

## CARACTÉRISATION, ISOLEMENT ET PROPRIÉTÉS DE GLYCOSIDASES THYROÏDIENNES: $\beta$ -GALACTOSIDASE, $\beta$ -N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ET $\alpha$ -MANNOSIDASE

ODILE CHABAUD, SIMONE BOUCHILLOUX ET MIREILLE FERRAND

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 13-Marseille, 5 (France)*

(Reçu le 17 juillet, 1970)

---

### SUMMARY

*Characterization, isolation and properties of thyroid glycosidases:  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and  $\alpha$ -mannosidase*

1. Sheep thyroid gland is relatively rich in glycosidases with an acid pH optimum:  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and  $\alpha$ -mannosidase, as identified using nitrophenylglycosides. Some of their properties are reported.

2. These enzymes show a subcellular distribution and a structure linked latency compatible with their main localization in lysosomes, a very heterogeneous group of particles in the thyroid tissue.

3. Starting from particulate pellets, three partially purified glycosidases have been isolated using gel filtration and ion exchange chromatography: a 6.6 S  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, a 10.0 S  $\alpha$ -mannosidase, and a 19 S  $\beta$ -galactosidase (more or less convertible into a 5.6 S species).

4. In spite of a partly prevented instability on storage, these purified glycosidases are able to sequentially release with various yields carbohydrates from sialic acid freed thyroglobulin glycopeptides. With desialylated thyroglobulin, low yields are observed, which are largely increased in the presence of thyroid proteases.

---

### INTRODUCTION

Le métabolisme dégradatif de la thyroglobuline a suscité depuis longtemps l'intérêt car il est un préalable à la libération des hormones iodées. Diverses données morphologiques et biochimiques ont contribué à clarifier cet aspect essentiel de la fonction du follicule thyroïdien. Par un mécanisme d'endocytose qui contrôle la thyréostimuline, s'effectue une capture intracellulaire de "gouttelettes de colloïde", c'est-à-dire essentiellement de vacuoles de thyroglobuline: celles-ci vont ensuite fusionner avec des lysosomes, particules caractérisées par leur contenu en phosphatase acide<sup>1-3</sup> et de façon générale riches en diverses hydrolases de pH optimum acide. La présence d'enzymes protéolytiques dans les lysosomes thyroïdiens a été démontrée par des études biochimiques<sup>4-8</sup> et l'on dispose par ailleurs d'un certain nombre de

données sur la protéolyse de la thyroglobuline par des endo- et exopeptidases thyroïdiennes<sup>9-15</sup>. On ne possède par contre aucune information sur le devenir des groupements hétéropolysaccharidiques de la thyroglobuline et l'on ne sait pas de quelle façon leur catabolisme est lié temporellement à l'ensemble du processus dégradatif conduisant à la libération des hormones.

Au cours de ce travail nous avons étudié l'équipement de la glande thyroïde de mouton en diverses glycosidases susceptibles d'intervenir dans la dégradation des copules glucidiques de la thyroglobuline:  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23),  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) et  $\alpha$ -mannosidase (EC 3.2.1.24). Elles présentent les caractères généraux d'enzymes lysosomaux, avec une distribution subcellulaire comparable à celle de la "phosphatase acide" (EC 3.1.3.2). L'isolement, en petites quantités, de ces glycosidases partiellement purifiées a permis d'en préciser quelques propriétés et d'étudier leur action d'une part sur des glycopeptides de thyroglobuline, d'autre part sur une thyroglobuline (préalablement privés de leurs résidus terminaux d'acide sialique). Les résultats obtenus suggèrent qu'*in situ* diverses protéases doivent intervenir en synergie avec les glycosidases lors de la dégradation de la thyroglobuline\*.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les solutions sont en eau bidistillée et les produits chimiques de qualité analytique.

#### Détermination des activités enzymatiques

L'activité des *glycosidases* est mesurée à 37° dans un volume de 0.5 ou 1 ml comprenant un tampon citrate-phosphate de sodium 0.04 M, pH 4.7, et l'un des substrats suivants (Sigma Chem. Co.): *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside 5 mM (quelquefois lorsque mentionné, *o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside 5 mM), *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-N-acétylglucosaminide 5 mM, *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-mannoside 2 mM. Les glycosidases purifiées sont, pour être testées, diluées en présence de sérum albumine (1 mg/ml; 120-360  $\mu$ g/ml dans l'essai). Généralement après une heure d'incubation, la réaction est arrêtée par l'addition d'un volume égal de tampon carbonate-bicarbonate de sodium 0.2 M, pH 10.8. On centrifuge si nécessaire avant d'estimer l'absorbance du nitrophénol libéré, à 400 m $\mu$  pour le *p*-nitrophénol ( $\epsilon_M = 18 \cdot 10^3$ ) à 430 m $\mu$  pour l'*o*-nitrophénol ( $\epsilon_M = 2 \cdot 10^3$ ). L'unité enzymatique est la quantité libérant 1  $\mu$ mole de nitrophénol par min. L'activité spécifique est le nombre d'unités par mg de protéines. Dans nos conditions de travail les quantités de nitrophénol libéré varient linéairement en fonction de la quantité d'enzyme et du temps; la proportion de substrat hydrolysé n'excède pas 10% de la quantité engagée.

La *phosphatase acide* est mesurée à 37°, pendant 15 min en tampon acide acétique-acétate de sodium 0.1 M, pH 5.0, soit à l'égard du *p*-nitrophénylphosphate (Sigma) 12 mM, en présence de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, EDTA 2 mM, la réaction étant arrêtée par l'addition de 15 vol. de NaOH 0.1 M, soit à l'égard du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium 50 mM, la réaction étant arrêtée par l'addition d'acide trichloracétique pour

\* Certains de ces résultats ont été brièvement rapportés dans une communication présentée à la 2ème Réunion de l'Association Européenne de Recherches sur la Glande Thyroïde, Marseille, France, sept. 1968.

obtenir une concentration finale de 5%. On estime alors soit le *p*-nitrophénol soit l'ion orthophosphorique<sup>16</sup>.

L'activité *protéolytique* est mesurée à 37° en tampon acide acétique-acétate de sodium 0.066 M, pH 3.7, vis-à-vis de l'hémoglobine dénaturée<sup>4,14,15</sup>. L'unité enzymatique est la quantité libérant sous forme soluble dans l'acide trichloracétique à 10% l'équivalent de 0.1  $\mu$  mole de tyrosine.

La cytochrome oxydase (EC 1.9.3.1) est dosée selon COOPERSTEIN ET LAZAROW<sup>17</sup>.

#### *Fractionnement subcellulaire*

Les thyroïdes de mouton conservées à 0° pendant environ 1 h avant d'être disséquées, sont divisées en tranches minces puis homogénéisées dans 5 vol. (ml/g de tissu) de saccharose 0.25 M, avec un appareil Ultra-Turrax (vitesse semimaximale pendant 15 sec). Ces homogénats sont soumis à divers fractionnements, réalisés à des températures de 0-4°.

(1) Afin d'avoir une idée générale de la répartition subcellulaire des glycosidases, on a procédé à une centrifugation différentielle<sup>18</sup> d'un homogénat préalablement filtré sur gaze de nylon. Les centrifugations successives ont été à 1000, 3300, 10 000 et 25 000  $\times g_{\text{max}}$  pendant 10 min (rotor SS 34, Sorvall RC<sub>2</sub>) enfin à 145 000  $\times g$  pendant 60 min (rotor 40, Spinco L<sub>2</sub>). A l'aide d'un homogénéiseur Potter peu serré, muni d'un piston en téflon, les sédiments issus de chaque centrifugation successive sont remis en suspension dans un volume réduit de saccharose 0.25 M et l'on effectue une deuxième centrifugation identique dans un nombre restreint de tubes; les surnageants obtenus sont réunis à ceux de la première centrifugation et l'ensemble est alors soumis à la centrifugation suivante. Les sédiments successifs (P<sub>10</sub>, P<sub>33</sub>, P<sub>100</sub>, P<sub>250</sub> et P<sub>1450</sub>) sont conservés dans la glace ou congelés.

(2) Si l'on désire seulement recueillir l'ensemble des particules riches en glycosidases, l'homogénat est soumis à une centrifugation de 10 min à 1000  $\times g$ , ce qui élimine débris cellulaires et noyaux, et le surnageant postnucéaire filtré sur gaze de nylon, est alors soumis à une centrifugation de 10 min à 25 000  $\times g$ . Le sédiment obtenu, "sédiment 25 000  $\times g$ ", contient une proportion élevée des glycosidases thyroïdiennes.

#### *Extraction des enzymes particulières*

Elle est obtenue de diverses façons selon les objectifs.

(1) A partir de sédiments non congelés suspendus en saccharose 0.25 M à 0° (2.5 ml/g de tissu initial), l'addition de 0.2% (v/v) de Triton X-100 (Sigma) conduit en quelques minutes à une libération maximale des activités enzymatiques (estimée dans le surnageant d'une ultracentrifugation à 145 000  $\times g$  pendant 40 min). Par suspension en divers milieux salins hypotoniques on obtient, à volume égal, une solubilisation moins importante.

(2) Les sédiments congelés (qui conservent pendant plusieurs semaines sans modification appréciable leurs activités enzymatiques potentielles) sont remis en suspension dans des volumes variables de diverses solutions salines hypotoniques, éventuellement avec deux congélation et décongélation. La solubilisation des activités hydrolases dépend de l'ensemble des conditions mises en jeu (congélation(s), force ionique, rapport de volume); elle est obtenue plus facilement que celle de la cytochrome oxydase.

*Purification de la  $\beta$ -galactosidase, de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase*

Elle est effectuée à partir de sédiments  $25\ 000 \times g$ , ce qui élimine une part importante de la thyroglobuline des homogénats. Toutes les opérations sont effectuées à  $0\text{--}4^\circ$ . Dans une expérience type les sédiments provenant de 25 g de thyroïdes sont extraits par 62 ml de NaCl 0.015 M en s'aidant de deux congélations et décongélations. Le surnageant d'une ultracentrifugation à  $145\ 000 \times g$  pendant 40 min est additionné de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 80% de la saturation. Le précipité obtenu est redissous dans 5 ml d'eau et la solution est dialysée pendant 16 h contre un tampon phosphates de sodium 0.05 M, pH 6.5, NaCl 0.1 M.

Elle est alors filtrée sur Sephadex G-200 (Pharmacia) équilibré en ce même tampon. Une colonne de 2.1 cm  $\times$  87 cm reçoit 126 mg de protéines, la vitesse d'écoulement est de 10 ml/h, les fractions recueillies de 5 ml. Les fractions correspondant à trois pics d'activités glycosidases relativement bien séparés (régions I, II et III) sont regroupées et concentrées si nécessaire par dialyse contre du polyéthylène glycol (Carbowax 20 M, Union Carbide Corp.). Ces échantillons sont conservés à  $0^\circ$  avant d'être équilibrés par dialyse contre le tampon initial de l'opération suivante, une chromatographie d'échange d'ions. Pour la  $\beta$ -galactosidase de la région I, l'échangeur d'ions est le DEAE-Sephadex A-50, et pour les deux autres enzymes (régions II et III) le CM-Sephadex C-50. Ces échangeurs d'ions ont été cyclés selon les recommandations de Pharmacia, avant d'être équilibrés avec chaque tampon initial.

La colonne de DEAE-Sephadex (2.3 cm  $\times$  37 cm) a reçu 49.8 mg de protéines. On établit avec un dispositif Varigrad un gradient linéaire de NaCl allant de 0.02 à 0.32 M dans un tampon phosphates de sodium 0.01 M, pH 6.4,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptopropanol 10 mM. La vitesse d'écoulement est de 20-15 ml/h et les fractions recueillies de 3.5 ml. Chaque tube contient à l'avance 100  $\mu\text{l}$  d'une solution saline NaCl 2.5 M,  $\text{MgCl}_2$  0.14 M. On regroupe les fractions correspondant à l'activité  $\beta$ -galactosidase, on concentre comme précédemment et on équilibre par dialyse contre un milieu stabilisant ayant la composition suivante: NaCl 0.1 M,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, phosphate de sodium 0.01 M, pH 6.4, EDTA 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptopropanol 10 mM.

La colonne de CM-Sephadex (environ 1.7 cm  $\times$  41 cm) reçoit le matériel issu de la région II (10 mg de protéines) ou III (14 mg de protéines) du fractionnement sur Sephadex G-200. On établit un gradient linéaire de NaCl allant de 0.005 à 0.34 M, dans un tampon acide acétique-acétylate de sodium 0.01 M, pH 5.8, EDTA 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptopropanol 10 mM. Le rythme est de 18-15 ml/h, et les fractions de 3 ml. Elles sont recueillies dans des tubes contenant à l'avance 100  $\mu\text{l}$  d'une solution saline: NaCl 2.1 M,  $\text{MgCl}_2$  0.3 M. On regroupe et on concentre les fractions correspondant à l'activité  $\alpha$ -mannosidase ou à l'activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Elles sont conservées à  $0^\circ$ , équilibrées par dialyse contre le milieu stabilisant décrit plus haut.

*Action des glycosidases purifiées sur des glycopeptides de thyroglobuline et sur une thyroglobuline préalablement privés d'acide sialique*

Les glycopeptides non dialysables résultant de l'action de la pronase sur une thyroglobuline de mouton sont privés des résidus terminaux d'acide N-acétylneuramique par hydrolyse en HCl 0.02 M pendant 1 h à  $80^\circ$  puis dialysés contre eau<sup>19</sup>. L'action des glycosidases thyroïdiennes est étudiée avec 5.5 mg de glycopeptides par essai de 5 ml, en tampon citrate-phosphate de sodium 0.04 M, pH 4.7 (contenant aussi NaCl 0.025 M,  $\text{MgCl}_2$  1.25 mM, EDTA 0.125 mM,  $\beta$ -mercaptopropanol 2.5 mM),

et avec un nombre variable de mUnités pour chacun des enzymes (enzymes introduits séquentiellement ou simultanément). Ces essais, additionnés de quelques gouttes de toluène, sont placés à 37° et des quantités aliquotes sont prélevées à intervalles réguliers.

Une thyroglobuline de mouton purifiée sur DEAE-cellulose est privée de 87% de ses résidus terminaux d'acide *N*-acétylneuraminique par l'action d'une neuramidase dépourvue d'activité protéolytique (Behringwerke AG), puis filtrée sur Sephadex G-200. L'action des glycosidases thyroïdiennes est étudiée dans les mêmes conditions que pour les glycopeptides mais avec 27.6 mg de substrat par essai dans un volume de 6.5 ml et avec davantage de mUnités enzymatiques.

#### *Dosage des glucides combinés et des glucides libérés*

Les glucides combinés sont dosés après une hydrolyse acide adéquate. Les glucides libérés enzymatiquement sont dosés après élimination par centrifugation du matériel insolubilisé (important dans les essais avec la thyroglobuline asialique) et après dessalage sur colonne (0.8 cm × 10 cm) de résines Dowex 50-X8 (200-400 mesh, forme H<sup>+</sup>) et Dowex 1-X8 (200-400 mesh, forme HCOO<sup>-</sup>). Les oses neutres sont recueillis en tête avec la *N*-acétylglucosamine. Le galactose est estimé par une méthode mettant en jeu la galactose oxydase (Galactostat Worthington), la *N*-acétylglucosamine selon une modification du procédé de Morgan-Elson<sup>20</sup>. Afin d'estimer les autres oses neutres, on a recours à une séparation chromatographique sur papier, suivie d'une élution par eau et d'un dosage par la réaction à l'orcinoïl<sup>20</sup>.

#### *Autres déterminations chimiques*

Les protéines, RNA et DNA sont dosées comme précédemment décrit<sup>21</sup>.

### RÉSULTATS

#### *Quelques propriétés des glycosidases thyroïdiennes*

On observe tout d'abord que relativement à d'autres tissus animaux<sup>22-25</sup> la glande thyroïde de mouton est riche en activités  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -*N*-acétylglucosaminidase et  $\alpha$ -mannosidase. Le nombre d'unités enzymatiques par g de tissu frais est du même ordre que pour le foie de rat, alors que dans la thyroïde la proportion de cellules épithéliales (et de DNA) est inférieure, du fait de l'existence de l'espace "colloïde". Le nombre d'unités par mg de DNA est, respectivement pour les trois activités enzymatiques: 0.41, 6.16 et 0.98 (moyenne de 3 expériences; DNA 1.1 mg/g thyroïde). Des essais préliminaires ont également montré la présence d'une sialidase (EC 3.2.1.18) active vis-à-vis du sialyllactose.

*L'effet du pH* sur les activités  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -*N*-acétylglucosaminidase et  $\alpha$ -mannosidase est indiqué sur la Fig. 1. Les courbes sont assez comparables qu'il s'agisse d'enzymes solubilisés à partir de sédiments 25 000 × g, des résidus particulaires correspondant ou de surnageants cytoplasmiques. Cette similitude suggère qu'une part importante de l'activité des surnageants pourrait résulter de dommages infligés aux particules lors de l'homogénéisation. On observe un plateau plus large pour l'optimum d'activité de la  $\beta$ -galactosidase (pH 3.5 à 5.2) que pour les  $\beta$ -*N*-acétylglucosaminidase et  $\alpha$ -mannosidase (pH 4.0 à 4.8).

*Les valeurs de K<sub>m</sub>* obtenues vis-à-vis des *p*-nitrophénylglycosides sont les sui-

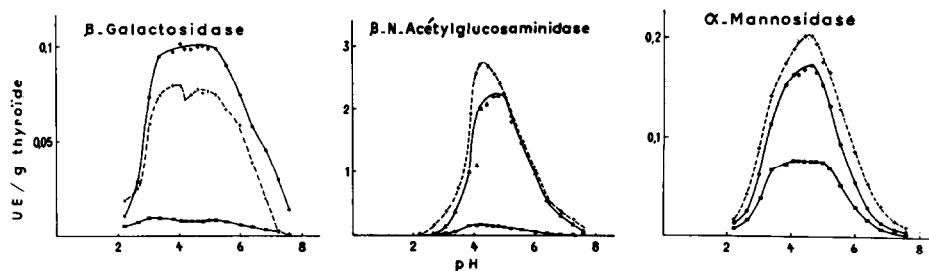


Fig. 1. Effet du pH sur l'activité enzymatique à l'égard des *p*-nitrophénylglycosides (unités pour 1 g de thyroïdes). Fraction soluble après extraction par NaCl 0.015 M d'un sédiment 25 000  $\times$  g: ○—○,  $\beta$ -galactosidase; ▲—▲,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase; ●—●,  $\alpha$ -mannosidase. □—□, activités enzymatiques dans les fractions sédimentables correspondantes. +—+—+, activités enzymatiques dans les surnageants cytoplasmiques après centrifugation à 25 000  $\times$  g pendant 10 min.

vantes:  $1.5 \cdot 10^{-4}$  M pour la  $\beta$ -galactosidase,  $0.9 \cdot 10^{-3}$  M pour la  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase et  $0.85 \cdot 10^{-3}$  M pour l' $\alpha$ -mannosidase. Vis-à-vis de l'*o*-nitrophénylgalactoside, la  $\beta$ -galactosidase a un  $K_m$  de  $1.4 \cdot 10^{-4}$  M. Les tracés selon LINEWEAVER ET BURK<sup>26</sup> sont essentiellement linéaires (Fig. 2). Pour la  $\beta$ -galactosidase on note un

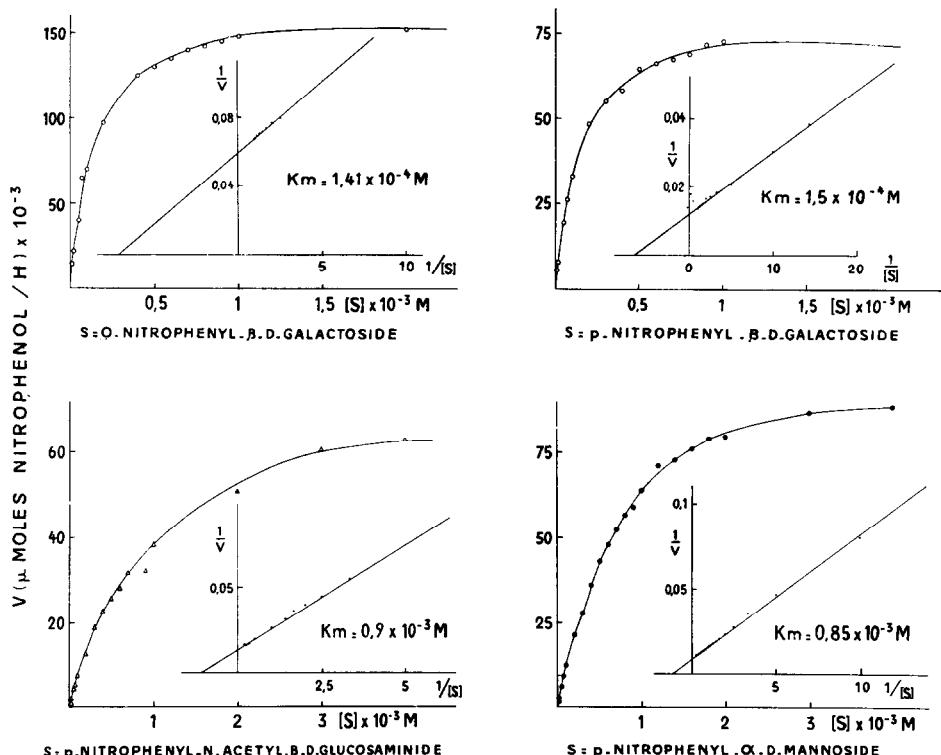


Fig. 2. Valeurs de  $K_m$ , déterminées avec l'extrait par NaCl 0.015 M d'un sédiment 25 000  $\times$  g.

TABLEAU I

## ACTION DE DIVERSES SUBSTANCES SUR LES GLYCOSIDASES THYROIDIENNES

Résultats exprimés en % de l'activité de témoins sans effecteurs.

Effecteur	$\beta$ -Galactosidase	$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	$\alpha$ -Mannosidase
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	100	118	100
10 mM	104	118	105
MnCl <sub>2</sub> 10 mM	100	127	106
ZnSO <sub>4</sub> 10 mM	87	51	112
EDTA 20 mM	94	100	90
$\beta$ -Mercaptoéthanol 1 mM	100	108	100
100 mM	128	108	96
<i>p</i> -Chloromercuriphénylsulfonate de sodium 0.01 mM	21	74	100
0.10 mM	0	37	100
0.50 mM	0	0	100

léger effet inhibiteur du substrat au-delà de  $2 \cdot 10^{-3}$  M (*p*-nitrophénylgalactoside) ou  $3 \cdot 10^{-3}$  M (*o*-nitrophénylgalactoside).

*L'action de diverses substances sur l'activité des glycosidases* est indiquée dans le Tableau I. On voit que la  $\beta$ -galactosidase est très sensible à l'action d'un agent bloquant les groupements sulphydryles, la  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase un peu moins et l' $\alpha$ -mannosidase apparemment pas. Le zinc, inhibiteur de l'activité des deux premiers enzymes, augmente au contraire l'activité du dernier. Ces essais et l'observation de ce que l'addition de NaCl à la concentration 0.1 M ralentit une inactivation progressive à 0° pour des temps longs, nous ont guidé dans le choix du milieu stabilisant utilisé au cours de la purification des enzymes (voir MÉTHODES).

*Le caractère de latence* des glycosidases a été évalué comparativement à celui de la phosphatase acide à partir de sédiments  $25\ 000 \times g$  non congelés. C'est en présence de Triton X-100 que l'activité solubilisée est la plus grande (Tableau II). Une solubilisation efficace est également obtenue avec un tampon phosphate de sodium 0.01 M, pH 6.5, ou avec NaCl 0.015 M après deux congélations et décongélation: ces observations sont compatibles avec une appartenance au groupe des lyso-

TABLEAU II

LATENCE DE DIVERSES HYDROLASES DANS LES SÉDIMENTS  $25\ 000 \times g$ 

Reprises par 2.5 ml de chaque milieu pour 1 g de tissu initial. Résultats exprimés en % de l'activité solubilisée, mesurée après ultracentrifugation à  $145\ 000 \times g$  pendant 40 min (moyenne 3 expériences, sauf\*: 1 expérience).

Extrait	$\beta$ -Galactosidase	$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	$\alpha$ -Mannosidase	<i>Nitrophénylphosphatase</i>
Saccharose 0.25 M	6.5	6.1	6.1	5.5
Saccharose + 0.2% Triton X-100	89.4	97.7	81.1	77.8
Phosphate de sodium 0.01 M, pH 6.5	67.7	87.7	31.0*	41.3
NaCl 0.015 M congél.-décongel.	76.1	86	46.5	41.5

somes<sup>27</sup>. On remarque pourtant que ces diverses hydrolases acides n'ont pas exactement le même comportement en milieu hypotonique : les proportions solubilisées sont plus élevées pour la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase que pour l' $\alpha$ -mannosidase et la phosphatase acide. Nous n'avons pas recherché si cela provient pour ces deux dernières d'une réadsorption préférentielle sur les sédiments membranaires éliminés par ultracentrifugation ou réellement d'une localisation plutôt membranaire au sein des lysosomes.

#### Répartition subcellulaire

Au cours d'une centrifugation différentielle, la répartition des trois glycosidases thyroïdiennes est comparable à celle de la phosphatase acide (Fig. 3). Tandis que la cytochrome oxydase est préférentiellement localisée dans la fraction  $P_{100}$ , les activités

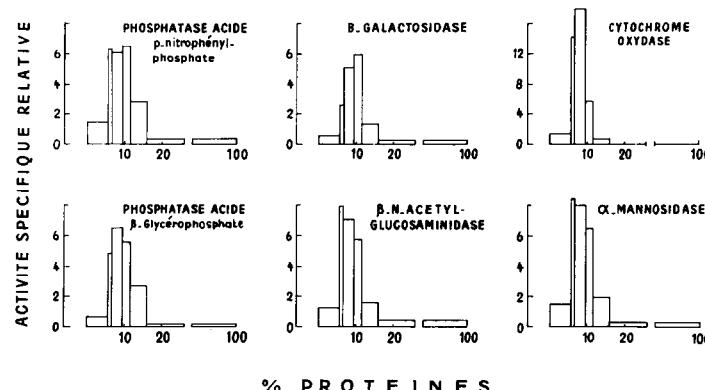


Fig. 3. Répartition subcellulaire de divers enzymes (moyenne 2 expériences). Les fractions successives sont dans l'ordre de leur isolement, de gauche à droite  $P_{10}$ ,  $P_{33}$ ,  $P_{100}$ ,  $P_{250}$ ,  $P_{1450}$  et surnageant postmicrosomal (voir MÉTHODES). En ordonnée: activité spécifique relative (unités/mg protéines de la fraction/unités/mg protéines de l'homogénat); les déterminations enzymatiques sont faites après extraction par le Triton X-100 mais sans éliminer le matériel sédimentable. En abscisse: % de protéines. Les fractions particulières successives contiennent respectivement par g de thyroïde: 11.2, 1.84, 5.7, 4.2, 8.7 mg de protéines; et 380, 47, 141, 244, 607  $\mu$ g de RNA.

hydrolases correspondent à une population de particules sédimentant de façon assez mal définie, plus encore que dans le cas du foie<sup>22</sup>. Le parallélisme observé dans la répartition des  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase  $\alpha$ -mannosidase et phosphatase acide est pourtant en faveur d'une localisation largement lysosomale pour tous ces enzymes.

Avec la glande thyroïde comme avec le tissu lymphoïde<sup>24,28</sup>, la proportion des activités glycosidases et phosphatase acide dans les surnageants postmicrosomaux est plus élevée qu'avec le foie: ici 30 à 45% des activités totales, selon les enzymes (moyenne 2 expériments). L'ensemble des particules sédimentant entre 1000 et 25 000  $\times$  g (10 min) détiennent ici de 42 à 50% de ces activités totales et dans d'autres expériences, jamais plus de 64%. Ces proportions ne sont pas modifiées par l'emploi de saccharose 0.44 M, au lieu de 0.25 M. Les conditions d'homogénéisation auxquelles on doit recourir avec ces tissus sont plus violentes qu'avec le tissu hépatique ce qui pourrait avoir pour conséquence l'éclatement d'un plus grand nombre de particules lysosomales<sup>4,7,29</sup>.

À partir de sédiments  $25\ 000 \times g$  remis en suspension dans le saccharose 0.25 M nous avons essayé par centrifugation isopycnique et par centrifugation de zone en divers gradients de saccharose (0.25-1.8 M, rotor SW 25, Spinco L<sub>2</sub>) de préciser la répartition des hydrolases acides comparativement à celle de la cytochrome oxydase. Des résultats préliminaires montrent (1) que pour des centrifugations correspondant à des  $g_{min}$  élevés, les particules détenant les activités hydrolases sédimentent en majorité au-delà de la cytochrome oxydase, (2) que pour des centrifugations correspondant à des  $g_{min}$  faibles<sup>30</sup>, il existe à la fois des particules sédimentant moins vite et d'autres sédimentant plus vite que les mitochondries. Il reste à déterminer dans quelle mesure ceci traduit surtout une hétérogénéité fonctionnelle des lysosomes<sup>29,31,32</sup> ou peut-être aussi la présence d'activités glycosidases et phosphatase dans d'autres structures subcellulaires.

*Isolement de petites quantités de glycosidases purifiées*

Le bilan d'une expérience type est résumé dans le Tableau III. Les rendements de la purification partielle des trois glycosidases sont assez bons au niveau de la filtra-

TABLEAU III

PURIFICATION DES GLYCOSIDASES THYROIDIENNES

Purification type réalisée à partir de 25 g de glandes.

No.	Fraction	$\beta$ -Galactosidase		$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase		$\alpha$ -Mannosidase	
		Etapes 1-5		Etapes 1, 2, 3, 4, 6		Etapes 1, 2, 3, 4, 6	
		mUnités totales	mUnités/mg protéines	mUnités totales	mUnités/mg protéines	mUnités totales	mUnités/mg protéines
1	Surnageant postnucéaire	8500	1.2	268 000	39	19 000	2.7
2	Extrait séd. $25\ 000 \times g$	2200	9.1	85 000	355	3 800	16.1
3	Précipité $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2020	16	68 000	572	2 780	22
4	Sephadex G-200	978	19.5	44 000	3 050	1 970	215
5	DEAE-Sephadex	728	450				
6	CM-Sephadex			44 000	29 500	830	2380

tion sur gel, des chromatographies d'échange d'ions et de la récupération des enzymes après ces opérations.

On voit sur la Fig. 4 que la filtration sur Sephadex G-200 conduit à la séparation de trois zones relativement bien distinctes d'activités glycosidases: pour une large part l'activité  $\beta$ -galactosidase est exclue; elle est suivie de l' $\alpha$ -mannosidase puis de la  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase au niveau de laquelle se situe aussi une certaine activité  $\beta$ -galactosidase. L'activité protéolytique testée est assez largement retardée au delà des glycosidases.

Dans les opérations que résume le Tableau III, seule la  $\beta$ -galactosidase exclue du Sephadex G-200 (région I, Fig. 4) est utilisée pour la chromatographie sur DEAE-Sephadex, qui permet d'éliminer largement la thyroglobuline (Fig. 5).

La chromatographie sur CM-Sephadex de la région III de la filtration sur Sephadex G-200, où se trouvent à la fois la  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase et une activité

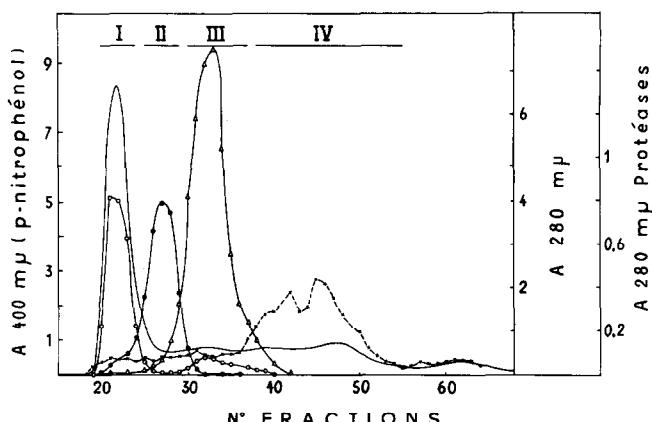


Fig. 4. Filtration sur Sephadex G-200 de l'extrait provenant de sédiments  $25\ 000 \times g$  (voir MÉTHODES). L'absorbance de *p*-nitrophénol libéré ( $400\ m\mu$ ) est évaluée avec des prises d'essai différentes pour chaque glycosidase:  $\bigcirc-\bigcirc$ ,  $\beta$ -galactosidase;  $\triangle-\triangle$ ,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase;  $\bullet-\bullet$ ,  $\alpha$ -mannosidase. —, absorbance à  $280\ m\mu$ .  $\times-\times$ , absorbance à  $280\ m\mu$  dans le test d'activité protéolytique.

$\beta$ -galactosidase conduit à l'exclusion de cette  $\beta$ -galactosidase tandis qu'une proportion élevée de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase est échangée (Fig. 6a). Dans des conditions comparables sur CM-Sephadex, la mannosidase de la région II de la filtration sur Sephadex G-200, échangée elle aussi, est éluée à une force ionique légèrement supérieure à celle éluant la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase (Fig. 6b).

Si l'on effectue une chromatographie directe sur CM-Sephadex d'un extrait salin de sédiment  $25\ 000 \times g$ , on note qu'il est alors difficile d'éviter une contamination de la N-acétylglucosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase par une activité protéolytique (Fig. 7).

#### Quelques propriétés des glycosidases purifiées

Les glycosidases deviennent très instables au cours de leur purification. La congélation ainsi que la lyophilisation sont alors à proscrire. Une stabilisation satis-

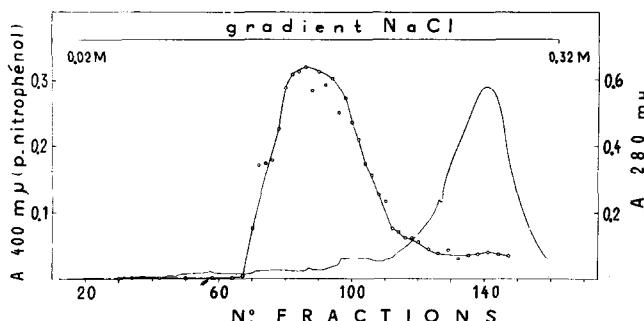


Fig. 5. Chromatographie sur DEAE-Sephadex du matériel exclu du Sephadex G-200 (voir MÉTHODES).  $\bigcirc-\bigcirc$ ,  $\beta$ -galactosidase d'après absorbance à  $400\ m\mu$ ; —, absorbance à  $280\ m\mu$ .

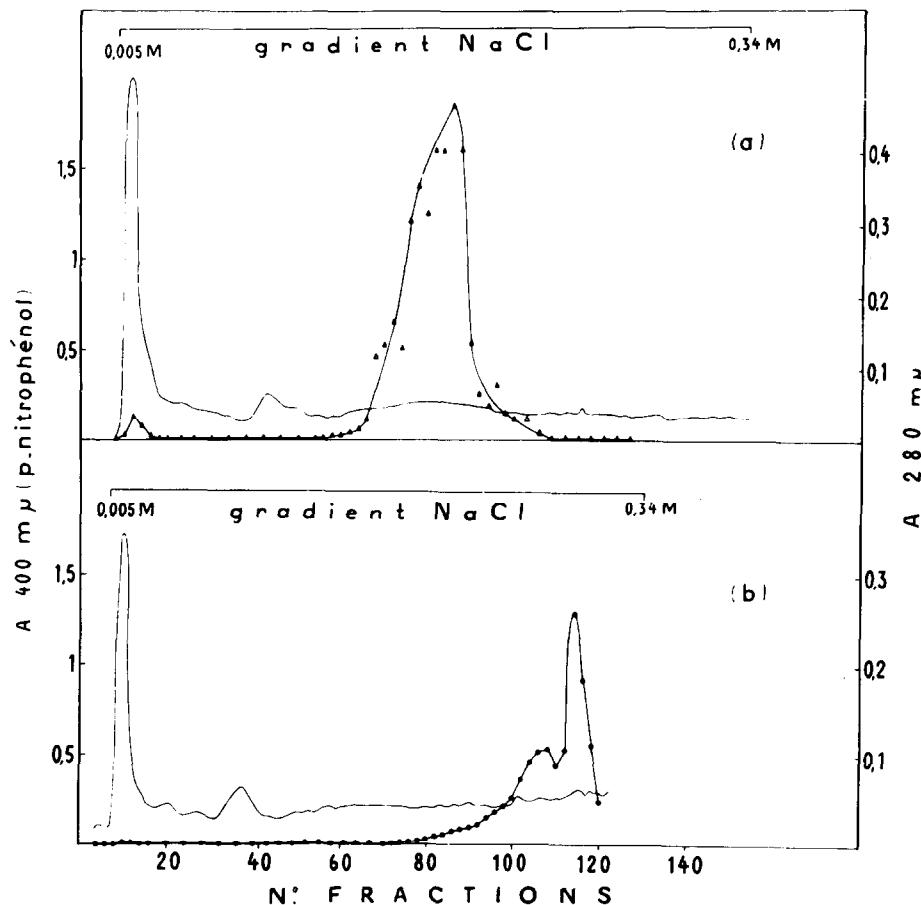


Fig. 6. Chromatographie sur CM-Sephadex (voir MÉTHODES). (a) Échantillon provenant de la région III de la filtration sur gel (Fig. 4).  $\triangle-\triangle$ ,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase d'après absorbance à  $400 \text{ m}\mu$ ; —, absorbance à  $280 \text{ m}\mu$ . (b) Échantillon provenant de la région II de la filtration sur gel. ●—●,  $\alpha$ -mannosidase.

faisante est pourtant obtenue pour des périodes de plusieurs jours à  $0^\circ$  dans un milieu salin faiblement réducteur et faiblement complexant (voir MÉTHODES). Les tests enzymatiques à l'égard des nitrophénylglycosides sont maintenant effectués avec des enzymes préalablement dilués en présence de serum albumine ( $1 \text{ mg/ml}$ ).

*L'effet du pH sur l'hydrolyse des  $\beta$ -nitrophénylglycosides est inchangé par rapport aux enzymes non purifiés, tant pour la  $\beta$ -galactosidase exclue du Sephadex G-200 et purifiée sur DEAE-Sephadex (plateau assez large) que pour la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Par contre l' $\alpha$ -mannosidase manifeste maintenant un pH optimum plus acide d'environ une unité de pH.*

*Les valeurs de  $K_m$  vis-à-vis des  $\beta$ -nitrophénylglycosides sont les suivantes:  $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  pour la  $\beta$ -galactosidase (exclue du Sephadex G-200, échangée sur DEAE-Sephadex),  $0.90 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  pour la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase et  $0.85 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  pour l' $\alpha$ -mannosidase, valeurs identiques à celles trouvées à partir d'extraits non purifiés*

(voir plus haut). Une petite quantité de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase exclue du CM-Sephadex (Fig. 6a) manifeste un  $K_m$  identique à celui du pic principal échangé. Pour la  $\beta$ -galactosidase primitivement localisée avec la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase sur Sephadex G-200 et plus tard exclue du CM-Sephadex, le  $K_m$  est de  $0.76 \cdot 10^{-4}$  M.

L'analyse par ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose (5-20%, en phosphates de sodium 0.05 M, pH 6.98, NaCl 0.05 M, 23 h à 4°, 24 000 rev./min, Rotor SW 25, Spinco L<sub>2</sub>) donne un ordre de grandeur des masses moléculaires, déjà suggérées par la filtration sur Sephadex G-200. Par référence à une thyroglobuline

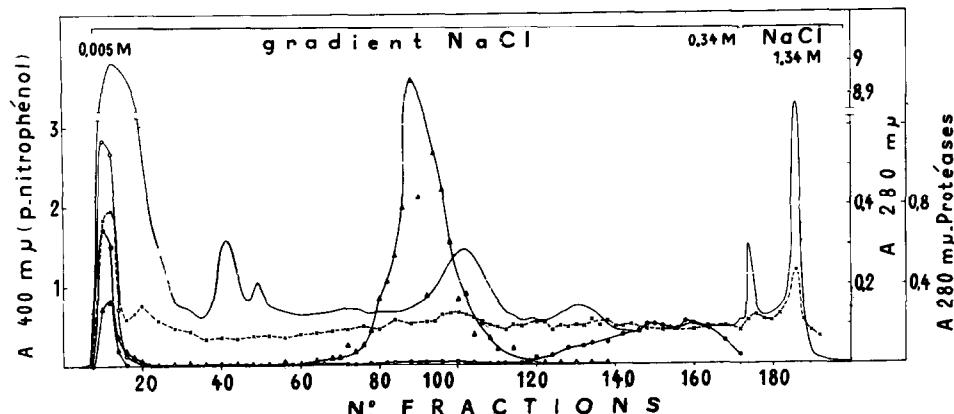


Fig. 7. Chromatographie sur CM-Sephadex d'un extrait salin de sédiment  $25\ 000 \times g$  (voir MÉTHODES). Les activités enzymatiques et l'absorbance à  $280\ \mu\mu$  sont indiquées avec les mêmes symboles que dans les Figs. 4-6.

19 S et à une  $\gamma$ -globuline 6.9 S, la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase (6.6 S) et l' $\alpha$ -mannosidase (10.0 S) pourraient avoir des masses moléculaires voisines de 150 000 et 225 000. La  $\beta$ -galactosidase manifeste un comportement particulier: l'enzyme "léger" de la filtration sur Sephadex G-200, dont on a vu qu'il n'est pas retenu sur CM-Sephadex présente un coefficient de sédimentation de 5.6 S compatible avec une masse moléculaire de l'ordre de 125 000. L'enzyme "lourd", exclu du Sephadex G-200, présente après échange sur DEAE-Sephadex à la fois un constituant 19 S majoritaire et un constituant 5.6 S, ce qui suggère une interconversion. Cette hypothèse est étayée par l'observation suivante: tandis que l'analyse d'un extrait enzymatique non purifié par ultracentrifugation dans un gradient de saccharose tamponné en phosphates de sodium, pH 6.98, NaCl 0.05 M montre la présence de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans les deux pics précédemment mentionnés, si ce gradient est effectué en Tris-HCl 0.02 M, pH 7.57, NaCl 0.1 M, on constate que la  $\beta$ -galactosidase est entièrement 5.6 S. On peut se demander si l'on assiste alors à la dissociation d'un polymère 19 S en un monomère 5.6 S ou seulement à la séparation de  $\beta$ -galactosidase 5.6 S à partir d'un complexe pré-existant qui resterait à définir.

Tandis que l'existence de la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* sous la forme d'un tétramère est acquise<sup>33-35</sup>, on connaît moins bien les  $\beta$ -galactosidases animales; l'hypothèse a été émise de l'existence dans le foie de divers animaux de formes multiples correspondant à des degrés différents de polymérisation<sup>36</sup>.

TABLEAU IV

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE GLYCOPEPTIDES DE THYROGLOBULINE ET DE THYROGLOBULINE ASIALIQUES

Enzyme	No. prép.	Temps (h) incubation	Glycopeptides asialiques			Thyroglobuline asiale		
			Partial	Total	m Unités ds test	% Hydrolyse	m Unités ds test	% Hydrolyse
					Gal	N-Ac- Glc		Gal
$\beta$ -Galactosidase	3		24	96	53		145	16
			48	100	45		21	
					84			22
$\beta$ -Galactosidase (24 h)	3	24	24	96			145	
+ $\beta$ -N-acetylglucosaminidase	3	48	48	800	56		13 200	12
		48	72		63	32		8
		98	122		71	38		
					41		15	9
$\beta$ -Galactosidase (24 h)	3	24	24	96			145	
+ $\beta$ -N-acetylglucosaminidase 24 h	3	48	48	800			13 200	
+ $\alpha$ -mannosidase	3	22	70	276	57		276	15
		50	98		63	35		9
		72	120		52	37		Traces
					36			
$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	1	38	38	1 380	31	10	920	6
		62	62		40	16		2
		96	96		60	19		
					20		20	
$\beta$ -Galactosidase	1	96	96	460	95		460	33
+ $\beta$ -N-acetylglucosaminidase	1			32	31		23	
+ $\alpha$ -mannosidase	1				24			8
$\beta$ -Galactosidase	1	96	96	id			id	56
+ protéases*							14	12
$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	2	24	24	10 000	36	12	10 000	16
+ protéases**		48	48		50	20	24	7
		90	90		62	26	39	8
								20

\* Protéases retardées sur Sephadex G-200 (Fig. 4); 3,5 unités dans le test.

\*\* Protéases restées présentes dans cette préparation obtenue par chromatographie directe sur CM-Sephadex (Fig. 7).

*Action des glycosidases purifiées sur des glycopeptides de thyroglobuline et sur une thyroglobuline asialiques*

Les résultats obtenus sont portés dans le Tableau IV. Avec les glycopeptides non dialysables privés d'acide sialique, on constate que la  $\beta$ -galactosidase libère une proportion élevée des résidus de galactose, observation compatible avec leur position devenue terminale<sup>19,37</sup>. Une faible proportion du galactose doit rester inaccessible à la  $\beta$ -galactosidase du fait de la présence de fucose, non détaché préalablement. L'addition de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase dans les conditions où nous l'avons effectuée (Tableau IV), libère moins de la moitié de la  $\beta$ -N-acétylglucosamine combinée et l'addition d' $\alpha$ -mannosidase une proportion voisine de mannose. La raison de ces résultats par défaut est difficilement explicable sur la seule base de ces premières expériences: elle pourrait être due à l'instabilité des enzymes dans nos conditions expérimentales. Par l'action séquentielle d'une  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* et d'une  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase d'épididyme sur un substrat comparable au notre, SPIRO ET SPIRO<sup>38</sup> signalent avoir obtenu un enlèvement plus complet des résidus de N-acétylglucosamine.

A l'occasion de chromatographies sur papier, on observe la libération d'un peu de fucose dans les essais contenant la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, ce qui montre que cette dernière détient aussi une fucosidase (ici non testée à l'égard d'un substrat synthétique).

Un fait intéressant est observé pour la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase thyroïdienne purifiée: cet enzyme, défini par son activité à l'égard du *p*-nitrophényl- $\beta$ -N-acétylglucosaminide, ne présente qu'une activité  $\beta$ -galactosidase minime vis-à-vis du *p*-nitrophénylglycoside (environ 20 mUnités/mg de protéines;  $K_m$  environ  $0.76 \cdot 10^{-4}$  M), tandis qu'il est capable de libérer à la fois la N-acétylglucosamine et le galactose des glycopeptides de thyroglobuline et de la thyroglobuline asialiques (Tableau IV). Une observation similaire a été rapportée à propos d'une  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase hépatique qui se comporte comme une  $\beta$ -galactosidase en présence d' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide privée d'acide sialique<sup>39</sup>.

Les résultats obtenus avec la thyroglobuline asialique sont assez médiocres, probablement largement en raison de son insolubilisation en cours de réaction. La thyroglobuline asialique est en effet peu soluble à pH voisin de 5.0, même en milieu salin, et précipité lors d'incubations prolongées. Si les rendements des hydrolyses enzymatiques restent faibles avec les glycosidases purifiées, on observe par contre des rendements très augmentés en présence de protéases thyroïdiennes (Tableau IV).

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ainsi qu'on pouvait le prévoir la glande thyroïde est relativement riche en un certain nombre de glycosidases dont la fonction principale doit être la dégradation des groupements hétéropolysaccharidiques de la thyroglobuline. Le pH optimum acide de ces glycosidases, leur caractère de latence et leur répartition subcellulaire parallèle à celle de la "phosphatase acide", sont des arguments en faveur d'une localisation prédominante dans les lysosomes. Si l'on en juge d'après la sédimentation différentielle et la distribution par ultracentrifugation en gradients de saccharose des particules détenant les activités glycosidases et phosphatase acide, les lysosomes thyroïdiens apparaissent comme un groupe encore plus hétérogène que les lysosomes

hépatiques. De toute façon, le concept biochimique de lysosomes<sup>27,29,31</sup> étayé par des données morphologiques dont certaines relatives au tissu thyroïdien<sup>1,3,40</sup> englobe une population très composite, allant de pré-lysosomes qui semblent pouvoir être élaborés par le système de Golgi à des lysosomes spécifiques ou non de certains groupes d'enzymes, enfin à divers phago-lysosomes, dont ici ceux responsables de la dégradation des gouttelettes de colloïde. Par ailleurs il est possible que certaines des hydrolases mesurées existent en faibles quantités, dans d'autres structures membranaires, peut être sous des formes enzymatique différentes, actives à des pH moins bas: des travaux ultérieurs pourront préciser ces points.

Trois glycosidases thyroïdiennes identifiées par leur activité à l'égard de nitro-phénylglycosides ont été partiellement purifiées à partir de sédiments particulaires: une  $\beta$ -galactosidase 19 S (convertible en une espèce 5.6 S selon un mécanisme qui reste à définir) une  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase 6.6 S et une  $\alpha$ -mannosidase 10 S. Comme plusieurs autres glycosidases animales et végétales elles sont instables. Nous n'avons que partiellement réussi (grâce à l'emploi d'un milieu salin faiblement réducteur et faiblement complexant) à freiner leur inactivation après qu'elles aient été artificiellement extraites de leur site particulaire et diluées du fait de leur purification.

En dépit de cette instabilité ces glycosidases sont suffisamment actives pour détacher séquentiellement à partir de glycopeptides de thyroglobuline privés d'acide sialique, d'une part le galactose avec un bon rendement, d'autre part la N-acétylglucosamine et le mannose avec un rendement moindre. Avec la thyroglobuline asiatique, peu soluble à pH acide, les glycosidases purifiées n'agissent que faiblement mais ces rendements sont très augmentés par l'ajout de protéases thyroïdiennes: ceci est un argument en faveur d'une action en synergie, lors de la dégradation de la thyroglobuline, des protéases (notamment d'endopeptidases fragmentant la protéine initiale<sup>4,11,12</sup>) et des glycosidases (exoglycosidases) ici présentées.

Il a été récemment montré que la  $\beta$ -aspartylglucosylamine amido hydrolase, glycopeptidase responsable de l'hydrolyse des résidus les plus internes de N-acétylglucosamine d'un certain nombre de glycoprotéines (dont probablement la thyroglobuline) n'est active que lorsque les groupements  $\alpha$ -aminés et  $\alpha$ -carboxyliques des résidus aspartiques sont libres<sup>41</sup>: cette particularité d'un enzyme récemment caractérisé dans les lysosomes de foie<sup>42</sup> souligne la nécessité d'une protéolyse poussée comme préalable à un détachement complet des glucides de ces glycoprotéines. Les lysosomes de foie contiennent aussi un ensemble d'exoglycosidases plus ou moins actives pour enlever séquentiellement les glucides de glycoprotéines telles que fétuine et  $\alpha_1$ -glycoprotéine acide<sup>39,43-46</sup>.

Signalons enfin que des échantillons de thyroglobuline partiellement déglycosylée soit par la  $\beta$ -galactosidase soit par celle-ci et la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase ont pu servir d'accepteurs à une  $\beta$ -galactosyltransférase et à une  $\beta$ -N-acétylglucosaminyl-transférase thyroïdiennes que nous avons récemment caractérisées dans une sous-fraction microsomale riche en fragments provenant de l'appareil de Golgi<sup>47</sup>.

## RÉSUMÉ

I. La glande thyroïde de mouton est relativement riche en glycosidases de pH optimum acide:  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase et  $\alpha$ -mannosidase identi-

fiées par leur activité vis-à-vis de nitrophénylglycosides. Quelques propriétés en sont rapportées.

2. Ces enzymes présentent une répartition subcellulaire et un caractère de latence compatible avec leur appartenance, au moins pour une large part, au groupe des lysosomes, très hétérogène dans le tissu thyroïdien.

3. A partir de sédiments particulaires trois glycosidases partiellement purifiées ont été isolées par filtration sur gel et chromatographie d'échange d'ions: une  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase 6.6 S, une  $\alpha$ -mannosidase 10.0 S et une  $\beta$ -galactosidase 19 S (plus ou moins convertible en une espèce 5.6 S).

4. Malgré leur instabilité, à laquelle on a remédié en partie, ces glycosidases purifiées sont capables de détacher séquentiellement, avec des rendements divers, les glucides de glycopeptides de thyroglobuline préalablement privés d'acide sialique. Avec une thyroglobuline asialique les faibles rendements d'hydrolyse sont très augmentés par l'ajout de protéases thyroïdiennes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. K. WETZEL, S. S. SPICER ET S. H. WOLLMAN, *J. Cell Biol.*, 25 (1965) 593.
- 2 R. EKHOLM ET S. SMEDS, *J. Ultrastruct. Res.*, 16 (1966) 71.
- 3 R. SELJELID, *J. Ultrastruct. Res.*, 18 (1967) 237.
- 4 K. BALASUBRAMANIAN ET W. P. DEISS, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 564.
- 5 K. BALASUBRAMANIAN, W. P. DEISS, W. C. TAN ET R. C. POWELL, *Endocrinology*, 77 (1965) 54.
- 6 R. EKHOLM, S. SMEDS ET U. STRANDBERG, *Exptl. Cell Res.*, 43 (1966) 506.
- 7 J. P. HERVEG, C. BECKERS ET M. DE VISSCHER, *Biochem. J.*, 100 (1966) 540.
- 8 P. JABLONSKI ET M. T. MCQUILLAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 454.
- 9 M. MC QUILLAN, J. D. MATHEWS ET V. M. TRIKOJUS, *Nature*, 192 (1961) 333.
- 10 II. M. HADDAD ET J. E. RALL, *Endocrinology*, 67 (1960) 413.
- 11 J. B. ALPERS, M. L. PETERMANN ET J. E. RALL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 513.
- 12 A. D. LITONJUA, *Nature*, 191 (1961) 356.
- 13 R. L. PEAKE, K. BALASUBRAMANIAN ET W. P. DEISS, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 689.
- 14 L. F. KRESS, R. J. PEANASKEY ET H. M. KLITGAARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 113 (1966) 375.
- 15 G. D. SMITH, M. A. MURRAY, L. W. NICHOL ET V. M. TRIKOJUS, *Biochim. Biophys. Acta*, 171 (1969) 288.
- 16 M. MACHEBOEUF ET J. J. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25 (1943) 116.
- 17 S. J. COOPERSTEIN ET A. LAZAROW, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 665.
- 18 C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX ET F. APPELMANS, *Biochem. J.*, 60 (1955) 604.
- 19 C. CHEFTEL, S. BOUCHILLOUX ET S. LISSITZKY, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 1458.
- 20 C. CHEFTEL, S. BOUCHILLOUX ET O. CHABAUD, *Biochim. Biophys. Acta*, 170 (1968) 29.
- 21 C. CHEFTEL ET S. BOUCHILLOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 170 (1968) 15.
- 22 O. Z. SELLINGER, H. BEAUFAY, P. JACQUES, A. DOYEN ET C. DE DUVE, *Biochem. J.*, 74 (1960) 450.
- 23 J. CONCHIE ET A. J. HAY, *Biochem. J.*, 87 (1963) 354.
- 24 W. E. BOWERS, J. T. FINKENSTAEDT ET C. DE DUVE, *J. Cell. Biol.*, 32 (1967) 325.
- 25 R. G. PRICE ET N. DANCE, *Biochem. J.*, 105 (1967) 877.
- 26 E. H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 27 C. DE DUVE, IN A. V. S. DE REUCK ET M. P. CAMERON, *Ciba Foundation Symp.*, *Lysosomes*, (1963) 1.
- 28 W. E. BOWERS ET C. DE DUVE, *J. Cell Biol.*, 32 (1967) 339.
- 29 C. DE DUVE, IN T. HAYASHI, *Subcellular Particles*, The Ronald Press Co., New York, 1959, p. 128.
- 30 H. SCHUEL, R. SCHUEL ET N. A. UNAKAR, *Anal. Biochem.*, 25 (1968) 146.
- 31 A. B. NOVIKOFF, IN A. V. S. DE REUCK ET M. P. CAMERON, *Ciba Foundation Symp.*, *Lysosomes*, (1963) 36.
- 32 C. DE DUVE ET R. WATTIAUX, *Ann. Rev. Physiol.*, 28 (1966) 323.
- 33 G. R. CRAVEN, E. STEERS, JR. ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 2468.
- 34 S. SHIFRIN ET E. STEERS, JR., *Biochim. Biophys. Acta*, 133 (1967) 463.
- 35 A. ULLMANN ET J. MONOD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 35.

- 36 F. CHYTIL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19 (1965) 630.
- 37 R. G. SPIRO, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1603.
- 38 M. J. SPIRO ET R. G. SPIRO, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 6529.
- 39 T. J. LANGLEY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 128 (1968) 304.
- 40 A. B. NOVIKOFF ET A. VORBRUDT, *J. Cell Biol.*, 19 (1963) 53 A.
- 41 M. MAKINO, T. KOJIMA, T. OHGUSHI ET I. YAMASHINA, *J. Biochem.*, 63 (1968) 186.
- 42 S. MAHADEVAN ET A. L. TAPPEL, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4568.
- 43 S. MAHADEVAN, J. C. NDUGUBA ET A. L. TAPPEL, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4409.
- 44 C. BECK, R. MAHADEVAN, A. BRIGHTWELL, C. J. DILLARD ET A. L. TAPPEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 128 (1968) 369.
- 45 S. MAHADEVAN, C. J. DILLARD ET A. L. TAPPEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 129 (1969) 525.
- 46 N. N. ARONSON, JR. ET C. DE DUVE, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 4564.
- 47 S. BOUCHILLOUX, O. CHABAUD, M. MICHEL-BECHET, M. FERRAND ET A. M. ATHOUËL-HAON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40 (1970) 314.

*Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 154-170