

acid was localized in endogenous ganglioside products by thin layer chromatography, incorporation into  $G_{D1b}$  was at least 30 times that of incorporation into  $G_{D1a}$ . With total particulate fractions, the branch point enzyme of the disialoganglioside pathway, CMP-N-acetylneuraminic acid:  $G_{M3}$  sialyltransferase, was 36 times more active than the UDP-N-acetylgalactosamine:  $G_{M3}$  N-acetylgalactosaminyltransferase, the entry enzyme into the monosialoganglioside pathway<sup>9</sup>. Thus, the synthesis of higher homologues of disialogangliosides in rat liver apparently occurs predominantly if not exclusively via the disialoganglioside pathway; CMP-N-acetylneuraminic acid was not incorporated into  $G_{D1a}$  by either total particulate or Golgi apparatus fractions of rat liver suggesting that  $G_{D1a}$  is an endproduct of the monosialoganglioside pathway in this tissue.

- 1 L. Svennerholm, in: *Comprehensive Biochemistry*, vol. 18, p. 201. Ed. M. Florkin and E. H. Stotz. Elsevier, Amsterdam 1970.
- 2 B. Kaufman, S. Basu and S. Roseman, in: *Inborn Disorders of Sphingolipid Metabolism*, p. 193. Ed. S. M. Aronson and B. W. Volk. Pergamon, New York 1966.
- 3 B. Kaufman, S. Basu and S. Roseman, *J. biol. Chem.* **243**, 5804 (1968).

- 4 F.A. Cumar, P.H. Fishman and R.O. Brady, *J. biol. Chem.* **246**, 5075 (1971).
- 5 F.A. Cumar, J.F. Tallman and R.O. Brady, *J. biol. Chem.* **247**, 2322 (1972).
- 6 M.G. Mestrallet, F.A. Cumar and R. Caputto, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **59**, 1 (1974).
- 7 R.W. Ledeen, R.K. Yu and L.F. Eng, *J. Neurochem.* **21**, 829 (1973).
- 8 Abbreviations used: Cer, ceramide; Gal, galactose; GalNAc, N-acetyl galactosamine; Glc, glucose;  $G_{M3}$ , NAN-Gal-Glc-Cer;  $G_{M2}$ , GalNAc-(NAN)-Gal-Glc-Cer;  $G_{M1}$ , Gal-GalNAc-(NAN)-Gal-Glc-Cer;  $G_{D1a}$ , NAN-Gal-GalNAc-(NAN)-Gal-Glc-Ceramide;  $G_{D3}$ , (NAN)<sub>2</sub>-Gal-Glc-Cer;  $G_{D2}$ , GalNAc-(NAN)<sub>2</sub>-Gal-Glc-Cer;  $G_{D1b}$ , Gal-GalNAc-(NAN)<sub>2</sub>-Gal-Glc-Cer;  $G_{T1a}$ , (NAN)<sub>2</sub>-Gal-GalNAc-(NAN)-Gal-Glc-Cer;  $G_{T1b}$ , NAN-Gal-GalNAc-(NAN)<sub>2</sub>-Gal-Glc-Cer;  $G_{T3}$ , (NAN)<sub>3</sub>-Gal-Glc-Cer; NAN, N-acetylneuraminic acid (sialic acid).
- 9 T.W. Keenan, D.J. Morré and S. Basu, *J. biol. Chem.* **249**, 310 (1974).
- 10 D.J. Morré, *Meth. Enzym.* **22**, 130 (1971).
- 11 C.L. Richardson, T.W. Keenan and D.J. Morré, *Biochim. biophys. Acta* **488**, 88 (1977).
- 12 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 13 J.L. Chien, T. Williams and S. Basu, *J. biol. Chem.* **248**, 1778 (1973).
- 14 A. Arce, H.J. Maccioni and R. Caputto, *Biochem. J.* **121**, 483 (1971).
- 15 M.C.M. Yip, *Biochim. biophys. Acta* **306**, 298 (1973).

## Mise en évidence d'une activité $\alpha$ -amylasique dans les lysosomes d'*Aspergillus oryzae*

### $\alpha$ -Amylase activity in lysosomes of *Aspergillus oryzae*

Jacqueline Bata, Paulette Vallier et L. Colobert<sup>1</sup>

*Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale, Faculté de Médecine Alexis-Carrel, 8 rue Guillaume Paradis F-69008 Lyon (France), 5 Octobre 1977*

**Summary.** The  $\alpha$ -amylase of mycelial cells of *Aspergillus oryzae* exists in a particular form in 8000 g pellet. The lysosomal localization of acid phosphatase is confirmed by electron microscopy. The purification of lysosomes by discontinuous gradient of sucrose in  $D_2O$  shows that  $\alpha$ -amylase activity is bound to these particles.

De nombreux travaux ont été entrepris sur la forme soluble de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* libérée en quantité importante lorsque la lyse cellulaire débute<sup>2-4</sup>. Un site de fixation de l'enzyme a été décelé sur la paroi cellulaire du mycélium<sup>5</sup>. La présence d' $\alpha$ -amylase a également été démontrée dans la membrane cellulaire de *Bacillus amyloliquefaciens*<sup>6</sup>. Dans les cellules d'aleurone d'orge, on retrouve, à côté d'une forte proportion d' $\alpha$ -amylase soluble, 5-25% de cette enzyme sous forme particulaire<sup>7</sup>. Par ailleurs l'hydrolyse intralysosomique du glycogène sous l'action de l' $\alpha$ -glucosidase ou maltase acide a été démontrée dans les hépatocytes humains<sup>8</sup>. L' $\alpha$ -amylase est capable d'initier une telle hydrolyse.

Dans le présent travail après la mise en évidence de lysosomes dans les cellules mycéliaires d'*Aspergillus oryzae* nous avons recherché l'existence d'une activité  $\alpha$ -amylasique lysosomique.

**Matériel et méthodes.** *Aspergillus oryzae* (CBS 129.49) est cultivé en milieu liquide ajusté à pH 6,5, sous agitation et avec circulation d'air. La culture est effectuée à 30 °C et dure 40 h. Le terme de la culture correspond au milieu de la phase exponentielle de croissance. Les cellules mycéliaires sont isolées du milieu de culture, lavées et remises en suspension, puis soumises à une digestion enzymatique de la paroi cellulaire sous l'action du suc digestif d'*Helix pomatia* suivant la méthode de Greenawalt et al.<sup>9</sup>. Le broyage est ensuite effectué à l'aide de l'homogénéiseur

Potter-Elvhejehm type C. La fraction mitochondriale recueillie entre 1500 et 8000 g est lavée 3 fois et déposée sur un gradient discontinu constitué de 14 couches de solutions de saccharose dans un tampon tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM, pH 7, réalisé dans l'eau lourde. Les concentrations en saccharose de ces solutions varient de 49% à 7% (densités 1,26-1,13). Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al.<sup>10</sup>. L'activité  $\alpha$ -amylasique est mesurée en tampon acétate-acide acétique 50 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5 par diminution de l'intensité de la coloration du complexe bleu formé entre l'amylase et l'iode<sup>11</sup>. Le dosage de la phosphatase acide s'effectue par la mesure du parnitrophénol libéré à partir de parnitrophénol phosphate à pH 3<sup>12</sup>. La cytochrome-oxydase est dosée par disparition du cytochrome C réduit à 550 nm et à pH 7,1<sup>13</sup> tandis que la NADH-cytochrome C oxydoréductase se caractérise par l'apparition de cette forme réduite, à pH 7 en tampon phosphate 80 mM, cyanure de potassium 0,3 mM, roténone 0,15 · 10<sup>-3</sup> mM<sup>14</sup>. La mise en évidence de la phosphatase acide au microscope électronique se fait par une modification de la méthode de Gomori<sup>15</sup> après inclusion du mycélium dans la gélose et fixation par le glutaraldéhyde 3,5% pendant 4 h<sup>16</sup>. On prépare également un témoin sans substrat. L'inclusion est réalisée dans une résine époxy.

**Résultats et discussion.** La figure 1 confirme la localisation lysosomique de la phosphatase acide dans les cellules mycéliaires d'*Aspergillus oryzae*. Dans des spores fongiques,

cellules au métabolisme ralenti, pauvres en cytoplasme, Wilson et al.<sup>16</sup> a mis en évidence, en microscopie électronique, la présence de phosphatase acide à la périphérie de vacuoles où se localiseraient également la désoxyribonucléase acide et l'arylsulfatase. Par analogie avec les cellules

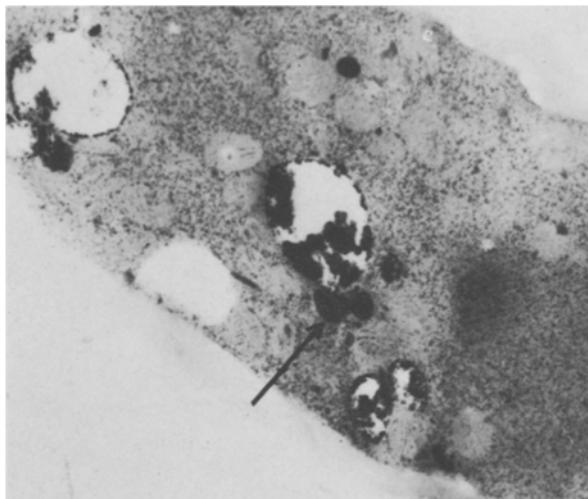


Fig. 1. Mise en évidence de la phosphatase acide dans les cellules mycéiales d'*Aspergillus oryzae* d'après une modification de la technique de Gomori<sup>15</sup>.  $\times 32,400$ . Localisation dans les lysosomes primaires indiqués par la flèche, ou les vacuoles digestives de taille plus importante.

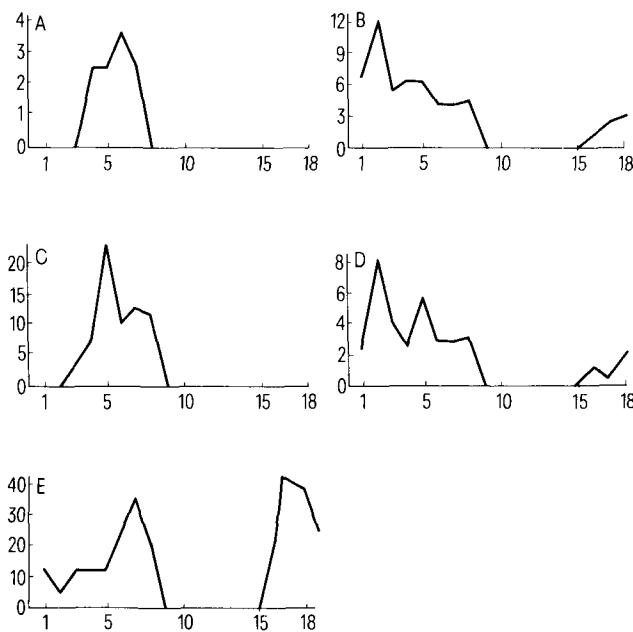


Fig. 2. Répartition des activités enzymatiques spécifiques après passage du culot 8000 g sur un gradient de saccharose 49% à 7% dans  $D_2O$ , centrifugé 15 h à 16000 rpm (Spinco L 50 - Rotor SW 25-1). En abscisse sont portés les numéros des fractions du gradient et en ordonnée les activités en unités par mg de protéine. La concentration en protéines est exprimée en  $\mu g/ml$ . A NADH, cytochrome C oxydoreductase insensible à la rotenone. B Phosphatase acide. C Cytochrome-c oxydase. D a-Amylase. E Protéines.

animales, il a étendu le terme de lysosomes à ces vacuoles de spores fongiques. Dans nos essais réalisés sur les cellules mycéiales en phase exponentielle de croissance, le métabolisme est très actif et le cytoplasme plus abondant renferme des vésicules de tailles différentes allant du lysosome primaire petit, dense et peu actif à la vacuole digestive ou lysosome secondaire activé contenant des hydrolases acides actives et au moins en partie solubles. Nous avons localisé la phosphatase acide aussi bien dans les lysosomes primaires qui apparaissent entièrement colorés que dans les vacuoles où la coloration semble concentrée, pour certaines, à la périphérie.

La séparation des populations lysosomiques et mitochondrielles regroupées dans le culot 8000 g a été réalisée au moyen d'un gradient discontinu de saccharose dans l'eau lourde sur lequel nous avons déposé 1,5 mg de protéines du culot 8000 g. La centrifugation s'effectue à 26500  $\times g$  pendant 15 h (centrifugeuse Spinco L 50 rotor SW 25-1). Les activités spécifiques de l' $\alpha$ -amylase et de la phosphatase acide présentent un maximum pour une densité de 1,253 (figure 2) où nous ne trouvons pas de cytochrome-c oxydase. Celle-ci se répartit en 2 pics voisins de densité 1,228 et 1,213, d'importance inégale, au niveau desquels subsiste une concentration moindre d' $\alpha$ -amylase et de phosphatase acide. La NADH-cytochrome C oxydoreductase insensible à la rotenone, marqueur de la membrane externe des mitochondries, se retrouve dans la même zone que la cytochrome-c oxydase marqueur de la membrane interne. Dans le cas du tissu hépatique de rat Beaufay et al.<sup>17</sup> ont montré que, dans un gradient linéaire 0,95-1,61 M en saccharose dans l'eau lourde, l'on retrouve les mitochondries à une densité de 1,23 et les lysosomes à 1,25-1,26. Nos résultats sont comparables à ceux de Beaufay. La répartition de l' $\alpha$ -amylase suit celle de la phosphatase acide et les particules qui les contiennent se comportent comme les lysosomes des hépatocytes. Il semble donc qu'il existe dans les cellules mycéiales d'*Aspergillus oryzae* une  $\alpha$ -amylase lysosomique, ce qui n'exclut pas la possibilité d'autres localisations de l'enzyme.

- 1 Nous remercions M. Michel Terrier pour sa collaboration technique.
- 2 J. Andrzejczuk, K. Kaczkowski, Bull. Acad. pol. Sci. Biol. 19, 313 (1971).
- 3 E. H. Fisher et R. De Montmollin, Helv. chim. Acta 3, 1994 (1951).
- 4 P. Vallier, J. Bata et L. Colobert, Annls Microbiol. Inst. Pasteur, in press (1977).
- 5 M. Yabuki et D. Fukui, J. Bact. 104, 138 (1970).
- 6 L. Fernandez-Revira Rio et A. Arroyo Begovich, Biochem. biophys. Res. Commun. 65, 161 (1975).
- 7 R. D. Firn, Planta 125, 227 (1975).
- 8 J. Badoual et H. Lestrade, Path. Biol. 16, 459 (1968).
- 9 J. W. Greenawalt, D. O. Hall et O. C. Wallis, dans: Methods in Enzymology 10, 142 (1967).
- 10 O. H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 11 J. R. Close et H. V. Street, Clin. chim. Acta 3, 476 (1958).
- 12 W. H. Fishman et F. Lerner, J. biol. Chem. 200, 89 (1953).
- 13 F. Appelmanns, R. Wattiaux et C. de Duve, Biochem. J. 59, 438 (1955).
- 14 G. L. Sotocasa, B. Kuylenstierna, L. Ernster et A. Bergstrand, J. Cell Biol. 32, 415 (1967).
- 15 T. Barka et P. J. Anderson, dans: Histochemistry Theory Practice and Bibliography, p. 238. Harper and Row, New York 1963.
- 16 C. L. Wilson, D. L. Stiers et G. G. Smith, Phytopathology 60, 216 (1970).
- 17 H. Beaufay, D. S. Bendall, P. Baudhuin, R. Wattiaux et C. de Duve, Biochem. J. 73, 628 (1959).