

POLYMORPHISME DES HYDROLASES LYSOSOMALES CHEZ L'ABEILLE (*APIS MELLIFERA* L.) A BUKAVU ET SES ENVIRONS (SUD-KIVU, REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO)

[Polymorphism of lysosomal hydrolases in bee (*Apis mellifera* L.) from BUKAVU and its surroundings (South-KIVU, Democratic Republic of Congo)]

Dieudonné C.T. BAKENGA MATABARO¹, Alexandre MBAYA NTUMBULA², and Simone WATTIAUX-DE CONINCK³

¹Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu, ISP/Bukavu, RD Congo

²Université Pédagogique National de Kinshasa, UPN, RD Congo

³Université de Namur, Belgium

Copyright © 2017 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The polymorphism of lysosoma β - galactosidase (EC. 3.2.1.23) and N- acetylglucosaminidase (EC. 3.2.1.49) has been established taking into account the variation of their specific activities at both the larval, pupal and adult stages. These activities have been decreased from the larva stage (22.03 ± 4.3 nmoles/min/mg of protein) to the adult stage (5.30 ± 1.27 nmoles/min/mg of protein) via the pupal stage (20.4 ± 1.78 nmoles/min/mg of protein). The N- acetylglucosaminidase activity has been about 10 times as higher as that of β -galactosidase. That activity of the N- acetylglucosaminidase is 200.88 ± 31.39 nmoles/min/mg of protein for larvae, 115.00 ± 21.02 nmoles/min/mg of protein for pupas and 9.48 ± 2.23 nmoles/min/mg of protein for adults.

The activities of both 2 enzymes have followed the MICHAELIS-MENTEN law as they were positively linear as well in function of the enzyme concentration and the incubation time as in function of the substrate concentration. The temperature has influenced their respective activities according to ARRHENIUS law, the Q10 being around 2.

The cathepsine C (EC. 3.4.14.1) activities have been equal to 2.03 ± 1.18 , 0.95 ± 0.54 and 0.76 ± 0.39 nmoles/min/mg of protein for larvae, pupas and adults, respectively. For the acid phosphatase (EC. 3.1.3.2), the activities have been equal to 6.29 ± 2.87 , 6.89 ± 2.69 and 8.51 ± 4.51 nmoles/min/mg of protein for larvae, pupas and adults, respectively. These activities are weak comparatively to those of the former two glycosidases at the 3 development stages of *Apis mellifera* L. Conversely, the venom acid phosphatase has been very active (25.32 ± 6.94 nmoles/min/mg of protein), an activity almost 20 times higher than that of both cathepsine C, β -galactosidase and N-acetylglucosaminidase.

The β -galactosidase and N-acetylglucosaminidase from larvae and pupas have all the characteristics of lysosoma enzymes. They have a maximum activity at acidic pH, i.e. 5 for the β -galactosidase and 6 for the N-acetylglucosaminidase, and present a latency property that is annihilated by detergents. A fraction of their activity being sedimentable in the used experimental conditions, these 2 glycosidases are most likely lysosoma acid hydrolases and indicate the presence of lysosomes in *Apis mellifera* L. In addition, as their activities vary during the bee development stages, it becomes evident the 2 glycosidases are involved in the bee metamorphosis and are thus polymorphic in *Apis mellifera* L.

Another enzyme, i.e. the hyaluronidase (EC. 3.2.1.35; MW 37 kDa), has been identified in the bee venom.

KEYWORDS: *Apis mellifera* L., polymorphism, lysosome, enzyme.

RÉSUMÉ: Le polymorphisme de la β - galactosidase (EC. 3.2.1.23) et de la N- acétylglucosaminidase (EC. 3.2.1.49) lysosomales a été établi tenant compte de la variation de leurs activités spécifiques aux stades larvaire, pupal et adulte. Ces activités ont été réduites du stade larvaire ($22,03 \pm 4,9$ nmoles/min/mg de protéine) au stade adulte ($5,30 \pm 1,27$? nmoles/min/mg de protéine), en passant par le stade pupal ($20,4 \pm 1,78$ nmoles/min/mg de protéine). L'activité de la N- acétylglucosaminidase

est environ 10 fois plus élevée que celle de la β -galactosidase. Elle est de $(200,88 \pm 31,39 \text{ nmoles/min/mg de protéine pour les larves, } 115,00 \pm 21,02 \text{ nmoles/min/mg de protéines pour les pupes et } 9,48 \pm 2,23 \text{ nmoles/min/mg de protéine pour les adultes})$.

Les activités respectives de ces 2 enzymes ont suivi la loi de MICHAELIS-MENTEN, car elles sont positivement linéaires en fonction de la concentration en enzyme, du temps d'incubation et en fonction de la concentration en substrat. La température a influencé leurs activités respectives selon la Loi d'ARRHENIUS, le Q10 ayant une valeur qui avoisine 2.

Les activités de la cathepsine C (EC. 3.4.14.1) ont été de $2,03 \pm 1,18$; $0,95 \pm 0,54$ et $0,76 \pm 0,39$ nmoles/min/mg de protéine pour les larves, les pupes et les adultes, respectivement. Celles de la phosphatase acide (EC. 3.1.3.2.) équivalent respectivement à $6,29 \pm 2,87$; $6,89 \pm 2,69$ et $8,51 \pm 4,51$ nmoles/min/mg de protéine pour les larves, les pupes et les adultes. Ces activités sont faibles comparativement à celles des 2 glycosidases précitées aux 3 stades de développement de *Apis mellifera*. La phosphatase acide est par contre très active au niveau du venin ($25,32 \pm 6,94$ nmoles/min/mg de protéines), son activité étant environ 20 fois supérieure à celles de la cathepsine C, de la β galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase.

La β -galactosidase et la N-acétylglucosaminidase des larves et pupes ont toutes les caractéristiques des enzymes lysosomales. Elles ont une activité maximale à pH acide, soit 5 pour la β -galactosidase et 6 pour la N-acétylglucosaminidase, et présentent une propriété de latence qui est annulée par les détergents. Une partie de leur activité pouvant sédimenter dans les conditions expérimentales utilisées, ces 2 glycosidases sont donc très probablement des hydrolases acides lysosomales et signalent la présence de lysosomes chez *Apis mellifera* L. En plus, comme leurs activités varient pendant les étapes de développement, il devient évident que les 2 glycosidases sont impliquées dans la métamorphose de l'abeille et sont donc polymorphiques chez *Apis mellifera* L.

Une autre enzyme, l'hyaluronidase (EC. 3.2.1.35 ; PM 37 kDa), a été en plus identifiée dans le venin d'abeille.

MOTS-CLEFS: *Apis mellifera* L., polymorphisme, lysosome, enzyme.

1 INTRODUCTION

L'abeille joue ainsi un rôle économique indéniable pour les paysans apiculteurs de la région de BUKAVU et ses environs compte tenu des produits de la ruche (miel, cire, propolis et venin). Elle garantit un certain équilibre dans les efforts de développement rural en leur procurant des moyens de subsistance assurés et durables.

Les populations d'abeilles présentent une certaine hétérogénéité pouvant être génétique, géographique, saisonnière continue ou discontinue. La variabilité discontinue intra-spécifique dénommée « polymorphisme » est définie comme étant la présence simultanée dans un même biotope de deux ou plusieurs formes discontinues (ou morphes), appartenant à une même espèce. Les différences individuelles se traduisent par des variantes : larves, pupes et imagos qui se différencient entre eux par des caractéristiques biologiques et biochimiques (CAMPBELL & REECE, 2002). La métamorphose de l'abeille résulte d'une suite de modifications spectaculaires : l'œuf minuscule se transforme en larve puis en nymphe ou pupa et finalement en adulte, ouvrière, reine ou faux bourdon. Dans ce processus complexe seraient impliqués nombre de facteurs, parmi lesquels la digestion intracellulaire et plus précisément les lysosomes. La digestion intracellulaire est une propriété générale des cellules, associée à de multiples fonctions physiologiques importantes (de DUVE, 2000). Les lysosomes jouent un rôle important dans le développement et la métamorphose en stimulant la division cellulaire et la régression de certains tissus sous l'action de certaines enzymes lysosomales (CRUZ *et al.*, 2013 ; ZOLTOWSKA *et al.*, 2007a). D'où un intérêt capital dans l'étude de la cinétique des enzymes lysosomiales au cours des différentes phases de la métamorphose chez l'abeille.

La métamorphose s'accompagne de la destruction massive de certains tissus et la libération de grandes quantités d'hydrolases lysosomales. Les lysosomes ne seraient pas le facteur initial agissant lors de la métamorphose : en effet, de toute évidence, lorsque les muscles subissent la première étape de l'altération, on constate une altération de la membrane plasmique, qui précède toute modification détectable des lysosomes. (SCHEIB- PFLEGER & WATTIAUX, 1962).

L'activité de ces enzymes lysosomiales (hydrolases acides) varierait-elle au cours des différentes phases de la métamorphose des abeilles, du stade larvaire au stade pupal et puis au stade adulte ?

Les lysosomes sont des organites subcellulaires identifiés pour la première fois par la voie biochimique dans le foie de rat par de DUVE dans les années 1950, contenant une variété d'hydrolases acides entourées d'une membrane et intervenant dans les mécanismes de la différenciation cellulaire, de la métamorphose ainsi que de l'apoptose ou mort cellulaire programmée (de DUVE & WATTIAUX, 1966). Ce sont des structures digestives intracellulaires qui permettent la dégradation des molécules extra- et intracellulaires sans que la cellule ne puisse en souffrir (WATTIAUX, 2010).

Il semble que les lysosomes et les enzymes lysosomales jouent un rôle important dans le cycle de vie de l'abeille au moins à 3 niveaux : la métamorphose, la défense immunitaire et la sécrétion d'enzymes par les glandes hypopharyngiennes. Les pesticides pourraient influencer la métamorphose à l'opposé des parasites et virus qui influenceraient la défense immunitaire. Ce qui accroît encore une fois l'intérêt d'une étude des enzymes lysosomiales.

Des centaines d'enzymes interviennent dans nombre de réactions métaboliques favorables au développement, à la croissance, à la nutrition cellulaire et à la défense immunitaire. Les enzymes localisées dans les lysosomes sont dans la plupart des cas des hydrolases acides actives à un pH compris entre 3 et 6 (WATTIAUX, 1969) et elles n'ont fait l'objet d'aucune étude fouillée chez *Apis*

Apis mellifera L. est depuis longtemps le modèle de référence pour les études de physiologie et du comportement chez les insectes. Malheureusement, pour ses différents stades polymorphiques notamment, les études biochimiques restent très limitées au regard des autres espèces domestiques (FRANK, 1999). L'objectif de notre étude est la détermination de l'activité de 3 enzymes lysosomales d'*Apis mellifera* L. : deux glycosidases [β - galactosidase (EC. 3.2.1.23) et N-acétylglucosaminidase (EC. 3.2.1.49)], et la phosphatase acide (EC. 3.1.3.2) des homogénats de larves, pupes et d'abeilles adultes. D'abord, il s'agit d'en déterminer quantitativement les activités respectives, du stade larvaire au stade adulte, et du venin d'abeille, celui-ci étant en grande partie constitué de protéines et enzymes (www.bee-hexagone.net). Ensuite, il a fallu vérifier l'applicabilité de la loi de MICHAELIS-MENTEN.

Tous les dosages enzymatiques ont été réalisés sur des homogénats de larves, pupes et adultes d'abeilles par des techniques de fluorescence. Ces dernières sont sensibles et donnent de meilleurs résultats que les méthodes colorimétriques et spectrochimiques (GONG *et al.*, 2009)

2 TECHNIQUE D'ANALYSE ENZYMATIQUE

Nous décrivons ci-dessous brièvement les principales méthodes utilisées pour notre travail.

2.1 FRACTIONNEMENT PAR CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE DES HOMOGÉNATS DE LARVES, DES PUPES ET D'ADULTES D'ABEILLES

La centrifugation différentielle en milieu homogène est utilisée dans le but d'isoler les organites cellulaires, sur base des différences de leurs coefficients de sédimentation.

L'échantillon prélevé est immédiatement immergé dans une solution de saccharose isotonique 0,25M maintenue à 0°C préalablement tarée et le poids de l'échantillon est ensuite déterminé par une deuxième pesée.

L'homogénéisation se fait à froid 0°C dans une quantité connue de saccharose 0,25M dans un homogénéiseur de POTTER dont le piston est actionné par un moteur de foreuse. Sa vitesse de rotation est d'environ 800 RPM.

Le tissu et les cellules se désintègrent à la suite des forces de cisaillement entre le piston et le tissu, tout en préservant les organites subcellulaires. La vérification a été faite en utilisant un microscope optique (LEICA DMILLED).

La suspension ainsi obtenue constitue l'homogénat H ; lequel est centrifugé à 4°C dans une centrifugeuse (International PR-J) à 1500 RPM pendant 10 min. Le surnageant prélevé constitue l'extrait (E).

Le culot ou fraction N, est constitué essentiellement de noyaux, de débris cellulaires et quelques cellules intactes. Il a été ramené à un volume connu dans le saccharose isotonique, à 0°C. Le volume de l'extrait surnageant, a été déterminé avec précision. On y retrouve les organites subcellulaires libérés lors de l'homogénéisation comme les mitochondries, lysosomes, peroxyosomes, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi. Cet extrait est examiné sous un microscope optique (LEICA DMILLED) pour s'assurer de son homogénéité.

Un volume précis de la fraction E, a été centrifugé à 35000 RPM dans une ultracentrifugeuse (BECKMAN L7) pendant 20 minutes à 4°C.

Le culot obtenu est resuspendu et ramené à un volume précis avec du saccharose isotonique froid et constitue la fraction MLP et le surnageant ou fraction S, dont le volume a été noté, contient tous les éléments non sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées.

L'activité enzymatique libre ou totale a été mesurée sur les différentes fractions obtenues, à savoir :

- Fraction H : Homogénat ;
- Fraction E : Extrait ;

- Fraction N constituée essentiellement de noyaux, débris cellulaires et de quelques cellules intactes ;
- Fraction MLP ; ensemble des fractions M, L et P.
- Fraction S

Dans la fraction M, ou Mitochondriale Lourde se retrouvent les mitochondries principalement mais aussi les lysosomes et peroxysomes en quantité appréciable

La fraction L, ou Mitochondriale Légère, enrichie en lysosomes et peroxysomes

La fraction P contient la plus grande partie des fragments du réticulum endoplasmique et du Golgi (WATTIAUX, 1966).

La Fraction S est constituée par des particules cellulaires non sédimentables de la cellule dans les conditions de centrifugation décrites.

Une vérification de la récupération a été faite afin de noter s'il n'y a pas eu soit des pertes lors des diverses manipulations, soit une inactivation enzymatique.

A cet effet la somme des activités enzymatiques des fractions N + MLP + S a été rapportée aux activités de E+N. Cette récupération permet de valider les résultats obtenus.

2.2 MESURE DES ACTIVITÉS LIBRE ET TOTALE

L'activité libre d'une enzyme est mesurée pendant un temps court d'incubation (10 min) en présence de saccharose 0,25M pour assurer l'isotonicité du milieu et cela sur une préparation aussi fraîche que possible. L'activité libre permet d'évaluer l'intégrité de la membrane de l'organite, en l'occurrence du lysosome ; si elle est faible, la membrane du lysosome est bien préservée et le substrat présent dans le milieu d'incubation n'a pas accès à l'enzyme intralysosomiale. On dit que l'enzyme est cachée ou latente.

L'activité soluble est l'activité d'une enzyme qui, normalement, se trouve à l'intérieur d'une structure et qui, après un traitement lésant, se trouve dans le surnageant après centrifugation.

L'activité totale correspond à l'activité de toute l'enzyme, libérée lorsque la membrane de tous les organites est rompue sous l'action d'un détergent, par exemple.

Elle est déterminée en ajoutant au milieu d'incubation le Triton X-100 à une concentration de 0,05 à 0,1%. Dans ces conditions la membrane des lysosomes est détruite et les enzymes des lysosomes ont totalement accès à leur substrat. (Figure II.1.) (WATTIAUX & de DUVE, 1956).

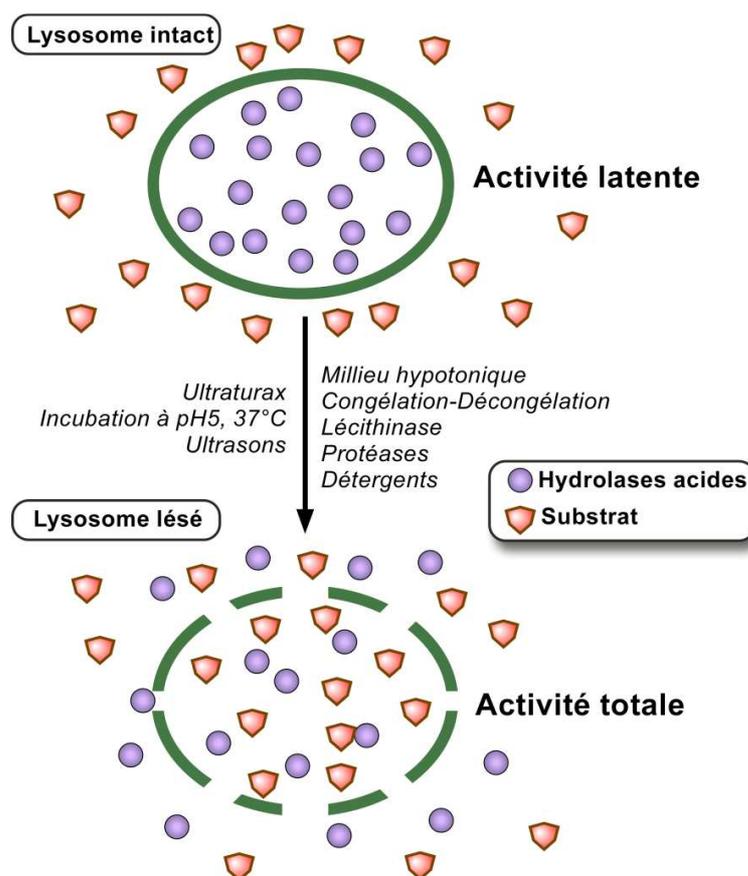


Figure II.1. Représentation schématique de la latence des hydrolases lysosomiales liée à la structure des lysosomes (WATTIAUX, 1966)

Au cours de la réaction enzymatique, les substrats utilisés, libèrent par hydrolyse, un produit de réaction fluorescent. Des substrats analogues mais qui libèrent un produit de réaction coloré, sont aussi disponibles dans le commerce.

2.3 MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

2.3.1 MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA β GALACTOSIDASE

L'activité de la β galactosidase est mesurée suivant le mode opératoire décrit au tableau II.1 en utilisant le substrat qui est le *para*-méthylumbellyféryl- β -D galactopyranoside ou MUG. Code Sigma M 1633-250mg (PM 338,3) concentration 40 mM soit 13,5 mg par ml de DMSO.

Tableau II.1. Composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration de la β -galactosidase sur l'activité enzymatique en présence de Triton X-100.

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
Substrat 40 mM	2,5	0,5
NaCl 400 mM	25	5
Tampon acetate 200 Mm	50	50
Triton X100 2%	5	0,05 %
Eau distillée	97,5	
Volume par test	180 (de mixture)	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

Le fixateur est la glycine 50 mM, EDTA-Na 5 mM et Triton X-100 à 0,05%.

La composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration de la β -galactosidase sur l'activité enzymatique en présence de Triton X-100 est indiquée dans le tableau II.1.

L'incubation se fait dans un bain thermostatique à 37°C ou à 27° C durant 20 min.

Pour les témoins (blanc), l'enzyme a été ajoutée après fixation, c'est-à-dire après addition de 2ml de tampon glycine-EDTA. La lecture des absorbances a été faite au fluorimètre VERSO FLUOR (BIO-RAD).

Pour la détermination de l'influence du temps sur les activités enzymatiques, 180 μ l de la mixture et 20 μ l d'enzyme sont chaque fois incubés pendant différents temps : 5, 10, 15, 20, 30 min.

Pour la détermination de l'influence de la concentration de l'enzyme et de la température sur l'activité enzymatique, 5, 10, 15, 20 μ l d'enzyme sont incubés en présence de 180 μ l de la mixture pendant 20 min soit à 37 °C soit à 27°C. Le volume d'incubation est porté à 200 μ l par ajout au préalable de 15, 10, et 5 μ l d'eau distillée. L'évaluation des activités libres en milieu isotonique sans détergent et totale en présence du détergent a été faite suivant la composition des tests reprise au tableau II.2.

Tableau II.2. Composition des tests pour l'évaluation des activités libres (en milieu isotonique) sans Triton X-100 et totale en présence de Triton X-100 pour la β -galactosidase.

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
Substrat 40 mM	2,5	0,5
NaCl 400 mM	25	50
Tampon 200 mM	50	50
Saccharose 1 M	45	0,25
Eau distillée	57,5	
Volume par test	180 (mixture)	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

Cette mixture est destinée à mesurer l'activité libre en milieu isotonique. Pour la mesure de l'activité totale, on prélève 9 ml de cette prémixure à laquelle on ajoute 0,05 ml de Triton X-100 à 20%. La concentration finale du détergent dans le volume final 200 μ l du test est de 0,1%.

La Composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la β -galactosidase en présence de Triton X-100 est indiquée dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la β -galactosidase en présence de Triton X-100.

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
Substrat 40 mM	2,5	0,5
NaCl 400 Mm	25	5
Triton 2%	5	0,05 %
Eau distillée	97,5	
Volume par test	130 (prémixure)	
Volume de tampon 200 mM	50	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

A 130 μ l de prémixure, nous avons ajouté 50 μ l de tampon 200 mM pour les différentes valeurs de pH détaillées ci-dessous et 20 μ l d'enzyme :

Tampon citrate 200 mM, pH 3,45 ;

Tampon acétate 200 mM, pH 4,5 ;

Tampon acétate 200 mM, pH 5 ;

Tampon Tris 200 mM, pH 6 ;

Tampon Tris 200 mM, pH 7,4 ;
 Tampon Tris 200 mM, pH 8 ;
 Tampon glycine 200 mM, pH 9,6.

Le test pour l'évaluation du K_m de la β -galactosidase en présence de détergent Triton X-100 est indiquée dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Composition des tests pour l'évaluation du K_m de la β -galactosidase en présence de Triton X-100 (Détergent).

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
NaCl 400 Mm	25	50
Tampon acétate 200 mM pH5	50	50
Triton 2%	5	0,05 %
Eau distillée	90	
Volume par test	170 (prémixture)	
Volume de substrat	10	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

2.3.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA N- ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE

Le substrat est le 4-méthylumbelliféryl-N-acétyl β -D-glucosaminide (PM 379,4) , Code Sigma 2133-100mg, concentration 100 mM soit 37,9 mg pour 1 ml de DMSO

Le fixateur est la glycine 50 mM, EDTA-Na 5 mM et Triton X-100 à 0,05%.

La composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration en N-acétylglucosaminidase sur l'activité enzymatique en présence de Triton X-100 est indiquée dans le tableau II.5.

Tableau II.5. Composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration en N-acétylglucosaminidase sur l'activité enzymatique en présence de Triton X-100

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
Substrat 100 Mm	2	1
NaCl 400 Mm	25	5
Tampon 200 Mm	50	50
Triton 2%	5	0,05 %
Eau distillée	98	
Volume par test	180 (mixture)	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

On ajoute à 180 μ l de mixture 20 μ l d'une préparation enzymatique de telle sorte que le volume final lors de l'incubation soit de 200 μ l. L'incubation se fait dans un bain thermostatique à 37 ou 27° C durant 20 minutes *en général*.

Pour les témoins (blanc), l'enzyme est ajoutée après fixation, c'est-à-dire après ajout de 2 ml de tampon glycine-EDTA

La lecture des absorbances se fait au fluorimètre VERSO FLUOR (BIO-RAD)

Pour la détermination de l'influence du temps sur les activités enzymatiques, 180 μ l de la mixture et 20 μ l d'enzyme sont incubés pendant différents temps : 5, 10, 15, 20, 30 min.

Pour la détermination de l'influence de la concentration de l'enzyme et de la température sur l'activité enzymatique, 5, 10, 15, 20 μ l d'enzyme sont incubés en présence de 180 μ l de la mixture pendant 20 minutes soit à 37 et 27°C. Le volume d'incubation est porté à 200 μ l par ajout au préalable de 15, 10, et 5 μ l d'eau distillée.

La composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la N- acétylglucosaminidase en présence de Triton X-100 est indiquée dans le tableau II.6.

Tableau II.6. Composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la N-acétylglucosaminidase en présence de Triton X-100.

Composant	Volume par test(μ l)	Concentration finale(mM)
Substrat 40 mM	2	0,5
NaCl 400 mM	25	5
Triton 2%	5	0,05 %
Eau distillée	98	
Volume par test	130 μ l (prémixture)	
Volume de tampon 200 Mm	50	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

A 130 μ l de prémixture, on ajoute 50 μ l de tampon pour les différentes valeurs de pH détaillés ci-dessous et 20 μ l d'enzyme :

Tampon citrate 200 mM pH 3,45
 Tampon acétate 200 mM pH 4,5
 Tampon acétate 200 mM pH 5
 Tampon Tris 200 mM pH 6
 Tampon Tris 200 mM pH 7,4
 Tampon Tris 200 mM pH 8
 Tampon glycine 200 mM pH 9,6

La composition des tests pour l'évaluation du Km est indiquée dans le tableau II-7.

Tableau II.7. Composition des tests pour l'évaluation du km de la N- acétylglucosaminidase en présence de Triton X-100

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
NaCl 400 mM	25	50
Tampon acétate 200 mM pH5	50	50
Triton 2%	5	0,05 %
Eau distillée	90	
Volume par test	170 (mixture)	
Volume de substrat	10	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

2.3.3 MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ACIDE

Cette enzyme a été mesurée uniquement sur les larves d'abeille.

Le substrat est le 4-méthylumbelliférylphosphate Code Sigma M 8883- 100 mg ou MUP (PM 256,2) substrat, S 40 mM (soit 10,24 mg dans 1 ml d'eau distillée).

Le fixateur est la glycine 50 mM, EDTA-Na 5 mM et Triton X-100 à 0,05%.

La composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration en phosphatase acide enzyme sur l'activité enzymatique en présence de Triton X-100 est décrite dans le tableau II.8

Tableau II.8. Composition des tests pour l'évaluation de l'effet du temps, de la température et de la concentration en phosphatase acide enzyme sur l'activité enzymatique

Composant	Volume par test (µl)	Concentration finale (mM)
Substrat 40mM	5 µl	1Mm
Tampon 200 mM	50 µl	50 Mm
Triton X-100 à 2%	10 µl	0,1 %
Eau distillée	115 µl	
Volume par test	180 µl de mixture	
Volume d'enzyme	20µl	
Volume final	200 µl	

On ajoute à 180 µl de cette mixture 20 µl d'une préparation enzymatique de telle sorte que le volume final lors de l'incubation soit de 200 µl. L'incubation se fait dans un bain thermostatique à 37°C ou 27° C durant 20 min en général.

Pour les témoins (blanc), l'enzyme est ajoutée après fixation, c'est-à-dire après ajout de 2 ml de tampon glycine-EDTA

La lecture des absorbances se fait au fluorimètre VERSO FLUOR BIO-RAD.

Pour la détermination de l'influence du temps sur les activités enzymatiques, 180 µl de la mixture et 20 µl d'enzyme sont incubés pendant différents temps : 5, 10, 15, 20, 30 min.

Pour la détermination de l'influence de la concentration de l'enzyme et de la température sur l'activité enzymatique, 5, 10, 15, 20 µl d'enzyme sont incubés en présence de 180 µl de la mixture pendant 20 min soit à 37°C et 27°C. Le volume d'incubation est porté à 200 µl par ajout au préalable de 15, 10, et 5 µl d'eau distillée

La composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la phosphatase en présence de Triton X-100 est décrite dans le tableau II.9.

Tableau II.9. Composition des tests pour l'évaluation du pH optimum de la phosphatase en présence de Triton X-100.

Composant	Volume par test (µl)	Concentration finale (mM)
Substrat 8 Mm	20	0,8
Triton X-100 à 2%	10	0,1%
Eau distillée	100	
Volume par test	130 (mixture)	
Volume de Tampon 200 Mm	50	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

A 130 µl de prémixture, nous avons ajouté 100 µl de tampon pour les différentes valeurs de pH détaillées ci-dessous et 20 µl d'enzyme :

- Tampon citrate 200 mM pH 3,45
- Tampon acétate 200 mM pH 4,5
- Tampon acétate 200 mM pH 5
- Tampon Tris 200 mM pH 6
- Tampon Tris 200 mM pH 7,4*
- Tampon Tris 200 mM pH 8
- Tampon glycine 200 mM pH 9,6

La composition des tests pour l'évaluation du K_m de la phosphatase (en présence de Triton X-100) est décrite dans le tableau II.10.

Tableau II.10. Composition des tests pour l'évaluation du K_m la phosphatase (en présence de Triton X-100).

Composant	Volume par test (μ l)	Concentration finale (mM)
Tampon acétate 0,2M	50	50
Triton X-100 à 2%	10	0,1 %
Eau distillée	100	
Volume par test	160 (prémixture)	
Volume de substrat	20	
Volume d'enzyme	20	
Volume final	200	

2.3.4 MESURE DE L'ACTIVITÉ DE L'HYALURONIDASE (GASINGIRWA ET AL , 2010)

L'activité de l'hyaluronidase est mesurée par zymographie à l'acide hyaluronique.

En résumé l'échantillon à analyser est ajouté au tampon de charge (250 mM Tris/HCl, pH 6,8 contenant 4% poids/poids de SDS, 20 % v/v de glycérol et 0,01% de Bleu de Bromophénol). Les protéines sont séparées par SDS PAGE (gels à 10% de polyacrylamide auxquels on ajoute 0,17 mg/ml d'acide hyaluronique provenant de cordon ombilical humain (Sigma- Aldrich) sur la glace) et à 200 mA sous un voltage constant de 80V. Après l'électrophorèse les gels sont rincés à l'eau distillée et incubés durant 2 heures dans une solution de Triton X-100 à 3% sur un plateau oscillant. Les gels sont ensuite équilibrés en présence du tampon de mesure (formate 100 mM, pH 3,7 contenant du NaCl 150 mM) et incubés durant 20 heures à 37 °C. Après l'incubation, le gel est lavé à l'eau distillée et incubé durant 2 heures à 39°C dans un milieu contenant du Tris/HCl 20 mM et 0,1 mg/ml de solution de pronase (Sigma- Aldrich) en vue d'éliminer les bandes de protéines interférentes. Le gel est ensuite rincé dans l'eau distillée et équilibré dans la formamide aqueuse à 50% pendant 30 min sous agitation douce. Enfin le gel est coloré au moyen de Stains-All (Sigma- Aldrich) dissous dans la formamide aqueuse à 50% pour une durée de 3 jours au moins et à l'obscurité. Ensuite les gels sont rincés dans l'eau et photographiés sur un transilluminateur au moyen d'un appareil photo digital.

2.4 RECUPERATION, PURIFICATION

On calcule la récupération en(%) en additionnant les activités enzymatiques de E + N d'une part et de N+ MLP+S d'autre part. La récupération est égale au rapport de N+ MLP+ S et E+N. Des résultats valables doivent se situer entre 80% et 110 %.

L'ASR (Activité Spécifique Relative) est le rapport de l'AS (Activité spécifique) d'une enzyme dans une fraction et de l'AS de l'homogénat. Si cette valeur est supérieure à 1, elle donne une idée de la purification de l'enzyme.

3 ETUDE CINETIQUE DE L'ACTIVITE DE QUELQUES HYDROLASES PRESENTES CHEZ L'ABEILLE

3.1 HOMOGÉNÉISATION DES LARVES, PUPES ET ADULTES

Les échantillons de larves, pupes et d'adultes d'abeilles ont été pesés et homogénéisés à froid dans une quantité connue de saccharose isotonique 0,25 M au moyen d'un homogénéiseur de Potter. L'homogénat a été ensuite fractionné par centrifugations successives à vitesses croissantes, les fractions N, MLP et S ont été ainsi obtenues.

Les homogénats de larves et d'adultes d'abeilles ainsi que les différentes fractions ainsi obtenues à partir de larves ont été examinés au microscope à contraste de phase (Leica DM IL LED). Les homogénats ont été en majorité constitués de petits organites libérés lors de l'homogénéisation et se présentant sous forme de points noirs. Les points blancs nettement visibles dans les fractions S, N et l'homogénat de larves sont vraisemblablement des globules de graisse. Quelques cellules et gros débris ayant échappé à l'homogénéisation sont visibles sur le champ photographié. Les homogénats se présentent bien homogènes, sans agglutination (Figure III.1).

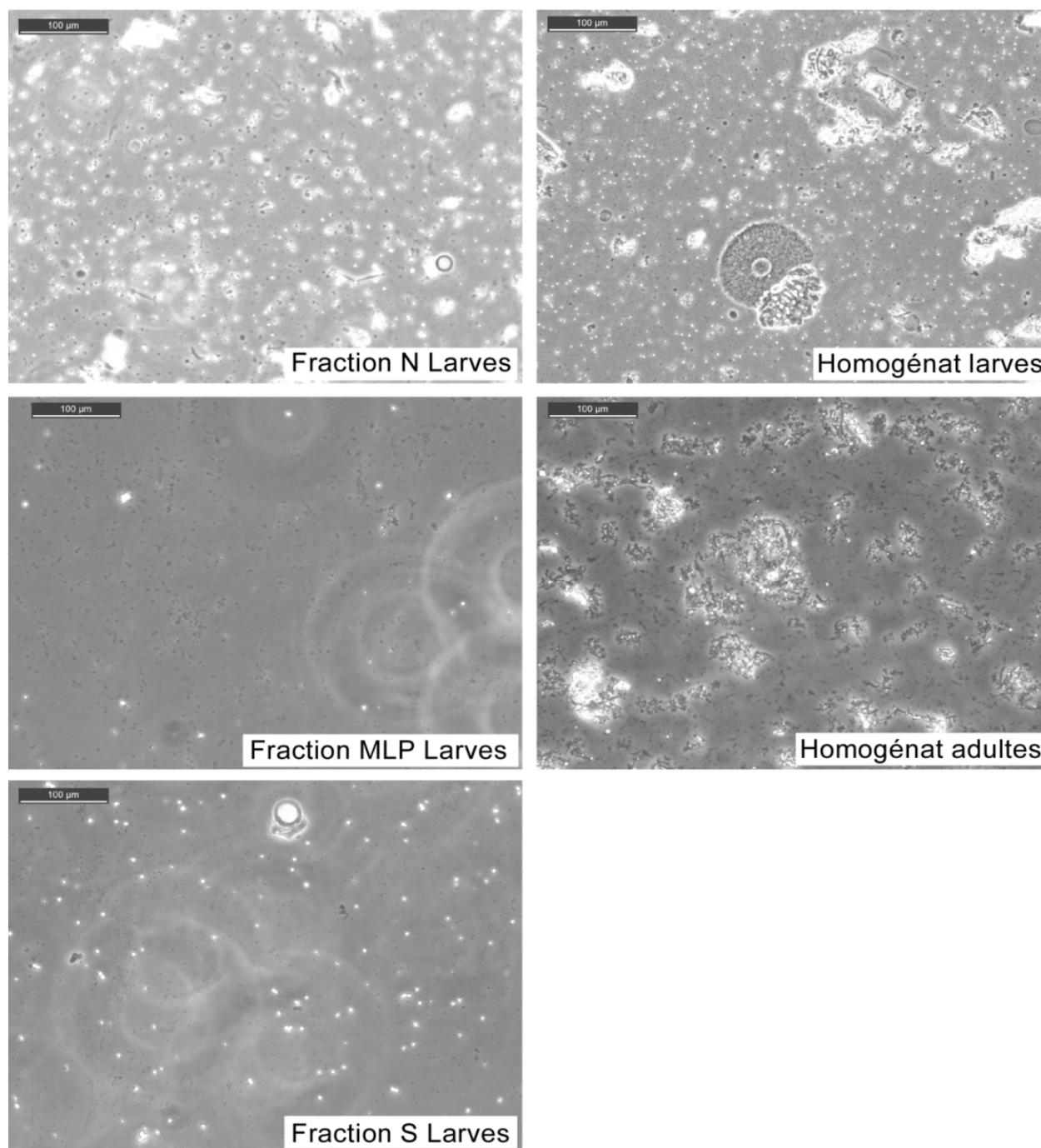


Figure III.1. Vue en contraste de phase des homogénats de larves et adultes *Apis mellifera* L. et des fractions N, MLP et S de larves.

3.2 ACTIVITÉS DE DIFFÉRENTES HYDROLASES DES HOMOGÉNATS DE LARVES, DE PUPES ET D'ADULTES RÉCOLTÉES À BUKAVU (R.D.C) ET DE VENIN D' *APIS MELLIFERA* L. LYOPHILISÉ (SIGMA)

La figure III.2. donne les activités spécifiques en nanomoles de produit formé par minute par mg de protéines des hydrolases lysosomiales mesurées à différents stades de développement de l'abeille et dans le venin.

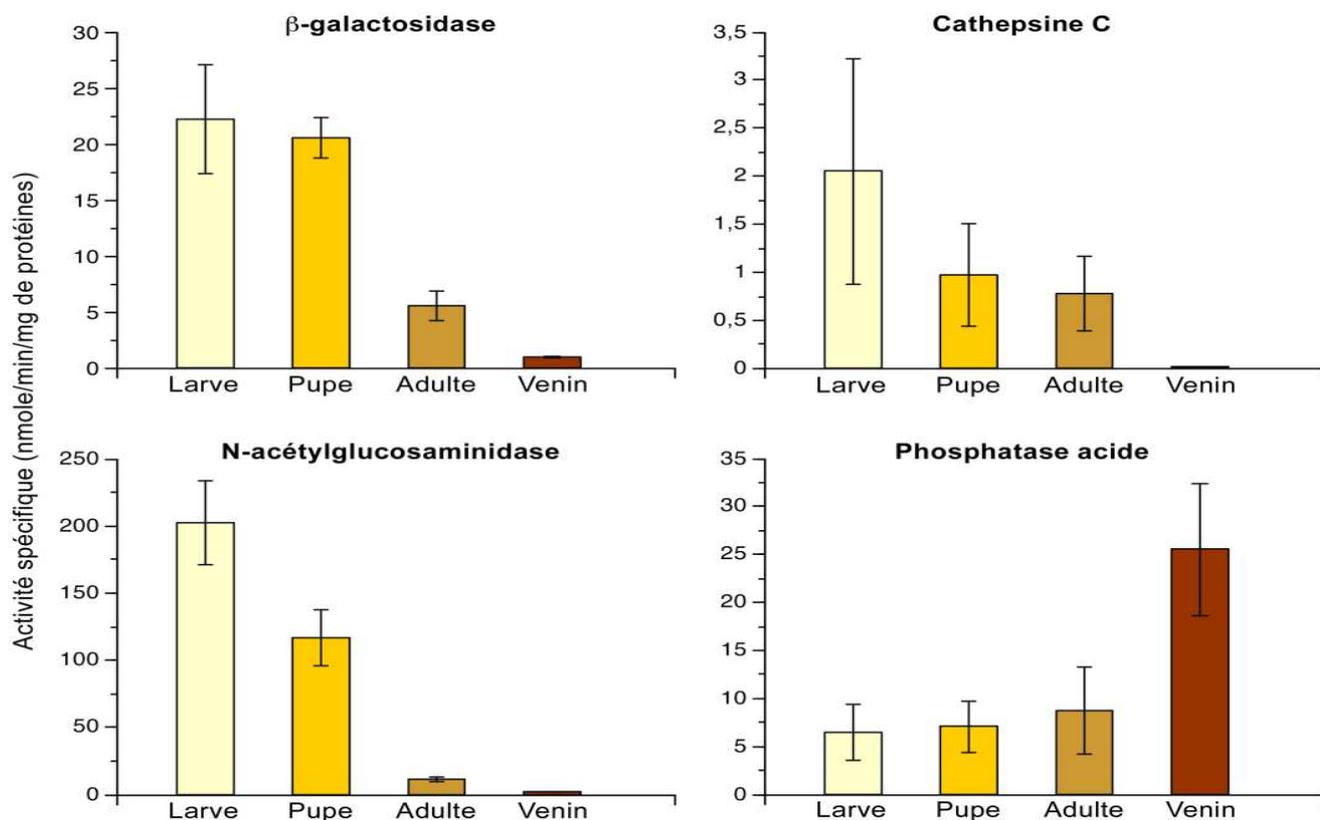


Figure III.2. Activités spécifiques de la β -galactosidase, de la cathepsine C, de la N-acétyl glucosaminidase et de la phosphatase acide chez les larves, pupes, adultes et du venin d'*Apis mellifera* L récoltées

De ces analyses nous avons pu tirer les constats suivants :

Pour le venin (V3375 Sigma Aldrich), Il existe une forte activité spécifique de la phosphatase acide par rapport aux tissus de larves, de pupes et d'adultes. la phosphatase acide du venin présente un optimum d'activité à pH acide et pourrait donc être d'origine lysosomiale. Proviendrait-elle de la glande vénéripare acide ? Quelle est la constitution de cette glande ?

Nous avons remarqué une activité spécifique relativement faible de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase, mais pratiquement nulle de la cathepsine C dans le venin.

Pour les larves, pupes et adultes d'abeilles : dans les tissus de larves et pupes, on observe une activité spécifique plus élevée que chez l'adulte de la β galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase, de la phosphatase et de la cathepsine C. A ces stades les tissus sont en plein remaniement et métamorphose, subissant de nombreuses modifications qui doivent impliquer les lysosomes dans leurs phénomènes d'autophagie. Ces activités enzymatiques diminuent donc avec l'avancement du stade de développement, avec l'âge des abeilles

La présence d'hyaluronidase a été mise en évidence dans le venin d'abeille par zymographie et électrophorèse sur gel d'acrylamide (Figure III.3.), cette enzyme très active révèle un poids moléculaire d'environ 37 kDa. Les étalons de poids moléculaire sur la piste de gauche sont de 50, 75 et 100kDa.



Figure III.3. Révélation par zymographie de la présence d'hyaluronidase1 dans le venin d'abeille.

L'hyaluronidase, avec la phosphatase acide, est un des principaux allergènes protéiques du venin d'abeille. Cette enzyme agit sur l'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire et est un des composés majeurs des tissus conjonctifs, nerveux et épithéliaux.

3.3 DISTRIBUTION DES HYDROLASES APRÈS CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

La fraction N est principalement constituée de noyaux, à coefficient de sédimentation relativement élevé. La fraction MLP contient les organites de dimension moindre : mitochondries, lysosomes, peroxysomes, réticulum endoplasmique et Golgi, qui se manifestent par de petits points noirs. La fraction S, surnageant final, contient aussi de très petits fragments mais surtout de gros globules blancs, probablement constitués de lipides.

La figure III.4. donne le Profils de distribution (en %) de la β -galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase après centrifugation différentielle d'homogénats de larves, de pupes et d'adultes *Apis mellifera* L.

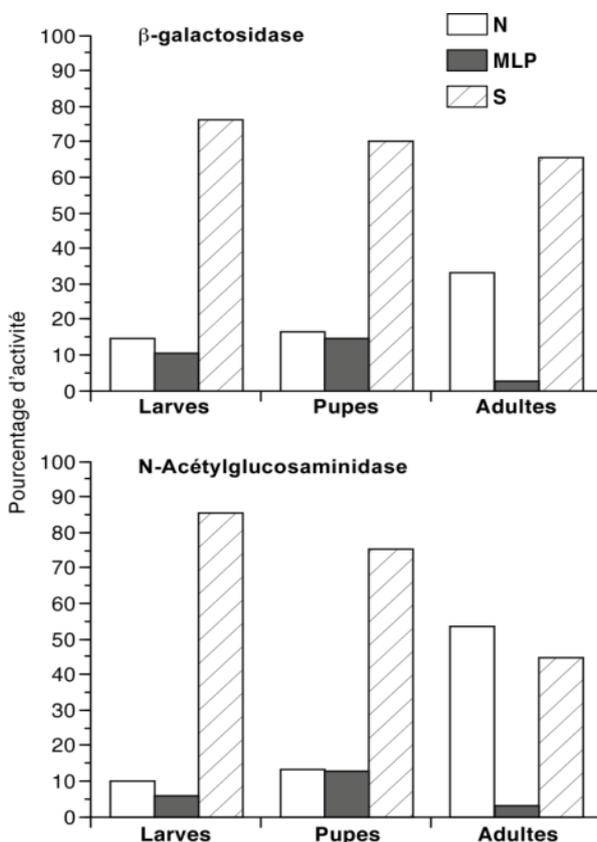


Figure III.4. Profils de distribution (en %) de la β -galactosidase et de la N-Acétyleglucosaminidase, dans les fractions N, MLP et S obtenues à partir de larves, pupes et adultes

Dans les conditions d'homogénéisation utilisées, le pourcentage le plus important d'enzymes lysosomiales se retrouve dans les fractions N et S. Ceci prouve que l'homogénéisation a été insuffisante pour rompre totalement les membranes cellulaires.

Dans tous les cas, environ 70 % si non plus des activités de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase se retrouvent dans le surnageant final chez les larves et les pupes. Chez les adultes un pourcentage élevé de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase se retrouve dans la fraction N. Ce qui s'expliquerait par le caractère non homogène de l'homogénat observé chez les adultes et du fait d'une homogénéisation plus difficile.

Chez les larves et les pupes, la fraction MLP contient 14,2 et 12,3 % de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase. Ce qui pourrait peut-être révéler une présence d'organites contenant ces enzymes, éventuellement des lysosomes.

3.4 ACTIVITÉS LIBRES ET TOTALES

Le rapport entre activité libre et activité totale de la β -galactosidase chez les larves, pupes et adultes d'abeille se présente dans la Figure III.5.

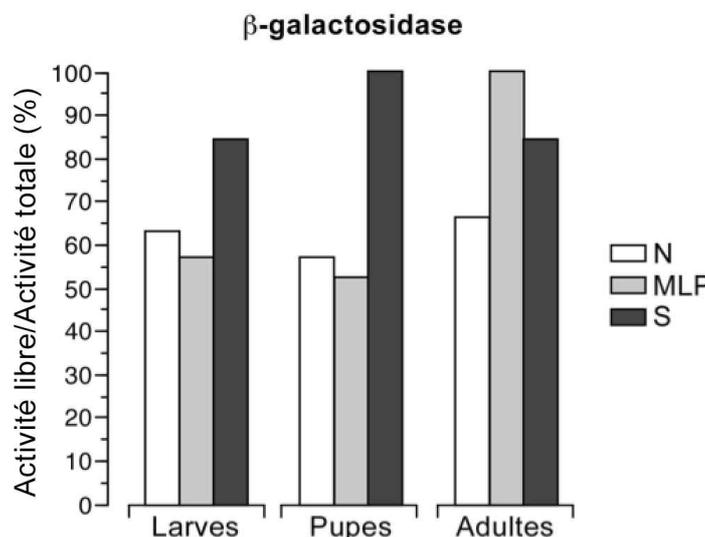


Figure III.5. Rapport des activités libre / totale de la β -galactosidase en % dans les différentes fractions provenant d'homogénats de larves, pupes et adultes d'*Apis mellifera* L.

Ce rapport a été très élevé dans la fraction S, équivalent à 84% chez les larves et adultes et à 100% chez les pupes.

Dans la fraction N, il a varié de 57 à 66% pour les 3 stades de développement.

Dans la fraction MLP, ce rapport entre l'activité libre et totale a été de l'ordre de 50% chez les larves et pupes mais égal à 100% chez les adultes.

Chez les larves et les pupes, un rapport activité libre / activité totale de 50 % signifie que la moitié de l'activité enzymatique est masquée en milieu isotonique et en absence de détergent. Nous pourrions interpréter cette latence relative par l'existence d'un organite abritant l'enzyme. La membrane de l'organite empêche ainsi tout contact entre l'enzyme et son substrat. Cet organite pourrait être un lysosome. En effet, la mesure de la β -galactosidase se fait en milieu acide.

Chez l'adulte l'activité libre est égale à l'activité totale, en d'autres termes le rapport activité libre/activité totale est égal à 100 %, parce que cela peut s'expliquer parce que :

- 1- il n'existerait pas de lysosome chez l'adulte.
- 2- les conditions d'homogénéisation seraient trop drastiques, cette dernière hypothèse étant la plus plausible.

Les résultats obtenus à ce jour constituent une première étape importante dans la mise en évidence, par des méthodes biochimiques quantitatives, des lysosomes actifs chez les larves et pupes d'abeilles. Cette étude laisse entrevoir la nécessité d'une mise au point des conditions optimales d'homogénéisation afin de préserver l'intégrité des membranes des organites subcellulaires, en général, et des lysosomes en particulier.

3.5 ETUDE CINÉTIQUE DES ENZYMES CHEZ LES LARVES, PUPES ET ADULTES D'*APIS MELLIFERA* L.

Une étude de la cinétique de la β -galactosidase, la N-acétylglucosaminidase et la phosphatase acide est présentée chez les larves, les pupes et les adultes d'*Apis mellifera* récoltées dans la région namurois. Les activités des enzymes β -galactosidase et N-acétylglucosaminidase sont reprises dans la Figure III.6.

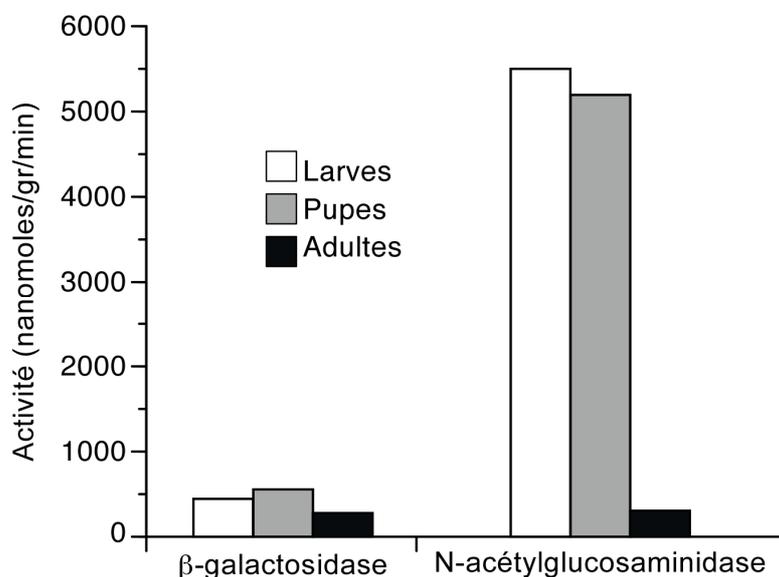


Figure III.6. Activités (en nmoles/g/min) de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase présentes dans les homogénats de larves, depupes et adultes d'*Apis mellifera* L. récoltés dans la région namuroise.

Il apparaît que l'activité de la N-acétylglucosaminidase est très élevée chez les larves et pupes d'abeilles par rapport à l'activité de la β -galactosidase.

3.5.1 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR LES ACTIVITÉS DE LA β -GALACTOSIDASE, DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ET DE LA PHOSPHATASE ACIDE CHEZ LES LARVES, PUPES ET ADULTES.

La loi de Michaelis-Menten a été strictement vérifiée car en effet, la vitesse est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu d'incubation (Figure III.7.)

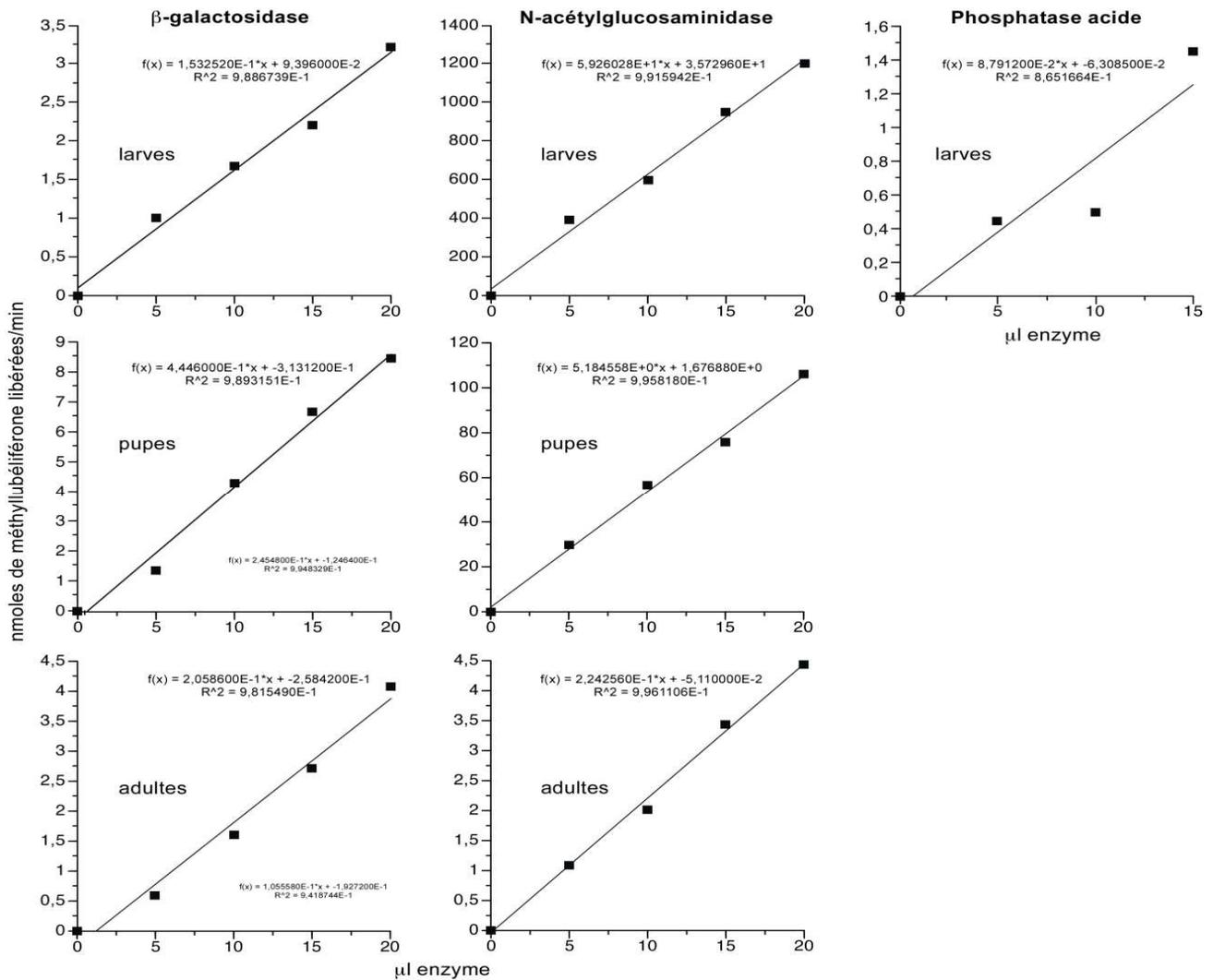


Figure III.7. Influence et la concentration en enzymes sur les activités (en nmoles/min) de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide présentes dans les homogénats de larves, de pupes et adultes d'Apis mellifera L.

Les activités de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide au niveau des adultes, des pupes et des larves dépendent fortement de la concentration en enzyme au vu des coefficients de corrélation très élevés. Une durée d'incubation longue de 2h n'altère en rien l'activité de ces enzymes.

3.5.2 INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION SUR LES ACTIVITÉS DE LA β- GALACTOSIDASE, DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ET DE LA PHOSPHATASE ACIDE CHEZ LES LARVES PUPES ET ADULTES

La figure III.8. indique l'influence du temps d'incubation sur les activités de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide chez les larves pupes et adultes.

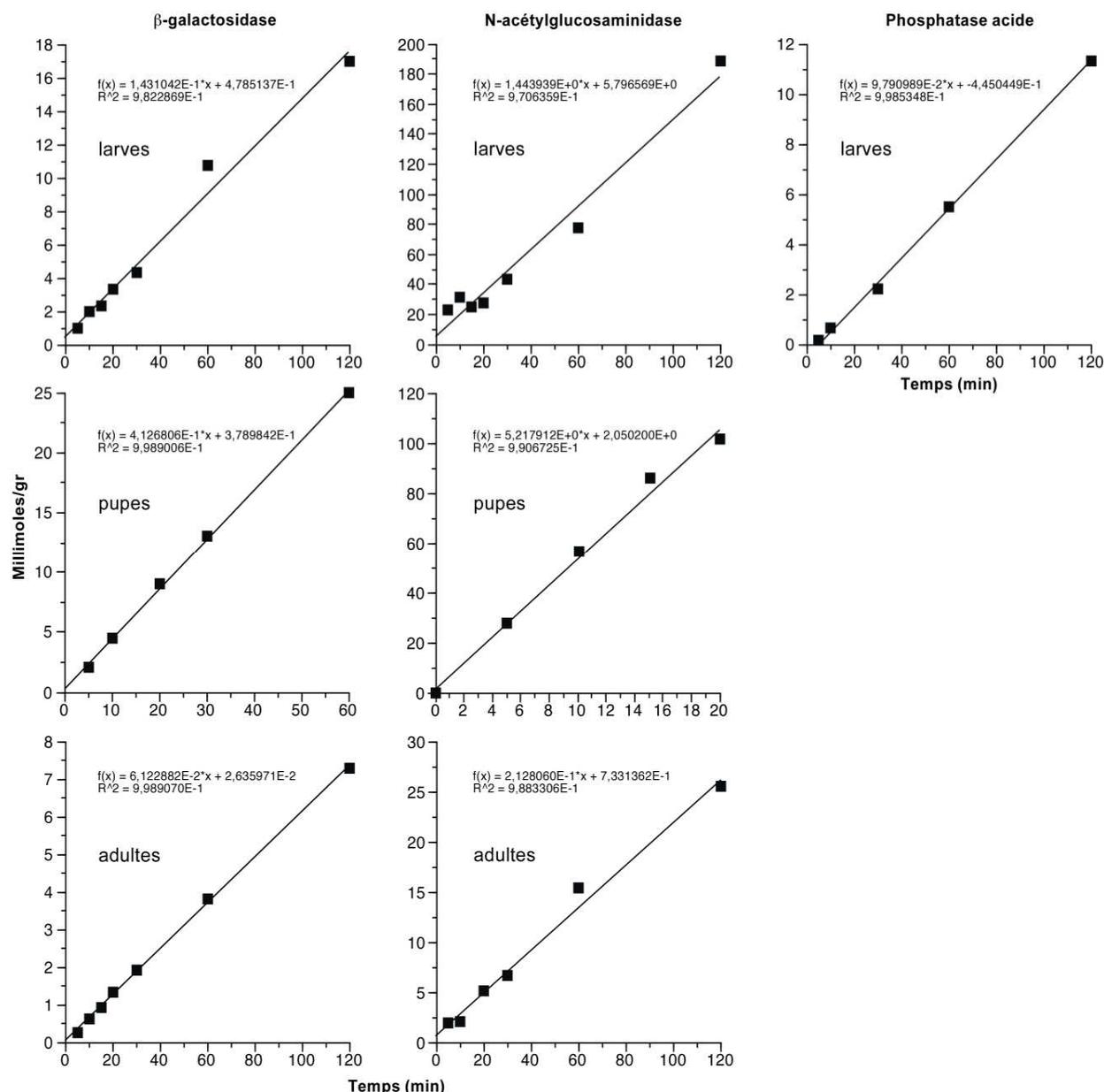


Figure III.8. Influence du temps d'incubation sur les activités (en millimoles/g) de la β -galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide présentes dans les homogénats de larves, de pupes et adultes d'*Apis mellifera* L

Les activités de la β -galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide au niveau des adultes, des pupes et des larves dépendent fortement du temps d'incubation au vue de leurs coefficients de corrélation très élevés, une durée d'incubation longue de 2 heures n'altère en rien l'activité de ces enzymes.

3.5.3 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LES ACTIVITÉS DE LA β -GALACTOSIDASE ET DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE CHEZ LES LARVES, PUPES ET ADULTES

Nos résultats ont montré que les Q 10 calculés pour la β -galactosidase, la N-acétylglucosaminidase et la phosphatase acide chez les larves, pupes, et adultes sont tous proches de 2 (Figure III.10.), après une incubation à 27 et 30° C.

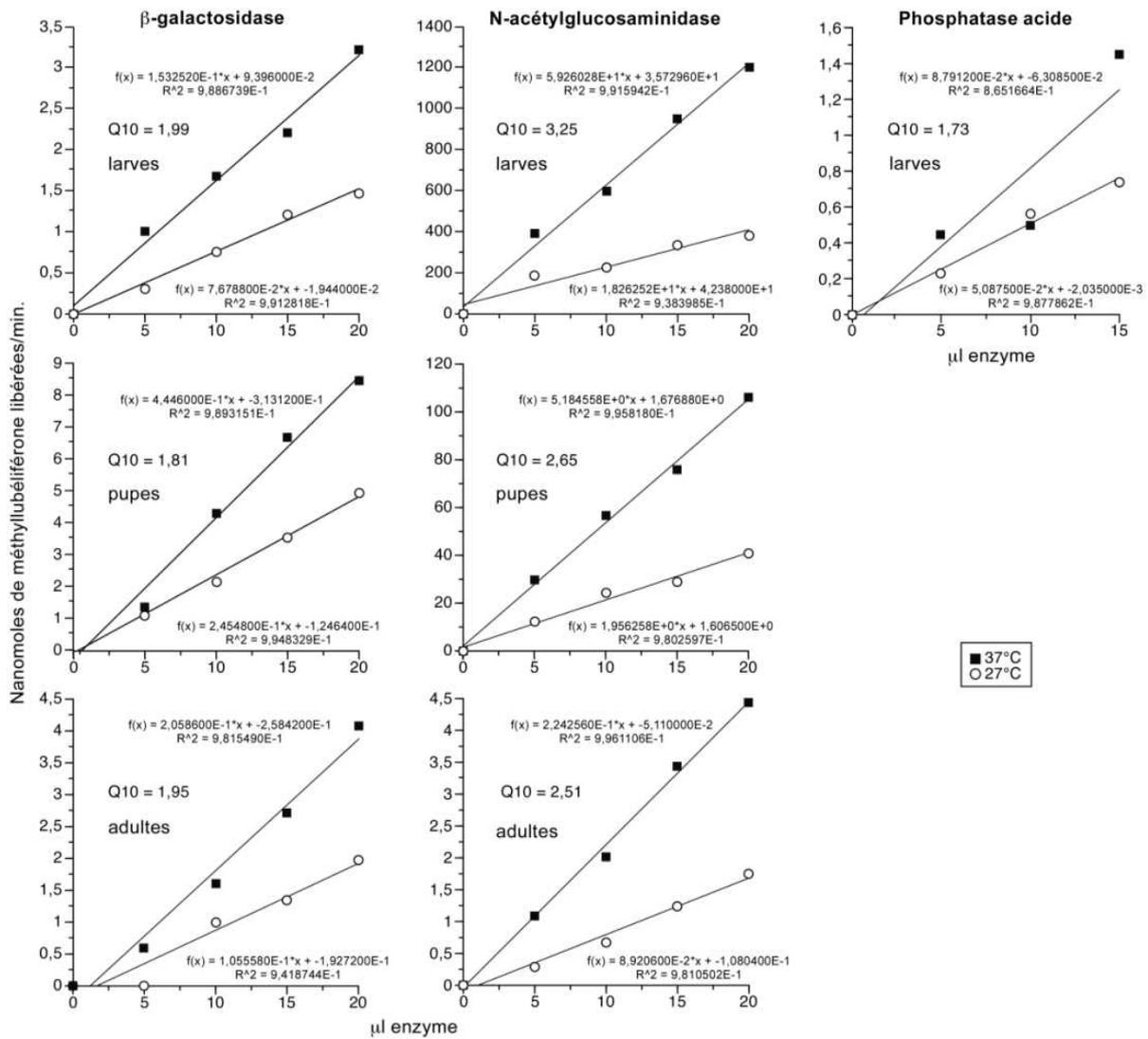


Figure III.10. Influence de la température sur les activités (en nmoles/min) de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide présentes dans les homogénats de larves, de pupes et adultes d'Apis mellifera L.

3.5.4 INFLUENCE DU PH SUR LES ACTIVITÉS DE LA β-GALACTOSIDASE, DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE ET DE LA PHOSPHATASE ACIDE CHEZ LES LARVES PUPES ET ADULTES.

L'activité de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide a été testée à différents pH répartis entre 2 et 10 (Figure III.11.).

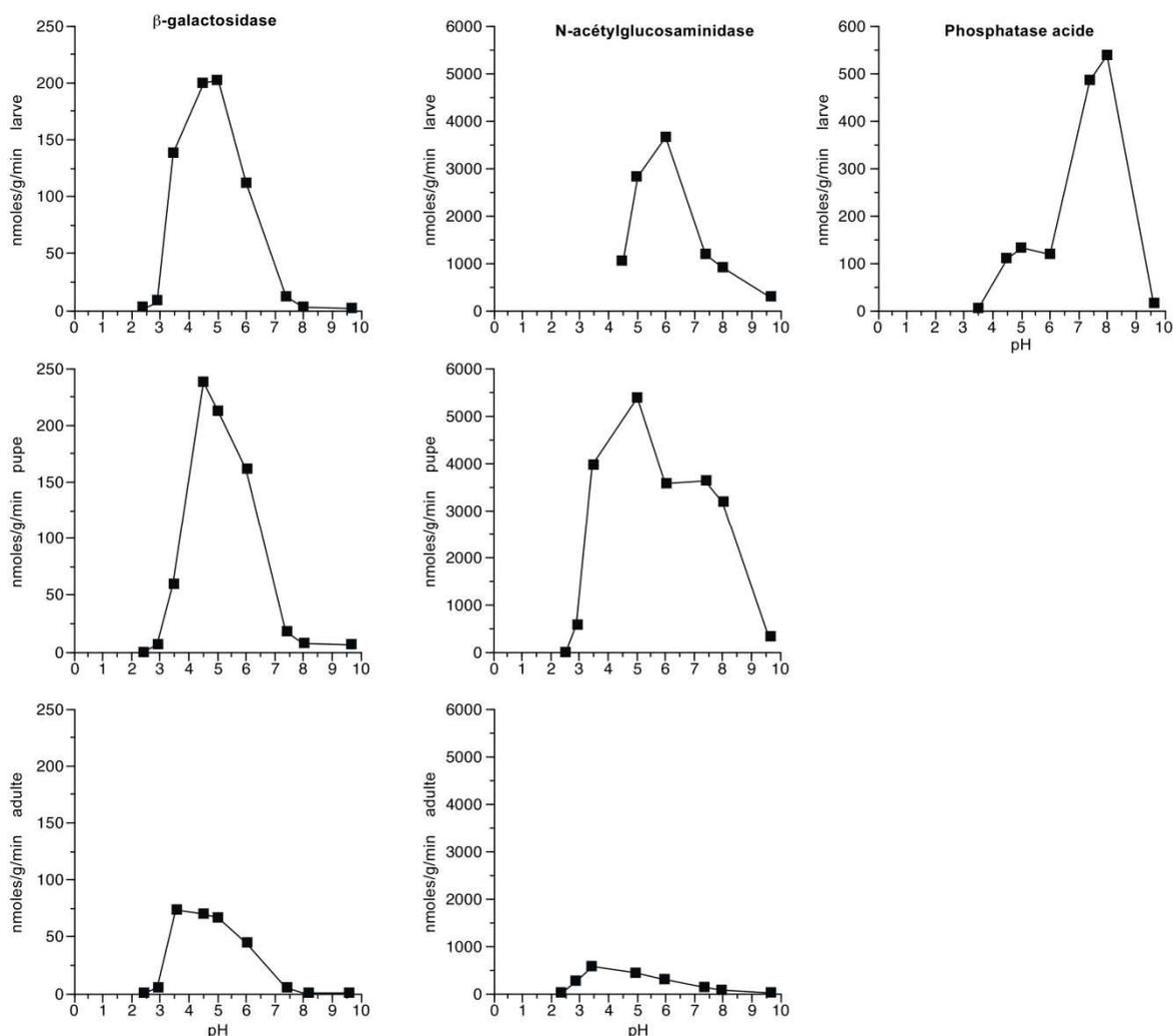


Figure III.11. Influence du pH sur les activités (en nmoles/g/min) de la β-galactosidase, de la N-acétylglucosaminidase et de la phosphatase acide présentes dans les homogénats de larves, de pupes et adultes d'*Apis mellifera* L.

Cette figure montre que, tant pour les larves que les pupes et les adultes que pour la β-galactosidase, le pH optimum est autour de 5. Pour la N-acétylglucosaminidase, les résultats sont moins nets. L'enzyme larvaire est la plus active à pH 6, celle des pupes à pH 5 avec cependant un épaulement vers pH 8. En ce qui concerne l'adulte, l'activité de cette enzyme est tellement faible qu'il est malaisé d'en tirer une conclusion. La phosphatase acide de la larve a un comportement bimodal : une faible activité à pH acide et un maximum d'activité à pH 8.

Nous pouvons donc en déduire que probablement il existe une β-galactosidase et une N-acétylglucosaminidase de nature lysosomiale chez la larve et chez la pupa

3.5.5 DÉTERMINATION DU K_M DE LA β-GALACTOSIDASE ET DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE CHEZ LES LARVES PUPES ET ADULTES D'*APIS MELLIFERA* L. RÉCOLTÉES DANS LA RÉGION NAMUROISE.

Une grande affinité de la β-galactosidase a été détectée au niveau des larves, des pupes et des adultes. Il en est de même pour la N-acétylglucosaminidase chez les pupes et adultes mais cette affinité a été moindre chez les larves.

La phosphatase acide (figure III.12.), présente une affinité très élevée pour son substrat, le méthylumbelliférylphosphate.

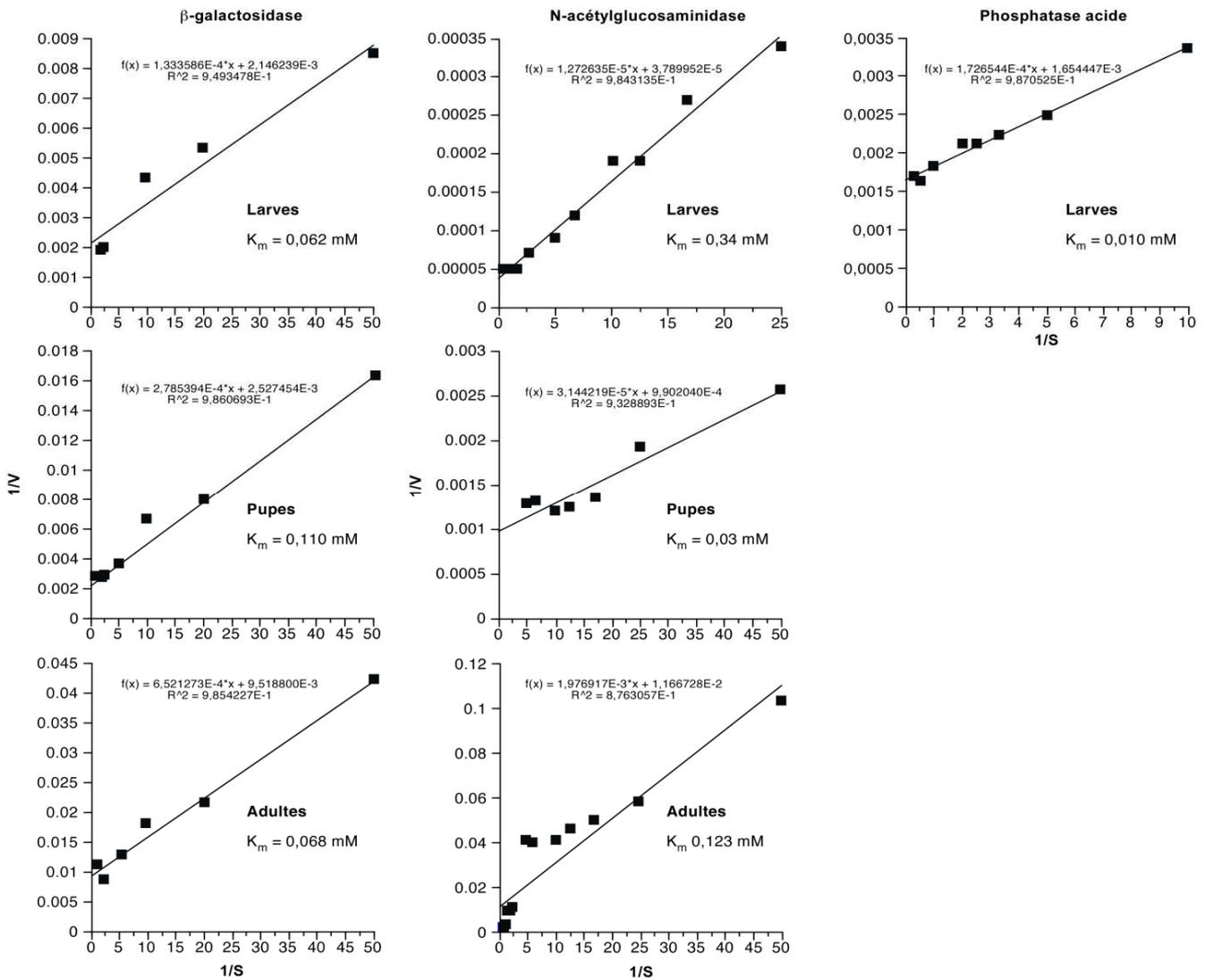


Figure III.12. Détermination du K_m de la β -galactosidase, de la N-acétyl glucosaminidase, et de la phosphatase acide présentes dans les homogénats de larves, de pupes et adultes d'*Apis mellifera* L.

4 DISCUSSION

4.1 CINÉTIQUE DES ENZYMES LYSOSOMALES

Dans le cadre d'une activité hydrolytique lysosomiale impliquant la β -galactosidase, la N- acétylglucosaminidase, et la phosphatase acide à tous les stades de développement de l'abeille, l'activité enzymatique fait donc l'objet de plusieurs études chez l'*Apis mellifera* L.

La figure III.7 établit une relation linéaire entre la quantité d'enzyme et la vitesse de la réaction pour la β -galactosidase (larves, pupes, adultes), la N-acétylglucosaminidase (larves, pupes, adultes), la phosphatase (larves).

La figure III.8. montre que la vitesse de la réaction reste constante au cours du temps même après une incubation de 120 min. Cela signifie que la β -galactosidase et la N- acétylglucosaminidase sont stables dans ces conditions et que la concentration en substrat est suffisante pour permettre une réaction d'ordre 0 indépendante de la concentration en substrat.

La figure III.12. nous a permis de calculer le K_m pour la β -galactosidase, la N-acétylglucosaminidase et la phosphatase acide par la méthode de Lineweaver-Burk.

L'affinité de la β -galactosidase est élevée (K_m faible) pour le substrat utilisé (*p*-méthylumbellyféryl- β -D-galactopyranoside) aussi bien pour l'enzyme présent chez les larves, que chez les pupes et adultes. Il s'agit donc très probablement de la même enzyme dans les 3 cas. Une affinité élevée se traduit par un facteur influençant favorablement la vitesse de la réaction.

La N-acétylglucosaminidase présente aussi une affinité élevée (K_m faible) chez les pupes et les adultes, ce qui est un facteur qui influence de façon positive la vitesse de la réaction. La valeur du K_m pour la N-acétylglucosaminidase que l'on note chez les larves est plus élevée.

Ces deux enzymes lysosomiales ont une forte affinité pour leurs substrats naturels, le lactose pour la β -galactosidase et les glycosides pour la N-acétylglucosaminidase et semblent être impliquées dans les mécanismes de croissance et de développement de l'abeille mais leur rôle précis reste à élucider.

L'unique donnée de K_m pour la phosphatase que nous avons déterminée chez les larves va dans le même sens : affinité élevée, facteur favorable pour augmenter la vitesse de la réaction.

Nous avons constaté que les valeurs de Q10 sont effectivement toutes très proches de 2, à l'exception de la valeur de 3,25 (N-acétylglucosaminidase- larves). En effet, en corollaire, une diminution de température ralentira les vitesses de réaction des enzymes étudiées mais aussi de toutes les réactions enzymatiques contrôlant le métabolisme de l'organisme.

En valeur absolue, les activités spécifiques de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase présentes dans les larves et les pupes sont élevées par rapport à celles existant chez les adultes et dans le venin.

Les activités spécifiques respectives de ces 3 enzymes sont du même ordre chez les larves, pupes et adultes.

L'activité spécifique de la phosphatase est du même ordre chez les larves, pupes et adultes. Par contre, elle est beaucoup plus élevée dans le venin d'abeille.

BOUSQUET *et al.* (1979) ont également trouvé que l'activité de la phosphatase acide était plus élevée dans le venin que dans tout le corps de l'abeille. Nos résultats ont montré que la β -galactosidase et la N-acétylglucosaminidase sont donc très actives au niveau des larves et pupes d'abeilles. Ce qui est à mettre en corrélation avec le processus de métamorphose extrêmement marqué à ces stades de larve et de pupa (HOLTZMANN, 1989 ; SCHEIB-PFLEGER & WATTIAUX, 1962).

ZOLTOWSKA *et al.* (2007 b) étudiant l'activité des hydrolases chez le faux bourdon d'*Apis mellifera* L. a constaté un changement d'activité enzymatique au cours de l'ontogenèse des larves et un accroissement d'activité journalière qui passait de 10 à 20 nmoles/mg de protéines.

Au stade de pupa de 20 à 30 nmoles/mg de protéines, tombant ensuite à 10 nmoles/mg de protéines chez les adultes. D'autres hydrolases, comme l' α -galactosidase et la β -glucuronidase changent également d'activités au cours des différentes phases de développement de l'abeille (ZOLTOWSKA *et al.*, 2011). Ce polymorphisme de la dipeptidyl-aminopeptidase a été étudié par LAMA *et al.* (2004) qui ont trouvé une plus grande activité de l'enzyme chez les pupes que chez les adultes. FRANZEC *et al.* (2009) ont trouvé qu'une forte activité de la β -galactosidase peut être induite par une infestation de l'abeille par des parasites tel le *Varroa destructor*, l'activité enzymatique dans l'hémolymphe augmentant et atteignant celle du parasite (40 nmoles/min/g de protéines avec un pH optimum égal à 5,4).

Dans le venin nous avons surtout retrouvé une activité très élevée de la phosphatase acide, nos mesures étant faites dans un milieu à pH 5. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature (BARBONI *et al.*, 1987). Cette protéine est d'ailleurs un allergène important.

Dans le venin coexiste une autre enzyme de 37 kDa, l'hyaluronidase. KEMENY *et al.* (1984) ont pour cette enzyme déterminé un poids moléculaire de 35-37 kDa par filtration sur gel mais de 41 kDa par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

La distribution après centrifugation différentielle a montré que, dans les conditions d'homogénéisation utilisées une proportion faible ($\pm 10\%$) mais significative de β -galactosidase et N-acétylglucosaminidase est sédimentable dans la fraction MLP. Ce qui met en lumière le fait que ces 2 enzymes ne soient pas sous la forme de molécules libres après homogénéisation mais plutôt encloses par une membrane, c'est-à-dire dans un organite, lequel sédimente dans les conditions de centrifugation utilisées. La nature de cet organite sera précisée par des expériences ultérieures.

Chez les larves et les pupes, environ 50% de la β -galactosidase associée à un organite se retrouverait à l'état libre donc ayant accès à son substrat. L'autre moitié latente et cachée n'a pas d'accès à son substrat car isolée par une membrane et se trouvant donc dans un organite.

Le pH optimum d'activité de la β -galactosidase (Figure III.18.) chez les larves, pupes et adultes se situe en moyenne autour de pH 4,5. Pour la N-acétylglucosaminidase, ce pH est centré autour de pH 4 chez les pupes et les adultes. Pour les larves d'abeilles le pH optimum semble plus élevé tendant vers 6. La phosphatase acide chez les larves a semblé être d'une activité double. Deux pics d'activité sont visibles, l'un à pH 5 et l'autre à pH 8,5. Ce qui signifierait la présence d'une phosphatase acide peu active et d'une phosphatase alcaline 4 à 5 fois plus importante.

RISEH *et al.* (2012), ont observé une activité maximale de β -galactosidase au pH 4 dans l'hémolymphe du charançon du Palmier en Iran, une des rares références à ce sujet.

En bref, nos résultats montrent une activité très importante de la β -galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase chez les larves et les pupes d'abeilles. Une petite partie de ces activités, dans nos conditions expérimentales, est sédimentable et latente. Ces enzymes agissent préférentiellement à pH acide. Ces résultats nous ont permis d'avancer que les larves et pupes contiennent des lysosomes où sont localisés les deux enzymes précitées, et sans doute d'autres encore. Ce résultat est important et constitue un point de départ intéressant pour une mise en évidence claire et nette de lysosomes aux différents stades larvaires et pupes de l'abeille.

5 CONCLUSION

Il est maintenant admis que les abeilles pollinisatrices sont en déclin dans toutes les régions du monde, Bukavu et ses environs n'étant pas épargné. Les causes en sont multiples. Vu l'ampleur de ce problème qui pourrait entraîner des catastrophes pour l'alimentation comme pour l'équilibre de la plupart des milieux ruraux, il est encore temps de mobiliser les scientifiques pour mener des études de grande envergure pour sauver l'abeille et l'apiculture. Cela passe par la maîtrise de sa biologie, de sa physiologie et la rentabilisation de l'apiculture. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés au polymorphisme enzymatique d'*Apis mellifera* L. et à la composition en nutriments de ses larves.

L'analyse du polymorphisme enzymatique ou de l'évolution des activités des enzymes s'est donc avérée très informative ; le polymorphisme d'enzymes lysosomiales β -galactosidase et N-acétylglucosaminidase a été établi en tenant compte de la variation de leurs activités spécifiques au cours des 3 stades de développement de l'abeille : le stade larvaire, le stade de pupa et le stade adulte ou imago.

L'activité enzymatique de ces deux glycosidases décroît du stade larvaire au stade adulte. Ce qui fait penser qu'elles pourraient intervenir dans les phénomènes de croissance et de métamorphose chez l'abeille. Cette activité est d'ailleurs fort réduite au stade adulte. L'activité de la N-acétylglucosaminidase est très élevée, environ dix fois plus élevée que celle de la β -galactosidase.

Les activités de ces enzymes suivent la loi de Michaelis-Menten, car elles sont positivement linéaires en fonction de la concentration en enzyme mais aussi du temps d'incubation et de la concentration en substrat. La température influence leurs activités respectives selon la Loi d'Arrhenius avec le Q10 avoisinant une valeur de 2.

Les activités enzymatiques de la phosphatase acide sont faibles comparativement aux deux glycosidases précitées aux 3 stades de développement de *Apis mellifera* L. La phosphatase acide a été par contre très active au niveau du venin (25,32 nmoles/min/g de protéines), une activité environ 20 fois supérieure à celle de la β -galactosidase, et de la N-acétylglucosaminidase.

Une autre enzyme identifiée dans le venin de l'abeille est l'Hyaluronidase avec un poids moléculaire de 37 kDa. Sa mise en évidence est laborieuse et n'est pas quantitative.

La β -galactosidase et la N-acétylglucosaminidase des larves et pupes affichent toutes les caractéristiques d'enzymes lysosomiales. Une partie de leur activité est sédimentable dans les conditions expérimentales utilisées. Ces enzymes présentent la propriété de latence laquelle est annulée sous l'effet de détergents. Elles ont une activité maximale à pH acide compris entre 4 et 5. Nos résultats, fort intéressants requièrent cependant confirmation par une étude plus fouillée.

L'activité de ces enzymes ainsi décrite pourrait servir comme contrôle de l'état de la colonie et être comparée à celle de larves d'abeilles dans le cas d'infestation par les parasites ou d'intoxication par les pesticides. La question qui se pose est de savoir si les enzymes lysosomiales engagées dans les processus de métamorphose et dans l'apoptose (MACKOWIAK, 2009) sont ou non la cible d'insecticides et autres composés toxiques utilisés couramment dans l'agriculture. Est-ce là une des causes de la disparition des abeilles ?

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les autorités de l'ISP (Institut Supérieur Pédagogique, Bukavu- RDC) et le Fonds Adrien Bauchau de l'Université Namur, Belgique pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- [1] BARBONI E., KEMENI D.M., CAMPOS S., VERNON C.A. 1987. The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*). *Toxicon* 25(10) :1097-103.
- [2] BOUSQUET J., MARTY J.P., CLAUSS C., MICHEL F.B. 1979. Enzymes of bee venom, sac and whole body. *Ann.Allergy* 43 (2):110-4.
- [3] CAMPBELL, N. A. & REECE, J. B. 2002. *Biology* 6th ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- [4] CRUZ C., ARAÚJO V., FIALHO M., SERRÃO J. NEVES C. 2013. Proliferation and cell death in the midgut of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) during metamorphosis. *Apidologie* 44:458-466.
- [5] de DUVE, 2000. Les lysosomes texte intégral. *La Recherche, Mensuel*, No 99.
- [6] de DUVE & WATTIAUX 1966. Fonctions de lysosomes. *Annu .rev.Physiol.* 28,435-492.
- [7] FRACZEK R., ZOLTOWSKA K., LIPINSKI Z. 2009. The activity of nineteen hydrolases in extracts from *Varroa destructor* in hemolymph of *Apis mellifera carnica* worker bees. *Journal of Apicultural science*, Vol.53 N° 1.
- [8] FRANK P., 1999. Approche génétique des questions évolutives associées à la sociobiologie et à la phylogéographie de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- [9] GASINGIRWA M. THIRION J., MERTENS – STRIJHAGEN J., WATTIAUX-DE-CONNINCK, FLAMION B, WATTIAUX R, JADOT M. Endocytosis of hyaluronidase -1 by the Liver *Biochem .J.* (2010)430, 305-313.
- [10] GONG HAIBIO, BIN ZHANG, GARRICK LITTLE, JOY KOVAR, HUAXIAN CHEN, WEN XIE, AMY SCHUTZ-GESCHWENDER, AND D.MICHAEL OLIVE 2009. b-Galactosidase activity assay using far-red-shifted fluorescent substrate DDAOG. *Analytical Biochemistry*, vol 386. 54-64.
- [11] HOLTZMAN E. 1989. *Lysosomes*. Plenum Press, New York.
- [12] KEMENY D.M., DACTON N., LAWRENCE A.J., PEARCE F.L., VERNON C.A. 1984. The purification and characterization of hyaluronidase from the venom of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Biochem.* 1,139(2):217-23.
- [13] LAFLECHE B., 1981. Les abeilles, Guide pratique de l'apiculture amateur. Solar Nature.
- [14] LAMA M., BORASHI D., SOARES A., DURAN X. 2004. Genetic characterization of a polymorphic dipeptidyl aminopeptidase of *Apis mellifera*. *Apidologie*.
- [15] MACKOWIAK C. 2009. Le déclin de l'abeille domestique *APIS MELLIFERA* en France. Thèse, Université Henri Poincaré – Nancy1.
- [16] RISEH S.N., GHADAMYARI M., MOTAMEDINIYA B. 2012. Biochemical Characterisation of α - and β -glucosidases and α - and β -galactosidases from Red Palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Col.: curculinide). *Plant Protect. Sci.* vol.48, 2:85-93
- [17] SAMMATARO D., UNTALAN P., GUERRERO F., FINLEY J. 2010. The resistance of *varroa* mites (*Acari:varroidae*) to acaricides and the presence of esterase. *International journal of Acarology*, 31:1,67-74.
- [18] SCHEIB-PFLEGER D. & WATTIAUX R. 1962. Etude des hydrolases acides des canaux de Muller de l'embryon de Poule. *Developmental Biology* 5 ,205-217.
- [19] WATTIAUX R. 2010. Christian de Duve et la découverte des lysosomes et des peroxysomes. *Revue des questions scientifiques*, 181(2).
- [20] WATTIAUX R. 1966. Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes. Université catholique de Louvain, Faculté de médecine, édition J. DUCULOT, Gembloux –Belgique.
- [21] WATTIAUX R. de DUVE. 1956. *Biochem. J. Biol.* 63, 606, 608.
- [22] ZOLTOWSKA K., REGINA FRACZEK, ZBIGNIEW LIPINSKI 2011. Hydrolases of developing workers Broad and newly emerged worker of *Apis mellifera carnica*. *Journal of apicultural science* Vol. 55 1.
- [23] ZOLTOWSKA K., LIPINSKI Z., DMITRYJUK M. 2007a. Effets of *Varroa destructor* on sugar levels and their respective carbohydrate hydrolase activities in honey bee drone prepupae. *Journal of Apicultural Research*, 110-113.
- [24] www.bee-hexagone.net