

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

50.376
1968
20-1

MÉMOIRES PRÉSENTÉS

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Geneviève SPIK

PREMIER MÉMOIRE

ÉTUDE COMPARATIVE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET DE LA STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES

DEUXIÈME MÉMOIRE

PROCÉDÉS DE DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES ET ÉLECTROPHORÉTIQUES DES OSES CONSTITUANT LES GLYCOPROTÉIDES



PRÉSENTÉS LE 8 JUIN 1968 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL, Président

H. CLAUSER, Rapporteur

C. LOUCHEUX, Examineur

NA PAMIATKĘ MOJEMU TATY

DLA MOJEJ MAMY

DLA MOJEJ SIOSTRY.

Którzy byli dla mnie stałym przykładem miłości, pracy i wytrwałości.

A LA MEMOIRE DE MON PERE,

A MA MERE,

A MA SOEUR,

qui ont été pour moi des exemples constants d'affection, de travail
et de persévérance.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille sous la direction du Professeur Jean MONTREUIL.

Je témoigne ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL pour l'honneur que j'ai d'avoir été formée à son école, dans un esprit de bienveillance et de travail et dans le souci constant de bien faire. Qu'il me permette d'exprimer ma joie d'appartenir à l'équipe enthousiaste et dynamique qu'il a forgée dans les vieux murs de la Faculté des Sciences de Lille et à laquelle il communique sa passion pour les problèmes de la Vie. Qu'il m'autorise, enfin, à lui redire mon profond attachement et mon admiration pour ses qualités de "meneur d'Hommes".

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur H. CLAUSER, Professeur de Biochimie à la Faculté des Sciences d'ORSAY, qui, en sa qualité de parrain au Centre National de la Recherche Scientifique, a toujours attentivement suivi nos travaux et a contribué pour une très grande part à l'évolution de notre carrière. C'est pour moi une grande joie et un grand honneur que de le compter parmi les membres du Jury de ma thèse.

Je remercie vivement Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur de Chimie Macromoléculaire à la Faculté des Sciences de Lille, d'avoir accepté de juger mon travail et de m'offrir la perspective séduisante d'une collaboration qui sera, sans nul doute, très fructueuse.

En témoignage de reconnaissance envers tous mes Maîtres de l'Ecole et de l'Université qui ont marqué et ciselé mon esprit, et principalement envers mes institutrices, Madame DARDENNE et Mademoiselle DECARNIN, sans qui je n'aurais pas connu l'extraordinaire aventure de la Recherche Scientifique.

En témoignage d'amitié profonde

à Monsieur le Professeur E. SEGARD que je remercie pour les conseils qu'il nous a prodigués et pour l'aide qu'il nous a maintes fois apportée avec la simplicité et la cordialité souriante qui le caractérisent.

à tous mes camarades du Laboratoire et, plus particulièrement, à Michel MONSIGNY et à Jacques DESCAMPS qui m'ont aidée, au sein d'une équipe amicale, de leurs conseils avisés et à Mademoiselle Renée VANDERSYPPE et Messieurs Guy DECROIX et Francis DECAMPS qui m'ont fait bénéficier de leur précieuse et efficace collaboration technique.

à Mesdames A. ADAM-CHOSSON et N. MENARD-SCHEPPLER qui m'ont initiée à la chimie des glycoprotéines aux temps héroïques de l'installation du Laboratoire de la rue Gosselet.

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES : MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU, J. TILLIEU

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, LAMOTTE, LELONG, KOURGANOFF, Mme LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, HOUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

DOYEN : M. DEFRETIN, Professeur de Biologie Marine

ASSESEURS : MM. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale
LEBRUN, Professeur de Radioélectricité

PROFESSEURS :

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BECART Maurice	Physique
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONTE Antoine	Géologie appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Botanique
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Radioélectricité
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique

M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. DEMORS Roger	Physique Industrielle
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELEAU Paul	Géologie et Minéralogie
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale
M. DESCOMBES Roger	Mathématiques
M. DURCHON Maurice	Zoologie
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radioélectricité
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEIM de BALZAC Henri	Zoologie
M. HOCQUETTE Maurice	Botanique
M. LEBEGUE André	Botanique C.S.U. AMIENS
Mme LEBEGUE Georgette	Physique C.S.U. AMIENS
M. LEFEBVRE Henri	Chimie Appliquée
Mlle LENOBLE Jacqueline	Physique
M. LIEBART Robert	I.U.T.
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MARION Ernest	Chimie C.S.U. AMIENS
M. MARTINOT-LAGARDE André	Mécanique des Fluides
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MENNESSIER Guy	Géologie C.S.U. AMIENS
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	Physique
M. MOUVIER Gérard	Chimie SAINT-QUENTIN
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique

M. THAM MAU QUAN	Mathématiques
M. FOUZET Pierre	Calcul Numérique
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHILTZ René	Physique
M. SCHALLER François	Zoologie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M. VAZART Bernard	Botanique AMIENS
M. VIVIER Emile	Zoologie C.S.U. AMIENS
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Générale

MAITRES DE CONFERENCES :

M. ATTEIA Marc	Calcul Numérique
M. BELLET Jean	Physique
M. BENABOU Jean	Mathématiques
M. BILLARD Jean	Physique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BUI TRONG LIEU	Mathématiques
M. CHERRUAULT Yves	Mathématiques
M. CHEVALIER Alfred	Mathématiques C.S.U. AMIENS
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVIRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme DIXMIER Suzanne	Mathématiques AMIENS
Mme DRAN Raymonde	Chimie Organique
M. DUQUESNOY Alain	Chimie AMIENS
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAUT Pierre	Physiologie Animale
M. GUILLAINNE Jean	Botanique
M. HANGAN Théodor (associé)	Mathématiques
M. HENRY Lucien	Physique AMIENS
M. HERZ Jean-Claude	Calcul Numérique

M. HEYMAN Michel	Physique C.S.U. AMIENS
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY Robert	Zoologie C.S.U. AMIENS
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Botanique
M. LAMBERT Gérard	Physique SAINT-QUENTIN
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LEHMAN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMAN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Minérale Appliquée
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. METTETAL Christian	Zoologie AMIENS
M. MONTEL Marc	Physique C.S.U. VALENCIENNES
M. NGUYEN PHONG CHAU	Mathématiques SAINT-QUENTIN
M. PANET Marius	Electromécanique
M. PARSY Fernand	Mathématiques Appliquées
M. SAADA Georges	Physique
M. SEGARD Emile	Chimie Biologique
M. TUDO Joseph	Chimie Minérale Appliquée C.S.U. AMIENS
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Physique Industrielle
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Mathématiques

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	5
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">LA TRANSFERRINE</div>	
<u>I - HISTORIQUE DE SA DECOUVERTE</u>	6
A - Mise en évidence de fer non héminique dans le plasma	6
B - Localisation du fer dans le plasma humain	6
C - Mise en évidence de la réversibilité de la formation du complexe fer-protéide	7
D - Isolement des transferrines	7
<u>II - PREPARATION DE LA TRANSFERRINE HUMAINE</u>	8
A - <u>PREPARATION DE LA TRANSFERRINE A PARTIR DES "FRACIONS DE COHN"</u>	8
1 - <u>Sous-fractionnement de la fraction IV-7</u>	9
a - Procédé de KOECHLIN	9
b - Procédé d'INMAN	10
2 - <u>Sous-fractionnement chromatographique des fractions de COHN</u>	10
a - Procédé d'INMAN et coll.	10
b - Procédé de WINDLE et coll.	10
c - Procédé d'AISEN et coll.	11
B - <u>PREPARATION DE LA TRANSFERRINE PAR LES METHODES DU RIVANOL</u>	11
1 - Procédé de BOETTCHER et coll.	11

2 - Procédé de KISTLER et coll.	12
3 - Modifications aux méthodes précédentes	12
4 - Procédé de SCHULTZE	12
C - <u>PREPARATION DE LA TRANSFERRINE PAR CHROMATOGRAPHIE</u> <u>D'ECHANGE D'IONS</u>	16
D - <u>CONCLUSIONS</u>	16
III - <u>FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE</u>	19
A - <u>FIXATION DU FER ET DE DIVERS METAUX PAR LA</u> <u>TRANSFERRINE</u>	19
B - <u>VALENCE DU FER CONJUGUE</u>	20
C - <u>CAPACITE DE FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE</u>	21
D - <u>CONDITIONS DE FIXATION DU FER</u>	22
1 - Influence du pH	22
2 - Influence de la composition du tampon et des chélateurs	25
3 - Influence du CO ₂ et des bicarbonates	25
4 - Conclusions	27
E - <u>MODALITES DE LA LIAISON FER-TRANSFERRINE</u>	27
1 - Démonstration de la participation de la tyrosine	29
2 - Participation d'autres groupements que la fonction phénolique de la tyrosine	31
3 - Réactivité des deux sites de fixation	31
4 - Conclusions	33
IV - <u>PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA TRANSFERRINE</u>	33
A - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	35
1 - Caractères de solubilité	35
2 - Comportement électrophorétique	35
3 - Point isoélectrique	37

4 - Masse moléculaire	37
5 - Propriétés physiques diverses	37
B - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	37
1 - Composition en glucides	44
2 - Composition en amino-acides	47
V - <u>STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE</u>	47
A - <u>STRUCTURE DE LA PROTEINE</u>	47
B - <u>STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	50
C - <u>MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE</u>	52
VI - <u>LE POLYMORPHISME DE LA TRANSFERRINE</u>	52
A - Caractéristiques électrophorétiques des variants de la transferrine	52
B - Propriétés générales des variants de la transferrine	55
C - Isolement des transferrines B, C et D	56
VII - <u>REPARTITION ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA TRANSFERRINE</u>	57
A - Répartition de la transferrine	57
B - Métabolisme de la transferrine	58
C - La transferrine et le métabolisme du fer	59
D - Pathologie de la transferrine	61
E - Action antibiotique de la transferrine	62
VIII - <u>LES AUTRES TRANSFERRINES ANIMALES</u>	63

LA LACTOTRANSFERRINE

I - <u>HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	64
A - Mise en évidence de fer conjugué dans le lait de Femme	64

B - Isolement de la transferrine	65
C - A propos de la nomenclature de la lactotransferrine	66
II - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	67
A - Procédé de MONTREUIL et coll.	67
B - Procédé de JOHANSSON	67
C - Procédé de BLANC et ISLIKER	68
D - Procédé de GOT	69
III - <u>FIXATION DU FER SUR LA LACTOTRANSFERRINE</u>	69
IV - <u>PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	72
A - <u>Propriétés physiques</u>	72
B - <u>Propriétés chimiques</u>	72
V - <u>STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	75
VI - <u>REPARTITION ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	
A - <u>Répartition</u>	75
B - <u>Métabolisme de la lactotransferrine</u>	76
C - <u>La lactotransferrine et le métabolisme du fer</u>	76
D - <u>Activité antibiotique de la lactotransferrine</u>	77
VII - <u>LACTOTRANSFERRINE BOVINE</u>	77
VIII - <u>TRANSFERRINE ET LACTOTRANSFERRINE</u>	80
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	81
<u>INTRODUCTION</u>	82
PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE	
I - <u>APPLICATION DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET</u>	84

A - <u>PRINCIPE</u>	84
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	84
1 - Fractionnement par le sulfate d'ammonium	84
2 - Purification par chromatographie sur Amberlite XE-64	86
C - <u>RESULTATS</u>	89
D - <u>CONCLUSIONS</u>	91
II - <u>MODIFICATIONS DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET</u>	91
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE</u>	91
1 - Principe	91
2 - Mode opératoire	91
3 - Résultats	92
4 - Conclusions	96
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE</u>	96
<u>PREMIER PROCEDE</u>	96
1 - Principe	96
2 - Mode opératoire	96
3 - Résultats	96
4 - Conclusions	97
<u>DEUXIEME PROCEDE</u>	99
1 - Principe	99
2 - Mode opératoire	99
3 - Résultats	99
4 - Conclusions	100
III - <u>CONCLUSIONS CONCERNANT LA PREPARATION DE LA LACTO- TRANSFERRINE</u>	100

ETUDE COMPAREE DE LA FIXATION
DU FER PAR LA TRANSFERRINE ET
PAR LA LACTOTRANSFERRINE

	1 - <u>DETERMINATION DE LA CAPACITE DE FIXATION DU FER</u> <u>DES TRANSFERRINES</u>	102
I -	<u>METHODES</u>	103
A -	<u>DOSAGE DU FER CONJUGUE</u>	103
1 -	<u>PRINCIPE</u>	103
2 -	<u>LIBERATION ET REDUCTION DES IONS FERRI- QUES</u>	103
3 -	<u>DOSAGE DU FER</u>	105
B -	<u>SATURATION DES TRANSFERRINES ET DETERMINATION DE LEUR CAPACITE DE FIXATION DU FER</u>	106
1 -	<u>PRINCIPE</u>	106
2 -	<u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL</u>	107
II -	<u>RESULTATS</u>	110
III -	<u>DISCUSSION</u>	110
IV -	<u>CONCLUSIONS</u>	113
2 -	<u>LA QUESTION DE LA "SURSATURATION" EN FER DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	113
3 -	<u>CONCLUSIONS CONCERNANT LA FIXATION DU FER PAR LA LACTOTRANSFERRINE</u>	116

PROPRIETES PHYSIQUES COMPAREES DE LA
TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

	1 - <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	117
I -	<u>METHODES</u>	117

A - <u>PROCEDES PHYSIQUES</u>	117
1 - <u>PROCEDES FONDES SUR L'ULTRACENTRIFUGATION</u>	117
a - <u>Détermination à l'approche de l'équilibre de sédimentation</u>	117
b - <u>Détermination par la méthode d'ARCHIBALD</u>	118
α - Détermination de la constante de sédimentation	118
β - Détermination de la constante de diffusion	119
γ - Détermination du volume spécifique partiel	119
2 - <u>PROCEDES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION</u>	119
a - <u>Principe</u>	119
b - <u>Mode opératoire</u>	120
B - <u>PROCEDES CHIMIQUES</u>	120
II - <u>RESULTATS</u>	121
1 - Constantes de sédimentation	121
2 - Volume spécifique partiel	122
3 - Masse moléculaire	122
III - <u>DISCUSSION</u>	125
A - <u>CONSTANTES DE SEDIMENTATION</u>	125
B - <u>MASSES MOLECULAIRES</u>	125
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	126
2 - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	
I - <u>METHODES</u>	126

II - <u>RESULTATS</u>	127
III - <u>CONCLUSIONS</u>	128
3 - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	130
I - <u>ABSORPTION DE LA LUMIERE</u>	130
A - <u>Méthodes</u>	130
B - <u>Résultats</u>	130
II - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	132
A - <u>Méthodes</u>	132
B - <u>Résultats</u>	132
III - <u>CONCLUSIONS</u>	132
4 - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROPRIETES <u>PHYSIQUES DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANS- <u>FERRINE</u></u></u>	133

<p>ETUDE COMPAREE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</p>
--

1 - <u>PREPARATION DES APOTRANSFERRINES</u>	135
A - Apotransferrine	135
B - Apolactotransferrine	136
2 - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES DE LA <u>TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</u></u>	136
I - <u>METHODES</u>	
A - <u>DOSAGE DES OSES NEUTRES</u>	136
B - <u>DOSAGE DES OSAMINES</u>	140
1° - Hydrolyse chlorhydrique	140
2° - Dosages colorimétriques	141
C - <u>DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES</u>	141
1° - Procédé de WERNER et ODIN	141
2° - Procédé d'AMINOFF	142

D - <u>RECHERCHE DES ACIDES URONIQUES</u>	143
II - <u>RESULTATS</u>	143
III - <u>CONCLUSIONS</u>	145
3 - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES DE LA</u> <u>TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	146
I - <u>METHODES</u>	146
A - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN OSES "NEUTRES"</u>	146
1 - <u>Principe</u>	146
2 - <u>Mode opératoire</u>	
- Procédé de DATE modifié	147
- Procédé de MONTREUIL modifié	147
B - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN OSAMINES</u>	147
1 - <u>Principe</u>	147
2 - <u>Mode opératoire</u>	147
a - Hydrolyse	148
b - Identification des osamines	148
α - désamination	148
β - Chromatographie sur échangeurs de cations	149
γ - N-réacétylation	149
C - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES SIALIQUES</u>	
1 - <u>Principe</u>	150
2 - <u>Mode opératoire</u>	150
a - Hydrolyse	
b - Purification	
c - Identification des acides sialiques	
II - <u>RESULTATS</u>	

1 - <u>Les oses "neutres"</u>	151
2 - <u>L'osamine</u>	153
3 - <u>L'acide sialique</u>	154
III - <u>CONCLUSIONS</u>	159
4 - <u>ETUDE PRELIMINAIRE DE LA STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANS- FERRINE.</u>	160
I - <u>METHODES</u>	160
A - <u>HYDROLYSES CHIMIQUES</u>	
1 - <u>Hydrolyse par les acides dilués</u>	160
2 - <u>Hydrolyse par les résines polystyrène- sulfonées</u>	161
B - <u>ACTION DES ENZYMES</u>	161
1 - <u>Action sur le glycanne</u>	
a - Hydrolyse par la neuraminidase	161
b - Oxydation par la galactose-oxydase	162
2 - <u>Action des protéases</u>	162
II - <u>RESULTATS</u>	162
III - <u>CONCLUSIONS</u>	168

ETUDE COMPAREE DE LA FRACTION PROTIDIQUE
DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

1 - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES</u>	170
I - <u>METHODES</u>	
1 - Hydrolyse des glycoprotéines	171
2 - Calculs	171
3 - Dosage du tryptophane	172

II - <u>RESULTATS</u>	172
III - <u>CONCLUSIONS</u>	175
2 - <u>DETERMINATION DES ACIDES AMINES N et C-TERMINAUX</u>	176
I - <u>METHODES</u>	176
A - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX</u>	176
1 - <u>Hydrolyse par les carboxypeptidases</u>	176
2 - <u>Hydrazinolyse</u>	176
a - <u>Principe</u>	176
b - <u>Mode opératoire</u>	176
B - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX</u>	177
1 - <u>Dinitrophénylation</u>	177
2 - <u>Hydrolyse des DNP-protéides</u>	177
3 - <u>Extraction et chromatographie des DNP- amino-acides</u>	177
4 - <u>Chromatographie des DNP-amino-acides</u>	178
a - DNP-éthéro-solubles	178
b - DNP-hydrosolubles	179
II - <u>RESULTATS</u>	179
III - <u>CONCLUSIONS</u>	181
3 - <u>FINGER-PRINTING DES HYDROLYSATS PROTEINASIQUES DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	184
I - <u>METHODES</u>	
1 - <u>HYDROLYSES PROTEINASIQUES</u>	
a - Hydrolyse trypsique	185
b - Hydrolyse chymotrypsique	185
c - Hydrolyse pepsique	185
d - Hydrolyse papaïnique	186
e - Hydrolyse pronasique	186

	2 - <u>ELECTRO-CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE</u>	186
II - <u>RESULTATS</u>		187
III - <u>CONCLUSIONS</u>		187
4 - <u>CONCLUSIONS GENERALES DE L'ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTO- TRANSFERRINE</u>		190

ETUDE COMPAREE DES MODALITES DE
 L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE DANS
 LA TRANSFERRINE ET DANS LA LAC-
 TOTRANSFERRINE

	1 - <u>DESCRIPTION DES METHODES</u>	195
I - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>		195
	A - HYDROLYSE PRONASIQUE	196
	B - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPROTIDES	196
II - <u>COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DES GLYCOPEPTIDES</u>		198
	A - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>	198
	B - <u>COMPOSITION MOLAIRE</u>	
	1 - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPEPTIDES</u>	198
	2 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES ET DES ACIDES AMINES CONSTITUANTS LES GLYCOPRO- TIDES</u>	
	a - Identification et dosages des oses	
	b - Identification et dosage des acides aminés	
III - <u>DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES.</u>		199
	A - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX</u>	199

B - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX</u>	
1 - Action de la leucine-aminopeptidase	199
2 - Dinitrophénylation	200
3 - Dégradation d'EDMAN	202
IV - <u>ETUDE DE LA NATURE DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS LES GLYCOPEPTIDES</u>	206
A - <u>Cas d'une liaison asparaginy-glucosamine</u>	206
1 - Hydrolyse des aspartylglycannes	206
2 - Identification de l'asparaginy- glucosamine	207
B - <u>Cas d'une liaison O-glycosidique</u>	207
1 - Principe	207
2 - Action des alcalis	209
3 - Identification et dosage des β - hydroxy amino-acides détruits	210
4 - Fractionnement des produits de la β -élimination	210
2 - <u>APPLICATIONS A LA TRANSFERRINE</u>	211
I - <u>RESULTATS</u>	211
A - <u>ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	211
B - <u>COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES</u>	211
C - <u>STRUCTURE DES FRACTIONS PEPTIDIQUES</u>	215
D - <u>MODALITES DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE</u>	215
II - <u>CONCLUSIONS</u>	
3 - <u>APPLICATIONS A LA LACTOTRANSFERRINE</u>	222
I - <u>RESULTATS</u>	
A - <u>ISOLEMENT ET COMPOSITION DES GLYCOPROTIDES</u>	222
B - <u>MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON O-THREONYL- GLYCOSIDIQUE</u>	224

1 - Action de la soude sur la composition des glycopeptides	224	
2 - Fractionnement et étude des produits de l'action de la soude	224	
C - <u>MISE EN EVIDENCE DE LIAISONS ASPARAGINYL-</u> <u>GLUCOSAMINE</u>	229	
III - <u>CONCLUSIONS</u>	230	
<table border="1"><tr><td>CONCLUSIONS GENERALES</td></tr></table>	CONCLUSIONS GENERALES	233
CONCLUSIONS GENERALES		
BIBLIOGRAPHIE	238	

INTRODUCTION

Dès notre entrée, en 1960, dans son Laboratoire, le Professeur MONTREUIL nous a confié la tâche d'étudier la composition en glucides de la lactotransferrine qu'il venait d'isoler du lait de Femme. Ce genre de recherche relevait, en effet, de notre spécialisation technique dans le dosage des sucres. Nos résultats furent exposés dans une première note parue en 1961.:

J. MONTREUIL, G. BISERTE, S. MULLET, G. SPIK et N. LEROY - Composition chimique de la lactosidérophiline. C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 4065.

En 1965, à la suite d'un mémoire élliptique de BLANC, BUJARD et MAURON (1) paru dans le périodique Experientia, nous fûmes amenée à participer à la rédaction d'une mise au point qui parut dans le même journal et dans laquelle nous décrivions la composition complète de la transferrine et de la lactotransferrine :

J. MONTREUIL, G. SPIK, M. MONSIGNY, J. DESCAMPS, G. BISERTE et M. DAUTREVAUX - Etude comparée de la composition en oses et en amino-acides de la transferrine et de la lactotransferrine humaines. Experientia, 1965, 21, 254.

Cette étude révéla, dans la composition de la lactotransferrine, quelques anomalies qui, s'ajoutant à des résultats apportés par l'électrophorèse, l'immuno-électrophorèse et l'ultra-centrifugation, nous amenèrent, - en collaboration avec J. DESCAMPS -, à reprendre d'une manière systématique la question de l'isolement d'une lactotransferrine pure. En effet, des échantillons présentaient fréquemment une hétérogénéité dont la nature sera discutée plus loin. A l'heure actuelle, ce problème n'a pas encore reçu, malgré nos efforts, de solution absolument satisfaisante et les procédés que nous appliquons fournissent, certes, des préparations pures mais avec des rendements relativement faibles.

Nous sommes toutefois parvenue à préparer des quantités suffisantes de lactotransferrine pour entreprendre l'étude comparée de la structure de la lactotransferrine et de la transferrine humaines. Cette dernière nous était fournie par l'Industrie.

Dans une première série d'expériences, nous avons exploré la constitution des groupements glycaniques et des copules protéiques dans leur ensemble. Les résultats que nous avons obtenus ont été rassemblés dans les mémoires suivants :

J. MONTREUIL, G. SPIK et A. CHOSSON - Recherches sur la structure des glycoprotéides. III - Identification chromatographique de la N-acétyl-lactosamine dans les hydrolysats de divers glycoprotéides. Hypothèse de l'existence d'un schéma général de structure des glycoprotéides. C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493.

J. MONTREUIL, A. CHOSSON et G. SPIK - Etudes sur les glycoprotéides. IX - Etudes cinétiques de l'hydrolyse chimique des glycoprotéides. Application à l'ovomucoïde. Hypothèse de l'existence d'un schéma général de structure de la fraction glucidique des glycoprotéides d'origine animale. Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1867.

G. SPIK et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéides. XVI - Etudes comparatives de la structure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines. "Finger-printing" des hydrolysats protéasiques des deux glycoprotéides. C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 94.

Dans une seconde série de travaux, nous avons abordé l'étude comparée des modalités de la liaison glycanne-protéide dans les deux glycoprotéines et démontré, pour la première fois, la nature de la conjugaison.

Nous avons, en effet, prouvé sans ambiguïté que, dans la transferrine, existaient deux groupements glycaniques unis à la protéine par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminyllamine. Les premiers résultats furent publiés dans les deux notes suivantes :

G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéides. XI - Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique avec le groupement mucopolysidique dans la transferrine humaine. C. R. Acad. Sci., 1965, 260, 4282.

G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéides. XII - Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine dans la transferrine humaine. C. R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137.

Quelques mois auparavant, JAMIESON (2) avait décrit, dans une note, quelques glycopeptides qu'il avait isolés des hydrolysats pronasiques de la transferrine mais il ne précisait pas la nature de la liaison glycanne-protide. Un second mémoire de JAMIESON (3), postérieur à nos deux notes n'apportait pas encore la solution de ce problème.

Parallèlement à nos travaux sur la transferrine, nous menions une série de recherches sur la liaison glycanne-protide de la lactotransferrine, et démontrions l'existence de deux chaînes glucidiques unies à la protéine par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine et d'une troisième chaîne conjuguée par une liaison O-thréonyl-glycosidique alcalilabile. Nos résultats furent communiqués, dès 1965, dans une conférence faite par MONSIGNY (4) au Symposium Technicon de Paris et publiés dans la note suivante :

G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL - XVIII - Etudes sur les glycoprotéides. Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine et d'une liaison O-thréonyl-glycosidique dans la lactotransferrine humaine. C.R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893.

Cette publication était postérieure à une note de GOT (5) dans laquelle cet auteur donnait la composition de glycopeptides préparés à partir d'hydrolysats pronasiques de la lactotransferrine sans préciser la nature de la liaison glycanne-protéine dans cette glycoprotéine. Dans un article postérieur à notre note, GOT, GOUSSAULT et FONT (6) confirmèrent l'existence d'une liaison O-glycosidique de la thréonine dans la lactotransferrine. Enfin, nous avons rassemblé tous nos résultats dans un mémoire dont le texte était celui d'une conférence faite par le Pr. MONTREUIL au 4^e Symposium sur la Chromatographie, de Bruxelles (14-15 septembre 1966) :

G. SPIK et J. MONTREUIL - Etude comparée de la nature de la liaison glycanne-protéine dans la transferrine et dans la lactotransferrine humaines. Chromatographie-Symposium IV, Arscia éd., Bruxelles.

Le but de cette introduction, **était**, d'une part, de montrer que, malgré la durée de nos travaux, nos résultats sont restés originaux et ont conservé leur antériorité et, d'autre part, de préciser le plan de notre mémoire.

Nous présenterons successivement, après un bref historique sur la transferrine et sur la lactotransferrine humaines :

- 1 - le problème de la préparation de la lactotransferrine ;
- 2 - la question de la fixation du fer par ces deux glycoprotéines ;
- 3 - les propriétés physiques des deux transferrines ;
- 4 - l'étude comparée des fractions glycaniques ;
- 5 - l'étude comparée des copules protéiniques ;
- 6 - les modalités de la liaison glycanne-protéine dans les deux protéides .

GENERALITES

Nous exposerons, dans ce chapitre, les résultats qui ont été acquis, dans différents laboratoires, sur les propriétés physico-chimiques et biologiques et sur la structure de la transferrine et de la lactotransferrine.

LA TRANSFERRINE (+)

I - HISTORIQUE DE SA DECOUVERTE

La découverte, dans le sérum de différents animaux, d'un protéide capable de fixer réversiblement le fer : la transferrine ou sidérophiline, s'est effectuée en plusieurs étapes.

A - Mise en évidence de fer non héminique dans le plasma

L'histoire de la découverte de la transferrine commença réellement en 1925 par la mise en évidence, par FONTES et THIVOLLE (18) de fer non porphyrinique dans les cendres du plasma de Cheval. Cependant, dès 1891, SOCIN (19) avait déjà signalé la présence de fer dans du sérum non hémolysé mais son observation ne reçut aucune application. En 1927, HENRIQUES et ROCHE (20) et WARBURG et KREBS (21) mettent au point des procédés de dosages du fer plasmatique non héminique et trouvent des valeurs comprises entre 50 et 220 µg p.100 ml de plasma.

B - Localisation du fer dans le plasma humain

En 1927-1933, BARKAN (22,23) démontre qu'il ne s'agit pas de fer "minéral" mais que le métal ne dialyse pas aux pH physiologiques. Au contraire, après acidification, le fer devient ultrafiltrable. L'auteur (24) conclut que le fer est lié à des protéines et isolé avec SCHALES (BARKAN et SCHALES(25)), en 1937, par précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, un complexe fer-globulines qui contient la totalité du fer

(+) Revues générales : LAURELL, 1952 (7) ; DREYFUS-SCHAPIRA, 1955 (8) ; SCHULTZE, HEIDE et MÜLLER, 1957 (9) ; RAMSAY, 1958 (10) ; DREYFUS et SCHAPIRA, 1958 (11) ; LAURELL, 1960 (12) ; PUTNAM, 1965 (13) ; BEARN et PARKER, 1966 (14) ; SCHULTZE et HEREMANS, 1966 (15) ; Protides of the Biological Fluids, 1967 (16) ; JEPPSSON, 1967 (17).

plasmatique. STARKENSTEIN et HARVALIK (26) parviennent simultanément à la même conclusion.

En 1941, VAHLQUIST (27), par électrophorèse, et YOSHIKAWA, HAHN et BALE (28), par fractionnement du sérum après injection de fer radio-actif, montrèrent, eux aussi, que le fer était localisé sur les globulines α et β , mais aussi, en très faible quantité, au niveau des albumines. Ce dernier résultat ne reçut pas de confirmation ultérieure.

C - Mise en évidence de la réversibilité de la formation du complexe fer-protéide

HOLMBERG et LAURELL (29) et SCHADE et CAROLINE (30) (+) montrèrent que la globuline sérique fixant le fer n'est pas saturée en métal et que l'addition de sels de fer au sérum provoque le développement d'une coloration saumon qui atteint un maximum quand 300 μ g environ de fer ont été fixés par 100 ml de sérum. Cette réaction de fixation du fer est réversible (LAURELL) (32). A ce protéide responsable du transport de fer plasmatique, HOLMBERG et LAURELL (33), en 1947, donnèrent le nom de transferrine. SCHADE, REINHART et LEVY (34) proposèrent, en 1949, le terme de sidérophiline pour exprimer l'affinité pour le fer de la globuline.

D - Isolement des transferrines

Grâce à leur propriété de fixation du fer, associée à leur pouvoir bactériostatique mis en évidence par SCHADE et CAROLINE (35), le repérage des transferrines au cours des opérations de fractionnement des sérums de divers animaux était aisé et permit de mettre au point, rapidement, des procédés d'isolement.

En 1947, LAUREL et INGELMAN (36) décrivent la préparation de la transferrine du Porc et parviennent à la cristalliser en 1953. En 1949, SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (37) modifient la "méthode 6" de COHN et obtiennent, à partir du plasma humain, une "fraction IV-7" très enrichie en transferrine à partir de laquelle, en 1952, KOEHLIN (38) prépare cette dernière à l'état cristallisé.

(+) SCHADE et CAROLINE étaient parvenus à ce résultat en étendant au sérum les recherches qu'ils poursuivaient sur le blanc d'oeuf et qui les avaient conduits à identifier à la conalbumine le protéide fixant du fer (31).

Depuis, de nombreux procédés ont été proposés dont nous décrivons ci-dessous les principes. Ils permettent d'obtenir des quantités élevées de transferrine pure dont les propriétés physico-chimiques et biologiques sont étudiées principalement depuis les 7 ou 8 dernières années.

II - PREPARATION DE LA TRANSFERRINE HUMAINE

La transferrine humaine est obtenue, avec les meilleurs rendements, à partir de préparations enrichies provenant de fractionnement du plasma par le procédé à l'éthanol de COHN et coll. ou par le procédé au rivanol de HOREJSI et SMETANA.

Nous nous limiterons à l'exposé du principe des différentes méthodes qui ont été proposées.

A - PREPARATION DE LA TRANSFERRINE A PARTIR DES "FRACTIONS DE COHN"

En 1945, COHN (39) décrit un procédé de fractionnement des protéides plasmatiques par un gradient d'éthanol associé à des variations de température, de pH, de force ionique et de concentration en protéides. Il obtient de cette manière 6 fractions. En 1946, SCHADE et CAROLINE (40) qui étudiaient l'action inhibitrice sur la croissance de Shigella dysenteriae (voir p. 7) des fractions de COHN, observent que la fraction IV-3,4 possède l'activité maximale. Ces auteurs montrent, en outre, que l'addition de sel de fer développe, uniquement avec cette fraction, une coloration rose-saumon identique à celle que fournit la conalbumine de l'oeuf et caractérisaient ainsi la protéine responsable du transport du fer plasmatique. Malheureusement, la grande complexité de composition de la fraction IV-3,4 du "fractionnement I" de COHN, ne permit pas d'isoler la transferrine à partir de cette fraction.

Malgré les perfectionnements apportés à son procédé par COHN, aucune des fractions qu'il obtenait ne renfermait de proportions importantes de transferrine. Par exemple, la fraction IV-4 de la "méthode 6" de COHN contenait, - outre la transferrine -, de la choline-estérase, de la sérum-albumine, des α -lipoprotéines, des α_2 et des β_2 globulines.

En 1949, SURGENOR, STRONG, TAYLOR, GORDON et GIBSON (41) et SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (42) sous-fractionnent la fraction IV-4 de COHN de manière à éliminer la choline-estérase, l'albumine et les lipoprotéines et obtiennent une fraction à 76 p.100 de transferrine qu'ils appellent : fraction IV-7. Malgré plusieurs tentatives, les auteurs ne parviennent pas à obtenir la transferrine à l'état pur à cause d'interactions énergiques entre cette protéine et les α_2 -globulines présentes dans la fraction.

KOEHLIN (43) réussit, le premier, à obtenir de la transferrine pure en soumettant la fraction IV-7 à un sous-fractionnement éthanolique et en faisant varier les conditions de pH et de force ionique. A la suite de KOEHLIN, d'autres auteurs proposèrent des procédés fondés sur le même principe. Plus récemment, la chromatographie sur échangeurs d'ions a été appliquée avec succès.

1 - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION IV-7

a - Procédé de KOEHLIN (44)

Le procédé de KOEHLIN est fondé sur la recherche systématique des meilleures conditions de force ionique, de pH et de concentration en protéides à appliquer à la fraction IV-7 pour réduire au maximum les interactions protéines-protéines. Dans certaines conditions, il précipite d'abord sélectivement les globulines α_2 (fraction IV-7-1), puis la transferrine (fraction IV-7-2) pure à 95 p.100.

Dans une seconde série de travaux, KOEHLIN fixa les conditions suivantes de la cristallisation de la transferrine :

pH	5,2 - 5,5	6,1 - 6,5
$\Gamma/2$	0,01- 0,02 (chlorure)	0,01- 0,05 (chlorure ou acétate)
Concentration en éthanol p.100	10 - 14	14 - 20
Concentration en protéines p.100	8 - 10	8 - 12
Température	0 - 5°C	0 - 5°C

La cristallisation à pH 6,2 est réservée à des préparations IV-7-2 pures à 95 p.100. Seules les préparations possédant un degré de pureté supérieur cristallisent à pH 5,2 - 5,5. Deux ou trois cristallisations successives fournissent la transferrine homogène en électrophorèse et en ultracentrifugation. Toutefois, la purification de la transferrine par la cristallisation reste un procédé délicat. En outre, les rendements sont faibles.

b - Procédé d'INMAN

INMAN (45) améliore le sous-fractionnement de la fraction IV-7 de SURGENOR et coll. et le rendement de la cristallisation. Toutefois, les rendements restent faibles et INMAN et coll. (46) furent amenés à modifier profondément le procédé de KOEHLIN et de l'associer, en particulier, à la chromatographie sur échangeurs d'ions.

2 - SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES FRACTIONS DE COHN

a - Procédé d'INMAN et coll.

INMAN et coll. (47) utilisent la fraction IV-4 de la "méthode 6" de COHN, - au lieu d'utiliser la fraction IV-7 comme matériel de départ. La principale modification apportée par les auteurs consiste à saturer la transferrine en fer, de manière à augmenter de 40 fois sa solubilité et de favoriser sa séparation par précipitation fractionnée des impuretés. La précipitation de la transferrine elle-même est précédée d'un traitement par l'EDTA de manière à augmenter son insolubilité en la privant de fer. Les auteurs obtiennent de cette manière une préparation (fraction IV-4-c) qui contient 80 à 85 p.100 de transferrine dont la purification est achevée par chromatographie sur DEAE-cellulose (qui la débarrasse des globulines γ G), puis sur CM-cellulose (qui élimine la sérumbumine et les globulines α_1).

Ce procédé permet de préparer rapidement des quantités élevées de transferrine pure à 91-95 p.100.

b - Procédé de WINDLE et coll.

WINDLE, WIERSEMA, CLARK et FEENEY (48) isolent la transferrine à partir de la fraction IV-7-2 de KOEHLIN, préalablement saturée en fer, qu'ils soumettent à la chromatographie sur DEAE-cellulose. L'élution est

effectuée avec un tampon 0,01 M tris - HCl, de pH 8,5 avec des concentrations croissantes en ClNa : 0,05 M - 0,075 M - 0,1 M et 0,15 M. La transferrine est éluée avec les tampons renfermant 0,05 et 0,075 M de ClNa.

c - Procédé d'AISEN et coll.

AISEN et coll. (49) utilisent la fraction IV-7 de SURGENOR et coll. dont ils extraient la transferrine saturée en fer par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50. (tampon tris de pH 8 ; gradient de concentration de 0,07 à 0,15 M).

B - PREPARATION DE LA TRANSFERRINE PAR LES METHODES AU RIVANOL

Le lactate de 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine ou rivanol possède la propriété de précipiter dans certaines conditions de pH, de force ionique et de concentration en rivanol la majeure partie des protéides sériques. Fondé sur ce principe, un procédé de fractionnement du plasma a été décrit par HOREJŠI et SMETANA (50), en 1956. Dans le surnageant obtenu après précipitation, à 20°C et à pH 7,3, de 2 volumes de plasma par 7 volumes de rivanol à 0,4 p.100, et à la température de la pièce, les auteurs ont trouvé dans le filtrat, à côté de la sérumalbumine et des globulines γ G, une globuline β .

En 1958, BOETTCHER et coll. (51) reprennent les études faites par HOREJŠI et SMETANA et décrivent une méthode de purification de la globuline β présente dans le surnageant après précipitation par le rivanol et l'identifient à la transferrine.

1.-- Procédé de BOETTCHER, KISTLER et NITSCHMAN (52)

La méthode de BOETTCHER et coll. est fondée sur la grande solubilité de la transferrine en présence du rivanol à des pH supérieurs à 7. Entre pH 8 et 10, la sérumalbumine est précipitée en totalité et il demeure dans le surnageant les globulines γ G et la transferrine qui peuvent être séparées par précipitation éthanolique effectuée à basse température et à des concentrations et à des pH différents : les globulines γ G sont d'abord précipitées par l'éthanol à 25 p.100 et à pH 6,8 et la transferrine est précipitée du filtrat par l'éthanol à 40 p.100 et à pH 5,8. Les rendements atteignent 2 g de transferrine pure à 90 p.100 pour 100 g de protéides sériques totaux.

La transferrine est ensuite purifiée par un nouveau fractionnement au rivanol.

2 - Procédé de KISTLER et coll. (53)

En 1960, KISTLER et coll., par la mesure de la capacité de fixation du fer, démontrent que les préparations de transferrine obtenues par le fractionnement au rivanol selon BOETTCHER et coll. (54) contiennent jusqu'à 40 p.100 d'impuretés et ils proposent un procédé de purification fondé sur la cristallisation de la transferrine dans les conditions décrites par INMAN pour la fraction IV-7 de COHN (55). Ce procédé permet d'obtenir des quantités élevées de transferrine très pure à partir du plasma humain ou encore à partir de toute fraction enrichie en transferrine.

3 - Modifications aux méthodes précédentes

De nombreuses modifications de la technique de KISTLER et coll. ont été proposées. Elles portent :

- sur les conditions de précipitation par le rivanol ;
- sur les conditions d'élimination de ce dernier ;
- sur les conditions de purification de la transferrine.

Comme nous ne pouvons décrire en détail tous ces procédés, nous les avons rassemblés dans les tableaux I (p. 13), II (p. 14) et III (p. 15).

4 - Procédé de SCHULTZE

Dans les laboratoires de la firme BEHRINGWERKE, SCHULTZE et coll. ont mis au point plusieurs procédés généraux de fractionnement du sérum qui associent le relargage par les sels neutres et par l'éthanol, la précipitation au rivanol, la chromatographie préparative d'absorption et d'échanges d'ions, l'électrophorèse préparative de convection ou sur gels divers. Ces méthodes ont fait l'objet de nombreuses descriptions (voir, par exemple, SCHULTZE, GÖLLNER et coll. (56) ; HEIDE et HAUPT (57) ; HEIDE, HAUPT et STORIKO (58)) et on trouvera, dans le remarquable ouvrage de SCHULTZE et HEREMANS, Molecular Biology of Human Proteins (59), un chapitre consacré aux procédés de fractionnement des protéides plasmatiques dans lequel sont décrites les méthodes de préparation, à l'échelle industrielle, de la transferrine. Nos recherches ont été effectuées sur de tels échantillons mais nous ne connaissons pas les détails techniques de leur préparation.

Tableau I

Conditions de précipitation des protéides sériques par le rivanol

Nature de la solution de départ	Concentration de la solution de rivanol	Volumes de solution de rivanol ajoutée	Force ionique	pH	Température	Références
Sérum	0,4 p. 100	3,5	-	7,3	20°C	HÖRŤJŠI et SMETANA (60)
Sérum	0,4 p. 100	3,5	0,15	9,4	0°C	BOETTCHER et coll. (61) KISTLER et coll. (62) NAGLER et coll. (63) ROOP et PUTNAM (64)
Sérum (a)	0,4 p. 100	3	-	8,5	(b)	PATRAS et STONE (65) ROBERTS, MAKEY et SEAL (66)
Sérum dilué à 3 p. 100 de protéides	(c)	(c)	-	8,5	(b)	HEIDE et HAUPT (67) HEIDE, HAUPT, STORIKO et SCHULTZE (68)
Sérum saturé en fer dilué avec 3 vol. de tris 5mM de pH 8,8	0,6 p. 100 (d)	1	-	8,8	20°C	SUTTON et KARP (69)

(a) Sérum de Boeuf

(b) Non précisé

(c) Les auteurs donnent comme seule précision : protéines 3 p. 100 ; rivanol 0,87 p. 100.

(d) En solution dans un tampon tris 5mM de pH 8,8

Tableau II
Procédés d'élimination du rivanol des filtrats

Méthodes	Références
Passage sur charbon activé	<ul style="list-style-type: none"> - BOETTCHER et coll. (70) - KISTLER et coll. (71) - PATRAS et STONE (72)
Dialyse contre un tampon phosphate 0,02 M pH 6,3, suivi d'un passage sur colonne de CM-cellulose	<ul style="list-style-type: none"> - NAGLER, KOCHWA et WASSERMAN (73)
Addition de 5 p. 100 de chlorure de sodium	<ul style="list-style-type: none"> - HEIDE, HAUPT, STÖRIKO et SCHULTZE (74)
Passage sur amidon de pomme de terre	<ul style="list-style-type: none"> - SUTTON et KARP (75)
Passage sur colonne de Sephadex - G-25	<ul style="list-style-type: none"> - ROOP et PUTNAM (76)



Tableau III

Procédés d'élimination des globulines γ G des filtrats rivanoliques

Procédés	Références
Précipitation par l'éthanol à 25 p. 100, à pH 6,8 et à -6°C	BOETTCHER et coll. (77) KISTLER et coll. (78)
Précipitation par le sulfate d'ammonium - Sulfate d'ammonium 2 M, à pH 7. Concentration en protéides totaux : 0,25 p. 100. - 33 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution à pH 6,5	HEITE et HAUPT (79) ROOP et PUTNAM (80)
Chromatographie sur DEAE-cellulose - Tampon phosphate 0,04 M, à pH 6,3	NAGLER et coll. (81)
Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 - Tampon tris 5 m M ; pH 8,8 - Tampon tris-HCl ; pH 8 ; gradient linéaire de 0,02 à 2 M - Tampon tris-HCl ; pH 8 ; gradient linéaire de 0,06 à 0,5 M en tris et 0,06 à 0,3 M en HCl	SUTTON et KARP (82) ROBERTS et coll. (83) ROOP et PUTNAM (84)

BES
LILLE

C - PREPARATION DE LA TRANSFERRINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

Depuis les premiers travaux de PETERSON et SOBER (85), la chromatographie sur des celluloses modifiées et, en particulier, sur la DEAE-cellulose, a été largement utilisée pour préparer la transferrine. Une revue générale de la question a été effectuée par PETERSON et SOBER (86).

JAMES et STANWORTH (87) ont réalisé une étude critique des procédés de fractionnement des protéines sériques par chromatographie sur DEAE-cellulose. Les auteurs ont montré que l'affinité de la transferrine pour l'échangeur d'ions variait avec la teneur en transferrine du mélange de protéides à purifier : la transferrine pure est éluée avec un tampon phosphate 0,01 M, de pH 7,6, tandis que la transferrine présente dans le sérum total est éluée avec un tampon phosphate 0,02 M, de pH 6,3. Les auteurs expliquent cette différence par une modification de la configuration moléculaire de la transferrine quand elle est combinée à d'autres molécules de protéides sériques, ou par des différences de teneur en fer de la protéine ou encore par l'existence de plusieurs transferrines.

Nous avons précisé dans les tableaux IV et V (p. 17 et 18) quelques conditions appliquées par les auteurs pour isoler la transferrine directement à partir du sérum humain ou à partir de fractions très enrichies en ce protéide (voir aussi les paragraphes précédents).

D - CONCLUSIONS

Les procédés de préparation de la transferrine sont trop nombreux pour que l'on puisse conclure que le problème de l'isolement de ce composé pur et à l'état natif soit résolu. Pour tenter de faire le point de cette question, FREEMAN (88) a préparé la transferrine en appliquant trois procédés différents :

- 1 - Chromatographie sur DEAE-cellulose de la fraction IV de COHN.
- 2 - Précipitation au rivanol, suivie d'un relargage par le sulfate d'ammonium entre 45 et 65 p.100 de saturation et d'une purification sur DEAE-cellulose.

- 3 - Fractionnement sur DEAE-cellulose du sérum entier. L'élué est réalisé par un tampon phosphate. Le 3^e pic, renfermant de la transferrine

Tableau IV

Conditions d'isolement de la transferrine par chromatographie
sur celluloses modifiées

Nature du matériel de départ	Nature de l'échangeur d'ions	Nature du tampon	Procédés de purification	Références
Sérum entier	DEAE DEAE	Phosphate 0,02 M, pH 6,3 Phosphate 0,002 M, pH 7	Chromato sur hydroxylapatite Chromato sur Sephadex G 50 Electroph. gel d'amidon	JAMES et STANWORTH (89) ROBINSON et PIERCE (90) ROBINSON et coll. (91)
	DEAE	Phosphate 0,005 M, pH 7		ROBINSON et PIERCE (92)
	DEAE	Phosphate 0,015, pH 6,4		CHARLWOOD (93) SHIRASAWA (94)
	TEAE CM	Phosphate 0,1 M, pH 7,1 Phosphate 0,005 M, pH 6 à 7,5		JEPSSON et SJOQUIST (95)
Précipité AP ₁ du fraction- nement à l'éther de KEKWICK et Mc KAY (96)	DEAE	Acétate 0,02 M, pH 5,2		Chromato sur DEAE-cellulose
Fraction obtenue par relargage au sulfate d'ammonium	DEAE	Phosphate 0,005 M, pH 7,4		BEZKOROVAINY et coll. (98)
Fraction éthanolique	CM	Phosphate 0,005 à 1 M, pH 6 à 7,5		EPPSSON et SJOQUIST (99)
Fraction β obtenue par électrophorèse en gel d'amidon	TEAE	Phosphate 0,025 M		PARKER et BEARN (99 a)

Tableau V

Conditions d'isolement de la transferrine par chromatographie sur Sephadex modifiés.

Nature du matériel de départ	Nature de l'échangeur d'ions	Nature du tampon	Procédés de purification	Références
Plasma dialysé	DEAE- Sephadex A-50	Phosphate 0,04 M ; pH 5,9	Relargage $\text{SO}_4 \text{ Am}_2$ + DEAE-Sephadex (tampon tris) + DEAE-Sephadex (tampon borate-phosphate)	ROBERTS et coll. (99b)
Fraction obtenue par chromatographie sur Sephadex .G 200	DEAE-Sephadex			GELOTTE et coll. (99c)
Fraction obtenue par électrophorèse sur Pevikon C 870	DEAE-Sephadex A-50	Tris-HCl 0,05 à 0,2 M ; pH 8		CHARLWOOD (99d)



et des globulines γ , est soumis à une électrophorèse préparative en gel d'amidon à pH 9,1.

Ces trois préparations de transferrine possèdent les propriétés communes suivantes :

- 1 - Elles fixent, toutes trois, le fer d'une manière identique.
- 2 - En électrophorèse sur papier, elles migrent comme des globulines β .
- 3 - En ultracentrifugation, elles possèdent la même constante de sédimentation.
- 4 - Elles sont antigéniquement identiques. Toutefois, une différence très marquée se manifeste entre ces trois préparations en l'électrophorèse en gel d'amidon.

En effet, la fraction préparée par le rivanol se dissocie en 2 bandes qui possèdent une vitesse de migration plus lente que la transferrine présente dans le sérum et la transferrine préparée par DEAE-cellulose et gel d'amidon. En outre, des expériences biologiques révèlent que la préparation de transferrine obtenue par la 2^è méthode est catabolisée plus rapidement que la transferrine préparée par le 3^è procédé.

FREEMAN (100) explique ces différences par des pertes d'acide sialique ou par une dénaturation.

III - FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE

A - FIXATION DU FER ET DE DIVERS METAUX PAR LA TRANSFERRINE

La propriété de fixer le fer que possède la transferrine a été mise en évidence pour la première fois par SCHADE et CAROLINE (101) (voir p. 7) en 1946. Un peu plus tard, COHN montra que cette protéine était, en outre, capable de fixer in vitro d'autres métaux comme le cuivre et le zinc et il proposa de l'appeler "metal-combining β_1 -pseudoglobulin". Mais HOLMBERG et LAURELL (102) démontrèrent aussitôt que, dans le plasma, la transferrine fixait uniquement le fer. En effet, l'addition de sels de cuivre au sérum ne modifie pas la capacité de fixation du fer par ce dernier et ne provoque pas la dissociation du complexe fer-transferrine.

L'affinité de la protéine pour le fer semble donc être plus grande que son affinité pour le cuivre. Des expériences faites avec des sels de zinc montrent, en outre, que l'affinité de la protéine pour le zinc est plus faible que son affinité pour le cuivre et pour le fer. HOLMBERG et LAURELL parvinrent ainsi à la conclusion que si la protéine peut se combiner in vitro au cuivre et au zinc, elle est, in vivo, essentiellement liée au fer. C'est pourquoi, les auteurs proposèrent de l'appeler transferrine. Ces résultats furent confirmés par SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (103). COTZIAS (104), en 1961, ^{montre} que la fraction des globulines β_1 du plasma est capable de fixer les sels manganeux et pose l'hypothèse de l'existence d'une "transmanganine", différente de la transferrine. Plus récemment, en 1965, JONES et PERKINS (105) ont étudié la fixation de divers métaux par la transferrine à des pH différents ^{et ont montré que} les ions calcium, cuivre, zinc, cobalt pouvaient se fixer sur la protéine, mais que leurs sites de conjugaison n'étaient pas spécifiques et qu'ils étaient différents de celui du fer.

Enfin, selon HOPKINS et SCHWARZ (107), les sels de chrome se fixeraient sur la transferrine sur le même site qui accepte le fer. En effet, la saturation de la transferrine par le chrome empêche la fixation ultérieure du fer.

En conclusion, on peut actuellement affirmer que la transferrine possède un site spécifique de fixation du fer et des sites, non spécifiques de fixation d'autres ions métalliques comme le zinc, le cuivre, le calcium et le cobalt. Toutefois, dans le plasma, la transferrine semble fixer exclusivement le fer.

B - VALENCE DU FER CONJUGUE A LA TRANSFERRINE

Plusieurs démonstrations ont été apportées à la nature ferrique des ions fer conjugués à la transferrine. Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

1 - La vitesse ^{[de fixation} in vitro des ions ferriques sur la transferrine est plus grande que celle des ions ferreux (FIALA (108) ; KOEHLIN (109) ; ROSS et coll. (110)).

Ce phénomène ne s'observe pas, en aérobiose, avec la transferrine présente dans le plasma car celui-ci renferme un système d'oxydation des ions ferreux (STARKENSTEIN et WEDEN (111) ; LAURELL (112) ; SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (113)). Selon RABINOWITZ (114), cette oxydation serait catalysée par la céruléoplasmine et par une lipoprotéine α_2 ou β .

2 - L'addition de dipyridyle, qui donnent une coloration spécifique des ions ferreux, aux complexes fer-transferrine ne donnent lieu à aucune réaction, mais celle-ci se produit en milieu réducteur (TOMPSETT) (115).

3 - L'hydrosulfite de sodium fait disparaître la coloration rouge des solutions de transferrine saturée en fer (EHRENBERG et LAURELL) (116).

4 - La nature ferrique de l'ion fer a été confirmée par des mesures magnéto- métriques (MICHAELIS (117) ; EHRENBERG et LAURELL (118)) et par l'étude de la résonance de spin (AASA et coll) (119).

C - CAPACITE DE FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE

La mesure de la capacité de fixation du fer par la transferrine a pu être effectuée grâce aux deux séries de procédés suivants :

1 - Procédés colorimétriques de dosage du fer. Des méthodes précises et sensibles de dosage du fer conjugué à la transferrine ont été mises au point. Elles sont fondées sur les principes suivants :

a - Dissociation en milieu réducteur de la combinaison fer-transferrine, en général, par l'acide chlorhydrique ; précipitation du protéide par l'acide trichloracétique ; dosage colorimétrique du fer par l' α, α' -dipyridyle, l'orthophénanthroline ou la bathophénanthroline.

b - Addition d'un excès de sel ferrique et dosage de la quantité de fer qui n'a pas été fixé (HOLMBERG et LAURELL) (120).

2 - Procédés photométriques. SCHADE et CAROLINE (121) ont montré que la coloration des solutions de ferri-transferrine croissait proportionnellement à la quantité de métal fixée et atteignait une intensité maximale qui se

traduisait, dans le tracé de la droite, par l'apparition brusque d'un plateau (Fig 16; p.109). Sur cette observation, les auteurs ont proposé une méthode de saturation contrôlée de la transferrine qui consiste à ajouter progressivement une solution de sel ferrique au protéide et de suivre spectrophotométriquement à 460-465 m μ l'accroissement de l'absorbance.

Le procédé de SCHADE et CAROLINE, associé aux techniques colorimétriques précédentes, a permis de déterminer la capacité de fixation de la transferrine. Nous avons rassemblé dans le tableau VI(p.24) les valeurs données par différents auteurs. La connaissance du poids moléculaire de la transferrine, même s'il est encore approximatif, d'une part, et du pourcentage de fer fixé à la saturation du protéide, d'autre part, amène à la conclusion que la transferrine saturée renferme 2 atomes de fer. Ce résultat a été acquis, dès 1952, par KOEHLIN (122) et confirmé par tous les auteurs.

D - CONDITIONS DE FIXATION DU FER

La fixation du fer sur la transferrine dépend étroitement du pH, de la nature du tampon utilisé et des ions carboniques.

1 - Influence du pH

En 1927, BARKAN (123) avait montré qu'en acidifiant le sérum avec de l'acide chlorhydrique le fer sérique devenait ultrafiltrable.

En 1947, expérimentant sur le sérum, LAURELL a étudié la stabilité du complexe fer-transferrine en fonction du pH en mesurant la capacité de fixation du fer par le sérum et montré qu'elle était maximale entre pH 7 et 8 et minimale à pH 5.

Un résultat identique a été obtenu par SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (124), sur des solutions de transferrine. Les auteurs ont montré, en étudiant les variations d'intensité de la coloration de ces dernières en fonction du pH, que le complexe commençait à se dissocier vers pH 6-6,5 et que la coloration disparaissait totalement à pH 4 (Fig. 1 ; p.23).

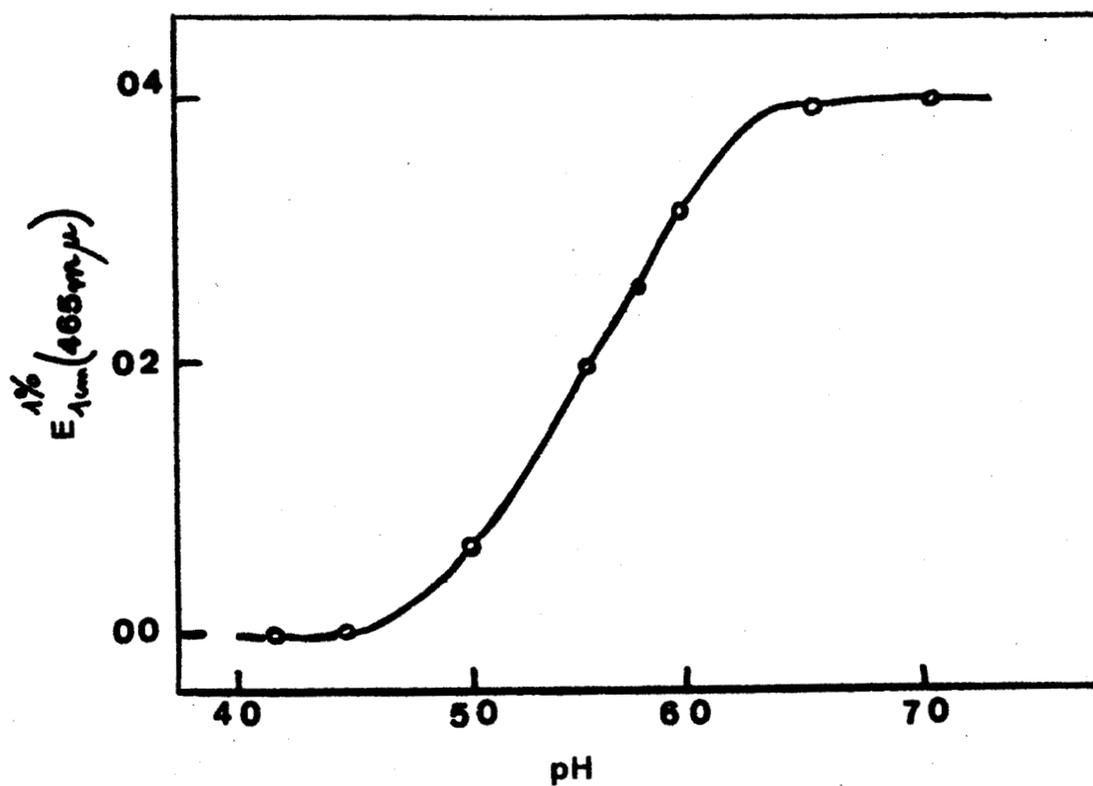


Figure 1

Courbe de dissociation du complexe fer-transferrine en fonction du pH (d'après SURGENOR et coll.) (125).

Tableau VI

Teneur en fer, en p. 1000, de la transferrine saturée en métal

1,25	SURGENOR, KOECHLIN et STRONG, 1949 (127)
1,25	KOECHLIN, 1952 (128)
1,26	LAURELL, 1953 (129)
1,30	SCHULTZE, HEIDE et MÜLLER, 1957 (130)
1,30	KATZ, 1961 (131)
1,35	JEPPSSON et SJÖQUIST, 1963 (132)
1,30	ROBINSON et PIERCE, 1964 (133)
1,51	ROBERTS, MAKEY et SEAL, 1966 (134)
1,28	LINE, GROHLICH et BEZKOROVAINY, 1967 (135)

Quand, après acidification, on revient à la neutralité, la coloration rouge réapparaît. La dissociation du complexe fer-transferrine en milieu acide est donc réversible (LAURELL (136) : SURGENOR, KOECHLIN et STRONG (137) ; FIALA (138)).

2 - Influence de la composition du tampon et des chélateurs

FIALA (139) a signalé en 1949, que les phosphates fragilisaient le complexe fer-transferrine. En effet, en présence de ces sels, les pH de dissociation sont décalés d'environ + 1,5 unité. A la suite de cette observation, INMAN (140), en 1956, a étudié systématiquement l'influence des tampons divers sur les conditions de dissociation du complexe fer-transferrine. Le tableau VII (p. 26) montre que les solutions de citrate favorisent considérablement la dissociation des complexes et ralentissent en conséquence, la fixation du fer. Les résultats identiques ont été obtenus par BLANC (141) (+). Cette action s'explique par une compétition entre la transferrine et le chélateur.

Cependant, dans les expériences de saturation de la transferrine en fer, ce dernier doit être nécessairement ajouté sous une forme chélatée car les ions ferriques "libres" se fixent sur des sites non spécifiques (AASA et coll.) (143) et donnent des transferrines "sursaturées". Pour obtenir, en présence de chélateurs, une fixation totale du fer, il suffit d'élever le pH des solutions à 8-8,5 et d'ajouter, en outre, au milieu, des bicarbonates qui favorisent la réaction.

3 - Influence du CO₂ et des bicarbonates

SCHADE, REINHART et LEVY (144) puis WARNER et WEBER (145) ont montré que le complexe fer-transferrine contenait du CO₂ à raison d'une mole par atome de fer. En l'absence de CO₂, l'addition d'ions ferrique, même en présence d'oxygène, développe une faible coloration qui s'intensifie si l'on ajoute du bicarbonate de sodium à raison d'une mole par atome de fer.

(+) Et par FRAENKEL-CONRAT (142) avec la conalbumine.

Tableau VII

Valeur du pH de dissociation totale du complexe fer-transferrine en solution saline (d'après INMAN) (146)

Nature du sel	Force ionique	Molarité	pH de dissociation
Sulfate d'ammonium	0,003 à 0,014		4,9
	0,1		5,4
	1		5,55
Chlorure de sodium	0,15		5,20
Citrate de sodium + Chlorure de sodium		0,6 M + 0,01 M	6,75
Citrate de sodium		0,1 M	7,65
Citrate de sodium		0,5 M	7,30 (+)

(+) 97 p. 100 de dissociation



Suivant certains auteurs comme LAURELL (147), SCHADE, REINHART et LEVY (148) et SCHADE et REINHART (149), 2 ions CO_3H^- participeraient à l'édification du complexe fer-transferrine lui-même. Un argument qui semble décisif à cet égard, a été récemment apporté par SCHADE et REINHART (150) à l'aide du $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ dont les auteurs ont démontré la fixation sur la ferri-transferrine.

Pendant, d'autres auteurs soutiennent que les bicarbonates ne se combinent pas avec le complexe fer-transferrine mais renforcent seulement la coloration de ce dernier (WARNER et WEBER (151) ; FRAENKEL-CONRAT (152) ; AISEN et coll.(153)).

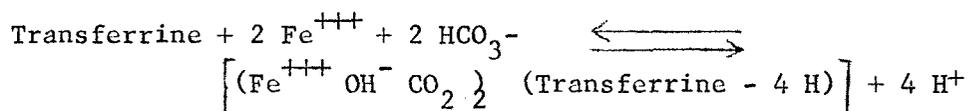
Quel que soit, toutefois, le mécanisme de la réaction, la présence de bicarbonates favorise la conjugaison du fer sur la transferrine. En outre, elle abolit l'action fragilisante des chélateurs. La figure 2 (p 28) empruntée à BLANC (154) est à cet égard démonstrative.

4 - Conclusions. Les expériences de conjugaison du fer sur la transferrine nécessitent, à la fois, la présence de chélateurs destinés à orienter la fixation du métal sur les sites spécifiques et de bicarbonates pour favoriser et stabiliser cette dernière.

E - MODALITES DE LA LIAISON FER-TRANSFERRINE

Pour expliquer la fixation, sur la transferrine, de deux ions ferriques et de deux moles d'acide carbonique, plusieurs schémas ont été proposés.

LAURELL, en 1951, expliquait la fixation du fer par l'équilibre suivant :



FIALA et BURK, en 1949, invoquèrent la formation d'hydroxamates. En effet, les acides hydroxamiques donnent, en présence de fer, une coloration rose-saumon qui possède un maximum d'absorption à 460 m μ . Toutefois, comme la formation de ces complexes ne nécessitait pas de CO_2 , contrairement à ce qui se passe avec l'hydroxylamine elle-même, FIALA et BURK (154a)

RELATION ENTRE TENEUR EN FER ET EXTINCTION

*Influence de NaHCO_3 et Citrate
Transferrine humaine 0,65 %.*

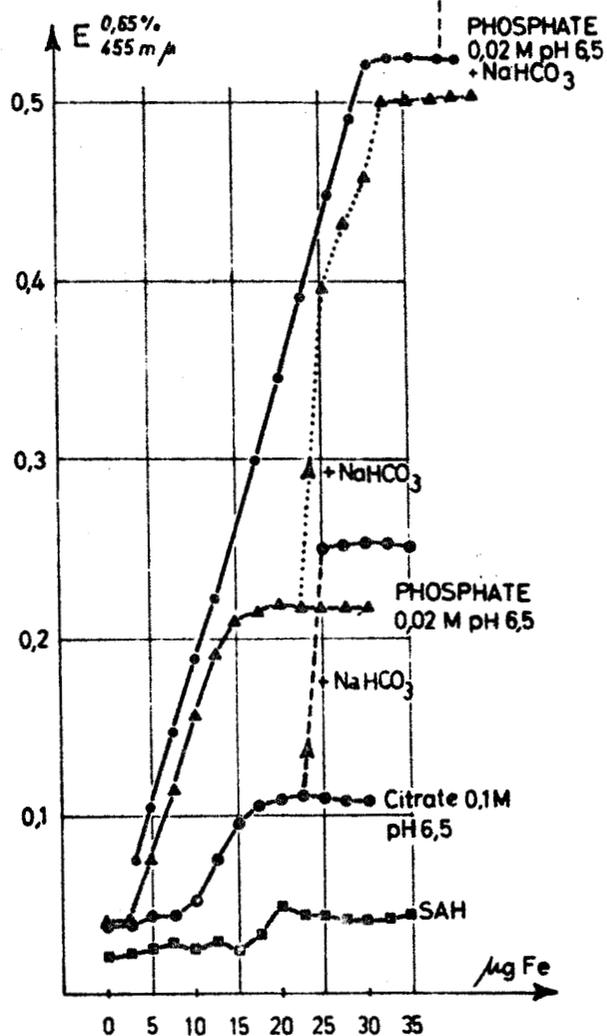
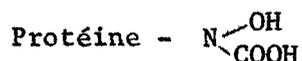


Figure 2

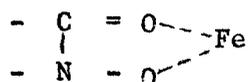
Influence des phosphates et des citrates, seuls ou associés aux bicarbonates, dans la formation des complexes fer-transferrine. En abscisses, quantités de fer ajoutées à l'apotransferrine sous la forme de sulfate ferreux. En ordonnées, absorbances des solutions. SAH : solution-témoin de sérum albumine humaine (d'après BLANC) (154).



posèrent en hypothèse que la transferrine réagissait comme une hydroxylamido-protéine qui se conjugait, dans un premier temps, avec le CO_2 , pour donner naissance à un groupement hydroxycarbamique :



Dans un second temps, celui-ci se combinait avec le fer pour donner le complexe suivant :

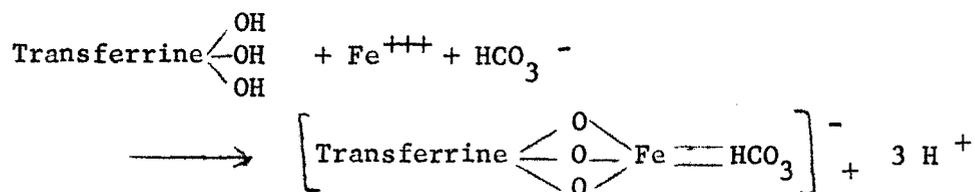


En synthétisant des hydroxylamido-protéines et en comparant leurs propriétés avec celles de la conalbumine, -dont les modalités de liaison avec le fer sont identiques à celles de la transferrine-, FRAENKEL-CONRAT (155) infirme le schéma de FIALA et BURK.

1° - Démonstration de la participation de la tyrosine

Actuellement, l'accord est généralement fait sur la participation de la fonction phénolique de la tyrosine à la fixation du fer, à raison de 3 résidus de cet acide aminé par atome de fer. Ce résultat a été acquis sur la base des expérimentations suivantes :

a - Des expériences de titrimétrie, inspirée de celles de WARNER et WEBER (156) et de WHISNIA et coll. (157) sur la conalbumine, ont montré que la fixation de chaque atome de fer sur la transferrine s'accompagnait de la libération de 3 protons (AASA, MALMSTRÖM, SAITMAN et VANNGARD)(158) conformément au schéma suivant :



Nota : La formation de ce complexe explique le comportement anionique électrophorèse de la transferrine saturée en fer (voir p.35).

b - L'étude de la fixation du fer à la suite de modifications chimiques spécifiques des sites de fixation peut apporter des renseignements précieux sur le mécanisme de cette dernière. Malheureusement, il n'existe pas encore de procédés rigoureusement spécifiques. Toutefois, les expériences suivantes ne sont pas en contradiction avec la conception d'une conjugaison du fer sur la tyrosine:

1° - L'acétylation de la transferrine par l'acétylimidazole empêche la fixation du fer (FEENEY et KOMATSU (159) ; KOMATSU et FEENEY (160). Or, depuis les travaux de SIMPSON et coll. (161) et de RIORDAN et VALLEE (162), on sait, par des mesures spectrophotométriques, que l'acétylation se porte sur les fonctions OH des résidus de tyrosine. Ce résultat est donc en faveur de la participation de ces fonctions dans la fixation du fer par la transferrine. En outre, l'apotransferrine fixe 6 groupements "acétyle" de plus que la transferrine saturée. Toutefois, quelques réserves doivent être faites dans les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats, car l'acétylation des protéines par l'acétylimidazole ne se porte pas spécifiquement sur les OH de la tyrosine, mais aussi sur les ϵ -NH₂ de la lysine et sur les groupements SH de la cystéine.

2° - Comme dans le cas de la conalbumine (AZARI et FEENEY) (163), l'iodation de l'apotransferrine inhibe la fixation du fer et fait perdre à la transferrine ses propriétés chromogéniques. (PERKINS (164) ; JONES et PERKINS (165) ; MICHAUD et WOODWORTH (166). L'iodation de la transferrine saturée en fer ne fait pas perdre à cette dernière ses propriétés chromogéniques. L'apo-iodo-transferrine préparée à partir de la transferrine préalablement saturée en fer, puis iodée, garde ses propriétés de fixation intactes. En outre, l'iodo-apotransferrine possède 6 résidus d'iodotyrosine de plus que l'iodotransferrine saturée en fer (KOMATSU et FEENEY) (167)

3° - Les résultats de l'étude de la dispersion optique rotatoire (VALLEE et ULMER (168) ; ULMER et VALLEE (169) et de la résonance magnétique électronique (WINDLE, WIERSEMA, CLARK et FEENEY (170) montrent une asymétrie de la molécule de métallotransferrine qui n'existe pas dans l'apotransferrine. Le fer crée donc un centre d'asymétrie moléculaire.

2 - Participation d'autres groupements que la fonction phénolique de la tyrosine

D'après les expériences effectuées par différents auteurs, il semble que le fer se conjuguerait, non seulement avec les OH de la tyrosine, mais encore avec des fonctions azotées, comme celles du noyau imidazole de l'histidine (HAZEN (171) ; AASA, MALMSTROM et coll. (172)). Selon WINDLE, WIERSEMA et coll. (173), les études de résonance magnétique électronique montrent que deux atomes d'azote sont impliqués dans la liaison fer-transferrine.

Finalement, pour rendre compte de tous les résultats acquis jusqu'à présent sur les modalités de la fixation du fer sur la transferrine, WINDLE, WIERSEMA et coll. (174) ont proposé le schéma de la figure 3 (p. 32). D'après ces auteurs, chaque ion ferrique serait lié "octaédriquement coordiné" à 3 fonctions phénoliques de la tyrosine, à deux atomes d'azote et à un ion bicarbonate (+).

3 - Réactivité des deux sites de fixation

Pour certains auteurs, l'affinité pour le fer des deux sites spécifiques d'une molécule de transferrine est identique. Pour d'autres, l'un est plus réactionnel que l'autre.

Selon AASA, MALMSTROM et coll. (175) et AISEN, LEIBMAN et REICH (176), les deux sites sont identiques et indépendants.

Au contraire, d'après INMAN (177), WARNER et WEBER (178), WOODWORTH (179) et SCHADE (180), les deux sites ne posséderaient pas la même affinité. En effet, le second atome de métal est fixé beaucoup plus rapidement que le premier sur l'apotransferrine (INMAN (181) ; WARNER et WEBER (182)) et il est dissocié plus lentement du complexe : sa vitesse de dissociation est, en effet, de $2,8 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ contre $4,7 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ (WOODWORTH) (183). Ce dernier auteur a récemment proposé un schéma qui expliquerait ce mécanisme : dans un premier temps, le premier atome de fer se fixerait lentement sur deux points situés d'une manière éloignée sur l'apotransferrine, provoquerait un remaniement de la molécule qui,

(+) Selon les mêmes auteurs les ions Cu^{++} se fixeraient sur le même site que le fer avec les hydroxyles de deux tyrosines et avec deux atomes d'azote (Fig. 3 ; p. 32). Le système s'inscrirait sur une surface plane symétrique qui explique l'absence d'effet Cotton donné par la cupritransferrine. En outre, les modalités de la fixation du fer et du cuivre sont identiques sur la conalbumine et sur la transferrine.

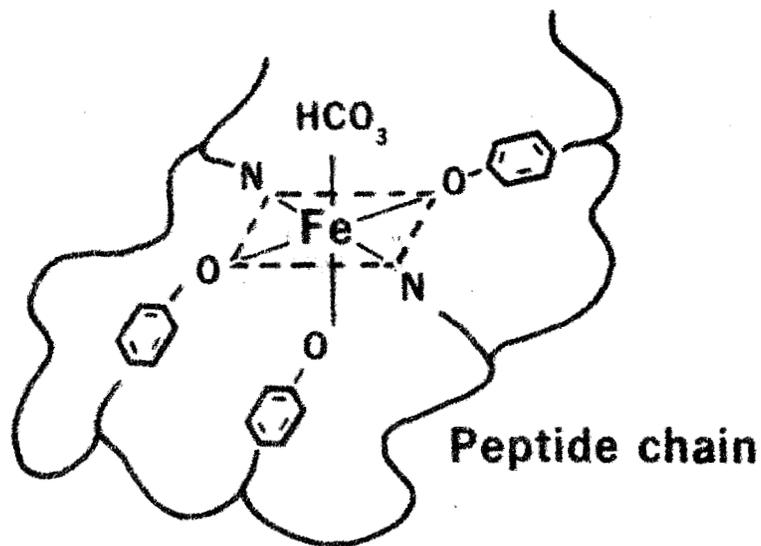
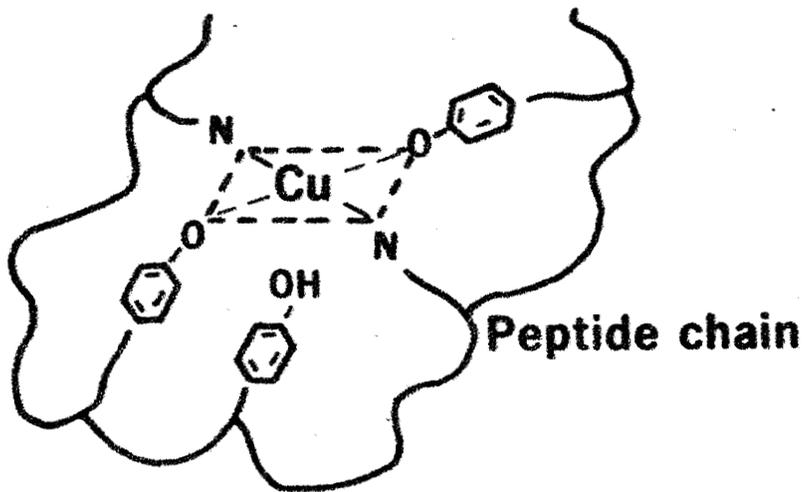


Figure 3



Schémas de la fixation du fer et du cuivre sur la transferrine
(et sur la conalbumine) (d'après WINDLE, WIERSEMA et coll.) (184).

en rapprochant les deux autres points de conjugaison du fer faciliterait la fixation de ce dernier (Fig. 4, p. 34). Cette hypothèse d'une relation entre morphologie moléculaire, et fixation du fer avait déjà été proposée par FRAENKEL-CONRAT et FEENEY (185), par FRAENKEL-CONRAT (186), par WARNER (187) et par BUTTKUS et coll. (188).

4 - CONCLUSIONS

Il est bien établi, à présent, que la transferrine fixe deux atomes de fer, sous la forme d'ions ferriques, sur deux sites spécifiques et que ces mêmes sites sont capables de fixer deux ions cuivriques. Il semble, en outre, démontré que les fonctions phénoliques de trois résidus de tyrosine par atome de fer soient impliquées dans la conjugaison. La participation d'autres acides aminés à la liaison demande à être confirmée.

Quant à la différence de réactivité des deux sites de fixation, elle n'est pas encore démontrée. Toutefois, on a acquis la certitude que la fixation du fer modifiait la forme et les propriétés de l'apotransferrine.

IV - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA TRANSFERRINE

Au moment où nous avons entrepris, en 1960, nos travaux sur la transferrine, nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques de ce composé étaient très fragmentaires et, à l'exception de SCHULTZE et de ses collaborateurs, aucun auteur n'avait, à l'époque, effectué une étude complète du problème. Après 1960, de nombreux chercheurs s'attachèrent à la question et les résultats qu'ils obtinrent ne furent pas toujours concordants. C'est pourquoi, nous avons poursuivi des travaux qui étaient, au départ, complémentaires ou originaux, et qui devinrent, par la suite, "statistiques", de manière à tenter de réaliser l'accord entre les résultats ou à déterminer lesquels étaient satisfaisants.

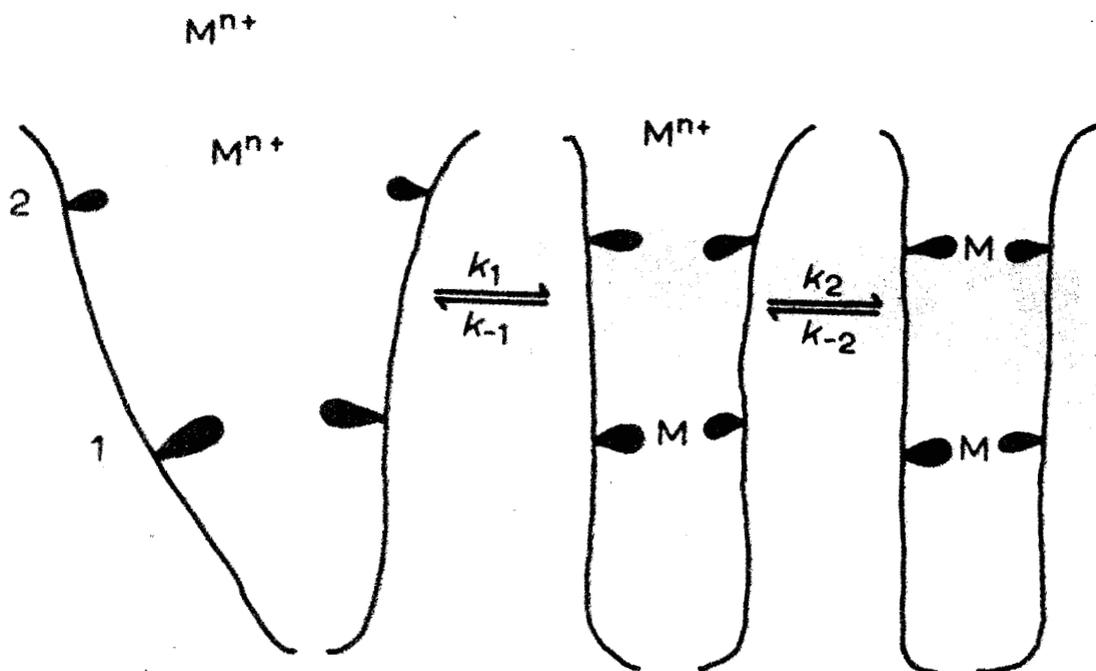


Figure 4

Schéma de WOODWORTH (189) expliquant les différences de vitesse de fixation des deux atomes de fer sur la transferrine (et sur la conalbumine)



A - PROPRIETES PHYSIQUES

La transferrine est une protéine incolore quand elle est sous la forme d'apotransferrine, dépourvue de métal. Associée au fer, elle est rose saumon, associée au cuivre, elle est jaune.

1 - Caractères de solubilité

La transferrine est très soluble dans l'eau, surtout sous la forme de métalloprotéine. Elle est précipitée, à pH 7, par le sulfate d'ammonium, à 64-74 p. 100 de saturation (solution à 0,4 g de protéide p. 1000 ml d'eau), par l'acide trichloracétique à 10 p. 100 et par l'acide sulfosalicylique. Elle n'est pas précipitée par l'acétate d'uranyle (SCHULTZE, COLLNER, HEIDE, SCHONENBERGER et SCHWICK) (190).

2 - Comportement électrophorétique

En électrophorèse libre et en électrophorèse de zone sur papier, en gélose et sur acétate de cellulose, la transferrine possède la vitesse de migration d'une globuline $\beta 1$. Nous avons rassemblé dans le tableau VIII (p. 36) les valeurs de mobilité électrophorétique obtenues par différents auteurs.

Dans certaines conditions électrophorétiques, -en particulier, par électrophorèse en gel d'amidon-, la transferrine révèle une hétérogénéité. Celle-ci sera discutée plus loin, (voir p.52)

D'autre part, une anomalie se révèle dans le comportement électrophorétique de la transferrine saturée en fer. En effet, on voit à l'examen des valeurs de ROOP (Tableau VIII p. 36), que la métalloprotéine possède un caractère plus électronégatif que l'apotransferrine. Un résultat identique a été obtenu par AISEN et coll. (191) qui ont trouvé les valeurs de mobilité électrophorétique à pH 6,7 (force ionique 0,1) suivantes :

Apotransferrine	- 0,95
Transferrine à 1 atome de fer	- 1,20
Transferrine à 2 atomes de fer	- 1,53

Tableau VIII

Valeurs de la mobilité électrophorétique de la transferrine suivant différents auteurs, dans un tampon véronal de pH 8,6 (a)

Nature de la transferrine	Mobilité (b)	Références
Non précisée	- 3,1	SCHULTZE, COLLNER et coll., 1955 (192)
Apotransferrine	- 3,1 - 3,2 - 3,03	KELLER et PENNELL, 1959 (193) INMAN et coll., 1961 (194) ROOP, 1964 (195)
Transferrine saturée en fer	- 3,63	ROOP, 1964 (196)



(a) Tampon véronal de force ionique 0,1 et de pH 8,6
 (b) $10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$

Une observation analogue a été faite à propos de la conalbumine par WARNER et WEBER (197). Ce comportement de la transferrine peut s'expliquer par des remaniements profonds de la chaîne protéique qui dévoilent ou masquent des groupements ionisés ou encore par la conjugaison avec l'ion carbonique du complexe fer-protéine (voir p.25).

3 - Point isoélectrique. Les valeurs du point isoélectrique de la transferrine "libre" et saturée en fer sont précisées dans le tableau IX (p 38).

4 - Masse moléculaire

A présent encore, l'accord est loin d'être fait sur la valeur de la masse moléculaire de la transferrine qui oscille, suivant les auteurs, entre 68 000 à 90 000. Ces différences s'expliquent, d'une part, par des variations des principaux paramètres qui permettent de calculer la masse moléculaire, (constante de sédimentation, constante de diffusion, coefficient de viscosité) et, d'autre part, par la nature des procédés utilisés (ultracentrifugation, diffusion de la lumière, filtration du gel, quantité de fer fixée. Nous avons rassemblé dans les tableaux X (p. 39), XI (p.40) et XII (p.41), les valeurs de quelques constantes physiques utilisées dans le calcul des masses moléculaires et dans le tableau XIII (p. 42) les valeurs de ces dernières déterminées par différents auteurs.

5 - Propriétés physiques diverses

Nous avons rassemblé dans le tableau XIV (p. 43) quelques unes des propriétés physiques de la transferrine que nous n'avons pas décrits dans les paragraphes précédents.

B - PROPRIETES CHIMIQUES

La transferrine est une glycoprotéine qui contient de 14,7 (KOECHLIN (198), SURGENOR, KOECHLIN et STRONG (199)) à 15,3 - 15,4 (SCHULTZE, GOLLNER et coll. (200), SCHULTZE, HEIDE et MULLER (201)) p. 100 d'azote. Elle est exempte de lipides (SURGENOR, KOECHLIN et STRONG (202) SCHULTZE, GOLLNER et coll. (203), BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll. (204).

Tableau IX

Valeurs du point isoélectrique de la transferrine suivant différents auteurs

Nature de la transferrine	Méthodes utilisées	pHi	Références
Apotransferrine	Solubilité minimale	5,80 - 5,90	KOECHLIN, 1952 (205)
	?	5,58	INMAN, 1956 (206)
	Electrophorèse libre	5,80	KELLER et PENNELL, 1959 (207)
	Electrophorèse libre	5,80	PARKER et BEARN, 1962 (208)
	Electrophorèse libre	4,90	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll; 1963 (209)
	Electrophorèse libre	5,50	ROOP et PUTNAM, 1967 (210)
	Electrofocalisation	5,98	JEPPSSON, 1967 (211)
Transferrine saturée en fer	?	5,40	INMAN, 1956 (212)
	Electrophorèse libre	5,45	KELLER et PENNELL, 1959 (213)

Tableau X

Valeurs des constantes de sédimentation de la transferrine humaine suivant différents auteurs (a)

Conditions des Mesures	$S_{20}^0 \times 10^{-13}$	Références
<u>Apotransferrine</u>		
ClNa 0,15 M	5,2	ONGLEY, SCATCHARD et BROWN, 1947 (214)
ClNa 0,15 M	5,5	INMAN, 1956 (215)
ClNa 0,15 M	6,1	SCHULTZE, SCHÖNENBERGER et coll., 1956 (216)
ClNa 0,15 M	5,38	NAGLER, KOCHWA et coll., 1962 (217)
Phosphate 0,03 M + ClNa 0,2 M ; pH 6,78	5,50	MAHLING, 1963 (218)
Acétate ; pH 5	5,64	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (219)
Phosphate ; pH 7	5,35	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (220)
Tampons différents ; pH de 6,8 à 8	5,10	CHARLWOOD, 1963 (221)
Phosphate 0,1 M ; pH 6,8	5	JEPPSSON et SJOQUIST, 1963, (222)
Tampons différents ; pH 5,5 à 8,5	4,92	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (223)
Acétate 0,15 M ; pH 5	5,52	BEZKOROVAINY, 1966 (224)
Cacodylate 0,05 M + ClNa 0,1 M ; pH 7	5,54	BEZKOROVAINY, 1966 (225)
<u>Transferrine saturée en fer</u>		
Phosphate ; pH 7,67	4,97	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (226)
Cacodylate ; pH 7	5,75	BEZKOROVAINY, 1966 (227)
<u>Asialotransferrine</u> ; Cacodylate pH 7	5,99	BEZKOROVAINY, 1966 (228)

(a) Nous n'avons fait figurer dans notre tableau que les valeurs calculées pour une dilution infinie et exclu les déterminations effectuées à une seule concentration en transferrine.



Tableau XI

Valeurs des constantes de diffusion de la transferrine humaine suivant différents auteurs

Conditions des mesures	$D_{20 w}^{\circ}$ (a)	Références
-	5,4	INMAN, 1956 (229)
-	6,2	SCHULTZE, HEIDE et coll., 1957 (230)
Apotransferrine, tampon acétate, $\mu = 0,1$; pH 5	$5,3 \pm 0,17$ (b)	BEZKOROVAINY et RAFELSON, 1964 (231)
Apotransferrine, tampon phosphate $\mu = 0,1$; pH 7	$5,43 \pm 0,08$ (b)	BEZKOROVAINY et RAFELSON, 1964 (232)
Apotransferrine, tampon Cl _k -Cl _H $\mu = 0,1$; pH 2,2	4,28 (b)	ROBERTS et coll., 1966 (233)
Transferrine saturée en fer, tam- pon phosphate $\mu=0,1$; pH 6,8	5,85 (c)	ROBERTS et coll., 1966 (234)
Apotransferrine purifiée sur Se- phadex ; pH 5	5,52	BEZKOROVAINY, 1966 (235)
Apotransferrine purifiée sur Se- phadex ; pH 7	5,54	BEZKOROVAINY, 1966 (236)
Transferrine saturée en fer; pH 7	5,75	BEZKOROVAINY, 1966 (237)
Transferrine saturée en fer et débarrassée de l'acide sialique; pH 7	5,99	BEZKOROVAINY, 1966 (238)

(a) $\times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

(b) Moyenne de 9 mesures

(c) $D_{20 w}^{\circ}$

Tableau XII

Valeurs de la viscosité intrinsèque de la transferrine humaine suivant différents auteurs

Conditions des mesures	[η]	Références
Fraction IV-7 totale (a) de SURGENOR et coll. (voir p.9); ClNa 0,15 M	0,055	ONCLEY et coll., 1947 (239)
Apotransferrine ; ClNa. 0,15 M	0,042	SCHULTZE, GOLLNER et coll., 1955 (240)
Apotransferrine C ; tampon acétate de pH 5	0,046	BEZKOROVAINY et RAFELSON, 1964 (241)
Apotransferrine ; tampon acétate 0,15 M de pH 5 et de conductance 6.100	0,039	BEZKOROVAINY, 1966 (242)
Apotransferrine ; tampon cacodylate 0,05 M ClNa 0,1 M, de pH 7 et de conductance 10.600	0,041	BEZKOROVAINY, 1966 (243)
Transferrine saturée en fer, tampon de pH 7	0,040	BEZKOROVAINY, 1966 (244)
Asialotransferrine saturée en fer, tampon de pH 7	0,039	BEZKOROVAINY, 1966 (245)

(a) Renferme 76 p. 100 de transferrine. Cette valeur ne peut être prise en considération.



Tableau XIII

Valeurs de la masse moléculaire de la transferrine humaine déterminée par l'application de différentes méthodes physico-chimiques.

Procédés utilisés	Masse moléculaire	Références
<u>Diffraction de la lumière</u>	90 000	MORRISON et LOUTIE, 1952 (246)
	88 000	SCHÖNENBERGER, 1955 (247)
<u>Osmométrie</u>	93 000	ONCLEY, SCATCHARD et coll., 1947 (248)
	73 200	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (249)
<u>Sédimentation + diffusion</u>	89 000	SCHULTZE, HEIDE et coll., 1957 (250)
	82 500	HAZEN, 1963 (251)
	91 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (252)
	92 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (253)
	86 000	BEZKOROVAINY, 1966 (254)
	73 800	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (255)
<u>Sédimentation + viscosité</u>	93 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (256)
<u>Equilibre de Sédimentation</u>	82 700	ALLERTON, 1962 (257)
	69 700	CHARLWOOD, 1963 (258)
	93 000 + 3 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON et LIKHTE, 1963 (259)
	114 000 ± 5 000	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (260)
	73 400	TANFORD, 1967 (261)
	80 000	
<u>Diffusion + viscosité</u>	95 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (262)
<u>"Gel filtration"</u>	70 000	SILBERZAHN, RICHARD et coll., 1967 (263)
<u>Teneur en fer à la saturation</u>	90 000	SURGENOR, KOEHLIN et coll., 1949 (264)
	90 000	KOEHLIN, 1952 (265)
	86 000	KATZ, 1961 (266)
	86 000	JANDL et KATZ, 1963 (267)
	93 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963
	74 100	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (269)

268
LILLE

Tableau XIV

Valeurs des constantes physiques diverses
de la transferrine humaine

		Valeurs	Références	
E	$\frac{1p.100}{278-280 \text{ m}\mu}$	<u>Apotransferrine</u>	11,2	KOECHLIN, 1952 (270)
			10,9	SCHÖNENBERGER, 1955 (271)
			11,2	KELLER et PENNEL, 1959 (272)
			11,7	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (273)
			11,9	ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (274)
			11,4	AISEN et coll., 1967 (275)
			<u>Transferrine saturée</u>	14,1
E	$\frac{1p.100}{460 \text{ m}\mu}$	<u>Transferrine saturée</u>	0,57	SCHADE, REINHART et coll., 1949 (277)
			0,57	SURGENOR, STRONG et coll., 1949 (278)
			0,595	BEZKOROVAINY, 1966 (279)
		<u>Volume spécifique partiel</u>		
		- mesuré	0,725	ONCLEY, SCATCHARD et coll., 1947 (280)
				KOECHLIN, 1957(281);SCHULTZE, HEIDE et coll., 1957 (282)
		- calculé	0,722	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (283)
		<u>Pouvoir rotatoire spécifique</u>		
		- <u>Apotransferrine</u>		
		$[\alpha]_{25}^{25}$		
		546,1 m μ ; eau	-57°+2	KOECHLIN, 1952 (284)
		589 m μ ; tampon pH 8,3	-49	BEZKOROVAINY et GROHLICH, 1967 (285)
		- <u>Transferrine saturée</u>		
		$[\alpha]_{589}^{589}$ m μ ;	-55	BEZKOROVAINY et GROHLICH, 1967 (286)
		f/fo		
		<u>Apotransferrine</u>	1,28	INMAN, 1956 (287)
			1,31	BEZKOROVAINY, 1966 (288)
		<u>Transferrine saturée</u>	1,27	BEZKOROVAINY, 1966 (289)
		<u>Rapport axial</u>		
		<u>Apotransferrine</u>	1/3	INMAN, 1956 (290)
			1/2	BEZKOROVAINY, 1966 (291)
		<u>Transferrine saturée</u>	1/3	BEZKOROVAINY, 1966 (292)

1° - Composition en glucides

La nature glycoprotéinique de la transferrine a été démontrée, dès 1952, par KOECHLIN (293), et par SURGENOR, KOECHLIN et STRONG (294) qui ont trouvé en taux d'oses neutres de 1,8 p. 100.

a - Composition centésimale

La première détermination complète de la composition centésimale en glucides de la transferrine a été effectuée par SCHULTZE, GÖLLNER et coll. (295). D'autres travaux furent réalisés par la suite et nous avons rassemblé dans le tableau XV (p. 45) les résultats obtenus par les auteurs. On voit que ces valeurs sont très différentes suivant les expérimentateurs et qu'il s'imposait d'effectuer des déterminations d'une manière "statistique". En effet, la connaissance, à un mole près, de la composition en oses de la transferrine était nécessaire pour entreprendre sur des bases solides l'exploration de la structure du glycanne.

b - Composition molaire

Les oses "neutres" ont été identifiés pour la première fois par chromatographie sur papier au galactose et au mannose par SCHULTZE, SCHMIDT BERGER et coll. (296) en 1958. En outre, les auteurs ont signalé la présence de traces d'acide ~~mannique~~ et de fucose, mais ces résultats ne reçurent ultérieurement aucune confirmation. La présence de galactose et de mannose a été vérifiée par nous-même, en 1961 (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (297), puis par JAMIESON (298), en 1964. L'osamine a été identifiée, pour première fois, à la glucosamine et l'acide sialique à l'acide N-acétylneuraminique par nous même, en 1961 (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY) (299). Ce dernier résultat concernant l'acide sialique a été confirmé par JAMIESON (300) en 1966.

Nous avons précisé, dans le tableau XVI (p. 46) la composition molaire en oses de la transferrine suivant SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT en 1958 (301) et JAMIESON, en 1965 (302). On voit que les résultats obtenus par les deux auteurs, associés à ceux que nous avons publiés, en 1961 et en 1965` révèlent un désaccord profond que nous discuterons plus loin.

Tableau XV

Composition centésimale (en g p. 100) en glucides de
la transferrine humaine d'après différents auteurs

Hexoses (a)	Fucose	Osamines (b)	Acides sialiques (c)	Acides uroniques	Références
1,8	-	-	-	-	KOECHLIN, 1952 (303) ; SURGENOR, KOECHLIN et STRONG, 1949 (304).
1,8	-	1,3	0,9	-	SCHULTZE, GÖLLNER et coll., 1957 (305)
2	-	-	0,25	-	SCHULTZE, HEIDE et coll., 1957 (306)
2,4	0,07	1,7-2	1-1,4	0,05	SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et coll., 1958 (307)
2,4	0,07	2	1,4	-	HEIMBURGER, HEIDE et coll., 1964 (308)
2,8	-	1,8	1,2	-	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (309)
2,5	-	1,3	1,4	-	JONES et PERKINS, 1965 (310)
2,6	-	-	1,3	-	JAMIESON, 1964 (311)

a) Galactose + mannose.

b) La nature de l'osamine n'a été précisée par aucun auteur.

c) Exprimé en acide-N-acétylneuraminique.



Tableau XVI

Composition molaire en oses de la transferrine suivant
différents auteurs

	SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT, 1958 (312) (a)	JAMIESON, 1965 (313) (b)
Galactose	8	4
Mannose	4	8
Fucose	1	-
N-acétylglucosamine	8	8
Acide N-acétyl sialique	4	4

(a) Pour une masse moléculaire de 88 000

(b) Pour une masse moléculaire de 90 000



2 - Composition en amino-acides

Les premiers dosages d'acides aminés dans la transferrine ont été effectués par SCHULTZE, HEIDE et MULLER (314), en 1957. Ils ont été répétés, à plusieurs reprises, par les mêmes auteurs et nous avons fait figurer dans le tableau XVI (p.46) les résultats les plus récents que ces derniers ont fourni. Nous y avons ajouter ceux qui ont été effectués ensuite par PARKER et BEARN (315), en 1962 et par BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll. (316), en 1963.

Dans le tableau XVII (p. 48), nous avons précisé le nombre de résidus d'acides aminés par mole de transferrine. On voit que dans l'ensemble, les résultats obtenus par les différents auteurs sont assez concordants sauf dans les cas, -cependant très importants du point de vue de l'application des procédés de rupture sélective des chaînes peptidiques-, de l'arginine et de la lysine, de la cystéine, de la méthionine, du tryptophane et de la tyrosine et de la leucine.

V - STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE

Quand nous avons commencé nos recherches, aucun travail concernant la structure de la transferrine n'avait été entrepris. Actuellement encore, nos connaissances sur cette dernière sont encore très fragmentaires et la plupart d'entre elles sont les résultats de nos propres travaux.

A - STRUCTURE DE LA PROTEINE

Les recherches se limitent actuellement aux résultats suivants :

1 - L'acide aminé N-terminal est la valine (GÖLLNER, 1955 (317) ; PUTNAM, 1955 (318) ; MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (319) ; (voir p.177); BEARN et PARKER, 1966 (320) ; JEPPSSON, 1967 (321).

Aucune recherche sur la nature de l'acide aminé C-terminal n'a été effectuée sauf par nous-même (voir p.181).

2 - La présence d'un seul acide aminé N-terminal a longtemps fait penser que la protéine était constituée par une chaîne polypeptidique unique. Cette manière de voir avait trouvé une confirmation dans les travaux de PARKER, CRESTFIELD et BEARN, 1963 (322) qui n'avait pas mis en évidence de sous-unités après réduction des ponts disulfure et alkylation des groupements SH.

Sérine	3,9 (a)	3,7 (a)	4,38
Thréonine	3,5 (a)	2,8 (a)	3,71
Tryptophane	1,6	4,4 (f)	2,10
Tyrosine	4,9	3,1 (c) (g)	4,61
Valine	4,7	5,0 (a)	5,40
Total	94,5	92	95,20

(a) Extrapolé au temps zéro de l'hydrolyse.

(b) Somme de l'acide cystéique et de la demi-cystéine.

(c) Valeur probable obtenue en faisant les moyennes des valeurs aux trois temps d'hydrolyse.

(d) Valeur de l'acide cystéique.

(e) Somme de la méthionine et de la méthionine sulfone.

(f) Application de la méthode spectrophotométrique de BENCZE et SCHMID (327).

(g) Valeur spectrophotométrique : 2,8 p 100 .

Tableau XVIII

Composition en acides aminés de la transferrine humaine exprimée en moles
par mole de transferrine humaine

	Résultats de PARKER et BEARN, 1962	Résultats de BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963.	Résultats de HEIMBURGER et coll., 1964	Résultats de ROOP et PUTNAM, 1967
Valeur de la masse molé- culaire	90 000	92 000	90 000	90 000
Acide aspartique	82	80	89	91,0
Acide glutamique	62	62	71	66,1
Arginine	28	25	30	30,1
Histidine	19	21	22	21,5
Lysine	60	60	68	67,5
Alanine	59	58	63	65,7
Cystine / 2	40	23	44	39,6
Glycocolle	51	54	54	58,0
Isoleucine	15	14	17	16,8
Leucine	60	57	66	69,8
Méthionine	10	24	9	9,4
Phénylalanine	28	30	31	33,2
Proline	36	35	35	38,8
Sérine	42	39	44	42,9
Thréonine	32	25	32	33,5
Tryptophanne	8	22	10	-
Tyrosine	26	18	25	29,1
Valine	47	46	48	48,7
Total	705	694	827	762



Cependant, JEPSSON (329) a récemment démontré que la rupture des ponts disulfure entraînait l'apparition de deux sous-unités d'une masse moléculaire de 39 000 et de 44 000. En outre, sur la carte peptidique de l'hydrolysate tryptique de l'une de ces deux sous-unités existe un peptide qui ne se révèle pas avec les réactifs à la ninhydrine mais seulement avec le réactif de RYDON et SMITH. L'auteur conclut qu'il existe donc, outre la valine, une autre amino-acide N-terminal dont la fonction NH_2 est bloquée.

Nous verrons que nos propres résultats confirment ceux de JEPSSON (voir p.183).

B - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

Les seules informations, très fragmentaires, que l'on possède sur la structure de la fraction glucidique de la transferrine sont les suivantes :

- 1 - La transferrine contient deux groupements glycaniques (JAMIESON, 1964 (330) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL, 1965 (331)) dont la composition en oses semble être identique.
- 2 - L'hydrolyse acide partielle des glycanes fournit les enchaînements suivants : N-acétyllactosamine, deux mannobioses isomères, un mannotriose, comme dans de nombreuses autres glycoprotéines (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON, 1962, (332) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK, 1965 (333)).
- 3 - L'acide sialique se trouve en position externe (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON, 1962 (334) ; JAMIESON, 1964 (335) ; ROBINSON et PIERCE, 1964 (336), MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK, 1965 (337)). En effet, les neuraminidases éliminent sélectivement l'acide sialique de la glycoprotéine et conduisent à une asialoprotéine.

L'élimination de l'acide N-acétylneuraminique s'accompagne de modifications profondes de la mobilité électrophorétique qui ont été étudiées par POULIK (338) dès 1959-1961, par PARKER et BEARN, 1961 (339) et par BLUMBERG et WARREN, 1961 (340). Ces auteurs ont montré, en faisant varier la concentration en enzymes que l'on pouvait obtenir jusqu'à 5 bandes en électrophorèse en gel d'amidon qui correspondent à des transferrines contenant 0, 1, 2, 3 ou 4 résidus d'acide sialique.

4 - L'action successive de la neuraminidase, puis de la galactose-oxydase montre que l'acide sialique est conjugué à des résidus de galactose (ROBINSON et PIERCE) (341) (voir aussi nos résultats, p.164).

5 - JAMIESON (342) a récemment proposé le schéma de structure de la figure 5 sur la base des résultats expérimentaux suivants :

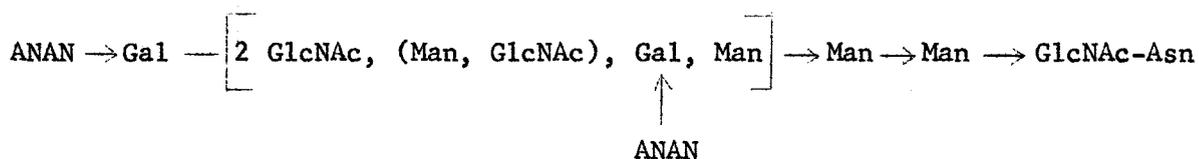


Figure 5

a - L'hydrolyse acide ménagée (HCl 0,15 N, à 100°C) libère immédiatement l'acide sialique et, en 4 h, un résidu de galactose et deux résidus de N-acétylglucosamine. Le mannose apparaît tardivement et occupe donc une position "interne" (voir aussi nos résultats p.152).

b - L'oxydation périodique détruit la totalité de l'acide N-acétylneuraminique et la galactose. La moitié de l'osamine et 75 p. 100 du mannose résistent à l'oxydation.

c - La dégradation récurrente de SMITH (343) donne, après le premier cycle un diholoside constitué de mannose et de N-acétylglucosamine (1 : 1) et un glycopeptide contenant du mannose, de la glucosamine et de l'acide aspartique, dans les rapports 2 : 1 : 1. Après le second cycle, l'auteur obtient un glycopeptide renfermant les mêmes composants dans les rapports 1:1:1. Le troisième cycle fournit une substance constituée de glucosamine et d'acide aspartique (1 : 1).

C - MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

Nous avons les premiers démontré sans ambiguïté que les deux glycanes étaient conjugués, dans la transferrine, par une liaison de type N-(β -aspartyl)- N-acétylglucosaminyldamine (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL, 1965 (343a)), (voir p.218). Ce mode d'attache avait été posé en hypothèse, mais non démontré, par JAMIESON (344), en 1964 et 1965. Cet auteur a confirmé nos résultats, en 1967 (345), en isolant par dégradation récurrente de SMITH d'un glycopeptide de la transferrine le chaînon asparagine -N-acétylglucosamine (voir plus haut).

VI - LE POLYMORPHISME ET LES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE (+)

Le manque d'homogénéité des résultats concernant les propriétés physico-chimiques de la transferrine peut s'expliquer, dans une certaine mesure, par le polymorphisme de ce protéide qui a été révélé par SMITHIES (352), en 1957, à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon.

A - CARACTERISTIQUES ELECTROPHORETIQUES DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE

1 - La grande majorité des sérums humains donne, en électrophorèse en gel d'amidon, une bande unique de transferrine que SMITHIES (353) avait désignée par les lettres β C. Certains sérums donnent une bande supplémentaire, plus rapide chez certains sujets (bande β B), plus lente chez d'autres (bande β D) qui a été identifiée, elle aussi, à de la transferrine (SMITHIES et HILLER (354) ; GIBLETT, HICKMAN et SMITHIES (355) ; ALLISON (356)).

2 - Chacune des bandes B et D présente, en outre, des variations de mobilité qui sont contrôlées génétiquement, tandis que la bande C possède un comportement invariable (Fig. 6 ; p. 53). On connaît actuellement 18 variants génétiques, dont nous avons précisé la nature dans le tableau XIX (p. 54) en les classant par ordre de mobilité croissante.

(+) Revues générales : SMITHIES et CONNELL (346) ; BARNICOT (347) ; GIBLETT (348) ; AUDRAN (349) ; BEARN et PARKER (350) ; FINE (351).

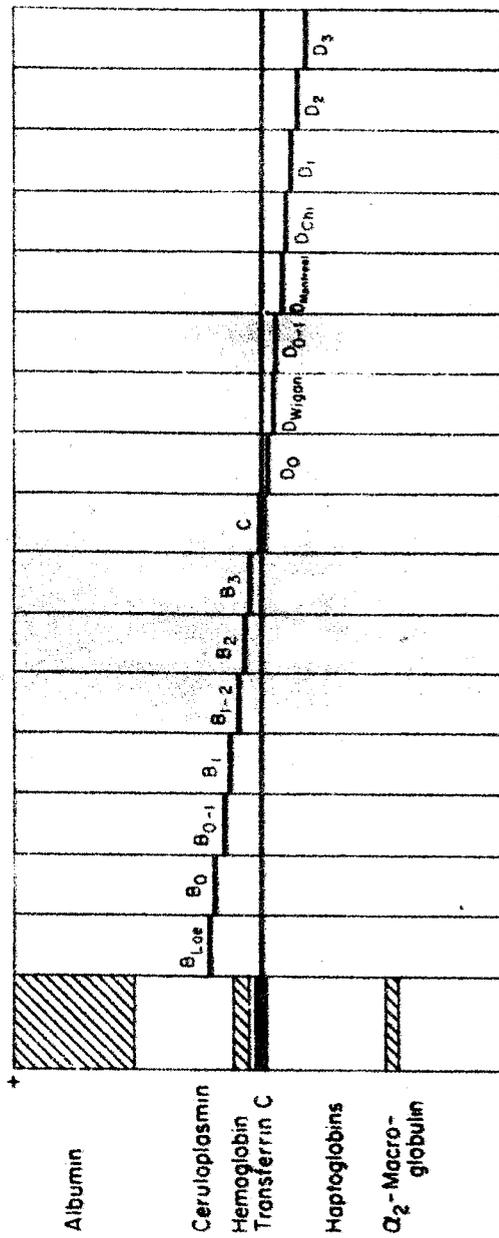


Figure 6

Carte électrophorétique (électrophorèse en gel d'amidon) de 16 des 18 variants génétiques de la transferrine (in BEARN et PARKER) (357).



Tableau XIX

Variants de la transferrine sérique humaine

Désignation de la transferrine	Origine	Références
D3	Noir américain	GIBLETT, HICKMAN et SMITHIES, 1959 (358)
D2	Noir africain	HARRIS, ROBSON et SINALCO, 1958 (359)
D1	Noir américain	SMITHIES, 1957 (360)
D Chi	Chinois	PARKER et BEARN, 1961, (361)
D Montréal	Caucasien-canadien	PARKER et BEARN, 1962 (362)
D4 ou Do-1	Anglais	HARRIS, PENINGTON et coll., 1960 (363)
D wigan	Anglais	GLEN-BOTT, HARRIS et coll., 1964 (364)
Do	Noir américain	GIBLETT, HICKMAN et SMITHIES, 1959 (365)
D Adélaïde	Australien-irlandais	COOPER, LANDER et KIRK, 1964 (366)
C		
B3	Japonais	PARKER et BEARN, 1961 (367)
B2	Caucasien-canadien	SMITHIES, 1958 (368)
B1 - B2	Indien-vénézuélien	ARENDS, GALLANGO et coll., 1962 (369)
B1	Caucasien-anglais	HARRIS, ROBSON et SINALCO, 1958 (370)
B Atalante	Grec	MURRAY, ROBINSON et BLUMBERG, 1964 (371)
Bo - 1	Indien Navajo	PARKER et BEARN, 1961, (372)
Bo	Américain	GIBLETT, HICKMAN et SMITHIES, 1959 (373)
B Lae	Nouvelle Guinée	LAI, 1963 (374)

(+) ROOP et PUTMAN (375) ont identifié, en 1967, un nouveau variant : le variant D-Raiford

3 - Ces variants génétiques sont sous la dépendance de trois gènes alléomorphes TfB, TfC et TfD qui conduisent aux 6 phénotypes : BB, CC, DD, BC, BD et CD. Suivant le phénotype, le sérum renfermera, respectivement, les transferrines B, C ou D ou le mélange des transferrines B + C, B + D et C + D.

Dans les populations européennes, le phénotype homozygote CC est observé avec une fréquence de 99 p.100 (95 p.100 en Asie et en Afrique).

B - PROPRIETES GENERALES DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE

1 - Les variants génétiques de la transferrine possèdent les caractères identiques suivants :

- taux de fixation du fer (ALLISON) (376).
- réactions immunologiques (ALLISON (377) ; PARKER et BEARN (378)).
- teneur en acide sialique.
- constante de sédimentation (PARKER et BEARN) (379).

2 - Toutefois, on observe des différences dans la composition et dans la structure des fractions protéiques par l'application de l'électrochromatographie aux hydrolysats protéasiques. Par exemple, dans le cas des transferrines C et D₁ (SUTTON et BOWMAN) (380), 3 peptides spécifiques sont présents dans les hydrolysats tryptiques de cette dernière.

Dans le cas des transferrines C et D₁, les hydrolysats chymotrypsiques contiennent un peptide spécifique : 1 C pour la transferrine C et 1 D₁ pour la transferrine D₁, dont la composition en acides aminés est la suivante :

	1 C	1 D ₁
Lysine	2	2
Sérine	1	1
Acide glutamique	1	1
Phénylalanine	1	1
Acide aspartique	1	0
Glycocolle	1	2

Les transferrines C et D₁ différencieraient donc seulement par le remplacement, dans la protéine, d'un résidu d'acide aspartique pour un résidu de glycolle. Ce résultat pourrait expliquer le comportement électrophorétique plus anodique de la transferrine C en tampon basique (WANG et SUTTON) (381) ; WANG, SUTTON et SCOTT (382)).

Par une expérimentation analogue, WANG, SUTTON et RIGGS (383) ont montré que, dans la transferrine B₂, un résidu d'acide glutamique remplaçait un résidu de glycolle de la transferrine C.

C - ISOLEMENT DES TRANSFERRINES B, C ET D

L'isolement des transferrines B, C et D a été réalisé, à partir des mélanges BC et CD, par électrophorèse préparative en gel d'amidon (PARKER et BEARN (384) ; SUTTON et KARP (385) ; WANG et SUTTON (386) ; JEPSSON (387)) et par "électrofocalisation" (JEPSSON) (388). L'application de ce dernier procédé a permis à JEPSSON (389) d'obtenir, par exemple, les transferrines D₁, B₁ et B₂. L'étude de ces transferrines est actuellement en cours.

Nota : A côté du polymorphisme génétique de la transferrine, plusieurs observations sont en faveur soit de l'existence d'un polymorphisme non génétique de la transferrine, soit de la présence de protéides différents de cette dernière mais capables de fixer le fer.

JEPSSON et SJOQUIST (390), par chromatographie sur CM-cellulose de la transferrine C ont obtenu deux fractions qui possèdent des propriétés immunologiques, biologiques et physiques identiques mais qui présentent de légères variations dans leur composition glucidique, dans leur composition en fer et dans la carte des peptides après digestion tryptique. Selon les auteurs, il existerait donc, dans le sang, deux transferrines différentes.

En outre, au cours du fractionnement et de l'isolement de la transferrine C par chromatographie sur TEAE cellulose, SHIRASAWA (391) a révélé l'existence d'un composé mineur qui fixe le fer, renferme 5 à 10 p.100 de la radio-activité totale de la transferrine et possède en électrophorèse en gel d'amidon vertical une migration anodique plus faible que le composé majeur. Un résultat identique a été obtenu par FABER et JORDAL (392) qui ont caractérisé une globuline α_1 fixant le fer.

VII - REPARTITION, METABOLISME ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA TRANSFERRINE

A - REPARTITION DE LA TRANSFERRINE

La transferrine constitue le véhicule du fer à travers tout l'organisme. Un individu normal possède de 10 à 11 g de transferrine dont 52 à 53 p.100 sont extra-vasculaires, selon AWAI et BROWN (393) et 56 à 62 p.100, selon KATZ (394).

1 - La transferrine des liquides biologiques

a - La transferrine se trouve essentiellement dans le sang, à la concentration de 2 g p.litre environ. Ce résultat a été obtenu soit par des procédés physico-chimiques, soit par des méthodes immunologiques (JAGER (395) ; BAMBACH (396) ; WOODWORTH et SCHADE (397)).

b - Les urines normales contiennent de la transferrine (BERGGÅRD (398) et on estime que 8 à 9 p.100 de la transferrine sont éliminés quotidiennement dans les urines (AWAI et BROWN) (399). Ce taux est beaucoup plus élevé dans les urines de néphrotiques (HARDWICKE (400) ; HORST (401) ; NIESERT (402)) et peut atteindre, selon RIFKIND et coll. (403) 1,6 g par 24 h. MAIORCA et SCARPIONI (404) ont démontré que les transferrines sérique et urinaire étaient identiques.

c - Le liquide céphalo-rachidien contient de la transferrine (EWERBECQ (405) ; BUCHER et coll. (406) ; GAVRILESCO et coll. (407) ; BURTIN (408) CLAUSEN et MUNKNER (409) à la concentration de $10,26 \pm 3,3$ mg p.litre (GOODMAN et VULPE) (410). En se fondant sur la forme asymétrique de l'arc de précipitation donnée, en immuno-électrophorèse, par la transferrine du liquide céphalo-rachidien, CLAUSEN et MUNKNER (411) ont montré qu'il existait deux composés qui seraient, selon PETTE et STUPP (412) et FRICK et SCHEIDSEYDEL (413) de la transferrine et de l'asialotransferrine. Ces composés posséderaient des groupements glycaniques incomplets (PARKER, HAGSTROM et BEARN) (414) et seraient synthétisés par le système nerveux central (FRICK et coll. (415) ; ROSENTHAL et SOOTHILL (416)). Selon SCHULTZE et HEREMANS (417), il s'agit d'un cas d'allomérisme prosthétique ou d'immaturité moléculaire.

d - Dans le lait, la transferrine a été identifiée, en 1959, par plusieurs auteurs (HANSON (418) ; HUIDOBROTECH (419) ; FILIPE DA SILVA et MONTEIRO (420) ; BLANC (421)), SCHWICK, ESSER et KOCH (422) estiment que le taux de transferrine dans le lait est de l'ordre de 10 mg p.litre. Les transferrines du lait et du plasma donnent des réactions immunologiques d'identité parfaite.

e - Enfin, la transferrine a été caractérisée dans les liquides biologiques suivants : la bile (HARDWICKE et coll.) (423) ; les sécrétions nasales (ROSSEN et coll.) (424) ; la salive (GABL et WACHTER) (425) ; la lymphe (MOORE, MINNICH et WELCH) (426)

2 - La transferrine des tissus

La présence de transferrine dans les tissus a pu être démontrée par électrophorèse en gel d'amidon dans le foie et le rein (MC LENNAN et LEWIS) (427) ou par la technique des anticorps fluorescents (LANE) (428) dans le foie qui est le grand producteur de transferrine.

B - METABOLISME DE LA TRANSFERRINE

Chez l'adulte, la transferrine est essentiellement synthétisée dans le foie (voir la revue générale de SCHULTZE et HEREMANS (429) et aussi SAADI et Von der DECKEN (430). Toutefois, selon certains auteurs, la rate, les nodules lymphatiques, la moelle des os et la muqueuse intestinale interviendraient aussi dans sa synthèse, mais à un degré moindre.

La quantité de transferrine catabolisée quotidiennement est de 1 g environ (FREEMAN) (431) et sa demi-vie a été fixée entre 7 et 8 jours par KATZ (432), entre 8 et 10 jours par AWAI et BROWN (433) et à 12 jours par GITLIN et coll. (434).

Selon plusieurs auteurs, le foetus semble synthétiser sa propre transferrine dès la 8^e semaine (SHEIDEGGER, MARTIN et RIOTTON) (435). En effet, le foie des embryons de 3 mois incorpore du ¹⁴C-glycocolle dans la transferrine (DANCIS, BRAVERMAN et LIND) (436). En outre, les phénotypes transferriniques peuvent être différents chez la mère et chez l'embryon : C pour l'une, C et D₁ pour l'autre (RAUSEN, GERALD et DIAMOND) (437).

Enfin, les transferrines de cordon ombilical d'enfants prématurés sont immatures : elles ne renferment pas d'acide N-acétylneuraminique et leurs groupements polyosidiques sont incomplets (PARKER et BEARN (438) et PARKER, HAGSTROM et BEARN (439)).

C - LA TRANSFERRINE ET LE METABOLISME DU FER

Il nous est impossible de décrire en détail les mécanismes du métabolisme du fer et nous renvoyons le lecteur aux revues générales de BLANC (440) de DREYFUS (441, 442), de DREYFUS et SCHAPIRA (443, 444), de LAURELL (445, 446), Nous nous limiterons donc à un résumé schématique de la question (Fig. 7 ; p. 60).

La transferrine intervient :

1 - d'une part, entre le fer alimentaire et les formes de réserve transitoires ou durables de la ferritine et de l'hémosidérine ;

2 - et, d'autre part, entre ces dernières et les formes "actives" de conjugués du fer : hémoglobine, et myoglobine, cytochromes, catalases et peroxydases, métalloflavo-protéines.

Le fer alimentaire conjugué (10 à 20 mg p. jour) est dissocié par l'acidité gastrique, réduit en ions ferreux par l'acide ascorbique et, peut-être aussi, par des groupements SH.

Nota Récemment, DAVIS et coll. ont isolé du suc gastrique la gastroferrine, protéide de masse moléculaire élevée, qui est capable de fixer du fer et qui contrôlerait la concentration en ions-fer libres et régulariserait l'absorption du fer (DAVIS, LUKE et DELLER (447, 448) ; LUKE, DAVIS et DELLER (449)). Un protéide semblable existerait dans la salive (REILLY, DAVIS et DELLER) (450).

Dans la fraction duodénale de l'intestin, le "fer gastrique", -auquel vient s'ajouter le "fer biliaire"-, passe dans les cellules intestinales (+)

(+) L'absorption du fer est accélérée par l'histidine et le fructose (FRONSTIN) (451). D'après COONS (452), elle serait réglée par les hormones hypophysaires.

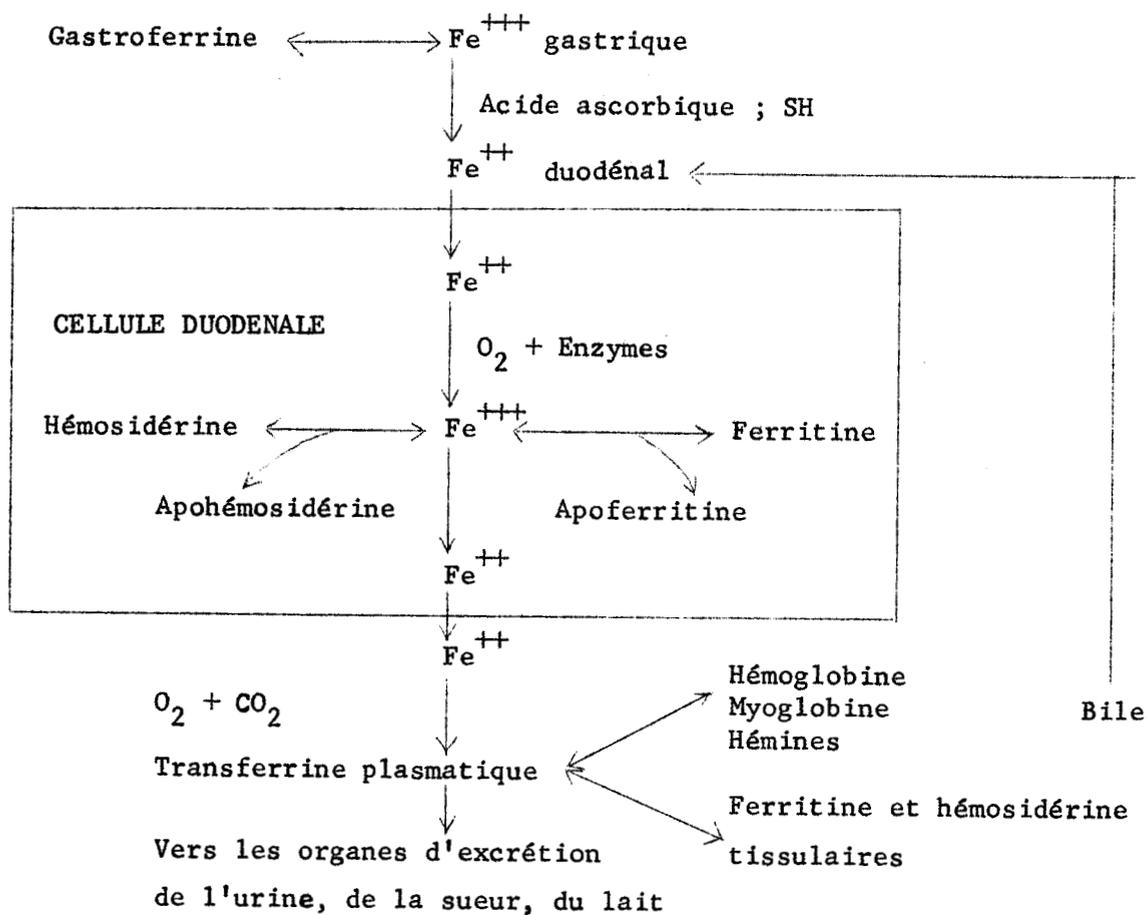


Figure 7

Rôle de la transferrine dans le métabolisme du fer.

Suivant GRANICK (453), il existerait un gradient de potentiel d'oxydo-réduction dans ces dernières qui provoquerait, dans un premier temps, l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques dont une partie, selon CROSBY (454) serait mise en réserve sous forme de ferritine (d'hémossidérine dans le cas de surcharges en fer). Vers la partie apicale de la cellule, les ions ferriques seraient réduits, dans un second temps, en ions ferreux qui, diffusant dans le plasma, sont pris en charge par les molécules non saturées de transferrine. Celle-ci dirige le fer soit vers des tissus comme le foie, la rate et la moelle osseuse, où il est mis en réserve sous forme de ferritine ou d'hémossidérine, soit vers les organes érythropoïétiques où le fer est utilisé suivant un mécanisme encore très mal connu (voir à ce sujet MORGAN et LAURELL (455) ; SCHADE (456) ; FLETCHER et HUEHNS (457)), soit, encore vers les points de synthèse des enzymes hémiques, soit enfin vers les organes d'excrétion (1 à 2 mg p. jour) de l'urine, de la sueur et du lait.

Nota Selon certains auteurs, le rôle de la transferrine ne se limiterait pas au transport du fer et le protéide interviendrait dans certaines chaînes d'oxydation cellulaire. En outre, d'après BARBER (458) et BARBER et SCHELLER (459), la transferrine serait un inhibiteur de la formation des peroxydes lipidiques.

D - PATHOLOGIE DE LA TRANSFERRINE (+)

L'importance du rôle de la transferrine explique le nombre élevé des recherches qui ont été effectuées dans le domaine de la Clinique. Celles-ci ont pris leur départ après la mise au point de procédés de dosage du fer sérique FS (voir p.105), qui est essentiellement conjugué à la transferrine et de mesure de la fixation du fer par la transferrine (voir p.107), qui ont permis de montrer que celle-ci circulait dans le sang sous une forme non saturée. Cette observation a conduit aux notions de capacité latente de fixation (C L), qui correspond à la transferrine non saturée-, et de capacité totale de fixation (C T) qui correspond à la transferrine totale.

(+) Voir, en particulier, DREYFUS (461, 462) ; DREYFUS et SCHAPIRA (463) ; LAURELL (464).

L'application de ces procédés de dosage a permis de tirer les conclusions suivantes :

- la concentration de la transferrine dans le plasma est de l'ordre de 2 à 3 g p. litre.

- elle est saturée à 40 p. 100 chez l'homme et à 35 p. 100 chez la femme, ce qui correspond à des taux de fer plasmatique de 1,35 (\pm 0,55) mg p. litre chez l'homme et de 1,2 (\pm 0,60) mg p. litre chez la femme.

La détermination des variations des paramètres FS, CL et CT apporte de précieux renseignements dans le diagnostic ou dans l'étude de l'évolution des maladies suivantes :

- Carence martiale : diminution de FS, augmentation de CT
- Anémies avec hémolyse : augmentation de FS, diminution de CT
- Ictères par hépatite : augmentation de FS, maintien ou diminution légère de CT
- Hémochromatoses et hémosidéroses : augmentation très importante de FS, diminution de CT
- Infections : diminution de FS et de CT.

Des cas d'atransferrinémie congénitale ont, en outre, été signalés par différents auteurs (RIEGEL et THOMAS (465), NITZIG et coll. (466), HEILMEYER et coll. (467)).

E - ACTION ANTIBIOTIQUE DE LA TRANSFERRINE

L'activité bactériostatique de la transferrine a été mise en évidence "in vitro" par SCHADE et CAROLINE (468) et par SCHADE (469). Elle s'expliquerait par une ferriprivation des milieux de culture. Toutefois, l'activité de la transferrine reste très faible "in vivo" (MARTIN et coll.) (470). Il est cependant intéressant de remarquer que la transferrine plasmatique se "désature" fortement dans les maladies infectieuses et que sa concentration dans le plasma augmente sensiblement dans les cas d'agammaglobulinémies (MARTIN) (471).

Etendue au virus, l'expérimentation a montré que la transferrine inhibait puissamment la multiplication en culture de tissus, des virus de la polyomélite et les adénovirus. Elle est sans action sur le virus de la vaccine.

VIII - LES AUTRES TRANSFERRINES ANIMALES

Des transferrines sériques ont été caractérisées et parfois isolées du sang de nombreux animaux. Nous nous limiterons à citer ces derniers en laissant aux lecteurs intéressés le soin de consulter une bibliographie dont l'importance va croissant et d'étudier l'évolution biologique de ces composés.

Jusqu'à présent, les recherches ont porté sur la transferrine des espèces suivantes :

- Porc (INGELMAN et LAURELL) (472), cristallisée par LEIBMAN et AISEN (473).
- Rat (GORDON et LOUIS) (474) ; DOLEŽALOVÁ et coll. (475)
- Cobaye (HAVEZ, BONTE, DAUTREVAUX et MOSCHETTO) (476)
- Souris (WATKINS, et coll.) (477)
- Carpe (SILBERZAHN, RICHARD et CREYSSEL) (478)
- Lamproie marine (BOFFA et coll.) (479)
- Anguilles (FINE, DRILHON et coll.) (480)
- Roussette (GOT, FONT et GOUSSAULT) (481) dont la transferrine est dépourvue d'acide sialique et possède un point isoélectrique élevé (pH 9,2)
- Poule dont WILLIAMS (482, 483, 484) a effectué une étude comparée de la transferrine sérique et de la conalbumine de l'oeuf et qui conclut que les deux protéides diffèrent seulement par leur groupement glucidique (voir aussi à ce sujet les recherches immunologiques de HEKTOEN et COLE (485), de BRUYNOCHE (486), de MARSHALL et DEUTSCH (487), de KAMINSKI et DURIEUX (488), d'OGDEN et coll. (489).

Comme dans le cas de la transferrine humaine, il existe un polymorphisme des transferrines animales : Singe Rhesus (ASTHON (490) ; BLUMBERG (491) ; LAI et KIRK (492) ; GALLANGO et ARENDS (493,494) ; GOODMAN et POULIK (495,496) ; PARKER et BEARN (497) ; GOODMAN et WOLF (498)) ; Chimpanzés (BOYER et YOUNG (499) ; PARKER et BEARN (500) ; GOODMAN et RIOPELLE (501) ; Boeuf (AHSTON (502) ; SMITHIES et HICKMAN (503)) ; Souris (COHEN (504) ; SHREFFLER (505)) ; Kangourou (COOPER et SHARMAN) (506) ; Lamproie marine (BOFFA, DRILHON et coll. (507) ; Poule OGDEN et coll (508) ; CROIZIER (509,510), STRATIL (511).

LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine est de découverte trop récente pour que ses propriétés physico-chimiques et biologiques soient bien définies. Nos connaissances à son sujet sont donc encore très fragmentaires et le chapitre des généralités que nous lui réservons sera très bref.

I - HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE LA LACTOTRANSFERRINE

A - MISE EN EVIDENCE DU FER CONJUGUE DANS LE LAIT DE FEMME

Le lait de Femme contient de 0,5 à 1 mg de fer p. litre et on sait à présent, que le métal est conjugué sous une forme réversible, comme dans le plasma.

La nature protéidique de la combinaison du fer dans le lait de Femme a été démontrée par les observations suivantes :

1 - L'analyse par électrophorèse sur papier des protéides totaux du lait additionné de fer radioactif révèle que ce dernier est lié à un protéide dont le comportement est identique à celui de la transferrine plasmatique (SCHÄFER (512) ; SCHÄFER et coll. (513)).

2 - L'addition de sels de fer à du petit lait humain, provoque, comme dans le cas du sérum, l'apparition d'une coloration rose-saumon (SCHÄFER (514) ; JOHANSSON (515)).

B - ISOLEMENT DE LA LACTOTRANSFERRINE

1 - MONTREUIL et coll. (516) et JOHANSSON (517) ont décrit simultanément, en 1960, un protéide rose-saumon qu'ils avaient isolé du Lait de Femme et dont ils donnaient les premières propriétés physico-chimiques.

La découverte de JOHANSSON était l'aboutissement de recherches entreprises depuis 1958 à la suite de la caractérisation d'une fraction protéique hétérogène, de coloration rose-saumon que l'auteur obtenait au cours de la préparation de la lactalbumine humaine par chromatographie sur des colonnes de phosphate de calcium, qui contenait une petite quantité de fer et présentait un maximum d'absorption de la lumière à 460-470 m μ , sans bande de SORET.

Le cheminement des travaux de MONTREUIL et coll. qui devait les conduire à la découverte de la lactotransferrine s'est effectué d'une manière différente. Les auteurs tentaient d'isoler les glycoprotéines du lait de Femme par précipitation fractionnée par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium, associé à un gradient de pH. Au cours des fractionnements, ils avaient été frappés par la coloration rose-saumon de certains filtrats et précipités, qui s'atténuait lors de l'acidification des solutions et s'intensifiait par neutralisation. Cette observation conduisit MONTREUIL et coll. à l'isolement d'une glycoprotéine qui était capable, comme la transferrine, de fixer réversiblement le fer mais qui se distinguait toutefois de ce protéide par ses propriétés physiques, chimiques et immunologiques. A cette glycoprotéine spécifique, les auteurs donnèrent le nom de lactosidérophiline (MONTREUIL et MULLET) (518) puis de lactotransferrine, (MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (519).

2 - La même année, GRÜTTNER, SCHÄFER et SCHRUTER (520), pour rattacher leurs résultats d'électrophorèse, isolèrent le protéide en appliquant le procédé de JOHANSSON, l'identifiant à leurs fractions électrophorétiques et décrivant quelques-unes de ses propriétés.

3 - Un peu plus tard, BLANC et al. (521) qui étudiaient les protéines présentes dans les filtrats du lait de Femme traité par le rivanol, découvrirent dans ces derniers une glycoprotéine à laquelle ils donnèrent d'abord le nom de lactoferrine. Par la suite, ayant reconnu l'identité de la lactoferrine et de la lactotransferrine, BLANC abandonna sa terminologie et adopta le nom que MONTREUIL et coll. avaient proposé.

Nota. Depuis 1966, HEREMANS reprend le terme de ~~xxxxx~~ lactoferrine proposé une première fois par BLANC, sous le prétexte suivant : "Since no structural relationship between this protein and the iron-binding protein from serum, transferrin, has yet been demonstrated, it would appear incautious to designate it by a name such as "lactotransferrin" or "lactosiderophilin". The prefix "lacto" is likewise rather ill-chosen, because, as we shall demonstrate, this protein is by no means specific for milk". (MASSON et HEREMANS) (523). SCHADE (524) a proposé récemment le terme d'ékrinosidérophi-line qui, d'après l'auteur, se justifie par la présence du protéide dans les tissus excréteurs.

Dans notre mémoire, nous utiliserons le terme de lactotransferrine pour les raisons suivantes :

1 - On utilise généralement le terme proposé par l' "inventeur" d'une substance et on ne lui substitue une autre désignation qu'après avoir sollicité au préalable son accord.

2 - La lactotransferrine ne présente certes pas, jusqu'à preuve du contraire, de relations structurales avec la transferrine, mais elle partage néanmoins avec celle-ci la propriété physico-chimique de fixer réversiblement le fer par un mécanisme analogue et sur des sites actifs identiques, et la propriété biologique de transporter le métal.

3 - La présence de lactotransferrine dans des tissus sécrétoires autres que la glande mammaire a été mise en évidence uniquement par des procédés immunologiques, sans le moindre fondement physico-chimique. Il n'existe donc aucune preuve de l'identité structurale de la lactotransferrine du lait et des lactotransferrines tissulaires.

4 - Un nouveau composé est généralement désigné par un terme qui précise le milieu d'où il a été extrait pour la première fois et on utilise couramment, par exemple, sans les trouver choquants, les noms de cholestérol bien que cette substance se trouve ailleurs que dans la bile et de sérine, bien que cet amino-acide entre dans la constitution d'autres protéines que la soie.

5 - BLANC lui-même utilise le terme de lactotransferrine.

II - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

A - PROCEDE DE MONTREUIL et coll..

Nous décrivons, dans le chapitre réservé à nos travaux personnels le procédé d'isolement de la lactotransferrine décrit par MONTREUIL et MULLET (525) et par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (526) car nous l'avons appliqué et nous avons, en outre, été amenée à tenter de le perfectionner.

B - PROCEDE DE JOHANSSON (527)

1 - Principe. Le lait délipidé est soumis à un fractionnement par le sulfate d'ammonium et le précipité obtenu à 80 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et à pH 8 est purifié par chromatographie sur DEAE-cellulose, puis sur gel d'apatite.

2 - Mode opératoire

a - Fractionnement par le sulfate d'ammonium. 4 litres de lait de Femme, délipidés par centrifugation et additionnés de 10 mg de sulfate ferreux, sont amenés à 45 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium à pH 8 et maintenus à 37°C pendant 30 mn. Le précipité est éliminé par filtration et la solution obtenue est ajustée à pH 4 avec de l'acide sulfurique 1 M. Un second précipité se forme qui est séparé par centrifugation et la solution surnageante est amenée à pH 8 et à 80 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité rouge obtenu est dialysé contre de l'eau distillée, puis contre une solution de phosphate de sodium 0,02 M à pH 8.

b - Purification par chromatographie. La "red-protein" est soumise à une première purification par chromatographie sur DEAE-cellulose en tampon phosphate 0,02 M de pH 8 qui l'élue dans la fraction de tête, puis à une seconde purification par chromatographie sur des colonnes de phosphate de calcium préparé selon le procédé décrit par TISELIUS et coll. (528), l'élution étant effectuée par le passage successif de solutions, à pH 8, de phosphate de sodium 0,03 M - 0,12 M et 0,5 M. La "red-protein" est éluee par le dernier tampon. Elle contient de 0,13 à 0,15 p. 100 de fer. Un procédé de préparation analogue a été décrit par GRÜTTNER et coll. (529).

C - PROCEDE DE BLANC et ISLIKER (530)

1 - Principe. La lactotransferrine est précipitée par l'éthanol du filtrat de défécation du lait par le rivanol et purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose.

2 - Mode opératoire. Le lait de Femme frais est délipidé par centrifugation à 20°C, pendant 20 minutes, à 900 g et soumis à une ultracentrifugation de 104.500 g, pendant 45 minutes, à 20°C, pour précipiter la caséine. Le surnageant clair ne contient plus que 0,03 g de caséine p. litre.

Le lactosérum, concentré au 1/12 de son volume, est soumis ensuite au fractionnement par le rivanol selon le procédé décrit par HOREJSI et SMETANA (531) (0,31 p. 100 de rivanol ; pH 7,9 ; repos de 30 mn à 20°C). La lactotransferrine se trouve dans le surnageant rivanolique obtenu après centrifugation à 900 g pendant 15 minutes à 20°C. L'addition de charbon animal (15 mg/ml) et l'agitation pendant 8 à 10 h à 2°C provoque une adsorption du rivanol ainsi que d'une partie des globulines β_2 et γ . Après centrifugation, le surnageant est soumis à une précipitation, à 0 - 6°C et à pH 6,8, par de l'éthanol (concentration finale : 25 p. 100). Le surnageant SN II est soumis à une chromatographie sur DEAE-cellulose. Un double gradient de pH décroissant et de force ionique croissante en tampon phosphate permet d'éluer la lactotransferrine pure.

Le rendement est de 85 p. 100 (500 mg de lactotransferrine p. litre de lactosérum).

D - PROCEDE DE GOT (532)

1 - Principe. Le précipité obtenu par l'addition d'un volume d'éthanol au lait de Femme est extrait par un tampon acétate de pH 4,6 qui permet d'éliminer la caséine insoluble. La solution est fractionnée par le sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu entre les molarités 2 M et 2,7 M à pH 4 contient la lactotransferrine qui est isolée par "filtration sur gel".

2 - Mode opératoire. Nous avons illustré par le schéma de la figure 8 (p. 70) le protocole expérimental de GOT qui conduit à une fraction P 66/4 (3,2 g p. 2 l de colostrum) qui renferme, de l' α -lactalbumine et une globuline sérique β 1 (GOT) (533). Une chromatographie sur Sephadex G-200 permet d'éliminer ces derniers composants (GOT) (534) ; GOT, GOUSSAULT et FONT (535)).

E - PROCEDE DE MASSON et HEREMANS

MASSON et HEREMANS (536) ont récemment décrit un procédé d'isolement de la lactotransferrine qui associe un fractionnement à la chromatographie sur DEAE-cellulose. Le lait écrémé est traité par le sulfate d'ammonium 2 M à pH 6,8 et le surnageant est additionné de citrate de sodium 0,1 M et d'EDTA, à pH 3,8. La solution obtenue après élimination du précipité est soumise à la chromatographie sur DEAE-cellulose avec des solutions tamponnées de phosphate de sodium de pH 7,6 : la lactotransferrine riche en fer est éluee à 0,005 de molarité ; les lactotransferrines pauvres en fer le sont à 0,007 et 0,01 de molarité.

III - FIXATION DU FER SUR LA LACTOTRANSFERRINE

Les études concernant la fixation du fer sur la lactotransferrine sont encore fragmentaires et nous pouvons résumer les résultats actuellement acquis de la manière suivante :

1 - Comme la transferrine, la lactotransferrine fixe réversiblement le fer, le zinc et le cuivre (MONTREUIL et MULLET, 1960 (537) ; MONTREUIL, TONNELAT et MULLET, 1960 (538) ; BLANC et ISLIKER, 1961 (539)).

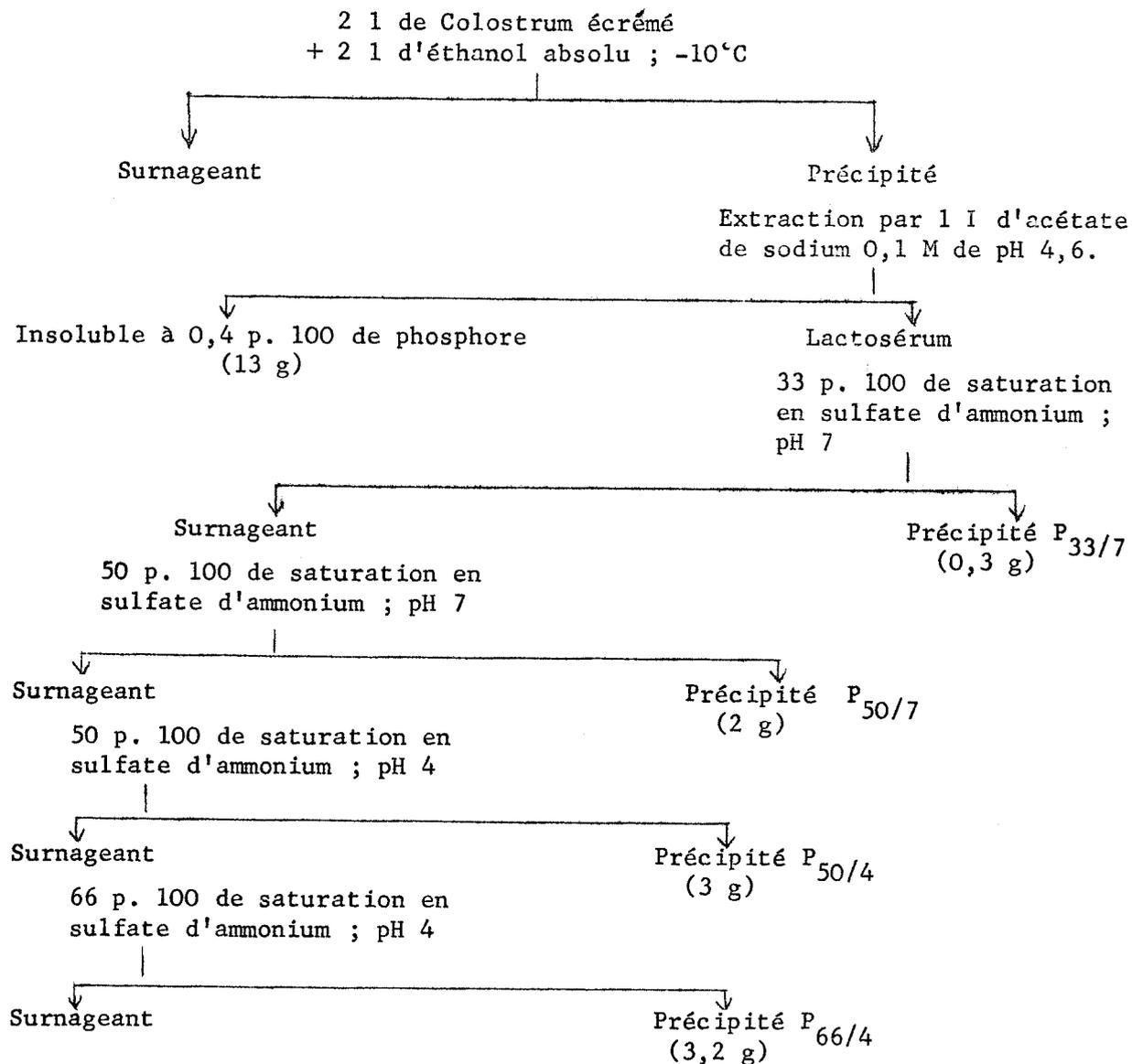


Figure 8

Schéma de fractionnement du colostrum de Femme selon GOT (540).

2 - La liaison fer-lactotransferrine est nettement plus stable que celle de la transferrine. En effet, le pH de dissociation totale est de 1,75 à 2 (MONTREUIL et MULLET (541) ; MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (542) ; JOHANSSON (543) ; BLANC et ISLIKER (544)) au lieu de 4 - 4,5.

La dissociation est réversible puisque le retour à un pH neutre par l'addition de soude à des solutions de lactotransferrine préalablement décolorées par l'addition d'acide chlorhydrique fait réapparaître la coloration rose avec son intensité initiale. Il s'agit donc d'une transferrine spécifique.

3 - Au moment où nous avons repris les travaux de MONTREUIL, l'accord n'était pas fait sur la capacité de fixation du fer par la lactotransferrine. En effet, selon MONTREUIL et coll., la lactotransferrine à saturation renfermait 3,5 p. 1000 de fer et 6 atomes de ce métal tandis que JOHANSSON (545) BLANC et ISLIKER (546) et GRÜTTNER et coll. (547) fixaient le nombre à 2, pour une teneur en fer de 1,1 à 1,5 p. 1000. Cette dernière valeur a été confirmée par nos propres travaux (voir p.110) et par ceux de MASSON et HEREMANS (548). Nous analyserons plus loin (voir p.112) les raisons de l'erreur commise par MONTREUIL et coll.

4 - Comme dans le cas de la transferrine, les bicarbonates sont nécessaires pour assurer la fixation du fer (BLANC et ISLIKER (549) ; MASSON et HEREMANS (550)).

5 - Le mécanisme de la fixation des métaux sur la lactotransferrine et les sites actifs semblent être analogues à ceux de la transferrine. En effet, selon WINDLE, WIERSEMA, CLARK et FEENEY (551) les spectres de résonance paramagnétique électronique sont caractéristiques du fer Fe^{+++} . Ils démontrent, en outre, qu'il n'y a pas d'interaction magnétique entre les différents atomes de fer et que chacun de ces derniers est, comme dans la transferrine, coordonné octaédriquement aux trois atomes d'oxygène de trois résidus de tyrosine, à deux atomes d'azote de la protéine et à un ion bicarbonate. Toutefois, il reste à expliquer la grande stabilité des complexes de la lactotransferrine.

IV - PROPRIETES PHYSIQUES et CHIMIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine possède des propriétés physico-chimiques qui ont été définies par MONTREUIL et MULLET (552) et MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (553) et, pour quelques unes d'entre elles, par JOHANSSON (554) et par BLANC et ISLIKER (555).

Ces propriétés sont différentes, comme l'ont souligné, les premiers, MONTREUIL et coll., de la transferrine sérique et d'autres lactoprotéides comme la lactoperoxydase de THEORELL et AKESON (556) et de POLIS et SHMUKLER (557) et comme les ferrilactines de BLOCK et ZWEIG (558) et ZWEIG et BLOCK (559) qui sont des combinaisons ferriques réversibles de l' α -lactalbumine et des β -lactoglobulines (+).

A - PROPRIETES PHYSIQUES

Nous avons rassemblé dans le tableau XX (p. 73) les propriétés physiques de la lactotransferrine telles qu'elles avaient été définies, avant le début de nos recherches, par MONTREUIL et coll., par JOHANSSON et par BLANC et ISLIKER. Nous verrons, à l'exposé de nos résultats personnels, que, d'une part, nous avons pu rectifier plusieurs des données de ces auteurs, -en particulier, celles qui concernent la masse moléculaire, le comportement électrophorétique et la capacité de fixation du fer-, et que, d'autre part, nous avons complété cette liste par quelques acquisitions nouvelles.

B - PROPRIETES CHIMIQUES

MONTREUIL et MULLET (560) et MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (561) ont démontré, en 1960, la nature glycoprotéinique de la lactotransferrine. Celle-ci fut confirmée, en 1961, par BLANC et ISLIKER (562). Toutefois, ces auteurs s'étaient limités à la détermination de la composition centésimale en glucides du protéide (Tableau XXI p. 74). L'étude de la composition molaire en oses et en acides aminés de la lactotransferrine a fait l'objet, jusqu'à présent, de nos seuls travaux que nous exposerons donc dans le chapitre réservé à nos résultats personnels.

(+) Ces ferrilactines sont capables de fixer des quantités élevées de fer (jusqu'à 34,2 g de fer/100 g de ferrilactines) et leur coloration varie du blanc au jaune et au brun foncé pour des proportions de fer, respectivement, de 3 à 4 g, 6 à 15 g et 18 à 34,2 g/100 g de ferrilactines.

Tableau XX
Propriétés physiques de la lactotransferrine humaine connues en 1960

	MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (563)	JOHANSSON (564)	BLANC et ISLIKER (565)
λ max	452,5 m μ	460-470 m μ	455 m μ
E _{10 mg/ml} 1 cm ; 280 m μ	11,7	11,5	11,5
E _{10 mg/ml} 1 cm : à 452,5 m μ ; pH 7	0,5 (\pm 0,01)	-	0,5
: à 460 m μ ; pH 9	-	0,4 à 0,45	-
: à 465 m μ ; pH 7,9	-	-	-
E _{1 μg fer/ml} 1 cm ; 452,5 m μ	0,0144 (\pm 0,0004)	-	-
Constante de sédimentation	4,8 - 5,1	-	4,5 (a)
Constante de diffusion	4,6	-	-
Volume partiel spécifique	0,735	-	-
Masse moléculaire			
déterminée par la constante de sédimentation	95.000	-	-
déterminée par la diffusion de la lumière	89.000	-	-
calculée d'après la teneur en fer	100.000	-	-
Mobilité électrophorétique (en cm ³ /V/sec/10 ⁻⁵)			
tampon véronal pH 8,6 ; μ 0,1	- 3,5	-	-
tampon véronal pH 8,2 ; μ 0,025	-	-	3,5
tampon glycine pH 9,85 ; μ 0,1	-	-	-
Capacité de fixation du fer (à pH 7-7,5) (b)			
en μ g de fer p. mg de protéide	3,47 (\pm 0,13)	1,3 à 1,5	1,1 (c)
en atomes de fer p. mole de protéide	6	-	2
pH de dissociation totale du complexe fer-protéine	1,75 à 2	environ 2	2

BUS
LILLE

(a) Valeurs de GRUTTNER et coll. (566) : 4,4.

(b) A saturation pour MONTREUIL et coll., mais sans spécification pour les autres auteurs.

(c) Valeurs de GRUTTNER et coll. (567) : 1.

Tableau XXI

Composition centésimale en glucides de la lactotransferrine.

	Valeurs de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (568)	Valeurs de BLANC et ISLIKER (569)	Valeurs de GOT, GOUSSAULT et FONT (569a)
Oses neutres p.100	3,90	4,10	3,70
Osamines p.100	22,40	2,30	2,00
Acides sialiques p.100	0,87	0,80	0,90



V - STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Aucun résultat n'avait encore été acquis sur la structure de la lactotransferrine quand nous entreprîmes nos recherches. Actuellement, encore, les connaissances sont très fragmentaires. Nous les décrivons en détail en exposant nos résultats personnels, mais nous pouvons néanmoins les résumer de la manière suivante :

- 1 - La lactotransferrine possède 2 groupements glycaniques construits sur le modèle classique des glycanes d'origine animale : acide sialique et fucose en position externe ; galactose en position subterminale ; mannose dans la fraction "stable".
- 2 - Un des groupements est uni à la protéine par des liaisons de type N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminyamine et le deuxième par une liaison O-thréonylglycosidique.

VI - REPARTITION ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

A - REPARTITION

1 - Le lait de Femme renferme, d'après MONTREUIL, 1 à 1,5 g de lactotransferrine par litre. Cette valeur supérieure à celle que propose BLANC (570) (0,6 g p. l) a été obtenue par des dosages "colorimétriques" effectués après traitement de laits préalablement saturés en fer.

Des recherches récentes ont montré que la lactotransferrine était plus largement répandue dans l'organisme.

2 - BISERTE, HAVEZ et CUVELIER (571) ont, les premiers, démontré que de cette protéine était présente dans les expectorations bronchiques. Ce résultat fut confirmé par MASSON, HEREMANS et PRIGNOT (572), grâce à l'application de techniques immuno-histochimiques qui ont mis en évidence la lactotransferrine dans les cellules séreuses elles-mêmes des acini des glandes bronchiques.

3 - Dans une autre série d'expériences, MASSON, HEREMANS, et PRIGNOT (573) ont identifié, par immunoélectrophorèse, la lactotransferrine dans la salive (non contaminée par les expectorations bronchiques).

4 - Puis, MASSON, HEREMANS et DIVE (574) et MASSON et HEREMANS (575) ont montré, grâce à la technique d'OUCHTERLONY, qu'il y avait une réaction d'identité immunologique totale entre la lactotransferrine isolée du lait de Femme et les protéides renfermant du fer isolés des liquides d'excrétion suivants :

- sécrétions nasales (0,1 mg p. ml)
- larmes (0,1 mg p. ml)
- bile (0,01 à 0,04 mg p. ml)
- suc pancréatique (0,05 à 0,1 mg p. ml)
- sécrétions génitales (0,5 à 1 mg p. ml)
- urine (0,001 mg p. ml)

La lactotransferrine n'a pas été mise en évidence dans le liquide céphalo-rachidien, dans la sueur et dans le sérum.

Nota : Dans tous les liquides d'excrétions cités ci-dessus, existent, à côté de la lactotransferrine de très faibles quantités d'une autre protéine qui fixe le fer et qui proviendrait de la transferrine sérique.

5 - Enfin, LOISILLIER et coll. (576) ont montré, par l'application des méthodes immunologiques d'OUCHTERLONY et par des réactions d'hémagglutination, la présence de la lactotransferrine dans les tissus sains d'origine gastrique et colique. Ils trouvent, en outre, que le taux de lactotransferrine est plus élevé dans les mêmes tissus cancéreux.

B - METABOLISME DE LA LACTOTRANSFERRINE

Le métabolisme de la glycoprotéine elle-même est parfaitement inconnu et on ignore, en particulier, les relations qui pourraient exister entre la transferrine et la lactotransferrine. La question se pose, en effet, de savoir si la lactotransferrine est synthétisée de novo ou à partir de fragments de la molécule de transferrine.

C - LA LACTOTRANSFERRINE ET LE METABOLISME DU FER.

Le rôle de la lactotransferrine du lait est évident. Elle apporte au Nourrisson, sous une forme spécifique, le fer dont celui-ci a besoin. Ainsi s'expliqueraient certaines anémies par ferriprivation que l'on observe chez les enfants alimentés au lait de vache. En effet, dans celui-ci existe aussi une lactotransferrine (voir p.77) dont le fer est peut-être moins bien assimilé par le Nourrisson que celui de la lactotransferrine humaine.

Le passage du fer de la transferrine sérique sur la lactotransferrine a été bien étudié par BLANC (577,578) qui a montré que la transmission pouvait s'effectuer par deux voies (Fig.9; p. 78) :

- l'une, la plus probable, est "directe" et, grâce à la plus grande affinité de la lactotransferrine pour le fer, que la transferrine, -vérifiée expérimentalement par BLANC-, le fer transferrinique est prélevé par la lactotransferrine.

- l'autre, qui semble a priori la plus normale, comprendrait un "relai" par la ferritine et par l'hémosidérine mammaires.

D - ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Comme la transferrine et par le même mécanisme de ferriprivation, la lactotransferrine possède une activité antibiotique sur différents micro-organismes (MASSON, HEREMANS, PRIGNOT et WAUTERS (579) ; BLANC (580) ; MASSON et HEREMANS (581), comme S.aureus, S.albus, Pseudomonas aeruginosa. La lactotransferrine a été identifiée, dans le lait de Vache, par ORAM et REITER (582) au facteur inhibiteur de la croissance de B. subtilis et de B. stearothermophilus de FRANKLIN, WILLIAMS et GLEGG (583) et de CHEESEMAN et JAYNE-WILLIAMS (584). L'activité de la lactotransferrine s'ajoute à celle d'autres facteurs présents dans les laits comme le lysozyme, les anticorps, le complément et les leucocytes auxquels REITER et ORAM (585) ont récemment consacré une revue générale.

VII - LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

La présence d'une "protéine rouge" ("red protein" dans le lait de Vache a été signalée pour la première fois par SØRENSEN et SØRENSEN (586) qui décrivent, en 1939, une méthode d'isolement du composé. Ce procédé conduisait à une préparation très impure que POLIS et SHMUKLER (587), en 1963, tentèrent sans succès d'améliorer. Ces auteurs purent toutefois préciser que ce protéide contenait du fer, des glucides et une proportion élevée de tryptophane.

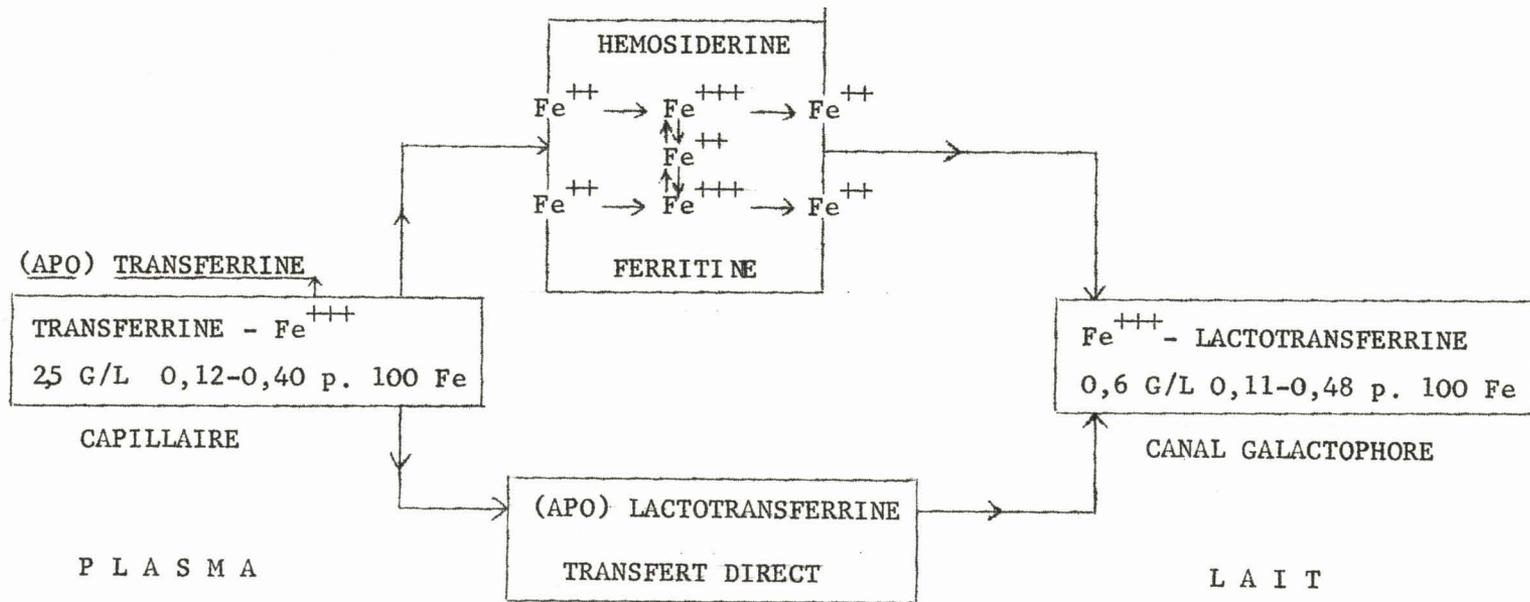


Figure 9

Voies possibles du transfert du fer au niveau de la cellule glandulaire mammaire (BLANC) (588).



C'est finalement GROVES (589) qui, le premier, réussit, en 1960, à isoler le protéide à l'état pur et qui en détermina les principales propriétés physico-chimiques. Ultérieurement, GORDON et coll. (590) décrivent un autre procédé original de préparation de la lactotransferrine bovine qui fournissait de meilleurs rendements. Le principe des procédés consiste à extraire par l'acide acétique la lactotransferrine du précipité de caséine obtenu par acidification du lait de Vache à pH 4,6, à fractionner ensuite la solution par le sulfate d'ammonium et à soumettre à la chromatographie sur DEAE-cellulose ou sur Amberlite IRC - 50 le précipité obtenu entre 40 et 65 p.100 de la saturation en sulfate d'ammonium.

Les propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine bovine ont été déterminées par GROVES (591,592). La composition en glucides et en acides aminés a été précisée par GROVES (593) et par BLANC, BUJARD et MAURON (594). Comme dans le cas de la lactotransferrine humaine, il s'agit d'une glycoprotéine capable de fixer réversiblement 2 atomes de fer par mole. Les principales caractéristiques sont les suivantes :

S_{20}^0	5,25 - 5,55
D_{20}^w	5,75
VSP	0,725
Masse moléculaire	86.100
Point isoélectrique	7,8
Oses "neutres"	4,3 à 4,73 p.100
Osamines	2,12 à 2,28 p.100
Acides sialiques	0,3 p.100

Des variants génétiques ont été mis en évidence par GROVES, PETERSON et KIDDI (595) par "disc electrophoresis".

La comparaison des propriétés immunologiques de la lactotransferrine bovine (GUGLER et coll.)(596) ; DERECHIN et JOHNSON (597) avec celle de la transferrine bovine a conduit les auteurs à la conclusion que les deux protéides sont différents, comme dans le cas de la transferrine et de la lactotransferrine humaines.

VIII - TRANSFERRINE ET LACTOTRANSFERRINE

La transferrine et la lactotransferrine sont immunologiquement différentes (MONTREUIL et MULLET (598) ; MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (599) ; BLANC (600) ; BLANC et ISLIKER (601)). Leurs propriétés physico-chimiques et leur structure doivent donc, en principe, être très dissemblables. Certes, les deux protéides possèdent quelques caractères communs comme la coloration rose-saumon et la capacité de fixer réversiblement le fer, mais les premières études comparatives réalisées par MONTREUIL et coll., en 1960 ont permis de mettre en évidence plusieurs caractères distinctifs comme la composition centésimale en glucides, la grande stabilité du complexe fer-lactotransferrine, la capacité de fixation du fer, la mobilité électrophorétique. Toutefois, ces points de comparaison étaient peu nombreux et ne permettaient pas de tirer des conclusions définitives sur la structure comparée des deux protéides qui auraient pu apporter des renseignements sur leur comportement physico-chimique et sur leur origine. Seule, en effet, la connaissance de la structure fine de la transferrine et de la lactotransferrine permettra de résoudre ces deux problèmes. C'est à ce travail que nous nous sommes attachée.

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Nous avons rassemblé dans ce chapitre les résultats que nous a apporté l'application d'une série de méthodes dont le but était essentiellement de mettre en évidence les différences de structure qui font de la transferrine et de la lactotransferrine deux entités immunologiquement distinctes et de rechercher les sites antigéniques spécifiques. En effet, comme avaient antérieurement démontré MONTREUIL et coll. (602,603) et BLANC et ISLIKER (604), la transferrine réagit uniquement avec les antisérums spécifiques des protéides sériques et la lactotransferrine avec les antisérums spécifiques des protéides lactés. Nous avons répété ces expériences, en utilisant les procédés d'immunodiffusion d'OUCHTERLONY et d'immuno-électrophorèse. Les figures 10a et 10b, qui confirment les résultats des auteurs précédents, illustrent cette notion de spécificité antigénique de la transferrine et de la lactotransferrine.

Le plan que nous avons adopté pour présenter nos travaux personnels est le suivant :

En premier lieu, nous décrivons uniquement les procédés que nous avons appliqués pour préparer la lactotransferrine car ce protéide n'est pas encore commercialisé, contrairement à la transferrine. Celle-ci nous a, en effet, été fournie par la firme BEHRINGWERKE, grâce à l'obligeance de Messieurs les Professeurs SCHULTZE, HAUPT, HEIDE et SCHWICK auxquels nous adressons nos vifs remerciements.

Nous exposerons, ensuite, d'une manière comparative, les résultats que nous avons obtenus, à la fois, à propos de la transferrine et de la lactotransferrine et qui concernent les problèmes suivants :

- les propriétés physiques
- la fixation du fer
- la composition centésimale en oses et en acides aminés
- la structure de la fraction glucidique
- la structure de la protéine
- les modalités de l'attache glycanne-protéine

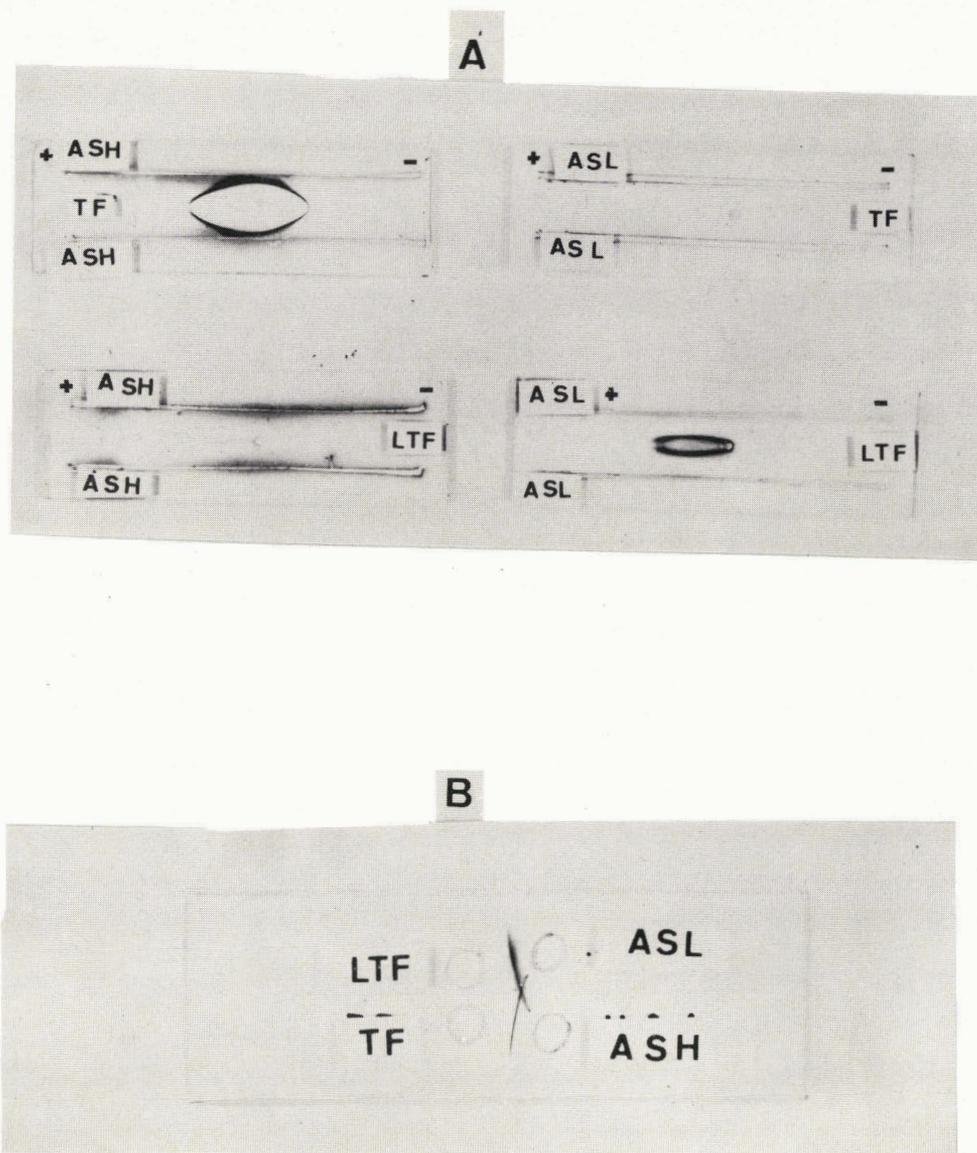


Figure 10



En A : Immuno-électrophorèse de la transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF). ASH : sérum de Lapin antiprotéides sériques humains. ASL : sérum de Lapin anti-protéides du lait de Femme.

En B : Immunodiffusion selon OUCHTERLONY. Le croisement des arcs de précipitation est la conséquence d'une réaction de non-identité totale entre les deux protéides.

PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nous avons appliqué le procédé original de MONTREUIL et coll. (605,606) que nous avons, en outre, tenté d'améliorer (+). Nous décrivons donc, successivement,

- 1 - La méthode de MONTREUIL et coll.;
- 2 - Les modifications apportées à celle-ci.

L'application de ces procédés nous a fourni des fractions qui ont été systématiquement soumises aux analyses suivantes destinées à préciser le degré de **leur hétérogénéité** : électrophorèse en gélose ; électrophorèse sur acétate de cellulose ; immuno-électrophorèse (++) ; dosage des glucides (oses "neutres" ; osamines ; acide N-acétylneuraminique) (voir p.136). En outre l'ultracentrifugation a été appliquée à certaines préparations.

I - APPLICATION DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET

A - PRINCIPE

Le lait délipidé est soumis à un fractionnement préalable associant un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH. La fraction obtenue par précipitation à saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7 est soumise à la chromatographie sur Amberlite XE 64.

B - MODE OPERATOIRE

1 - Fractionnement par le sulfate d'ammonium

3 litres de lait de Femme, délipidés par une centrifugation à 0°C, sont neutralisés et soumis à un fractionnement par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium associé à un gradient de pH suivant le schéma de la figure 11 (p. 85).

Ce procédé est d'application générale. Il offre l'avantage d'effectuer un "découpage" profond des protéides et de fournir des fractions enrichies en certains constituants :

(+) Avec la collaboration de M. Jacques DESCAMPS

(++) Ces procédés sont devenus tellement classiques que nous n'avons pas jugé utile de décrire leurs protocoles expérimentaux.

Lait délipidé : 1/3 de saturation
 en sulfate d'ammonium : pH 7

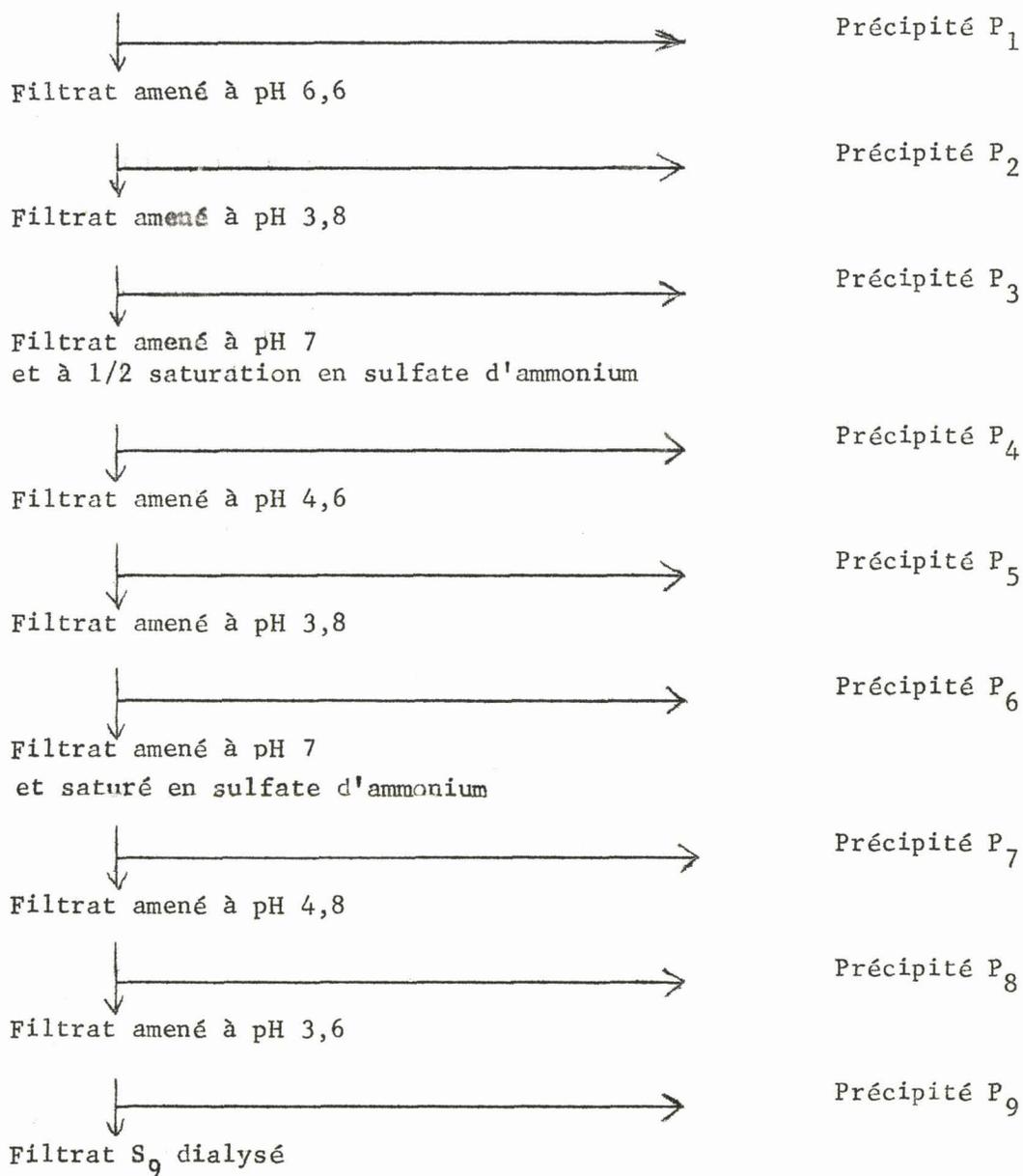


Figure 11

Schéma du fractionnement des protéides du lait de Femme par le sulfate d'ammonium selon MONTREUIL, HAVEZ et MULLET (607).

P₁ est riche en globulines immunes IgG et IgM ;

P₄ renferme surtout des globulines γ A ;

P₇ contient principalement de la lactotransferrine.

Le précipité P 7, de teinte rose, est débarrassé du sulfate d'ammonium par dialyse et purifié par chromatographie sur Amberlite XE 64.

2 - Purification par chromatographie sur Amberlite XE-64

La solution de 2 à 3 g du précipité P 7 est passée sur une colonne d'Amberlite XE-64 (+) (3,5 x 60 cm ; "mesh" 200-400 ; forme citrate).

a - Préparation de la résine :

La résine "neuve" est traitée suivant le protocole de HIRS (608) : 1,5 k de résine sont agitées mécaniquement dans 3,5 litres d'eau distillée pendant 20 minutes. Après un repos de 2 h, le liquide surnageant est éliminé et l'opération est répétée 4 à 5 fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair. La résine est ensuite séchée à l'air. Le lavage à l'eau distillée est suivi d'un lavage avec 4 l d'acétone. La résine filtrée sur Büchner est lavée par l'acétone jusqu'à ce que le filtrat obtenu soit limpide. La résine, séchée à l'air, est lavée avec 20 l environ d'eau distillée sur filtre Büchner. La résine est ensuite mise sous la forme "citrate" par l'application du procédé de SCHMID et coll. (609).

b - Passage à la forme "citrate" de la résine

La résine en suspension dans 5 l d'eau distillée, est traitée sous agitation continue par 1,5 l de soude 10 N pendant 4 h. Elle est ensuite lavée deux fois sous agitation avec de l'eau distillée pendant 1 heure. Elle est enfin transférée sur un filtre Büchner et lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH de l'effluent atteigne 10. La résine est alors amenée sous la forme "acide".

c - Passage à la forme "acide" de la résine

La forme "acide" de la résine est obtenue par le passage lent (4h environ) de 10 l d'acide chlorhydrique 3 N, suivi d'un lavage avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH des eaux de lavage voisin de 5. La résine peut être conservée sous cette forme à 0°C, en présence de chloroforme.

(+) Résine carboxylique fournie par ROHM et HAAS Company, Philadelphia, Pa. 19 105.

d - Préparations des colonnes de chromatographie

La résine est d'abord "équilibrée" avec le tampon d'élution (citrate de sodium 0,05 M de pH 5,2) en agitant 1 k de résine dans 5 litres du tampon, pendant une nuit, en maintenant le pH à 5,2 au pH.stat. La résine est ensuite lavée sur filtre Büchner par le tampon d'élution (environ 30 l) et est introduite dans les colonnes. Celles-ci sont ensuite "stabilisées" par le passage du tampon d'élution pendant 24 à 48 heures.

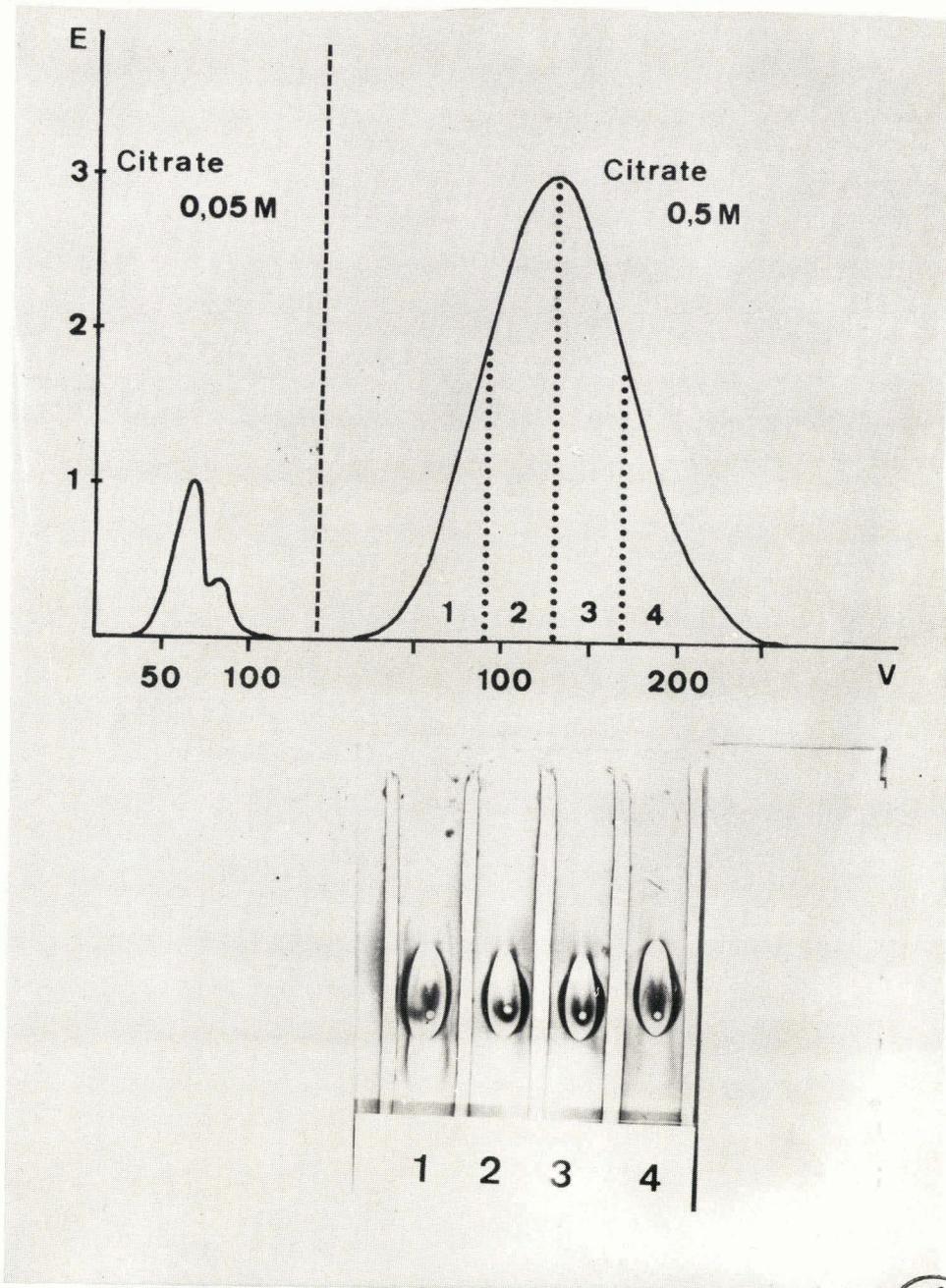
Nota. Conservation de la résine. La résine, sortie de la colonne, est lavée par décantation avec de l'eau distillée, traitée par 5 l d'acide chlorhydrique 3 N p. k de résine, lavée de nouveau avec de l'eau distillée par décantation, puis sur filtre Büchner jusqu'à neutralité de l'effluent. La résine est ensuite mise sous la forme "citrate" (voir plus haut).

e - Technique chromatographique

Sur une colonne (3,5 x 60 cm), réfrigérée à +4°C, d'Amberlite XE-64, on introduit 2 à 2,5 g de précipité P 7 en solution dans 20 ml de citrate 0,05 M de pH 5,2. L'élution de la colonne par le même tampon (0,5 ml p. mm ; fractions de 10 ml) fournit un premier pic ("Pic 1") (Fig 12 p.88). Le passage d'un tampon citrate 0,50 M de pH 6,2 donne un second pic, très important et coloré, en rose. Ce pic est asymétrique et est flanqué, généralement, de deux autres pics mineurs incolores.

Tous les tubes ^{colorés} en rose-saumon, et qui correspondent à la partie centrale du pic majeur, sont rassemblés et représentent la fraction "Pic 2". La lactotransferrine est précipitée, saturant celle-ci en sulfate d'ammonium à pH 3,8. Après un repos de 48 h, à +4°C, le précipité est recueilli par centrifugation, dialysé jusqu'à réaction négative avec le réactif de NESSLER et lyophilisé. Ce mode opératoire est rendu indispensable par les difficultés que l'on rencontre à éliminer par dialyse le citrate de sodium.

Le rendement est de l'ordre de 10 à 25 p.100 (500 mg de lactotransferrine p. litre de lait).



BUS
LILLE

Figure 12

Chromatographie sur Amberlite XE-64 (3,5 x 60 cm ; forme "citrate") des protéides (2 g) du précipité P₇ (voir Fig. 11 ; p. 85) En abscisses : nombre de fractions de 10 ml recueillies. En ordonnées : absorbances mesurées à 278 mμ en cuve de 1 cm d'épaisseur

C - RESULTATS

L'application du procédé original de MONTREUIL et coll. nous a donné des résultats analogues à ceux de ces auteurs :

1 - Le fractionnement du lait de Femme par le sulfate d'ammonium fournit un précipité P₇ (1 à 1,5 g p. litre de lait) hétérogène en électrophorèse et en immuno-électrophorèse qui révèlent la présence, d'une façon constante - outre de la lactotransferrine -, de lactalbumine et de 3 préalbumines, et, de manière inconstante, de globulines γ A. Sa teneur en glucides est la suivante :

Oses "neutres"	17,2 à 18,2 p. 100
Osamines	6, 25 p. 100
Acide sialique	4,15 à 5 p. 100

L'ultracentrifugation révèle la présence de 4 constituants dont les constantes de sédimentation, déterminées pour les 3 constituants les plus "légers" et à la seule concentration de 10 mg p. ml sont les suivantes : 1,75, 4,55 et 6,85. Ces pics correspondent vraisemblablement aux constituants du "pic 1" (voir ci-dessous), à la lactotransferrine et aux globulines γ A.

2 - La chromatographie sur Amberlite XE-64 fournit les pics 1 et 2 (Fig. 12 ; p. 88) dont les propriétés sont très différentes :

a - le pic 1 (0,3 g p. 2 g de précipité P₇ ; soit 0,15 à 0,20 g p. litre de lait) possède les caractéristiques suivantes :

- Il est légèrement coloré en jaune.
- Il ne possède pas de constituants antigéniques.
- Il contient une proportion élevée de glucides :

Oses "neutres"	25 à 30 p. 100
Osamines	20 à 22 p. 100
Acide sialique	6 à 10 p. 100

- Il est riche en fucose et ne contient pas de mannose. Les rapports molaires des oses sont, en effet, les suivants :

Galactose	4
Fucose	2
Galactosamine	1
Glucosamine	3
Acide N-acétylneuraminique	1

- Il est homogène à l'ultracentrifugation et sa constante de sédimentation $S_{20}^0_w$ égale 2,3.

b - Le pic 2 (1 g p. 2 g de précipité P_7 ; soit 0,75 g p. litre de lait) présente les caractéristiques suivantes :

- Il possède une coloration rose-saumon
 - Il est homogène en électrophorèse en gélose mais hétérogène en électrophorèse sur acétate de cellulose (2 bandes) et en immuno-électrophorèse qui révèle la présence, outre de la lactotransferrine, de globulines γA .

- Sa composition centésimale est la suivante :

Oses "neutres"	2,94 à 4 p. 100
Osamines	2,53 à 2,79 p. 100
Acide sialique	1,3 à 1,41 p. 100

- Il renferme du galactose, du mannose, du fucose, de la glucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique.

c - L'immuno-électrophorèse, appliquée à différentes fractions du pic 2 (Fig. 12 ; p. 88), montre que la fraction de tête (Fraction 1 ; 0,15 g environ) est hétérogène et renferme, outre la lactotransferrine, deux composants de comportement β_1 et α_2 et un constituant de comportement cathodique γ (+).

La fraction 4 (0,08 g environ) est, elle aussi, hétérogène et possède un constituant de comportement β_1 qui donne un arc de précipitation "interne" par rapport à celui de la lactotransferrine.

Les fractions "centrales" du pic (Fractions 2 et 3) (0,15 g environ) renferment seulement de la lactotransferrine homogène en électrophorèse, en immuno-électrophorèse et à l'ultracentrifugation xxxxxxxxxxxxxxxx Rassemblées, elles représentent les préparations de "lactotransferrine XE-64.

(+) L'arc donné par ce constituant se raccorde à celui de la lactotransferrine et fournit une image identique à celle que BLANC (610) et nous-mêmes obtenons avec une lactotransferrine dégradée par des protéases.

D - CONCLUSIONS

- 1 - L'application du procédé de MONTREUIL et coll. nous a fourni, comme à ces auteurs, des préparations pures de lactotransferrine à raison de 0,5 g par litre de lait, avec un rendement de 85 p. 100. Le lait de Femme, contient, en effet, d'après nos travaux effectués d'une manière très quantitative, de 700 à 900 mg de lactotransferrine par litre. Cette valeur est intermédiaire entre celles de BLANC (0,6 g) et de MONTREUIL (1 à 1,5 g).
- 2 - Les préparations que nous avons obtenues par ce procédé ont été utilisées pour nos études physico-chimiques et structurales.
- 3 - Nous avons tenté d'améliorer le rendement en appliquant, au pic 2, la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ou de CM-cellulose, afin d'éliminer les impuretés en évitant le "découpage" du pic 2 et la perte des fractions de tête et queue (Fractions 1 et 4).

II - MODIFICATIONS DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET

A - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

- 1 - Principe. Nous avons appliqué la méthode chromatographique sur DEAE-cellulose décrite par GROVES (611), à propos de la lactotransferrine du lait de Vache. L'élution des protéides est obtenue avec un gradient discontinu de concentration en phosphate de sodium et de pH.
 - 2 - Mode opératoire. Les protéides totaux du pic 2 (voir p.90) (7 g en solution dans 100 ml de tampon phosphate 0,005 M de pH 8) sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (4 x 50 cm) de DEAE-cellulose stabilisée avec un tampon phosphate 0,005 M de pH 8. Le déplacement des constituants est effectué par le passage successif des tampons suivants :
 - phosphate 0,005 M - pH 8
 - phosphate 0,05 M - pH 7
 - phosphate 0,1 M + ClNa 0,5 M - pH 4
- Les solutions effluents sont dialysées et lyophilisées. Les protéides sont ensuite soumis à l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique. Enfin, leur composition en glucides est déterminée.

3 - Résultats

a - La figure 13 (p. 93) illustre le résultat du fractionnement chromatographique sur DEAE-cellulose du pic 2. On voit que nous avons caractérisé 5 fractions dont nous avons précisé dans le tableau XXII (p.94) les quantités que nous avons obtenues, la composition en glucides et le degré d'hétérogénéité révélé par l'immuno-électrophorèse (Fig. 14 ; p. 95)

b - La fraction 1 est pondéralement la plus importante et représente 70 à 80 p. 100 des protéides totaux soumis à la chromatographie. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Elle renferme uniquement de la lactotransferrine, mais celle-ci est partiellement dénaturée comme le démontre la morphologie de l'arc de précipitation qui présente une bifidité cathodique se raccordant exactement sur l'arc de la lactotransferrine native.

- Cette dénaturation est confirmée par l'ultracentrifugation qui révèle la présence de deux constituants de $S_{20}^0 w$ 4,55 et 6,70 (+).

- La composition en glucides de cette fraction est différente de celle de la lactotransferrine (voir p.114). Les taux d'osamine et d'acide sialique, en effet, sont très nettement diminués.

- Elle donne deux bandes distinctes en électrophorèse sur acétate de cellulose.

c - Les autres fractions sont obtenues en proportion moindre. Elles sont toutes très hétérogènes et renferment des taux de glucides plus élevés que la lactotransferrine.

d - La fraction 2 est colorée en rouge-saumon et renferme de la lactotransferrine très dénaturée comme l'indique la présence de l'arc de dénaturation mentionné plus haut.

(+) $S_{20}^0 w$ de la lactotransferrine 4,80 et 4,85

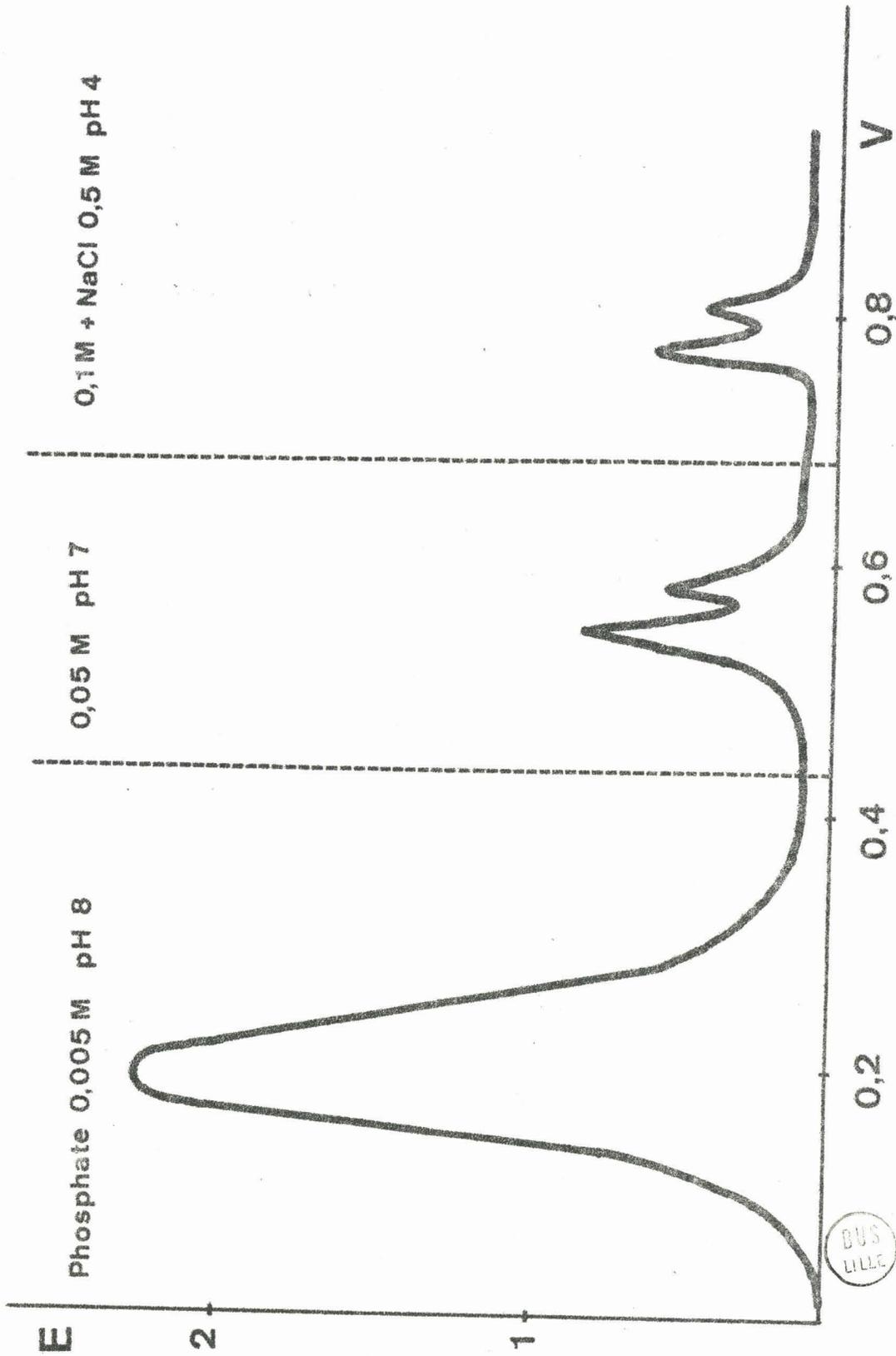


Figure 13

Chromatographie du pic 2 (voir p. 91) sur DEAE-cellulose.

Tableau XXII

Caractéristiques des fractions obtenues par chromatographie du pic 2 sur DEAE-cellulose

Désignation des fractions (a)	Poids obtenus en g (b)	Oses "neutres" p. 100	Osamines p. 100	Acide sialique p. 100	Composition des fractions
1	5 à 6	3,37	1,85	1,04	1 arc bifide de lactotransferrine
2	0,36	4,45	1,67	1,52	4 constituants dont la lactotransferrine
3	0,07	6,66	2,36	2,11	7 constituants
4	0,15	4,41	1,06	2,35	5 constituants dont la lactotransferrine
5	0,05	-	-	-	8 constituants dont la lactotransferrine

(a) Voir la figure 13 (p. 93)

(b) Pour 7g de protéides totaux du pic 2 soumis à la chromatographie sur DEAE-cellulose.



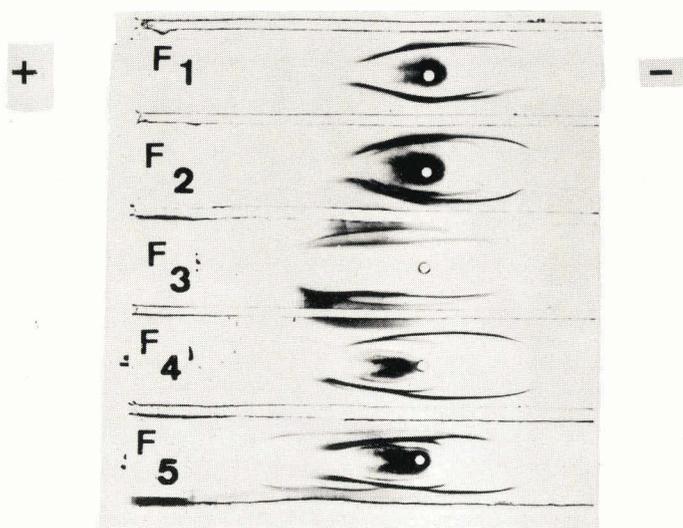


Figure 14

Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose du pic 2.



4 - Conclusions

a - La chromatographie du pic 2 sur DEAE-cellulose fournit, avec un rendement de 70 à 80 p. 100, identique à celui que donne la méthode de MONTREUIL et coll., une lactotransferrine pure mais dénaturée.

b - La dénaturation de la lactotransferrine est provoquée par la DEAE-cellulose. Elle se manifeste par des anomalies de comportement de l'arc de précipitation obtenu en immuno-électrophorèse, par une diminution de l'acide sialique due à une activité "sialidasique" de la DEAE-cellulose souvent observée au Laboratoire avec différents glycoprotéines, par une hétérogénéité en électrophorèse et à l'ultracentrifugation. La chromatographie sur DEAE-cellulose doit donc être, en règle générale, utilisée avec prudence. Elle est à rejeter dans le cas de la lactotransferrine.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE

PREMIER PROCEDE

1 - Principe. Le pic 2 est soumis à une chromatographie sur CM-cellulose, d'abord avec un tampon acétate de sodium de faible force ionique qui élimine les impuretés, puis de force ionique élevée qui déplace la lactotransferrine.

2 - Mode opératoire.

a - Préparation de la CM-cellulose. 100 g de CM-cellulose 32 Whatman sont agités dans 15 fois leur volume de soude 0,5 N pendant environ 30 mn. Après décantation du liquide surnageant, la CM-cellulose est lavée à l'eau distillée sur un filtre Büchner jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 8. Elle est ensuite agitée dans 15 volumes d'acide chlorhydrique 0,5 N pendant 30 mn. Après décantation, la CM-cellulose est de nouveau lavée à l'eau distillée jusqu'à un pH voisin de la neutralité.

b - Préparation des colonnes. La CM-cellulose est agitée dans le tampon d'élution acétate 0,04 M de pH 5,5 pendant 20 à 30 mn. Le surnageant est éliminé par décantation. Ce traitement est répété 6 à 8 fois jusqu'à ce que le pH du tampon ne varie plus.

La CM-cellulose est alors introduite dans des colonnes de 2 cm de diamètre (hauteur de CM-cellulose : 65 cm), réfrigérées à 4°C. Elle est "stabilisée" par le passage du tampon acétate pendant 16 à 24 h.

Nota. Après chaque chromatographie, la colonne peut être réutilisée pour un nouveau fractionnement. Il suffit de la "rééquilibrer" par le passage du tampon acétate 0,04 M de pH 5,5 pendant 24 à 48 h.

c - Chromatographie. 1,5 g de protéides sont dissous dans 5 ml de tampon acétate 0,04 M de pH 5,5. La solution est soumise à la chromatographie avec le tampon précédent (500 ml environ). On obtient de cette manière, un premier pic qui renferme toutes les impuretés. La lactotransferrine est ensuite déplacée par un tampon acétate de sodium 0,6 M de pH 5,5. Les tubes colorés sont rassemblés, dialysés et lyophilisés. On obtient, de cette manière, la lactotransferrine - CMC - 1.

3 - Résultats

a - Le passage du tampon acétate 0,04 M déplace une fraction mineure incolore (0,2 g), tandis que le tampon acétate 0,6 M élue une fraction fortement colorée qui donne, après lyophilisation 0,85 g de lactotransferrine - CMC - 1, soit un rendement de 85 à 95 p. 100.

b - La composition en glucides de cette fraction est la suivante :

Oses "neutres"	3,13 p. 100
Osamine	2,30 p. 100
Acide sialique	1,25 p. 100

c - L'immuno-électrophorèse révèle la présence d'un seul arc de précipitation (Fig. 15 ; p. 98). La préparation est, en outre, homogène en électrophorèse de zone réalisée sur différents supports et en ultracentrifugation.

4 - Conclusions

a - La chromatographie du pic 2 sur CM-cellulose fournit d'excellentes préparations de lactotransferrine qui répondent positivement à tous les critères d'homogénéité, mais n'améliore pas le rendement de la méthode originale de MONTREUIL et coll.

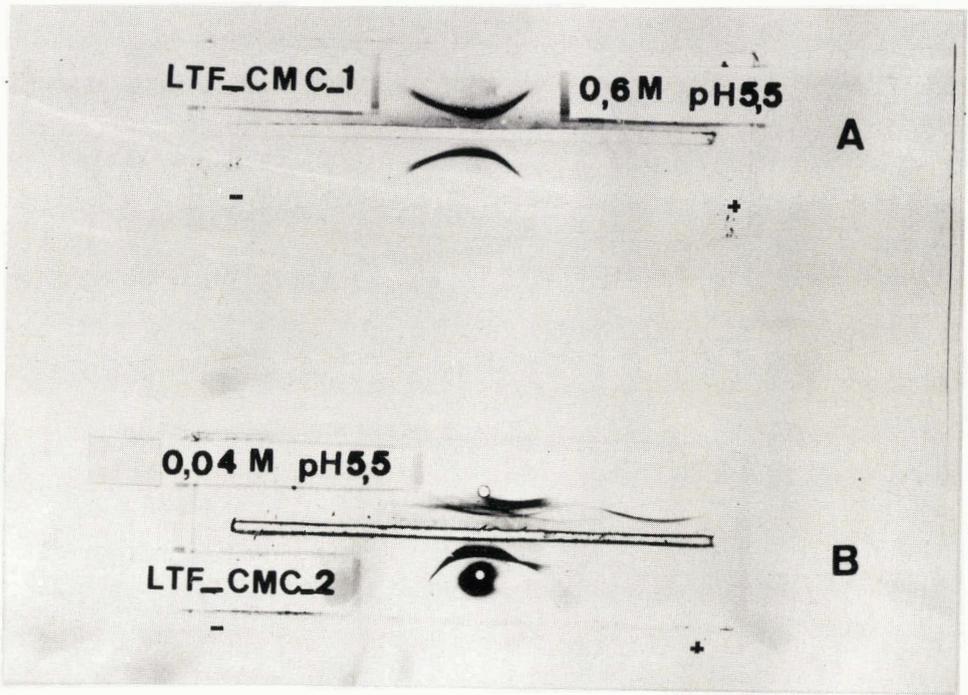


Figure 15

BUS
LILLE

Immuno-électrophorèse de préparations de lactotransferrine-CMC obtenues par chromatographie sur CM-cellulose :

- A : Chromatographie du pic 2. Préparation de lactotransferrine-CMC-1 obtenue par le passage du tampon 0,6 M de pH 5,5.
- B : Chromatographie du précipité P₂. En haut : fraction éluee par le tampon 0,04 M de pH 5,5. En bas : préparation de lactotransferrine-CMC-2 obtenue par le passage du tampon 0,6 M de pH 5,5.

b - C'est pourquoi, nous avons tenté, devant l'efficacité de la chromatographie sur CM-cellulose, d'appliquer ce procédé à la purification directe du précipité P₇ (voir Fig. 11 ; p. 85).

DEUXIEME PROCEDE

1 - Principe. Les composés "acides" du précipité P₇ ainsi que les globulines γ A ne sont pas retenus par la CM-cellulose. Celle-ci fixe, au contraire, énergiquement la lactotransferrine que l'on déplace avec un tampon d'acétate de sodium 0,6 M.

2 - Mode opératoire . Sur des colonnes (2 x 50 cm) de CM-cellulose préparées suivant le protocole décrit ci-dessus, on dépose 15 ml d'une solution de 3 g des protéides totaux du précipité P₇ dans l'acétate de sodium 0,4 M de pH 5,6. Le passage de 1 L de ce tampon élimine les glycoprotéides acides, riches en glucides, qui correspondent au pic 1 du fractionnement sur Amberlite XE et les autres protéides qui étaient élués avec la lactotransferrine dans le pic 2 du même type de chromatographie. La lactotransferrine est déplacée par le passage d'un tampon acétate de sodium 0,6 M de pH 5,5 (environ 0,5 à 1 litre). Les fractions colorées sont réunies, dialysées et lyophilisées. Elles fournissent les préparations de lactotransferrine - CMC - 2.

3 - Résultats.

a - L'application du second procédé de chromatographie sur CM-cellulose fournit rapidement les quantités les plus élevées de lactotransferrine. En effet, à partir de 3 g de précipité P₇, correspondant à 2 à 3 l de lait, nous obtenons 2 g de lactotransferrine, soit un rendement de 90 à 95 p. 100.

b - Les préparations sont homogènes en immuno-électrophorèse (Fig. 15 ; p. 98), en électrophorèse de zone sur différents supports et à l'ultracentrifugation. En outre, elles ne présentent aucun signe de dénaturation.



4 - Conclusions

a - La CM-cellulose représente le support chromatographique de choix pour purifier la lactotransferrine qu'elle fixe énergiquement sans retenir les impuretés (Fig. 15 B ; p. 98) qui accompagnent cette dernière dans les précipités P_7 obtenus par relargage salin : lactalbumine, globulines γA et sialoglycoprotides acides, riches en glucides. En outre, elle n'exerce pas d'action dénaturante sur la lactotransferrine.

b - Les préparations ainsi obtenues (Lactotransferrine - CMC -2) ont été utilisées, comme la lactotransferrine XE-64 pour l'étude des propriétés et de la structure de la lactotransferrine.

III - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos recherches sur les méthodes de préparation de la lactotransferrine sont les suivantes :

1 - Le procédé de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (612) de chromatographie sur Amberlite XE-64 des précipités P_7 , obtenus par relargage par le sulfate d'ammonium du lait de Femme (précipitation entre 0,50 de saturation pH 3,5 et saturation pH 7) fournit de la lactotransferrine pure, à raison de 0,6 g environ par litre de lait total, soit avec un rendement de 70 à 85 p. 100 identique au rendement de la méthode de BLANC (613). Son application nous a permis de retrouver et de confirmer les résultats obtenus par MONTREUIL et coll..

2 - Une tentative d'amélioration du rendement par chromatographie sur DEAE-cellulose, selon le procédé appliqué par GROVES (614) à la préparation de la lactotransferrine du lait de Vache a échoué. En effet, pour un rendement identique à celui que fournit la méthode précédente, on obtient une lactotransferrine dénaturée par la DEAE-cellulose.

3 - Au contraire, l'emploi de la CM-cellulose qui ne retient pas les protéides accompagnant la lactotransferrine dans le précipité P₇ et qui fixe énergiquement la transferrine, permet de résoudre le problème. On obtient, en effet, des quantités de lactotransferrine pure et non dénaturée de l'ordre de 0,75 à 0,80 g par litre de lait total, soit avec un rendement de 90 à 95 p. 100.

4 - Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de fixer la teneur du lait de Femme en lactotransferrine entre 0,7 et 0,9 g. Ces valeurs sont supérieures à celle de BLANC (0,6 g) et inférieures à celle de MONTREUIL et coll. (1 à 1,5 g).

ETUDE COMPAREE DE LA FIXATION DU FER
PAR LA TRANSFERRINE ET PAR LA LACTO-
TRANSFERRINE

Nous avons repris, dans des conditions très rigoureuses définies par l'expérience des autres auteurs et par notre expérience propre, la question de la fixation du fer sur la transferrine et sur la lactotransferrine, pour les raisons suivantes :

1 - La capacité de fixation du fer sur la lactotransferrine avait été fixée à 6 atomes de métal par MONTREUIL et MULLET (615) et par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (616). Cette valeur, comparée à celle de la transferrine qui fixe, comme nous l'avons vu, 2 atomes de fer, nous paraissait a priori élevée. En outre, la courbe de fixation du fer par la lactotransferrine, donnée par les auteurs précédents, présentait une cassure anormale. La transferrine, dont les propriétés de fixation du fer étaient bien définies, nous a servi de produit de référence pour vérifier la valeur des méthodes employées.

2 - Devant la dispersion des résultats concernant la masse moléculaire de la transferrine et de la lactotransferrine et fournis par des méthodes physiques, nous avons entrepris de déterminer d'une manière statistique, la quantité de fer fixée par les deux transferrines de manière à pouvoir en déduire, d'une manière précise, la masse moléculaire de ces dernières.

1 - DETERMINATION DE LA CAPACITE DE FIXATION DU FER DES TRANSFERRINES

La détermination de la capacité de fixation du fer par un protéide repose sur deux principes :

1 - ou bien, on dose le fer fixé contenu par le protéide et on ajoute ensuite une solution titrée du métal jusqu'à saturation : la somme du "fer préexistant" et du "fer ajouté" représente la capacité de fixation du composé.

2 - ou bien, on sature le protéide et on dose le fer qu'il a fixé.

Nota. Le procédé qui consiste à ajouter une solution titrée de fer aux apoprotéides n'est pas toujours applicable. Par exemple, dans le cas de la lactotransferrine, l'élimination totale du fer qui est énergiquement fixé sur le protéide, s'effectue dans des conditions drastiques (maintien prolongé à pH 1,5, par exemple) qui provoquent la dénaturation de ce dernier.

I - METHODES

Nous décrivons :

- le procédé de dosage du fer conjugué aux transferrines que nous avons utilisé.
- la méthode de saturation des transferrines et de détermination de leur capacité de fixation du fer.

A - DOSAGE DU FER CONJUGUE (+)

1 - PRINCIPE

Le fer conjugué est libéré en milieu acide en présence d'un réducteur, débarrassé de la protéine et dosé colorimétriquement par un réactif à la bathophénanthroline. Nous décrivons successivement les trois étapes de ce mode opératoire.

2 - LIBERATION ET REDUCTION DES IONS FERRIQUES

Principe. La libération du fer par minéralisation des protéides est abandonnée, dans le cas des transferrines, au profit d'une dissociation effectuée en milieu acide. L'acide trichloracétique fut d'abord utilisé mais son action n'est pas toujours totale, même dans le cas de la transferrine. C'est pourquoi, les auteurs utilisent l'acide chlorhydrique. HEILMEYER et PLÖTNER (622) ont décrit la première méthode de dissociation du complexe fer-protéine par acide chlorhydrique 2 N, suivie d'une précipitation des protéines par l'acide trichloracétique. L'influence de la concentration de l'acide chlorhydrique

(+) Revue générale : LAURELL, 1947, (617) ; HEMMELER, 1956 (618) ; LAURELL, 1952 (619) ; RAMSAY, 1958 (620) ; DREYFUS et SCHAPIRA, 1958 (621).

sur la dissociation du complexe fer-protéine a été étudiée par RAMSAY, en 1957 ~~xxxx~~ qui a montré que l'extraction du fer n'était totale que si la concentration en acide chlorhydrique était supérieure à la normalité, dans le cas de la transferrine. Ces conditions sont réalisées dans la méthode de WATKINS et BUTLER (623) que nous utilisons sous une forme légèrement modifiée et qui utilise l'acide chlorhydrique 2 N. Dans le cas de la lactotransferrine, à cause de la grande stabilité du complexe, nous ajustons le pH à une valeur inférieure à 1,5.

La dissociation des complexes est, en outre, effectuée en milieu réducteur de manière à transformer les ions ferriques conjugués aux transferrines en ions ferreux qui réagissent, seuls, avec la bathophénanthroline. Parmi les nombreux agents de réduction proposés (dithionite, hydrazine, hydroquinone, sulfites, acide thioglycolique, N-méthyl-p-amino-phénol, acide ascorbique), les auteurs utilisent généralement ce dernier.

Protocole expérimental

a - Réactifs

- Solution préparée extemporanément, d'acide chlorhydrique 2 N renfermant 1 g d'acide ascorbique p. 100 ml .

- Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 20 g p. 100 ml.

b - Mode opératoire. Dans un tube conique à centrifuger on introduit successivement :

- 1 ml de solution de transferrine ou de lactotransferrine renfermant des quantités de fer de l'ordre de 1,5 à 12 μg .

- 1 ml de la solution chlorhydrique. Les tubes sont maintenus à 37°C pendant 30 mn. La défécation est ensuite réalisée par l'addition de 1 ml de la solution d'acide trichloracétique suivie d'un chauffage à 100°C pendant 15 mn. Les tubes sont ensuite centrifugés et les ions ferreux sont dosés dans la solution surnageante.

3 - DOSAGE DU FER

Principe. Les ions ferreux donnent une coloration rose (PETERSON, 1953 (624)) avec la bathophénanthroline (4,7 - diphényl -1,10- phénanthroline) rendue soluble dans l'eau par sulfonation (TRINDER) (625). La méthode est extrêmement précise et très sensible puisque des quantités de fer de l'ordre de 0,5 µg peuvent être déterminées avec précision. La bathophénanthroline a supplanté tous les autres réactifs, comme la phénanthroline et les di- et tripyridyles, grâce à sa sensibilité plus grande.

Le complexe fer-bathophénanthroline donne une coloration stable et proportionnelle entre 0,5 et 5 µg de fer dans le milieu réactionnel, pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 7 (ZAK et EPSTEIN) (626). C'est pourquoi, le pH des solutions doit être tamponné par l'addition d'une solution concentrée d'acétate d'ammonium.

Protocole expérimental

a - Réactifs

- Solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 50 g p. 100 ml.
- Solution de sulfobathophénanthroline préparée suivant le procédé de TRINDER (627) : 100 mg de bathophénanthroline sont traités dans un tube à essais avec 0,5 ml d'acide chlorosulfonique. La solution est portée à l'ébullition pendant 30 secondes. Après refroidissement, on ajoute lentement 10 ml d'eau distillée, et on chauffe le mélange au bain-marie bouillant jusqu'à dissolution du précipité. La solution est diluée à 150 ml environ et ajustée à pH 4 avec une solution aqueuse de soude à 10 g p. 100 ml. On complète enfin à 200 ml avec de l'eau distillée.
- Solution titrée à 1 µg de fer p. ml. Elle est obtenue en diluant au centième une solution mère préparée, de la manière suivante : 100 mg de fil de clavecin, décapé avec du papier émeri, dégraissé à l'éther et essuyé soigneusement avec du coton hydrophile, sont introduits dans un ballon jaugé contenant 150 ml d'acide chlorhydrique concentré exempt de fer et 150 ml d'eau distillée. On chauffe au bain-marie, et après dissolution du fer on complète à 1 litre avec de l'eau distillée.

b - Mode opératoire. A 1 ml de la solution chlorhydro-trichloracétique dont la préparation a été décrite plus haut on ajoute :

- 3 ml d'eau distillée
- 0,5 ml de la solution d'acétate d'ammonium
- 0,5 ml de réactif à la bathophénanthroline.

Trois témoins "internes" sont introduits dans chaque série de dosages. Dans le premier, la solution à doser est remplacée par 1 ml de solution titrée de fer et dans le second, par 1 ml d'eau distillée. Dans le troisième, 0,5 ml d'eau distillée remplace la solution de bathophénanthroline.

Nota. Les plus grandes précautions doivent être prises en ce qui concerne la propreté du matériel utilisé. Celui-ci doit être rigoureusement exempt de fer. La verrerie est lavée avec de l'acide chlorhydrique chaud ou avec de l'acide nitrique et elle est ensuite soigneusement rincée avec de l'eau bidistillée dépourvue de toute trace de fer.

D'autre part, tous les réactifs utilisés doivent être exempts de fer, en particulier l'acide chlorhydrique.

B - SATURATION DES TRANSFERRINES ET DETERMINATION DE LEUR CAPACITE DE FIXATION DU FER.

1 - PRINCIPE

A une solution d'apotransferrine ou de transferrine (ou de lactotransferrine) partiellement saturée en fer, on ajoute des quantités croissantes de sel ferrique et on détermine, à 460 m μ , les absorbances données par les complexes colorés fer-protéine. Le tracé des courbes d'absorbances en fonction de la quantité de fer ajouté montre qu'à partir d'une certaine quantité de fer, l'absorbance des solutions ne varie plus. La stabilité de la coloration indique que la transferrine est saturée en fer (Fig. 17 ; p.111).

Nous avons précisé, dans le précédent chapitre (voir p. 22) les conditions optimales de la fixation du fer telles qu'elles ont été définies par de nombreux auteurs :

1 - Le fer doit être chélaté car les ions ferriques "libres" se fixent sur des sites non spécifiques. Les auteurs utilisant généralement des solutions ferriques en présence d'un excès de citrate de sodium. En effet, la vitesse de réaction est, dans ces conditions, très augmentée par la formation d'un complexe de dicitrate ferrique plus réactif que le polymère de citrate ferrique qui se forme en présence d'un défaut de citrate (BATES, BILLUPS et SALTMAN) (628).

2 - Le pH optimal de fixation du fer en présence de citrate est de 8,5.

3 - Les ions bicarbonate accélèrent la fixation du fer et stabilisent la coloration des complexes.

2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

a - Principe. La capacité de fixation en fer des transferrines est déterminée par une modification du procédé de SURGENOR et coll. (629) dont le principe est le suivant :

1 - On sature une transferrine, dont on a déterminé la teneur en fer, en ajoutant une solution titrée de sel ferrique jusqu'à ce que l'absorbance de la solution soit stable. Connaissant la quantité de fer ajoutée à la transferrine, on en déduit la teneur en métal de la transferrine saturée.

2 - On effectue une "contre-expérience" en déterminant la quantité de fer présente dans la transferrine ainsi saturée.

b - Mode opératoire

α - Réactifs

- Solution 0,1 M en citrate de sodium et 0,1 M en bicarbonate de sodium, de pH 8,6.

- Solution de sel ferrique d'AZARI et BAUGH (630) :

Chlorure ferrique à 6 H ₂ O	232 mg
Solution citratée précédente q.s.p.	100 ml

Le titre de la solution est déterminé par l'application du procédé de dosage du fer que nous avons décrit plus haut (voir p.103).

β - Saturation des transferrines. 250 mg de transferrine ou d'apoptransferrine dont la teneur en fer a été déterminée (voir p.104), sont dissous dans 25 ml de la solution citratée. et des fractions de 3 ml sont réparties dans des tubes à hémolyse. Des quantités croissantes de la solution de sel ferrique (dont 10 μ l renfermaient 4,6 μ g de fer) sont ajoutées aux différents tubes à hémolyse. Le mélange est agité et la mesure des absorbances est effectuée à 460 m μ après un repos de 24 heures à l'obscurité.

γ - Calculs. Des courbes sont tracées (Fig. 16 ; p. 109) en portant en abscisses les volumes de solution ferrique ajoutés et, en ordonnées, les absorbances des solutions. Le point d'intersection de la courbe ascendante et du palier de saturation donne le volume V_s pour lequel cette dernière est atteinte. On connaît ainsi la quantité de fer qui a été nécessaire pour saturer le protéide. Ajoutée à la quantité de fer préexistante, conjuguée à ce dernier, elle donne la quantité de fer fixée à la saturation.

Un autre procédé de calcul consiste à extrapoler vers l'axe des abscisses la courbe ascendante. Le point d'intersection V_0 permet de calculer le volume de solution ferrique qu'il aurait fallu ajouter à une solution d'apoptéide pour le saturer.

En outre, on dose le fer total de la première fraction V correspondant au palier de saturation et on déduit de la valeur obtenue, la quantité de fer ajoutée en excès, contenue dans le volume $V - V_s$.

Nota. Ce dernier mode de calcul semble a priori complexe car il paraîtrait plus simple de dialyser le fer en excès, comme dans le procédé de WINDLE, WIERSEMA, CLARK et FEENEY (631) où la dialyse est effectuée contre une solution de chlorure d'ammonium 0,002 M. Cependant, nous avons vérifié que la dialyse dissocie les complexes dans la proportion de 20 à 35 p. 100. En effet, nous avons trouvé, dans des transferrines ainsi traitées, des taux de fer de 1 et 1,24 p. 1000 alors que le taux réel est de 1,47 p. 1000.

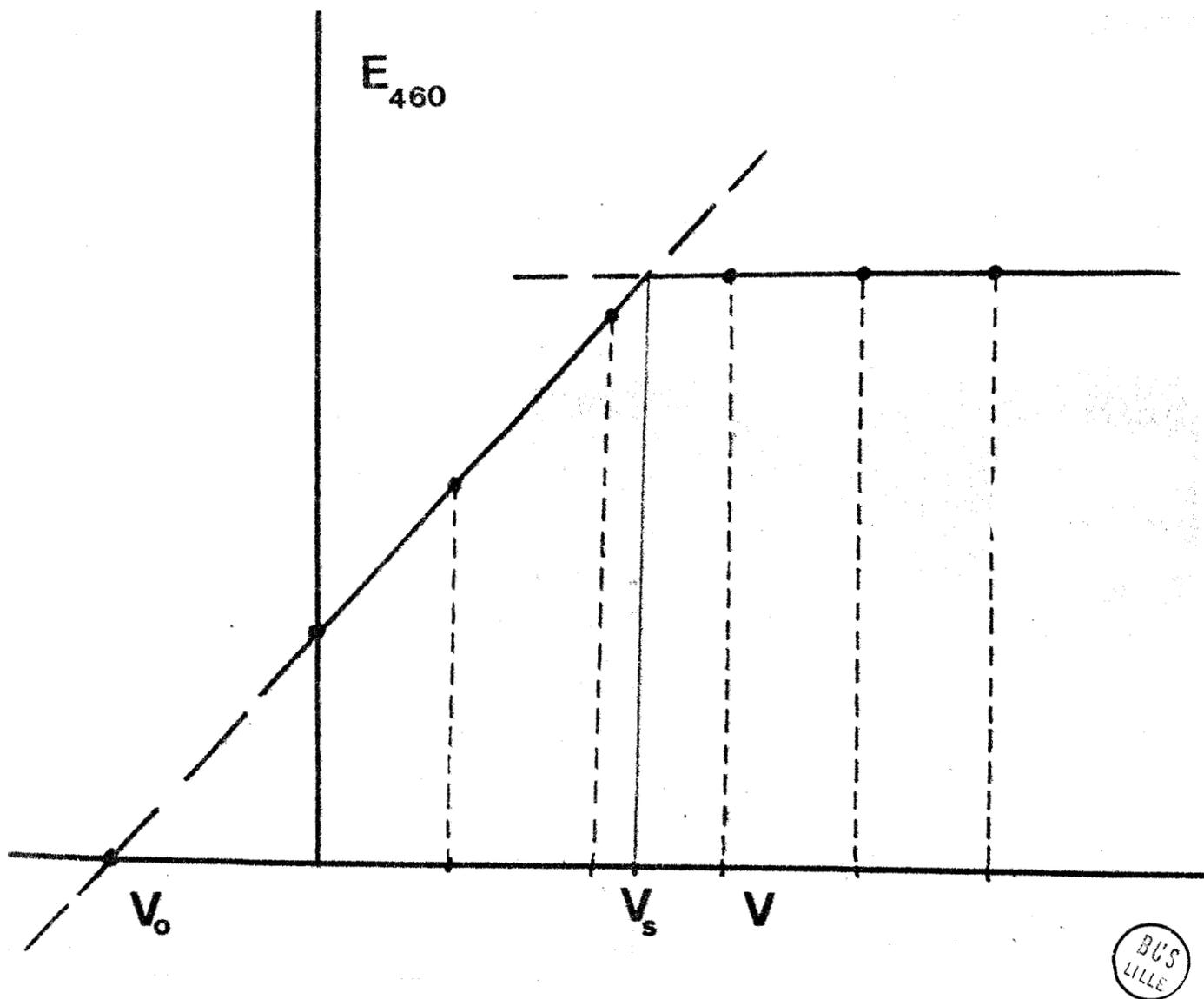


Figure 16

Schéma général d'une courbe de fixation du fer par une transferrine. En ordonnées : absorbances des solutions (à 460 m μ). En abscisses : volumes (en μ l) de solution titrée de sel ferrique ajoutés.

II - RESULTATS

1 - La figure 17 (p. 111) illustre les résultats que nous avons obtenus. On voit que les tracés des courbes de fixation du fer par la transferrine et par la lactotransferrine sont identiques.

2 - L'application, aux protéides saturés, des procédés de dosage du fer que nous avons décrits plus haut montre que la teneur en fer des protéides, à saturation, exprimée en g de fer pour 1000 g de protéide, est la suivante :

Transferrine	:	1,47
Lactotransferrine	:	1,47

3 - Nous pouvons donc conclure, d'après leur masse moléculaire, que la transferrine et la lactotransferrine contiennent, à saturation :

2 atomes de fer p. mole de protéide.

III - DISCUSSION

1 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la teneur en fer de la transferrine s'éloignent sensiblement de la valeur de 1,25 à 1,35 obtenue par certains auteurs (voir tableau VI ; p. 24). Elle se rapproche, au contraire, de la valeur de 1,51 obtenue par ROBERTS, MAKEY et SEAL (632). Ces discordances peuvent s'expliquer par l'observation que nous avons faite que **certaines** valeurs faibles ont été déterminées sans tracer les courbes de saturation. Au contraire, la valeur de ROBERTS et les nôtres résultent de l'interprétation des courbes de saturation. Celle-ci était, de cette manière, rigoureusement contrôlée.

D'autres causes d'erreur par défaut peuvent encore être trouvées :

a) dans le fait que certains auteurs dialysent la transferrine saturée avant de déterminer sa teneur en fer et nous avons vu plus haut (voir p. 108) que la dialyse introduisait une cause d'erreur ; b) dans la composition des solutions tampons qui est, comme nous l'avons vu, déterminante.

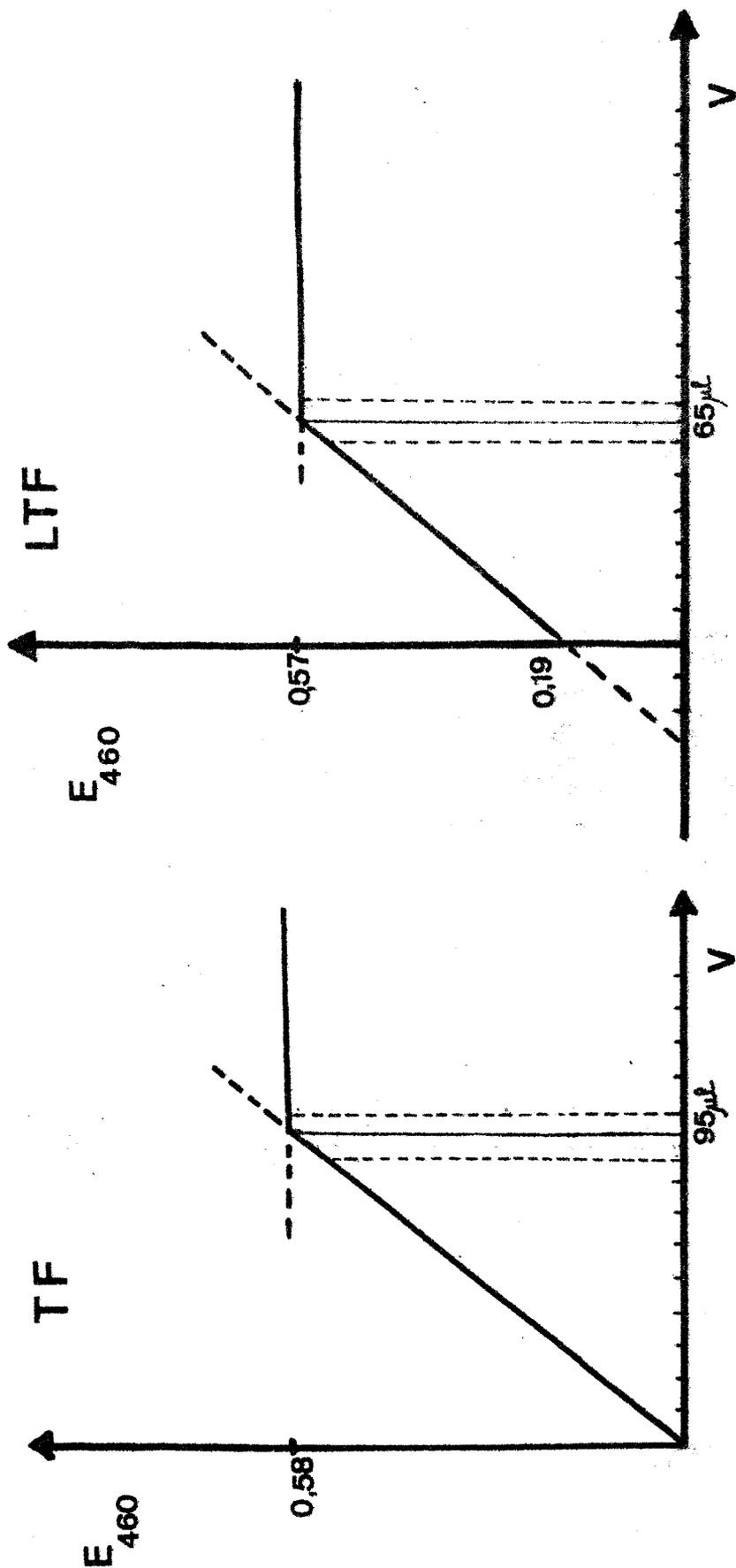


Figure 17

Courbes de fixation du fer sur l'apotransferrine (TF) et sur une lactotransferrine (LTF) contenant 0,49 p. 1000 de fer, en solution dans un tampon citrate-bicarbonate. En ordonnées : absorbances des solutions. En abscisses : volumes (en µl) de solution ferrrique à 4,65 µg de fer p. 10 µl. Solution à 1 g de protéide anhydre p. 100 ml de tampon citrate-bicarbonate.

En outre, nos propres résultats, ainsi que ceux de ROBERTS et coll., ont été obtenus sur plusieurs échantillons et par deux procédés qui consistent, l'un, à déterminer la teneur en fer du protéide à saturation, d'après sa teneur initiale et la quantité de fer ajoutée et l'autre, à doser le fer du protéide sans éliminer les ions ferriques en excès par dialyse ou par chromatographie.

Enfin, des teneurs en fer de l'ordre de 1,3 p. 1000 sont incompatibles avec le poids moléculaire de la transferrine qui avoisinerait alors 87.000 alors qu'il est, en réalité, de l'ordre de 75.000.

Toutefois, malgré les discordances de résultats, nous parvenons, comme l'ensemble des auteurs, à la conclusion que la transferrine renferme, à saturation, 2 atomes de fer.

2 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la lactotransferrine s'éloignent de ceux de MONTREUIL et MULLET (633) et de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (634). En effet, ces auteurs trouvaient un taux de fer, à saturation, de 3,5 p. 1000 et 6 atomes de fer conjugués. Nous proposons les valeurs plus faibles de 1,47 g de fer p. 1000 g de lactotransferrine et 2 atomes de fer. Ces résultats ont été acquis sur plusieurs échantillons de protéide en appliquant les deux procédés de dosage que nous avons mentionnés dans le paragraphe précédent. Nos résultats ont été récemment confirmés par ^{MAS-}HEREMANS (635) qui trouvait que la lactotransferrine à saturation contient ^{SON,} 0,026 μ atome de fer, soit 1,45 g de métal p. 1000 g de protéide.

Pour expliquer les discordances de nos résultats avec ceux de MONTREUIL et coll., nous émettons l'hypothèse que l'erreur par excès commise par ces auteurs est due, soit au fait que les expériences de fixation du fer ont été effectuées sur des solutions de lactotransferrine dans l'eau et non dans un tampon comme la solution de citrate-bicarbonate que nous utilisons ; soit au fait que le temps de 5 mn entre deux additions de fer était trop court pour réaliser une fixation totale du métal ; soit, enfin, au fait que ^{la lactotransferrine soit capable de} se "sursaturer" en fer. En effet, en nous fondant sur les résultats que nous décrivons dans le paragraphe suivant, nous pensons que la lactotransferrine possède, en dehors des deux sites spécifiques de fixation des deux atomes de fer en milieu tamponné, d'autres sites non spécifiques qui seraient occupés par d'autres atomes de fer lorsque la fixation de ce dernier est réalisée en solution dans l'eau.

IV - CONCLUSIONS

Des expériences de fixation du fer sur la transferrine et sur la lactotransferrine effectuées dans les conditions optimales définies par les travaux de nombreux auteurs démontrent que les deux protéides renferment, à saturation, 2 atomes de fer.

Dans le cas de la lactotransferrine, nous infirmons les résultats de MONTREUIL et coll. qui avaient fixé à 5 le nombre d'atomes de fer conjugués à la lactotransferrine à saturation.

2 - LA QUESTION DE LA "SURSATURATION" EN FER DE LA LACTOTRANSFERRINE

Au cours de la mise au point de procédés de préparation de la lactotransferrine, nous avons découvert fortuitement la propriété que possède ce protéide de fixer du fer sur des sites non spécifiques.

Nous tentions d'isoler de la lactotransferrine pure par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 91) et nous obtenions plusieurs pics dont les teneurs en fer allaient en décroissant (une observation identique a été faite récemment par MASSON et HEREMANS (636). Pour éviter ce fractionnement en plusieurs pics, nous avons ajouté une solution de sel ferrique en excès à la solution des protéides du pic 2 de la chromatographie sur Amberlite XE-64 du précipité P₇ (voir p. 85 à 88). Nous avons effectué cette addition sur la base d'une teneur de fer de 3,5 p. 1000, à la saturation du protéide. C'est dire que nous ajoutions un large excès de fer.

Nous obtenions, de cette manière, par chromatographie sur DEAE-cellulose un pic majeur de lactotransferrine - DEAE (voir p. 93), - sans que la saturation en fer des préparations ait eu pour effet d'éliminer les autres pics de chromatographie. Les caractéristiques de la préparation de lactotransferrine - DEAE sont précisées dans le tableau XXIII (p. 114). On voit que la composition en glucides est identique à celle de la lactotransferrine et que l'ultracentrifugation révèle l'existence de deux constituants de S_{20w}^0 4,55 et 6,70, dans les proportions respectives de 85 et 15 p. 100. En outre, la teneur en fer (3,50 g p. 1000) est très voisine de celle des lactotransferrines décrites par MONTREUIL et coll. (3,47 p. 1000).

Tableau XXIII

Propriétés des préparations de lactotransferrines sursaturées en fer

Nature de la préparation	S ₂₀ ⁰ w	Oses p. 100	Osamines p. 100	Acide sialique p. 100	Fe p. 1000
Lactotransferrine - DEAE	4,55 (85 p. 100) 6,70 (15 p. 100)	3,37	1,85 (a)	1,04	3,50
Lactotransferrine - G 100 - rouge	4,75 (80 p. 100) 6,9 (15 p. 100) 9 (5 p. 100)	3,40	2,07	1,04	1,25
Lactotransferrine - G 100 - jaune	-	3,05	1,25 (a)	0,98	15

(a) La diminution du taux des osamines s'explique par une destruction partielle de ces dernières au cours de l'hydrolyse acide. Cette destruction est due aux traces de fer qui persistaient dans les préparations d'"apolactotransferrines" sursaturées.

Pour éliminer le constituant "lourd" de ces préparations, nous avons soumis ces dernières à la chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-100 (colonnes de 2 x 100 cm ; chromatographie de 500 mg de lactotransferrine - DEAE ; élution par un tampon d'acétate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,1 M de pH 4,6) et nous avons eu la surprise de voir se séparer deux constituants. L'un, le plus rapide, est coloré en jaune (lactotransferrine - G 100 - jaune) et l'autre, coloré en rouge (lactotransferrine - G 100 - rouge, représente 85 p. 100 des protéides totaux élués.

L'étude de la composition des deux substances (voir tableau XXIII ; p. 114) montre qu'il s'agit de lactotransferrine dont les teneurs en fer sont différentes : la lactotransferrine - G 100-rouge contient 1,25 p. 1000 de fer et correspond à la lactotransferrine saturée (+) tandis que l'autre composant correspond à une lactotransferrine dont la teneur en fer est 10 fois celle d'une lactotransferrine normalement saturée.

L'ultracentrifugation de la lactotransferrine -G-100-rouge révèle l'existence de trois constituants de S_{20w}^0 4,75 - 6,9 et 9, dans les proportions relatives 80 - 15 et 5 p. 100. L'ultracentrifugation de la lactotransferrine - G 100- jaune n'a pu être effectuée à cause de l'insolubilité du composé lyophilisé.

CONCLUSIONS

La lactotransferrine est susceptible de fixer du fer sur des sites non spécifiques quand le métal est ajouté en large excès et en l'absence de bicarbonate et de chélateur du fer. On obtient, dans ces conditions, un protéide qui contient jusqu'à 15 p. 1000 de fer, -au lieu de 1,47-, qui est fortement coloré en jaune, qui ne donne plus le spectre caractéristique de la lactotransferrine et qui est très peu soluble dans l'eau. En outre, il possède, en chromatographie de gel filtration, un comportement "macromoléculaire" qui demeure, pour l'instant, une énigme.

(+) La teneur de fer de 1,25 au lieu de 1,47 p. 1000 s'explique par le fait que les préparations ont été dialysées.

3 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE ET PAR LA LACTOTRANSFERRINE

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude sur la fixation du fer par la transferrine et la lactotransferrine sont les suivantes :

1 - La détermination, par deux procédés différents, du taux de fer fixé à saturation par les deux protéides, dans des conditions identiques : addition de sel ferrique à des solutions de protéides effectuées en tampon citrate-bicarbonate, mesures après 24 h de contact, nous a donné les résultats suivants :

Transferrine	1,47 p. 1000
Lactotransferrine	1,47 p. 1000

2 - En nous fondant sur la masse moléculaire des deux protéides, la transferrine et la lactotransferrine fixent, à saturation, 2 atomes de fer.

3 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la transferrine saturée en fer confirment, quant au nombre d'atomes de fer, ceux des autres auteurs. Ils s'éloignent, quant à la teneur en fer, de ceux de nombreux auteurs (voir Tableau VI ; p. 24), mais ils se rapprochent des résultats récents obtenus par ROBERTS et coll. (637). L'expérimentation de ces derniers et la notre propre reposent sur des données expérimentales obtenues par plusieurs auteurs concernant les conditions optimales de fixation du fer. Elle a, en outre, été effectuée d'une manière statistique.

4 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la lactotransferrine en appliquant les procédés utilisés pour la transferrine infirment ceux de MONTREUIL et coll. (638) qui trouvaient des teneurs en fer plus élevées et, en particulier, 6 atomes fixés à saturation. Nous posons en hypothèse que, dans les conditions expérimentales appliquées par les auteurs, le fer se fixe sur la lactotransferrine au niveau de sites non spécifiques pour donner des lactotransferrines sursaturées que nous avons mises en évidence par chromatographie de filtration sur gel.

PROPRIETES PHYSIQUES COMPAREES DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE
--

1 - MASSE MOLECULAIRE

Nous avons vu, dans le chapitre consacré aux généralités sur la transferrine et sur la lactotransferrine que la masse moléculaire de ces composés n'était pas encore définie avec exactitude. Dans le cas de la transferrine, en effet, les valeurs varient entre 70.000 et 114.000 et la masse moléculaire généralement adoptée est de 90.000. Dans le cas de la lactotransferrine, deux valeurs seulement avaient été données, jusqu'à présent, par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (639) : 89.000 par la diffusion de la lumière ; 95.000 par la constante de sédimentation.

Nous avons repris l'étude de ce problème important à l'aide de différents procédés, de façon à déterminer, le plus précisément possible, la valeur de la masse moléculaire dont la connaissance est indispensable pour calculer d'une manière exacte le nombre de résidus de glucides et d'acides aminés des deux protéides avant d'entreprendre l'étude de la structure de ces derniers.

Nous avons appliqué, d'une part, les procédés physiques classiques fondés essentiellement sur les données de l'ultracentrifugation et sur la filtration sur gel et, d'autre part, des procédés chimiques fondés sur la connaissance de la composition chimique des composés.

I - METHODES

A - PROCEDES PHYSIQUES

1° - PROCEDES FONDES SUR L'ULTRACENTRIFUGATION (+)

a - Détermination à l'approche de l'équilibre de sédimentation.

La détermination de la masse moléculaire de la transferrine à

(+) Les ultracentrifugations ont été effectuées par le Professeur TONNELAT, à la Faculté des Sciences d'Orsay et par Madame FILITTI-WURMSER, à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du CNRS de Paris. Nous leur adressons nos plus vifs remerciements.

l'approche de l'équilibre de sédimentation a été effectuée sur une solution à 7,5 mg p. ml de tampon tris 0,1 M - ClNa 1 M de pH 8, à 20°C, aux vitesses suivantes : 9.945 - 14.290 - 21.740 et 31.410 tours.

b - Détermination par la méthode de SVEDBERG.

La méthode de SVEDBERG fait appel à l'équation suivante :

$$M = \frac{S}{D} \frac{RT}{1 - V\rho}$$

où

M : masse moléculaire du composé

S : constante de sédimentation $S_{20}^0 W$ déterminée à 20°C pour une dilution infinie

D : constante de diffusion $D_{20}^0 W$ déterminée dans des conditions identiques conditions identiques

R : constante des gaz parfaits ($8,303 \times 10^{-7}$)

T : température absolue ($273,2 + t$)

V : volume spécifique partiel

ρ : densité du solvant

Pour appliquer cette formule, la connaissance de $S_{20}^0 W$ et du du volume spécifique partiel V_{sp} est indispensable.

α - Détermination de la constante de sédimentation. La constante $S_{20}^0 W$ de la transferrine et de la lactotransferrine a été déterminée en extrapolant à une dilution infinie les valeurs de S données par des solutions à 5,10 et 15 mg de protéide par ml de tampon phosphate de μ 0,1 et de pH 7.

En outre, dans le cas de la lactotransferrine, des déterminations ont été effectuées dans des solutions de chlorure de sodium à 9 p. 1000 et à pH 7.

β - Détermination de la constante de diffusion. Nous n'avons pas obtenu de résultats personnels sur la constante de diffusion de la transferrine et de la lactotransferrine. Nous avons utilisé les valeurs de BEZKOROVAINY et RAFELSON (640) et de BEZKOROVAINY et GROHLICH de 5,40 et de 5,54 pour la transferrine BEHRINGWERKE (solution dans un tampon phosphate de force ionique 0,1 et de pH 7) et la valeur de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (641) de 4,6 pour la lactotransferrine.

γ - Détermination du volume spécifique partiel Vsp

Vsp déterminé. Le volume spécifique partiel des protéides a été déterminé par le procédé classique de pycnométrie qui consiste à mesurer, à l'aide d'un pycnomètre, d'une part, la densité du tampon et, d'autre part, la densité de la solution de protide à une concentration connue, puis à en déduire le volume effectivement occupé par une masse unité de protide.

Vsp calculé. Le volume spécifique partiel d'une molécule est égal à la moyenne des Vsp de ses différents constituants. Les valeurs des Vsp des acides aminés ont été précisés par COHN et EDSALL (642) et celles des oses par SQUIRE et coll. (643) et par BEZKOROVAINY et coll. (644).

2° - PROCEDES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION (+)

a - Principe. Le principe de la méthode de détermination de la masse moléculaire d'une protéine par chromatographie de "tamisage moléculaire" sur gels de Sephadex est le suivant : les volumes d'élution des protéines déposées au sommet d'une colonne de Sephadex G-100 ou G-200 sont une fonction du logarithme de la masse moléculaire. ANDREWS (645) a parfaitement défini les conditions de reproductibilité de ce genre de chromatographie et démontré que la masse moléculaire d'un protide pouvait être exactement déterminée grâce à l'étalonnage préalable des colonnes à l'aide de composés de masse moléculaire connue. Toutefois, ce procédé n'est pas applicable aux glycoprotéines qui renferment des teneurs élevées en glucides, comme l'ovomucoïde ou comme l'orosomucoïde. Cette cause d'erreur est évitée dans le cas de la transferrine et de la lactotransferrine dont le taux de glucides est faible.

(+) Nous remercions Monsieur J.P. KERCKAERT de sa précieuse collaboration.

Nous avons appliqué le procédé d'ANDREWS en utilisant comme témoins internes du cytochrome c de Cheval (MM : 12.400), de l'ovalbumine (MM : 44 - 46.000), et de la sérumalbumine de Boeuf (MM du monomère : 65 - 70.000 ; MM du dimère : 130 - 140.000).

b - Mode opératoire. 4 mg de protéide, en solution, dans 2 ml de tampon tris 0,005 M - Cl K 0,1 M ajusté à pH 7,5 avec de l'acide chlorhydrique, sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (refrigérées à 4°C) Pharmacia (2,5 x 90 cm) de Sephadex G-100 ou G-200 (chromatographie descendante dans le cas du G-100, ascendante dans le cas du G-200 pour éviter le colmatage des colonnes). Le débit est régularisé, à l'aide d'une pompe, à 18 ml p. h. Des fractions de 4,5 ml sont recueillies et l'absorbance des solutions est déterminée à 230 m μ .

Dans le cas de la transferrine, un témoin interne de "Dextran blue" et de cytochrome c est introduit dans la solution. Dans le cas de la lactotransferrine, ces témoins internes doivent être rejetés car la lactotransferrine se conjugue avec ces derniers. L'élimination de ces témoins oblige à interpoler les courbes d'étalonnage et les conditions de chromatographie doivent **donc** être très reproductibles.

Les courbes d'éluion sont tracées, et, seuls, sont retenus les résultats donnés par des pics d'éluion rigoureusement symétriques.

La masse moléculaire est calculée en interpolant des courbes tracées en portant en abscisses le logarithme de la masse moléculaire et, en ordonnées, la valeur du rapport V_e/V_o où :

V_e : volume d'éluion correspondant au sommet du pic d'éluion du composé.

V_o : volume "mort" d'éluion d'un composé exclu avec le "front" du liquide d'éluion. Ce volume "mort" est repéré, par exemple, par le passage du "Dextran blue" de masse moléculaire élevée.

B - PROCEDES CHIMIQUES

La connaissance, d'une part, du pourcentage et, d'autre part, du nombre de résidus d'un composé présent dans un protéide permet de déterminer sa masse moléculaire avec précision ou, dans certains cas, en opérant par approximations successives à choisir entre plusieurs valeurs de masse

moléculaire en éliminant celles qui sont incompatibles avec les données chimiques. Toutefois, un tel calcul ne peut être réalisé que si le nombre de résidus est faible. Par exemple, dans le cas de la transferrine, en se fondant sur la teneur en fer de la protéine (1,47 g p. 1000 g) et sur la présence de 2 atomes de fer, on parvient à une valeur de masse moléculaire de 75.980 compatible avec les données d'ultracentrifugation : 77.500 à 79.700 (voir plus loin).

II - RESULTATS

1 - Constantes de sédimentation

Les valeurs des constantes de sédimentation qui ont été déterminées sur plusieurs échantillons de transferrine et de lactotransferrine sont les suivantes :

	<u>Transferrine</u>	<u>Lactotransferrine</u>
Phosphate de μ 0,1 ; pH 7	4,81	4,8
	4,80	4,95
	4,80	-
	4,90	-
NaCl 9 p. 100	-	4,75
	-	4,75
	-	4,75
<hr/>		
Valeur retenue	4,80	4,80

Nota. Dans certaines préparations de transferrine existe un dimère de $S_{20w}^{\circ} 7$ (10 à 20 p. 100 environ) dont la proportion augmente avec le vieillissement des protéides. Ce phénomène de dimérisation a aussi été signalé par CHARLWOOD (646). Un composé analogue de $S_{20w}^{\circ} 6,7$ à 7 est également présent dans quelques préparations de lactotransferrine. Peut-être s'agit-il aussi d'un dimère ?

2 - Volumes spécifiques partiels

Nous avons trouvé les valeurs de volume spécifique partiel suivantes :

	<u>Déterminé</u>	<u>Calculé</u>
Transferrine	0,725	0,723
Lactotransferrine	0,768	0,725

sans qu'il nous soit possible d'expliquer, à propos de la lactotransferrine, la discordance entre le Vsp déterminé expérimentalement et le Vsp calculé.

3 - Masses moléculaires

Nous avons rassemblé dans le tableau XXIV (p. 123) les valeurs de masse moléculaire de la transferrine et de la lactotransferrine déterminées par différents procédés. Les résultats peuvent être résumés de la manière suivante :

a - Dans le cas de la transferrine, on observe une concordance très satisfaisante entre les valeurs obtenues par les différents procédés.

Nous avons choisi la valeur de masse moléculaire de 76.000 fournie par les dosages de fer qui ont été effectués avec une grande précision.

b - Dans le cas de la lactotransferrine, plusieurs valeurs sont voisines de 76.000, à l'exception de celle qui a été fournie par la mesure de la constante de sédimentation et qui est de 94.300. Toutefois, nous avons employé, dans nos calculs, la valeur de constante de diffusion de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (647) qui est très ancienne et peut-être erronée et que nous n'avons malheureusement pas pu vérifier. Nous avons donc adopté la valeur de 76.000 sur la base de la teneur en fer et de la chromatographie de filtration sur gel.

c - En effet, la chromatographie de filtration sur gel, de Sephadex G-100 et G-200 a fourni des valeurs très reproductibles et très concordantes. Nous avons rapporté dans la figure 18 (p. 124) les résultats que nous avons obtenus. On voit que les deux transferrines s'intègrent parfaitement dans les droites et que les interpolations peuvent être effectuées d'une manière précise.

Tableau XXIV

Masses moléculaires de la transferrine et de la lactotransferrine déterminées par différents procédés

Méthodes appliquées	Transferrine	Lactotransferrine
Equilibre de sédimentation	72.900	—
Constantes de sédimentation et de diffusion	79.700 (a) 77.600 (b)	94.300 (c)
Chromatographie de filtration sur gel		
-Sephadex G-100	74 à 78.000	76.000
-Sephadex G-200	76.000	76.000
Teneur en fer	75.980	75.980
Teneur en acide sialique	74.000 (d)	73.000 (e)

(a) Pour $D_{20}^{\circ} w$ 5,4

(b) Pour $D_{20}^{\circ} w$ 5,54

(c) Pour $D_{20}^{\circ} w$ 4,60 et V_{sp} 0,725

(d) Pour 3,5 résidus et 1,46 p. 100

(e) Pour 3 résidus et 1,27 p. 100

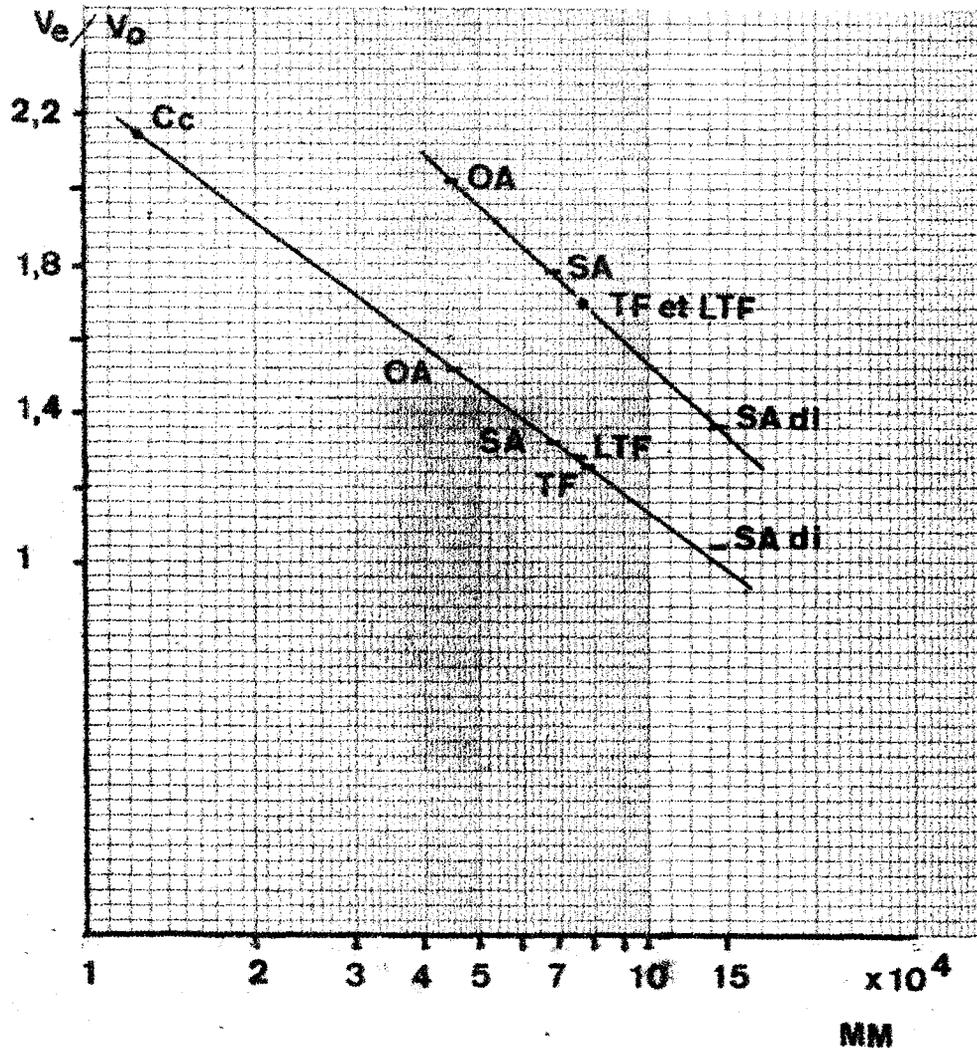


Figure 18

Détermination des masses moléculaires de la transferrine et de la lactotransferrine par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-100 et G-200. En abscisses : logarithmes des masses moléculaires. En ordonnées : rapport V_e/V_o .

C : cytochrome c de Cheval ; OA : ovalbumine ; SA-1 : sérumalbumine ; SA-2 : dimère de la sérumalbumine ; TF : transferrine ; LTF : lactotransferrine.

III - DISCUSSION

A - CONSTANTES DE SEDIMENTATION

1 - Transferrine. La valeur de $S_{20}^0_w$ 4,8 que nous proposons est le résultat d'expérimentations qui ont été effectuées sur des échantillons différents. Elle se rapproche de déterminations récentes effectuées par ROBERTS, MAKEY et SEAL (648)(4,92) et par JEPSSON(649) (5) dans des conditions identiques. Elles s'éloignent, au contraire, de celles de nombreux auteurs (voir tableau X ; p. 39), en particulier de celles de BEZKOROVAINY (650), BEZKOROVAINY et coll. (651). Il nous est, pour l'instant, impossible de trancher cette question. Seules des études systématiques pourraient répondre à ce problème.

2 - Lactotransferrine. La valeur de $S_{20}^0_w$ 4,8 que nous avons déterminée sur plusieurs échantillons différents confirme les résultats de MONTREUIL et coll. (652) qui avait trouvé exactement la même valeur.

Conclusion . La transferrine et la lactotransferrine possèdent la même constante de sédimentation : $S_{20}^0_w$ 4,8.

B - MASSES MOLECULAIRES

1 - Transferrine. La valeur de 76.000 que nous proposons nous semble se rapprocher le plus de la réalité bien que la plupart des auteurs donnent une valeur supérieure, de l'ordre de 90.000. L'examen du tableau XIII (p. 42) est, à cet égard, significatif puisque sur 25 valeurs que nous précisons, 4 seulement se rapprochent de nos résultats, comprises entre 73.200 et 74.100 (ROBERTS, MAKEY et coll. (653)), 23 lui sont supérieures et 2 seulement lui sont inférieures (69.700. CHARLWOOD (654) ; 70.000 : SILBERZAHN et coll.(655)).

Nous pensons, cependant, que la valeur de 76.000 correspond à la masse moléculaire réelle de la transferrine. En effet, les valeurs de 70.000 et de plus de 80.000 sont incompatibles avec les résultats des dosages de fer qui sont très précis. En outre, la chromatographie de filtration sur gel dont nous avons vérifié la précision donne, avec deux types de Sephadex, la même valeur de 76.000. Enfin, tous les procédés que nous avons employés fournissent cette valeur.

2 - Lactotransferrine. Jusqu'à présent, deux valeurs de masse moléculaire seulement étaient connues. Elles avaient été déterminées par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (656), en 1960 et fixées à 95.000 par ultracentrifugation-diffusion et à 89.000 par diffusion de la lumière.

Nous proposons la valeur de 76.000 sur la base des résultats obtenus par filtration sur gel et par dosage du fer. En effet, la valeur de 94.300 que nous avons obtenue par sédimentation-diffusion nous paraît incompatible avec les expériences de dosage du fer. En outre, la filtration sur gel nous a fourni la même valeur de 76.000 avec le Sephadex G-100 et avec le Sephadex G-200.

IV - CONCLUSIONS

Sur la base des résultats reproductibles obtenus par l'application de différents procédés d'ordre physique et d'ordre chimique, nous proposons pour la transferrine et pour la lactotransferrine la même valeur de masse moléculaire : 76 000.

2 - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE

Nous avons étudié le comportement de la transferrine et de la lactotransferrine saturées en fer en électrophorèse, libre et en électrophorèse de zone (en gélose, sur acétate de cellulose, en gel de polyacrylamide et en gel d'amidon).

I - METHODES

L'électrophorèse en veine liquide (+) a été effectuée avec un appareil AMINCO, dans un tampon véronal de μ 0,1 et de pH 8,6. Notre étude s'est limitée à la lactotransferrine, puisque la mobilité électrophorétique de la transferrine avait été bien définie par plusieurs auteurs (voir Tableau VIII ; p. 36).

(+) Nous remercions M. Y. MOSCHETTO qui a effectué les mesures de mobilité électrophorétique .

L'électrophorèse en gélose a été réalisée avec un tampon véronal de pH 8,2, sous une tension de 4 à 5 V/cm pendant 2 à 3 h.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose a été faite sur bandes de CELLOGEL de 2,5 x 17 cm avec un tampon véronal de pH 8,6 et de μ 0,07, sous une tension de 4 à 5 V/cm pendant 2 h.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été effectuée avec le tampon de RAYMOND (657), de pH 9, qui avait été utilisé par GROVES, PETERSON et coll. (658) pour mettre en évidence les variants de la lactotransferrine de Vache :

Tris	27 g
EDTA disodique	3,51 g
Acide borique	2,07 g
Eau distillée q.s.p.	2,7 l

Le gel de polyacrylamide a été préparé par polymérisation de "Cyanogum 41". Une tension de 3V/cm a été appliquée pendant 1,5 à 2 h.

L'électrophorèse en gel d'amidon horizontal a été réalisée suivant le procédé de KRISTJANSSON(659) avec les deux tampons suivants :

- Tampon de préparation de gel :

Tris	0,014 M
Acide citrique	0,004 M

- Tampon des bacs d'électrophorèse :

Acide borique	0,3 M
Soude	0,1 M

La tension utilisée était de 10 - 15 V/cm pendant 2 à 3 h.

II - RESULTATS

1 - Electrophorèse libre

a - Les mesures de mobilité électrophorétique de la lactotransferrine en tampon véronal de μ 0,1 et de pH 8,6 ont donné les résultats suivants :

$$- 1,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$$

Cette valeur est inférieure à celles qui ont été proposées par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (660) (-3,45), par BLANC et ISLIKER (661) (-3,50) et par GOT (662) (-2,8).

b - La lactotransferrine possède une mobilité plus cathodique que la transferrine (-3,63) (voir p. 36).

2 - Electrophorèse en gélose.

La figure 19 (p. 129) montre que le comportement de la lactotransferrine est différent en gélose. En effet, sa mobilité est plus anodique que celle de la transferrine et elle a tendance à se comporter comme une globuline α_2 . Toutefois, nous devons signaler que la mobilité de ce protéide varie avec la concentration qui, en augmentant, ralentit sa migration.

3 - Electrophorèse sur acétate de cellulose

La transferrine et la lactotransferrine donnent une bande unique, la transferrine étant la plus anodique (Fig. 19 ; p. 129).

4 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, effectuée dans le tampon de RAYMOND (663) ne dissocie ni la transferrine, ni la lactotransferrine qui possèdent des vitesses de migration pratiquement identiques.

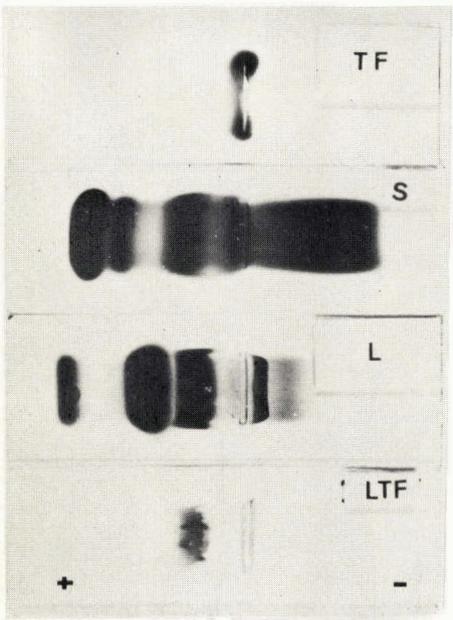
5 - Electrophorèse en gel d'amidon.

Le comportement des deux transferrines est très nettement différent en gel d'amidon (Fig. 19 ; p. 129). La lactotransferrine donne une bande unique qui se détache à peine du trait de départ. Au contraire, la transferrine migre très loin vers l'anode.

III - CONCLUSIONS

1 - Sauf en électrophorèse en gélose, la transferrine possède un comportement plus anodique que la lactotransferrine.

2 - La lactotransferrine reste homogène dans tous les systèmes d'électrophorèse en gel, même dans le tampon de RAYMOND (664) qui a permis à GROVES, PETERSON et coll. (665) de mettre en évidence les variants de la lactotransferrine de Vache.



Gélose



Acétate de cellulose



Gel d'amidon

Figure 19

Electrophorégrammes en gélose, sur acétate de cellulose et en gel d'amidon de la transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF) saturées en fer. S : sérum humain ; L : fraction adialysable du lait de Femme.



3 - PROPRIETES OPTIQUES

I - ABSORPTION DE LA LUMIERE

A - METHODES

Les courbes d'absorption de la lumière visible et de l'ultraviolet ont été déterminées, en cuves de 1cm d'épaisseur, sur des solutions de protéides saturés en fer et d'apoprotéides.

- à 0,1 g p. 100 ml d'eau à pH 7 pour les études dans l'ultraviolet

- à 1 g p. 100 ml de tampon citrate 0,1 M - bicarbonate 0,1 M de pH 8,5 pour les études dans le visible.

D'après les valeurs obtenues au maximum d'absorption, les absorbances $E_{1\text{ p. }100}^1$ ont été déterminées.

B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV (p. 131). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

1 - La transferrine et la lactotransferrine possèdent des propriétés d'absorption de la lumière visible et ultraviolette identiques. En effet, les longueurs d'onde d'absorption maximale et les $E_{1\text{ p. }100}^1$ sont semblables.

2 - Les valeurs que nous avons obtenues à propos de la transferrine sont les mêmes que celles qui ont été précisées par d'autres auteurs (voir tableau XIV ; p. 43).

Au contraire, nos valeurs concernant la lactotransferrine, sont différentes des valeurs de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (666) : $E_{280\text{ m}\mu}^1\text{ p. }100$ 11,7 et $E_{452,5}^1\text{ p. }100$ 0,5 pour le ferriprotéide.

3 - La valeur de $E_{280\text{ m}\mu}^1\text{ p. }100$ de la transferrine et de la lactotransferrine augmente avec la teneur en fer. Les résultats identiques ont été obtenus avec la conalbumine par WARNER et WEBER (667) et avec la transferrine par LEIBMAN et AISEN (668). Ils sont en faveur de la participation des fonctions OH de la tyrosine dans la fixation du fer qui provoque une modification de la molécule de cet amino-acide. Un phénomène analogue a été observé par WARNER et WEBER (669) lors de la formation des complexes du fer et de l'o-dihydroxybenzène.

Tableau XXV

Propriétés optiques de la transferrine et de la lactotransferrine

Nature du protéide	λ_{max} visible (a)	λ_{max} U.V. (a)	E 1 p. 100 280 m μ	E 1 p. 100 460 m μ	$[\alpha]$ 20 546 m μ ; eau (b)
<u>Transferrine</u>					
-ferriprotéide	460	278-280	14	0,58	-75°,8
-apoprotéide	-	278-280	11,2	-	-57°
<u>Lactotransferrine</u>					
-ferriprotéide	455	278-280	14,3	0,57	-58°,5
-apoprotéide	-	278-280	11	-	(c)



(a) En m μ

(b) A pH 7.

(c) La fixation énergétique en fer sur la lactotransferrine exige, pour obtenir l'apoprotéide, d'appliquer des procédés brutaux d'élimination du métal qui provoquent une dénaturation profonde de la lactotransferrine.

Ils pourraient encore s'expliquer par un remaniement profond de la morphologie de la molécule tout entière de transferrine et de lactotransferrine provoqué par le fer (voir Fig. 4 ; p. 34). Les résultats fournis par l'étude du pouvoir rotatoire spécifique sont en faveur de cette conception.

II - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

A - METHODES

Nous avons étudié le pouvoir rotatoire spécifique à 546 m μ de solutions de transferrine et de lactotransferrine saturées ou exemptes de fer. Les mesures ont été effectuées sur des solutions à 1 g de protéide pour 100 ml d'eau, ajustées à pH 7, à l'aide d'un micropolarimètre Zeiss à 0,005°.

B - RESULTATS

L'examen du tableau XXV (p. 131) montre que le pouvoir rotatoire spécifique de la transferrine est supérieur à celui de la lactotransferrine. En outre, le pouvoir rotatoire spécifique de l'apotransferrine est nettement inférieur à celui du protéide saturé en fer. Ce résultat implique que la fixation du métal s'accompagne de profonde modification de la molécule et que le fer intervient dans la structure tertiaire de la transferrine - et, probablement aussi, de la lactotransferrine.

III - CONCLUSIONS

L'étude des propriétés optiques de la transferrine et de la lactotransferrine nous conduit aux conclusions suivantes :

- 1 - Les deux protéides possèdent des propriétés optiques identiques, sauf en ce qui concerne le pouvoir rotatoire spécifique, de la lactotransferrine qui est inférieur à celui de la transferrine.
- 2 - Le fer intervient dans la structure tertiaire de la transferrine et de la lactotransferrine comme en témoignent les variations importantes que subissent l'absorption de la lumière visible et ultraviolette ainsi que le pouvoir rotatoire spécifique quand le métal se fixe sur les apoprotéides.

4 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROPRIETES
PHYSIQUES DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nos recherches sur les propriétés physiques de la transferrine et de la lactotransferrine nous ont permis de déterminer avec précision quelques constantes sur la base de résultats expérimentaux, obtenus, en général, d'une manière "statistique". Nous les avons rassemblées dans le tableau XXVI (p. 134).

Les résultats les plus marquants sont les suivants :

- 1 - Les masses moléculaires de la transferrine et de la lactotransferrine sont identiques et égales à 76.000.
- 2 - La lactotransferrine possède une mobilité électrophorétique moins anodique que celle de la transferrine.
- 3 - Les coefficients d'extinction des deux protéides à 280 $m\mu$ et à 460 $m\mu$ sont identiques.
- 4 - L'absorbance à 278 $m\mu$ des solutions des deux protéides augmente de 20 à 30 p. 100 quand les deux transferrines sont saturées en fer. Cette modification confirme la participation de résidus de tyrosine à la fixation du fer.
- 5 - Le pouvoir rotatoire spécifique augmente de près de 25 p. 100 quand la transferrine et la lactotransferrine sont saturées en fer. Ce résultat démontre que la fixation du fer s'accompagne d'une modification profonde des deux types de molécules.

Tableau XXVI

Propriétés physiques de la transferrine et de
la lactotransferrine humaines.

	<u>Transferrine</u>	<u>Lactotransferrine</u>
S_{20}° w	4,8	4,8
D_{20}° w	5,54	-
Vsp	0,723	0,725
Masse moléculaire	76.000	76.000
Mobilité électrophorétique (a)	-3,10	-1,75
λ_{\max} des ferri-protéides Visible	460	455
	U.V.	278 - 280
λ_{\max} des opoprotéides U.V.	278 - 280	278 - 280
E 1 p. 100 des ferriprotéides	14	14,3
280 m μ des apoprotéides	11,2	11
E 1 p. 100	0,58	0,57
460 m μ		
$[\alpha]$ 20 des ferriprotéides	-75°,8	-58°,5
546 m μ , eau des apoprotéides	-57°	-

(a) 10^{-5} cm²/V/sec.



<p style="text-align: center;">ETUDE COMPAREE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</p>
--

Nous envisagerons successivement les points suivants :

- La composition centésimale en glucides.
- L'identification et la détermination des rapports molaires des oses "neutres", de l'osamine et de l'acide sialique.
- L'étude succincte de la structure des glycanes des deux glycoprotéines.

Dans tous les cas, les expériences ont été effectuées sur les "apo-transferrines". En effet, la présence du fer introduit de nombreuses causes d'erreur dues principalement à une catalyse des réactions de destruction des composés. Nous décrivons donc, en premier lieu, le procédé que nous avons utilisé pour débarrasser les deux glycoprotéines du fer qu'elles contiennent.

1 - PREPARATION DES APOTRANSFERRINES

A - Apotransferrine. Les préparations de transferrine fournies par la firme BEHRINGWERKE sont pratiquement exemptes de fer. Toutefois, par mesure de prudence, les dernières traces de métal sont éliminées de la manière suivante, en tirant parti de la fragilité de la liaison fer-transferrine:

Une solution à 1 g de transferrine p. 100 ml d'eau distillée est amenée à pH 3,5 par addition d'acide chlorhydrique. Elle est ensuite dialysée, pendant 48 heures, à 0°C, dans des tubes de cellophane (préalablement lavés à l'eau courante pendant 24 h) contre 500 ml d'une solution d'EDTA (sel disodique) à 1 g p. 100 ml. Elle est enfin débarrassée de l'EDTA par une nouvelle dialyse de 48 h, effectuée contre 500 ml d'eau distillée renouvelée 2 fois. La solution obtenue est lyophilisée.

B - Apolactotransferrine. La liaison fer-lactotransferrine est très stable et l'élimination du métal exige des conditions relativement brutales qui entraînent une dénaturation, plus ou moins profonde de la protéine. La dissociation est effectuée dans des conditions identiques, à la différence près que, d'une part, le pH de la solution de lactotransferrine est amené à 1,5 - 1,7 au lieu de 3,5 et que le cycle complet, depuis la dissociation jusqu'à la lyophilisation, doit parfois être renouvelé une fois.

Nota. L'emploi de la desferrri-ferrioxamine (Desferrine CIBA), préconisé par BLANC (670) (2 dialyses de 8 h contre une solution de tampon citrate 0,1 M de pH 3,5 contenant 10^{-3} M de Desferrine de masse moléculaire 500) ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. Même en abaissant le pH à 2,5 et en prolongeant les dialyses pendant 2 à 3 jours, la lactotransferrine contient encore des traces de fer, à la différence du procédé que nous avons décrit.

2 - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES DE LA TRANSFERRINE ET LA LACTOTRANSFERRINE

La composition centésimale en glucides des deux glycoprotéines a été déterminée d'une manière statistique. En effet, le calcul du nombre de résidus d'oses, prélude aux études de structure des glycannes, devait être précis à une mole près. En outre, les résultats obtenus, par différents auteurs présentaient de telles divergences, que le travail auquel nous nous sommes livrée nous a paru indispensable. Enfin, nous devons appliquer des procédés sûrs, soumis à l'épreuve du temps et d'études critiques systématiques que nous avons réalisées de manière à éliminer toute cause d'erreur.

I - METHODES (+)

A - DOSAGE DES OSES "NEUTRES"

Les oses "neutres" ont été dosés par les méthodes colorimétriques

(+) Nous n'avons pas décrit les protocoles expérimentaux des méthodes de dosage que nous avons utilisées. Elles ont été rassemblées dans notre mémoire de Diplôme d'Etudes Supérieures et dans la monographie de MONTREUIL et SPIK (671). Nous nous limiterons donc dans tous les cas au seul exposé de leur principe.

à l'orcinoïol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (672), modifiée par RIMINGTON (673) et à l'anthrone sulfurique de DREYWOOD (674), modifiée par SHIELDS et BURNETT (675).

Les dosages ont été effectués sur des solutions aqueuses d'apotransferrines à 100 mg p. 15 ml. Dans toutes les séries de dosages, des témoins "internes" à 200 µg d'oses totaux p. 1 ml ont été introduits. Ils renfermaient dans le cas de la transferrine, du galactose et du mannose dans les proportions 1 : 1 et, dans le cas de la lactotransferrine, du galactose, du mannose et du fucose, dans les proportions 1 : 1 : 0,8. Nous avons, en effet, démontré (SPIK (676) ; MONTREUIL et SPIK (677) ; SPIK et MONTREUIL (678)) que, à quantités égales, les différents oses donnent des colorations dont les absorbances varient dans de larges proportions (Tableau XXVII ; p. 138). Cette observation est d'une importance capitale, car elle permet d'éviter de graves causes d'erreur dans la détermination de la composition en oses neutres des glycoprotéines. Généralement, en effet, la solution de référence pour les dosages est constituée d'un mélange, en proportions égales, de galactose et de glucose (WINZLER) (679) qui ne correspond pas toujours à la composition molaire en oses des solutions étudiées. La solution de référence doit logiquement contenir les mêmes oses que ceux qui entrent dans la composition des glycoprotéides étudiés et dans des rapports de concentration identiques aux rapports molaires des différents oses préalablement déterminés par chromatographie sur papier. WINZLER (680) était d'ailleurs parvenu à la même conclusion puisqu'il écrivait, dès 1955 : "A galactose-mannose standard has been employed in the writer's laboratory since the best available evidence suggests that the serum glycoproteins contain only these two hexoses in approximately equal amounts. Since the optical density varies with the different hexoses, the standard should contain the same sugars in the same proportions as occur in the unknown". On évitera de cette manière une cause d'erreur qui peut être importante. Le tableau XXVIII (p. 139) est, à cet égard, démonstratif; il concerne, en premier lieu, les variations de la composition de l'ovomucoïde suivant que les dosages sont effectués par rapport à une solution-témoin de galactose et de mannose en proportions équimolaires ou par rapport à une solution-témoin de galactose, de mannose dans le rapport 1 : 5, tel qu'il existe dans l'ovomucoïde. En second lieu, il montre que la différence est encore plus marquée lorsque la glycoprotéine renferme, - comme c'est le cas

Tableau XXVII

Absorbances relatives (mesurées par rapport à celle du galactose)
des colorations données par les principaux oses
avec les réactifs à l'orcinol sulfurique et à l'anthrone sulfurique
(SPIK et MONTREUIL) (681)

Nature de l'ose	Orcinol sulfurique (a)	Anthrone sulfurique (b)
Galactose	100	100
Mannose	81	83
Galactose + Mannose (1:1)	93	94
Fucose	76	200
Galactose + Mannose + Fucose (1:1:0,8)	81	114

(a) Les absorbances ont été mesurées à 510 m μ

(b) Les absorbances ont été mesurées à 585 m μ

Tableau XXVIII

Composition de l'ovomucoïde et de la lactotransferrine (g d'oses "neutres" totaux p. 100 g de glycoprotéines) suivant la composition de la solution-témoin.

Nature de la glycoprotéine	Composition de la solution-témoin (a)	Méthode de dosage	
		Orcinol sulfurique	Anthrone sulfurique
Ovomucoïde	Gal + Man (1:1)	8	8
	Gal + Man (1:5) (b)	8,8 Erreur: -9 p. 100	8,8 Erreur: -9 p. 100
Lactotransferrine	Gal + Man (1:1)	3,06	3,62
	Gal + Man + Fuc (1:1:0,3) (b)	3,34 Erreur: -2 p. 100	2,89 Erreur: +25 p. 100

(a) Gal, Man, Fuc : respectivement, galactose, mannose, fucose.

(b) Composition réelle en oses du glycoprotéide déterminée par chromatographie quantitative sur papier.



de la lactotransferrine -, une proportion importante de fucose et que le dosage est effectué par la méthode à l'anthrone sulfurique. Dans le cas de la transferrine, la cause d'erreur n'existe pas puisque le galactose et le mannose y sont présents en proportions équimolaires.

Sans l'introduction de ce terme de correction, nous aurions donc, dans le cas de la lactotransferrine, un déficit d'un résidu d'ose "neutre" dans les dosages à l'orcinol et un excès de 4 à 5 résidus dans les dosages à l'anthrone.

B - DOSAGE DES OSAMINES

Les osamines ont été dosées par les méthodes colorimétriques d'ELSON et MORGAN (682), modifiée par BELCHER et coll. (683) et de GOOD et BESSMAN (684). Dans les deux cas, elles ont été préalablement libérées par une hydrolyse chlorhydrique.

1° - HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

A la suite d'une étude critique des différents procédés d'hydrolyse des liaisons glucosaminidyl proposés par de nombreux auteurs, nous avons tiré les conclusions suivantes (SPIK (685) ; MONTREUIL et SPIK (686)):

1 - Au-delà d'une concentration en acide chlorhydrique de 4 N, on introduit un gros risque de destruction des osamines.

2 - Il est impossible de prévoir la labilité des liaisons glucosaminidyl et il est nécessaire d'effectuer des cinétiques d'hydrolyse pendant des temps variant de 0,5 à 6 h.

3 - La présence de sels de fer catalyse la destruction des osamines, principalement en présence d'oxygène. Les hydrolyses doivent donc être effectuées, sous vide, avec de l'acide chlorhydrique plusieurs fois redistillé et avec des protéides exempts de fer.

Nous avons respecté ces conditions et effectué l'hydrolyse des apo-transferrines, en tubes scellés sous vide, avec de l'acide chlorhydrique 4 N, exempt de fer, à 100°C pendant des temps variant de 0,5 à 6 h. Les hydrolysats ont été débarrassés de l'acide chlorhydrique par évaporation à siccité sous vide.

2° - DOSAGES COLORIMETRIQUES

a - Procédé de BELCHER et coll. (687). Le principe général est celui de la méthode d'ELSON et MORGAN. Seules varient les concentrations des différents réactifs et certains détails du mode opératoire.

b - Procédé de GOOD et BESSMAN (688). Les osamines sont N-réacétylées par l'anhydride acétique en milieu alcalin et les N-acétylosamines formées donnent naissance à des dérivés furanniques (chromogènes de KUHN) qui donnent une coloration violacée avec le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Nota. 1 - Comme pour les oses "neutres", l'intensité de la coloration varie, dans le cas de ces deux procédés, avec la nature des osamines et il est nécessaire d'introduire un "témoin interne" dont la composition en osamines est identique à celle des solutions étudiées. Nous avons utilisé des solutions de glucosamine que nous avons, seule, identifiée dans les deux glycoprotéines

2 - Nous avons systématiquement tracé les courbes d'absorbance des colorations, à différentes longueurs d'onde, de manière à éliminer éventuellement l'interférence due à la formation de composés de N-transosidation par la réaction de MAILLARD qui présentent un maximum d'absorption à 585 m μ (λ_{max} de la coloration donnée par les osamines : 510 à 530 m μ).

C - DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

Nous avons appliqué les procédés de dosages colorimétriques à la diphénylamine de WERNER et ODIN (689) et à l'acide periodique-acide thio-barbiturique d'AMINOFF (690). Cette dernière méthode nécessite la libération préalable des acides sialiques par hydrolyse chimique ou enzymatique.

1° - PROCEDE DE WERNER et ODIN (691). Les acides sialiques libres ou conjugués donnent, à chaud, une coloration violette avec le réactif de DISCHE à la diphénylamine. Le tracé des courbes d'absorption permet d'éliminer, éventuellement, l'interférence du désoxyribose. L'introduction de témoins internes possédant la même composition en acides sialiques que la substance étudiée met l'expérimentation à l'abri de la cause d'erreur due aux différences d'absorbances molaires des colorations données par les différents acides sialiques (SPIK (692) ; MONTREUIL et SPIK (693)).

Nota. Le fer augmente de façon notable la coloration. Les dosages doivent être effectués sur les apoglycoprotéines.

2° - PROCEDE D'AMINOFF (694): nécessite au préalable une hydrolyse des liaisons.

a - Hydrolyse des liaisons "sialosyl"

α - Hydrolyse acide. A la suite de recherches personnelles (SPIK) (695,696) et des travaux d'autres auteurs, voir, par exemple, KARKAS et CHARGAFF (697), nous avons évité l'emploi de l'acide chlorhydrique qui est très agressif vis-à-vis des acides sialiques, et qui, en outre, les lactonise. Nous avons donc effectué des hydrolyses sulfuriques dans diverses conditions. En effet, on ne peut prévoir la stabilité des liaisons sialosyl et, seules, des hydrolyses cinétiques peuvent permettre d'obtenir une certitude, - qui reste, toutefois, relative -, sur la quantitativité de l'hydrolyse. Celle-ci est, en effet, toujours un compromis entre la libération des acides sialiques et leur destruction.

Nous avons effectué l'hydrolyse des liaisons sialosyl de la transferrine et de la lactotransferrine pendant des temps échelonnés entre 0 et 2 h, dans les conditions suivantes :

- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,01 N, à 80°C
- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,01 N, à 100°C (YAMASHINA) (698)
- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,1 N, à 80°C (SVENNERHOLM) (699)
- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,1 N, à 100°C

En outre, il est nécessaire d'utiliser des composés et des milieux exempts de fer, car ce métal catalyse la destruction rapide des acides sialiques (LUDEWIG et GLOVER) (700).

β - Hydrolyse enzymatique. Nous avons utilisé une neuraminidase (3.2.1.18) de Clostridium perfringens (SIGMA ; "grade III") dans les conditions expérimentales suivantes (ROBINSON et PIERCE) (701) : 20 mg d'apoglycoprotéine et 1 mg d'enzyme sont dissous dans 1 ml de tampon d'acétate de sodium 0,05 M, renfermant du chlorure de sodium (0,06 M) et du chlorure de calcium (0,004 M) et ajusté à pH 5,6. La solution est maintenue à 37°C pendant des temps variant de 0 à 24 h.

Nota. 1 - On vérifie au préalable que les préparations de neuraminidase sont exemptes de neuraminyl-aldolase (N-acétylneuraminatase lyase 4.1.3.3) en appliquant le procédé de GIBBONS (702) fondé sur la recherche et le dosage de la N-acétylmannosamine libérée.

2 - La neuraminidase libère plus rapidement l'acide N-acétylneuraminique que l'acide N-glycolylneuraminique de leurs liaisons. Elle est sans action sur les N,O-di et triacétylneuraminosides.

3 - La neuraminidase libère en 1 h la totalité de l'acide N-acétylneuraminique de la transferrine. Au contraire, dans le cas de la lactotransferrine, l'hydrolyse doit être prolongée pendant 24 h. Ces différences de stabilités sont certainement liées à l'existence de type de liaisons sialosyl différentes dans la transferrine et dans la lactotransferrine.

b - Dosage : Les acides sialiques libérés sont dosés après oxydation périodique par l'acide thiobarbiturique..

D - RECHERCHE DES ACIDES URONIQUES

SCHULTZE et coll. ayant signalé la présence d'acide uronique dans la transferrine (voir Tableau XV ; p. 45), nous avons recherché ces composés à l'aide du réactif de DISCHE (703) au carbazole sulfurique qui donne, à chaud, une coloration rose violacé avec les acides uroniques. Dans chaque série d'expériences, nous avons introduit des témoins internes d'oses "neutres", car ces derniers interfèrent dans la réaction (SPIK (704) ; SPIK et MONTREUIL (705)).

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIX (p. 144). Il s'agit de moyennes de 10 séries de dosages effectués sur 5 échantillons différents de transferrine et de lactotransferrine.

1 - Transferrine. La comparaison de nos valeurs avec celles d'autres auteurs rassemblées dans le tableau XV (p. 45) montre que les résultats sont très semblables, en particulier si l'on considère les valeurs les plus récentes obtenues par SCHULTZE et coll., par BEZKOROVAINY et coll. (706), par JONES et PERKINS (707) et par JAMIESON (708).

Tableau XXIX

Composition centésimale et molaire (+) en glucides
de la transferrine et de la lactotransferrine
humaines

	Transferrine	Lactotransferrine
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>		
<u>Oses "neutres"</u>		
Méthode à l'orcinol	2,37	3,34
Méthode à l'anthrone	2,26	2,89
<u>Osamines</u>		
Méthode modifiée d'ELSON et MORGAN	1,99	2,43
Méthode de GOOD et BESSMAN	1,97	-
<u>Acides sialiques</u>		
Méthode à la diphenylamine	1,46	1,27
Méthode à l'acide thiobarbiturique	1,40	1,17
<u>COMPOSITION MOLLAIRE</u>		
D - (+) - galactose	5	5
D - (+) - mannose	5	5
L - (-) - fucose	0	4
N-acétyl-D-(+)-glucosamine	8	10
Acide N-acétyl-D-(-)- neuraminique	3 ou 4	3

(+) Pour des masses moléculaires de 76.000 de la transferrine
et de la lactotransferrine



Nous infirmons, en outre, la présence d'acides uroniques dans la transferrine.

2 - Lactotransferrine. Les résultats que nous avons obtenus d'une manière statistique, s'éloignent, sauf dans le cas de l'osamine, de ceux de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (709) et de BLANC et ISLIKER (710) (voir Tableau XXI ; p. 74). La teneur en oses "neutres" que nous trouvons est inférieure (3,34 p. 100) de 20 p. 100 environ à celle de MONTREUIL et coll. (3,9 p. 100) et de BLANC et ISLIKER (4,10). Ce résultat s'explique en partie par le fait que ces auteurs n'avaient pas introduit, dans leurs séries de dosages, de "témoins internes" de composition molaire identique à celle du glycanne de la lactotransferrine (Voir Tableau XXVIII ; p. 139).

III - CONCLUSIONS

1 - Des dosages effectués de manière "statistique" par des procédés différents et en éliminant toutes les causes d'erreur que nous ont permis de déceler une étude critique des méthodes de dosage colorimétrique des glucides (SPIK (711) ; MONTREUIL et SPIK (712)), nous ont conduite à la détermination précise de la composition centésimale en oses "neutres", osamines et acides sialiques de la transferrine et de la lactotransferrine.

2 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la transferrine sont très voisins de ceux qui ont été déterminés par différents auteurs et on peut considérer, à l'heure actuelle, que la composition centésimale de la transferrine est définitivement établie.

Dans le cas de la lactotransferrine, les résultats que nous avons obtenus permettent de corriger ceux de MONTREUIL et coll. et de BLANC et ISLIKER.

3 - La composition centésimale en glucides de la transferrine et de la lactotransferrine ^{est très différente,} la lactotransferrine est plus riche en oses "neutres" (+ 40 p. 100 environ) et en osamines (+ 20 p. 100 environ). que la transferrine ; elle est plus pauvre en acides sialiques (-13 p. 100 environ).

Ces différences vont s'affirmer dans l'étude de la composition molaire en oses de la fraction glycanne.

3 - COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES DE LA TRANSFERRINE
ET DE LA LACTOTRANSFERRINE (+)

I - METHODES

A - COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES "NEUTRES"

1 - PRINCIPE. Les oses "neutres" sont quantitativement libérés par une hydrolyse chlorhydrique. Les hydrolysats sont purifiés sur des échangeurs d'ions et les oses sont identifiés et dosés par chromatographie quantitative sur papier.

2 - MODE OPERATOIRE. 200 à 500 mg d'apotransferrine (ou d'apolactotransferrine) sont hydrolysés, à 100°C, par 20 ml à 50 ml d'HCl 1,5 N pendant 2 h ou par 20 ml à 50 ml d'HCl 2 N pendant 1 h 30.

Les hydrolysats, dilués avec de l'eau distillée à 100 ml environ, sont passés successivement sur des colonnes (2 x 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25 - 50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25 - 50 ; forme acétate). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (500 ml) est concentré à 35°C, sous vide, à un faible volume (5 à 10 ml) dont l'évaporation à siccité est effectuée en dessiccateur, en présence de soude et en ajoutant de temps en temps du méthanol pour éliminer les dernières traces d'acide chlorhydrique non retenues par l'échangeur d'anions. Nous avons, en effet, démontré (voir notre second mémoire de thèse) que les pertes en oses "neutres" avaient lieu au cours de l'évaporation, en exsiccateur par des réactions de transosidation provoquées par les traces d'acide non fixé sur l'échangeur d'anions.

Le résidu sec est repris par 0,2 à 0,5 ml d'eau et soumis à l'analyse par chromatographie sur papier dans les deux systèmes-solvants :

- n-butanol / acide acétique / eau (4:1:5)
- pyridine / acétate d'éthyle / eau (1:2:2)

(+) La description détaillée des procédés de dosages chromatographiques et électrophorétiques, mis au point à la suite d'une étude critique que nous avons effectuée, sont rassemblés dans notre second mémoire original de thèse de Doctorat. Nous nous limiterons donc, dans le présent chapitre, à l'exposé des principes et à une description succincte des modes opératoires.

La révélation des oses "neutres" est effectuée à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (713).

Les oses "neutres" sont dosés par deux procédés :

- Procédé de DATE (714) modifié : les taches d'oses "neutres" révélées par un réactif au citrate d'aniline sont traitées, pendant 2 h, par une solution d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 80 p. 100, 0,1 N en acide chlorhydrique) et l'absorbance des solutions est mesurée à 390 m μ . Sur chaque chromatogramme, sont introduits des témoins internes contenant des quantités connues d'oses. L'étude critique du procédé que nous avons effectuée (voir notre second mémoire de thèse) nous a permis de vérifier que la précision atteignait 1 p. 100.

- Procédé de MONTREUIL (715) modifié : les rectangles de papier renfermant les oses, repérés grâce à des témoins latéraux que l'on révèle, sont élués avec de l'eau distillée et les oses sont dosés par une méthode réductimétrique au ferricyanure : réduction du ferricyanure en ferrocyanure ; addition d'un sel ferrique et dissolution du Bleu de Prusse formé par l'acide oxalique. Les détails techniques de ce procédé sont décrits dans notre second mémoire de thèse. L'expérience nous a montré que le procédé était précis à 1 p. 100 près.

B - COMPOSITION MOLAIRE EN OSAMINES

1 - PRINCIPE.

Les osamines sont d'abord libérées par une hydrolyse chlorhydrique. Elles sont ensuite identifiées.

- a - par détermination oxydative et identification du pentose formé.
- b - par chromatographie sur échangeur de cations.
- c - par N-réacétylation et identification des N-acétylosamines.

2 - MODE OPERATOIRE

a - Hydrolyse. L'étude critique systématique que nous avons effectuée des conditions d'hydrolyse des liaisons N-acétylglucosaminide (voir notre second mémoire de thèse) nous a permis de déterminer ces dernières : nous employons l'acide chlorhydrique 4 N, à 100°C, pendant 4 h. Les hydrolysats sont débarrassés de l'acide chlorhydrique par évaporation prolongée en exsiccateur en présence de soude, et en ajoutant, de temps en temps, du méthanol sur le résidu.

b - Identification des osamines

α - Procédé de détermination de GARDELL et coll. (716). Le résidu sec est d'abord passé sur une colonne (2 x 10 cm) de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25 - 50 ; forme acide) pour éliminer les oses "neutres". Les osamines sont déplacées par le passage de 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N. Le liquide effluent est évaporé à siccité.

Le résidu sec, correspondant à 1 à 5 mg d'osamines, est dissous dans 3 ml d'eau. On ajoute à la solution 2 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g de ninhydrine dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M de pH 4,7). On maintient à 100°C pendant 30 mn. La solution obtenue est filtrée et purifiée par un passage sur un échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25 - 50 ; forme acide ; 1,8 x 10 cm), puis d'anions (Duolite A 40 ; mesh 25 - 50 ; forme formiate ; 1,8 x 10 cm). Le liquide effluent, débarrassé de la ninhydrine et des produits de dégradation des acides aminés, est évaporé à siccité et le résidu est soumis à la séparation chromatographique dans les systèmes - solvants décrits plus haut. La révélation des taches de pentoses est effectuée à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (717) (coloration rose). L'identification des pentoses est aisée puisque leurs valeurs de R_{Glucose} sont les suivantes.

Arabinose 1,2

Lyxose 1,4

β - Procédé de chromatographie sur échangeurs de cations. Nous avons appliqué le mode opératoire de GARDELL (719) : une aliquote de l'hydrolysate chlorhydrique, correspondant à 500 μ g d'osamines totales en solution dans 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N, ^{est déposée} au sommet d'une colonne (0,7 x 40 cm) d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 200-400) préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée avec 50 à 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies toutes les 20 mn et les osamines sont dosées dans chaque tube, après neutralisation, par la méthode colorimétrique de BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (719a). Des courbes sont ensuite tracées. Le premier pic qui apparaît est celui de la glucosamine (+) et le second celui de la galactosamine. Les quantités respectives de chaque osamine sont déterminées à ± 5 p. 100 près, en effectuant la somme des quantités dosées dans les tubes correspondant à chacun des pics.

γ - Identification des N-acétylosamines. La séparation électrophorétique des N-acétyl-osamines est beaucoup plus aisée que celle des osamines et elle permet l'identification des dérivés acétylés des trois osamines que les procédés précédents ne parvenaient pas à discriminer : la glucosamine, la galactosamine et la mannosamine. La réacétylation des osamines est très simple à réaliser et elle est quantitative.

La N-réacétylation est effectuée selon le procédé de ROSEMAN et LUDOWIEG (720) : une partie aliquote de l'hydrolysate purifié sur échangeurs de cations, et renfermant de 1 à 2 mg d'hexosamines, est dissoute dans 1 ml d'eau distillée. On ajoute à la solution 1,5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium, à 0,5 g p. 100 ml et on fait suivre immédiatement par l'addition de 2 gouttes d'anhydride acétique. Le mélange est agité et abandonné, à la température de la pièce pendant 24 heures. Les ions sont éliminés par passage sur une colonne (2 x 15 cm) de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide). L'éluat neutre est lyophilisé et une partie aliquote est soumise à l'analyse électrophorétique.

(+) Et (ou) de la mannosamine

L'électrophorèse sur papier est réalisée avec une solution de borate de sodium à 1 g p. 100 ml, dans une cuve d'électrophorèse "en toit", sous une tension de 10 V/cm pendant 4 heures. Après l'électrophorèse, les papiers sont immédiatement séchés à l'étuve à 105°C pendant 10 à 15 mn et les chromogènes de KUHN formés en milieu alcalin par les N-acétyl-hexosamines sont révélés par le réactif de PARTRIDGE.

C - COMPOSITION MOLLAIRE EN ACIDES SIALIQUES

1 - PRINCIPE. Les acides sialiques sont libérés par hydrolyse acide douce ou par hydrolyse enzymatique, purifiés sur échangeurs d'anions, identifiés et dosés par chromatographie sur papier.

2 - MODE OPERATOIRE

a - Hydrolyse. L'hydrolyse des liaisons sialosyl est effectuée dans les conditions qui ont été précisées dans le paragraphe réservé aux dosages colorimétriques des acides sialiques (voir p.142).

b - Purification. L'hydrolysats refroidi est amené à pH 6 par l'addition d'eau de baryte. Le précipité formé est éliminé par filtration ou par centrifugation et lavé plusieurs fois à l'eau distillée. La solution est ensuite passée, à 4°C, successivement sur une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25-50 ; forme acide ; 1 x 10 cm), puis sur une colonne d'échangeur d'anions (Dowex 1 x 8 ; mesh 200-400 ; forme formiate ; 1 x 10 cm). Après un lavage soigneux à l'eau distillée, les acides sialiques sont déplacés de l'échangeur d'anions par le passage de 50 ml d'acide formique 0,3 N (SVENNERHOLM) (721). La solution d'élution est lyophilisée et le résidu sec est repris par de l'eau distillée.

c - Identification des acides sialiques.

α - La chromatographie sur papier a été effectuée dans les systèmes solvants suivants :

- n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:2:1) (papier Whatman n° 1 ; chromatographie descendante pendant 18 h) (SVENNERHOLM et SVENNERHOLM) (722).

- Acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3 : 1 : 3) (Papier Whatman, n°3; chromatographie descendante pendant 18 à 24 h) (NORDAL et OISETH (723)).

Les acides sialiques sont révélés par un réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (724).

β - Nous avons vérifié la conformation moléculaire de l'acide-N-acétylneuraminique que nous avons caractérisé, en faisant agir, dans des conditions que nous décrivons en détail dans notre second mémoire de thèse, la neuraminase aldolase (N-acétylneuraminase lyase 4.1.3.3) qui dissocie l'acide N-acétylneuraminique en acide pyruvique, - que nous avons identifié par la méthode aux dinitrophénylhydrazones de BISERTE et DASSONVILLE (725)-, et en N-acétylmannosamine que nous avons identifiée par électrophorèse sur papier dans les conditions que nous avons décrites plus haut.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXIX (p. 144) et illustrés par des figures. Ils se résument de la manière suivante :

1 - LES OSES "NEUTRES" (Fig. 20 ; p. 152).

a - La transferrine contient 5 résidus de galactose et 5 résidus de mannose. Ces résultats ont été acquis à la suite d'hydrolyses répétées qui ont été effectuées sur 5 échantillons différents de transferrine. En outre, les oses ont été dosés par deux procédés différents qui ont fourni exactement les mêmes résultats.

Nos valeurs s'éloignent de celles de SCHULTZE et coll. (726) : 8 galactose et 4 mannose, et de JAMIESON (727) : 4 galactose et 8 mannose (voir Tableau XVI ; p. 46). Les résultats de SCHULTZE et coll. peuvent s'expliquer par le procédé d'hydrolyse que ces auteurs ont employé. Il s'agissait, en effet, de la méthode de DIXON (728) qui utilise une résine polystyrène sulfonée (Dowex 50 ; forme acide) à 100°C. Or, l'hydrolyse d'une glycoprotéine n'est jamais totale dans ces conditions.

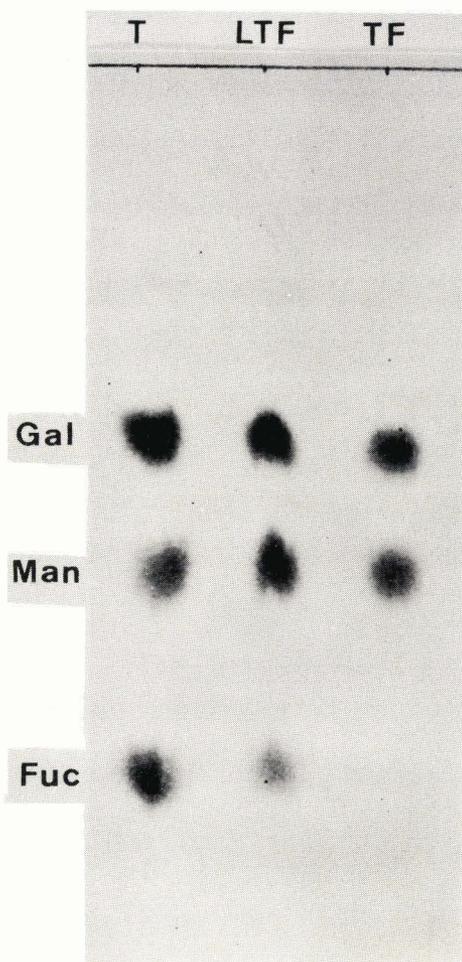
BUS
LILLE

Figure 20

Chromatographie des oses "neutres" constituant les glycanes de la transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF) humaines. Hydrolyse par HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h. Système-solvant n-butanol et acide acétique, eau (4 : 1 : 5) ; Papier Whatman n° 3 ; durée de la chromatographie : 48 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'anoline. T : solution témoin d'oses purs ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

Ce procédé représente d'ailleurs la méthode de choix pour obtenir des oligosides par hydrolyse partielle des glycoprotéines (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (729) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (730) et la figure 26 (p. 166) est, à cet égard, démonstrative. Or, nous avons démontré que, dans ces conditions, le galactose est libéré le premier, tandis que le mannose fait partie de la fraction la plus résistante à l'hydrolyse.

Quant aux discordances que nous observons entre nos résultats et ceux de JAMIESON, il nous est impossible de les expliquer. Cet auteur, en effet, n'a pas précisé les conditions d'hydrolyse qu'il a appliquées.

Nota. Dans une Note parue en 1961, MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (731), nous avons signalé la présence d'un résidu de xylose dans la transferrine. Nous infirmons ce résultat que nous expliquons par le fait que nous utilisions, à l'époque, des feuilles de cellophane comme membranes de dialyse qui cédaient, aux solutions, des quantités importantes de xylose comme nous avons pu le démontrer.

b - La lactotransferrine renferme, comme la transferrine, 5 résidus de galactose et de mannose, auxquels s'ajoutent 4 résidus de fucose.

Nos résultats sont différents des premières valeurs que nous avons trouvées, en 1961 (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY) (732) :

Galactose	10
Mannose	7
Xylose	1
Fucose	5

Ces différences s'expliquent par l'amélioration de nos procédés de dosage des sucres qui nous permettent d'éliminer toute cause d'erreur et par le fait que la masse moléculaire de la lactotransferrine était fixée, à l'époque, à 95.000.

2 - L'OSAMINE

La même osamine est présente dans la transferrine et dans la lactotransferrine, et nous démontrons pour la première fois, - car aucun auteur, jusqu'à présent, ne s'était penché sur ce problème -, qu'il s'agit de la glucosamine seule. L'identification de celle-ci a été effectuée sur la base des résultats expérimentaux suivants :

a - La désamination oxydative donne uniquement de l'arabinose (Fig. 21 ; p. 155).

b - La chromatographie sur colonne de Dowex-50 selon GARDELL (733) fournit un seul pic : celui de la glucosamine (Fig. 22 ; p. 156).

c - L'électrophorèse de l'osamine N-réacétylée révèle la présence exclusive de N-acétylglucosamine (Fig. 23 ; p. 157). Ce résultat, contrairement aux deux précédents qui n'éliminait pas l'éventualité de la présence de mannosamine, est sans ambiguïté.

Nous pouvons conclure sur la base de la connaissance de la composition centésimale des protéides et de la valeur de 76.000 de leur masse moléculaire qu'il existe 8 résidus de glucosamine dans la transferrine et 10 résidus dans la lactotransferrine.

Nos résultats confirment ceux de SCHULTZE et coll. (734) et de JAMIESON (735), à propos de la transferrine (voir tableau XVI ; p. 46) et infirment nos premiers résultats (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (736) qui avaient été calculés sur la base d'une masse moléculaire de 95.000 et donnaient 13 résidus de glucosamine.

3 - L'ACIDE SIALIQUE

Nous avons identifié, pour la première fois, l'acide N-acétylneuraminique dans la transferrine et dans la lactotransferrine grâce aux résultats expérimentaux suivants :

a - La chromatographie sur papier de l'acide N-acétylneuraminique (Fig. 24 ; p.158).

b - L'action de l'aldolase libère, en proportions équimolaires, de l'acide pyruvique et de la N-acétylmannosamine.

Nous éliminons, de cette manière la possibilité de la présence d'acide N-glycolylneuraminique. En effet, le critère appliqué par plusieurs auteurs, fondé sur l'action positive de la neuraminidase n'éliminait pas la cause d'erreur due à l'action non spécifique de l'enzyme qui coupe aussi les liaisons N-glycolylneuraminidosyle.

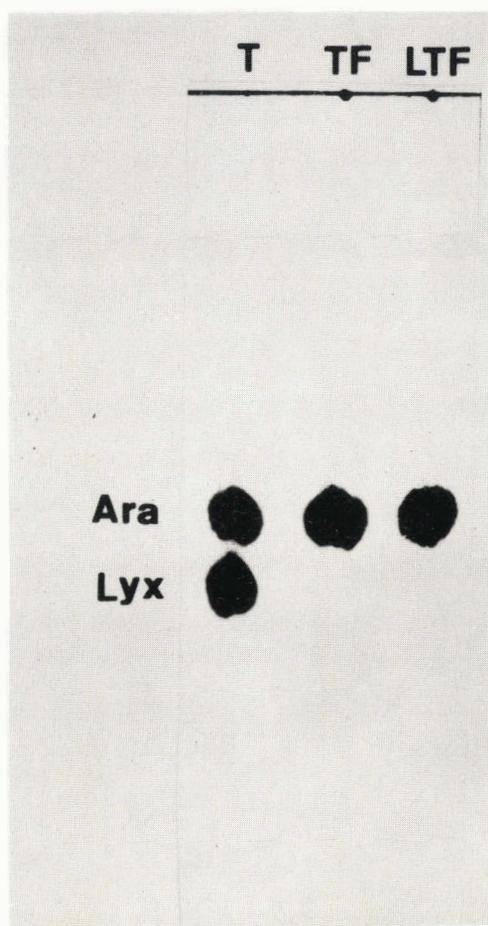


Figure 21

Identification par chromatographie sur papier (papier Whatman ^{BUS}_{n°15} ; 48 h ; système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline) du pentose produit par la désamination oxydative par la ninhydrine (méthode de GARDELL et coll. (737) de l'osamine de la transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF). Ara : arabinose ; Lyx : lyxose ; T : témoin.

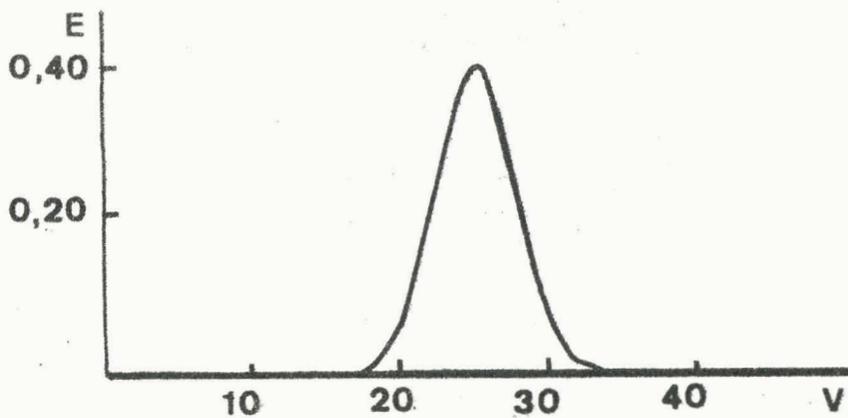
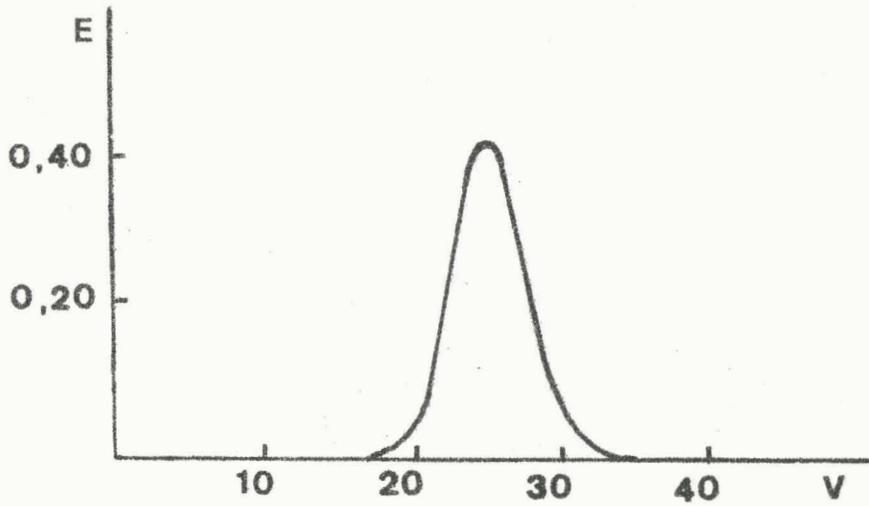


Figure 22

Chromatographie, selon GARDELL (738), sur colonne de Dowex-50 de l'osamine de la transferrine (TF) et de lactotransferrine (LTF).
En abscisses : nombre de fractions. En ordonnées : absorbances des colorations données par la méthode d'ELSON et MORGAN.



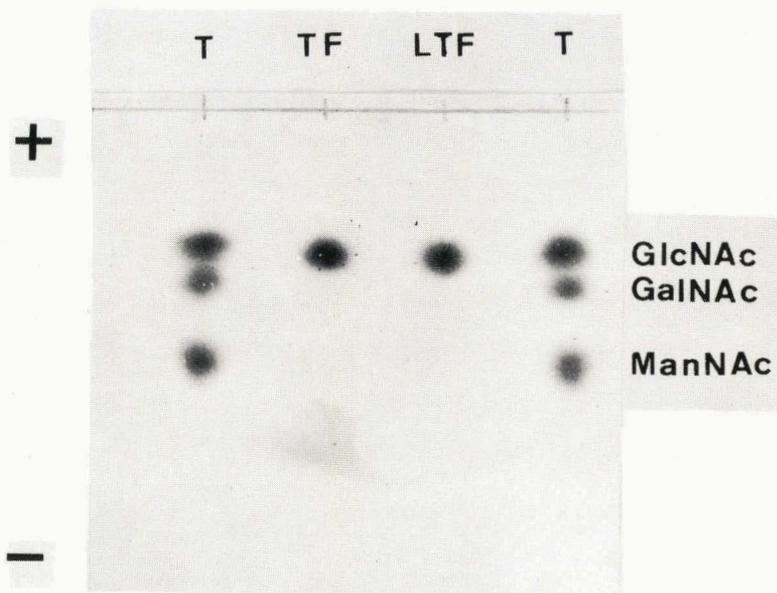


Figure 23

Comportement électrophorétique de la N-acétylosamine obtenue par N-réacétylation de l'osamine libérée par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N ; 100°C ; 4 h) de la transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF) humaines. Electrophorèse effectuée en cuve "en toit" en tampon borate de pH 9,2 (solution de tétraborate de sodium à 1 g p. 100 ml), à 10 V/cm, pendant 4 h. Révélation par la réaction d'EHRLICH "indirecte". T : solution témoin de N-acétylglucosamine (GlcNAc), de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et de N-acétylmannosamine (ManNAc) pures.



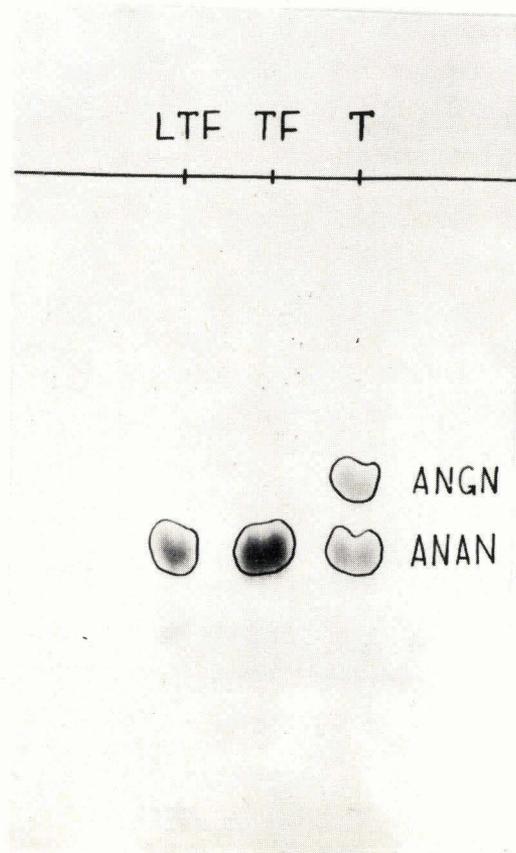


Figure 24

Comportement chromatographique de l'acide sialique isolé de la lactotransferrine (LTF) et de la transferrine (TF) humaines. Système-solvant : ~~n~~-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1 : 2 : 1) ; papier Whatman n° 3 ; durée de la chromatographie : 18 h ; révélation avec le réactif d'EHRlich. T : solution témoin d'acide N-acétylneuraminique (ANAN) et d'acide N-glycolylneuraminique (ANGN)

Sur la base de la composition molaire des deux protéides et d'une masse moléculaire de 76.000, nous concluons qu'il existe 3 résidus d'acide N-acétylneuraminique dans la lactotransferrine, confirmant ainsi nos résultats antérieurs (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY) (739) et 3,5 résidus dans la transferrine (4 selon SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT (740) et JAMIESON (741)). Ce résultat ambigu peut s'expliquer par l'existence de deux transferrines possédant 3 et 4 résidus d'acide sialique comme l'ont suggéré JEPPSSON et SJÖQUIST (742).

III - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos recherches sur la composition en glucides des glycanes de la transferrine et de la lactotransferrine sont les suivantes :

- 1 - La composition molaire en oses de la transferrine et de la lactotransferrine a été déterminée d'une manière statistique sur plusieurs échantillons différents de protéides et les résultats que nous avons obtenus sont concordants et reproductibles. Ceux qui concernent la lactotransferrine sont entièrement originaux puisque nous sommes le seul auteur à avoir abordé cette question.
- 2 - Les compositions en oses "neutres" de la transferrine et de la lactotransferrine sont très voisines : dans les deux cas, en effet, nous trouvons du galactose et du mannose en quantités identiques (5 résidus de chacun des oses). La différence fondamentale se manifeste au niveau du fucose : la transferrine en est dépourvue tandis que la lactotransferrine en contient 4 résidus.
- 3 - La transferrine et la lactotransferrine renferment la même osamine : la N-acétylglucosamine qui a été identifiée par l'application de trois procédés différents. Toutefois, 8 résidus sont présents dans la transferrine et 10 dans la lactotransferrine.
- 4 - La transferrine et la lactotransferrine possèdent le même acide sialique : l'acide N-acétylneuraminique qui a été identifié par deux procédés distincts. La lactotransferrine en renferme 3 résidus et la transferrine 3,5 résidus. Cette teneur ambiguë s'explique par la présence dans la transferrine (que nous utilisons de deux transferrines renfermant, l'une, 3 résidus et l'autre 4 résidus d'acide sialique.

4 - ETUDE PRELIMINAIRE DE LA STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nous avons commencé l'étude de la structure de la fraction glycanique de la transferrine et de la lactotransferrine d'une manière très générale. En effet, nous verrons plus loin que la transferrine possède 2 groupements glycaniques et que la lactotransferrine en possède 3. Tant que nous ne serons pas parvenue à isoler ces groupements glycaniques, il restera illusoire de tenter d'élucider leur structure en appliquant des méthodes fines comme l'oxydation périodique et la perméthylation car ces dernières s'adresseraient à des mélanges. C'est pourquoi, nous nous sommes limitée à une étude superficielle destinée essentiellement à obtenir une image générale des fractions glycaniques.

I - METHODES

Dans une première série de travaux, nous avons effectué une étude cinétique de l'hydrolyse de la transferrine et de la lactotransferrine par différents agents chimiques, afin de déterminer, d'une part, les positions relatives des différents oses et de préciser, d'autre part, les meilleures conditions d'hydrolyse pour obtenir, en grande quantité, de nombreux osides.

Dans une seconde série de recherches, nous avons employé des procédés enzymatiques destinés à modifier soit la fraction glycanique, soit la copule protéique.

A - HYDROLYSES CHIMIQUES

Nous avons appliqué les protocoles expérimentaux que nous avons décrits dans des mémoires antérieurs (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (743) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (744)).

1 - Hydrolyse par les acides dilués

a - Des solutions de 1 g de transferrine ou de lactotransferrine dissoutes dans 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N, ou sulfurique 0,5 N, sont maintenues à 100°C pendant des temps variant de 5 minutes à 8 heures. Après refroidissement, 10 ml des hydrolysats sont dialysés à 4°C pendant 4 jours, contre de l'eau distillée (4 à 5 volumes) renouvelée chaque jour. Les frac-

tions dialysables sont purifiées par un passage successif sur des échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide ; 25 ml de résine p. 100 mg de protides) et d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 2,5 ml de résine p. ml d'acide 1 N). Le liquide neutre effluent est soumis, après concentration, à la chromatographie sur papier dans différents systèmes-solvants.

b - En outre, des cinétiques d'hydrolyse des liaisons sialosyl ont été effectuées dans les conditions que nous avons décrites plus haut : hydrolyse par SO_4H_2 0,01 N à 100°C et par SO_4H_2 0,1 N à 80°C, suivie d'un dosage colorimétrique de l'acide N-acétylneuraminique libéré, par la méthode d'AMINOFF (voir p.142).

2 - Hydrolyse par les résines polystyrène-sulfonées

Nous avons démontré (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (745) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (746)) que les résines polystyrène sulfonées hydrolysaient les glycanes en donnant préférentiellement des oligosides.

Nous avons effectué des hydrolyses de la transferrine et de la lactotransferrine par une résine insoluble polystyrène sulfonée (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide). Le mode opératoire est le suivant : 0,5 g de protéide en solution dans 150 ml d'eau sont maintenus à 100°C sous agitation constante en présence de 5 ml de résine humide. Après 45 mn à 100°C, les hydrolysats, préalablement concentrés, sont directement soumis à l'analyse chromatographique.

B - ACTION DES ENZYMES

1 - Action sur le glycanne

a - Hydrolyse par la neuraminidase. Nous avons suivi, pendant 24 h, la cinétique de libération de l'acide N-acétylneuraminique détaché par l'action de la neuraminidase. Celle-ci a été utilisée dans les conditions que nous avons décrites plus haut (voir p.142).

b - Oxydation par la galactose-oxydase. La galactose-oxydase oxyde en aldéhyde la fonction alcoolique primaire du galactose libre ou conjugué en position terminale non réductrice. Nous avons appliqué à l'apotransferrine, native et sans acide sialique, le procédé de ROBINSON et PIERCE (747) dont les étapes sont les suivantes : oxydation par la galactose-oxydase qui s'accompagne d'une libération d'eau oxygénée ; celle-ci est décomposée par la peroxydase du Raifort en présence d'un accepteur qui est le leuco-dérivé de la benzidine ; il apparaît une coloration dont on détermine l'absorbance. On en déduit la quantité de galactose oxydé. En outre, nous avons complété ce procédé colorimétrique par une détermination des rapports molaires du galactose et du mannose, avant et après l'action de l'enzyme.

2 - Action des protéases

Nous exposerons, en détail, dans le chapitre réservé à l'étude du point d'attache glycanne-protide, les procédés d'hydrolyse enzymatique qui nous ont conduite à l'isolement de 2 glycopeptides, à partir de la transferrine. Nous avons déterminé la composition centésimale et molaire de ces différentes fractions en appliquant les procédés colorimétriques et chromatographiques que nous avons décrits plus haut.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1 - Dans la transferrine et dans la lactotransferrine la totalité de l'acide N-acétylneuraminique se trouve en position externe. En effet, l'hydrolyse acide ménagée et l'hydrolyse enzymatique libèrent la totalité de l'acide neuraminique sans qu'apparaissent, dans les hydrolysats, d'autres oses. En outre, la composition centésimale en oses "neutres" et en osamines des asialoprotéides n'est pas profondément modifiée.

2 - Les liaisons sialosyl de la transferrine et de la lactotransferrine possèdent des labilités différentes. La figure 25 (p.163) est, à cet égard, démonstrative. Elle prouve, en effet, que la vitesse de libération de l'acide sialique par les acides ou par la neuraminidase est beaucoup plus élevée dans le cas de la transferrine. Ce résultat implique que les modalités de l'attache des résidus d'acide N-acétylneuraminique sont différentes dans les deux protéides.

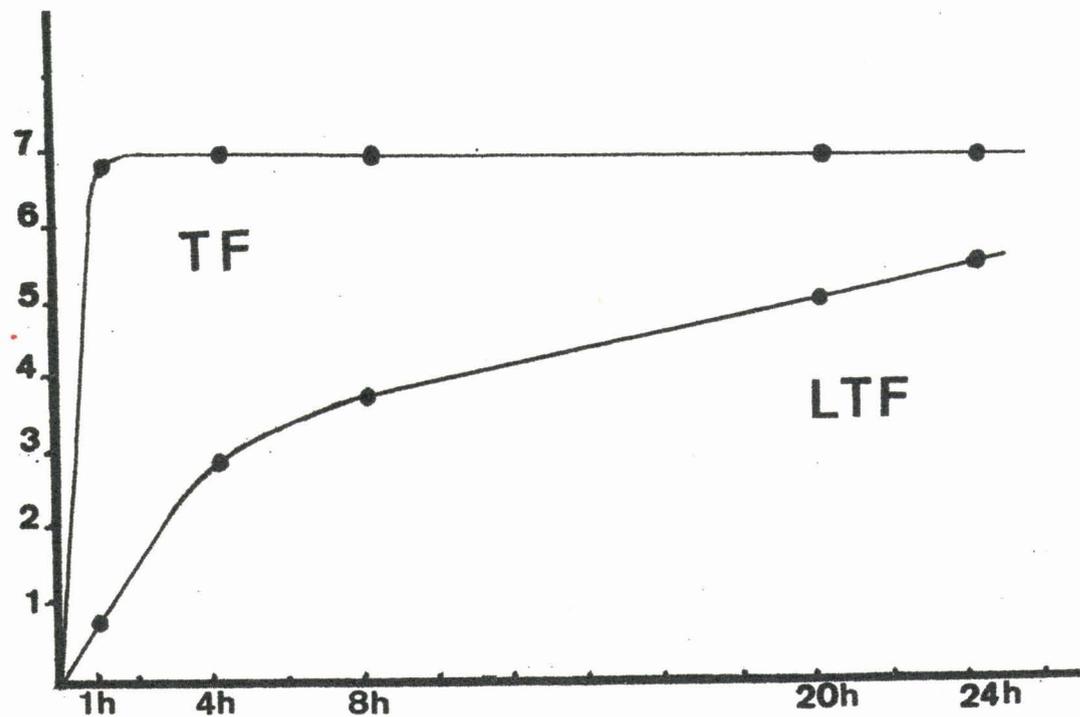


Figure 25

BIB
LITE
 Courbes de libération de l'acide N-acétylneuraminique à partir de 20 mg de transferrine (TF) et de la lactotransferrine (LTF) sous l'action de la neuraminidase. En abscisses : durée de l'hydrolyse. En ordonnées : µg d'acide sialique libérés et dosés par la méthode d'AMINOFF (voir p. 141).

3 - Dans la transferrine, les 3 résidus d'acide sialique sont conjugués à 3 résidus de galactose. En effet, l'action de la galactose-oxydase est négative sur la transferrine native et détruit 3 résidus de galactose de l'asialo-transferrine. D'après ce résultat, nous pouvons donc conclure que dans la transferrine, 2 résidus de galactose sur les 5 sont en position "interne". Sur les 3 autres est conjugué l'acide N-acétylneuraminique. Un résultat identique a été obtenu par ROBINSON et PIERCE (748) qui ont, eux aussi, observé le même phénomène sans toutefois préciser le nombre de résidus de galactose conjugués à l'acide sialique.

4 - L'étude cinétique de la libération des oses par les acides a fourni des résultats identiques pour la transferrine et pour la lactotransferrine. Comme dans le cas de toutes les glycoprotéines que nous avons étudiées (globulines γ G sériques de l'Homme et du Boeuf, globulines γ G du lait de Vache, ovomucoïde, orosomucoïde) (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (749) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (749a)).

a - L'acide sialique et le fucose, dans le cas de la lactotransferrine, apparaissent les premiers sur les chromatogrammes, suivis très rapidement par la N-acétylglucosamine. Le mannose est libéré plus tardivement ainsi qu'une autre fraction de la N-acétylglucosamine.

b - L'hydrolyse acide libère principalement des oses et peu d'oligosides. Seule parmi ceux-ci, la N-acétyllactosamine apparaît dès le début de l'action des acides. L'existence dans la partie supérieure du chromatogramme d'une "traînée" d'osides, qui s'allonge au fur et à mesure que se poursuit l'hydrolyse, montre que la libération des oses laisse, au début de l'hydrolyse, un oside de poids moléculaire relativement élevé qui reste au point de départ et dont l'hydrolyse ultérieure se manifeste par une intensification de l'effet de traînée.

c - L'hydrolyse par la résine polystyrène sulfonée donne des résultats identiques en ce qui concerne les oses : libération préférentielle du galactose et de la N-acétylglucosamine et hydrolyse tardive du mannose. Mais elle fournit, en outre, contrairement à l'hydrolyse acide, de nombreux

oligosides en quantité élevée. Parmi ceux-ci, la N-acétyllactosamine apparaît dès le début de l'hydrolyse. Elle est suivie par les mannobioses et par le mannotriose. Ces résultats sont illustrés par la Fig. 26 ; p. 166.

Les résultats que nous avons obtenus par hydrolyse acide ménagée ont été confirmés récemment par JAMIESON (750).

5 - Nous démontrons plus loin qu'il existe, dans la transferrine, deux chaînes glycaniques unies à la protéine par une liaison "asparaginy-glucosamine" et, dans la lactotransferrine, trois chaînes glycaniques dont deux sont unies à la protéine par le même type de liaison et une autre par une liaison O-thréonyl-glycosidique.

Nous avons pu isoler des hydrolysats pronasiques de l'asialotransferrine (voir p.211), deux glycopeptides I et II et des hydrolysats de l'asialolactotransferrine deux glycopeptides A et B et le glycanne détaché par l'action de la soude (voir p.224). Nous avons précisé dans le tableau XXX (p.167) la composition centésimale et molaire de ces différents composés.

On voit que, dans le cas de la transferrine, les compositions des glycopeptides I et II sont identiques, soit parce que les deux glycannes sont semblables, soit parce que les glycopeptides I et II sont chacun un mélange des deux glycanno-peptides.

Au contraire, dans le cas de la lactotransferrine, les 3 composés glucidiques que nous avons isolés possèdent des compositions centésimales différentes comme en témoignent les variations du rapport oses/osamines. En outre, en nous fondant sur les rendements, la masse moléculaire du glycanne détaché par l'action de la soude ne doit pas excéder 1.000, tandis que la masse moléculaire moyenne des autres glycannes est de l'ordre de 2.100 environ.

6 - D'un point de vue purement théorique, nous pouvons toutefois affirmer que les groupements glycaniques, aussi bien ceux de la transferrine que ceux de la lactotransferrine, sont différents. En effet, en nous fondant sur la composition molaire, des deux glycoprotéines, on voit que le nombre de résidus d'oses ne peuvent pas se répartir également sur les 2 glycannes, dans le cas de la transferrine, et sur les 2 glycannes dans le cas de la lactotransferrine. Semblable démonstration de l'existence de structures glycaniques différentes a été faite récemment par SCHMID et coll. (751) à propos de l'orosomucoïde.

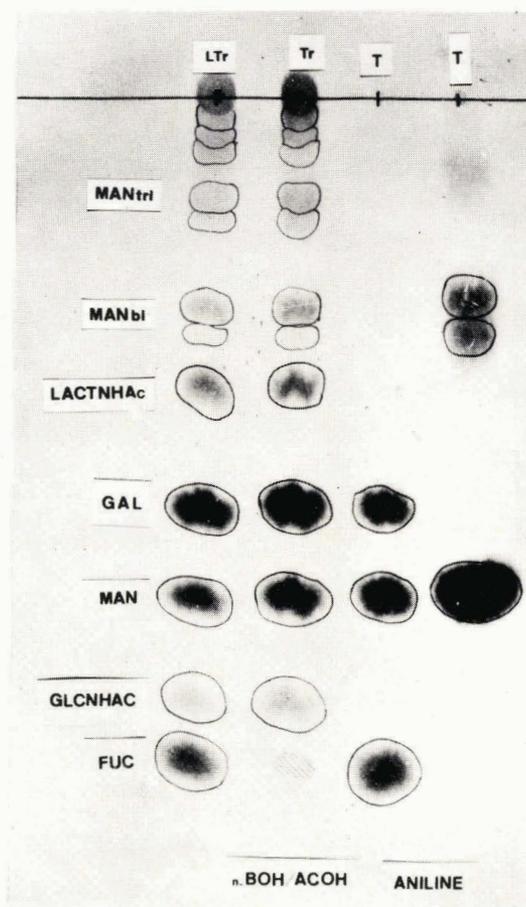


Figure 26

Chromatographie d'hydrolysats partiels de transferrine (Tr) et de lactotransferrine humaines (LTr) par un échangeur de cations (Dowex 50 x 8) ; forme acide). Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; papier Whatman n° 3 ; durée de la chromatographie 48 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. T : solutions-témoins. MANtri : manno-triose ; MAN bi ; mannobioses ; LACTNHAc : N-acétyllactosamine ; GAL : galactose ; MAN : mannose ; GLCNHAc : N-acétyl-glucosamine ; FUC : fucose.



Tableau XXX

Compositions centésimale et molaire de fractions glycaniques isolées des hydrolysats pronasiques de l'asiolotransferrine et de l'asiololactotransferrine (a).

Nature des composés	Oses "neutres" p. 100	Glucosamine p. 100	<u>Oses "neutres"</u> Glucosamine	Proportions molaires (c)		
				Gal	Man	Fuc (d)
<u>Transferrine</u>						
Glycopeptide I	38	20,60	1,94	1	1	-
Glycopeptide II	42,80	22,50	1,90	1	1	-
<u>Lactotransferrine</u>						
Glycopeptide A	42,30	30	1,40	1	1	0,62
Glycopeptide B	57,30	27,70	2,07	1	1,1	0,55
Glycane "libre" (b)	48	46	1,20	1	1	0,68

(a) Pour les détails expérimentaux, voir p. 136

(b) Libéré par l'action de la soude

(c) Gal : galactose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

(d) Au cours de la "désialylation" de la transferrine par hydrolyse acide, 1 résidu de fucose a été perdu

III - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude encore très fragmentaire que nous avons effectuée sur la structure des fractions glycaniques de la transferrine et de la lactotransferrine sont les suivantes :

1 - La transferrine possède deux groupements glycaniques et la lactotransferrine en possède trois.

2 - La répartition "théorique" des résidus d'oses entre les glycanes montre que les deux groupements glycaniques de la transferrine possèdent des structures différentes. Il en est de même pour les trois groupements glycaniques de la lactotransferrine à propos desquels nous apportons, en outre, une preuve expérimentale.

3 - Des différences fondamentales se manifestent à l'étude des glycanes de la transferrine et de la lactotransferrine, non seulement du point de vue du nombre des groupements glycaniques présents dans chacune des deux glycoprotéines, mais encore du point de vue de la composition en oses. En particulier, la lactotransferrine renferme du fucose qui est absent de la transferrine.

4 - Toutefois, nous avons mis en évidence, des analogies de structure entre les glycanes de la transferrine et de la lactotransferrine. En effet :

a - Les cinétiques de libération des oses sont superposables. En outre, des chaînes oligosidiques communs ont été mis en évidence dans les hydrolysats partiels des deux glycoprotéines : la N-acétyllactosamine qui apparaît dès le début des hydrolyses et qui se trouve donc en position externe, deux mannobioses isomères et un mannotriose vraisemblablement identiques à ceux qui ont été récemment isolés, au Laboratoire, des hydrolysats partiels de l'orosomucoïde et de l'ovomucoïde.

b - Dans la transferrine et dans la lactotransferrine, les glycanes sont constitués par de courtes chaînes peu ramifiées. Leur masse moléculaire moyenne est de 2.200 environ, dans le cas de la transferrine. Dans le cas de la lactotransferrine, le glycanne conjugué par une liaison O-glycosidique possède une masse moléculaire de l'ordre de 1000, tandis que la masse moléculaire moyenne des deux autres glycanes est de 2.100 environ.

Les unités glycaniques renferment donc, en moyenne (sauf dans le cas du glycanne détaché de la lactotransferrine par la soude qui renferme 5 résidus d'oses) de 11 à 12 résidus d'oses. Un résultat identique a été obtenu, dès 1963, par KAMIYAMA et SCHMID (753) à propos de l'orosomucoïde.

5 - La constitution des fractions glycaniques de la transferrine et de la lactotransferrine obéit donc à l'hypothèse de l'analogie de structure des glycoprotéines que nous avons énoncée, dès 1962 (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON) (754). En nous fondant, d'une part, sur cette hypothèse et, d'autre part, sur des résultats acquis récemment sur l'ovomucoïde et sur l'orosomucoïde par des chercheurs du Laboratoire (FOURNET, BAYARD, TAKERKART et DUPONT, Communication personnelle) et sur l'ovalbumine par MONTGOMERY et coll. (755), nous proposons le schéma général de structure suivant pour les 2 glycannes de la transferrine et de la lactotransferrine conjugués à la protéine par une liaison "aspariginyl-glucosamine"

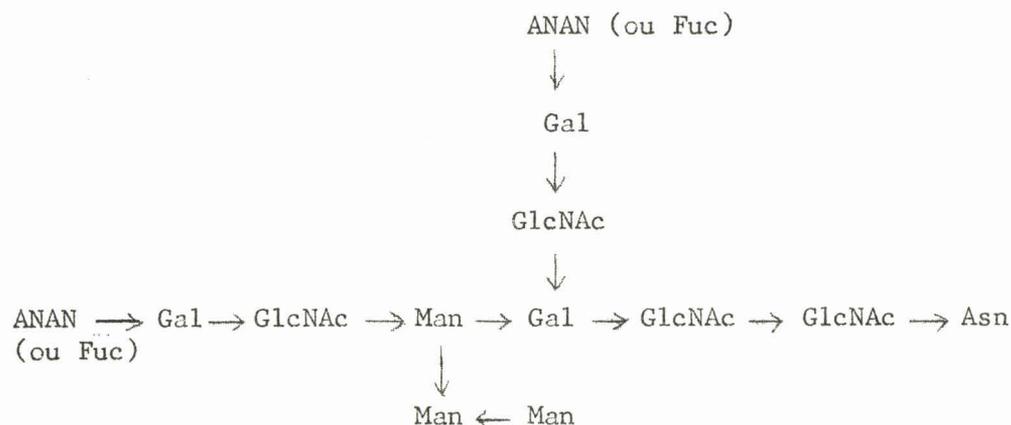


Figure 27

Quant au glycanne détaché par l'action de la soude sur la lactotransferrine, sa formule pourrait s'écrire :



Figure 28

Ces schémas sont évidemment purement spéculatifs. Ils ont néanmoins le mérite de rendre compte des résultats que nous avons obtenus et de représenter des modèles sur lesquels nous fonderons nos expérimentations futures.

ETUDE COMPAREE
DE LA
FRACTION PROTIDIQUE
DE LA TRANSFERRINE
ET
DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nos recherches sur l'étude comparée de la fraction protéique de la transferrine et de la lactotransferrine ont porté sur les points suivants :

- 1 - Détermination de la composition centésimale et molaire en acides aminés
- 2 - Identification des acides aminés N et C-terminaux
- 3 - Etude comparée de la composition en peptides des hydrolysats protéiniques des deux glycoprotéines.
- 4 - Etudes préliminaires sur la structure secondaire et tertiaire des protéines.

1 - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE
ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES

I - METHODES

Les acides aminés ont été dosés par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon (colonne de 0,6 x 150 cm) selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (756) en utilisant le système-tampon préconisé par la firme TECHNICON (+).

Les hydrolyses ont été effectuées dans les conditions suivantes :

(+) Nous remercions vivement M. M. MONSIGNY qui a effectué les séparations chromatographiques.

1 - HYDROLYSE DES GLYCOPROTEINES

Les hydrolyses ont été réalisées sur l'apotransferrine et sur l'apolactotransferrine préparées suivant le mode opératoire que nous avons décrit plus haut (voir p.135). Le fer doit, en effet, être soigneusement éliminé pour éviter la destruction des acides aminés fragiles. Le mode opératoire est le suivant :

L'échantillon (2 à 10 mg) est introduit dans un tube en pyrex (diamètre intérieur 9 mm, longueur 35 cm), avec 1 à 5 ml d'acide chlorhydrique, 5,6 N (azéotrope redistillé 3 fois), contenant de la nor-leucine (0,5 mM) utilisée comme témoin interne. Le tube est chauffé à l'aide d'un chalumeau afin de provoquer un étranglement à quelques centimètres au-dessus du niveau du liquide. La solution est congelée dans un mélange de neige carbonique et d'acétone. Enfin les gaz sont éliminés sous pression réduite et le tube est scellé.

L'hydrolyse est effectuée à 105°C en triple, pendant 24 h, 48 et 72 h.

Après refroidissement, les tubes sont ouverts et l'hydrolysate est transféré dans un ballon à distiller de 50 ml. L'acide est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu est repris par 0,5 ml d'eau distillée. A cette solution on ajoute 0,1 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 0,4 ml de glycérol, pour ioniser les groupements aminés et pour augmenter la densité de la solution. Ce mode opératoire facilite le dépôt de l'hydrolysate à la surface de la résine, au sein-même de la solution tampon.

2 - CALCULS

- Les valeurs de la sérine et de la thréonine sont calculées par extrapolation au temps zéro de l'hydrolyse.
- Les valeurs de la tyrosine, de la phénylalanine, de la cystéine et de la méthionine sont obtenues au bout d'une hydrolyse de 24 heures.
- Les valeurs de l'isoleucine, de la leucine, de la valine sont les valeurs maximales.

3 - DOSAGE DU TRYPTOPHANNE

Le dosage du tryptophanne a été effectué selon le procédé de SPIES et CHAMBERS (757). Le mode opératoire est le suivant :

30 mg de différents échantillons d'apotransferrine (ou d'apolactotransferrine) sont dissous dans 10 ml de soude 0,1 N. A 1 ml de la solution on ajoute 8 ml d'acide sulfurique 23,7 N et 1 ml d'acide sulfurique 2 N renfermant 30 mg de p-diméthylaminobenzaldéhyde. Les tubes sont agités, refroidis à 25°C et conservés pendant des temps variant de 12 à 18 h à l'obscurité. On ajoute alors 0,1 ml d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,045 p. 100. Après des temps variant de 0,5 à 3 h d'obscurité, les mesures des absorbances sont effectuées à 590 m μ , en présence de témoins - tryptophanne et de témoins renfermant la protéine sans ajouter le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXI (p. 173), pour la composition centésimale, et dans le tableau XXXII (p. 174) pour la composition molaire en acides aminés de la transferrine et de la lactotransferrine. Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

- 1 - Les deux protéides sont relativement riches en acides aminés dicarboxyliques qui représentent environ 20 p. 100 de leur poids et en cystéine. Ils sont pauvres en méthionine et en tryptophanne.
- 2 - Ils possèdent des compositions molaires nettement différentes.
- 3 - Nos résultats concernant la lactotransferrine sont pratiquement identiques à ceux de BLANC, BUJARD et MAURON (758), sauf pour le tryptophanne (Tableau XXXI ; p. 173). Dans le cas de la transferrine, ils sont analogues à ceux de HEIMBURGER et coll. (759), sauf pour l'arginine, la cystéine et le tryptophanne (Tableau XXXI ; p. 173).

Tableau XXXI

Composition en acides aminés de la transferrine et de la lactotransferrine exprimée en g. de résidus d'acides aminés p. 100 g de protéide.

Nature des acides aminés	Transferrine		Lactotransferrine	
	Résultats personnels	Résultats de HEIMBURGER et coll. (760)	Résultats personnels	Résultats de BLANC, BUJARD et coll. (761)
Acide aspartique	11,72	11,40	9,18	8,50
Acide glutamique	10,48	10,22	9,81	10,23
Arginine	4,13	5,15	7,58	7,52
Histidine	3,06	3,33	1,59	1,50
Lysine	9,19	9,65	6,82	6,49
Alanine	5,10	5	4,51	4,64
Cystine / 2	3,38	5,07	3,34	3,27
Glycocolle	3,67	3,44	3,74	3,38
Isoleucine	2,22	2,10	2,01	2,07
Leucine	8,60	8,21	7,16	6,81
Méthionine	0,86	1,31	0,50	0,76
Phénylalanine	5,63	5,07	4,78	4,91
Proline	4,23	3,82	3,67	3,67
Sérine	4,79	4,38	4,36	4,09
Thréonine	4	3,71	3,90	3,13
Tryptophane	1,36	2,10	1,34 à 1,77	0,20
Tyrosine	5,50	4,61	3,92	4,19
Valine	5,31	5,40	4,48	4,49

Tableau XXXII

Composition molaire (+) en acides aminés de la
transferrine et de la lactotransferrine

Nature des acides aminés	Transferrine	Lactotransferrine
Acide aspartique	77	60
Acide glutamique	62	57
Arginine	20	37
Histidine	17	9
Lysine	54	40
Alanine	55	48
Cystine / 2	13	12
Glycocolle	48	49
Isoleucine	15	14
Leucine	58	48
Méthionine	5	3
Phénylalanine	29	25
Proline	33	29
Sérine	42	38
Thréonine	30	29
Tryptophane	5 ou 6	6 ou 7
Tyrosine	26	18
Valine	41	34

(+) Pour une masse moléculaire de 76.000

4 - Dans un premier travail (MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY) (762), la composition en acides aminés de la lactotransferrine avait été déterminée par la méthode des DNP - amino-acides de LEVY (763) et les résultats qui avaient été obtenus à l'époque étaient les suivants (ramenés à une masse moléculaire de 76.000).

Acide aspartique	73	Leucine + isoleucine	77
Acide glutamique	61	Phénylalanine	29
Arginine	42	Proline	34
Histidine	13	Sérine	48
Lysine	41	Thréonine	29
Alanine	76	Tyrosine	7
Cystine / 2	24	Valine	49
Glycocolle	58		

On voit que, pour la plupart des acides aminés, les résultats fournis par les méthodes de LEVY, d'une part, de PIEZ et MORRIS, d'autre part, sont différents, principalement pour la tyrosine. Ces anomalies s'expliquent par l'imperfection de la méthode de LEVY.

III - CONCLUSIONS

1 - La composition en acides aminés de la transferrine et de la lactotransferrine présente des différences significatives.

2 - Les résultats que nous avons obtenus à propos de la composition centésimale en acides aminés de la transferrine et de la lactotransferrine sont, dans l'ensemble, identiques à ceux, respectivement, de HEIMBURGER, HEIDE, HAUPT et SCHULTZE (764) et de BLANC, BUJARD et MAURON (765).

3 - Au contraire, les compositions molaires déterminées par nous-même, d'une part, et par les auteurs précédents, d'autre part, ne peuvent être comparées. En effet, nous les avons calculées sur la base de masses moléculaires de 76.000, tandis que HEIMBURGER et coll. adoptaient la valeur de 90.000 pour la transferrine et BLANC et coll., la valeur de 95.000 pour la lactotransferrine.

2 - DETERMINATION DES ACIDES
AMINES N- et C- TERMINAUX

I - METHODES

A - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Les acides aminés en position C-terminale ont été identifiés par voies enzymatiques (action des **carboxypeptidases**) et par voie chimique (action de l'hydrazine).

1 - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

Des tentatives d'hydrolyse enzymatique des liaisons des amino-acides C-terminaux ont été effectuées sans succès, par les carboxypeptidases A et B (LIGHT), selon le procédé décrit par SPIRO (766).

2 - HYDRAZINOLYSE

a - Principe. L'hydrazine, en milieu anhydre, coupe les liaisons peptidiques en libérant les acides aminés C-terminaux et en transformant les autres en hydrazides.

b - Mode opératoire. L'hydrazinolyse a été réalisée suivant la méthode d'AKABORI et coll. (767) :

100 mg de glycoprotéine anhydre et 25 μ M de nor-leucine utilisée comme témoin interne, sont traités à 100°C, pendant 8 h, par 1 ml d'hydrazine anhydre, préparée selon le procédé de KUSAMA (768). La solution est évaporée à siccité sous vide et reprise par 2 ml d'eau distillée et purifiée sur une colonne (0,9 x 5 cm) d'Amberlite IRC-50 (forme acide). Les hydrazides d'acides aminés et les acides aminés basiques libérés sont fixés sur la colonne.

Les acides aminés neutres et dicarboxyliques (+) libérés par l'hydrazinolyse, accompagnés du témoin interne de nor-leucine, sont déplacés par le passage de 25 à 50 ml d'eau distillée (LAY et POLGLASE) (769).

(+) Eventuellement accompagnés, dans le cas où l'asparagine (ou la glutamine) se trouve en position terminale, de "l'asparthydrazide 4" (ou du "glutamthydrazide 5").

Les acides aminés basiques (+) sont élués par 50 ml d'une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7 (DE LA LLOSA et coll. (770)). L'acétate d'ammonium est éliminé par un passage sur échangeur d'anions (Duolite A-102-D) suivie de l'évaporation à siccité de l'effluent.

Les acides aminés présents dans les deux éluats sont dosés à l'Auto-analyseur Technicon.

B - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS N-TERMINAUX

Les acides aminés en position N-terminale ont été identifiés par la méthode de dinitrophénylation de BISERTE, HOLLEMAN et coll. (771).

1 - Dinitrophénylation

250 mg de transferrine ou de lactotransferrine en solution dans 20 ml de chlorure de potassium 0,1 M, sont traités par 0,7 ml de fluorodinitrobenzène. Le mélange est placé au bain-marie à 40°C, sous agitation constante et le pH est maintenu à 8 par l'addition continue de potasse 0,05 N, à l'aide d'un pH-stat. Le mélange est maintenu au bain-marie jusqu'à cessation de la consommation de potasse, (environ 1 à 2 h). La DNP-protéine est précipitée par l'addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité est recueilli par centrifugation, lavé à l'éther, à l'acétone et séché sous vide en exsiccateur.

2 - Hydrolyse de DNP-protéides

Les DNP-protéines (60 mg) sont hydrolysées par 10ml d'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé, pendant 5 et 18 h, à 105°C, en tube scellé, sous vide.

3 - Extraction et chromatographie des DNP-amino-acides

Les hydrolysats chlorhydriques sont dilués avec de l'eau pour obtenir une concentration sensiblement normale en acide chlorhydrique. L'hydrolysate ainsi dilué est extrait 7 à 8 fois par 50 ml d'éther privé de peroxydes, lavé une fois par 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Ils contiennent les DNP-amino-acides éthero-solubles.

(+) Eventuellement accompagnés de "l'asparthydrazide 1" et du "glutamhy-drazide 1".

Les phases aqueuses sont rassemblées. Elles renferment les DNP-amino-acides hydrosolubles : DNP-arginine, acide DNP-cystéique, ϵ -DNP-lysine, Im-DNP-histidine que l'on extrait par du butanol secondaire, puis par de l'acétate d'éthyle.

Les solutions étherées ou aqueuses sont évaporées à siccité, séparément, dans l'appareil spécial décrit par BISERTE et al. (772) qui permet d'éliminer le dinitrophénol par sublimation sous pression réduite. La sublimation s'effectue à 70° - 80°C pendant trente minutes, le doigt intérieur étant rempli d'un mélange de neige carbonique et d'acétone.

4 - Chromatographie des DNP-amino-acides

a - DNP-éthéro-solubles

Le résidu, privé du dinitrophénol, est dissous dans un faible volume d'acétone, et l'analyse des DNP-amino-acides est réalisée par chromatographie bidimensionnelle sur papier WHATMAN n° 1.

Le dépôt est effectué sur une feuille de 40 x 55 cm à 10 cm du bord du petit côté et à 5 cm du bord du grand côté. Le premier système-solvant utilisé est préparé de la façon suivante :

Le mélange : toluène/pyridine/2chloro-éthanol/ammoniaque 0,8 N (10:3:6:6), qui est biphasique, est homogénéisé par agitation, puis laissé au repos pendant 4 h. La phase aqueuse, inférieure est éliminée ; la phase organique supérieure, qui reste trouble, est filtrée sur du papier WHATMAN n° 1, qui retient les micelles d'eau, et le filtrat clair ainsi obtenu est utilisé comme solvant de développement de la première dimension.

Le chromatogramme, enroulé est maintenu par 2 agrafes, en cylindre. Il est placé dans une cuve de chromatographie ascendante, contenant deux cristallisoirs concentriques ; le cristallisoir reçoit le système-solvant 24 h après l'introduction du chromatogramme dans la cuve.

Lorsque le front du solvant atteint la partie supérieure de la feuille, celle-ci est sortie de la cuve, et le solvant est éliminé sous courant d'air, à l'abri de la lumière, pendant 10 à 12 h.

Une deuxième chromatographie, descendante, est alors effectuée perpendiculairement à la première, dans un tampon phosphate de sodium 1,5 M de pH 6, ou dans un tampon phosphate de sodium 2,5 M de pH 6 lorsque les acides DNP-aspartique et DNP-glutamique sont tous deux présents.

Les DNP-amino-acides apparaissent sous la forme de taches jaunes. Ils sont identifiés grâce à des diagrammes témoins. La tache de dinitrophénol (jaune) peut facilement être reconnue, car elle disparaît lorsque l'on soumet le chromatogramme aux vapeurs d'acide ; la tache de la dinitraniline se présente sous forme d'une traînée qui possède une fluorescence verdâtre particulière lorsqu'elle est soumise aux rayons ultra-violet.

b - DNP-hydrosolubles

Les DNP-amino-acides hydrosolubles sont extraits de la phase aqueuse par du butanol secondaire, puis par de l'acétate d'éthyle. Les deux extraits sont réunis, évaporés à siccité et soumis à la chromatographie dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) avec des témoins latéraux de DNP-histidine, DNP-arginine et ϵ -DNP-lysine.

Les DNP-amino-acides sont dosés selon le procédé de BISERTE, HOLLEMAN et coll. (773) : extraction par une solution bicarbonate ; mesure des absorbances à des longueurs d'onde spécifiques ; calcul des résultats d'après les coefficients d'extinction déterminés par les auteurs précédents.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1 - AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

a - La transferrine possède 1 résidu de valine en position N-terminale (Fig. 29 ; p. 180). Aucun DNP-amino-acide hydrosoluble a été caractérisé dans la phase aqueuse (à l'exception évidemment de l' ϵ -DNP-lysine). Ce résultat que nous avons obtenu en 1961, confirme les conclusions d'autres auteurs comme GÖLLNER, 1955 (774), PUTNAM, 1955 (775), BEARN et PARKER, 1963 (776) appliquant la méthode des DNP-amino-acides de SANGER.

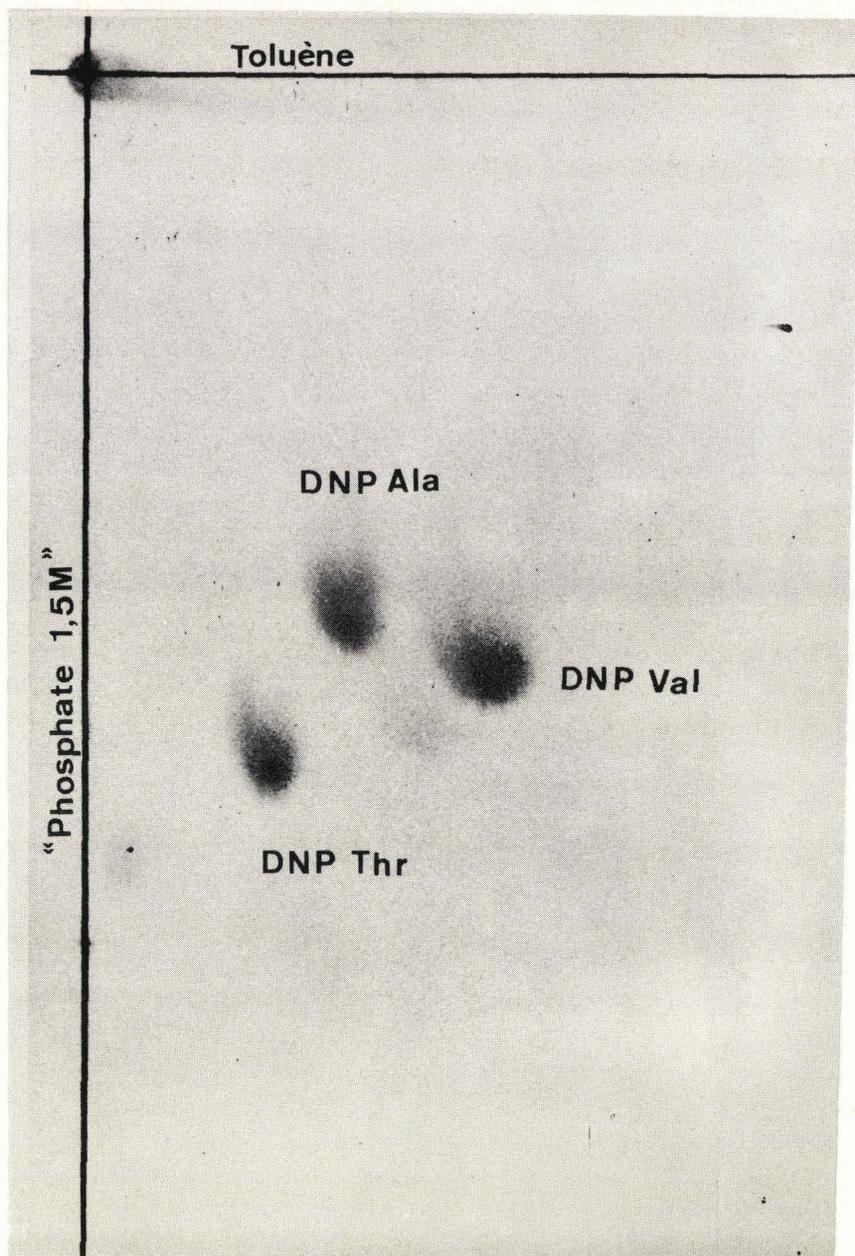
BUS
LILLE

Figure 29

Identification chromatographique d'acide aminé N-terminal (valine) de la transferrine sous la forme de DNP-dérivé DNP-Val : DNP-valine. Les DNP-alanine (DNP-Ala) et -thréonine (DNP-Thr) ont été introduits comme témoins internes. Systèmes-solvants : toluène/pyridine/2-chloro-éthanol/ammoniac 0,8 N (10:3:6:6), en première dimension ; solution-tampon de phosphate de sodium 1,5 M de pH 6, en deuxième dimension.

Récemment, JEPPSSON(777), utilisant la méthode d'ERIKSSON et SJOQUIST (778) des PTH-dérivés d'EDMAN a obtenu les résultats que nous avons rassemblés dans le tableau XXXIII (p. 182). On voit que, à côté de la valine, d'autres acides aminés ont été caractérisés, en proportion moindre, en position N-terminale. Selon cet auteur, ces résultats s'expliqueraient soit par la présence d'impuretés protéiques, soit par l'existence, dans la transferrine, de très courtes chaînes peptidiques. Un résultat analogue a été obtenu par AISEN (779) qui a trouvé, pour une transferrine préparée à partir de la fraction IV-7 de COHN, les proportions suivantes d'acides aminés N-terminaux : valine 0,91 et acide aspartique 0,15.

b - La lactotransferrine ne possède pas d'acide aminé en position NH_2 terminale. Ce résultat qui n'a reçu, jusqu'à présent, la confirmation d'aucun autre auteur, implique que la fonction amine du ou des acides aminés N-terminaux est bloquée.

2 - AMINO-ACIDES C-TERMINAUX

a - L'application à la transferrine de la méthode d'hydrazinolyse libre, pour une masse moléculaire de 76.000, 0,72 résidu de proline, 0,80 résidu de glycolle et 0,32 résidu de sérine (Tableau XXXIV ; p. 183). Ce résultat original, qui, lui aussi, n'a pas encore reçu la confirmation d'autres auteurs, est en faveur de l'existence de trois chaînes peptidiques dans la transferrine.

b - L'application du même procédé à la lactotransferrine montre que 1 résidu de glycolle et 0,6 résidu de sérine sont en position C-terminale (Tableau XXXIV ; p. 183). Ce résultat qui réclame des confirmations futures amène à la conclusion que la lactotransferrine est formée d'au moins 2 chaînes peptidiques.

III - CONCLUSIONS

Les conclusions auxquelles nous conduisent notre étude sur la détermination des acides aminés C et N-terminaux dans la transferrine et dans la lactotransferrine sont les suivantes :

Tableau XXXIII

Acides aminés N-terminaux de différents échantillons de transferrine humaine (d'après JEPPSSON) (784).

Résidus d'acides aminés (+)	Transferrine Kabi	Transferrine Behringwerke	
		Echantillon 1	Echantillon 2
Acide aspartique	0,10	0,20	0,13
Glycocolle	0,12	-	0,15
Sérine	0,10	-	0,10
Valine	0,86	0,83	0,93

(+) Pour une masse moléculaire de 88.000

Tableau XXXIV

Acides aminés C-terminaux de la transferrine et de la lactotransferrine humaines (+)

Acides aminés	TRANSFERRINE	LACTOTRANSFERRINE
Glycocolle	0,80	1
Proline	0,72	-
Sérine	0,32	0,60
Alanine	traces	traces

(+) Les résultats sont exprimés en résidus d'acides aminés par mole de protéide de masse moléculaire 76.000.

1 - La détermination des groupements N-terminaux et C-terminaux introduit une nouvelle discrimination entre la transferrine et la lactotransferrine. En effet, la nature et le nombre des acides aminés en position C-terminale sont différents dans les deux protéides comme l'illustre le tableau XXXIV ; (p. 183). En outre, un amino-acide N-terminal : la valine a été caractérisé dans la transferrine tandis que la lactotransferrine en est dépourvue.

2 - En nous fondant sur la détermination des groupements C-terminaux de la lactotransferrine nous parvenons à la conclusion qu'elle possède deux chaînes peptidiques avec le glyco-colle et la sérine en position C-terminale.

3 - D'après les résultats fournis par l'hydrazinolyse, la transferrine posséderait 2 à 3 chaînes peptidiques. Ainsi serait confirmé des résultats récemment obtenus par JEPPSSON(785) qui a montré que la rupture des ponts disulfure de la transferrine conduisait à la formation de deux sous-unités de même masse moléculaire.

3 - "FINGER-PRINTING" DES HYDROLYSATS PROTEINASIQUES DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nous avons abordé l'étude comparée de la structure de la fraction protéique de la transferrine et de la lactotransferrine en appliquant, dans son principe, le procédé de "finger-printing" d'INGRAM, dans le but, d'une part, de caractériser des séquences peptidiques spécifiques de l'un et de l'autre des glycoprotéides et de préciser, d'autre part, les meilleures conditions d'hydrolyse protéasique à appliquer à ces derniers pour obtenir des glycopeptides de composition simple destinés à l'exploration du point d'attache du glycanne sur la protéine.

I - METHODES

Les enzymes suivants ont été utilisés : trypsine (EC 3.4.4.4) ; chymotrypsine (EC 3.4.4.5) ; pepsine (EC 3.4.4.1) ; papaïne (EC 3.4.4.10) ; pronase de NOMOTO et NARAHASHI (786).

Les hydrolyses ont été effectuées

- a - sur la transferrine et sur la lactotransferrine saturées en fer
- b - sur les apoprotéines (voir p.135)
- c - sur les apo-asialoprotéides obtenus par hydrolyse sulfurique ménagée (SO_4H_2 0,01 N ; 80°C ; 1 h pour la lactotransferrine et SO_4H_2 0,1 N à 80°C ; 1 h pour la transferrine).

1 - HYDROLYSES PROTEINASIQUES

Les hydrolyses enzymatiques ont été effectuées dans des conditions strictement déterminées afin que les résultats soient reproductibles et comparables.

a - Hydrolyse trypsique :

Nous avons appliqué le procédé de HIRS, MOORE et STEIN (787) :

A 20 mg de protéides en solution dans 5 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,8, on ajoute 80 μl d'une solution de trypsine (10 mg de trypsine dans 2 ml d'acide chlorhydrique N/16 (Rapport enzyme / substrat 1/50). Le mélange, ajusté à pH 8,5 avec de la soude normale, est additionné d'une goutte de chloroforme et maintenu à 37°C , pendant 24 h. Au cours de l'hydrolyse, pour compenser la perte d'activité de l'enzyme par autolyse, on rajoute des quantités de 80 μl de la solution de trypsine après 4 et 8 h d'hydrolyse.

b - Hydrolyse pepsique

Les conditions de pH de l'hydrolyse pepsique nous ont conduite à expérimenter uniquement sur les apo-protéides dont les complexes ferriques sont dissociés. Nous avons appliqué le procédé de SANGER et THIMPSON (788) :

A 20 mg de protéides en solution dans 5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N, on ajoute 1 mg de pepsine cristallisée et une goutte de toluène. Les solutions sont maintenues à 37°C pendant 24 h.

c - Hydrolyse chymotrypsique

Le mode opératoire est identique à celui de l'hydrolyse trypsique à la différence près que le rapport enzyme substrat est de 1/100.

d - Hydrolyse papaïnique

L'hydrolyse papaïnique des protéides a été réalisée selon le mode opératoire de MARGOLIASH et coll. (789):

A 20 mg de protéides en solution dans 4,5 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 6,2, on ajoute 0,5 ml d'une solution de cyanure de sodium à 0,05 g p. 100 ml de la solution d'acétate et de papaïne cristallisée (rapport enzyme / substrat : 1 à 5/100). Les solutions, additionnées d'une goutte de toluène, sont maintenues à 37°C pendant 24 h.

e - Hydrolyse pronasique

Les protéides ont été hydrolysés par la pronase suivant la méthode de YAMASHINA et coll. (790) :

A 25 mg de protéides en solution dans 4,5 ml d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 0,5 ml d'une solution de pronase (10 mg dans 10 ml de tampon) (rapport enzyme / substrat 1/50). La solution est ensuite ajustée à pH 8 avec de la soude 1 N, additionnée d'une goutte de toluène et maintenue à 37°C pendant 24 h.

2 - ELECTRO-CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE

Nous avons appliqué le mode opératoire de BISERTE et coll. (790a)

Des volumes d'hydrolysats correspondant à 1 mg de protéide sont déposés en plusieurs additions de 100 μ l sur des feuilles de papier Whatman n° 3 et soumis à une électro-chromatographie bidimensionnelle effectuée dans les conditions suivantes :

- Electrophorèse dans le tampon de MICHL (791) : pyridine / acide acétique / eau (3:10:387) réalisée dans des cuves d'électro-rhéophorèse "en toit", sous une tension de 10 V/cm, pendant 18 h. Après séchage, les électrophorégrammes sont soumis à la chromatographie :

- Chromatographie descendante dans le système-solvant n-butanol/ acide acétique/eau (4:1:5), pendant 18 h.

Après séchage, les papiers sont imbibés, par trempage, d'une solution de ninhydrine à 1 g p. 100 (ninhydrine 10 g ; acétone 960 ml ; acide acétique 40 ml) et maintenus pendant 10 mn exactement dans une étuve à 100°C.

II - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être résumés de la manière suivante :

- 1 - Le fer complexé aux transferrines inhibe l'hydrolyse par la trypsine (Fig. 30 ; p. 188) et par la chymotrypsine. Il ralentit fortement l'activité de la papaïne et faiblement celle de la pronase. Dans le cas de la pepsine, il est sans action, car, dans les conditions de l'hydrolyse (pH 2) les complexes fer-transferrine sont dissociés.
- 2 - La présence de l'acide sialique ne semble pas avoir d'influence sur l'activité des protéases.
- 3 - Sauf dans le cas de la chymotrypsine, la protéolyse est profonde car il ne subsiste plus, sur les électrochromatogrammes, de tache correspondant aux transferrines intactes. La dégradation la plus importante est réalisée par la pronase. Des résultats identiques ont été obtenus par GOT (792) avec la lactotransferrine.
- 4 - Dans tous les cas d'hydrolyse protéinasique, les "finger-prints" obtenus par électrochromatographie révèlent l'existence de nombreuses séquences peptidiques spécifiques de la transferrine et de la lactotransferrine (Fig 31 ; p. 189).

III - CONCLUSIONS

L'étude comparée des produits de l'hydrolyse par différents enzymes protéolytiques de la transferrine et de la lactotransferrine humaines, natives ou modifiées, nous conduit aux conclusions suivantes :

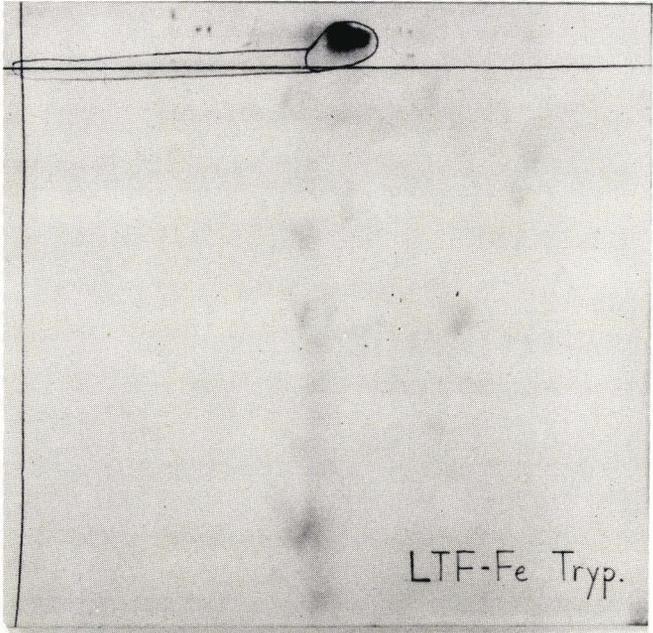
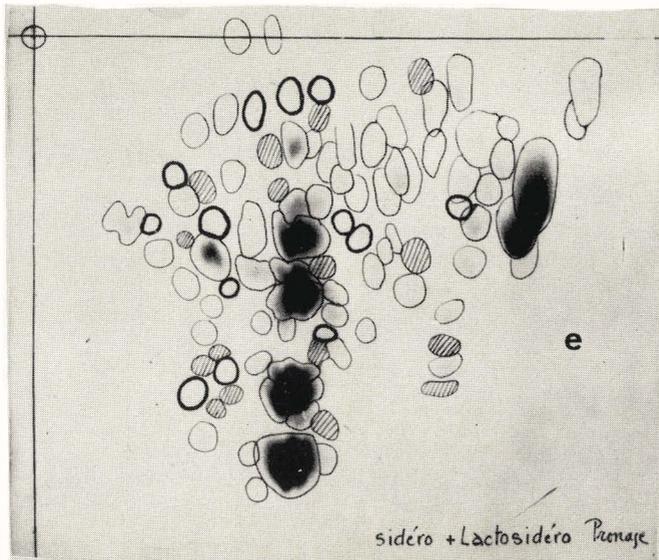
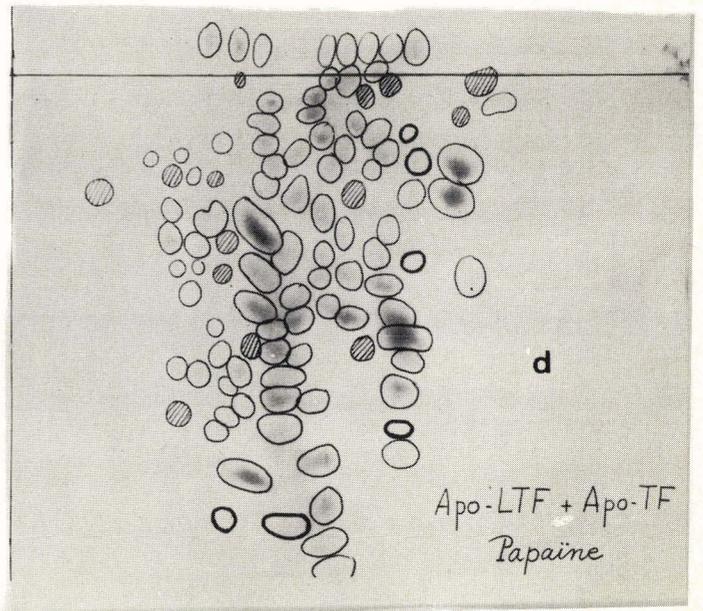
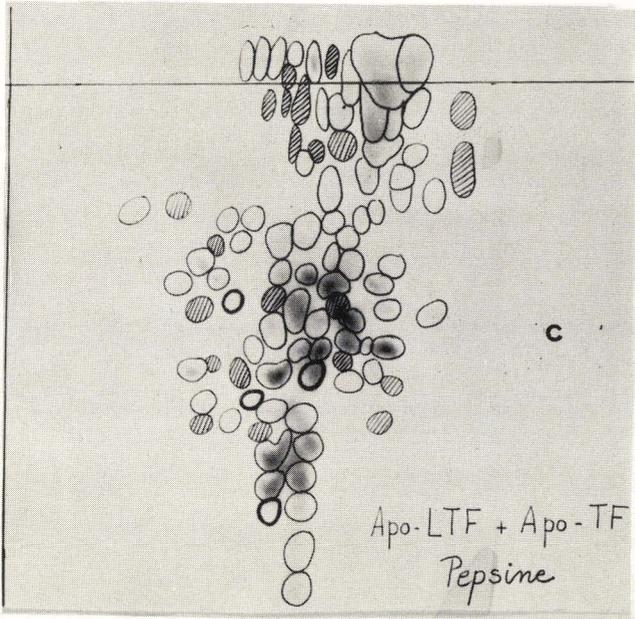
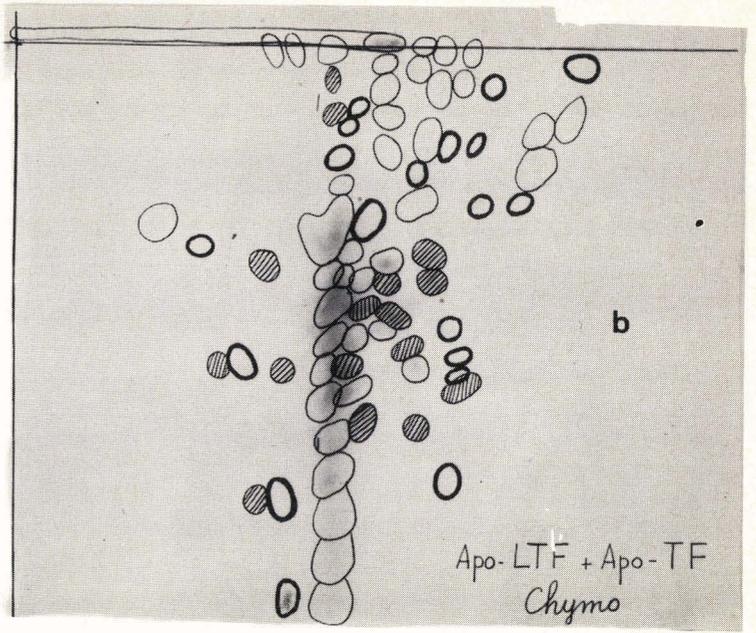
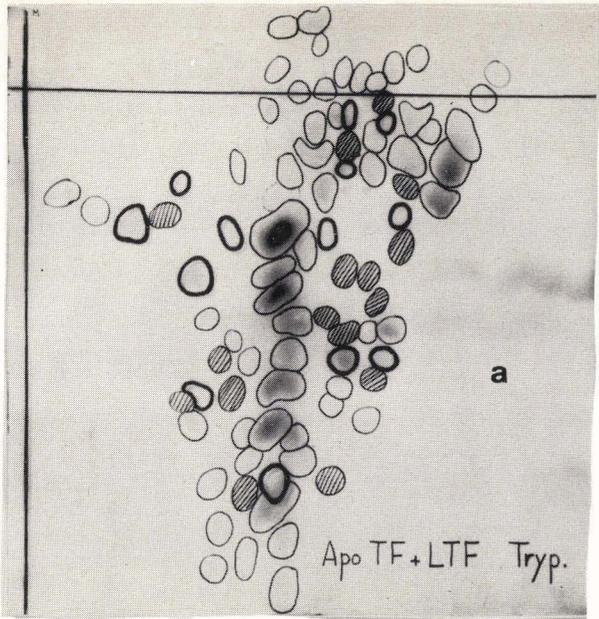


Figure 30



Electrochromatogramme bidimensionnel d'un hydrolysate trypsique de ferro-lactotransferrine Electrophorèse dans le sens horizontal ; chromatographie dans le sens vertical (voir texte ; p. 186).



1 - La présence du fer dans les transferrines stabilise leurs molécules et inhibe les protéases et il est nécessaire de faire agir ces dernières sur les apoprotéides. L'élimination de l'acide sialique n'améliore pas la protéolyse. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse de l'intervention du fer complexé aux transferrines dans les structures secondaire et tertiaire de ces dernières. **AZARI et FEENEY (793)** parviennent à la même conclusion à propos de la conalbumine et de la transferrine.

2 - L'hydrolyse pronasique représente le procédé de choix pour réaliser une hydrolyse profonde de la transferrine et de la lactotransferrine en vue d'isoler des glycoprotéides simples. Appliquée à la transferrine, elle nous a permis de déterminer les modalités de la liaison glycanne-protéine dans ce glycoprotéide (voir p.195).

3 - L'existence de séquences peptidiques différentes dans les hydrolysats protéasiques de la transferrine et de la lactotransferrine, révélées par la méthode de "finger-printing", démontre que les structures des fractions protéiques des deux glycoprotéides sont bien distinctes.

4 - CONCLUSIONS GENERALES DE L'ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE DE LA TRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude de la fraction protéique de la transferrine et de la lactotransferrine sont les suivantes :

1 - Les compositions en acides aminés des deux protéides sont très nettement différentes.

2 - Les résultats que nous avons obtenus statistiquement à propos de la composition en amino-acides de la transferrine et de la lactotransferrine confirment ou ont été confirmés par d'autres auteurs. Ils peuvent donc être considérés comme définitifs, tout au moins en ce qui concerne la composition centésimale des protéides. En effet, les valeurs de masse moléculaire de ces derniers demandent encore à être vérifiées.

3 - La nature des amino-acides N et C-terminaux est différente dans les deux protéides. En effet, la transferrine possède la valine en position N-terminale et le glycocolle, la proline et la sérine en position C-terminale. La lactotransferrine n'a pas d'acides NH₂-terminaux, mais possède le glycocolle et la sérine en position C-terminale.

4 - Ces résultats, associés à ceux de JEPPSSON (794) pour la transferrine impliquent l'existence de 2 à 3 chaînes polypeptidiques dans la transferrine et de 2 chaînes dans la lactotransferrine.

5 - Les structures primaires des deux protéides sont différentes. En effet, il apparaît sur les électro-chromatogrammes, bidimensionnels des hydrolysats protéinasiqes de la transferrine et de la lactotransferrine des oligopeptides spécifiques ce qui implique l'existence de séquences peptidiques différentes.

6 - La résistance des métalloprotéides à l'action des protéinases que nous avons mise en évidence, associée à l'observation que la fixation du fer sur les protéides modifie profondément le pouvoir rotatoire spécifique de ces derniers (voir p.131), nous permet de conclure que les 2 atomes de fer, en se fixant sur les sites spécifiques des protéides, interviennent dans la détermination de la structure secondaire et tertiaire de ces composés.

ETUDE COMPAREE
DES
MODALITES DE L'ATTACHE
GLYCANNE-PROTIDE
DANS LA TRANSFERRINE
ET DANS LA LACTOTRANSFERRINE

A la suite des travaux de YAMASHINA et coll. sur l'orosomucoïde et sur l'ovalbumine, d'une part, et de PIGMAN et de GOTTSCHALK sur les mucines sous-maxillaires, d'autre part, on a démontré que, dans de nombreuses glycoprotéines, les fractions glycaniques étaient attachées aux chaînes peptidiques par deux types principaux de liaisons :

- liaisons de type glycosylamine
- liaisons de type O-glycosidique

1 - LIAISONS GLYCOSYLAMINIQUES

Dans de nombreux glycoprotéides d'origine animale, le groupement glycanique et la fraction protidique sont unis par une liaison glycosylaminique formée par la conjugaison du groupement réducteur de la N-acétyl-glucosamine et de la fonction β amidée de l'asparagine. Le chaînon qui unit le glycanne et la protéine a été identifié au 2-acétamido-1- β -(L-aspartamido)-1,2-désoxy-D-glucose ou 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine (Fig. 32 ; p. 193).

Ce type de liaison a été caractérisé, sans ambiguïté, dans les glycoprotéides suivants : l'ovalbumine, l'orosomucoïde, l'ovomucoïde, les globulines γ G du sérum humain, du sérum bovin et du colostrum de Vache, le fibrinogène.

En outre, son existence est posée en hypothèse dans les glycoprotéines suivantes : haptoglobuline, Taka-amylase A, globulines γ A du sérum de myélomateux et du lait de Femme ; céruléoplasmine ; thyroglobuline ; albumine de l'Orge ; hémagglutinine du Haricot.

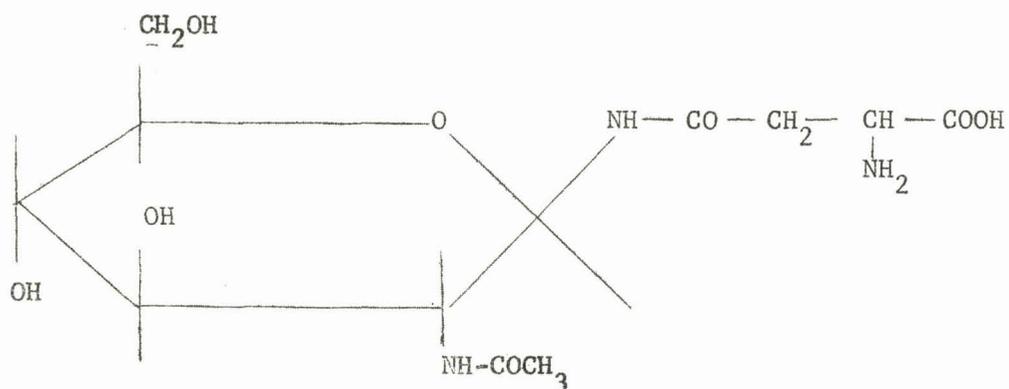
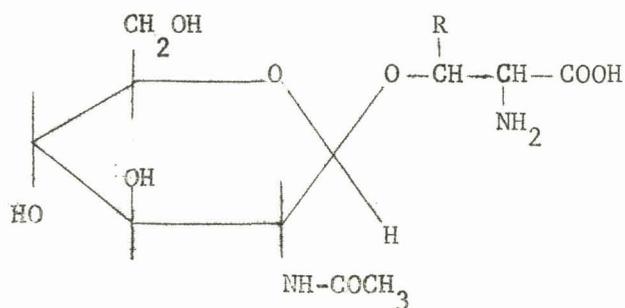


Figure 32

2 -acétamido-1- β -(L-aspartamido) -1,2-désoxy-D-glucopyrannose
 ou (β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine
 ou asparaginyln-N-acétylglucosamine.



R = H : sérine

R = CH₃ : thréonine

Figure 33

O-séryl ou O-thréonyl-N-acétylglucosaminide

2 - LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

Dans de nombreux glycoprotéides, la fonction réductrice de l'ose terminal du glycanne est conjuguée avec la fonction alcoolique d'un hydroxy-amino-acide de la chaîne peptidique (sérine, thréonine, hydroxylysine ou hydroxyproline). Ce type de liaison (Fig. 33 ; p. 193) a été mis en évidence dans les glycoprotides suivants :

- 1 - Mucines sous-maxillaires. Dans les mucines sous-maxillaires, des liaisons O-thréonyl ou O-séryl-N-acétylgalactosaminides ont été mises en évidence.
- 2 - Glycosylamino-glycannes de la substance fondamentale. Dans les mucopolysides acides de la substance fondamentale, le glycanne est attaché au protide par une liaison O-séryl-xylosidique : héparine, acides chondroïtine-sulfuriques.
- 3 - Substances de groupes sanguins : liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminidiques.
- 4 - Tropocollagène dans lequel le galactose est conjugué à la fonction hydroxylée de l'hydroxylysine.
- 5 - Glycoprotéines de la membrane basale glomérulaire où une liaison α -glucosido-1,2- β -galactoside de l'hydroxylysine a été caractérisée.
- 6 - Globulines γ A isolée du sérum de myélomateux et du lait de Femme, qui renferment des liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminides.
- 7 - Globulines γ G du lapin dont une "chaîne lourde" porte un résidu de N-acétylgalactosamine lié à un résidu de thréonine.
- 8 - "Extensine" glycoprotéide végétal extrait de la Tomate dans lequel existent des liaisons O-hydroxy-prolyl de l'arabinose.

Nous nous sommes attachée à rechercher dans la transferrine et dans la lactotransferrine, ces deux types de liaisons qui sont les plus répandues dans le règne animal.

Les procédés que nous avons appliqués sont essentiellement fondés sur l'hydrolyse acide ménagée des glyco-amino-acides (+) ou de leurs dérivés, destinés à parvenir jusqu'au point d'attache lui-même, constitué par l'association de l'ose et de l'acide aminé impliqués dans la liaison glycanne-protéine.

Leur application exige donc de dégrader profondément la fraction protéique de manière à parvenir le plus près possible des points d'attache.

Nous envisagerons donc successivement les problèmes suivants :

- 1 - Hydrolyse protéasique et isolement des glycopeptides
- 2 - Détermination de la composition des glycopeptides
- 3 - Détermination des séquences peptidiques dans les glycopeptides
- 4 - Détermination des modalités de la liaison glycanne-peptide.

1 - DESCRIPTION DES METHODES

I - HYDROLYSE PRONASIQUE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

A- HYDROLYSE PRONASIQUE

1° - Principe

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes, le procédé que YAMASHINA et MAKINO (795) ont appliqué à l'ovalbumine en apportant, toutefois, les trois modifications suivantes :

a - Abandon de la solution boratée, employée par les auteurs pour tamponner les hydrolysats, et stabilisation du pH à l'aide d'un pH-stat.

b - Fixation de l'acide trichloracétique, utilisé pour purifier les hydrolysats, par un échangeur d'anions, en remplacement de l'extraction par l'éther sulfurique qui provoque des pertes sensibles de rendement en glycopeptides.

c - Application de 4 hydrolyses pronasiques successives même lorsque la consommation de soude devient nulle à partir du 3^e hydrolysats. En effet, la libération des derniers amino-acides au voisinage de la liaison glycanne-protéide n'entraîne plus de consommation de soude perceptible.

(+) Nous désignons par ce terme, le produit de la conjugaison d'un acide aminé avec un glycanne.

2° - Mode opératoire

A une solution de 10 g d'apo-asialotransferrine (ou lactotransferrine) (voir p.142) dans 1 litre d'acétate de calcium 0,1 M, on ajoute 200 mg de Pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 40°C, sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat TTTIC Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial, puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu pendant deux heures à la température du laboratoire, puis à 2°C pendant 18 heures. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole expérimental est répété encore deux fois (+), à la différence près que le précipité obtenu à partir du 4^e hydrolysate est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous. Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique totale" (FGT).

B - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1° - Principe

Les glycopeptides sont débarrassés de l'acide trichloracétique et d'une partie des peptides par un passage sur échangeurs de cations et d'anions. Ils sont ensuite purifiés par chromatographie sur Sephadex qui élimine encore des peptides. En outre, certains glycopeptides ont été isolés et purifiés par électrophorèse préparative.

2° - Mode opératoire

a - Purification sur échangeurs d'ions

La fraction FGT est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g p. 100 ml.

(+) Fréquemment, à partir de la 3^e précipitation éthanolique, le mélange se gélifie et il est nécessaire d'ajouter un volume d'éther sulfurique pour sédimenter le précipité par centrifugation.

Le précipité formé est éliminé par centrifugation, après un repos de 18 h, à 2°C. La solution surnageante est purifiée par un passage successif sur des colonnes (2 x 35 cm), d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide), puis d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (1 litre), est concentré à 20 ml, dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu. Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique échangeurs d'ions" (FGEI).

b - Purification par chromatographie sur gel de dextrane

La fraction FGEI est débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus par les échangeurs d'ions, par une chromatographie sur colonne (2 x 35 cm) de gel de Sephadex G-25. La quantité de précipité chromatographié est de l'ordre de 400 mg et le déplacement des composés est effectué avec de l'eau distillée. Le repérage des constituants présents dans l'effluent est réalisé en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (796) et les protéides par le procédé à la ninhydrine de MOORE et STEIN. On obtient, de cette manière, une fraction enrichie en glycopeptides. Il s'agit de la "Fraction glycopeptidique Sephadex" (FGS).

c - Purification par chromatographie sur papier :

Les dernières traces de peptides sont éliminées par chromatographie sur papier MN 807 dans le système-solvant n-butanol/acide formique/eau (75:15:10).

d- Fractionnement par électrophorèse préparative sur papier

Certaines fractions sont soumises à l'électrophorèse préparative sur papier MN 807, exempt d'acides aminés, dans les conditions expérimentales suivantes :

- pH 3,9 (tampon de MICHL) (797) : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387).

ou pH 2,4 : acide acétique 1 N

- 12 V/cm, pendant 18 h, dans des cuves d'électro-rhéophorèse "en toit".

II - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DES GLYCOPEPTIDES

A - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

La composition centésimale des glycopeptides en glucides a été déterminée par l'application des procédés classiques de dosage colorimétrique des glucides (voir p.136) :

- Les hexoses "neutres" par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (798), modifiée par RIMINGTON (799) ;

- La glucosamine, par la méthode d'ELSON et MORGAN (800), modifiée par BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (801), après une hydrolyse de 4 h, par HCl 4 N redistillé, en tube scellé sous vide, et par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon.

B - COMPOSITION MOLAIRE

Les rapports molaires des constituants des glycopeptides ont été déterminés en dosant les oses et les acides aminés qui les constituent. Les résultats ont ensuite été exprimés sur la base du nombre de résidus de glucosamine présents dans les glycoprotéines natives (8 dans la transferrine ; 10 dans la lactotransferrine). La glucosamine étant, en effet, présente dans les hydrolysats de glycopeptides, sert de "témoin interne" sur les diagrammes de l'Auto-analyseur Technicon.

1 - Identification et dosage des oses

• - La composition molaire des glycopeptides en oses "neutres" a été déterminée par chromatographie quantitative sur papier en appliquant les modes opératoires décrits à la page 147 (hydrolyse par HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h ; purification des hydrolysats sur échangeurs d'ions ; chromatographie quantitative des oses "neutres" sur papier selon le procédé de DATE (802) modifié).

β - La glucosamine a été dosée, en même temps que les acides aminés, à l'Auto-analyseur Technicon, suivant le mode opératoire décrit ci-dessous et sur la base de la composition centésimale.

2 - Identification et dosage des acides aminés

Les acides aminés (et la glucosamine) ont été dosés par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon (colonne de 0,6 x 150 cm ou 0,6 x 65 cm) selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (803), en utilisant les systèmes-tampons de MONSIGNY (804) qui ont été adaptés à l'analyse des glycopeptides et qui améliorent considérablement la séparation et le dosage des constituants de ces derniers.

III - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES

A - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Les acides aminés C-terminaux des glycopeptides, comme dans le cas des glycoprotéines natives ont été identifiés par voie enzymatique et par voie chimique. Les protocoles expérimentaux sont identiques à ceux que nous avons décrits plus haut (voir p.176), à la différence près que les quantités de glycopeptides sont réduites à 20 mg.



B - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Les acides aminés en position N-terminale dans les glycopeptides ont été identifiés par les procédés suivants :

- 1° - Action de la leucine-aminopeptidase
- 2 - Dinitrophénylation
- 3 - Dégradation d'EDMAN

1 - Action de la leucine-aminopeptidase

L'hydrolyse des glycoprotides par la leucine aminopeptidase (SIGMA) a été effectuée suivant le mode opératoire de TAKAHASHI (805). Les acides aminés éventuellement libérés ont été recherchés soit par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon, soit par les procédés classiques d'analyse chromatographique et électrophorétique sur papier préconisés par BISERTE, DAUTREVAUX et BOULANGER (806). En outre, la composition du glycopeptide résiduel a été déterminée par l'application des procédés que nous avons décrits plus haut.

Protocole expérimental de l'hydrolyse

50 mg de glycopeptide sont dissous dans 5 ml d'un tampon tris 0,05 M de pH 8,5, contenant 0,005 M de chlorure de magnésium. 5 mg de leucine-aminopeptidase sont ajoutés à la solution qui est maintenue à 37° pendant 48 heures, en présence d'une goutte de toluène. L'hydrolyse enzymatique est poursuivie par addition de nouvelles quantités d'enzyme jusqu'à libération totale des acides aminés N-terminaux.

Les acides aminés libres sont séparés du glycopeptide résiduel par électrophorèse préparative sur papier Macherey Nagel MN 807 dans le tampon d'ATFIELD de pH 1,5 : acide formique/acide acétique/eau (5:15:80) sous une tension de 10 V/cm pendant 4 h. Les acides aminés du glycopeptide résiduel sont identifiés et dosés à l'Auto-analyseur TECHNICON.

2 - Dinitrophénylation

a - Principe. La recherche et le dosage des acides aminés N-terminaux dans les glycopeptides ont été effectués en appliquant, dans ses grandes lignes, le procédé de BISERTE, HOLLEMAN et coll. (867) que nous avons décrit à propos des protéides. Toutefois, ce procédé a été adapté à l'analyse des DNP-glycopeptides. Les modifications portent essentiellement 1°) sur la méthode d'isolement des DNP-glycopeptides qui sont insolubles dans les solvants organiques et 2°) sur la nécessité de doser les acides aminés non dinitrophénylés présents dans les hydrolysats chlorhydriques des DNP-glycopeptides.

b - Mode opératoire

α - Dinitrophénylation des glycoprotides

Le glycoprotide (20 mg) est dissous dans 5 ml d'eau contenant 500 mg de bicarbonate de sodium. A cette solution, on ajoute 10 ml d'une solution éthanolique à 5 p. 100 (v:v) de fluoro-2,4-dinitrobenzène et le mélange est agité pendant 4h, à l'obscurité et à la température du laboratoire. On ajoute alors, à nouveau 500 mg de bicarbonate de sodium et 10 ml de solution éthanolique de fluorodinitrobenzène et la réaction est prolongée encore pendant 24 h.

β - Isolement des DNP-glycoprotides

Les sels minéraux sont éliminés par l'addition d'éther sulfurique jusqu'à l'apparition d'un louche. Après un repos d'une heure, le précipité est redissous dans la quantité minimale d'eau distillée. La solution obtenue est additionnée d'un volume d'éthanol absolu et les sels minéraux sont de nouveau précipités par l'éther sulfurique. Les deux solutions surnageantes sont réunies et évaporées à siccité sous vide, à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par l'eau distillée et la solution obtenue est débarrassée du fluoro-dinitrobenzène en excès, ainsi que du dinitrophénol et de la dinitraniline formés au cours de la réaction, par deux extractions étherées effectuées, la première, en milieu neutre et, la seconde, en milieu acide (ajustement de la solution à pH 1 par addition d'acide chlorhydrique). La fraction aqueuse est enfin évaporée à siccité sous pression réduite, à l'évaporateur rotatif.

γ - Hydrolyse des DNP-glycoprotides et identification des DNP-amino-acides

L'hydrolyse des DNP-glycoprotides effectuée en présence d'un témoin interne nor-leucine et l'identification des DNP-amino-acides sont réalisées suivant le mode opératoire décrit à la page 177.

d - Analyse des acides aminés non dinitrophénylés dans les hydrolysats chlorhydriques

Les amino-acides libres, présents dans la phase aqueuse des hydrolysats après l'extraction des DNP-amino-acides par l'éther, sont dosés à l'Auto-analyseur Technicon par rapport au "témoin interne" de nor-leucine ajouté aux DNP-glycoprotides, avant l'hydrolyse chlorhydrique.

Les hydrolysats chlorhydriques (16 h à 105°C), débarrassés des DNP-amino-acides éthero-solubles, sont concentrés à siccité à l'évaporateur rotatif sous pression réduite, à 35 - 40°C. Le résidu est repris par de l'eau distillée, et une partie aliquote correspondant à 1 ou 2 mg de glycoprotide de départ, est soumise à l'analyse des acides aminés.

3 - Dégradation d'EDMAN

a - Principe. La réaction d'EDMAN est très précieuse dans l'exploration des modalités de la liaison glycanne-protide dans les glycopeptides. En effet, elle réalise la dégradation récurrente de la fraction peptidique par l'extrémité N-terminale et vient "buter" sur l'acide-amino conjugué au glycanne en respectant la liaison "glycosyl" et en détachant l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique. Il s'ensuit la formation d'un PTH-dérivé d'un glyco-amino-acide conformément aux réactions de la figure 34 (p. 203).

b - Mode opératoire

α - CAS OU L'ACIDE AMINE CONJUGUE AU GLYCANNE EST EN POSITION N-TERMINALE

Dans ce cas, une seule application de la réaction d'EDMAN fournit (voir la figure 34 ; p. 203) le PTH-amino-acide-glycanne et détache le peptide ou l'acide-amino en position C-terminale

1° - Préparation des dérivés phényl-thiohydantoïniques

Les glycoprotéides (100 à 200 mg dans 20 ml de tampon de pH 8,5) (+) sont condensés avec l'isothiocyanate de phényle (1,5 ml) dans les conditions décrites par KONIGSBERG et HILL (808) : 37°C, pendant 2,5 h. La solution est évaporée à siccité sous vide à l'évaporateur rotatif.

Les phényl-thiocarbamyl-dérivés sont ensuite cyclisés en milieu acide suivant le procédé de LIGHT et GREENBERG (809) : addition de 20 ml d'un mélange d'acide acétique et d'acide chlorhydrique concentré (5:1) (v:v) qu'on laisse agir à 37°C pendant 2 h.

Les phényl-thiohydantoïnes formées (PTH-dérivés) sont extraites trois fois par 10 ml de benzène, puis 2 fois par 10 ml d'un mélange de benzène et de butanone (2:3) (v:v) selon le protocole décrit par CHERBULIEZ, BAEHLER et RABINOWITZ (810). Les deux solutions d'extraction et la solution

(+) Composition du tampon :

N-éthylmorpholine redistillée	60	ml
Acide acétique glacial	1,5	ml
Ethanol à 95°	500	ml
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

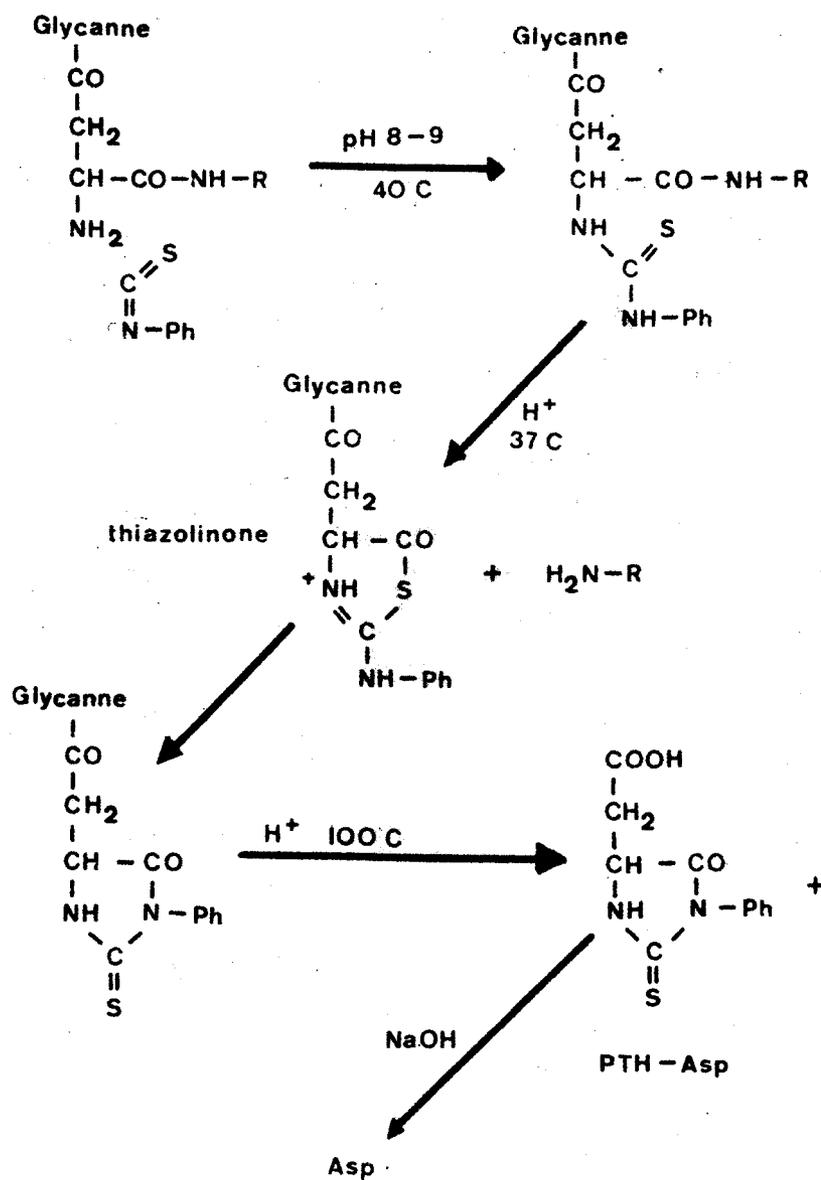


Figure 34

Dégradation récurrente d'EDMAN d'un glycopeptide et formation des glyco-PTH-amino-acides.



aqueuse sont évaporées à siccité sous pression réduite et sont ensuite analysées séparément.

2° - Analyse de la phase organique

Les PTH-dérivés, présents dans la phase organique, sont analysés par électrophorèse sur papier à pH 3,9 (tampon acétate de pyridine de MICHL) (811) et par chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans les systèmes-solvants de BRENNER, NIEDERWIESER et PATAKI (812) et de PATAKI (813) :

- Chloroforme/acide formique concentré (100:5) (v:v) ;
- Chloroforme/méthanol (100:5) (v:v)

La révélation des PTH-dérivés est effectuée, soit en chauffant à 120°C, pendant 2 h, les chromatoplaques préalablement imprégnées par pulvérisation d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p. 100 (v:v) (formation de taches jaunes) ; soit en utilisant le réactif à l'iode-azoture de sodium de CHERBULIEZ, BAEHLER et RABINOWITZ (814) (formation de taches blanches sur un fond brun) (+). En outre, la fraction des PTH-dérivés totaux a été traitée par de la soude 0,1 N (1 ml p. 10 mg de glycoprotide), à 120°C pendant 10 h (VAN ORDEN et CARPENTER) (815) de manière à dissocier les PTH-amino-acides libérés et à régénérer les amino-acides. On identifie ensuite ces derniers à l'Auto-analyseur Technicon, après avoir ajusté la solution sodique à pH 2, par l'addition d'acide chlorhydrique 2 N.

3° - Analyse de la phase aqueuse

La phase aqueuse contient les glycoprotides et les PTH-glyco-amino-acides qui se sont formés, soit à partir de glyco-amino-acides, soit à partir de glycopeptides dans lesquels l'acide-amino-N-terminal était conjugué au glycanne dans le glycopeptide natif. Sa composition a été étudiée de la manière suivante :

(+) Le réactif est obtenu en mélangeant extemporanément dans les rapports volumétriques 1 : 1 : 6, les trois solutions suivantes :

- Solution 1 : iode 1,27 g, IK 8,3 g, eau q.s.p. 100 ml.
- Solution 2 : NaN_3 3,2 g, eau q.s.p. 100ml.
- Solution 3 : Thiodène 1 g, eau q.s.p. 100 ml.

α - Une partie aliquote correspondant à 10 mg de glycoprotéide de départ, est hydrolysé par HCl 5,6 N à 100°C, pendant 24 h et sa composition en acides aminés est déterminée à l'Auto-analyseur Technicon. On identifie et on dose, de cette façon, les acides aminés dont le groupement NH₂ était protégé dans le glycoprotéide natif.

β - Le reste de la solution est soumis à l'analyse par chromatographie sur papier Macherey-Nagel 807, dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Les glycoprotéides et les PTH-glyco-amino-acides restent au trait de départ, tandis que les acides aminés et les peptides, libérés au cours de la dégradation d'EDMAN, sont entraînés par le solvant. Dans un second temps, les différents constituants ainsi repérés sont isolés par chromatographie préparative et leur composition en glucides, en amino-acides et en PTH-amino-acides est précisée en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut.

δ - CAS OU L'ACIDE AMINE CONJUGUE AU GLYCANNE N'EST PAS EN POSITION N-TERMINALE

Dans ce cas, il faut réaliser plusieurs cycles successifs. Le mode opératoire est alors, dans son principe, le suivant :

1er Cycle : a - Condensation du phénylisothiocyanate et du glycoprotéide, et cyclisation en milieu acide : hydrolyse d'une partie aliquote et analyse des acides aminés non modifiés. On obtient la composition totale I.

b - Purification par chromatographie préparative sur papier MACHEREY-NAGEL 807 ou 261, dans le système-solvant de PARTRIDGE (816) : analyse du glycoprotéide, resté au trait de départ (composition trait de départ I) et des acides aminés et peptides éventuellement libérés.

2è Cycle : a - Condensation du phénylisothiocyanate et du glycoprotéide "trait de départ I". Cyclisation en milieu acide. Hydrolyse d'une partie aliquote et analyse des acides aminés non modifiés. On obtient la composition totale II.

b - Purification et analyses identiques à celles du premier cycle : Composition trait de départ II.

Ce protocole est répété jusqu'à l'obtention d'un "glycoprotide trait de départ" ne renfermant plus d'acide aminé non modifié et qui est le PTH-amino-acide-glycane.

Dans le cas où des peptides sont libérés (peptides initialement en position C-terminale par rapport à l'acide aminé lié au glycane), ils sont isolés, analysés et soumis à une dégradation d'EDMAN, dans les mêmes conditions que les glycoprotides eux-mêmes.

IV - ETUDE DE LA NATURE DE LA LIAISON

GLYCANE-PROTIDE DANS LES GLYCOPEPTIDES.

A - CAS D'UNE LIAISON ASPARAGINYL-GLUCOSAMINE

Nous avons mis au point, au laboratoire, un procédé qui permet d'identifier sans ambiguïté le chaînon asparaginyln-acétylglucosamine sous la forme d'asparaginyln-glucosamine. Ce composé est isolé, puis identifié à partir des hydrolysats acides partiels des "aspartylglycannes" obtenus par hydrolyse pronasique des glycoprotéines ou par dégradation des glycopeptides.

1 - Hydrolyse des aspartylglycannes

100 mg de glyco-amino-acide sont hydrolysés par HCl 1,5 N (10 ml), à 100°C, pendant 1,5 h. L'acide chlorhydrique est éliminé par lyophilisation, à -70°C, des hydrolysats étendus de 30 fois leur volume d'eau. La préparation obtenue est soumise à une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 (tampon de MICHL) (817) et la composition en glucides et en acides aminés des différents constituants ainsi isolés est déterminée.

La fraction intéressante qui correspond au point d'attache lui-même (osaminidyl- ou osidyl-osaminidyl-amino-acide ou -peptide) et qui se trouve un peu en arrière de la glucosamine est purifiée par une chromatographie de 72 h, effectuée sur papier Macherey-Nagel 807, dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) de manière à éliminer totalement la glucosamine libre. Sa composition en glucides et en amino-acides est déterminée et ses propriétés sont ensuite étudiées.

2 - Identification de l'asparaginyl-glucosamine

Les composés ainsi préparés sont identifiés à l'asparaginyl -glucosamine sur la base des expérimentations suivantes :

- a - Identification et dosage à l'Auto-analyseur Technicon de la glucosamine et de l'acide aspartique dans les hydrolysats acides (HCl 4 N ; 100°C ; 4 h).
- b - Recherche de l'absence de pouvoir réducteur par la méthode au ferricyanure de PARK et JOHNSON (218).
- c - Comparaison du comportement électrophorétique des composés avec le produit de l'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N ; à 100°C pendant 1,5 h) de l'asparaginyl-N-acétylglucosamine de synthèse (+).

Nota. L'asparaginyl-glucosamine donne, avec les réactifs à la ninhydrine, une coloration gris-bleu caractéristique, semblable à celle que donne l'asparagine.

B - CAS D'UNE LIAISON O-GLYCOSIDIQUE

1 - Principe. On sait, depuis les travaux d'ANDERSON et coll. (819) que les liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidiques sont très labiles en milieu alcalin et que la rupture de la liaison glycosidique s'accompagne de la libération du glycanne et d'une modification structurale du β -hydroxy-amino-acide conjugué, par un mécanisme dit de " β -élimination" : la sérine est transformée en déhydro-alanine (acide 2-amino-2-propénoïque) et la thréonine en acide 2-amino-2-buténoïque (Fig. 35 ; p. 208). Au cours de l'hydrolyse acide de la chaîne peptidique, les "déhydro-amino-acides" sont détruits et on peut donc déterminer le nombre de résidus de β -hydroxy-amino-acides disparus après l'action de la soude. On en déduit le nombre de résidus glycaniques conjugués O-glycosidiquement au peptide ou à la protéine.

(+) Des échantillons de β -N-aspartyl-N-acétylglucosylamine de synthèse nous ont été aimablement fournis par les Professeur A. NEUBERGER, R.D. MARSHALL et I. YAMASHINA auxquels nous adressons nos vifs remerciements.

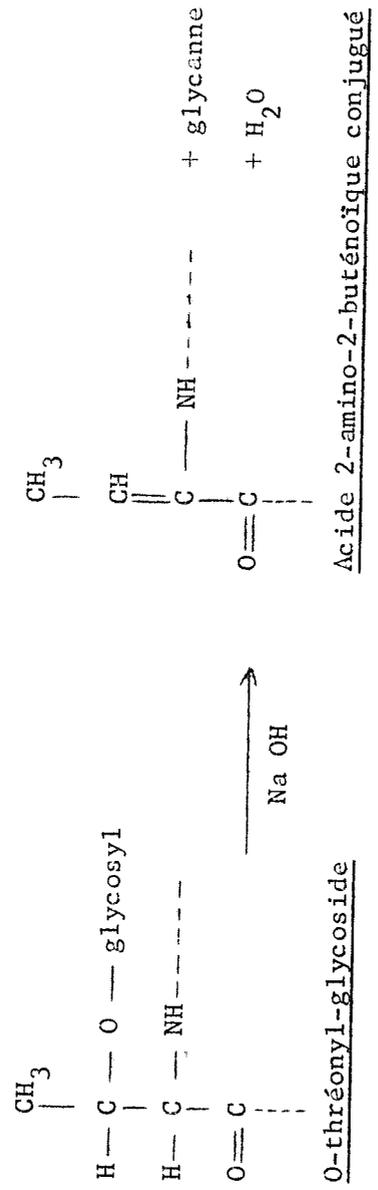
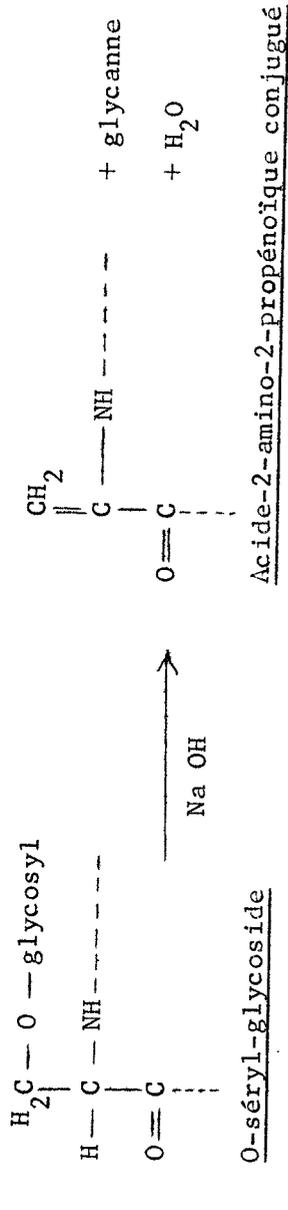


Figure 35



Rupture par "β-élimination" des liaisons O-séryl et O-thréonylglycosidique d'un glycoprotide.

En faisant agir la soude en milieu réducteur, on obtient un double effet :

a - Les déhydro-amino-acides sont réduits : la déhydro-alanine est transformée en alanine qui s'ajoute éventuellement à l'alanine préexistante et l'acide 2-amino-2-buténoïque, en acide α -amino-butyrique qui apparaît sur les chromatogrammes.

b - Le glycanne détaché par la soude voit se réduire la fonction réductrice de l'ose qui était engagée dans la liaison et qui peut être identifié sous la forme d'un polyol.

Toutefois, comme l'ont démontré récemment MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (820), la rupture ne peut s'effectuer que si la fonction carboxylique des β -hydroxy-amino-acides est bloquée, soit dans une liaison peptidique, soit sous la forme d'une fonction amide. Pour éviter toute cause d'erreur, nous faisons systématiquement agir la soude sur les glycopeptides natifs et réamidés.

2° - Action des alcalis

a - Action des alcalis sur les glycopeptides natifs

100 à 200 mg de glycopeptides sont traités par 10 à 20 ml de solutions aqueuses de soude 0,5 N, en présence de borohydrure de sodium (concentration finale 0,3 M), à 20°C, pendant des temps variant de 1 à 9 jours (procédé de TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN (821)).

La solution est acidifiée par de l'acide acétique glacial ajouté jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Elle est ensuite évaporée à siccité sous pression réduite. Le résidu est débarrassé de l'acide borique en le reprenant par un mélange de méthanol et d'acide acétique glacial (4:1) (v:v) et en évaporant la suspension obtenue par ventilation ou par distillation sous pression réduite. Ce mode opératoire est répété 4 fois.

b - Action des alcalis sur les glycopeptides réamidés

Nous avons vu que la rupture, par " β -élimination", des liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidique sous l'action des alcalis ne pouvait s'effectuer si le β -hydroxy-amino-acide conjugué au glycanne possédait son groupement carboxylique libre et qu'il était nécessaire de bloquer ce dernier pour

que la réaction ait lieu. Pour éliminer cette cause d'erreur nous faisons systématiquement agir la soude sur les glycopeptides natifs et réamidés.

La réamidation est effectuée de la manière suivante : 10 à 100 mg de glycopeptide sont d'abord estérifiés, pendant 4 h, à 20°C, par 2 à 20 ml d'une solution de chlorure de thionyle dans le méthanol anhydre (solution à 3 p. 100) (v:v) (SOKOLOVSKY et al.) (822). Le mélange est évaporé à siccité sous pression réduite, à l'abri de toute trace de vapeur d'eau, et le résidu sec est traité, à 20°C, pendant 24 h, par 0,2 à 2 ml de butylamine. La solution est évaporée à siccité et la préparation obtenue est soumise à l'action de la soude dans les conditions que nous avons décrites ci-dessus.

3° - Identification et dosage des β -hydroxy-amino-acides détruits

Le dosage des acides aminés est effectué à l'Auto-analyseur Technicon sur les glycopeptides natifs, d'une part, et sur les fractions "in toto" provenant de l'action de la soude.

4° - Fractionnement des produits de la " β -élimination".

Dans le cas d'un mélange de glycopeptides constitués de composés à liaison asparaginy-glucosamine stable en milieu alcalin et de composés à liaisons O-glycosidiques, il existe dans les milieux réactionnels, après l'action de la soude, trois types de substances : les glycopeptides stables, **les peptides** et les glycannes réduits scindés par l'action de l'alcali. Ces différents constituants sont séparés de la manière suivante :

Les solutions sont fractionnées sur des colonnes (2 x 40 cm) de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide) : le passage de l'eau distillée fournit une "fraction neutre" qui contient les glycannes réduits, libérés par la " β -élimination" et les glycoprotides respectés par la soude. Le passage d'une solution ammoniacale (dilution au 1/20 de la solution commerciale à 21 p. 100 d'ammoniac) déplace les protides détachés au cours de la " β -élimination".

Chacune des deux fractions est évaporée à siccité et leur composition en oses et en acides aminés est déterminée en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut.

2 - APPLICATIONS A LA TRANSFERRINE

I - RESULTATS

L'application à la transferrine humaine des procédés que nous avons décrit nous a permis de préciser les modalités de la liaison glycanne-protide dans cette glycoprotéine et de démontrer sans ambiguïté, pour la première fois, que la transferrine possède 2 groupements glycaniques unis à la protéine par une liaison de type asparaginy-glucosamine. Nous sommes parvenue à cette conclusion sur la base des résultats expérimentaux suivants :

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

L'hydrolysats pronasique de la transferrine est préalablement purifié sur des colonnes d'échangeurs d'ions (voir p.197) puis par chromatographie sur papier exempt d'acides aminés (papier Macherey-Nagel 807), dans le système-solvant n-butanol/acide formique/eau (75:15:10). La fraction qui reste au trait de départ est éluée et soumise à une électrophorèse préparative sur papier dans les conditions décrites à la p.197.

On obtient de cette manière, deux glycopeptides. L'un (glycopeptide I) possède un comportement de composé "neutre" et l'autre (glycopeptide II), un comportement de composé "basique" (Fig. 36 ; p.212).

B - COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES I et II

Les glycopeptides I et II renferment de 28,6 à 30,4 p. 100 d'hexoses et de 23,8 à 30 p. 100 de N-acétylglucosamine. L'analyse, effectuée à l'Auto-analyseur Technicon des hydrolysats par l'acide chlorhydrique 5,6 N permet de déterminer la composition molaire en acides aminés, rapportée aux 8 moles de glucosamine présentes dans la molécule native de transferrine. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXV ; p. 213 et illustrés par la figure 37 (p. 214).

La composition en oses des glycopeptides I et II a été précisée plus haut (p.167).

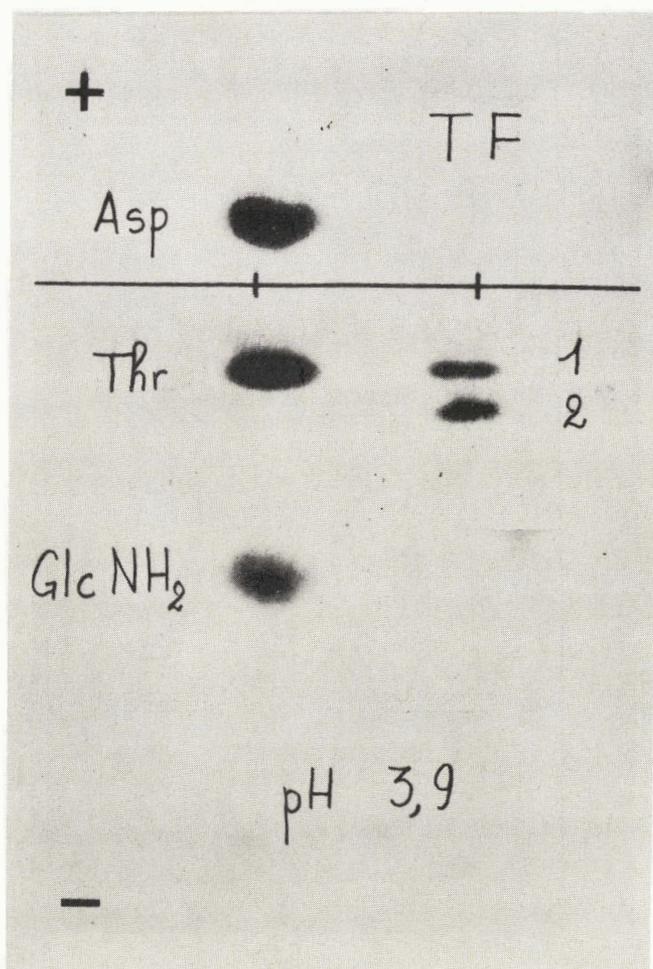


Figure 36

Electrophorèse effectuée en cuve "en toit", sur papier d'Arches 304, en tampon pyridine/acide acétique de pH 3,9, des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de la transferrine. Tension : 10 V/cm pendant 4 h. Révélation par la ninhydrine. Asp : acide aspartique ; Thr : thréonine ; GlcNH₂ : glucosamine ; TF : hydrolysate pronasique de transferrine. 1,2 : glycopeptides 1 et 2.

Tableau XXXV

Composition molaire en glucosamine et en acides aminés des Glycopeptides I et II provenant de l'hydrolyse pronasique de la transferrine.

	Glycopeptide I	Glycopeptide II
Glucosamine	8	8
Acide aspartique	1,64 à 2,24	2,04
Sérine	1,50 à 2	0
Lysine	0	1,88



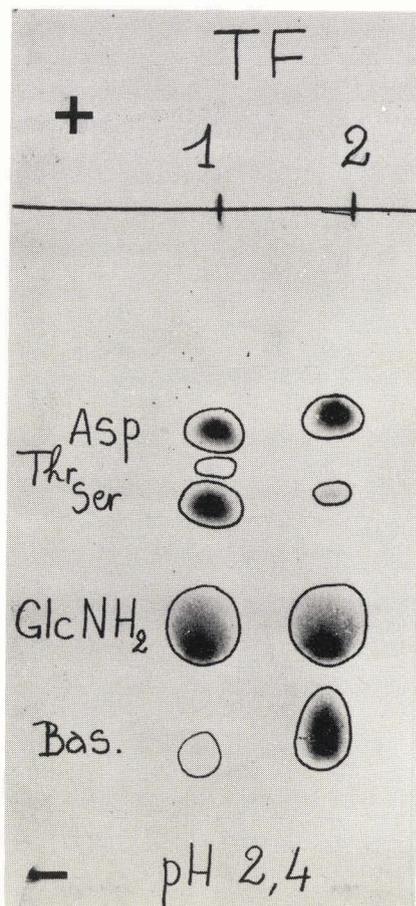


Figure 37



Electrophorèse effectuée en cuve "en toit", sur papier d'Arches 304, à pH 2,4 (acide acétique 1 N) des hydrolysats chlorhydriques (HCl 5,6 N ; 100°C ; 24 h) des glycopeptides 1 et 2 de la transferrine. Tension : 10 V/cm pendant 4 h. Révélation par la ninhydrine. Asp : ~~acide~~ aspartique ; Ser : sérine ; GlcNH₂ : glucosamine ; Bas : basique.

C - STRUCTURE DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

L'application aux glycopeptides I et II des procédés d'étude des séquences peptidiques a apporté les résultats suivants :

1 - L'application de la méthode de dinitrophénylation de BISERTE, HOLLEMAN et coll. (823) conduit à des DNP-glycopeptides dont l'hydrolyse chlorhydrique totale fournit, en proportions équimolaires :

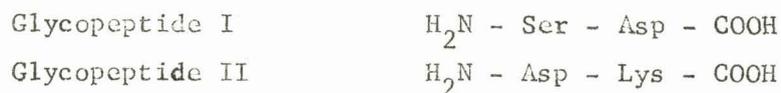
- la DNP-sérine et l'acide aspartique dans le cas du DNP-glycopeptide I

- le DNP-aspartique et l' ϵ -DNP-lysine dans le cas du DNP-glycopeptide II.

2 - La leucine-amino-peptidase détache la sérine du glycopeptide I et conduit à un glyco-amino-acide qui contient seulement de l'acide aspartique (aspartyl-glycane) (Tableau XXXVI ; p. 216). Elle est sans action sur le glycopeptide II (Tableau XXXVII ; p. 217).

3 - La méthode de dégradation récurrente d'EDMAN, appliquée au glycopeptide I, fournit la PTH-sérine et un aspartyl-glycane. Appliquée au glycopeptide II, elle libère l' ϵ -phénylthiocarbamyl-lysine et donne le PTH-dérivé d'un glyco-amino-acide dont l'hydrolyse chlorhydrique fournit l'acide PTH-aspartique (Tableau XXXVI ; p. 216 et XXXVII ; p. 217).

4 - On peut donc conclure de ces résultats que les séquences peptidiques sont les suivantes :



D - MODALITES DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE

1 - L'hydrolyse chlorhydrique partielle des glyco-amino-acides ne renfermant plus que de l'acide aspartique (aspartyl-glycannes obtenus par dégradation récurrente chimique ou enzymatique des séryl-aspartyl-glycannes ou isolés de certains hydrolysats pronasiques qui conduisent parfois directement aux glyco-amino-acides) conduit à un composé qui a été isolé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9, et dont les caractéristiques sont les suivantes :

Tableau XXXVI

Action de la leucine aminopeptidase et de l'isothiocyanate de phényle (dégradation d'EDMAN) sur le Glycopeptide I de la transferrine (+)

Acides aminés	Glycopeptide I natif	Glycopeptide I après action de la leucine aminopeptidase	Glycopeptide I après dégradation d'EDMAN
Acide aspartique	1,8	1,6	1,6
Sérine	1,6	0,27	-
Glycocolle	0,16	-	-
Thréonine	0,11	-	-
Acide glutamique	0,08	-	-
Glucosamine	8	8	8

(+) La composition en acides aminés et en glucosamine est exprimée en moles p. mole de transferrine



Tableau XXXVII

Action de la leucine aminopeptidase et de l'isothiocyanate de phényle sur le
Glycopeptide II de la transferrine. (+)

Acides aminés	Glycopeptide II natif	Glycopeptide II après action de la leucine aminopeptidase	Glycopeptide II après dégradation d'EDMAN
Acide aspartique	1,63	1,60	0,48
Lysine	1,52	1,52	-
Sérine	0,19	0,16	-
Thréonine	0,09	0,08	-
Glucosamine	8	8	8

BUS
LILLE

(+) La composition en acides aminés et en glucosamine est exprimée en moles p. mole
de transferrine

a - Il est constitué uniquement de glucosamine et d'acide aspartique, en proportions équimolaires.

b - Il n'est pas réducteur.

c - Il possède le comportement électrophorétique de l'asparaginyl-glucosamine (Fig. 38 ; p. 219). Il donne, en outre, avec le réactif à la ninhydrine, la même coloration caractéristique que l'asparaginyl-glucosamine de référence.

2 - La soude 0,5 N, à 20°C, pendant 2 jours est sous action sur les glycopeptides I^r et II natifs et réamidés (Tableau XXXVIII, p. 220). Il n'existe donc pas de liaison O-glycosidique (ni ester) dans la transferrine humaine.

II - CONCLUSIONS

1 - L'électrophorèse préparative sur papier des hydrolysats pronasiques de la transferrine humaine, préalablement purifiés sur échangeurs d'ions, permet d'obtenir deux glycopeptides de compositions en acides aminés différentes : acide aspartique et sérine (1 : 1), dans le cas du Glycopeptide I ; acide aspartique et lysine (1 : 1), dans le cas du Glycopeptide II. Ils sont identiques respectivement, au "glycopeptide DEAE-GP II" et au "glycopeptide DEAE-GP III" obtenus par JAMIESON (824,825) par chromatographie sur DEAE-cellulose (forme chlorure) des hydrolysats pronasiques de la transferrine préalablement purifiés sur Sephadex G-25.

2 - L'application des procédés classiques de détermination des séquences peptidiques nous a permis de démontrer que la fraction glycanique était attachée dans le Glycopeptide I, à un reste séryl-aspartique et, dans le Glycopeptide II, à un reste aspartyl-lysine.

3 - Nous avons démontré, sans ambiguïté, que, dans les Glycopeptides I et II, le glycanne était attaché par la glucosamine à l'acide aspartique grâce à une liaison de type asparaginyl-glucosamine. En effet, l'hydrolyse acide partielle fournit uniquement de l'asparaginyl-glucosamine.

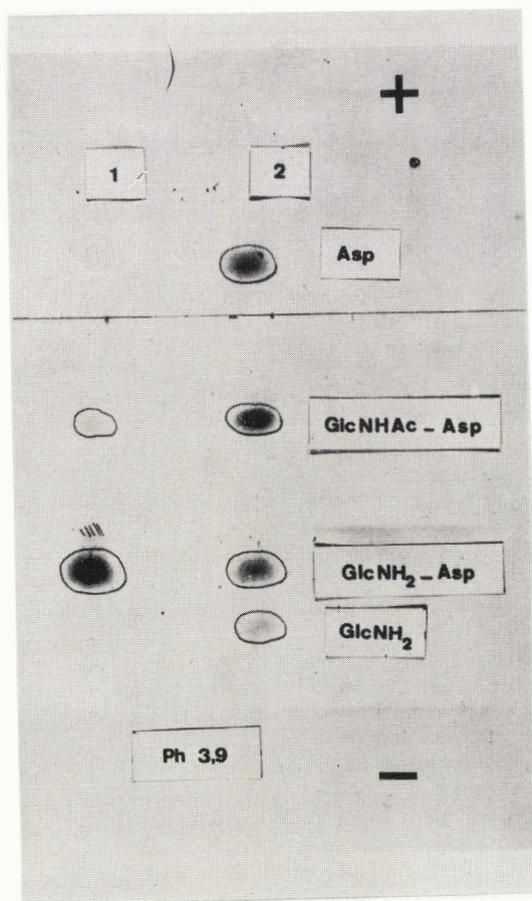


Figure 38

Electrophorèse effectuée en cuve "en toit", sur papier d'Arches 304 à pH 3,9 :

- en 1, du composé formé au cours de l'hydrolyse chlorhydrique ménagée (HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h) d'un "aspartyl-glycane" de la transferrine et isolé par une électrophorèse préparative préalable ;

- en 2, de la N-(β-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine de synthèse, hydrolysée dans les mêmes conditions. Asp : acide aspartique ; GlcNHAc - Asp : N-(β-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine ; GlcNH₂ - Asp : N-(β-aspartyl)-glucosaminylamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

Tableau XXXVIII

Action de la soude sur un mélange de glycopeptides (natifs et réamidés)
de la transferrine (a)

Acides aminés	Glycopeptide natif	Glycopeptide après action de la soude	Glycopeptide réamidé	Glycopeptide réamidé, après action de la soude
Acide aspartique	1,92	1,94	2,28	2,4
Sérine	1,09	1,04	1,28	1,24
Glycocolle	0,44	0,60	0,40	0,76
Acide glutamique	0,34	0,47	0,48	0,40
Glucosamine	8	8	8	8



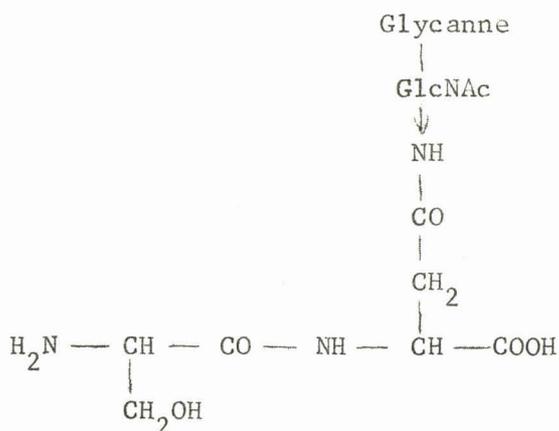
(+) La composition est exprimée en moles d'acides aminés et de glucosamine p. mole de transferrine.
transferrine.

Ce résultat, acquis en 1965 (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL) (826, 827) apporte une preuve expérimentale directe à l'existence de ce chaînon dans la transferrine qui avait été posée en hypothèse par JAMIESON, en 1964 (828). Récemment, cet auteur a obtenu, par dégradation récurrente de SMITH (829) par l'acide periodique un constituant composé uniquement de glucosamine et d'acide aspartique.

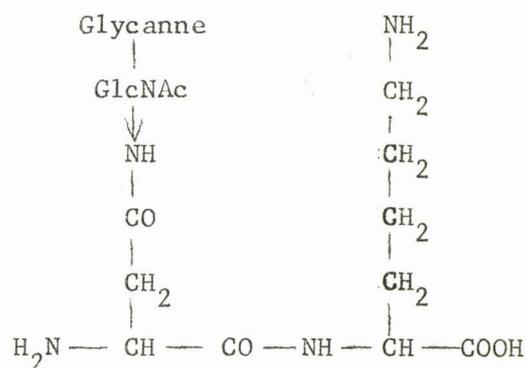
D'autre part, la stabilité, vis-à-vis de la soude, des glycopeptides préalablement réamidés démontre qu'il n'existe pas, dans la transferrine humaine de liaisons O-glycosidiques dont la présence n'avait pas été exclue par JAMIESON (830).

4 - La détermination de la composition molaire des Glycopeptides I et II montre qu'il existe toujours 2 résidus d'acide aspartique, en position N-terminale ou C-terminale, pour les 8 moles de glucosamine que contient la transferrine. (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL, 1965 (831). Nous parvenons ainsi à un résultat identique à celui qui avait été acquis simultanément par JAMIESON (832) sur la base de résultats d'ordre physique (détermination de la masse moléculaire (3100) des glycopeptides).

5 - L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous permet de proposer, pour les glycopeptides I et II de la transferrine humaine, les schémas de structure suivants :



Glycopeptide I



Glycopeptide II

3 - APPLICATIONS A LA LACTOTRANSFERRINE

Appliqués à la lactotransferrine, les procédés que nous avons décrits nous ont conduit aux résultats et aux conclusions suivantes :

I - RESULTATS

A - ISOLEMENT ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

1 - La purification sur échangeurs d'ions des hydrolysats pronasiques de la lactotransferrine fournit une "fraction glycopeptidique I" dont la composition centésimale en glucides est la suivante :

Oses "neutres"	36 à 40 p. 100
N-acétylglucosamine	37 à 39 p. 100

2 - Sa composition en acides aminés est précisée pour plusieurs échantillons dans le tableau XXIX (p. 223). On voit que les résultats varient d'une hydrolyse à une autre, mais que la fraction peptidique est toujours plus complexe que celle des glycopeptides de la transferrine, vraisemblablement à cause de la présence d'une quantité importante de proline et de glycolle dont les liaisons sont difficilement coupées par la pronase (NOMOTO, NARAHASHI et MURAKAMI (832a). Ce résultat implique que les séquences peptidiques au voisinage du point d'attache des glycanes sur la protéine sont différentes dans la transferrine et dans la lactotransferrine.

Un résultat analogue avait été obtenu antérieurement par GOT (833) qui avait isolé des glycopeptides très pauvres en thréonine. La composition donnée par l'auteur était la suivante :

Acide aspartique	1
Acide glutamique	2
Proline	1
Leucine	1

+ un peu de thréonine

Plus récemment, le même auteur (834) a confirmé nos propres résultats.

Tableau XXXIX

Composition en acides aminés et en glucosamine (+) de "fractions glycopeptidiques I" obtenus par hydrolyse pronasique de différents échantillons de lactotransferrine.

Acides aminés	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon
	1	2	3	4
Acide aspartique	2,04	3,72	3,36	2,20
Thréonine	2,48	1,94	1	2,68
Acide glutamique	1,72	3,12	2,52	1,02
Proline	1,52	1,84	1,84	1,60
Glycocolle	1,16	1,36	0,96	1,96
Sérine	0,52	0,89	0,57	1,41
Alanine	0,18	0,37	0,21	1,24
Glucosamine	10	10	10	10

(+) Par mole de lactotransferrine



B - MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON
O-THREONYL-GLYCOSIDIQUE

Nous avons mis en évidence, dans la lactotransferrine, la présence d'un groupement glycanique conjugué à la protéine par une liaison O-thréonyl-glycosidique sur la base des résultats expérimentaux suivants :

1 - Action de la soude sur la composition des glycopeptides

Le dosage des acides aminés présents dans les glycopeptides de la "fraction glycopeptide I" native et réamidée, avant et après action de la soude montre qu'un résidu de thréonine disparaît (Tableau XL ; p. 225, XLI; p. 226), tandis qu'apparaît une faible quantité d'acide α -aminobutyrique provenant de l'action réductrice modérée du borohydrure de sodium sur l'acide 2-amino-2-buténoïque produit au cours de la réaction de " β -élimination".

Nota. Le même résultat est obtenu quelle que soit la durée de l'action de la soude (Tableau XLI; p. 225).

2 - Fractionnement et étude des produits de l'action de la soude

a - Le passage de la solution sodique sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 20-50 ; forme acide) fournit deux fractions : l'une (Solution 1) est constituée par le liquide effluent auquel on joint les eaux de lavage des colonnes de résines ; l'autre (Solution 2) est obtenue par le passage sur ces dernières d'une solution d'ammoniac 0,5 N (voir p.210). La "Solution 1" se résoud, en électrophorèse sur papier en 3 constituants : glycane "libre", glycopeptide A, glycopeptide B. Nous avons précisé dans le tableau XLII(p. 227) les rendements de ces différentes fractions.

b - La Solution 1, donne par électrophorèse sur papier à pH 2,4 deux constituants majeurs qui se révèlent par les réactifs à l'acide periodique-benzidine spécifiques des osides libres et conjugués (Fig. 39 ; 228).

Tableau XL

Action de la soude (soude 0,5 N à 24°C, pendant 2 j.) sur la "fraction glycopeptidique I" de la lactotransferrine, native et réamidée (+).

Acides aminés	Glycopeptide natif	Action de la soude sur le glycopeptide natif	Glycopeptide réamidé	Action de la soude sur le glycopeptide réamidé
Acide aspartique	1,96	2,00	1,95	1,92
Thréonine	2,39	1,14	2,40	1,27
Sérine	1,26	0,95	1,29	0,84
Acide glutamique	0,91	0,90	1,05	1,05
Glycocolle	1,75	1,83	1,93	-
Alanine	1,10	1,05	1,22	1,08
Glucosamine	10	10	10	10

(+) La composition en acides aminés et en glucosamine est donnée p. mole de lactotransferrine

BUS
DATE

Tableau XLI

Cinétique de l'action de la soude (soude 0,5 N, à 24°C) sur la "fraction glycopeptidique I" de la lactotransferrine (+).

Acides aminés	Glycopeptide natif	Durée de l'action de la soude		
		1 j	2 j	4 j
Acide aspartique	1,96	1,80	2,00	2,70
Thréonine	2,39	1,30	1,14	1,31
Sérine	1,26	1,02	0,95	0,95
Acide glutamique	0,91	0,90	0,90	1,17
Proline	1,25	1,32	1,13	1,18
Glycocolle	1,75	1,73	1,83	2,17
Alanine	1,10	1,17	1,05	1,00
Glucosamine	10	10	10	10



(+) La composition en acides aminés et en glucosamine est donnée en moles p. mole de lactotransferrine.

Tableau XLII

Poids des différentes fractions obtenues à partir de 250 mg de "fraction glycopeptidique I" traitée par la soude.

	Chromatographie sur Dowex 50 x 8		Electrophorèse préparative à pH 2,4 de la Solution I	
	Solution 1 "neutre"	Solution 2 "basique"	Glycanne "libre"	Glycopeptide A Glycopeptide B
	188 mg	44 mg	52 mg	74 mg 17 mg
Proportions relatives	81 p. 100	19 p. 100	36 p. 100	52 p. 100 12 p. 100



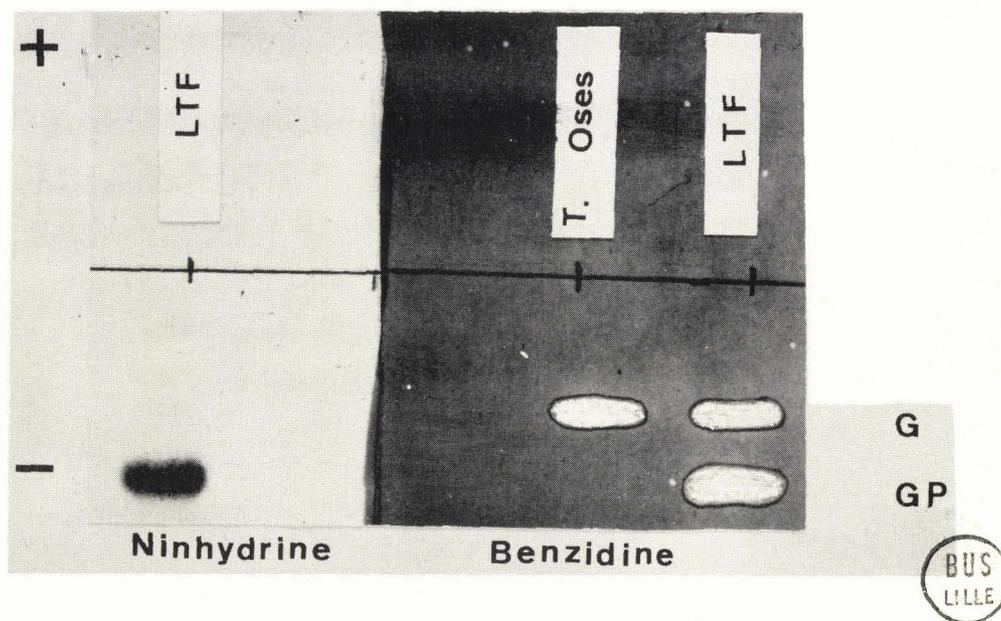


Figure 39

Action de la soude (NaOH 0,5 N ; 20°C ; 48 h) sur les glycopeptides de la lactotransferrine. Electrophorèse, effectuée en cuve "en toit", sur papier d'Arches 304, à pH 2,4, de la solution 1 (voir texte), fraction non retenue par l'échangeur de cations (Dowex 50 ; forme acide). 1 : Révélation par la ninhydrine ; 2 : révélation des glucides libres et conjugués par le réactif à l'acide périodique-benzidine. G : fraction glucidique ; GP : fraction glycopeptidique ; T : solution-témoin de glucides (mélange d'oses) ; LTF : produit de l'action de la soude sur le glycopeptide de la lactotransferrine.

α - Le Glycane "libre" (fraction G de la figure 39) possède un caractère "neutre". Il ne réagit pas à la ninhydrine. Il ne renferme pas d'acides aminés, et il est constitué uniquement de glucides. La composition en oses de ce Glycane "libre" est précisée dans le tableau XXX à la page 167. Il s'agit du glycane réduit qui a été détaché par la soude. En outre, la chromatographie en phase gazeuse des produits d'hydrolyse acide du glycane "libre", préalablement triméthylsilylés, permet d'identifier à côté des oses précédents de faible quantité de mannitol. Le mannose serait donc conjugué à la thréonine par une liaison O-glycosidique.

β - Le Glycopeptide A (fraction GP de la figure 39, p. 228) possède, en électrophorèse un comportement cationique. Il donne une réaction positive avec les réactifs à la ninhydrine et à l'acide periodique-benzidine. Il s'agit d'un glycopeptide essentiellement composé d'acide aspartique associé à un glycane dont la composition en oses a été précisée dans un chapitre antérieur (voir p. 167).

γ - Le Glycopeptide B qui n'apparaît pas sur la figure 39 (p. 228) car il existe en très faible quantité et sa vitesse de migration cathodique est, pour une cause inconnue, très élevée. Il possède des caractères voisins de ceux du glycopeptide A et sa composition en oses a été précisée à la page 167.

c - La Solution 2 ne renferme pas de glucides. Elle contient le peptide qui a été détaché du glycane par " β -élimination" sous l'action de la soude, et qui renferme la presque totalité des acides aminés de la "fraction glycopeptidique I", en particulier, la totalité de la proline.

C - MISE EN EVIDENCE DE LIAISONS ASPARAGINYL-GLUCOSAMINE

1 - L'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N ; à 100°C, pendant 1,5 h) des glycopeptides A et B fournit, par électrophorèse préparative sur papier, un composé qui possède les mêmes caractéristiques que la substance isolée, dans les mêmes conditions à partir des glycopeptides de la transferrine :

- Il n'est pas réducteur
- Il est composé de glucosamine et d'acide aspartique dans les proportions 1 : 1

- Il possède le comportement électrophorétique et les caractères de révélation de l'asparaginy-glucosamine de référence (fig. 40 ; p. 231).

2 - La dégradation récurrente d'EDMAN appliquée à la "fraction glycopeptide I" conduit, après plusieurs cycles, (voir p. 205), à un PTH-dérivé de glyco-amino-acide qui donne, par hydrolyse acide totale, uniquement le PTH-dérivé de l'acide aspartique, à l'exclusion de tout amino-acide. Ce résultat implique que la fonction α -amino de l'acide aspartique était libre et que la conjugaison se fait bien par le carboxyle β .

II - CONCLUSIONS

1 - Le fractionnement des hydrolysats de lactotransferrine humaine conduit à l'isolement de mélange de glycopeptides dont la fraction protidique, contrairement au cas de la transferrine -, reste importante, probablement à cause de la présence de plusieurs résidus de proline et de glycolle au voisinage des points d'attache.

2 - Dans la lactotransferrine, un résidu glycanique est attaché à la protéine par une liaison O-glycosidique qui unit une thréonine à un mannose. En effet, la soude, en milieu réducteur, détruit une mole de thréonine et détache un polyside qui contient du mannitol.

L'existence de ce type de liaison a été récemment confirmé par GOT et coll. (835). Selon ces auteurs, la conjugaison se ferait par un résidu de N-acétylglucosamine. Cette éventualité peut être envisagée malgré la caractérisation du mannitol, que nous avons effectuée, et qui semble a priori impliquer que le mannose soit conjugué à la thréonine. On voit en effet, que la N-acétylglucosamine, en position terminale réductrice, peut être cyclisée par la soude, en un "chromogène de KUHN" si sa fonction OH en 4 est libre. En outre, ce chromogène se détache si l'ose qui le précède le substitue en 3. On peut donc parfaitement admettre le mécanisme suivant, qui expliquerait la présence de mannitol dans le glycanne détaché par la soude.

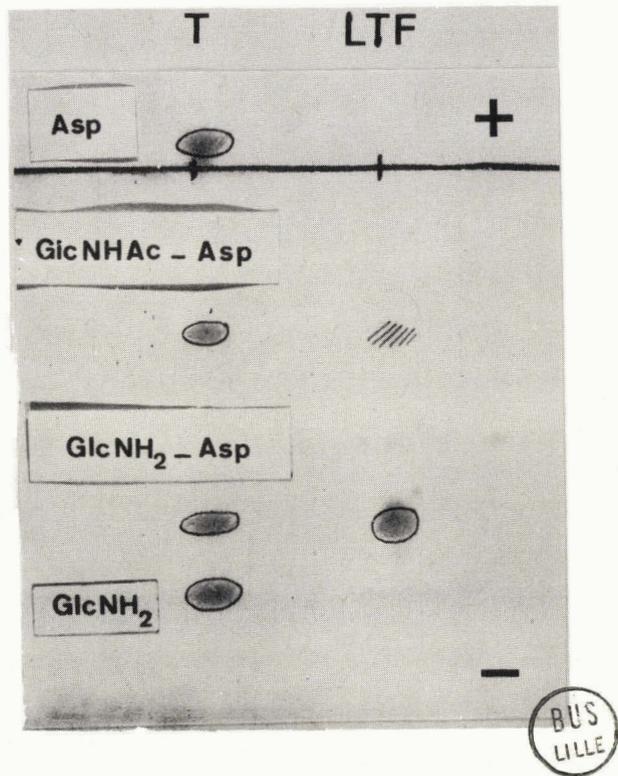
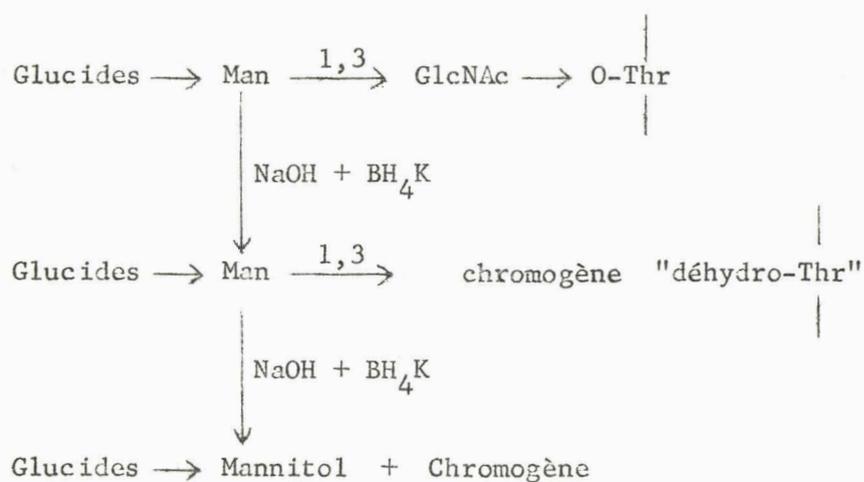


Figure 40

Electrophorèse effectuée en cuve "en toit" à pH 3,9 de l'hydrolysate chlorhydrique (HCl 1,5 N ; à 100°C ; pendant 1,5 h). T : de la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine pure ; LTF : de la fraction glycopeptidique GP, alcali-résistante de la lactotransferrine (voir Fig. 39 ; p. 228). Asp : acide aspartique ; GlcNHAc - Asp : N-(β -aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine ; GlcNH₂ : glucosamine.



3 - En outre, deux autres résidus glycaniques sont attachés à la protéine par la liaison classique, de type asparaginyglucosamine.

4 - Une nouvelle différence structurale se manifeste donc entre la transferrine et la lactotransferrine humaines. Elle renforce les bases physico-chimiques de la spécificité immunologique des deux glycoprotéides.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

1 - L'application du procédé original de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET de préparation de la lactotransferrine humaine (relargage par le sulfate d'ammonium et chromatographie sur une résine carboxylique, l'Amberlite XE-64, fournit des échantillons de lactotransferrine pure, avec un rendement de 70 à 85 p.100. Une tentative d'amélioration de la méthode qui consistait à substituer à l'Amberlite XE-64, la DEAE-cellulose, a échoué car celle-ci dénature le protéide. Il s'agit d'ailleurs d'un phénomène général et il nous semble que la plus grande prudence doit être observée dans les applications de la DEAE-cellulose à la chromatographie des protéides. Au contraire, l'emploi de la CM-cellulose nous a permis d'obtenir des préparations pures de lactotransferrine, avec un rendement qui atteint 90 à 95 p.100.

Des fractionnements réalisés d'une manière quantitative nous conduisent à fixer à 0,7 - 0,9 g p.litre la concentration du lait de Femme en lactotransferrine. Ces valeurs sont intermédiaires entre celles de BIANC (0,6 g) et de MONTREUIL et coll. (1 à 1,5 g).

2 - La détermination, par des procédés différents du taux de fer fixé à saturation par la transferrine et par la lactotransferrine nous a fourni le même résultat pour les deux protéides : 1,47 g p.1000 g, soit 2 atomes de fer par mole.

Les résultats que nous avons obtenus à propos de la lactotransferrine infirment ceux de MONTREUIL et coll. qui avaient obtenus des valeurs plus élevées : 3,47 g de fer p.1000 g de protéide et 6 atomes de fer par mole. Les résultats de ces auteurs s'expliquent par les conditions de fixation du fer qu'ils avaient appliquées et qui ont conduit à la formation de lactotransferrines sursaturées par conjugaison du fer sur des sites non spécifiques. L'isolement de lactotransferrines à teneur élevée en fer (15 g p.1000 g de protéide) que nous avons réalisé est en faveur de cette hypothèse.

3 - Nos recherches sur les propriétés physiques de la transferrine et de la lactotransferrine nous ont permis de déterminer quelques constantes et de révéler des analogies et des différences entre les deux protéides.

a - Les masses moléculaires de la transferrine et de la lactotransferrine sont identiques et égalent 76 000. Cette valeur s'éloigne de celle qui est souvent adoptée par les auteurs (85 à 90 000). Elle a été obtenue par l'application de différents procédés (sédimentation et diffusion ; équilibre de sédimentation ; chromatographie sur gels de Sephadex G-100 et G-200 ; calcul d'après la teneur en fer).

b - Les propriétés optiques (absorption de la lumière visible et de l'ultra-violet ; pouvoir rotatoire) de la transferrine et de la lactotransferrine sont identiques. L'absorbance molaire à 278 m μ et le pouvoir rotatoire spécifique sont profondément modifiés (augmentation de 20 à 25 p.100) par l'élimination du fer. Celui-ci participe donc à l'élaboration des structures secondaire et tertiaire des deux protéides.

c - La principale différence qui existe entre ceux-ci concerne le comportement électrophorétique : la lactotransferrine possède, en effet, une mobilité moins **anodique** que la transferrine.

4 - Nous avons, la première, identifié les glucides constituant les fractions glycaniques de la transferrine et de la lactotransferrine et déterminé avec précision, d'une manière "statistique" la composition centésimale et molaire en oses de ces dernières.

Les différences fondamentales entre les deux protéides sont les suivantes :

a - La lactotransferrine est plus riche en oses neutres (+ 40 p.100) et en glucosamine (+ 20 p.100) que la transferrine. Elle est plus pauvre en acide sialique. (- 13 p.100).

b - Les deux protéides renferment la même quantité de galactose et de mannose (5 résidus de chacun des oses) mais la lactotransferrine renferme, seule, du fucose (4 résidus). Transferrine et lactotransferrine :

renferment la même osamine : la glucosamine (respectivement, 8 et 10 résidus) et le même acide sialique : l'acide N-acétylneuraminique (respectivement, 3,5 et 3 résidus).

c - Les recherches préliminaires que nous avons effectuées sur la structure des groupements glycaniques de deux protéides ont apporté les résultats suivants :

- La transferrine possède deux groupements glycaniques et la lactotransferrine en possède trois.

- Les études cinétiques de libération des oses par les acides et l'analyse des produits de l'hydrolyse partielle des glycanes révèlent des analogies de structure et l'existence d'enchaînements osidiques communs. En effet, dans les deux cas, l'acide sialique est libéré en totalité le premier ; il est suivi par le galactose et par une fraction importante de l'osamine ; le mannose apparaît plus tardivement. En outre, la N-acétyllactosamine (qui est libérée dès le début des hydrolyses), deux mannobioses isomères et un mannotriose ont été caractérisés dans les hydrolysats partiels.

Sur la base de ces expérimentations nous avons proposé des schémas spéculatifs de structure des fractions glycaniques de la transferrine et de la lactotransferrine qui représentent, à nos yeux, des modèles sur lesquels nous fonderons nos futures recherches.

5 - L'étude de la fraction protéique révèle des différences très profondes entre la transferrine et la lactotransferrine qui portent sur les points suivants :

a - Les compositions centésimale et molaire en acides aminés que nous avons déterminées d'une manière statistique (pour la première fois, en ce qui concerne la lactotransferrine).

b - Les groupements N- et C-terminaux sont différents dans les deux protéides. En effet, la transferrine possède la valine en position N-terminale, tandis que la lactotransferrine (résultat original) n'a pas d'acide N-terminal. En outre le glycolle, la proline et la sérine sont en position C-terminale dans la transferrine tandis que le glycolle et la sérine le sont dans la lactotransferrine. Ces derniers résultats sont, eux-

aussi, originaux. Ils montrent que les deux protéides sont pluricaténaires et que la transferrine et la lactotransferrine renferment, respectivement, au moins 3 et 2 chaînes peptidiques.

c - Les structures primaires des deux protéides sont différentes. En effet, l'application du procédé des "empreintes" d'INGRAM révèle la présence de séquences peptidiques spécifiques dans les hydrolysats protéiniques des deux glycoprotéines. En outre, la résistance de la transferrine et de la lactotransferrine saturées en fer vis-à-vis des protéinases, alors que celles-ci dégradent totalement les apoprotéides, confirme l'hypothèse que nous avons formulée de l'intervention du fer dans la détermination des structures secondaire et tertiaire des deux protéides.

6 - Nous avons déterminé, pour la première fois, sans ambiguïté les modalités de la liaison glycanne-protéine dans la transferrine et dans la lactotransferrine et révèle une nouvelle différence structurale entre les deux protéides.

a - Dans la transferrine, les deux glycannes sont attachés par la N-acétylglucosamine à l'acide aspartique par une liaison du type "asparaginyl-glucosamine". Ce résultat a été obtenu en dégradant par récurrence deux glycopeptides que nous avons isolés des hydrolysats pronasiques de la transferrine (un séryl-aspartyl-glycanne et un glyco-aspartyl-lysine) et qui nous ont fourni l'asparaginyl-glucosamine elle-même.

b - Dans la lactotransferrine, deux restes glycaniques sont, eux aussi, conjugués à la protéine par le même type de liaison asparaginyl-glucosamine dont nous avons démontré l'existence par une expérimentation identique. En outre, le troisième résidu glycanique est attaché à la protéine par une liaison O-thréonyl-glycosidique dont la présence a été démontrée par la rupture, en milieu alcalin, de cette dernière par un mécanisme de " β -élimination".

7 - Nous pouvons donc conclure, d'une manière très générale, que les différences essentielles qui se manifestent entre la transferrine et la lactotransferrine sont plus d'ordre chimique que d'ordre physique. En effet, les propriétés physiques sont très voisines tandis que les propriétés chimiques sont

très nettement distinctes. Elle portent, à la fois, sur la structure des groupements glucidiques et de la fraction protéique et sur les modalités de la liaison glycanne-protide. Ainsi avons-nous fondé les bases physico-chimiques de la spécificité immunologique de la transferrine et de la lactotransferrine humaines.

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

- AASA R., MALMSTRÖM B.G., SALTMAN P. et VANNGÅRD T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, 203, (119, 143, 158, 172, 175)
- AISEN P., AASA R., MALMSTRÖM B.G. et VANNGÅRD T., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 2484, (153, 275)
- AISEN P., LEIBMAN A. et REICH H.A., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 1666, (49, 176, 191, 779)
- AKABORI S., OHNO K. et NARITA K., *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1952, 25, 214, (767)
- ALLERTON S.E., Thèse Doct., Harvard, 1962, (257)
- ALLISON A.C., *Experientia*, 1959, 15, 281, (356, 376, 377)
- AMINOFF D., *Biochem. J.*, 1961, 81, 384, (690, 694)
- ANDERSON B., SENO N., SAMPSON P., RILEY J.G., HOFFMAN P. et MEYER K., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, PC 2716, (819)
- ANDREWS P., *Biochem. J.*, 1964, 91, 222, (645)
- ARENDS T., GALLANGO M. L., PARKER W.C. et BEARN A.G., *Nature*, 1962, 196, 477, (369)
- ASHTON G.C., *Nature*, 1958, 182, 370, (490, 502)
- AUDRAN R., *Biol. Méd.*, 1965, 1, 97, (349)
- AWAI M. et BROWN E.B., *J. Lab. Clin. Med.*, 1963, 61, 363, (393, 399, 433)
- AZARI P. et BAUGH R.F., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 118, 138, (630)
- AZARI P.R. et FEENEY R.E., *J. Biol. Chem.*, 1958, 232, 293, (793)
- AZARI P.R. et FEENEY R.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 92, 44, (163)
- BAMBACH M.N., *Klin. Wochschr.*, 1966, 44, 1276, (396)
- BARBER A.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 92, 38, (458)
- BARBER A.A. et SHEELER P., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1961, 2, 233, (460)
- BARKAN G., *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 171, 194, (22, 123)
- BARKAN G., *Z. Physiol. Chem.*, 1963, 221, 241, (23)

- BARKAN G. et SCHALES O., Z. Physiol. Chem., 1937, 248, 96, (24, 25)
- BARNICOT N.A., in "Genetical Variation in Human Population" Harrison GA, Oxford Univ. Press éd., 1961, 51, (347)
- BATES G.W., BILLUPS C. et SALTMAN P., J. Biol. Chem., 1967, 242, 2810 et 2816, (628)
- BEARN A.G. et PARKER W.C., in "Glycoproteins", GOTTSCHALK A., Elsevier éd., Amsterdam, 1966, 413, (320,350,776)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst., 1954, 79, 201, (683, 687, 719a, 801)
- BENCZE W.L. et SCHMID K., Anal. Chem., 1957, 29, 1193, (327)
- BERGGÅRD I., Nature, 1960, 187, 776, (398)
- BEZKOROVAINY A., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 127, 535, (224, 225, 227, 228, 235, 236, 237, 238, 242, 243, 244, 245, 254, 279, 288, 289, 291, 292, 650)
- BEZKOROVAINY A. et DOHERTY D.G., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 96, 491, (644)
- BEZKOROVAINY A. et GROHLICH D., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 147, 497, (285, 286)
- BEZKOROVAINY A. et RAFELSON M.E., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 302, (231, 232, 241, 253, 256, 640, 651)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M.E. et LIKHTE V., Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103, 371, (98, 204, 209, 219, 220, 252, 259, 268, 273, 283, 309, 316, 324, 325, 706)
- BISERTE G. et DASSONVILLE B., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 49 (725)
- BISERTE G., DAUTREVAUX M. et BOULANGER P., Bull. Soc. Chim., 1963, 2954, (806)
- BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R., Exp. Ann. Biochim. Med., 1963, 25, 85, (571)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P., J. Chromatog., 1959, 2, 225, (771, 772, 773, 807, 823)
- BISERTE G., PLAQUET-SCHOONAERT T., BOULANGER P. et PAYSANT P., J. Chromatog., 1960, 3, 25, (790a)

- BLANC B., Thèse Doct., Genève, Editions Médecine et Hygiène, 1962, (141, 154, 421, 440, 570, 577, 580, 588, 600, 613, 670)
- BLANC B., in "Protides of the Biological Fluids", 14è Colloque de Bruges, 1966, Elsevier éd., 1967, 125, (578, 580, 610)
- BLANC B., BUJARD E. et MAURON J., *Experientia.*, 1963, 19, 299, (1, 594, 758, 761, 765)
- BLANC B. et ISLIKER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 929, (521, 530, 539, 544, 546, 549, 555, 562, 565, 569, 601, 604, 661, 710)
- BLOCK R.J. et ZWEIG G., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 48, 386, (558)
- BLUMBERG B.S., *Proc. Soc. Exptl., Biol. Med.*, 1960, 104, 25, (491)
- BLUMBERG et WARREN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 90, (340)
- BOETTCHER E.W., KISTLER P. et NITSCHMANN H., *Nature*, 1958, 181, 490, (51, 52, 54, 61, 70, 77)
- BOFFA G.A., MARINELLI G., DRILHON A. et FINE J.M., *C.R. Acad. Sci.*, 1966, 262, 2294, (479)
- BOFFA G.A., DRILHON A., FINE J.M. et FAURE A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1967, 49, 433, (507)
- BOYER S.H. et YOUNG W.J., *Nature*, 1960, 187, 1035, (499)
- BRENNER M., NIEDERWIESER A. et PATAKI G., in "Thin-Layer Chromatography", E. STAHL, Springer Verlag, Berlin, 1965, 391, (312)
- BRUYNOCHE G., *C.R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 441, (486)
- BÜCHER T., MATZELT D. et PETTE D., *Klin. Wochschr*, 1952, 30, 325, (406)
- BURTIN P., in "Protides of the Biological Fluids", 6è Colloque de Bruges, 1958, Elsevier éd., 1959, 213, (408)
- BURTIN P., *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 72, (408)
- BUTTKUS H., CLARK J.R. et FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1965, 4, 998, (188)
- CHARLWOOD P.A., *Biochem. J.*, 1963, 88, 394, (93, 99d, 221, 258, 646, 654)
- CHEESEMAN G.C. et JAYNE-WILLIAMS D.J., *Nature*, 1964, 204, 688, (584)
- CHERBULIEZ E., BAEHLER B. et RABINOWITZ J., *Helv. Chim. Acta*, 1964, 47, 1350, (810, 814)
- CLAUSEN J. et MUNKNER T., *Nature*, 1961, 189, 60 (409, 411)
- COHEN B.L., *Genet. Res.*, 1960, 1, 431, (504)
- COHN E.J., *Science*, 1945, 101, 51, (39)

- COHN E.J. et EDSALL J.T., in "Proteins, Amino-acids and Peptides as ions and dipolar ions", Reinhold éd. New Ybrk, 1943, (642)
- COONS C.M., Ann. Rev. Biochem., 1964, 33, 459, (452)
- COOPER D.W., LANDER H. et KIRK R.L., Nature, 1964, 204, 102, (366)
- COOPER D. et SHARMAN G.B., Nature, 1964, 203, 1094, (506)
- COTZIAS G.C., Fed. Proc. Suppl., 1961, 10, 20, (104)
- CROIZIER G., Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1966, 6, 379, (509)
- CROIZIER G., Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1967, 7, 173, (510)
- CROSBY W.H., Blood, 1963, 22, 441, (454)
- DANCIS J., BRAVERMAN N. et LIND J., J. Clin. Invest., 1957, 36, 398, (436)
- DATE J.W., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 et 444, (714, 802)
- DAVIS P.S., LUKE C.G. et DELLER D.J., Lancet, 1966, ii, 1431, (447)
- DAVIS P.S., LUKE C.G. et DELLER D.J., Nature, 1967, 214, 1126, (448)
- DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M., Experientia, 1964, 20, 204, (770)
- DISCHE Z., J. Biol. Chem., 1947, 167, 189, (703)
- DIXON A. St. J., Biochem. J., 1955, 60, 165, (728)
- DOLEZÁLOVÁ V., BRADA Z. et KOČENT A., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 294, (475)
- DREYFUS J.C., Traité de Biochimie Générale, 1967, tome III, fasc. 1, 545, (441, 461)
- DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 541, (8, 443, 463)
- DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G., in "Le Fer", L'expansion Scientifique Française éd., 1958, (11, 444, 621)
- DREYWOOD R., Ind. Eng. Chem. Anal. (Ed.), 1946, 18, 499, (674)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., Nature, 1951, 168, 167 ; Anal. Chem., 1956, 28, 350, (796)
- EHRENBERG A. et LAURELL C.B., Acta Chem. Scand., 1955, 9, 68, (116, 118)

- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., *Biochem. J.*, 1933, 27, 1824, (682, 800)
- ERIKSSON S. et SJÖQUIST J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 45, 290, (778)
- EWERBECK H., *Klin. Wochschr.*, 1950, 28, 692, (405)
- FABER M. et JORDAL R., *Nature*, 1961, 192, 181, (392)
- FIALA S., *Czechoslov. Chem. Com. Trav. Chim.*, 1949, 14, 287, (108, 138, 139)
- FIALA S. et BURK D., *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 172, (154a)
- FINE J.M., *Pathol. Biol.*, 1965, 13, 423, (351)
- FINE J.M., DRILHON A., RIDGWAY G.J., AMOUCH P. et BOFFA G., *C.R. Acad. Sci.*, 1967, 265, 58, (480)
- FEENEY R.E. et KOMATSU S.K., *Abstracts, 152th Meeting, Am. Chem. Soc. New-York, 1966, C₂₂₂*, (159)
- FLETCHER J. et HUEHNS E.R., *Nature*, 1967, 215, 584, (457)
- FONTES G. et THIVOLLE L., *C.R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 687, (18)
- FRAENKEL-CONRAT H., *Arch. Biochem.*, 1950, 28, 452, (142, 155, 186)
- FRAENKEL-CONRAT H. et FEENEY R.E., *Arch. Biochem.*, 1950, 29, 101, (185)
- FRANKLIN J.G., WILLIAMS D.J. et GLEGG L.F.C., *J. Appl. Bact.*, 1958, 21, 47, (583)
- FREEMAN T., in "Proteids of the Biological Fluids", 8è Colloque de Bruges, 1960, Elsevier éd., 1961, 213, (88, 100, 431)
- FRICK E. et SCHEID-SEYDEL L., *Klin. Wochschr*, 1960, 38, 1240 et 1963, 41, 589, (413, 415)
- FRONSTIN M.H., KROE D.J., KLAVINS J.V., KINNEY T.D. et KAUFMAN N., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1967, 125, 931, (451)
- GABL F. et WACHTER H., in "Protides of the Biological Fluids", 9è Colloque de Bruges, 1961, Elsevier éd., 1962, 336, (425)
- GALLANGO M.L. et ARENDS T., *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1960, 5, 826, (493)
- GALLANGO M.L. et ARENDS T., *Proc. 8th Intern. Congr. Blood, Transfusion, Tokyo, 1961*, (494)
- GARDELL S., *Acta Chem. Scand.*, 1953, 7, 207, (719, 733, 738)
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 970, (716, 737)

- GAVRILESCO K., COURCON J., HILLION P., URIEL J., LEWIN J. et GRABAR P.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 803, (407)
- GELOTTE B., FLODIN P. et KILLANDER J., Arch. Biochem. Biophys., 1962,
suppl 1, 319, (99c)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1963, 89, 380, (702)
- GIBLETT E.R., Progr. med. genet., 1962, 2, 34, (348)
- GIBLETT E.R., HICKMAN C.G. et SMITHIES O., Nature, 1959, 183, 1589, (355,
365, 373)
- GITLIN D., JANEWAY C.A. et FARR L.E., J. Clin. Invest., 1956, 35, 44, (434)
- GLEN-BOTT A.M., HARRIS H., ROBSON E.B., BEARN A.G. et PARKER W.C., Acta
Genet Stat. Med, 1964, 14, 52, (364)
- GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., Abstr. Div. Carbohydrate
Chem. Am. Chem. Soc., 135th, Meeting Boston, Mass., 1959, 3D, (343)
- GÖLLNER I., Behringwerk. Mitt., 1955, 30, 42, (317, 774)
- GOOD T.A. et BESSMAN S.P., Anal. Biochem., 1964, 9, 253, (684, 688)
- GOODMAN M. et POULIK E., Nature, 1961, 190, 171, (495)
- GOODMAN M. et POULIK E., Nature, 1961, 191, 1407, (496)
- GOODMAN M. et RIOPELLE A.J., Nature, 1963, 197, 1128, (501)
- GOODMAN M. et VULPE M., World Neurol, 1961, 2, 589, (410)
- GOODMAN M. et WOLF R.C., Nature, 1963, 197, 1128, (498)
- GORDON A.H. et LOUIS L.N., Biochem. J., 1963, 88, 409, (474)
- GORDON W.G., ZIEGLER J. et BASCH J.J., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 60,
410, (590)
- GOT R., in "Protides of the Biological Fluids", 12è Colloque de Bruges, 1964,
Elsevier éd., 1965, 385, (5,662,792,833)
- GOT R., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 432, (532, 533, 534, 540)
- GOT R., GOUSSAULT Y. et FONT J., Carbohydrate Res., 1966, 3, 157, (6, 535,
569a, 834, 835)
- GOT R., FONT J. et GOUSSAULT Y., C.R. Soc. Biol., 1967, 161, 1041, (481)

- GRANICK S., Chem. Rev., 1946, 38, 380, (453)
- GROVES M.L., J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 3345, (589, 593, 611, 614)
- GROVES M.L., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 154, (592)
- GROVES M.L., PETERSON R.F. et KIDDY C.A., Nature, 1965, 207, 1007, (595, 658, 665)
- GRÜTTNER R., SCHÄFER K. H. et SCHROTER W., Klin. Wochschr., 1960, 38, 1162, (520, 529, 547, 566, 567)
- HANSON L.A., Experientia, 1959, 15, 473, (418)
- HANSON L.A., Immunological studies of human milk with special reference to the immune globulins, Gothenburg, 1961, (418)
- HARDWICKE J., Proc. Roy. Soc. Med., 1954, 47, 832, (400)
- HARDWICKE J., BAKER K.J., RANKIN J.G. et PREISIG R., Protides of Biological Fluids, 10è Colloque de Bruges 1962, Elsevier (Ed.), 1963, 218, (423)
- HARRIS H., PENINGTON D.G., ROBSON E.B. et SCRIVER C.R., Ann. Hum; Genet, 1960, 24, 327, (363)
- HARRIS H., ROBSON E.B. et SINISCALCO M., Nature, 1958, 182, 452, (359, 370)
- HAVEZ R., BONTE M., DAUTREVAUX M. et MOSCHETTO Y., C.R. Soc. Biol., 1967, 161, 330, (476)
- HAZEN E.E., Thèse Doct. Med., Harvard, 1963, (171, 251)
- HEIDE K. et HAUPT H., Behringwerk. Mitt., 1964, 43, 161, (57, 67, 79)
- HEIDE K., HAUPT H., STÖRIKO K., et SCHULTZE H.E., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 460, (58, 68, 74)
- HEILMEYER L., KELLER W., VIVELL O., KEIDERLING W., BETKE K., WÖHLER F. et SCHULTZE H.E., Dtsch. Med. Wschr., 1961, 86, 1745, (467)
- HEILMEYER L. et PLOTNER K., Das Serumeisen und die Ecsenmangelkrankleit Fischer Iena, 1937, (622)
- HEIMBURGER N., HEIDE K., HAUPT H. et SCHULTZE H.E., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 293, (308, 326, 759, 760, 764)
- HEKTOEN L. et COLE A.G., J. Infect. Dis., 1928, 42, 1, (485)

- HEMMELEER G., Métabolisme du fer. Physiologie - pathologie - traitement. (Masson), 1956, (618)
- HENRIQUES V. et ROCHE A., Bull. Soc. Chim..Biol., 1927, 9, 501, (20)
- HIRS C.H.W., in "Meth. Enzymol.", COL OWICK S.P. et KAPLAN N.O., 1955, 1, 113, (608)
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.A., J. Biol. Chem., 1956, 221, 151, (787)
- HITZIG W.H., SCHMID M., BETKE K. et ROTSCCHILD M., Helv. Poediat. Acta, 1960, 15, 203, (466)
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B., Acta Physiol. Scand., 1945, 10, 307, (29, 120)
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B., Acta Chem. Scand., 1947, 1, 944, (33, 102)
- HOPKINS L.L. et SCHWARZ K., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 90, 484, (107)
- HOREJSI J. et SMETANA R., Acta Med. Scand., 1956, 155, 66, (50, 60, 531)
- HORSFALL W.R. et SMITHIES O., Science ; 1958, 128, 35
- HORST W., Klin. Wochschr., 1954, 32, 961, (401)
- HUIDOBRO-TECH G., in "Immunoelktrophoretische Untersuchungen an Kolostrum und Frauenmilch", Med. Diss., Freiburg in Breisgau, 1959, (419)
- INMAN J.K., Thèse Doct. Med., Harvard, 1956, (140, 146, 177, 181, 206, 212, 215, 229, 287, 290)
- INMAN J.K., 10th Conf. on plasma protein and cellular elements of blood. Protein Foundation Cambridge Mass., 1956, (45)
- INMAN J.K., CORYELL F.C., Mc CALL K.B., SGOURIS J.T. et ANDERSON H.D., Vox Sanguinis, 1961, 6, 34, (46,47,194)
- JAGER B.V., J. Clin. Invest., 1949, 4, 792, (395)
- JAMES K. et STANWORTH D.R., J. Chromatog., 1965, 15, 336, (87, 89)
- JAMIESON G.A., Biochim. Biophys. Res. Commun, 1964, 17, 775, (2, 298, 311, 330, 335, 344, 727, 824, 828)
- JAMIESON G.A., J. Biol. Chem., 1965, 240, 2914, (3, 302, 313, 344, 708, 727, 735, 741, 825, 830, 832)
- JAMIESON G.A., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 121, 326, (300)
- JAMIESON G.A., Protides of the Biological Fluids. 14è Colloque de Bruges, 1966, Elsevier, (Ed.), 1967, 71, (342, 750, 829)

- JANDL J.H. et KATZ J.H., *J. Clin. Invest.*, 1963, 42, 314, (267)
- JEPPSSON J.O., *Thèse Doct. Med.*, Umeå, 1967, (17)
- JEPPSSON J.O., *Acta Chem. Scand.*, 1967, 21, 1686, (329, 785, 794)
- JEPPSSON J.O., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 140, 468, (211, 387, 388, 389)
- JEPPSSON J.O., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 140, 477, (321, 777, 784)
- JEPPSSON J. O. et SJÖQUIST J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 658, (95, 99, 132, 222, 390, 649, 742)
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 1108, (515)
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1960, 14, 510, (517, 527, 543, 545, 554, 564)
- JONES H.D.C. et PERKINS D.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 100, 122, (97, 105, 165, 310, 707)
- KAMINSKI M. et DURIEUX J., *Exp. Cell. Res.*, 1956, 10, 590, (488)
- KAMIYAMA S. et SCHMID K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 80, (753)
- KARKAS J.D. et CHARGAFF E., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 949, (697)
- KATZ J.H., *J. Clin. Investig.*, 1961, 40, 2143, (131, 266, 394, 432)
- KEKWICK R.A. et MACKAY M.E., *Med. Res. Council. Sper. Rept. Ser.*, 1954, 286, (96)
- KELLER W. et PENNELL R.B., *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, 53, 638, (193, 207, 213, 272)
- KISTLER P., NITSCHMANN H.S., WYTTENBACH A., STUDER M., NIEDERÖST C.H. et MAUERHOFER M., *Vox. Sanguinis*, 1960, 5, 403, (53, 62, 71, 78)
- KOECHLIN B.A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, 74, 2649, (38, 43, 44, 109, 122, 128, 198, 205, 265, 270, 281, 284, 293, 303)
- KOMATSU S.K. et FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1967, 6, 1136, (160, 167)
- KONIGSBERG W. et HILL R.J., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2547, (808)
- KRISTJANSSON F.K., *Genetics*, 1963, 48, 1059, (659)
- KUSAMA K., *J. Biochem.*, 1957, 44, 375, (768)
- LAI L.Y.C., *Nature*, 1963, 198, 589, (374)

- LAI L.Y.C. et KIRK R.L., *Nature*, 1960, 188, 673, (492)
- LANE R.S., *Nature*, 1967, 215, 159, (428)
- LAURELL C.B., *Acta Physiol. Scand.*, 1947, 14, suppl. 46, (32, 136, 445, 464, 617)
- LAURELL C.B., *Blood*, 1951, 6, 183, (147)
- LAURELL C.B., *Pharmacol. Revs.*, 1952, 4, 371, (7, 446, 464, 619)
- LAURELL C.B., *Acta Chem. Scand.*, 1953, 7, 1407, (112, 129, 472a)
- LAURELL C.B., in "Plasma Proteins", PUTNAM F.W., Academic Press éd., 1960, 1, 349, (12)
- LAURELL C.B. et INGELMAN B., *Acta Chem. Scand.*, 1947, 1, 770, (36, 472)
- LAY W.P. et POLGLASE W.J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1957, 35, 39, (769)
- LEIBMAN A. et AISEN P., Communication personnelle à AISEN P., AASA R., MALMSTRÖM B.G., et VANNGÅRD T., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 2484, (276, 668)
- LEIBMAN A.J. et AISEN P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 121, 717, (473)
- LEVY A.L., *Nature*, 1954, 174, 126, (763)
- LIGHT A. et GREENBERG J., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 258, (809)
- LINE W.F., GROHLICH D. et BEZKOROVAINY A., *Biochemistry*, 1967, 6, 3393, (135)
- LOISILLIER F., GOT R., BURTIN P., GRABAR P., *Protides of Biological Fluids 14è Colloque de Bruges*, 1966, Elsevier (Ed.) 1967, 133, (576)
- LUDEWIG S. et GLOVER E.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, 113, 661, (700)
- LUKE C.G., DAVIS P.S. et DELLER D.T., *Lancet*, 1967, i, 926, (449)
- MAHLING A., *Z. Naturf.*, 1963, 18b, 1, (218)
- MAIORCA R. et SCARPIONI L., *Min. Nefrol.*, 1961, 9, 5, (404)
- MALMSTRÖM B.G., VANNGÅRD T., AASA R. et SALTMAN P., *Federation Proc*, 1963, 22, 595, (276)
- MARGOLIASH E., KIMMEL J.R., HILL, R.L. et SCHMIDT W.R., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2148, (789)
- MARSHALL M.E. et DEUTSCH H.F., *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 155, (487)
- MARTIN C.M., *Am. J. Med. Sci.*, 1962, 244, 334, (471)
- MARTIN C.M., JANDL J.H. et FINLAND M., *J. Infect. Diseases*, 1963, 112, 158, (470)

- MASSON P.L., CARBONARA A.O. et HEREMANS J.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 107, 485, (575)
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., *Protides of the Biological Fluids*. 14^e Colloque de Bruges 1966, Elsevier (Ed.), 1967, 115, (523, 536, 548, 550, 575, 581, 635, 636)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et DIVE C.H., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 735, (574)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et PRIGNOT J., *Experientia*, 1965, 21, 604, (572)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et PRIGNOT J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 111, 466, (573)
- MASSON P.L. HEREMANS J.F., PRIGNOT J. et WAUTERS, *Thorax*, 1966, (579)
- MC LENNAN W.J. et LEWIS G.P., *Clin. Chim. Acta*, 1967, 18, 371, (427)
- MICHAELIS L., Communication personnelle à KOECHLIN B.A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, 74, 2649, (117)
- MICHAUD R.L. et WOODWORTH R.C., *Abstracts 152 th Meeting. Am. Chem. Soc., New-York*, 1966, C₂₂₀, (166)
- MICHL H., *Monatsch. Chem.*, 1951, 82, 489, (791, 797, 811, 817)
- MONSIGNY M., *C.R. Symposium, Technicon, Paris*, 1965, (4)
- MONSIGNY M., *Thèse Doct.*, 1968, Lille, (804)
- MONTGOMERY R., WU Y.C. et LEE Y.C., *Biochemistry*, 1965, 4, 578, (755)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1639, (715)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON et SPIK G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1867, (333, 337, 730, 744, 746, 749a)
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G. et LEROY N., *C.R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 4065, (297, 299, 319, 731, 732, 736, 739, 762)
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S., *C.R. Soc. Biol.*, 1960, 154, 732, (607)
- MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T., *C.R. Acad. Sci.*, 1967, 264 D, 2068, (820)
- MONTREUIL J. et MULLET S., *C.R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 1736, (516, 518, 525, 537, 541, 552, 560, 598, 602, 605, 615, 633)

- MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosage des glucides Fasc.1 : Méthodes colorimétrique de dosages des glucides totaux. Laboratoire de Chimie Biologique. Fac. Sci., éd., Lille 1963, (671, 677, 686, 693, 704, 712)
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493, (332, 334, 729, 743, 745, 749, 754)
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413, (516, 519, 526, 538, 542, 553, 561, 563, 568, 599, 603, 605, 612, 616, 634, 638, 639, 641, 647, 652, 656, 660, 666, 709)
- MOORE C., MINNICH V. et WELCH J., J. Clin. Investig. , 1939, 18, 543, (426)
- MORGAN E.H. et LAURELL C.B., Brit. J. Haemat., 1963, 9, 471, (455)
- MORRISON F.R. et LOUITIE R., Communication personnelle à KOECHLIN B.A., J. Amer. Chem. Soc., 1952, 2649, (246)
- MURRAY R.F., ROBINSON J.C. et BLUMBERG B.S., Nature, 1964, 204, 382, (371)
- NAGLER A.L., KOCHWA S. et WASSERMAN L.R., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1962, 111, 746, (63, 73, 81, 217)
- NIESERT W., Klin. Wochschr, 1962, 40, 978B, (402)
- NOMOTO M. et NARA HASHI Y., J. Biochem., 1959, 46, 839, (786)
- NOMOTO M., NARAHASHI Y. et MURAKAMI M., J. Biochem., 1960, 48, 906, (832a)
- NORDAL A. et OISETH D., Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1289, (723)
- OGDEN A.L., MORTON J.R., GILMOUR D.G. et Mc DERMID E.M., Nature, 1962, 195, 1026, (489, 508)
- ONCLEY J.L., SCATCHARD G. et BROWN A., J. Phys. Colloid. Chem., 1947, 51, 184, (214, 239, 248, 280)
- ORAM J.D. et REITER B., Rep. Nat. Inst. Res. Dairy, 1966, (582)
- PARK J.T. et JOHNSON M.J., J. Biol. Chem., 1949, 181, 149, (818)
- PARKER W.C. et Bearn A.G., Science, 1961, 133, 1014, (339)
- PARKER W.C. et BEARN A.G., Science 1961, 134, 106, (372)
- PARKER W.C. et BEARN A.G., Ann. Hum. Genet., 1961, 25, 227, (361, 367, 497, 500)

- PARKER W.C. et BEARN A.G., *Science*, 1962, 137, 854, (362)
- PARKER W.C. et BEARN A.G. *J. Exp. Med.*, 1962, 115, 83, (99a, 208, 315, 323, 378, 379, 384, 438)
- PARKER W.C. et BEARN A.G., *Nature*, 1963, 199, 1184, (438)
- PARKER W.C., CRESTFIELD A.M. et BEARN A.G., Résultats non publiés (1963) cités par BEARN et PARKER in GOTTSCHALK A. GLYCOPROTEINS, Elsevier, 1966, 423, (322)
- PARKER W.C., HAGSTROM J.W.C. et BEARN A.G., *J. Exptl. Med.*, 1963, 118, 975, (414, 439)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 238, (718, 816)
- PARTRIDGE S.M., *Biochemical Society Symposia*, Cambridge University Press, éd., London, (713, 717), 1949, 3, 52.
- PATAKI G., *Chimia*, 1964, 18, 23, (813)
- PATRAS B. et STONE W.H., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1961, 107, 861, (65, 72)
- PERKINS D.J., *Biochem. J.*, 1963, 89, 93P, (164)
- PETERSON R.E., *Anal. Chem.*, 1953, 25, 1337, (624)
- PETERSON E.A., et SOBER H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 751, (85)
- PETERSON E.A. et SOBER H.A., in "The Plasma Proteins", PUTNAM F.W., Academic Press éd., 1960, 1, 105, (86)
- PETTE D. et STUPP I., *Klin. Wochschr*, 1960, 38, 109, (412)
- PIEZ K.A. et MORRIS L., *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 187, (756, 803)
- POLIS B.D. et SHMUKLER H.W., *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 475, (557, 587)
- POULIK M.D., *J. Immunology*, 1959, 82, 502 et *Clin. Chim. Acta*, 1961, 6, 493, (338)
- PUTNAM F.W., *Science*, 1955, 122, 275, (318, 775)
- PUTMAN F.W., in NEURATH H. (Ed.) "The Proteins" Academic Press, 1964, 3, 211, (13)
- RABINOVITZ M., CHAYEN R., SCHEN R.J. et GOLDSCHMIDT L., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 270, (114)
- RAMSAY W.N.M. in *Adv. in Clin. Chem.*, "Plasma Iron", 1958, 1, 1, (10,620)

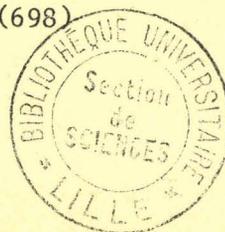
- RAUSEN A.R., GERALD P.S. et DIAMOND L.K., Nature, 1961, 192, 182, (437)
- RAYMOND S. et NAKAMICHI M., Anal. Biochem., 1962, 3, 23, (657, 663, 664)
- REILLY P.L., DAVIS P.S. et DELLER D.J., Nature, 1968, 217, 68, (450)
- REITER B. et ORAM J.D., Nature, 1967, 216, 328, (585)
- RIEGEL C. et THOMAS D., New. Eng. J. Med., 1956, 255, 434, (465)
- RIFKIND D., KRAVETZ H. KNIGH V. et SCHADE A.L., New. Engl. J. Med., 1961, 265, 115, (403)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 ; 1940, 34, 931, (673, 799)
- RIORDAN J.F. et VALLEE B.L., Biochemistry, 1963, 2, 1460, (162)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G. et SEAL U.S., J. Biol. Chem., 1966, 241, 4907, (66, 83, 99b, 134, 223, 226, 233, 234, 249, 255, 260, 269, 274, 632, 637, 648, 653)
- ROBINSON J.C. et PIERCE J.E., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106, 348, (90, 92, 133, 336, 341, 701, 747, 748)
- ROBINSON J.C., BLUMBERG B.S. et PIERCE J.E., J. Lab. Clin. Med., 1962, 60, 468, (91)
- ROOP W.E., Dissert. Abstr., 1964, 25, 79, (195, 196)
- ROOP W.E. et PUTMAN F.W., J. Biol. Chem., 1967, 242, 2502, (64, 76, 80, 84, 210, 375)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 300, (720)
- ROSENTAL F.D. et SOOTHILL J.F., J. Neurosurg. Psychiat., 1962, 25, 177, (416)
- ROOS J., KOCHWA S. et WASSERMAN L.R., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 154, 70, (110)
- ROSSEN R., SCHADE A.L., BUTLER W.T. et KASEL J.A., J. Clin. Invest., 1966, 45, 768, (424)
- SADDI R. et DECKEN A. VON DER, Experientia , 1965, 21, 577, (430)
- SANGER F. et THIMPSON E.O.P., Biochem. J., 1953, 53, 369, (788)
- SCHADE A.L., Protides of the Biological Fluids 8ème Colloque de Bruges 1960, Elsevier (Ed.), 1961, 261, (469)

- SCHADE A.L., *Biochem. Z.*, 1963, 338, 140, (469)
- SCHADE A.L., *Farmaco*, 1964, 29, 185, (180)
- SCHADE A.L., *Protides of the Biological Fluids*, 14è Colloque de Bruges 1966. Elsevier (Ed.) 1967, 13, (524)
- SCHADE A.L. et CAROLINE L., *Science*, 1944, 100, 14, (31)
- SCHADE A.L. et CAROLINE L., *Science*, 1946, 104, 340, (30, 35, 40, 101, 121, 126, 468)
- SCHADE A.L. et REINHART R.W., *Protides of the Biological Fluids*, 14è Colloque de Bruges 1966, Elsevier (Ed.), 1967, 75, (149, 150)
- SCHADE A.L., REINHART R.W. et LEVY H., *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 170, (34, 144, 148, 277)
- SCHÄFER K.H., *M Schr. Kinderheilk*, 1951, 99, 69, (512)
- SCHÄFER K.H., "V Kongress des Europäischen Gesellschaft für Hämatologie" Freiburg 1956, p. 154, (514)
- SCHÄFER K.H., BREYER A.M.; HORST W., KARTE H. et LENZ W., *Klin. Wochschr*, 1956, 34, 300, (513)
- SCHWEIDEGGER J.J., MARTIN E. et RIOTTON G., *Schweiz Med. Wochschr*, 1956, 86, 224, (435)
- SATAKE M., OKUYAMA T., ISHIHARA K. et SCHMID K., *Biochem. J.*, 1965, 95, 749, (751)
- SCHMID K., Mac NAIR M.B. et BÜRGI A.F., *J. Biol. Chem.*, 1959, 230, 853, (609)
- SCHONENBERGER M., *Z. Naturf.*, 1955, 10b, 474, (247, 271)
- SCHULTZE H.E., GÖLLNER I., HEIDE K., SCHÖNENBERGER M. et SCHWICK G., *Z. Naturf.*, 1955, 106, 463, (56, 190, 192, 200, 203, 240, 295, 305)
- SCHULTZE H.E., HEIDE K. et MÜLLER H., *Behringwerk Mitt.*, 1957, 32, 25, (9, 130, 201, 230, 250, 282, 306, 314)
- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F., *Molecular Biology of Human Proteins*. Elsevier, 1966, 1, (15, 59, 417, 429)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R. et HAUPT H., *Biochem. Z.*, 1958, 329, 490, (296, 301, 307, 312, 726, 734, 740)
- SCHULTZE H.E., SCHÖNENBERGER M. et SCHWICK G., *Biochem. Z.*, 1956, 328, 267, (216)

- SCHWICK G., ESSER H.O. et KOCH F., Behringwerk. Mitt., 1959, 37, 11, (422)
- SHIELDS R. et BURNETT W., Anal. Chem., 1960, 32, 885, (675)
- SHIRASAWA K., Proc. Jap. Acad., 1964, 40, 610, (94, 391)
- SHREFFLER D.C., Proc. Natl. Acad. Sci., 1960, 46, 1378, (505)
- SILBERZAHN P., RICHARD G.B., et CREYSSEL R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 495, (263, 478, 655)
- SILVA, FILIPE DA J.A. et MONTEIRO C.C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 1707, (420)
- SIMPSON R.T., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L., Biochemistry, 1963, 2, 616, (161)
- SMITHIES O., Nature, 1957, 180, 1482, (352, 353, 360)
- SMITHIES O., Nature, 1958, 181, 1203, (368)
- SMITHIES O. et CONNELL G.E., in G.E.W. WOLSTENHOLME C.M. O'CONNOR (Ed.)
Biochemistry of human genetics, Little, Brown and Company, Boston,
1959, p. 185; (346)
- SMITHIES O. et HICKMAN C.G., Genetics, 1958, 43, 374, (503)
- SMITHIES O. et HILLER O., Biochem. J., 1959, 72, 121, (354)
- SOCIN C., Z. Physiol. Chem., 1891, 15, 93, (19)
- SOKOLOVSKY M., SADEH T. et PATCHORNIK A., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1212
(822)
- ~~SORENSEN~~ M. et ~~SORENSEN~~ S.P.L., C.R. trav. lab. Carlsberg., 1939, 23, 55,
(586)
- SPIES, J.R. et CHAMBERS D.C., Analyt. Chem., 1948, 20, 30, (757)
- SPIK G., Dipl. Et. Sup., Lille, 1963, (676, 685, 692, 695, 711)
- SPIK G., Thèse Doct., Lille, 1968, (696)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 4282,
(826)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137,
(331, 343a, 827, 831)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 739, (678, 681,
705)

- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 382, (766)
- SQUIRE P.G., DELIN S. et PORATH J., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 409, (643)
- STARZENSTEIN S. et HARVALIK Z., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., 1933, 172, 75, (26)
- STARZENSTEIN E. et WEDEN H., Arch. exper. Path. Pharmacol., 1928, 134, 274, (111)
- STRATIL A., in Congrès des groupes sanguins des animaux Paris, 1966, 241, (511)
- SURGENOR D.M., KOEHLIN B.A. et STRONG L.E., J. Clin. Investig. , 1949, 28, 73, (37, 42, 103, 113, 124, 125, 127, 137, 199, 202, 264, 278, 294, 304, 629)
- SURGENOR D.M., STRONG L.E., TAYLOR H.L., GORDON R.S. et GIBSON D.M., J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 1223, (41)
- SUTTON H.E. et BOWMAN B.H., Proceedings of the second International Congress of human Genetics. Rome 1961. Edizioni dell'Instituto "Gregorio Mendel" Rome 1963, p. 712, (380)
- SUTTON H.E. et KARP G.W., Biochim. Biophys. Acta., 1965, 107, 153, (69, 75, 82, 385)
- SVENNERHOLM L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, 75, (699, 721)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154, (722, 724)
- TAKAHASHI K., J. Biochem., 1962, 52, 74, (805)
- TANAKA K., BERTOLI M. et PIGMAN W., Biochem. Biophys., Res. Commun., 1964, 16, 404, (821)
- TANFORD C., Résultats non publiés, cités dans AISEN P. et coll., J. Biol. Chem., 1957, 242, 2434, (251)
- THEORELL H. et AKESON A., Arkiv Kemi Mineral. Geol., 1943, 17 B, 1, (556)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36, (672, 798)
- TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 132, (528)
- TOMPSETT S.L., Biochem J., 1934, 28, 1536 ; 1940, 34, 959, (115)
- TRINDER P., J. Clin. Pathol., 1956, 9, 170, (625, 627)
- ULMER D.U. et VALLEE B.L., Biochemistry, 1963, 2, 1335, (169)

- VAHLQUIST B., *Acta pediatr.* 1941, 28, suppl. 5, 1, (27)
- VALLEE B.L. et ULMER D.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, 8, 331, (168)
- VAN ORDEN H.O. et CARPENTER F.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 399, (815)
- WANG A.C. et SUTTON H.E., *Science*, 1965, 149, 435, (381, 386)
- WANG A.C., SUTTON H.E. et RIGGS A., *Amer. J. Hum. Gen.*, 1966, 18, 454, (383)
- WANG A.C., SUTTON H.E. et SCOTT I.D., *Science*, 1967, 156, 936, (382)
- WARBURG O. et KREBS H.A., *Biochem. Z.*, 1927, 190, 143, (21)
- WARNER R.C., *Trans. New-York Acad. Sci.*, 1954, 16, 182, (187)
- WARNER R.C. et WEBER I., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, 75, 5094, (145, 151, 156, 178, 182, 197, 667, 669)
- WATKINS D.K. et BUTLER E.B., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 13, 449, (623)
- WATKINS J., TEE D.E.H., WANG M. et TARLOW O., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 127, 66, (477)
- WERNER I. et ODIN L., *Acta Soc. Med. Upsalienois*, 1952, 57, 230, (689, 691)
- WILLIAMS J., *Biochem. J.*, 1962, 83, 346, (482)
- WILLIAMS J., *Biochem. J.*, 1962, 83, 355, (483)
- WILLIAMS J., in "Protides of the Biological Fluids", 14^e Colloque de Bruges, 1966, Elsevier éd., 1967, 55, (484)
- WINDLE J.J., WIERSEMA A.K., CLARK J.R. et FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1963, 2, 1341, (48, 170, 173, 174, 184, 551, 631)
- WINZLER R.J., *Meth. Biochem. Anal.*, 1955, 2, 290, (679, 680)
- WISHNIA A., WEBER I. et WARNER R.C., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1961, 83, 2071, (157)
- WOODWORTH R.C., *Abstr. 136 th Meeting Am. Chem. Soc.*, 1959, (183)
- WOODWORTH R.C., *Protides of the Biological Fluides 14e Colloque de Bruges 1966 Elsevier (Ed.) 1967*, 37, (179, 189)
- WOODWORTH R.C. et SCHADE A.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 47, 403, (397)
- YAMASHINA I., *Acta Chem Scand.*, 1956, 10, 1666, (698)



YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem., 1962, 51, 359, (790, 795)

YOSHIKAWA H., HAHN P. et BALE W., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1942, 49,
285, (28)

ZAK B. et EPSTEIN E., Technicon International Symposium New-York, 1964, 56,
(626)

ZWEIG G. et BLOCK R.J., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 51, 200, (559)