

Le système protéolytique de *Penicillium Roqueforti*. IV. Propriétés d'une carboxypeptidase acide.

par J.-C. GRIPON

avec la collaboration technique de Michèle NARDI

Laboratoire de Biochimie Microbienne, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas.

Summary. *Proteolytic system of Penicillium roqueforti.*

IV. Properties of an acid carboxypeptidase.

An extracellular acid carboxypeptidase has been isolated from the culture medium of *Penicillium roqueforti*. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, filtration on Biogel P-100, chromatography on DEAE and CM-cellulose and filtration on Biogel P-150.

The molecular weight of the enzyme was estimated at 110 000 daltons by gel filtration. The optimum pH is 3.5-4.0 for Z-Glu-Tyr hydrolysis. At 35 °C the enzyme is stable in the range 5.0-5.5 ; optimum temperature is 40 °C. The enzyme was insensitive to metal cations and was not inhibited by metal chelators or sulfhydryl reagents (PHMB, MIAA). DFP inhibited enzyme activity but pH dependency was observed. Gly in the penultimate position or in C-terminal position caused poor hydrolysis of N-substituted dipeptides. The action of the enzyme on glucagon showed that it is non-specific and releases neutral, basic or acid amino acids. However, the enzyme cleaved the Pro₂₈-Lys₂₉ peptide bond of the oxydized insulin B-chain very slowly.

The properties of this enzyme were similar to those of other acid carboxypeptidases from molds.

Introduction.

Les nombreuses études réalisées sur le système protéolytique exocellulaire des moisissures ont permis de montrer la complexité de ce dernier. En dehors des activités endopeptidasiques du type protéases acides (Fukumoto, Tsuru et Yamamoto, 1967 ; Hofmann et Shaw, 1964 ; Yu *et al.*, 1968), métalloprotéases (Nakasai, Nasuno et Iguchi, 1973b ; Sekine, 1972), protéases à groupe sérine (Turkova *et al.*, 1969 ; Hayashi, Fukushima et Noji, 1967), des activités exopeptidasiques ont été mises en évidence. En particulier une activité carboxypeptidasique à pH acide a été détectée et des carboxypeptidases acides ont été étudiées pour une levure (Hayashi, Moore et Stein, 1973a) et certaines moisissures (Nakadai, Nasuno et Iguchi, 1972a ; Jones et Hofmann, 1972 ; Ichishima, 1972). Il est maintenant démontré que ces enzymes diffèrent nettement des carboxypeptidases des tissus animaux : en dehors de leur pH d'action très différent,

elles ne sont pas inhibées par les agents chélateurs des métaux mais par un réactif de la sérine le DFP. De plus leur spécificité est large puisqu'elles libèrent les acides aminés C-terminaux apolaires, acides ou basiques, y compris pour certaines (Hayashi, Moore et Stein, 1973a ; Arai et Ichishima, 1974 ; Hui *et al.*, 1974) la proline. Des enzymes présentant des caractères comparables ont été mises en évidence dans des organes végétaux tels que la graine de l'orge (Visuki, Mikoba et Enari, 1969) ou l'exocarpe de certains agrumes (Kubota *et al.*, 1973 ; Sprossler, 1971).

En ce qui concerne le système protéolytique exocellulaire de *Penicillium roqueforti* on a constaté qu'il comportait des endopeptidases (une protéase acide (Zevaco, Hermier et Gripon, 1973) et une protéase neutre (Gripon et Hermier, 1974)) mais également des activités aminopeptidasiques et carboxypeptidasiques. Dans le présent mémoire on se consacrera uniquement à l'étude de l'activité carboxypeptidasique à pH acide et l'on constatera que cette enzyme a des propriétés analogues à celles des carboxypeptidasiques de moisissures déjà étudiées.

Techniques expérimentales et matériel utilisé.

1) Production de l'enzyme.

La souche utilisée ainsi que les conditions de culture ont été précédemment décrites (Zevaco, Hermier et Gripon, 1973). Le filtrat de culture était recueilli après 72 h d'incubation alors que le pH du milieu était de 4,5.

2) Mesure de l'activité carboxypeptidasique.

L'activité était mesurée sur le Z-Glu-Tyr (Sigma) par la mesure de la quantité de tyrosine libérée à l'aide de la ninhydrine. 0,1 ml de solution enzymatique en tampon acétate 0,1 M pH 4,0 était ajouté à 0,9 ml de Z-Glu-Tyr $0,8 \cdot 10^{-3}$ M dans le même tampon. Après 10 mn d'incubation à 35 °C la réaction était arrêtée par l'addition de 1 ml de ninhydrine préparée selon Moore et Stein (1954) et le mélange était immédiatement placé dans un bain-marie bouillant pendant exactement 15 mn, puis dans un bain d'eau froide pendant 5 mn. Après addition de 8 ml d'éthanol à 50 p. 100 la densité optique de la solution était lue à 570 nm. Une unité carboxypeptidasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole de tyrosine par minute dans les conditions précédentes.

3) Dosage des protéines.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (1951) avec le réactif de Folin et Ciocalteu. La sérum-albumine a servi de protéine étalon.

Abréviations : CM : carboxyméthyle ; DEAE : diéthylaminoéthyle ; PMC : chlorure phényle mercurique ; MMB : bromure méthyle mercurique ; PHMB : p-hydroxymercuribenzoate ; MIAA : acide monoiodoacétique ; TPCK : p-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylcétone ; TLCK : N- α -p-tosyl-L-lysine chlorométhylcétone ; DFP : diisopropyle fluorophosphate ; Z-Glu-Tyr : N-carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine.

4) Action sur les substrats synthétiques.

Ils ont été soumis à l'action de la carboxypeptidase à une concentration de $0,5 \cdot 10^{-3}$ en tampon acétate 0,1 M pH 4,0. En cas d'insolubilité 1 p. 100 de diméthylformamide était ajouté au tampon (il a été vérifié à l'aide du Z-Glu-Tyr que la présence de ce composé ne modifie pas la vitesse d'hydrolyse du substrat). 0,1 ml de solution enzymatique était ajouté à 0,9 ml de substrat. L'hydrolyse était détectée par coloration à la ninhydrine comme précédemment décrit.

5) Action sur les chaînes polypeptidiques.

La chaîne B de l'insuline (Mann), le glucagon (Calbiochem), l'hexapeptide His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe (Mann) étaient incubés en tampon acétate 0,02 M (pH réactionnel : 5,5) à des concentrations respectives de 1,60, 1,60 et 0,66 mg/ml. Le rapport pondéral enzyme-substrat était de 1/125. Les hydrolyses étaient suivies par prélèvement d'aliquotes, puis électrophorèse sur papier à pH 1,9. Après 24 h à 30 °C l'enzyme était inactivée par alcalinisation du milieu et le mélange analysé sur un autoanalyseur Beckman Unichrom.

6) Détermination du poids moléculaire.

Le poids moléculaire a été estimé par filtration sur gel (Andrews, 1964) sur une colonne de Biogel P 150 ($100 \times 2,1$ cm) équilibrée en tampon acétate 0,1 M pH 5,5. L'aldolase du muscle de lapin (PM : 158 000 daltons), la sérum-albumine bovine (PM : 67 000 daltons), l'albumine de l'œuf (PM : 45 000 daltons) et le chymotrypsinogène (PM 25 000 daltons) ont servi de protéines étalons.

7) Electrophorèses.

Les électrophorèses étaient réalisées soit en plaques d'acrylamide agarose, soit en tube d'acrylamide. En acrylamide agarose le tampon était un tampon Tris-glycine pH 8,7, préparé selon Uriel (1966). Les protéines étaient colorées par immersion et agitation pendant 3 h dans le bleu de Coomassie (0,012 p. 100) en solution dans le mélange eau, méthanol, acide acétique, glycérol (52,5 ; 40 ; 5 ; 2,5). La décoloration avait lieu pendant une nuit dans une solution à 40 p. 100 de méthanol contenant 5 p. 100 d'acide acétique et 3 p. 100 de glycérol. Les électrophorèses en tube d'acrylamide étaient effectuées en tampon Tris-borate 0,1 M pH 9,2 ou en tampon β alanine-acide acétique pH 4,3 (Reisfeld, Lewis et Williams, 1962). Le bleu de Coomassie utilisé selon la méthode de Chrambach *et al.* (1967) a été employé pour la révélation des protéines.

L'existence de plusieurs protomères dans la molécule enzymatique a été testée par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS selon la méthode de Dunker et Rueckert (1969).

8) Purification de l'enzyme.

Le mycélium était séparé du milieu de culture par filtration sous vide sur filtre Durieux n° 111. Les spores et débris mycéliens restant en suspension étaient éliminés par centrifugation en continu à 27 000 g et 4 °C.

La concentration des protéines avait lieu par précipitation au sulfate d'ammonium à 80 p. 100 de saturation. Après un séjour d'une semaine à 4 °C le précipité était récupéré par filtration sur filtre en fibre de verre (Watman GF/F) puis mis en solution dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

— *Filtration sur Bio-Gel P-100.*

Après concentration préalable sur membrane Diaflo UM 10 les protéines étaient chromatographiées sur une colonne de Bio-Gel P-100 (4,2 × 132 cm) en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0. Le volume de l'échantillon était inférieur ou égal à 80 ml. Les fractions actives étaient regroupées et dialysées pendant une nuit contre du tampon phosphate 0,01 M pH 6,0.

— *Chromatographie sur DEAE-cellulose.*

Par fractions d'environ 20 mg l'extrait enzymatique était chromatographié sur une colonne de DEAE-cellulose (2,5 × 10,5 cm) équilibrée en tampon phosphate 0,01 M pH 6,0 et élué par un gradient de même tampon de molarité 0,01-0,2 M.

— *Chromatographie sur CM-cellulose.*

Après regroupement et dialyse contre un tampon phosphate 0,01 M pH 6,0 les protéines actives sont placées par fractions de 10 mg ou moins au sommet d'une colonne de CM-cellulose (2,5 × 10 cm) équilibrée avec le même tampon. Les protéines fixées sont éluées par un gradient de tampon phosphate 0,01-0,35 M.

— *Filtration sur Bio-Gel P-150.*

La fraction active non fixée sur CM-cellulose est concentrée sur membrane Diaflo UM 20, puis chromatographiée par volume de 5 ml sur colonne de Bio-Gel P-150 (2,0 × 99 cm) équilibrée en tampon acétate 0,1 M pH 5,5.

Résultats.

I. Purification (fig. 1, 2, 3 et 4).

Les pigments encore présents en grande quantité après la précipitation au sulfate d'ammonium sont éliminés sur Bio-Gel P-100 (fig. 1). Par chromatographie sur DEAE-cellulose (fig. 2) une seule activité carboxypeptidasique est éluée à une molarité de 0,10 M. Sur CM-cellulose (fig. 3) les protéines actives sont séparées en une fraction non fixée sur la colonne représentant environ 95 p. 100 de l'activité totale et une fraction mineure fixée sur la colonne. Cette dernière fraction (fraction B) a été mise de côté pour comparaison ultérieure avec la préparation purifiée. La purification a été poursuivie sur les protéines non fixées par une chromatographie sur Bio-Gel P-150 (fig. 4) qui élimine une quantité notable des protéines de l'extrait.

Un bilan de la purification est présenté dans le tableau 1. L'activité spécifique du filtrat de culture brut n'a pu être déterminée sur le Z-Glu-Tyr à cause de la présence des groupements aminés de l'hydrolysats tryptique de caséine composant le milieu.

TABLEAU 1
Bilan de purification

	Protéines (mg)	Volume (ml)	Unités	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (p. 100)	Purification
Filtrat de culture.....	13 084	18 000				
Précipité au sulfate d'ammonium	2 145	165	111,3	0,05	100	1
Bio-gel P-100.....	92	285	96,8	1,05	87	20
DEAE-cellulose	34	186	73,5	2,16	66	42
CM-cellulose	15	150	48,9	3,26	44	63
Bio-gel P-150.....	3,75	84	35,2	9,38	32	183

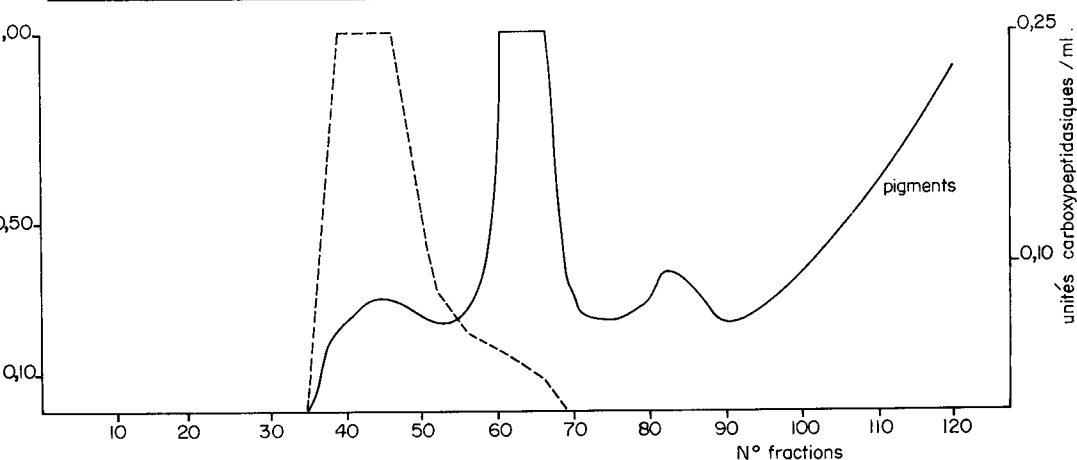


FIG. 1. — Chromatographie sur Bio-gel P-100

Colonne : 132 × 4,2 cm ; Volume d'échantillon : 80 ml ; Débit : 60 ml/h ; Fractions : 12 ml ; Elution en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0.

—— : Densité optique à 280 nm. - - - - : Activité carboxypeptidasique.

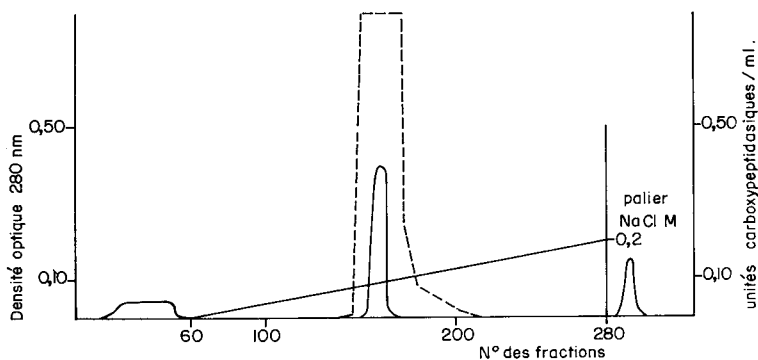


FIG. 2. — Chromatographie sur D.E.A.E.-cellulose.

Colonne : 10,5 × 2,5 cm ; Volume d'échantillon : 180 ml ; Débit : 30 ml/h ; Fractions : 5 ml ; Tampon phosphate 0,01 M pH 6,0 ; Gradient de tampon 0,01-0,2 M puis palier NaCl 1 M.

—— : Densité optique à 280 nm. - - - - : Activité carboxypeptidasique.

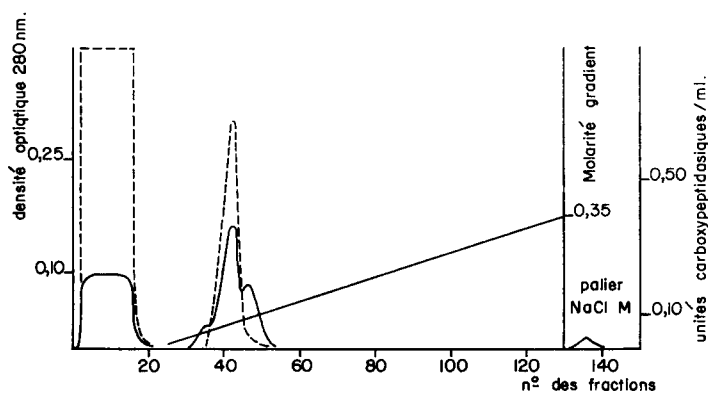


FIG. 3. — Chromatographie sur CM-cellulose.

Colonne : $2,5 \times 10$ cm ; Volume d'échantillon : 70 ml ; Débit : 30 ml/h ; Fraction : 5 ml ; Tampon phosphate 0,01 M pH 6,0 ; Gradient de tampon 0,01-0,35, puis palier NaCl 1 M.

— : Densité optique à 280 nm.

- - - - : Activité carboxypeptidasique.

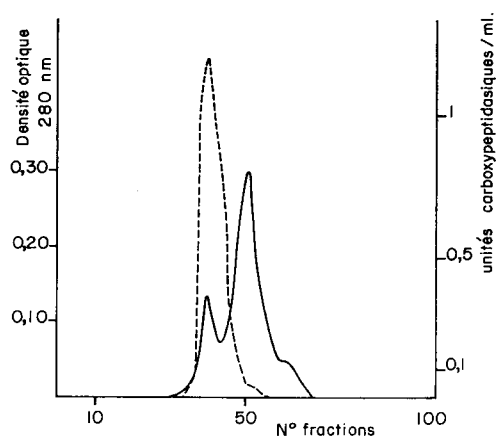


FIG. 4. — Chromatographie sur Bio-gel P-150.

Colonne : $99 \times 2,0$ cm ; Volume d'échantillon : 5 ml ; Débit : 10 ml/h ; Fractions : 2,5 ml ; Elution en tampon acétate 0,1 M pH 5,5.

— : Densité optique à 280 nm.

- - - - : Activité carboxypeptidasique.

Le degré final de purification par rapport à la précipitation après sulfate d'ammonium est de 183. Il est à noter que la quantité initiale d'enzyme produite par *P. roqueforti* dans le milieu est faible (moins de 0,7 mg par litre du milieu de culture).

Par électrophorèse de l'extrait enzymatique purifié en gel d'acrylamide à pH 4,3 une seule bande de protéine est obtenue. Par contre, à pH alcalin en gel d'acrylamide ou d'acrylamide agarose on observe la présence d'une bande principale et d'une bande de coloration faible. La révélation de l'activité dans les gels d'acrylamide a été

testée par découpage du gel en disques et incubation de ces disques en présence de Z-Glu-Tyr tamponné à pH 4,0. Aucune activité n'a pu être détectée par cette méthode, l'enzyme étant probablement dénaturée par le pH alcalin du tampon d'électrophorèse. Cependant les courbes d'inactivation thermiques obtenues en exprimant le logarithme de l'activité résiduelle en fonction du temps de chauffage sont des droites (fig. 7) et indiquent qu'une seule activité carboxypeptidasique est présente dans la préparation. L'extrait enzymatique obtenu après P-150 a été considéré comme suffisamment purifié pour entreprendre l'étude de ses propriétés.

II. Propriétés.

1. Influence du pH.

Le pH optimum d'action est de 3,5-4,0 sur le Z-Glu-Tyr en tampon citrate-phosphate (fig. 5). L'activité enzymatique est sensible à la nature du tampon présent et à pH 4,0 elle est environ deux fois et demie plus forte en tampon acétate qu'en tampon citrate-phosphate.

La stabilité vis-à-vis du pH a été mesurée entre pH 2,6 et 7,0 après incubation en tampon citrate-phosphate 0,2 M puis détermination de l'activité résiduelle sur le

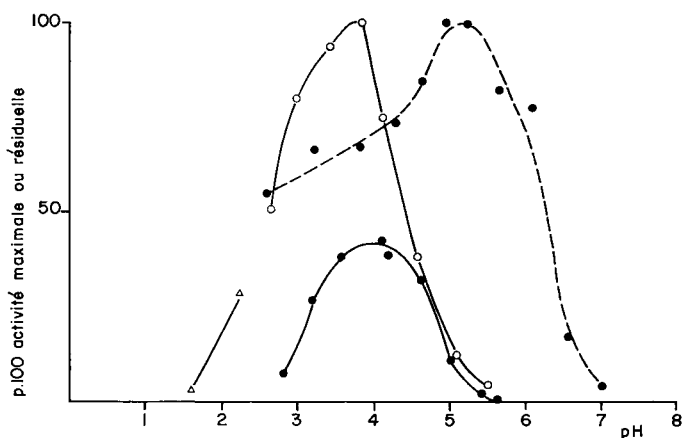


FIG. 5. — Influence du pH.

a) pH optimum d'action

- △—△ : Tampon KCl HCl 0,1 M
- : Tampon citrate phosphate 0,1 M
- : Tampon acétate 0,1 M

Mélange d'hydrolyse : — 0,1 ml d'enzyme en tampon acétate pH 5,5 0,05 M ; — 0,9 ml de Z-Glu-Tyr 0,8 mM en tampon 0,1 M
Hydrolyse : 20 mn à 35 °C.

b) Stabilité vis-à-vis du pH

- --- ● : Tampon citrate phosphate
- Incubation : 20 mn à 35 °C en tampon citrate phosphate 0,2 M.
Hydrolyse : selon matériel et méthodes.

Z-Glu-Tyr tamponné à pH 4,0. Après 20 mn à 35 °C l'enzyme reste stable (fig. 5) dans une zone de pH étroite comprise entre 5,0 et 5,5. L'activité diminue très rapidement pour des pH supérieurs à 6,0.

2. Influence de la température.

Sur le substrat Z-Glu-Tyr l'hydrolyse maximale est obtenue à 40 °C (fig. 6). En tampon acétate 0,1 M pH 5,5 pendant 40 mn à différentes températures l'enzyme reste stable jusqu'à 42 °C. La stabilité thermique diminue rapidement au-dessus de cette valeur, après 20 mn d'incubation à 50 °C on ne retrouve plus d'activité (fig. 7).

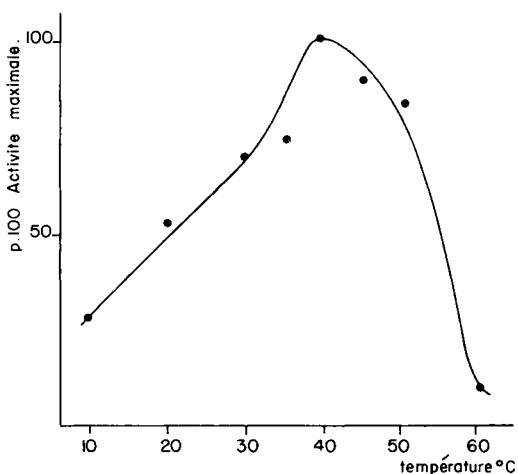


FIG. 6. — Température optimale d'action.

Mélange d'hydrolyse : 0,1 ml de solution enzymatique en tampon acétate 0,1 M pH 5,5 ; — 0,9 ml de Z-Glu-Tyr, 0,8 mM en tampon acétate 0,1 M pH 4,0.
Incubation pendant 20 mn à 35 °C.

3. Estimation du poids moléculaire.

Le poids moléculaire estimé par filtration sur Bio-Gel P-150 (fig. 8) est de 110 000 daltons.

L'électrophorèse en présence de SDS ne permet pas de montrer l'existence de sous-unités. En effet on observe, comme pour les électrophorèses à pH alcalin précédentes, l'existence d'une bande de protéine principale et d'une bande de faible intensité qui correspondent respectivement à des poids moléculaires de 102 000 et 115 000. La différence entre ces deux poids moléculaires semble trop forte pour admettre que ces deux bandes correspondent à des isoenzymes.

4. Action des inhibiteurs (tabl. 2).

Les agents chélateurs tels que l'EDTA ou l'O-phénantroline sont sans effet sur l'activité enzymatique. Il en est de même des composés réducteurs comme le β -mer-

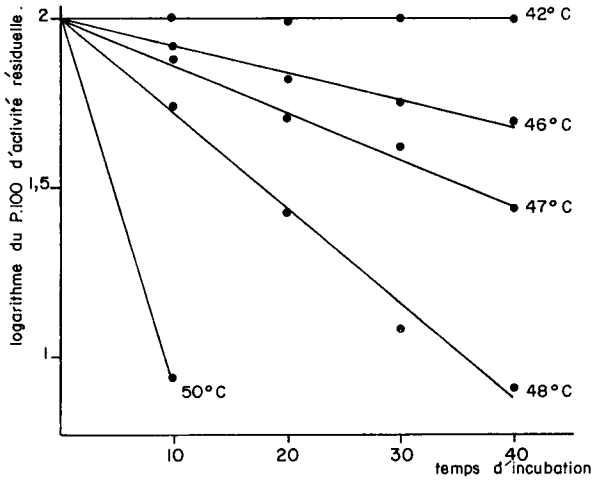


FIG. 7. — Stabilité à différentes températures.

Inactivation en tampon acétate 0,1 M pH 5,5.

Mélange d'hydrolyse : — 0,1 ml de solution enzymatique inactivée ; — 0,9 ml de Z-Glu-Tyr. 0,8 mM en tampon acétate 0,1 M pH 4,0.

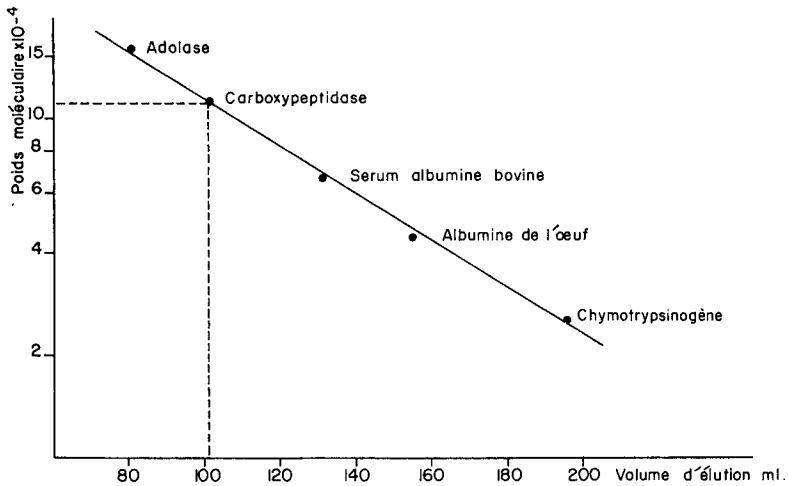


FIG. 8. — Estimation du poids moléculaire par filtration sur Bio-Gel P-150.

captoéthanol et le dithiothreitol. La carboxypeptidase a été soumise à l'action des réactifs des groupes SH ($HgCl_2$, PMC, MMB, PHMB, MIAA) : l'inhibition quand elle est observée reste faible, l'activité résiduelle étant au moins égale à 80 p. 100. Si l'on fait varier les conditions d'incubation avec le PHMB et le MIAA en modifiant le pH (de pH 4,5 à 6,5 en tampon acétate ou phosphate) ou la température (4 ou 20 °C), on n'observe pas d'inhibition supérieure aux précédentes. Il est donc peu probable qu'un

groupement SH soit impliqué dans la réaction. Les inhibiteurs de la trypsine (TLCK) et de la chymotrypsine (TPCK) n'ont pas d'action sur l'activité enzymatique. En revanche l'enzyme est inhibée par le DFP ce qui indique qu'un groupement sérine intervient dans la réaction. L'inhibition est fonction du pH. Elle augmente entre pH 5,0 et 6,5 sans toutefois être complète pour cette dernière valeur (tabl. 2).

TABLEAU 2

Effet des inhibiteurs

(Activité résiduelle mesurée selon Matériel et Méthodes et exprimée en p. 100 par rapport à un témoin incubé sans inhibiteur dans les mêmes conditions)

Inhibiteur	Conditions de pré-incubation				Activité résiduelle (p. 100)
	Molarité	Temps (mn)	Température (°C)	Tampon 0,1 M	
EDTA	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	94
O-phéнантроline ...	5.10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	104
β-mercaptoéthanol ..	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	94
Dithiothreitol	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	79
PMC	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	80
MMB	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	100
PHMB	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	81
MIAA	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	106
HgCl ₂	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	105
TPCK	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	93
TLCK	10 ⁻³	30	20	Acétate pH 5,5	87
DFP	10 ⁻³	180	4	Phosphate pH 5,0	87
DFP	10 ⁻²	180	4	Phosphate pH 5,0	68
DFP	10 ⁻²	180	4	Phosphate pH 6,0	35
DFP	10 ⁻²	180	4	Phosphate pH 6,5	18

5. Action des cations métalliques.

Les sels minéraux suivants : ZnSO₄, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄, CuCl₂, CoCl₂ ont été testés à la concentration de 10⁻³ M. Aucune influence notable n'a été observée ce qui suggère que l'activité enzymatique n'est pas affectée par les cations métalliques ou les ions Cl⁻ et SO₄²⁻.

6. Spécificité d'action.

Parmi les peptides de synthèse testés seuls le Z-Glu-Tyr, le Z-Glu-Phe et le Leu-Leu-Leu sont hydrolysés avec un bon rendement (tabl. 3). Contrairement à certaines carboxypeptidases d'*A. oryzae* (Nakadai, Nasuno et Igushi, 1972a,b,c, 1973a) l'enzyme de *P. roqueforti* hydrolyse faiblement ou pas les substrats possédant une glycine en position pénultième, en particulier le Z-Gly-Phe est beaucoup moins bien hydrolysé que le Z-Glu-Phe. De même les substrats ayant une glycine en position C-terminale sont faiblement hydrolysés. L'action sur les dipeptides est faible (Leu-Leu est beaucoup moins attaqué que le tripeptide Leu-Leu-Leu).

TABLEAU 3

Hydrolyse des substrats synthétiques

Substrat	Activité	Substrat	Activité
Z-Glu-Tyr	0,600	Z-Gly-Gly-Gly	0,025
Z-Glu-Phe	0,580	Leu-Leu-Leu	0,520
Z-Gly-Met	0,115	Leu-Gly-Gly	0,055
Z-Gly-Val	0,090	Met-Leu-Gly	0,025
Z-Gly-Phe	0,040	Gly-Try-Gly	0,040
Z-Gly-Arg	0,030	Gly-Tyr-Gly	0,010
Z-Gly-Ser	0,020	Leu-Leu	0,045
Z-Gly-X *	0,000	Leu-Tyr	0,070
Bz-Gly-Lys	0,000	Z-Gly-Phe-NH ₂	0,000
		Z-Gly-Val-NH ₂	0,000

* X : Asp, Pro, Gly, Ala, Try.

Mélange d'hydrolyse :

- 0,1 ml de solution enzymatique en tampon acétate 0,1 M pH 5,5 contenant 0,8 µg d'enzyme ;
- 0,9 ml de substrat 0,5 10⁻³ M en tampon acétate 0,1 M pH 4,0.

Incubation : 3 h à 35 °C.

Activité exprimée en différence de densité optique à 570 nm (après coloration à la ninhydrine) par rapport à un blanc incubé sans enzyme.

Après 24 h d'hydrolyse le glucagon est profondément hydrolysé (fig. 9). Du fait de la séparation incomplète des résidus Thr, Ser, Asn et Gln sur autoanalyseur et de la présence de résidus identiques en plusieurs points de la chaîne on ne peut préciser exactement où s'arrête l'hydrolyse. Parmi les résidus présents à un seul exemplaire dans la chaîne du glucagon (Met₂₇, Val₂₃, Ala₁₉, Lys₁₂ et Gly₄) on constate que Val₂₃, Ala₁₉ et Lys₁₂ représentent respectivement 88, 91 et 60 p. 100 de Met₂₇ et que Gly₄ n'est pas détectée, ce qui implique que l'hydrolyse s'arrête entre Lys₁₂ et Gly₄. Il apparaît donc que la spécificité de l'enzyme est large puisqu'elle est capable de libérer comme la carboxypeptidase A des acides aminés hydrophobes mais aussi des acides aminés acides et basiques (Asp, Lys et Arg).

Sur le substrat His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe (hexapeptide N-terminal du glucagon) on observe que le résidu Gln₃ est libéré en faible quantité (fig. 9) et que le dipeptide His₁-Ser₂ n'est pas coupé. Dans la mesure où les résidus Gln sont facilement libérés dans le glucagon (Gln₂₄ et Gln₂₀) la faible libération de la glutamine dans le tripeptide His-Ser-Gln peut être imputée à un effet de longueur de chaîne, les petits substrats (tripeptides) étant moins bien hydrolysés que les substrats plus longs.

Sur la chaîne de l'insuline l'alanine est libérée rapidement et en grande quantité. Les acides aminés suivants sont présents dans l'hydrolysats mais en quantités trop faibles pour être mesurées. La liaison Lys-Pro est donc hydrolysée à une vitesse très faible ce qui empêche la coupure des liaisons suivantes. Dans la mesure où la lysine est bien libérée dans le glucagon (liaison Ser₁₁-Lys₁₂) on peut conclure que la proline est responsable du très faible rendement obtenu pour cette liaison.

GLUCAGON

				5						10		
His	—	Ser	—	Gln	—	Gly	—	Thr	—	Phe	—	Lys
0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	(0,17)	(0,00)	(0,00)	(0,15)	(0,49)	(0,43)	0,60	
				15				20				
Tyr	—	Leu	—	Asp	—	Ser	—	Arg	—	Arg	—	Ala
(0,62)	(0,62)	(0,62)	(0,62)	(0,62)	(0,88)	(0,88)	0,91	(0,88)	(0,88)	(0,88)	0,88	(1,00)
				25				29				
Trp	—	Leu	—	Met	—	Asn	—	Thr				
—	(1,00)	1,00	(1,00)	(1,00)	(1,00)							

HEXAPEPTIDE

His	—	Ser	—	Gln	—	Gly	—	Thr	—	Phe
0,00	(0,00)	(0,17)	0,51	(0,51)	1,00					

INSULINE

1			20				25					
Phe	-----	Cys SO ₃ H	—	Gly	—	Glu	—	Arg	—	Gly	—	Phe
				+	+	+	+	+	+	+	+	+
				30								
Lys	—	Ala										
+	1,00											

FIG. 9. — Hydrolyse des chaînes peptidiques par la carboxypeptidase.

Rapport molaire des acides aminés libérés. Les chiffres entre parenthèses représentent les résidus hydrolysés en plusieurs endroits de la chaîne ou bien insuffisamment séparés sur autoanalyseur (Ser, Thr, Gln, Asn). Les quantités ont été calculées en supposant que chaque résidu est inférieur ou égal au précédent et supérieur ou égal au suivant.

+ : acide aminé présent en quantité trop faible pour être mesurée.

7. Propriétés de la fraction B.

La fraction B est séparée de l'extrait purifié par chromatographie sur CM-cellulose et représente une faible partie (5 p. 100) de l'activité totale (voir purification). Elle a été comparée succinctement à la préparation purifiée. Les inhibitions par le PHMB et le DFP sont très comparables en intensité et, pour le DFP, présentent la même dépendance vis-à-vis du pH. Le poids moléculaire estimé par filtration sur Bio-Gel P-150 dans les mêmes conditions que l'enzyme purifiée est de 105 000 daltons. La fraction B présentant donc des propriétés très comparables à la carboxypeptidase purifiée, son étude n'a pas été poursuivie.

Conclusion.

Le glucagon a été utilisé comme substrat pour les carboxypeptidases de *P. janthinellum* (carboxypeptidases S_1) (Jones et Hofmann, 1972), d'*A. saitoi* (Ichishima et Arai, 1973), d'une levure (carboxypeptidase Y, Hayashi, Moore et Stein, 1973a) et de la graine de coton (Ihle et Dure, 1972). Pour toutes ces enzymes ce substrat est profondément dégradé puisque l'on observe la libération d'acides aminés correspondant à l'hydrolyse de 9 liaisons pour la carboxypeptidase Y, 12 liaisons pour la carboxypeptidase d'*A. saitoi* et 19 liaisons pour la pénicillo-carboxypeptidase S_1 . L'enzyme de *P. roqueforti* coupe pour le moins 18 acides aminés sur cette chaîne protéique et présente donc une spécificité large comme les carboxypeptidases précédentes (libération des acides aminés basiques acides et neutres). Sur la chaîne B de l'insuline l'hydrolyse de la liaison Pro₂₈-Lys₂₉ est très lente alors que celle-ci est très bien coupée par la carboxypeptidase Y (Hayashi, Moore et Stein, 1973a) et la pénicillocarboxypeptidase S_1 (Jones et Hofmann, 1972). Toutefois pour cette dernière il a été montré (Hui et al., 1974) que dans certains cas la proline en position pénultième était un obstacle à l'hydrolyse (les liaisons Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Ser et Pro-Thr sont faiblement ou pas coupées).

Les peptides synthétiques contenant une glycine en position C-terminale ou C-pénultième sont peu hydrolysées par la carboxypeptidase de *P. roqueforti*. Là encore un comportement analogue a été observé pour les carboxypeptidases de *A. saitoi* (Ichishima, 1972), de la feuille d'oranger (Sprossler et al., 1971) et la carboxypeptidase Y (Hayashi, Moore et Stein, 1973a). Toutefois certains de ces substrats sont bien hydrolysés par les carboxypeptidases d'*A. oryzae* (Nakadai, Nasuno, Igushi, 1972a,b,c, 1973a).

L'enzyme de *P. roqueforti* est inhibée par le DFP, il est donc probable qu'un résidu sérine intervient dans la réaction d'hydrolyse. Pour la carboxypeptidase Y (Hayashi, Moore et Stein, 1973b) et une carboxypeptidase isolée du haricot (Shaw et Wells, 1972) (qui sont également inhibées par le DFP), on a pu isoler la séquence contenant la sérine impliquée. Cette séquence est identique pour les deux enzymes et diffère de celle des sérines protéases (protéases alcalines) déjà étudiées. L'inhibition de l'enzyme de *P. roqueforti* est fonction du pH, une concentration de 10^{-2} M et un pH de 6,5 étant les conditions les plus favorables que nous ayons testées.

De par l'ensemble des propriétés précédentes il apparaît nettement que l'enzyme de *P. roqueforti* appartient au groupe des carboxypeptidases acides (caractérisées par une spécificité large et l'inhibition par les réactifs de la sérine) mis en évidence non seulement chez les levures et moisissures (Hayashi, Moore et Stein, 1973a ; Nakadai, Nasuno et Igushi, 1972a ; Jones et Hofmann, 1972 ; Ichishima, 1972) mais aussi chez certains végétaux supérieurs (Visuki, Mikoba et Enari, 1969 ; Kubota et al., 1973 ; Sprossler, 1971, Ihle et Dure, 1972). Pour plusieurs de ces enzymes (Hayashi, Moore et Stein, 1973b ; Nakadai, Nasuno et Igushi, 1972a ; Jones et Hofmann, 1972 ; Ichishima, 1972 ; Visuki, Mikoba et Enari, 1969) l'intervention d'un groupe SH dans la réaction a été suggérée car elles sont inhibées par les réactifs classiques de ces groupements. L'enzyme de *P. roqueforti* est inhibée très partiellement par ces réactifs. Dans

la mesure où ces inhibiteurs sont des petites molécules, de dimensions comparables à celles des substrats, il semble peu probable que l'absence d'inhibition forte soit due à un empêchement stérique. De plus le chlorure de mercure n'est lui-même pas inhibiteur. Il semble donc qu'il n'y a pas de groupe SH impliqué directement dans le mécanisme d'action. Notons que les carboxypeptidases isolées de l'exocarpe du citron (Kubota *et al.*, 1973) et du fruit de la tomate (Matoba et Doi, 1974), présentent vis-à-vis du MIAA et du PHMB un comportement comparable à l'enzyme de *P. roqueforti*.

La quantité d'enzyme produite dans le milieu après 3 jours de culture (c'est-à-dire au moment de la croissance maximale) est faible (0,7 mg/l) et correspond à une activité carboxypeptidasique nettement inférieure à celles détectées par Yokoyama *et al.* (1974) pour d'autres espèces de *Penicillium*. La poursuite des cultures jusqu'à 6 jours en milieu à pH contrôlé (pH = 5) entraîne une lyse notable du mycelium sans augmenter l'activité produite dans le milieu. L'enzyme serait donc produite avant la lyse du mycelium et serait de nature exocellulaire.

La synthèse de plusieurs carboxypeptidases acides a été montrée pour plusieurs moisissures : chez *P. janthinellum* deux carboxypeptidases sont sécrétées (Jones et Hofmann, 1972), chez *A. oryzae* on a conclu à l'existence de 4 carboxypeptidases acides (Nakadai, Nasuno et Iguchi, 1972a,b,c, 1973). Chez *P. roqueforti*, deux fractions carboxypeptidasiques sont séparées par chromatographie sur CM-cellulose. Toutefois une comparaison des deux préparations montre qu'elles ont des propriétés voisines. La différence de comportement chromatographique peut traduire la synthèse de deux enzymes aux propriétés proches comme dans le cas d'*A. oryzae*. A l'inverse on peut supposer que *P. roqueforti* synthétise une seule carboxypeptidase acide et que la présence de deux fractions est due à une protéolyse partielle de l'enzyme par la protéase acide au cours de la production ou des premiers stades de purification.

Accepté en novembre 1976.

Remerciements. — Nous tenons à remercier Madame Ghislaine Brignon et Monsieur B. Ribadeau Dumas qui ont effectué les analyses d'acides aminés ainsi que Monsieur J. Hermier pour ses suggestions au cours de la réalisation de ce travail et de la rédaction du manuscrit.

Références

- ANDREWS P., 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, **91**, 222-233.
- ARAI T., ICHISHIMA E., 1974. Mode of action on protein of acid carboxypeptidase from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.*, **76**, 765-769.
- CHRAMBACH A., REISFELD R. A., WYCKOFF, M., ZACCARI, J., 1967. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **20**, 150-154.
- DUNKER A. K., RUECKERT R. R., 1969. Observations on molecular weight determination on polyacrylamide gel. *J. biol. Chem.*, **244**, 5074-5080.
- FUKUMOTO J., TSURU D., YAMAMOTO T., 1967. Studies on mold protease. I. Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710-717.

- GRIPON J.-C., HERMIER J., 1974. Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. III. Purification, propriétés et spécificité d'une protéase inhibée par l'E.D.T.A. *Biochimie*, **56**, 1323-1332.
- HAYASHI K., FUKUSHIMA D., MOJI K., 1967. Isolation of alkaline proteinase from *Aspergillus sojae* in homogeneous form. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1237-1241.
- HAYASHI R., MOORE S., STEIN W. H., 1973a. Carboxypeptidase from yeast. Large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptides and proteins. *J. biol. Chem.*, **248**, 2296-2302.
- HAYASHI R., MOORE S., STEIN W. H., 1973b. Serine at the active center of yeast carboxypeptidase. *J. biol. Chem.*, **248**, 8366-8369.
- HOFMANN T., SHAW R., 1964. Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. I. Purification and properties of a trypsinogen-activating enzyme (peptidase A). *Biochem. Biophys. Acta*, **92**, 543-557.
- HUI A., RAO L., KUROSKY A., JONES S. R., MAINS G., DIXON J. W., SZEWEZUK A., HOFMANN T., 1974. The use of penicillocarboxypeptidase. S₁ in amino acid sequencing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 577-587.
- ICHISHIMA E., 1972. Purification and characterisation of a new type of acid carboxypeptidase from *Aspergillus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 274-288.
- ICHISHIMA E., ARAI T., 1973. Specificity and mode of action of acid carboxypeptidase from *Aspergillus saitoi*. *Biochem. Biophys. Acta*, **293**, 444-450.
- IHLE J. N., DURE L. S., 1972. The developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. II. Catalytic properties of the cotton carboxypeptidase. *J. biol. Chem.*, **247**, 5041-5047.
- JONES S. R., HOFMANN T., 1972. Penicillocarboxypeptidase-S, a non-specific SH-dependent exopeptidase. *Can. J. Biochem.*, **50**, 1297-1310.
- KUBOTA Y., SHOJI S., FUNAKOSHI T., UEKI H., 1973. Carboxypeptidase C_N. I. Purification and characterization of the enzyme from the exocarp of *Citrus natsudaoidai* Hayata. *J. Biochem.*, **74**, 757-770.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MATOBA T. et DOI E., 1974. Carboxypeptidase activity of tomato fruit during the ripening process and some enzymatic properties. *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1901-1905.
- MOELWYN-HUGHES E. A., 1950. *The Enzymes*, vol. 1, pp. 28-78, SOMNER J. B., MYRBACH K., Ed. Academic Press, New York.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent of the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. biol. Chem.*, **211**, 907-913.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUGHI N., 1972a. Purification and properties of acid carboxypeptidase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1343-1352.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUCHI N., 1972b. Purification and properties of acid carboxypeptidase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1473-1480.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUCHI N., 1972c. Purification and properties of acid carboxypeptidase III from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1481-1488.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUCHI N., 1973a. Purification and properties of acid carboxypeptidase IV from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1237-1251.
- NAKADAI T., NASUNO S., IGUCHI N., 1973b. Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2695-2701.
- REISFELD R. A., LEWIS U. J., WILLIAMS D. E., 1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, **195**, 281-283.
- SEKINE H., 1972. Neutral proteinases I et II of *Aspergillus sojae*. Isolation in homogeneous form. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 198-206.

- SHAW D. C., WELLS J. R. E., 1972. Radiochemical determination of a unique sequence around the reactive serine residue of a di-isopropyl phosphorofluoridate-sensitive plant carboxypeptidase and a yeast peptidase. *Biochem. J.*, **128**, 8366-8369.
- SPROSSLER B., HEILMANN H. D., GRAMPP E., UHLIG H., 1971. Eigenschaften der carboxypeptidase C aus orangenblättern. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1524-1530.
- TURKOVA J., MIKES O., GANGEV K., BOUBLIK M., 1969. Isolation and characterization of alkaline proteinase of *Aspergillus flavus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **178**, 100-111.
- URIEL J., 1966. Méthode d'électrophorèse dans les gels d'acrylamide agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **48**, 969-982.
- VISUKI K., MIKOBA J., ENARI T. M., 1969. Isolation and partial characterization of a carboxypeptidase from barley. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 193-199.
- YOKOGAMA S., OOBAYASHI A., TANABE O., SUGAWARA S., ARAKI E., ICHISHIMA E., 1974. Production and some properties of a new type of acid carboxypeptidase of *Penicillium* mold. *Appl. Microb.*, **27**, 953-960.
- YU J., IWASAKI S., TAMURA G., ARIMA K., 1968. Physical properties and amino acid composition of *Mucor* rennin crystal isolated from *Mucor pusillus* var. *Lindt. Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1051-1052.
-