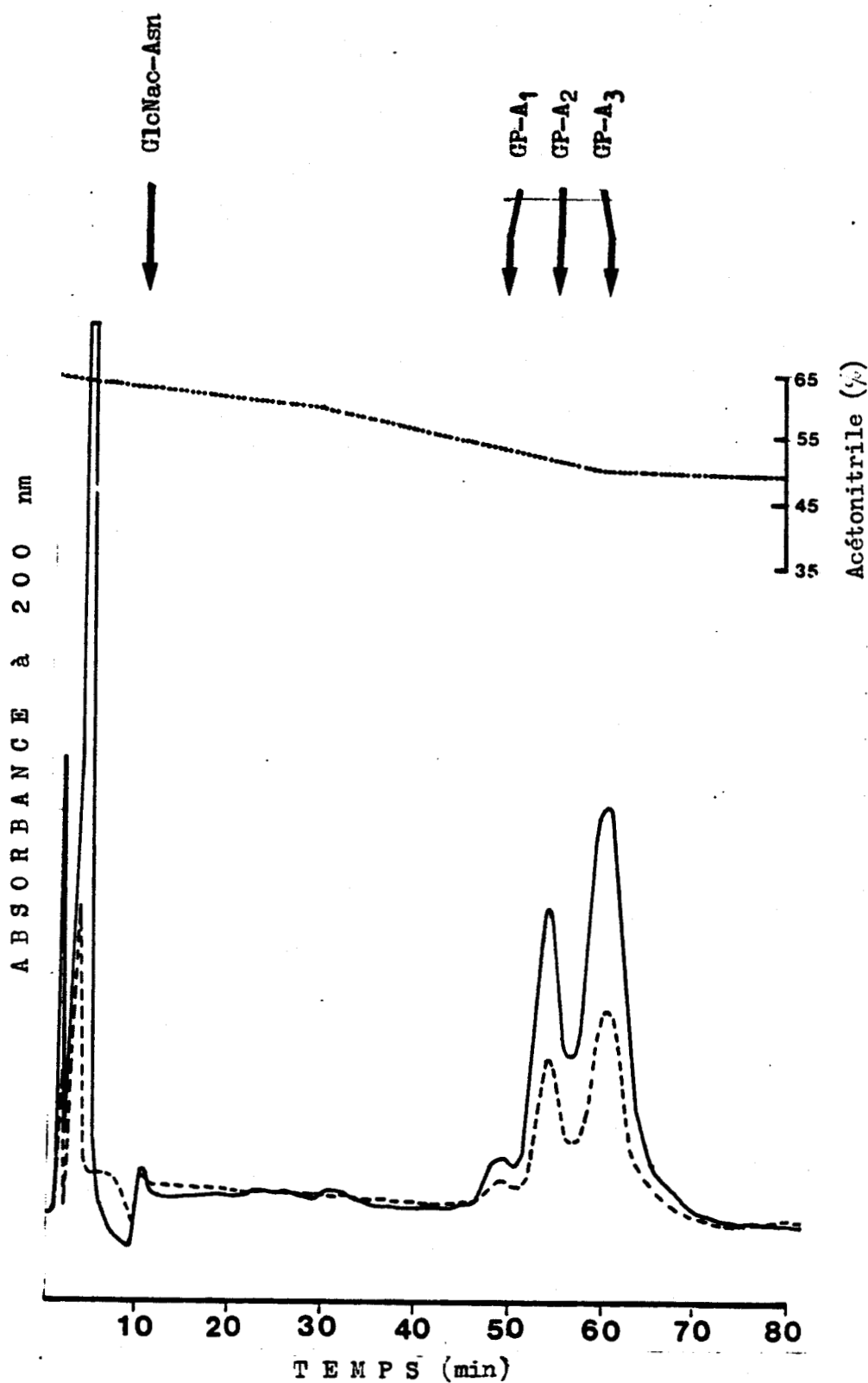


Figure 34 A : Hydrolyse de GP-A : analyse en chromatographie liquide haute performance .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 50)

traits pointillés : avant l'hydrolyse ; traits pleins : après .
l'hydrolyse .

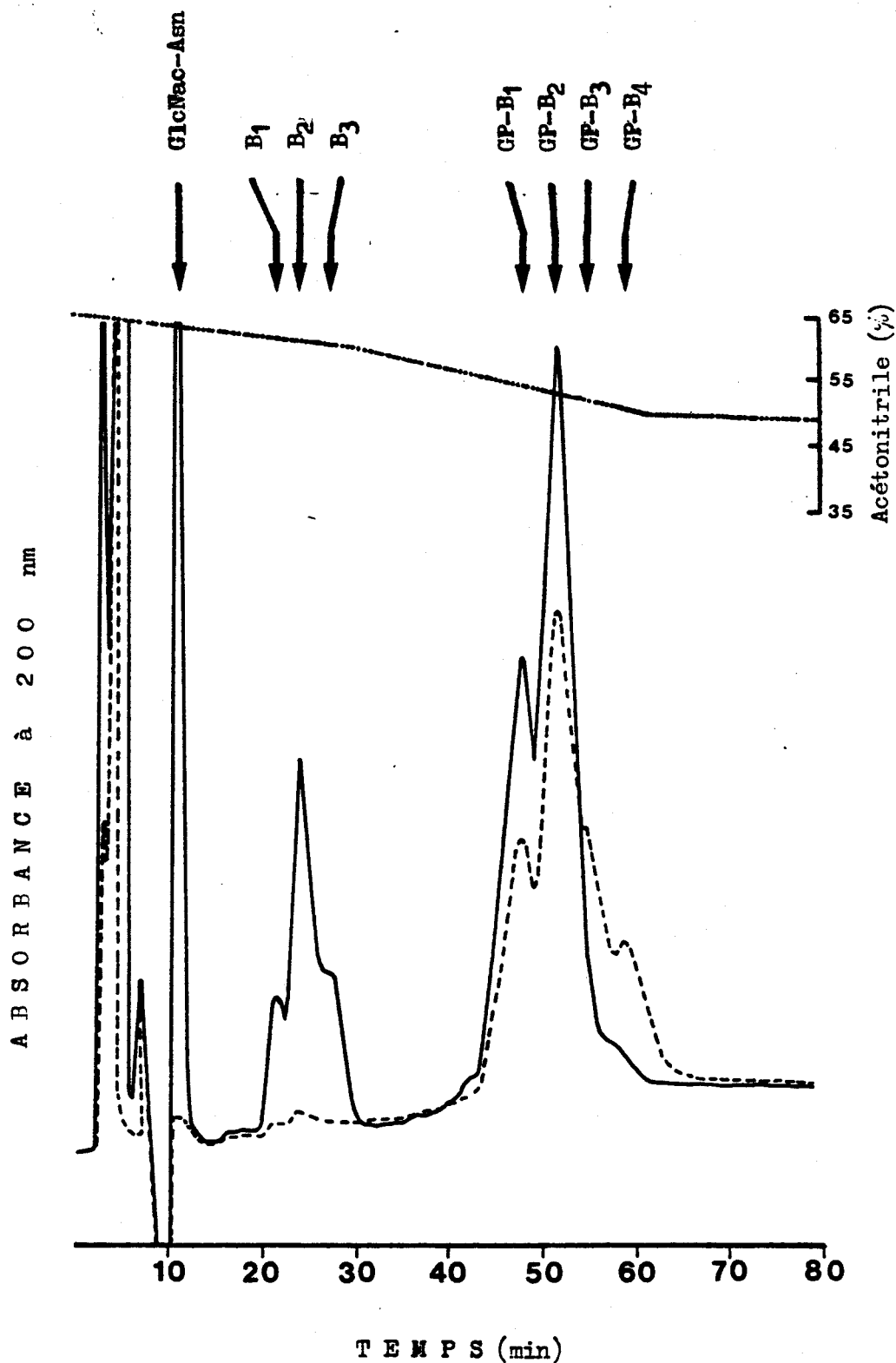


Figure 34 B : Hydrolyse de GP-B : analyse par chromatographie liquide haute performance .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 50)

traits pointillés : avant l'hydrolyse ; traits pleins : après l'hydrolyse .

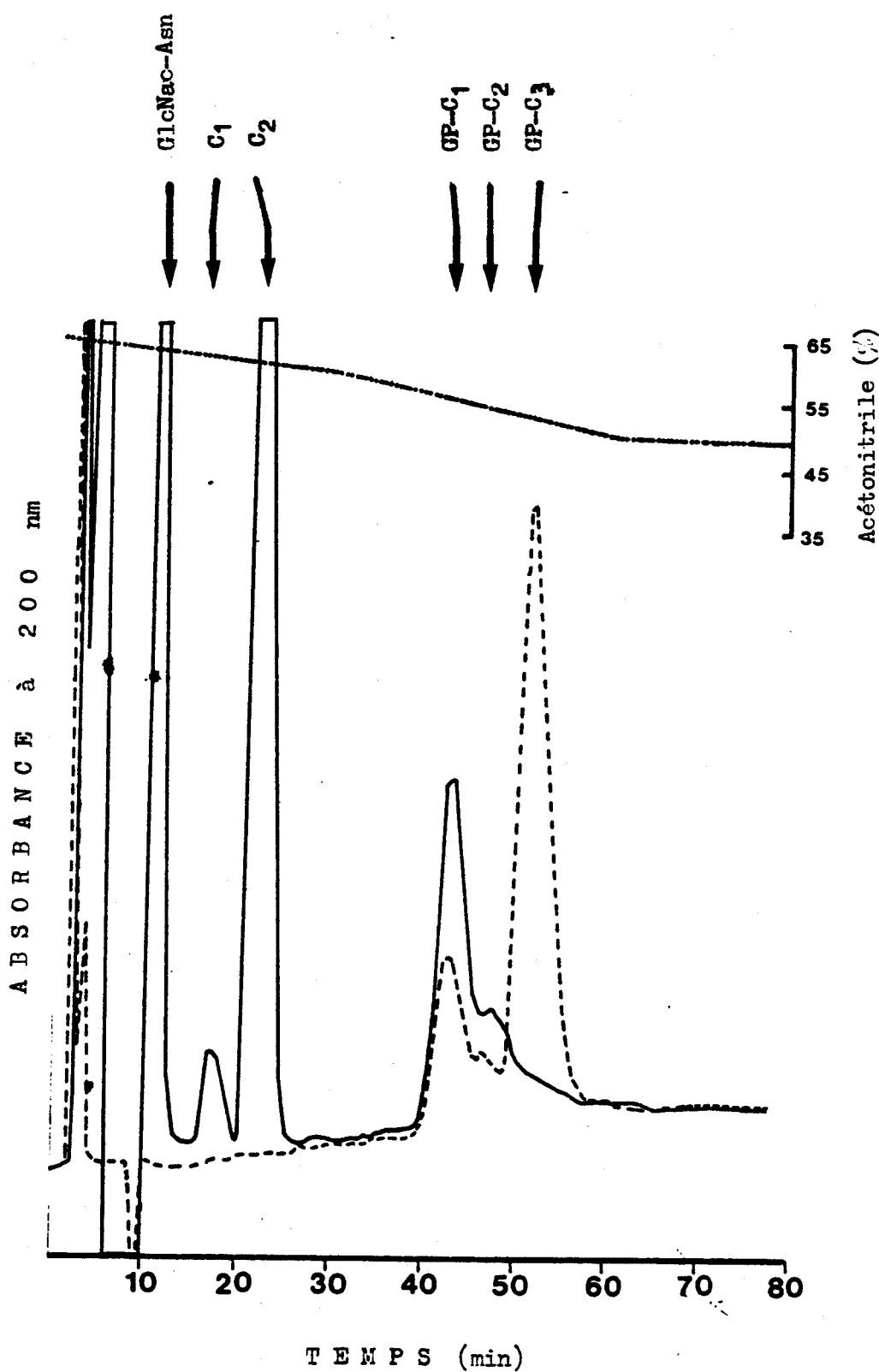


Figure 34 C : Hydrolyse de GP-C : analyse par chromatographie liquide haute performance .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 50)

traits pointillés : avant l'hydrolyse ; traits pleins : après l'hydrolyse .

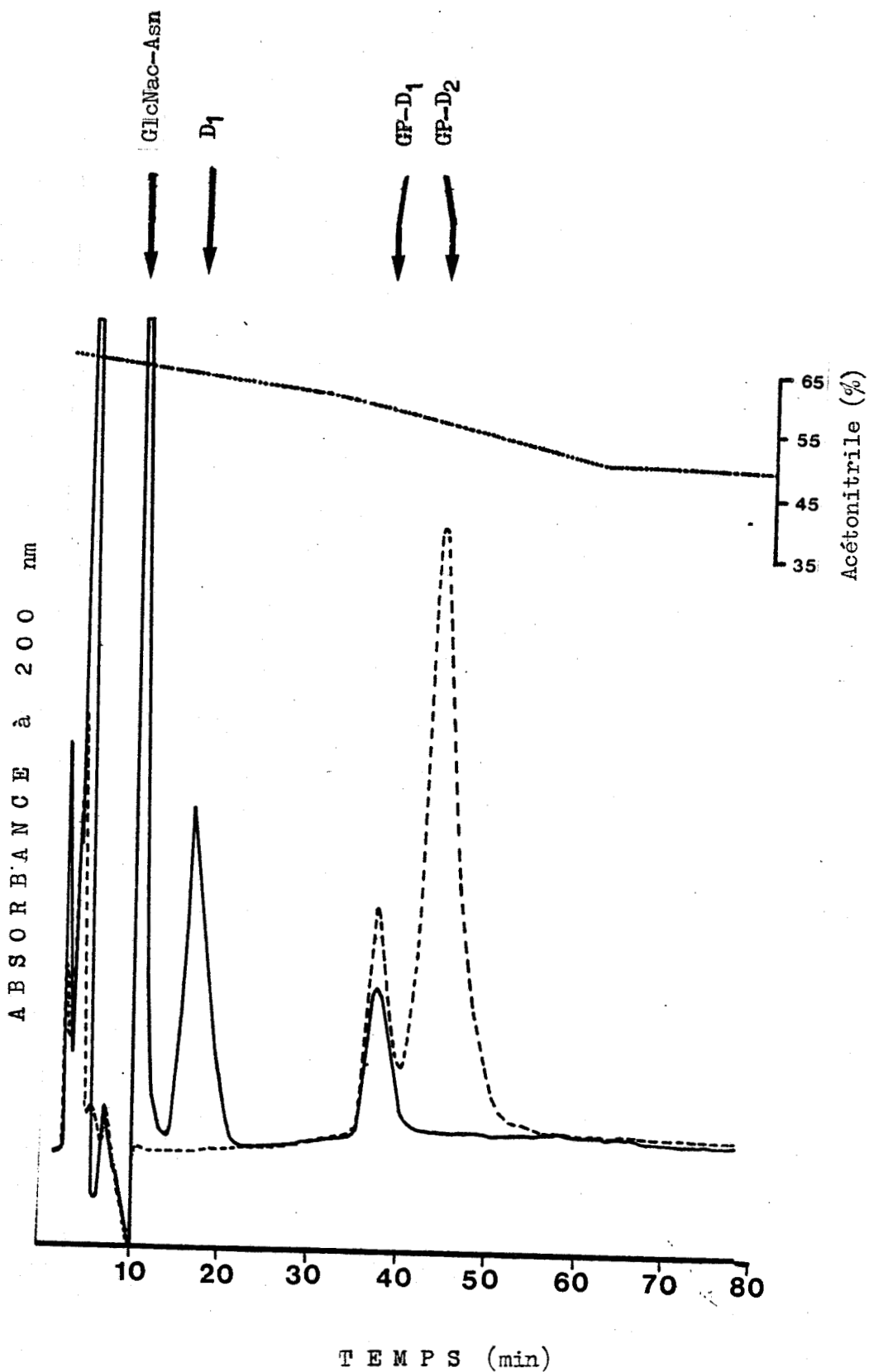


Figure 34 D : Hydrolyse de GP-D : analyse par chromatographie liquide haute performance .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 50)

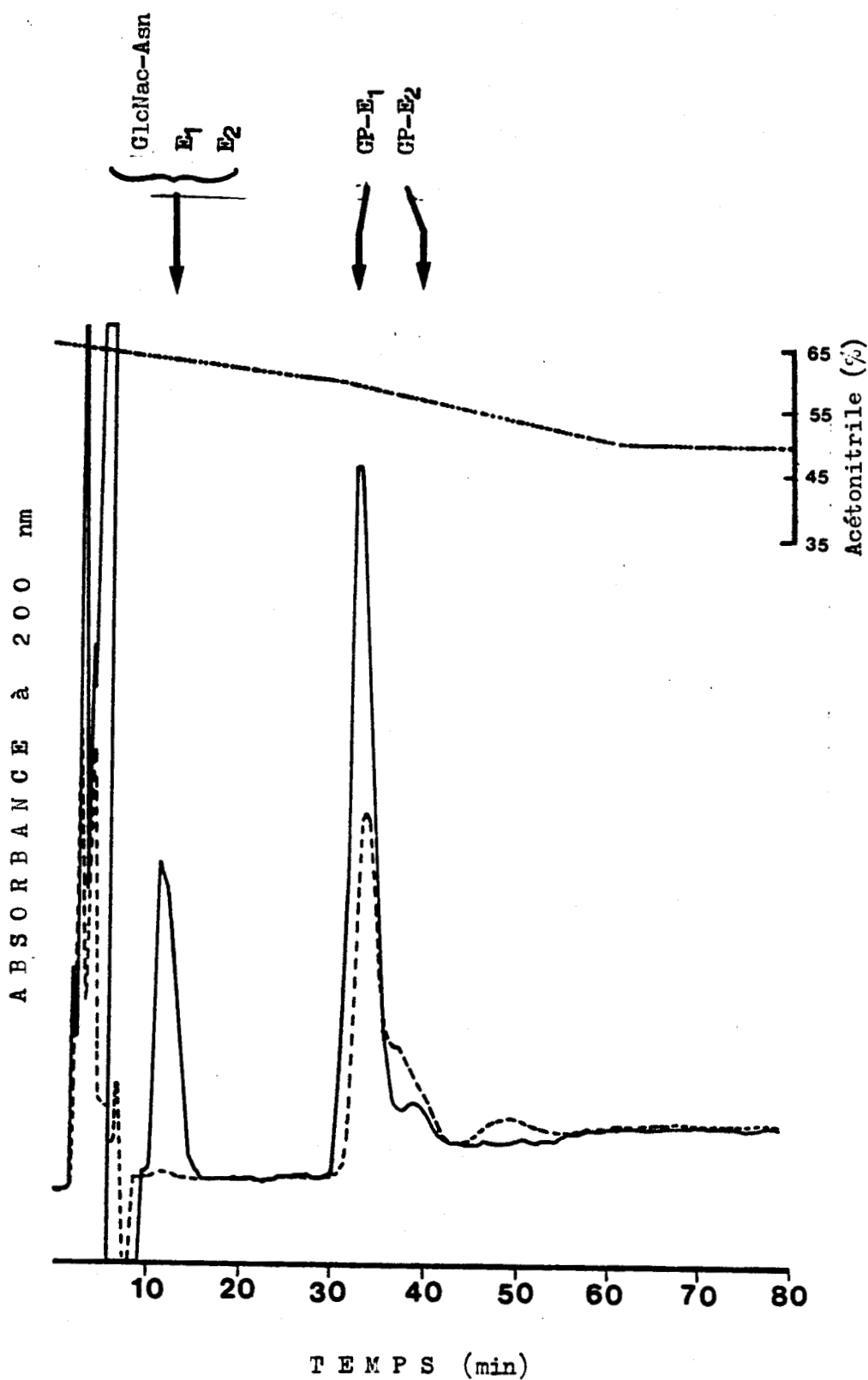


Figure 34 E : Hydrolyse de GP-E : analyse par chromatographie liquide haute performance .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 50)

traits pointillés : avant l'hydrolyse ; traits pleins : après l'hydrolyse .

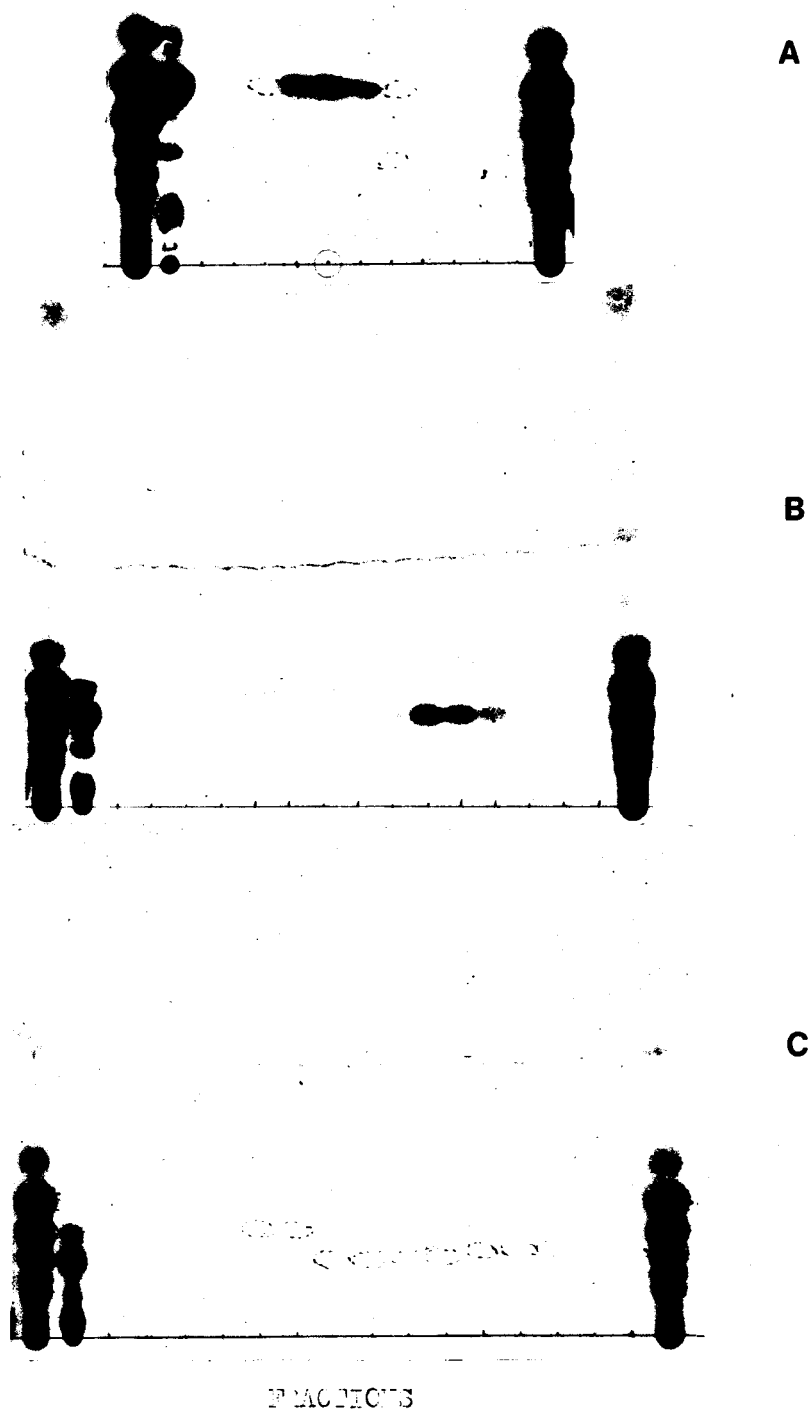


Figure 35 : Analyse en chromatographie sur couche mince des oligosaccharides obtenus en H.P.L.C.

(les conditions expérimentales sont décrites page 60)

- A : Hydrolysat de GP-D
- B : Hydrolysat de GP-C
- C : Hydrolysat de GP-B

Tableau XVI : Fractionnement en H.P.L.C. des différents glycopeptides

d'ovalbumine et de leur hydrolysats par l'Endo : Temps de rétention, et rapports molaires en monosaccharides des pics obtenus .

GP-A, GP-B, GP-C, GP-D, GP-E sont des glycopeptides d' ovalbumine fractionnés sur Dowex 50 W x 2 ; A, B, C, D, E sont les oligosaccharides obtenus à partir de ces glycopeptides après action de l'Endo .

(entre parenthèses sont indiqués les rapports molaires corrigés en fonction des résultats obtenus en H.P.L.C et sur couche mince)

PIC	TEMPS DE RETENTION	R A P P O R T S M O L A I R E S		
		Gal	GlcNAc	Man
GP-A ₁	49	-	2,812 (5)	3 (5)
GP-A ₂	53,5	0,734 (1)	2,590 (5)	3 (4)
GP-A ₃	59,8	0,846 (1)	3,030 (5)	3 (5)
GP-B ₁	47,2	0,605	1,958	3
GP-B ₂	52,8	{ 0,760* 0,893	{ 2,721* 2,857	{ 3* 3
GP-B ₃	54,9	traces	1,765	3
GP-B ₄	58,8	traces	1,077	3
B ₁	21,5	-	0,490 (1)	3 (6)
B ₂	24,1	-	1,781 (3)	3 (5)
B ₃	27,6	-	0,430 (1)	3 (7)
GP-C ₁	43,1	0,326	1,182	3
GP-C ₂	47,6	-	1,216 (2)	3 (5)
GP-C ₃	51,4	-	1,049 (2)	3 (6)
C ₁	17,8	-	0,650 (1)	3 (5)
C ₂	22,4	-	0,494 (1)	3 (6)
GP-D ₁	37,4	-	1,698	3
GP-D ₂	47,6	-	1,128 (2)	3 (5)
D ₁	17,8	-	0,605 (1)	3 (5)
GP-E ₁	32,5	-	2,813 (3)	3 (3)
GP-E ₂	44,1	-	1,583 (2)	3 (4)
E ₁	12	-	1,910 (2)	3 (3)
E ₂		-	0,740 (1)	3 (4)

* Rapports molaires déterminés avant l'hydrolyse par l'Endo .

GlcNAc pour 5 résidus de Man . Ces glycoasparagines correspondent donc à GP-IIIa et GP-I décrits par YAMASHITA et al. (131) .

Aucun de ces trois glycopeptides n'est hydrolysé par l'enzyme . Ce résultat est en accord avec celui obtenu auparavant avec les glycoasparagines témoins GP-I, GP-IIIa et GP-IIIB (voir page 111) .

- hydrolyse de GP-B

GP-B est fractionné en 4 pics GP-B₁, GP-B₂, GP-B₃, et GP-B₄ (fig 34 B) page 119). La composition molaire en monosaccharides de chaque pic est déterminée avant et après hydrolyse par l'Endo . Après l'hydrolyse nous pouvons noter la disparition de GP-B₃ et GP-B₄ et un changement de composition de GP-B₂ (fig 34-B et tableau XVI) . Il apparaît un pic correspondant à GlcNAc-Asn et trois pics oligosaccharidiques B₁, B₂ et B₃ .

L'analyse de la composition en monosaccharides de ces derniers (tableau XVI page 124), montre que B₁ et B₃ ont des structures de type oligomannosidique avec respectivement 6 et 7 résidus de Man pour 1 résidu de GlcNAc . B₂ possède une structure de type mixte avec 5 résidus de Man pour 3 résidus de GlcNAc .

Les oligosaccharides B₂ et B₃ proviennent probablement respectivement de GP-B₃ et GP-B₄ . Tandis que B₁ provient d'une glycoasparagine contenue dans GP-B₂ .

Ces résultats montrent l'hétérogénéité qui peut exister dans les différents pics de glycoasparagines obtenus après un seul fractionnement en H.P.L.C. . La composition de ces glycoasparagines reste donc à vérifier avec des produits purs obtenus après plusieurs fractionnements successifs en H.P.L.C. , en changeant le gradient d'éluion ou le type de colonne .

La pureté des oligosaccharides obtenus, est vérifiée par chromatographie sur couche mince, comme le montre la figure 35. page 123, leurs rapports molaires en monosaccharides donnés dans le tableau XVI page 124 sont donc exacts .

- hydrolyse de GP-C

Comme le montre la figure 34 C page 120, et le tableau XVI page 124 .

GP-C est fractionné en trois pics : GP-C₁, GP-C₂, et GP-C₃ .

Après l'hydrolyse par l'Endo, nous pouvons constater la disparition totale de GP-C₃, et l'apparition de GlcNAc-Asn et des oligosaccharides C₁ de composition (Man)₅GlcNAc et de C₂ ((Man)₆GlcNAc) qui proviennent respectivement de GP-C₂ et de GP-C₃ .

GP-C₃ qui est la glycoasparagine majeure de ce groupe, correspond à GP-IV décrit par TAI et al (103) . GP-C₂ provient probablement de la contamination de GP-C par un glycopeptide de GP-D . GP-C₁, qui possède une structure de type mixte avec un résidu de galactose, n'a pas encore été décrit dans la littérature et sa structure reste à déterminer .

- hydrolyse de GP-D

Comme le montre la figure 34 D, page 121, GP-D renferme deux glycoasparagines, GP-D₁ et GP-D₂ .

L'hydrolyse par l'Endo conduit à une disparition totale de GP-D₁ et à l'apparition de l'oligosaccharide D₁ ((Man)₅GlcNAc), voir tableau XVI page 124 . GP-D₁ correspond à GP-V décrit par TAI et al, (103) .

GP-D₂ n'est pas hydrolysé par l'enzyme .

- hydrolyse de GP-E

GP-E est composé de deux glycoasparagines, GP-E₁ et GP-E₂ .

L'hydrolyse de ces dernières libère les oligosaccharides E₁ et E₂ dont la composition est respectivement (Man)₄GlcNAc et (Man)₃(GlcNAc)₂ . Ces oligosaccharides ne sont pas bien séparés de GlcNAc-Asn dans les conditions décrites à la page 50, mais nous avons obtenu une bonne séparation en utilisant une élution isocratique avec le système solvant

acétonitrile/eau (60:40) . GP-E₁ correspond donc à GP-VI décrit par TAI et al. (105) et possède comme composition (Man)₄(GlcNAc)₂Asn , tandis que GP-E₂ a pour composition GlcNAc(Man)₃(GlcNAc)₂Asn . Cette glycoasparagine n'a pas encore été décrite dans la littérature .

L'étude de sa structure par méthylation montre l'absence totale du dérivé 2 mono-O-méthyl mannose et la présence des dérivés 2,3,4,6 tétra-O-méthyl mannose, 2,3,6 tri-O-méthyl mannose, 2,4 di-O-méthyl mannose, 2,6 di-O-méthyl N-acétylglucosamine, et 3,4,6 tri-O-méthyl N-acétylglucosamine dans des rapports équimolaires . Ces résultats sont confirmés par la spectrométrie de masse .

La présence du dérivé 2,4 di-O-méthyl mannose, comme l'absence du dérivé 2 mono-O-méthyl mannose, exclue la possibilité de substitution sur le C₄ du Man par un résidu de GlcNAc .

La présence du dérivé 2,3,4 tri-O-méthyl mannose montre qu'il y a un résidu de Man dont le C₄ est substitué, probablement, par un résidu de N-acétylglucosamine . La structure exacte de GP-E₂ n'a pas pu être déterminée, faute d'une quantité suffisante de produit .

En conclusion, grâce au couplage de la H.P.L.C. avec la méthanolyse, il est possible d'une part de déterminer la structure des glycopeptides de l'ovalbumine, et d'autre part d'analyser les oligosaccharides libérés par l'Endo .

Les résultats obtenus montrent que l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase de sporotricum dimorphosporum est capable d'hydrolyser les structures

- suivantes :
- $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$
 - $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$
 - $(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$
 - $(\text{Man})_4(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$
 - $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$
 - $(\text{GlcNAc})_1(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$

Les structures de type mixte, renfermant des résidus de galactose ne sont pas hydrolysées . L'hydrolyse de ces structures devient possible quand on effectue un décapage préalable de la molécule par les exoglycosidases . Le meilleur exemple est fourni par GP-A , qui n'est hydrolysé par l'enzyme, qu'après l'action associée de la galactosidase et de la N-acétyl-glucosaminidase (fig 35 page 129) .

L'utilisation de l'H.P.L.C. pour la détermination des activités de l'Endo est une méthode avantageuse puisqu'elle permet de visualiser sur le même chromatogramme tous les produits d'hydrolyse : GlcNAc-Asn, oligosaccharides ainsi que les glycopeptides non hydrolysés par l'enzyme .

Les autres méthodes utilisées pour déterminer l'activité enzymatique nécessitent l'utilisation d'un marqueur fluorescent ou radioactif .

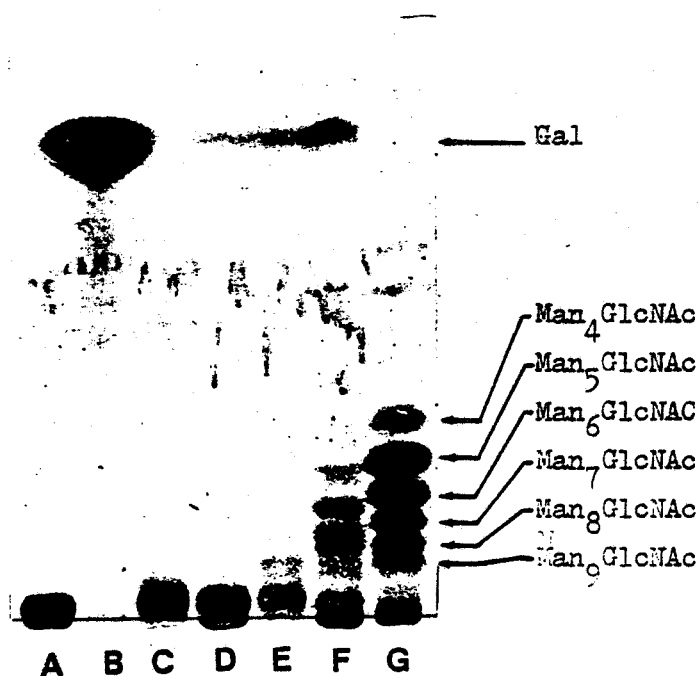


Figure 35 : Hydrolyse de GP-A après l'action des exoglycosidases .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 61)

A : GP-A

B : Gal

C : GP-A + Endo

D : GP-A + Gal-ase + Endo

E : GP-A + GlcNAc-ase + Endo

F : GP-A + Gal-ase + GlcNAc-ase + Endo

G : mannosides témoin

Les méthodes de séparation des produits d'hydrolyse les plus courantes, ne permettent de caractériser que, soit GlcNAc-Asn et les glycopeptides non hydrolysés (chromatographie sur papier, électrophorèse, chromatographie sur Con-A (16,120), soit les oligosaccharides libérés et les glycopeptides non hydrolysés (chromatographies sur couche mince ou sur papier) .

LI et al. (56) ont aussi utilisé l'H.P.L.C. pour déterminer l'activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, mais uniquement pour visualiser GlcNAc-Asn dansylé .

La méthode que nous avons utilisée, est inspirée des méthodes de LI et al. (56), et de TURCO (126) et MELLIS et al. (65) qui séparent les oligosaccharides en H.P.L.C. .

Cette technique nous a aussi permis de montrer la grande hétérogénéité des glycopeptides de l'ovalbumine, et de mettre en évidence la présence de plusieurs structures qui n'ont pas encore été décrites dans la littérature .

4 - Hydrolyse des glycoprotéines

a) hydrolyse de l'ovabumine native

Nous avons fractionné l'ovalbumine sur colonne de Con A . Par cette méthode, nous avons obtenu trois pics (fig 36 page 131) . Le pic 1 n'est pas retenu sur la colonne, alors que les pics 2 et 3 sont retenus par la lectine, et élués par une solution d' α -méthyl-glucoside 50 mM .

Sur chacune des trois fractions, nous avons fait réagir l'Endo . Les produits d'hydrolyse sont analysés par deux méthodes, comme décrit à la page 60 .

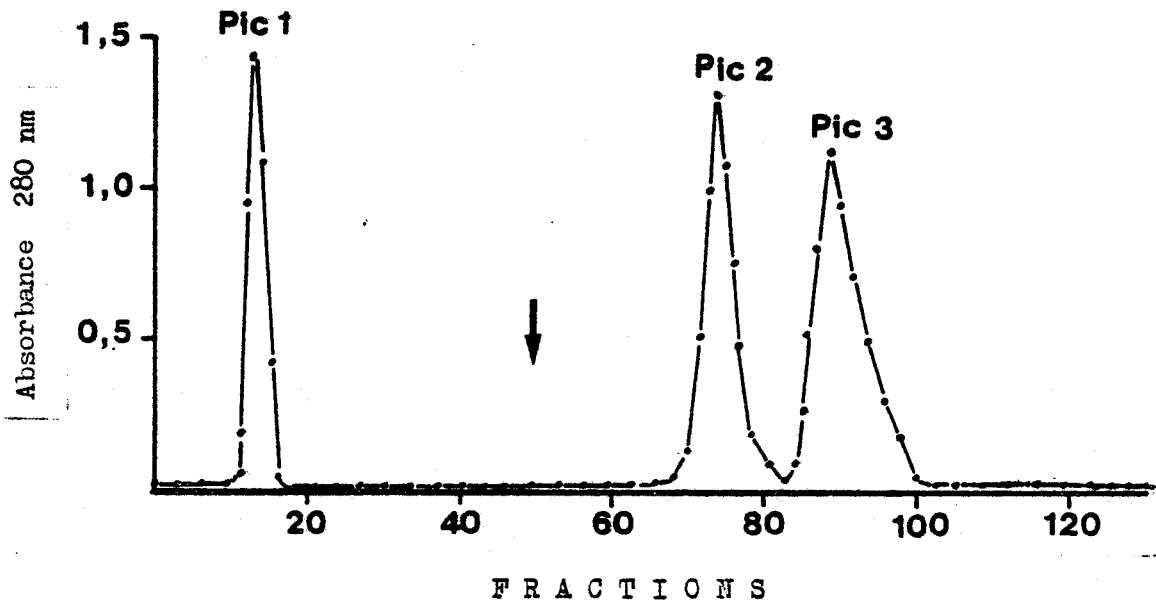


Figure 36 : Fractionnement de l'ovalbumine par chromatographie sur Con A .

10 mg d'ovalbumine sont chromatographiés selon les méthodes décrites à la page 49 .

(la flèche indique l'application de l' α -méthyl-glucoside 0,1 M dans le tampon d'équilibration)

L'analyse par chromatographie sur colonne de Con A, nous donne les résultats représentés sur la figure 37 A et B page 133 : Nous ne constatons aucun changement dans les profils d'élution des pics 2 et 3, après l'incubation avec l'Endo . Ceci montre, que soit l'enzyme n'a aucune activité sur la glycoprotéine, soit elle n'a qu'une activité partielle conduisant à une molécule encore reconnue par la lectine .

Comme le montrent les résultats rassemblés dans le tableau XVII page 134, l'analyse des produits d'hydrolyse par méthanolyse et trifluoroacétylation des précipités obtenus après précipitation éthanolique, ne montre aucune différence dans la composition en monosaccharides de la glycoprotéine, avant et après l'incubation avec l'enzyme . L'analyse de la composition en monosaccharides des surnageants n'a pas donné de résultat .

Ces résultats montrent que l'Endo ne possède pas d'activité détectable sur les trois pics de l'ovalbumine .

b) Hydrolyse de la lactotransferrine bovine native

Nous avons utilisé la lactotransferrine saturée en fer . Les produits d'hydrolyse sont analysés par les mêmes méthodes que pour l'ovalbumine, et par chromatographie sur couche mince (voir méthode page 61) .

Comme le montre la figure 37 C page 133, par chromatographie sur Con A, il n'y a pas de différence entre les profils d'élution obtenus avant et après incubation avec l'Endo . Donc, soit l'enzyme ne possède pas d'activité sur la lactotransferrine, soit l'hydrolyse n'est pas totale .

L'analyse des produits d'hydrolyse par méthanolyse et trifluoroacétylation, nous montre un changement dans la composition en monosaccharides des précipités éthanoliques (tableau XVII page 134), plus précisément, une baisse des taux de Man et de GlcNAc .

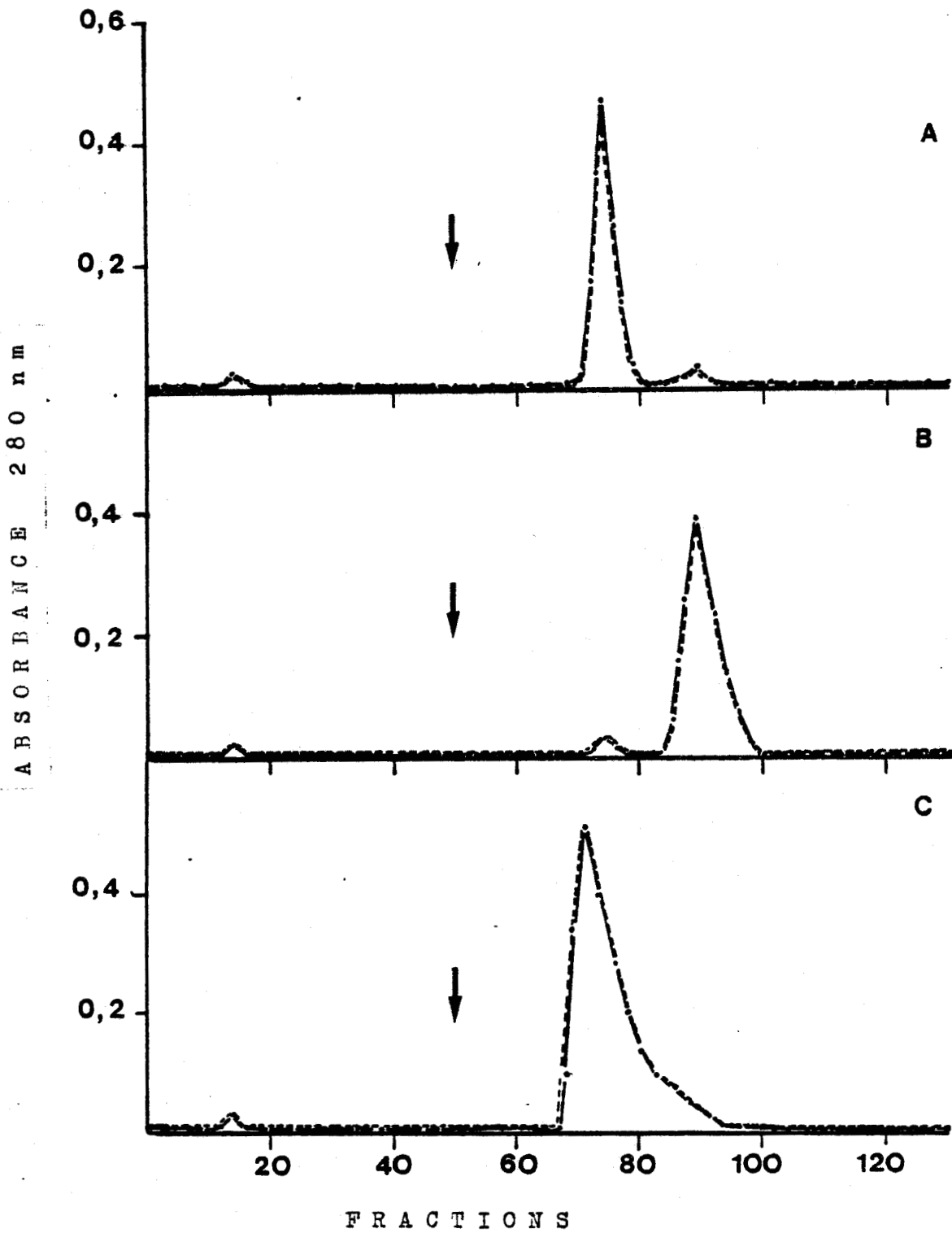


Figure 37 : Hydrolyse des glycoprotéines, ovalbumine et lactotransferrine bovine : analyse par chromatographie d'affinité sur Con A .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 60)

• ——— • : Hydrolysate • ——— • : glycopeptides témoins

A : Ovalbumine pic 2 ; B : Ovalbumine pic 3 ; C : L.T.B.

Les flèches indiquent l'application de 1'α-D-méthyl-glucoside 0,1 M dans le tampon de départ .

Tableau XVII : Rapports molaires en monosaccharides des précipités
éthanoliques de l'ovalbumine et de la lactotransferrine
bovine avant et après incubation avec l'Endo .

	Gal	Man	GlcNAc
<u>OVALBUMINE</u>			
Pic 1	0,10	0,54	1
Pic 1 + Endo	0,11	0,53	1
Pic 2	0,10	0,98	1
Pic 2 + Endo	0,10	0,97	1
Pic 3	traces	2,02	1
Pic 3 + Endo	traces	2,03	1
<u>LACTOTRANSFERRINE</u>			
L T B	1	12,47	3,23
L T B + Endo	1	8,13	2,49

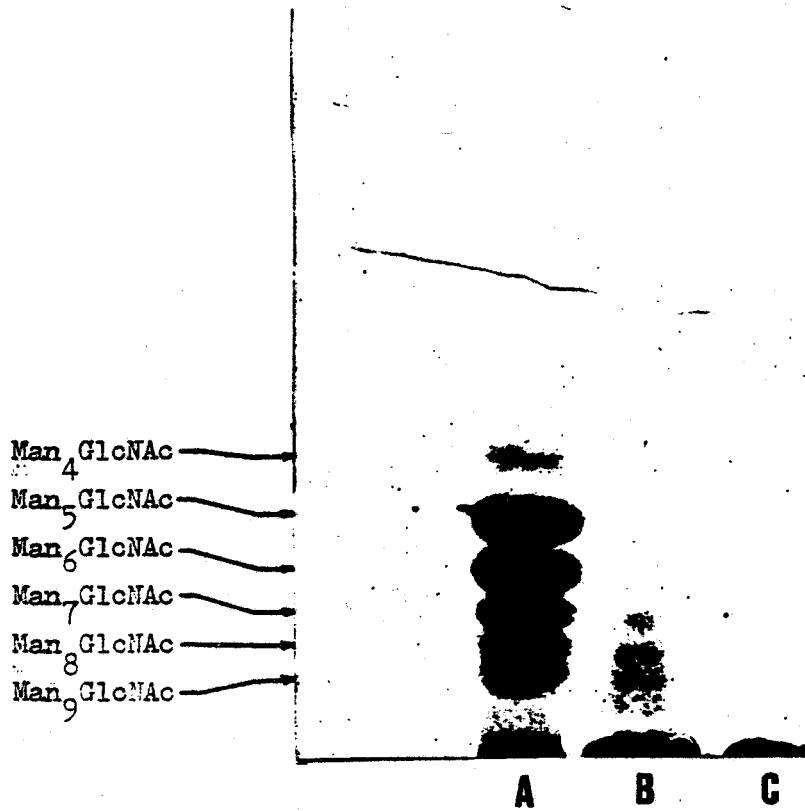


Figure 38 : Hydrolyse de la lactotransferrine bovine : analyse par chromatographie sur couche mince .

(les conditions expérimentales sont décrites à la page 61)

A : mannosides témoin

B : lactotransferrine bovine + Endo

C : lactotransferrine bovine

L'analyse de l'hydrolysate en chromatographie sur couche mince (fig 38 page 135), montre des bandes d'oligosaccharides libérés par l'enzyme . Ces oligosaccharides sont semblables à ceux obtenus lors de l'hydrolyse des glycopeptides de la lactotransferrine bovine (voir page 108).

L'ensemble de ces résultats montre que la lactotransferrine bovine native est hydrolysée par l'Endo, mais que cette hydrolyse n'est pas totale .

C - DISCUSSION SUR LA SPECIFICITE

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase que nous avons isolé du moût de fermentation du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum, possède la spécificité suivante :

1 - Spécificité sur les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique

L'enzyme possède une très grande activité sur les asialoglycoasparagines biantennées . Cette propriété la différencie des autres enzymes, comme l'Endo D, l'Endo C_I et l'Endo F_I qui n'hydrolysent que les structures monoantennées, dégradées jusqu'au α -Man lié sur le C₃ du résidu de β -Man du noyau pentasaccharidique des N-glycosyl-asparagines .

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum est la première enzyme capable d'hydrolyser les asialoglycoasparagines biantennées intactes . Par la suite, dans notre laboratoire, PIERCE et al. ont montré que l'Endo de foie de rat possédait aussi cette propriété (90)

La présence d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique diminue de 85 % l'activité de l'enzyme . La présence de deux résidus de NeuAc

l'inhibe totalement . Aucune Endo décrite à ce jour, n'est capable d'hydrolyser les structures sialylées . Or des oligosaccharides biantennés sialylés ont été caractérisés dans les urines de malades atteints de sialidose, laissant supposer l'existence d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases capables d'hydrolyser ce type de structure . Ce qui peut s'expliquer par l'hypothèse d'Endos inductibles par l'accumulation de glycopeptides sialylés .

La présence de résidus de fucose sur la molécule, ralentit aussi l'activité enzymatique, sans toutefois l'inhiber totalement .

Les structures triantennées ne sont que faiblement hydrolysées par l'enzyme, les structures tétraantennées ne le sont pas du tout .

2 - Spécificité sur les glycopeptides de type oligomannosidique et de type mixte

Sur les substrats de type oligomannosidique, l'enzyme est active sur les glycoasparagines de $(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$ à $(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$.

Parmi les structures de type mixte, seules les glycoasparagines $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$ et $(\text{GlcNAc})_4(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$, sont hydrolysées, alors que les glycopeptides renfermant des résidus de Gal ne le sont pas .

Ces résultats nous permettent de tirer les conclusions suivantes : La substitution sur le C_3 et le C_6 du Man lié en $(\alpha 1-6)$ sur le βMan , et la substitution sur le C_2 du Man lié en $(\alpha 1-3)$ sur le βMan , n'inhibent pas l'activité enzymatique (voir tableau XVIII, page 138 , structure générale des substrats de l'Endo) . La substitution sur le C_4 du résidu de Man lié en $(\alpha 1-3)$ sur le βMan , diminue l'activité de l'enzyme .

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'Endo de *Basidiomyces* , possède des propriétés analogues à celles décrites par TAI et al. (105) pour l'Endo C_{II} de *Clostridium perfringens* .

3 - Spécificité sur les protéines

En ce qui concerne les protéines renfermant des glycanes de type N-acétyllactosaminique, l'enzyme hydrolyse à 100 % la sérotransferrine de lapin désialylée, mais à 50 % la sérotransferrine humaine .

En ce qui concerne les protéines renfermant des glycanes de type oligomannosidique et de type mixte, l'enzyme n'est pas capable d'hydrolyser l'ovalbumine, par contre, elle est active sur la lactotransferrine bovine .

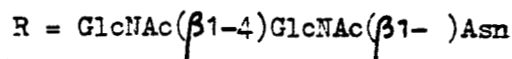
L'ensemble de ces résultats, montre que l'activité enzymatique peut être contrôlée par plusieurs facteurs :

- l'encombrement stérique créé, soit par la copule protéique, soit par des glycanes non hydrolysables par l'enzyme .
- la conformation des glycanes eux-mêmes .

Ces résultats permettent aussi d'émettre l'hypothèse que le catabolisme des glycoprotéines, commence par l'action des protéases . Les glycopeptides ainsi formés, sont ensuite dégradés par les endoglycosidases puis par les exoglycosidases . Cette hypothèse, émise au laboratoire, par STRECKER et MONTREUIL (100), permet d'expliquer l'accumulation d'oligosaccharides dans les urines de malades présentant une déficience en enzymes lysosomiales . (voir figure 9 page 18)

Dans le tableau XIX page 139, nous avons comparé la spécificité de l'Endo de Basidiomyces, avec celle des Endo H, D, C_I et C_{II} .

Tableau XIX : spécificités comparées des Endo D, C_I, H, C_{II} avec celle de l'Endo de Basidiomycète sporotricum dimorphosporum (Endo B) .



STRUCTURES	ENDO D et C _I	ENDO H	ENDO C _{II}	ENDO B
N-ACETYLLACTOSAMINIQUES				
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	-	-	-
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	-	-	+
$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	-	-	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	+	-	-	N.D.
OLIGOMANOSIDIQUES				
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	+	+	-	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) - \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	+	+	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	+	+	+	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) - \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	+	+	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) - \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}(\beta 1-4) \text{R}$	-	+	+	+

(suite)	D et C _I	H	C _{II}	E
$\text{Man}(\alpha 1-2)_3 \left[\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array} \right.$	-	+	+	+
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-2) \text{---} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-2) \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	+	+	+
M I X T E S				
$\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	N.D.	N.D.	N.D.	+
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \text{---} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	++	+	+
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	+	-	-
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	+	-	-
$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \text{---} \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	+	-	-
$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \searrow \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \searrow \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \searrow \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Man}(\beta 1-4)R \\ \text{Man}(\beta 1-4)R \end{array}$	-	+	-	-

V - Y-A-T'IL UNE OU DEUX ENZYMES ?

Comme nous venons de voir précédemment, l'Endo du Basidiomycès est active à la fois sur les substrats de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique . Afin de vérifier si ces deux substrats sont hydrolysés par une seule enzyme ou par deux enzymes ou deux sites catalytiques différents nous avons réalisé l'hydrolyse simultanée des deux substrats .

Comme le montre la figure 38 page 142, la vitesse d'hydrolyse du mélange des deux substrats N-acétylés [^{14}C] est supérieure à chacune des vitesses d'hydrolyse de chaque substrat seul, mais elle reste inférieure à la somme de ces dernières .

L'hydrolyse des glycopeptides N-acétyllactosaminiques N-acétylés [^{14}C] est inhibée par la présence des glycopeptides oligomannosidiques N-acétylés froids (fig 39 A page 143) . Par contre, l'hydrolyse des glycopeptides oligomannosidiques radioactifs n'est pas perturbée par la présence des substrats N-acétyllactosaminiques froids (figure 39 B page 143) .

Ces résultats excluent donc l'hypothèse qu'il existe deux enzymes ou deux sites catalytiques complètement indépendants . En tenant compte des autres résultats obtenus au cours de la purification et de la détermination des propriétés physico-chimiques, ces résultats nous apportent aussi une preuve supplémentaire de l'existence d' une seule enzyme responsable des deux activités, et nous pouvons émettre l'hypothèse que cette enzyme porte deux sites catalytiques . L'un des sites est spécifique à l'activité oligomannosidique, il n'est pas perturbé par la présence de substrats de type N-acétyllactosaminiques . Tandis que l'autre site est responsable de l'activité N-acétyllactosaminique . Cette activité est inhibée par la présence de substrats de type oligomannosidique .

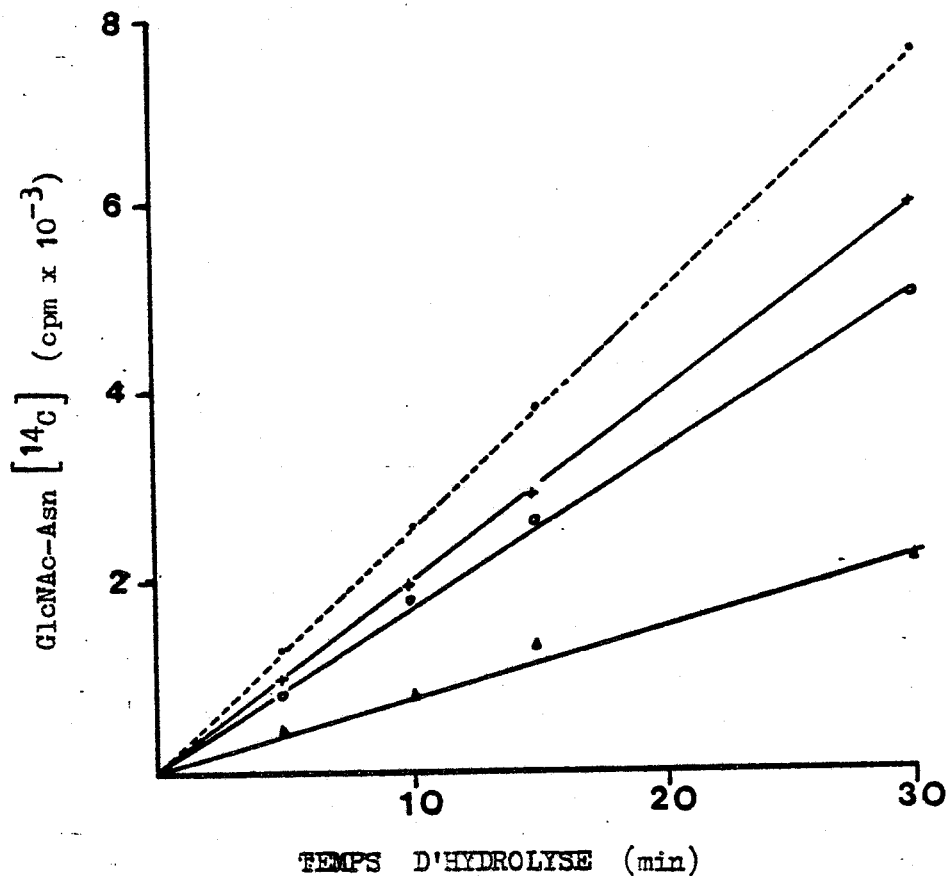


Figure 38 : Hydrolyse du mélange de glycopeptides ASTF $[^{14}\text{C}]$
 et des glycopeptides d'ovalbumine $[^{14}\text{C}]$

(60 nmoles de glycopeptides ASTF et 60 nmoles de glycopeptides d'ovalbumine sont repris par 0,01 ml de tampon de Mc ILVAINE pH 5,0 et 0,01 ml de préparation enzymatique . L'hydrolyse est effectuée à 60°C pendant des temps variables . Les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie sur papier .

- ▲ ——— ▲ : hydrolyse de ASTF $[^{14}\text{C}]$ seul
- ——— ○ : hydrolyse de glycopeptides de l'ovalbumine $[^{14}\text{C}]$ seuls
- + ——— + : hydrolyse de ASTF $[^{14}\text{C}]$ + ovalbumine $[^{14}\text{C}]$: résultat obtenu
- ——— • : hydrolyse de ASTF $[^{14}\text{C}]$ + ovalbumine $[^{14}\text{C}]$: résultat théorique

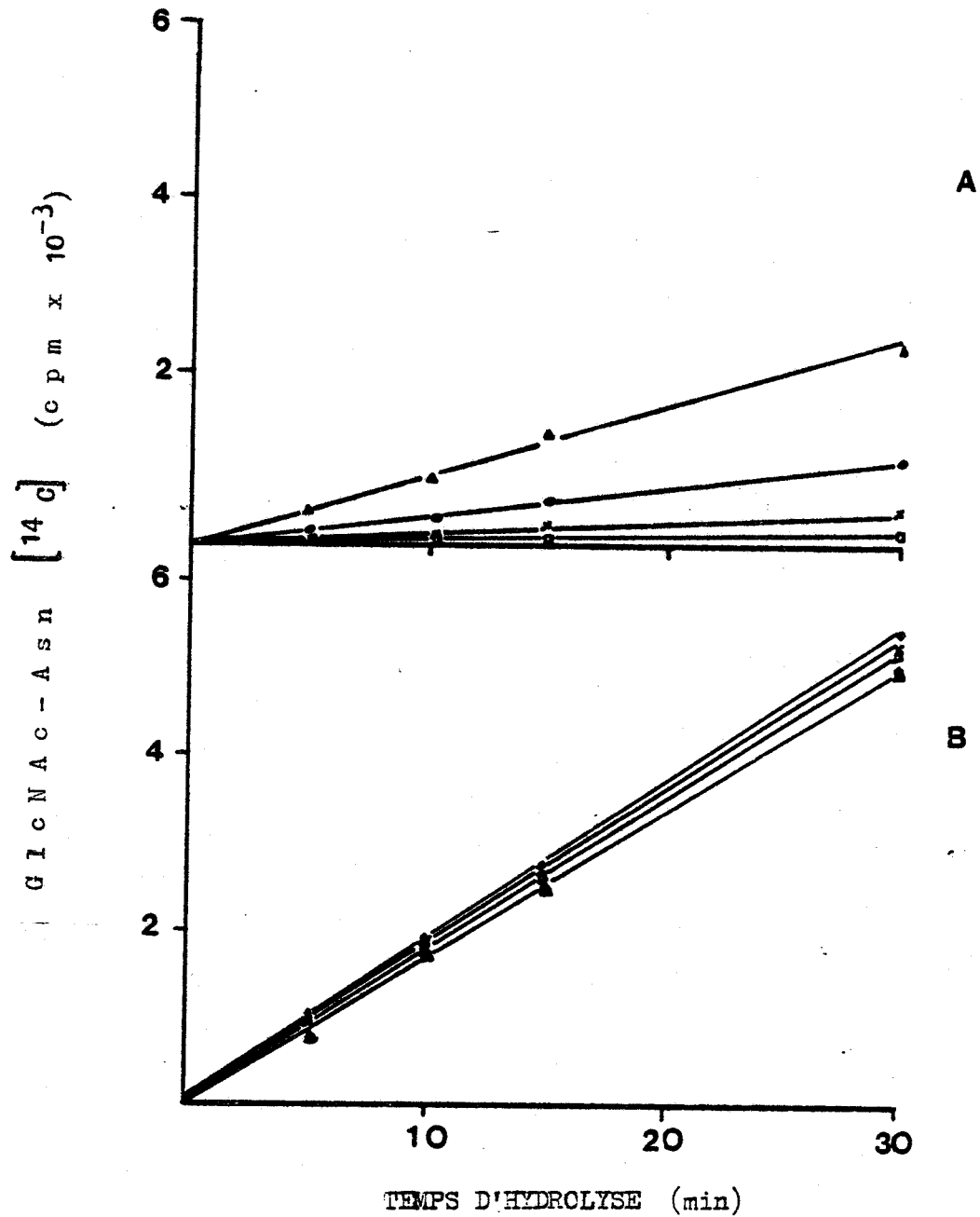


Figure 39 : hydrolyse de mélange de substrat radioactif et de substrat froid .

(Le mélange de 60 nmoles de glycopeptides [¹⁴C] et de glycopeptides froids à concentrations variables sont repris par 0,01 ml de tampon de Mc ILVAINE pH 5,0 et 0,01 ml de préparation enzymatique . L'hydrolyse est effectuée à 60°C pendant des temps variables . Les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie sur papier .)

A : ASIF [¹⁴C] + ovalbumine froid ; B : ovalbumine [¹⁴C] + ASIF froid

- ▲—▲ : glycopeptides [¹⁴C] seuls
- : glycopeptides [¹⁴C] + glycopeptides froids 3 mM
- ×—× : glycopeptides [¹⁴C] + glycopeptides froids 15 mM
- : glycopeptides [¹⁴C] + glycopeptides froids 30 mM

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude que nous avons réalisée sur l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum a porté sur la purification de l'enzyme, la détermination de ses propriétés physico-chimiques et enzymatiques, et sur sa spécificité. Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

1 - La préparation enzymatique que nous avons obtenue après les étapes de purification, ultrafiltration, chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, chromatographie sur colonne de DEAE - trisacryl M, chromatographie sur colonne de Biogel - agarose A 0.5 M, est débarrassée des principales activités exoglycosidasiques et protéasiques contaminantes ; Il subsiste cependant une faible activité exo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, même après une purification plus longue. Cette activité n'est pas inhibée par la N-acétylglucosaminolactone qui est pourtant un puissant inhibiteur des exo-N-acétylglucosaminidases. Elle est aussi observée dans plusieurs préparations d'Endo décrites dans la littérature.

2 - L'enzyme possède une plus grande affinité pour les substrats de type oligomannosidique ($K_m = 0,67 \text{ mM}$), que pour les substrats de type N-acétyllactosaminique ($K_m = 0,91 \text{ mM}$).

Les principales propriétés physico-chimiques que nous avons déterminées montrent que les deux activités possèdent, une même température optimale (60°C), une même stabilité à la température et au pH, une même masse moléculaire apparente ($89\ 000$), et un même pI_1 ($2,9$).

3 - L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du Basidiomycète sporotricum dimorphosporum est active sur les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique désialylés biantennés . C'est la première enzyme décrite, capable d'hydrolyser ce type de substrats .

L'enzyme est active sur les glycopeptides de type oligomannosidique, renfermant de 3 à 9 résidus de mannose .

Parmi les glycopeptides de type mixte, seuls $(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_4\text{Asn}$ et $(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_3\text{Asn}$ sont hydrolysés .

En ce qui concerne les glycoprotéines, l'enzyme hydrolyse totalement la sérotransferrine de lapin, tandis que la sérotransferrine humaine est hydrolysée à 50 p. 100 . L'ovalbumine ne semble pas être hydrolysée par l'enzyme alors que la lactotransferrine bovine l'est .

L'ensemble de ces résultats montre que cette enzyme peut être classée dans le groupe de l'Endo C_{II} de Clostridium perfringens , en ce qui concerne la spécificité sur les substrats de types oligomannosidique et mixte .

4 - La propriété de l'enzyme d'hydrolyser à la fois les substrats de types oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, nous amène à poser la question : y-a-t'il une ou plusieurs enzymes responsables de ces deux activités ? A cette question, nous pouvons répondre qu'il existe probablement une seule enzyme responsable des deux activités, car :

- Les différentes méthodes chromatographiques utilisées lors de la purification, ainsi que d'autres, comme la chromatofocalisation, l'iso-électrofocalisation, et la chromatographie d'affinité n'ont pas permis de dissocier les deux activités .

- Ces activités ont un taux d'enrichissement semblable tout au long de la purification .

- La plupart de leurs propriétés physico-chimiques sont identiques (même stabilité à la température et au pH, même masse moléculaire apparente, même pH_1)

De plus, les réactions croisées entre les deux types de substrats montrent que l'enzyme possède deux sites catalytiques . Le site de l'activité oligomannosidique n'est pas influencé par la présence de substrats N-acétyllactosaminiques . Par contre l'activité N-acétyllactosaminique est inhibée par les substrats oligomannosidiques .

5 - Nous avons aussi mis au point la technique d'analyse de l'activité Endo par chromatographie liquide haute performance . Cette technique est très avantageuse car elle ne nécessite aucun marquage préalable du substrat, et permet de visualiser sur le même chromatogramme tous les produits d'hydrolyse, et éventuellement de les récupérer .

Cette technique, nous a permis de mettre en évidence la présence, dans l'ovalbumine, de plusieurs glycopeptides dont la structure n'est pas encore décrite dans la littérature .

Les performances de cette technique pourraient être améliorées grâce à l'apparition dans le commerce, de nouveaux types de colonnes, et grâce à une meilleure connaissance des conditions de chromatographie .

6 - L'Endo que nous avons caractérisée et partiellement purifiée, présente une excellente stabilité, aussi bien dans son utilisation que dans son stockage . Ce critère est appréciable pour la production de l'enzyme .

De plus, le Basidiomycetes, d'où provient l'Endo, n'est pas pathogène, contrairement aux bactéries qui ont servi à produire les enzymes possédant des propriétés semblables, comme l'Endo D (Diplococcus pneumoniae), ou les Endo C_I et C_{II} (Clostridium perfringens) .

7 - L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase que nous avons purifiée, a servi aux études suivantes :

- Etude structurale des glycanes de la lactotransferrine bovine par G. SPIK et B. CODDEVILLE .

- Etude du rôle des glycanes de la sérotransferrine de lapin par D. LEGER .

- Première approche de l'étude structurale des glycanes des IgM normales et pathologiques par A. CAHOUR .

- Essai sur la hyaluronidase par J.C. MICHALSKI .

Ces études ont été réalisées, soit avec l'enzyme immobilisée , soit avec l'enzyme soluble .

B I B L I O G R A P H I E

(Les nombres écrits entre parenthèses renvoient aux pages de citation des auteurs) .

- 1 - AMINOFF, D. (1961) *Biochem. J.*, 81, 384-388 . (pp. 56, 80)
- 2 - ARAKAWA, M., MURAMATSU, T. (1974) *J. Biochem. (TOKYO)*, 76, 507-517 . (p. 25)
- 3 - ATKINSON, P.H., GREY, A., CARVER, J.P., HAKIMI, J., CECCARINI, C. (1981) *Biochemistry*, 20, 3979-3986 . (pp. 13, 15, 16, 17)
- 4 - BAIG, M.M., AMINOFF, D. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6111-6118 . (p. 5)
- 5 - BERTOLINI, M., PIGMAN, W. (1970) *Carbohydr. Res.*, 14, 53-63 . (p. 5)
- 6 - BOERSMA, A., LAMBLIN, G., ROUSSEL, P., DEGAND, P., BISERTE, G. (1975) *C. R. Acad. Sci.*, 281, 1269-1272 . (p. 36)
- 7 - BOUQUELET, S., Contrat ANVAR n° A-81-06-047-N rapport du 28-02-83 . (p. 44)
- 8 - CARVER, J.P., GREY, A.A., WINNIK, J., CECCARINI, C., ATKINSON, P.H. (1981) *Biochemistry*, 20, 6600-6606 . (p. 13)
- 9 - CARVER, J.P., GREY, A.A. (1981) *Biochemistry*, 20, 6607-6616 . (p. 13)
- 10 - CHERON, A., MAZURIER, J., FOURNET, B. (1977) *C. R. Acad. Sci.*, 284, 585-588 . (pp. 41, 42)
- 11 - CHIBA, S., KUNG, C.K.H., GOLDWASSER, E. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 1372-1377 . (p. 55)
- 12 - CHIEN, S., YEJICH, S.J., LI, S.C., LI, Y.T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 683-691 . (p. 29)
- 13 - CHIEN, S., WEINBURG, R., LI, S.C., LI, Y.T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 317-327 . (pp. 33, 36, 89)

- 14 - CHU, F.K., TRIMBLE, R.B., MALEY, F. (1978) J. Biol. Chem., 253, 8691-8693 .
(p. 26)
- 15 - CHU, F.K., MALEY, F. (1980) J. Biol. Chem., 255, 6392-6397 . (p. 25)
- 16 - CHU, F.K., MALEY, F., TARENTINO, A.L. (1981) Anal. Biochem., 116, 152-160 .
(p. 130)
- 17 - CONCHIE, J., STRACHAN, I. (1978) Carbohydr. Res., 63, 193-213 . (pp. 13, 15, 16)
- 18 - CUNNINGHAM, L.W., NUENKE, B.J., NUENKE, R.B. (1957) Biochim. Biophys. Acta,
26, 660-664 . (p. 12)
- 19 - CUNNINGHAM, L.W., CLOUSE, R.W., FORD, J.D. (1963) Biochim. Biophys. Acta,
78, 379-381 . (p. 12)
- 20 - DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTHART, J.F.G., FOURNET, B., STRECKER, G.,
SPIK, G., MONTREUIL, J. (1978) FEBS Letters, 89, 149-152 . (pp. 7, 9)
- 21 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956)
Anal. Chem., 28, 350-356 . (p. 52)
- 22 - ENDO, Y., KOBATA, A. (1976) J. Biochem. (TOKYO), 80, 1-9 . (p. 1)
- 23 - ENDO, Y., YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., TOJO, S., KOBATA, A. (1979)
J. Biochem. (TOKYO), 85, 669-679 . (p. 24)
- 24 - FISCHER, F.G., NEBEL, G.G. (1955) Z. Physiol. Chem., 302, 10-18 . (pp. 49, 64)
- 25 - FLETCHER, A.P., MARKS, G.S., MARSHALL, R.D., NEUBERGER, A. (1963) Biochem. J.,
87, 265-269 . (p. 12)
- 26 - FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, L.,
VLIEGENTHART, J.F.G., SCHMID, K., BINETTE, J.P. (1977) Biochemistry, 17,
5206-5214 . (pp. 7, 9)
- 27 - FUKUDA, M.N., MATSUMURA, G. (1976) J. Biol. Chem., 251, 6218-6225 . (p. 1)

- 28 - GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M., GLOVER, J.S. (1963) *Biochem. J.*, 89, 114-123 .
(p. 54)
- 29 - HART, G.W., BREW, K., GRANT, G.A., BRADSKAW, R.A., LENNARZ, W.S. (1979)
J. Biol. Chem., 254, 9747-9753 . (p. 26)
- 30 - HELDER, J.H., ALEXANDER, S. (1982) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79, 4540-4544 .
(p. 31)
- 31 - HORMANN, H., GOLLWITZER, R. (1962) *Anal. Chem.*, 655, 178-182 . (p.12)
- 32 - HOWARD, D.R., NATOWICZ, M., BAENZIGER, J.U. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257,
10861-10868 . (p. 25)
- 33 - HSIEH, P., ROSNER, M.R., ROBBINS, P.W. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 2555-
2561 . (p. 26)
- 34 - HUANG, C.G., MAYER, H.E., MONTGOMERY, R. (1970) *Carbohydr. Res.*, 13, 127-137 .
(pp. 12, 14, 15, 42)
- 35 - ISHIHARA, H., TAKAHASHI, N., ITO, J., TAKEUCHI, E., TEJIMA, S. (1981)
Biochim. Biophys. Acta, 669, 216-221 . (p. 12)
- 36 - ITO, S., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
63, 938-944 . (p. 22)
- 37 - ITO, J., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, 171,
78-86 . (p. 29)
- 38 - ITO, J., YAMASHITA, K., SPIRC, R.G., KOBATA, A. (1977) *J. Biochem. (TOKYO)*,
81, 1621-1631 . (p. 30)
- 39 - JAISSON, M.O. (1980) Thèse d'Ingénieur CNAM, LILLE . (pp. 77, 82, 89)
- 40 - JENNER, F.A., POLLIT, R.J. (1977) *Biochem. J.*, 103, 48-49 . (p. 18)
- 41 - JEVONS, F.R. (1958) *Nature*, 181, 1346-1349 . (p. 12)
- 42 - JOHANSEN, P.G., MARSHALL, R.D., NEUBERGER, A. (1961) *Biochem. J.*, 78,
518-522 . (p. 12)

- 43 - KAVERZNEVA, E.D., BOGDANOV, V.P. (1960) *Biokhimiya*, 26, 105-108 . (p. 12)
- 44 - KAVERZNEVA, E.D., DE-FAN, T. (1961) *Biokhimiya*, 26, 782-786 . (p. 12)
- 45 - KOBATA, A. (1978) In *Methods in Enzymology*, (GINSBURG, V., ed.), Vol. 50, Academic Press, New York, 567-574 . (pp. 25, 29, 100)
- 46 - KOBATA, A. (1979) *Anal. Biochem.*, 100, 1-14 . (pp. 1, 37, 39)
- 47 - KOIDE, N., MURAHATSU, T. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 4897-4904 . (pp. 20, 22, 24)
- 48 - KOIDE, N., MURAHATSU, T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 411-416 . (pp. 22, 51)
- 49 - KOIDE, N., NOSE, H., MURAHATSU, T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 830-841 . (p. 24)
- 50 - KOIDE, N., MURAHATSU, T., KOBATA, A. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)*, 81, 149-155 . (p. 25)
- 51 - KONDO, T., FUKUDA, K., OSAMA, T. (1977) *Carbohydr. Res.*, 58, 405-414 . (p. 7)
- 52 - LEE, Y.C., MONTGOMERY, R. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 9-15 . (p. 12)
- 53 - LEGER, D., FORDEPA, V., SPIK, G., DORLAND, L., HAVERELAMP, J., VLIEBENHART, J.F.G. (1978) *FEBS Letters*, 93, 255-260 . (pp. 7, 39)
- 54 - LI, Y.P., LI, S.C. (1973) In *Methods in Enzymology*, (GINSBURG, V., ed.), Vol. 28, Academic Press, New York, 699-706 . (p. 44)
- 55 - LI, Y.P., LI, S.C. (1973) In *Methods in Enzymology*, (GINSBURG, V., ed.), Vol. 28, Academic Press, New York, 714-722 . (p. 44)
- 56 - LI, Y.P., LI S.C. (1980) *Anal. Biochem.*, 104, 184-189 . (p. 130)
- 57 - LI, S.C., ASAKAWA, M., HIRabayashi, Y., LI, Y.P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 660, 278-283 . (pp. 33, 36, 77)

- 58 - LIANG, C.J., YAMASHITA, K., MUEHLENBERG, C.G., SHICHI, H., KOBATA, A. (1979)
J. Biol. Chem., 254, 6414-6418 . (p. 24)
- 59 - LINDAHL, B., RODEN, L. (1972) In Glycoproteins, their structure and function,
(GOTTSCALK, A., ed.) Vol. A, pp. 491-517, Elsevier, Amsterdam . (p. 5)
- 60 - LINEWEAVER, H., BURK, D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., 56, 658-666 . (p. 93)
- 61 - LIS, H., SHARON, N. (1978) J. Biol. Chem., 253, 3468-3476 . (pp. 7, 10)
- 62 - Mc ILVAINE, J.C. (1921) J. Biol. Chem., 49, 183-186 . (pp. 45, 92)
- 63 - MALEY, F., TRIMBLE, R.B. (1981) J. Biol. Chem., 256, 1088-1090 . (p. 25)
- 64 - MARSHALL, R.D., NEUBERGER, A. (1964) Biochemistry, 3, 1596-1600 . (p. 12)
- 65 - MELLIS, S.J., BAENZIGER, J.V. (1981) Anal. Biochem., 114, 276-284 . (p. 130)
- 66 - MONSIGNY, M., ADAM-CHOSSON, A., MONTREUIL, J. (1968) Bull. Soc. Chem. Biol.,
50, 857- 861 . (p. 41)
- 67 - MONTREUIL, J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157-223 . (p. 18)
- 68 - MONTREUIL, J. (1982) In Comprehensive Biochemistry : Glycoproteins,
(NEUBERGER, A., ed.), Elsevier Scientific Publishing Company, 19B Part II,
1-188 . (p. 18)
- 69 - MORELL, A.G., VAN DEN HAMER, C.J.A., SCHEINBERG, I.H., ASHWELL, G. (1966)
J. Biol. Chem., 241, 3745- 3749 . (p. 52)
- 70 - MURAMATSU, T. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5535-5537 . (p. 20)
- 71 - MURAMATSU, T., ATKINSON, P.H., NATHANSON, S.G., CECCARINI, C. (1973)
J. Mol. Biol., 80, 781-799 . (p. 24)
- 72 - MURAMATSU, T., KOIDE, N., CECCARINI, C., ATKINSON, P.H. (1976) J. Biol. Chem.,
251, 4673-4679 . (p. 24)

- 73 - MURAMATSU, T., OGATA, M., KOIDE, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 444, 53-68 .(p. 24)
- 74 - MURAMATSU, T. (1978) In *Methods in Enzymology*, (GINSEBURG, V., ed.), Vol. 50, Academic Press, New York, 555-559 . (pp. 20, 23, 103)
- 75 - MURAMATSU, T., KOIDE, N., MAEYAMA, K. (1978) *J. Biochem. (TOKYO)*, 83, 363-368 . (pp. 20, 22, 89)
- 76 - NAKAGAWA, H., YAMADA, T., CHIEN, J.L., GARDAS, A., KITAMIKADO, M., LI, S.C., LI, Y.T. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 5955-5959 . (p. 1)
- 77 - NAKAJIMA, T., BALLOU, C.E. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7685-7694 . (pp. 7,11,31)
- 78 - NAKAJIMA, T., BALLOU, C.E. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 870-879 (p. 31)
- 79 - NARASIMHAN, S., HARPAZ, N., LONGMORE, G., CARVER, J.P., GREY, A.A., SCHACHTER, H. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4876-4888 . (pp. 13, 15, 16, 17, 42, 111)
- 80 - NATOWICK, M.N., BAENZIGER, J.V., SLY, W.S. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 4412-4420 . (p. 25)
- 81 - NESS, S., VEH, R.W., SHAUER, R. (1975) *Z. Physiol. Chem.*, 356, 1027-1042 . (p. 41)
- 82 - NEUBERGER, A. (1938) *Biochem. J.*, 32, 1435- 1439 . (p. 12)
- 83 - NILSSON, B., NORDEN, N.E., SVENSSON, S. (1978) *Proc. 4th Intern. Symp. Glycoconjugates*, Woods Hole, Acad. Press, New York . (p. 7)
- 84 - NISHIGAKI, M., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 638-645 . (pp. 34, 36)
- 85 - NUENKE, R.H., CUNNINGHAM, L.W. (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 2452-2459 . (p. 12)
- 86 - OGATA-ARAKAWA, M., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1977) *J. Biochem. (TOKYO)*, 82, 611-614 . (p. 33)
- 87 - OVERDIJK, B., VAN DER KROEF, W.J., LISMAN, J.J.W., PIERCE, R.J., MONTREUIL, J.,

- SPIK, G. (1981) FEBS Lett., 128, 364-366 . (p. 36)
- 88 - PESONEN, M., HAAHTELA, K., RENKONEN, O. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 588, 102-112 . (p. 24)
- 89 - PIERCE, R.J., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1979) Biochem. J., 180, 673-676 . (pp. 35, 105, 136)
- 90 - PIERCE, R.J., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1980) Biochem. J., 185, 261-264 . (pp. 35, 105, 136)
- 91 - READING, C.L., PENHOET, E.E., BALLOU, C.E. (1978) J. Biol. Chem., 253, 5600-5612 . (p. 7)
- 92 - ROOP, W.E., PUTMAN, F.W. (1967) J. Biol. Chem., 242, 2507-2513 . (p. 41)
- 93 - ROSNER, M.R., TUNG, J.S., HOPKINS, N., ROBBINS, P.W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6420- 6424 . (p. 26)
- 94 - SCHMID, K., McNAIR, M.B., BURGI, A.F. (1958) J. Biol. Chem., 230, 853-864 . (p. 41)
- 95 - SHEPHERD, V., MONTGOMERY, R. (1978) Carbohydr. Res., 61, 147-157 . (pp. 13, 16, 17)
- 96 - SPIK, G., MONTREUIL, J. (1969) Bull. Soc. Chem. Biol., 51, 1271-1285 . (p. 41)
- 97 - SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J. (1975) FEBS-Lett., 50, 296-299 . (p. 7)
- 98 - SPIK, G., MAZURIER, J. (1978) In "Proteins of Iron Metabolism" (BROW, E.B., ed.) p. 143-151, Grune and Stratton, New York . (p. 41)
- 99 - STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DHOMDT, J.L., FARRIAUX, J.P. (1976) Biochimie, 58, 579-586 . (p. 42)
- 100 - STRECKER, G., MONTREUIL, J. (1979) Biochimie, 61, 1199-1246 . (pp. 18, 19, 138)
- 101 - TACHIBANA, Y., YAMASHITA, K., KOBARA, A. (1982) Arch. Biochem. Biophys., 214, 199-210 . (pp. 34, 35, 36, 103)

- 102 - TAI, T., ITO, S., YAMASHITA, K., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 968-974 . (p. 22)
- 103 - TAI, T., YAMASHITA, K., OGATA-ARAKAWA, M., KOIDE, N., MURAMATSU, T.,
IWASHITA, S., INCUE, Y., KOBATA, A. (1975) J. Biol. Chem., 250,
8569-8575 . (pp. 16, 17, 22, 126)
- 104 - TAI, T., YAMASHITA, K., ITO, S., KOBATA, A. (1977) J. Biol. Chem. 252,
6687-6694 . (pp. 13, 15, 16, 25, 30, 42, 111)
- 105 - TAI, T., YAMASHITA, K., KOBATA, A. (1977) Biochem. biophys. Res. Commun.,
78, 434-441 . (pp. 16, 17, 30, 127, 137)
- 106 - TAKAHASHI, N., NISHIBE, H. (1978) J. Biochem (TOKYO), 84 , 1467-1473 .
(p. 1)
- 107 - TAKAHASHI, N., NISHIBE, H., (1981) Biochim. biophys. Acta, 657, 457-467 .
(p. 1)
- 108 - TAKASAKI, S., KOBATA, A. (1976) J. Biol. Chem., 251, 3603-3609 . (p. 1)
- 109 - TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H.Jr., MALEY, F., (1972) J. Biol. Chem., 247,
2629-2631 . (p. 24)
- 110 - TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H.Jr., MALEY, F. (1973) J. Biol. Chem. 248,
5547-5551 . (p. 25)
- 111 - TARENTINO, A.L., MALEY, F. (1974) J. Biol. Chem., 249, 811-817 . (pp. 24, 25
(pp. 24, 25, 100)
- 112 - TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H.Jr., MALEY, F. (1974) J. Biol. Chem., 249,
818-824 (p. 25)
- 113 - TARENTINO, A.L., MALEY, F. (1975) Biochem. biophys. Res. Commun., 67,
445-462 . (pp. 22, 25)
- 114 - TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H.Jr., MALEY, F. (1975) Biochemistry, 14,
5516-5523 . (p. 24)
- 115 - TARENTINO, A.L., MALEY, F. (1976) J. Biol. Chem., 251, 6537-6543 .
(pp. 34, 77, 89, 100, 103)
- 116 - TARENTINO, A.L., MALEY, F. (1977) Anal. Biochem., 77, 185-194 . (p. 84)

- 117 - TARENINO, A.L., TRIMBLE, R.B., MALEY, F. (1978) in *Methods in Enzymology*, 50, 574-580 (GINSBURG, V. ed.), Acad. Press, New-York . (p. 26)
- 118 - TARENINO, A.L., TRIMBLE, R.B., AJLICK, G.E., MALEY, F. (1982) in *Methods in Enzymology*, 83, 603-610 (GINSBURG, V. ed.), Acad. Press, New-York . (p. 26)
- 119 - THOMAS, H., PLUMMER, T.H.Jr., TARENINO, A.L. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 10243-10246 . (p. 1)
- 120 - TKACZ, J.S. (1978) *Anal. Biochem.*, 84, 49-55 . (p. 130)
- 121 - TRIMBLE, R.B., MALEY, F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Acta*, 78, 935-944 . (p. 26)
- 122 - TRIMBLE, R.B., MALEY, F. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 4409-4412 . (p. 26)
- 123 - TRIMBLE, R.B., TARENINO, A.L., PLUMMER, T.H., MALEY, F. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 4508-4511 . (pp. 25, 30)
- 124 - TRIMBLE, R.B., TARENINO, A.L., EVANS, G., MALEY, F. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 9708-9713 . (p. 26)
- 125 - TURCO, S.J. (1981) *Anal. Biochem.*, 118, 278-283 . (p. 130)
- 126 - UMEMOTO, J., BHAVANANDAN, V.P., DAVIDSON, E.A. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 8609-8618 . (p. 1)
- 127 - VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VliegENHART, J.F.G., SPIK, G., CHERON, A., MONTREUIL, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 675, 293-296 . (pp. 7, 106)
- 128 - VESTERBERG, O., SVENSSON, H. (1966) *Acta Chem. Scand.*, 20, 820-834 . (p. 46)
- 129 - YAMASHINA, I., MAKINO, M. (1962) *J. Biochem. (TOKYO)*, 51, 359-364 . (p. 12)
- 130 - YAMASHINA, I., BAN-I, K., MAKINO, M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 78, 382-384 . (p. 12)
- 131 - YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., KOBATA, A. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 3862-3869 . (pp. 15, 16, 25, 42, 111, 117, 125)
- 132 - ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G. (1972) *J. Chromatogr.*, 69, 291-304 . (p. 61)

R E S U M E

L'étude que nous avons réalisée sur l'endo-N-acétyl- -D-glucosaminidase du Basidiomycète Sporotrycum Dimorphosporum est portée sur la purification de l'enzyme , la détermination de ses propriétés physico-chimiques et enzymatiques et sur sa purification .

La préparation enzymatique que nous avons obtenue après les étapes de purification par ultrafiltration , chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite chromatographie sur colonne de D.E.A.E. trisacryle M et chromatographie sur colonne de Biogel-agarose A 0.5 M est débarrassée des principales activités exoglycosidasiques et protéasiques contaminantes et est enrichie de 350 fois en activité endo-N-acétylglucosaminidasique .

L'enzyme possède un Km de 0,91 mM pour le glycopeptide $(Gal)_2(GlcNAc)_2(Man)_3(GlcNAc)_2Asn$ et 0,67 mM pour le glycopeptide $(Man)_6(GlcNAc)_2Asn$. Le pH optimum d'activité est de 4,5 pour le premier substrat et 5,5 pour le second . Les deux activités possèdent une même température optimale (60°C) , une même masse moléculaire apparente (89000) , un même pHi (2,9) , une même stabilité à la température et au pH .

L'étude de la spécificité montre que l'enzyme est active sur les structures de type N-acétyllactosaminiques biantennées désialylées , sur les structures de type oligomannosidiques renfermant de 3 à 9 résidus de mannose et sur les structures de type mixtes $(Man)_5(GlcNAc)_4Asn$ et $(Man)_3(GlcNAc)_3Asn$.

M O T S C L E S

Endo-N-acétylglucosaminidase , déglycosylation enzymatique , catabolisme glycoprotéines .