

50376

1968

30

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRES PRESENTES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR INGENIEUR

par

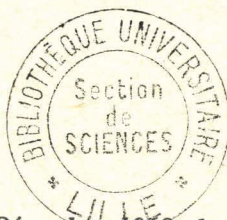
Madeleine MOCZAR

PREMIER MEMOIRE

GLYCOPROTEIDES DE LA TRAME FIBREUSE DE LA PAROI ARTERIELLE.

DEUXIEME MEMOIRE

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES OSES ET LEURS DERIVES.



Présentés le 18 Décembre 1968 devant la Commission d'examen.

MM. J. MONTREUIL, Président

P. BOULANGER,

C. LOUCHEUX

} Examineurs

L. ROBERT, Membre invité.

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
DEHEUVELS, DEHORME, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE de FERIET,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT
PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN,
ZAMANSKY.

PROFESSEURS

Nom - Prénom	Département	Laboratoire	Observations
BACCHUS Pierre	Mathématiques Appliquées	Astronomie et calcul numérique	Chef de département
BEAUFILS Jean Pierre	Chimie	Catalyse	
BONNEMAN Pierre	Chimie	Chimie Analytique Industrielle	
BECART Maurice	Physique	Spectroscopie moléculaire	I. U. T.
BLOCH Vincent	Biologie et Physiologie Animale	Psychophysiologie	Chef de Département
BONTE Antoine	Sciences de la Terre	Géologie Appliquée	Chef de Département
BOUGHON Pierre	Mathématiques Pures	Mathématiques	
BOUSSET Simon	Biologie et Physiologie Animale	Physiologie Générale	
BOURIQUET Robert	Biologie Végétale	Physiologie Végétale	Chef de Département
CELET Paul	Sciences de la Terre	Géologie Dynamique	
CONSTANT Eugène	Electronique, Electrotechnique et Automatique	Hyperfréquences et semi-conducteurs	
CORSIN Pierre	Sciences de la Terre	Palynologie Paléontologie Végétale	Directeur de l'Institut de la Houille
DUCUYPER Marcel	Mathématiques Pures	Mathématiques	Directeur de l'I. P. E. S.
DEDECKER Paul	Mathématiques Pures	Mathématiques	Professeur Associé
DERCOURT J. M.	Sciences de la Terre		
DEFRETIN René	Biologie et Physiologie Animales	Biologie Marine	Doyen Directeur de l'Institut de Biologie Maritime de WIMEREUX
DEHORS Roger	Electronique, Electrotechnique et Automatique	Automatique et Calcul Analogique	Directeur de l'Institut d'Automatique
DELATTRE Charles	Sciences de la Terre	Géologie Régionale	
DELEAU Paul	Sciences de la Terre	Sédimentologie	
DELHAYE Michel	Chimie	Spectroscopie Raman	
DESCOMBES Roger	Mathématiques Pures	Mathématiques	
DURCHON Maurice	Biologie et Physiologie Animales	Endocrinologie des Invertébrés	Directeur du Laboratoire régional de Zoologie Appliquée
FOURET René	Physique	Physique des Solides, Rayons X	Chef de Département
GABILLARD Robert	Electronique, Electrotechnique et Automatique	Géopropagation et Résonances Magnétiques	Chef de Département - Directeur de l'Institut de Radiotechnique
GLACIER Charles	Chimie	Chimie Organique I	
GONTIER Gérard	Mathématiques Appliquées	Mécanique des Fluides	
HEIM de BALSAC Henri	Biologie et Physiologie Animales	Ecologie des Vertébrés	
HEUBEL Joseph	Chimie	Chimie Minérales I	1er Assesseur
HOCQUETTE Maurice	Biologie Végétale	Botanique	Directeur de l'Institut Régional d'essais de semences et de recherches agricoles.
LEBRUN André	Electronique, Electrotechnique et Automatique	Spectrométrie des liquides et mesures automatiques	2eme Assesseur
Mlle LENOBLE Jacqueline	Physique	Optique Atmosphérique	
LIEBAERT Robert	Electronique, Electrotechnique et Automatique	Spectrométrie des solides et Mesures Automatique	I. U. T.
LINDER Robert	Biologie Végétale	Génie Electrique	
LUCQUIN Michel	Chimie	Cytogénétique Chimie de la Combustion.	Chef de département
MARTINOT-LAGARDE André	Mathématiques appliquées	Mécanique des Fluides	Directeur Institut de Mécanique des Fluides
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques Pures	Mathématiques	
MONTARIOL Frédéric	Chimie	Métallurgie	
MONTREUIL Jean	Chimie	Physico-Chimie Biologie	
MORIAMÉZ Michel	Physique	Physique des Ultra-sons	Directeur C. S. U. Valenciennes
MOUVIER Gérard	Chimie		Directeur C. S. U. Saint-Quentin
PARREAU Michel	Mathématiques Pures	Mathématiques	Chef de Département
PEREZ Jean-Pierre	Physique	Mécanique des Cristaux	
PHAM MAU QUAN	Mathématiques Pures	Mathématiques	
POUZET Pierre	Mathématiques Appliquées	Calcul Numérique	
PROUVOST Jean	Sciences de la Terre	Minéralogie	
SAVARD Jean	Chimie	Catalyse	
SCHLITZ René	Physique	Spectroscopie Générale	
SCHALLER François	Biologie et Physiologie Animales	Entomologie	
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques Pures	Mathématiques	

Je témoigne ma profonde reconnaissance à Monsieur Jean MONTEUIL

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences
de Lille

Qui a attentivement suivi nos travaux en nous
faisant profiter de sa très grande compétence en
chimie des glycoprotéines.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur P. BOULANGER,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Lille,

Qui a bien voulu me faire l'honneur de
participer au Jury de ma thèse.

Je remercie vivement Monsieur C. LOUCHEUX,

Maître de Conférences de Chimie Macromoléculaire à la
Faculté des Sciences de Lille,

d'avoir accepté de juger mon travail.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique. (Action concertées ; Convention 6600441) auquel nous adressons nos vifs remerciements.

Nous ne saurions commencer cet exposé sans remercier :

Monsieur Ladislas ROBERT,

Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique, responsable de l'équipe de recherche du Laboratoire de Biochimie du Tissu Conjonctif,

Qui m'accueillit dans son laboratoire, m'a fait bénéficier de son aide constante et de son soutien amical.

Monsieur le Professeur Agrégé Y. GROSGOGÉAT, et le Docteur REVERDY

Au Laboratoire de Microscopie Electronique à l'hôpital Boucicaut (Paris), les clichés histologiques et la microscopie électronique de l'aorte.

Monsieur P. COMTE

Directeur du Département des Macromolécules au Centre
Technique de Cuir à Lyon.

Sa précieuse collaboration dans l'interprétation
de la composition en acides aminés de nos préparations

Nous tenons à remercier également les membres
du Laboratoire de Biochimie du Tissu Conjonctif.

Monsieur E. MOCZAR.

Qui nous a fait bénéficier de ses conseils.

Madame B. ROBERT

Messieurs G. SCHILLINGER et

H. ROBERT

et Mademoiselle CHAVAROT.

Qui nous ont aidée au sein d'une équipe amicale.

Le plan adopté est le suivant :

I - <u>INTRODUCTION</u>	
II - <u>GENERALITES</u>	7
2.1. Morphologie et fonction des unités anatomiques de la paroi artérielle.	7
2.1.1. L'adventice	7
a. Morphologie	7
b. Fonctions physiologiques	7
2.1.2. La média	8
a. Morphologie	8
b. Fonctions physiologiques	8
2.1.3. L'intima	9
a. Morphologie	9
b. Fonctions physiologiques	9
2.2. Composition chimique de la paroi artérielle	9
2.3. Caractères chimiques et physico-chimiques des composants macromoléculaires de la paroi arté- rielle	10
2.3.1. Le collagène	11
2.3.2. L'élastine	11
2.3.3. Les mucopolysaccharides acides	12
Conclusions	15
3 - <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	17

3.1. EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DE LA PAROI ARTERIELLE
--

Principe	17
Matériel	20
Méthodes	21

A - <u>Techniques de l'extraction</u>	21
1 - Découpage de l'aorte	21
2 - Isolement des GPS. brute	21
3 - Fractionnement des glycoprotéines de structure de l'aorte	22
4 - Etude de l'extraction par l'acide trichloracétique	22
a - Hydrolyse acide du glycopeptide de fibrinogène	23
b - Hydrolyse par l'acide trichloracétique à 2,7 % du glycopeptide natif et désialidé	23
B - <u>Techniques d'analyse</u>	23
1 - Dosages colorimétriques	23
2 - Analyse quantitative des acides aminés	23
3 - Electrophorèse	23
a - Sur acétate de cellulose	23
b - sur papier à 5.000 V.	24
4 - Chromatographie sur couche mince	24
a - Identification des oses	24
b - Identification des acides aminés	24
c - Identification du groupement phosphate	25
C - <u>Dinitrophénylation</u>	25
D - <u>Ultra-centrifugation</u>	25
Résultats	25
Discussion	34
Conclusions	36

3.2. METHODES ANALYTIQUES MISES AU POINT POUR L'ETUDE DE LA FRACTION OSIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES.
--

**3.2.1. MICRODETERMINATION DES OSES NEUTRES ET OSAMINES PAR
CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE D'UN POLYMERE SYNTHETIQUE**

Principe	38
Matériel	39
Méthodes	40
A. Hydrolyse	40
B. Chromatographie sur couche mince	40
C. Procédés de révélation	40
D. Dosage densitométrique	41
Résultats	42
Conclusions	42

**3.2.2. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES HYDROLYSATS
PARTIELS DES OLIGOSIDES.**

Principe	44
Matériel	44
Méthodes	45
A - Préparation des glycoprotéines, glycopeptides et osides	45
B - Hydrolyse des glycopeptides	45
C - Chromatographie sur couche mince	45
Résultats et conclusions	46

**3.3. ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DES GLYCOPROTEINES DE
STRUCTURE DE L'AORTE.**

Introduction	48
Matériel	49
Méthodes	50

<u>A - Hydrolyse protéasique des glycoprotéines de structure</u>	
1 - Hydrolyse simple	50
2 - Hydrolyse successive par la pronase	50
<u>B - Isolement des glycopeptides</u>	50
<u>C - Séparation des glycopeptides</u>	50
1 - Electrophorèse	50
2 - Chromatographie sur CM Cellulose	51
3 - Chromatographie sur DEAE Cellulose	51
4 - Dinitrophénylation des glycopeptides bruts	51
<u>D - Recherche de la fonction C-terminale</u>	52
<u>E - Recherche de la fonction N-terminale</u>	52
<u>F - Hydrolyse acide des osides</u>	53
<u>G - Techniques d'analyse</u>	53
1 - Dosages colorimétriques	53
2 - Méthodes chromatographiques sur couche mince	54
a - Identification des acides aminés	54
b - Détermination du rapport molaire des oses et osamines	
c - Estimation du poids moléculaire	55
<u>Résultats</u>	58
<u>A - Hydrolyse protéasique des glycoprotéines</u>	58
<u>B - Comportement électrophorétique et chromatographique</u>	60
1 - Electrophorèse	60
2 - Chromatographie sur colonne de CM Cellulose	64
3 - Chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose	64
<u>C - Etude de la séparation des glycopeptides et des substances non glycopeptidiques par dinitrophénylation</u>	68
<u>D - Composition des glycopeptides</u>	68
<u>Discussion</u>	73
<u>Conclusions</u>	75

3.4. ETUDE SUR LE GROUPEMENT POLYOSIDIQUE

Introduction	77
Matériel	77
Méthodes	78
A - Oxydation périodique	78
B - Méthylation	79
C - Chromatographie bidimensionnelle des hydrolysats partiels des oligosides	80
D - Détermination du rapport molaire des oses	80
E - Etude sur la liaison polyoside-protéine	80
1 - Recherche d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine	80
a - Hydrolyse partielle de l'ovalbumine	80
b - Hydrolyse partielle des glycopeptides des gly- cuprotéines de structure de l'aorte de Porc et de Cheval	81
2 - Recherche d'une liaison O-glycosidique	81
a - Dinitrophénylation de la fonction N-terminale. Estérification et amidification de la fonction C-terminale	81
b - Hydrolyse par la soude	82
F - Techniques d'analyse	82
1 - Dosages colorimétriques	82
2 - Chromatographie des acides aminés	82
Résultats et discussions	82
A - Oxydation périodique	83
B - Méthylation	83
C - Hydrolyse partielle	83
Etude des oligosides	83
D - Rapport molaire des hexoses après l'hydrolyse totale et l'hydrolyse ménagée	84
E - Nature du point d'attache glycanne-protéine	85
1 - Recherche d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine	86
2 - Recherche d'une liaison O-glycosidique	87
Conclusions	89

I N T R O D U C T I O N

On a constaté que tous les tissus conjonctifs contiennent des glycoprotéides extractibles à l'urée 8M (ROBERT et al.) (1). Pour ces glycoprotéides constituants du stroma insoluble du tissu conjonctif, on a proposé la nomination de "glycoprotéine de structure" (ROBERT et DISCHE) (2).

Les glycoprotéines de structure, GPS. (*), sont antigéniques ; elles sont responsables des réactions spécifiques d'organes et d'espèces du tissu conjonctif comme l'opacification des hétéogreffes (ROBERT et al.) (3) de la cornée. Des réactions immunologiques analogues dans le cas des hétéogreffes de l'aorte ou des valvules cardiaques relèvent aussi en partie de l'antigénicité des GPS.

L'injection répétée de GPS de l'aorte dans l'adjuvant complet de Freund permet de déclencher chez le Lapin un processus athéromateux (ROBERT et al.) (4). Ces constatations justifient déjà l'étude détaillée de la structure de ces substances.

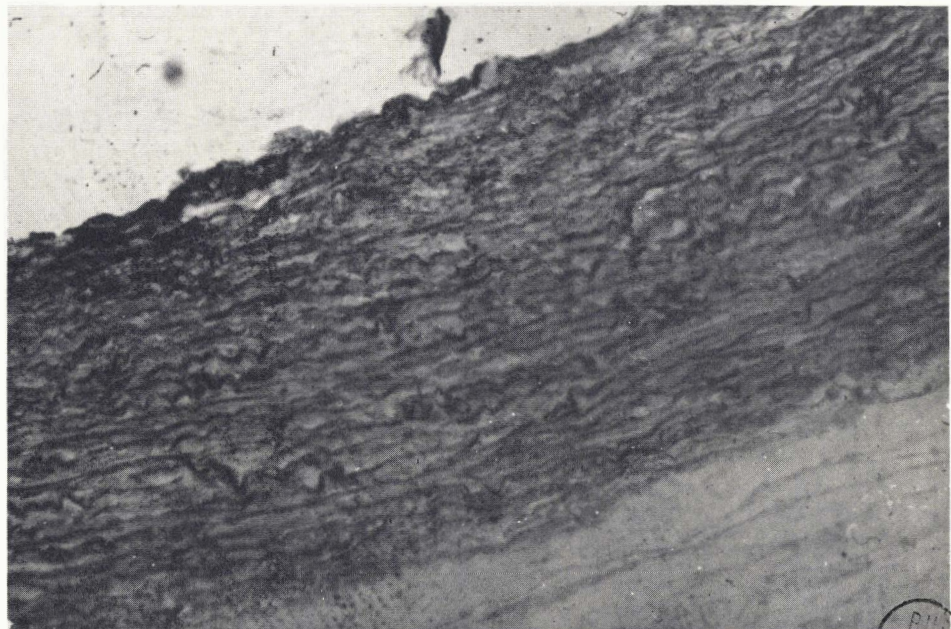
Nous avons abordé l'étude du fractionnement de l'extrait urée brut de l'aorte de différentes espèces, comme le Porc, le Mouton et le Cheval. La méthode que nous avons mise au point nous a permis d'obtenir deux fractions différentes de glycoprotéines de la trame fibreuse de la paroi artérielle, dont nous avons entrepris l'analyse.

Notre thèse comporte la description de cette méthode d'extraction et de fractionnement des GPS de la paroi artérielle, l'étude des propriétés physico-chimiques et chimiques des deux fractions principales purifiées, ainsi que l'étude de la copule glucidique de ces fractions.

(*) Nous désignons par cette abréviation les glycoprotéines liées à l'insoluble stroma du tissu conjonctif.



A



B

Figure 1 -

Coupe transversale de la média de l'aorte thoracique de Lapin. La coloration par l'orcéine fait apparaître les couches des fibres élastiques. Grossissement : A x 160, et B x 376. selon GROSGOGÉAT (*) (Microscopie optique).

2 - G E N E R A L I T E S

La paroi artérielle représente un type de tissu conjonctif hautement spécialisé en vue de la fonction qu'elle remplit dans l'organisme. La structure et la microarchitecture de la trame fibreuse sont conçues pour donner une élasticité et une résistance optimales à la paroi.

L'étude de l'évolution du vieillissement et la pathologie de l'athérosclérose ont mis au jour l'examen de la structure anatomique de la paroi artérielle en relation avec des fonctions physiologiques métaboliques majeures. Nous nous référons aux travaux spécialisés en ce domaine (LANSING) (5).

2.1. - MORPHOLOGIE ET FONCTION DES UNITES ANATOMIQUES DE LA PAROI ARTERIELLE.

Les constituants macroscopiques de l'aorte sont : l'adventice, la media et l'intima.

2.1.1. - L'ADVENTICE.

a - Morphologie

La couche de l'adventice couvre la surface extérieure de la paroi. Elle est fortement vascularisée et renferme le tissu conjonctif et les fibres du muscle lisse (WOERNER) (6). Le système de vascularisation (vaso vasorum) peut être démontré en coupe histologique par microscopie optique. WOERNER (7) décrit une coupe transversale de l'aorte thoracique du Chien dont les artérioles prenant le dichromate de potassium et l'acétate de plomb apparaissent au microscope comme des bandes noires.

b - Fonctions physiologiques

L'adventice, grâce à sa vascularisation, joue un rôle important dans la nutrition de la paroi (KIRK et LAURSEN) (8) (9). L'activité respiratoire de l'adventice



Figure 2 -

La crosse aortique de Lapin (E) endothélium (C) cellules intinales (CML) cellules musculaires lisses de la média (LE) lame élastique. Microscopie électronique x 13.000. Selon GROSGOGÉAT et LENEGRE (11).

est relativement faible comparativement aux autres types du tissu car elle est pauvre en cellules et le tissu conjonctif présent contribue peu à ce type de métabolisme. Par contre le taux de glycolyse anaérobie est élevé.

2.1.2. - LA MEDIA

a - Morphologie

La média représente l'unité la plus importante et la plus complexe de l'aorte. WOERNER (10) démontre qu'elle est peu vascularisée. La média se compose de plusieurs couches de fibres élastiques (une vingtaine environ) qui mesurent en moyenne $2,5 \mu$ d'épaisseur. Disposées de manière régulière et parallèle, elles sont toujours continues sur un long trajet. Elles forment le squelette aortique * (Voir figure 1 P.7 bis) Entre elles on trouve une substance fondamentale peu abondante, faiblement colorée par le Bleu Alcian, des fibres collagènes jouxtant les fibres élastiques, des cellules musculaires et conjonctives. Ces faits sont nettement mis en évidence par l'étude des coupes semi-fines. Comme l'indique la microscopie électronique sur la figure 2 (p.8bis) selon GROSGOGÉAT et LENEGRÉ (11), les fibres collagènes courent dans tous les sens entre les fibres élastiques. Elles sont donc transversales, obliques ou parallèles à celles-ci. Les cellules conjonctives ou musculaires, accolées les unes aux autres ou séparées par de la substance fondamentale et des fibrilles collagènes s'adaptent aux interstices ménagés entre la trame élastique (BOUISSOU, SENDRAIL-PESQUE et CASTAGNOL) (12). La média a une teneur élevée en tissu conjonctif (ROBERT et al.) (13). Les cellules du muscle lisse assurent la contractibilité de l'aorte. Les cellules conjonctives (fibroblastes) produisent les substances extra-cellulaires du tissu conjonctif comme les éléments fibreux et la substance fondamentale (LANSING) (14).

Le nombre des cellules du muscle lisse présent est fonction de la localisation anatomique. Selon LEHNINGER (15), leur nombre diminue avec l'éloignement du coeur.

b - Fonctions physiologiques

L'élasticité de la paroi est due à l'organisation de la média aortique en compartiments liés par les membranes élastiques. Plusieurs auteurs (BENNINGHOF) (16) BURTON (17) font intervenir cette structure physique dans le maintien de

* Y.C. GROSGOGÉAT. Laboratoire de Microscopie Electronique. Hôpital Boucicaut. Paris.

l'élasticité de la paroi. Cette élasticité permettra la conservation temporaire du sang éjecté dans les compartiments extensibles de la paroi (MOMMAERTS) (18) régularisant ainsi la circulation sanguine.

Le transport des éléments nutritifs, de l'oxygène et des métabolites tels que CO₂ est effectué dans la média par une diffusion due à son caractère relativement acellulaire et avascularisé.

2.1.3. - L'INTIMA.

a - Morphologie

La surface de système cardiovasculaire en contact avec le sang circulant est couverte d'une couche unicellulaire de l'endothélium. Les cellules sont plates, polygonales ou rhombiques. La microscopie optique permet de déceler son caractère avascularisé selon WOERNER (19). Au microscope électronique l'endothélium apparaît comme une couche de cellules aux noyaux régulièrement espacés (PALADE) (20). La membrane basale de l'épithélium présente une couche fine située immédiatement sous les cellules basales de l'épithélium. Sa découverte est récente. MOORE et RUSKA (21) la signalent chez les vaisseaux capillaires. Au microscope électronique selon PAPPAS (voir LANSING 22), c'est une bande filamenteuse.

b - Fonctions physiologiques

Le rôle de l'endothélium paraît être la formation d'une surface lisse et hydrophobe, destinée à faciliter la circulation du sang. D'autre part, il représente un lieu d'échange sous la forme d'une membrane semi-perméable entre le sang et le tissu de la paroi. L'endothélium a des propriétés mécaniques certaines. Il présente une résistance vis-à-vis de la distorsion exercée par les forces physiques (ZWEIFACH) (23). La cellule endothéliale montre des signes d'activité métabolique. Les informations sur ce sujet sont relativement fragmentaires. KABAT et FURTH (24) ont démontré un taux élevé d'activité phosphatasique. Les travaux de KIRK, EFFERSØE et CHIANG (25) ont mis en évidence la glycolyse et la respiration par le cycle de KREBS dans l'aorte du Chien.

2.2. - COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PAROI ARTERIELLE

La méthode histochimique a le grand avantage de montrer la localisation exacte des substances dans les tissus. Mais elle ne permet pas leur identification avec une précision comparable à celle de la biochimie. Des réactions colorées

"signalétiques" révèlent la présence des substances contenant les sucres aminés dans le tissu conjonctif. Les colorations utilisées couramment pour caractériser les mucopolysaccharides acides sont la métachromasie au Bleu de toluidine et le Bleu Alcyan (SCOTT) (26). La réaction à l'acide périodique fuchsine de Schiff (P.A.S.) n'est pas spécifique vis-à-vis des mucopolysaccharides acides. Elle est essentiellement donnée par les sialoglycoprotéines. (MONTREUIL et BISERTE) (27) ; (PAQUIN et PERCHERON) (28).

Les résultats de l'histochimie et de la microscopie, associés aux méthodes d'extraction chimique, démontrent que la média de l'aorte est un tissu conjonctif dense, relativement pauvre en cellules, constitué principalement de collagène (GROSS, HIGHBERGER et SCHMITT) (29), d'élastine (LANSING, ROSENTHAL et ALEX) (30) ; (LANSING et coll.) (31), (GRANT) (32), des mucopolysaccharides acides (BUDDECKE) (33), (BERENSON) (34), (MEYER, DAVIDSON, LINKER et HOFFMANN) (35), des protéines solubles (ROBERT et coll.) (36) et des glycoprotéines solubles (BAHRENS) (37) et insolubles (MOCZAR, MOCZAR et ROBERT) (38). Les autres protéines présentes sont celles du plasma imprégnant l'aorte.

L'aorte thoracique humaine se singularise par sa faible teneur en protéines solubles (7 %), par sa richesse en élastine et par sa teneur en glycoprotéines insolubles (ROBERT et coll.) (39).

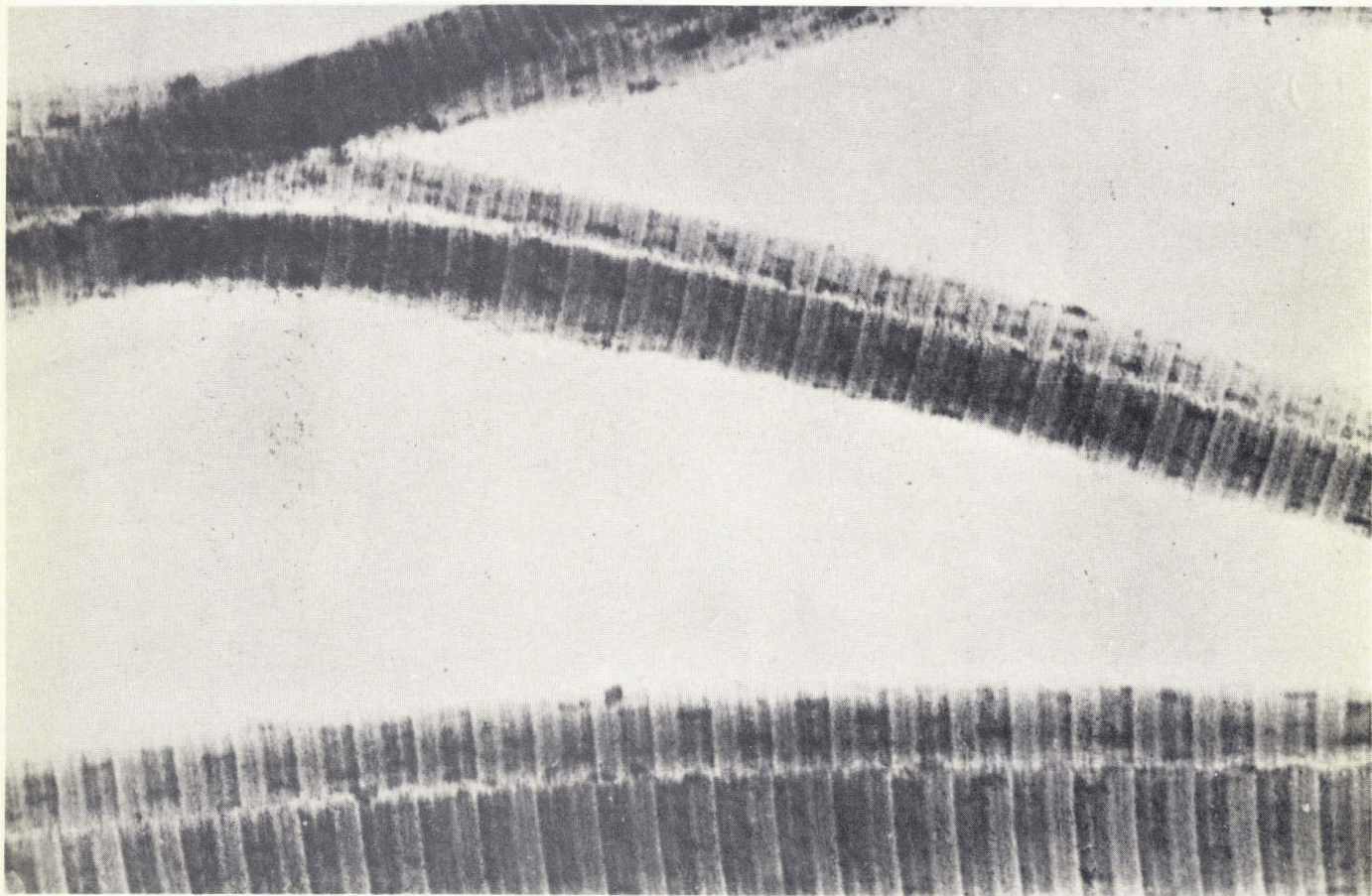
La composition subcellulaire de l'intima a été examinée par PORTMANN, ALEXANDER et MARUFFO (40). Ils décrivent la présence des phospholipides dans les fractions microsomales légères.

Selon MEYER et coll. (41), les MPA. représentent 1 % du poids sec total de l'aorte. Les mêmes auteurs ont démontré que 75 % des MPA sont formés par la chondroïtine sulfate A. Le mélange résiduel est composé de chondroïtine sulfate B et d'héparitine sulfate.

Les valeurs de distribution du collagène et de l'élastine selon GRANT (42) sont résumées sur le tableau I (p. 15).

2.3. - CARACTERES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSANTS MACRO-MOLECULAIRES DE LA PAROI ARTERIELLE.

Nous ne considérons ici que les constituants macromoléculaires de la paroi, plus précisément de la média : le collagène, l'élastine et les mucopolysaccharides acides. Les glycoprotéines de structure forment le sujet de cette thèse et ils seront traités au chapitre TRAVAUX PERSONNELS.



BUS
LILLE

Figure 3 -

Microscopie électronique des fibrilles du collagène selon CHAPMAN et STEVEN. Le Collagène a été préparée par l'action de α - amylase selon NISHIHARA (45). (Coupe colorée par nitrate de plomb à pH 5. Périodicité 590 A°.

2.3.1. - COLLAGÈNE

Le collagène est le constituant essentiel des fibrilles à striation périodique, que l'on voit au microscope électronique (GROSS) (43). Sur la figure 3 (p.11bis) CHAPMAN et STEVEN (44) représente l'image en microscopie électronique des fibrilles du collagène préparées par l'action de α -amylase selon NISHIHARA (45) à partir du tendon de Rat.

Les propriétés physico-chimiques du collagène ont été beaucoup étudiées et les caractéristiques de sa molécule déterminées par les mesures de viscosité, de diffusion de la lumière, de sédimentation et de biréfringence d'écoulement. Ces études ont porté pour la plupart sur le collagène acido-soluble de la peau ou du tendon. Elles indiquent que la molécule du collagène a un poids moléculaire de 380.000. C'est un bâtonnet de 3.000 Å de longueur sur 15 Å de diamètre, formé de 3 chaînes polypeptidiques enroulées en hélice autour d'un même axe et unies entre elles par des liaisons intercaténares. Les molécules se groupent pour former les fibrilles. Dans la fibrille, les molécules sont fixées les unes aux autres parallèlement avec un décalage constant qui entraîne une répartition de structures identiques selon une périodicité variable (640 Å, 2.600 Å, 2.800 Å) dans les fibres natives responsables de la striation visible au microscope électronique (CARASSO, FAVARD, OBERLIN) (46). (Voir fig. 4 p.12bis selon GRASSMAN) (47).

La composition chimique en acides aminés du collagène est caractérisée par une teneur de 14 % en hydroxyproline, par sa richesse en glycine, l'absence de tryptophane, la pauvreté en acides aminés soufrés (moins de 1 %), la présence de l'hydroxylysine. L'hydroxyproline n'existe pratiquement que dans le collagène et son dosage dans un extrait du tissu permet donc le dosage du collagène (BOWES, ELLIOTT et MOSS) (49), (GRASSMANN et coll.) (50).

2.3.2. - ELASTINE

L'élastine est le composant le plus important des vaisseaux sanguins. Elle représente 42 % du poids sec de la média (LANSING, ROSENTHAL et ALEX) (51). L'élastine est un élément structural inerte, résistant vis-à-vis de la plupart des enzymes, ainsi que des acides et alcalis dilués. Les informations concernant l'origine des fibres élastiques sont précaires ; ces fibres sont probablement

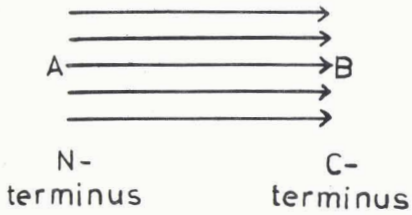
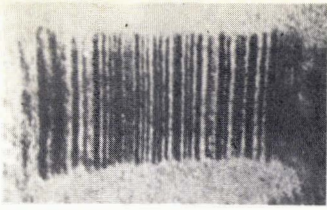


Fig. 1

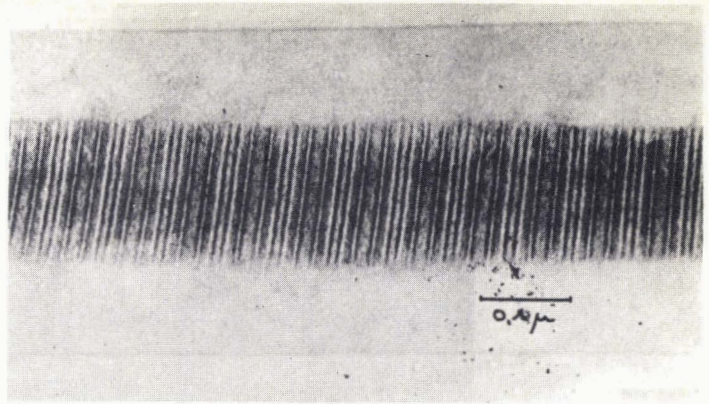


Fig. 2

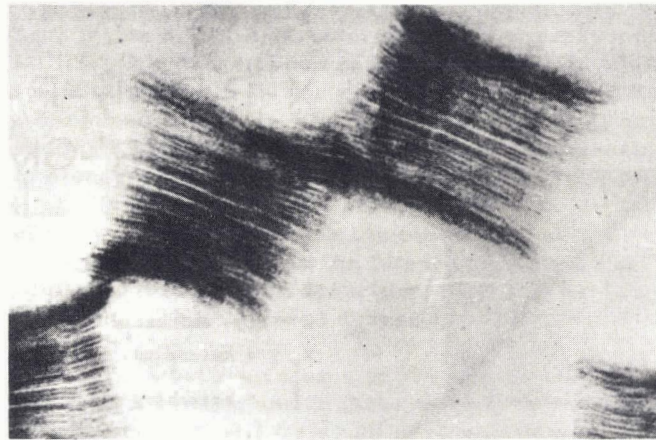


Fig. 3

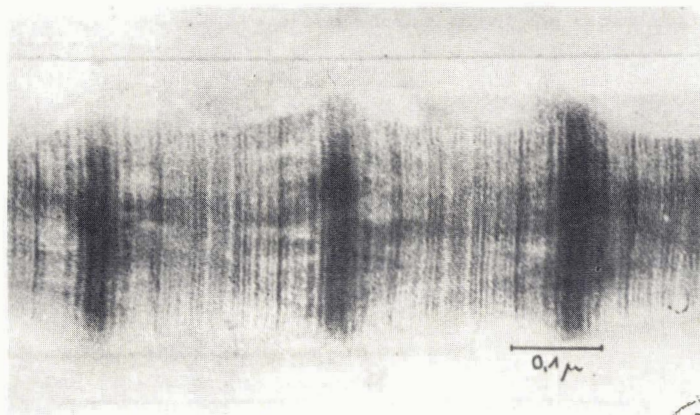


Fig. 4



Figure 4 -

- Electromicroscopie des fibrilles du collagène selon GRASSMANN (48). Visualisation par l'acide phosphotungstique et l'acétate d'uranyle.
- 1 - Segment du collagène à une striation aperiodique. Périodicité 2.800 A°.
 - 2 - Fibrille du collagène à partir du collagène purifié. Striation périodique. Périodicité 650 A°
 - 3 - Striation périodique à 2.600 A°.
 - 4 - Striation périodique à 2.800 A° de "long-spacing fibril".

élaborées par les fibroblastes.* L'élastine est constituée par des bandes superposées en lamelles qui offrent une certaine cohésion. Dans les artères jeunes, les lamelles peuvent avoir le rôle d'une barrière imperméable aux échanges entre la média et l'intima (LANSING) (53).

L'élastine reste insoluble dans l'eau même à température élevée et sous pression. On peut la solubiliser par l'acide oxalique 0,25 N. ou par la soude 0,1 N. à 98° C. La reconstitution des fibres d'élastine à partir des élastolysats n'est pas réussie, à la différence du collagène.

La composition en acides aminés de l'élastine est caractérisée par l'absence ou la faible teneur en hydroxyproline (2 %) et par la présence de la desmosine et de l'isodesmosine. Ces deux acides aminés rares ont été isolés par PARTRIDGE, ELSDEN et THOMAS (54) et LEDVINA et BARTOS (55) et sont représentés sur la Figure 6 (p.13).

Ces deux acides aminés selon PARTRIDGE (56) sont responsables pour le pontage dans la molécule d'élastine. (Figure 5 B. p. 13 bis). L'élastine se compose de 18 acides aminés. Elle possède les caractéristiques de composition suivantes :

- une richesse particulière (80 %) en acides aminés non polaires (glycine, alanine, valine),
- une teneur faible en acides dicarboxyliques (acide aspartique, acide glutamique),
- l'absence de cystine (DELAYNAY et BAZIN) (59), (LANSING) (60).

2.3.3. - LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

La dénomination "mucopolysaccharides acides" (MPA) (*) est appliquée aux macromolécules isolées du tissu conjonctif après traitement par alcali ou par les enzymes protéolytiques. Les substances ainsi obtenues sont des produits de dégradation et contiennent encore certains résidus d'acides-amino par lesquels ils étaient liés aux protéines (MEYER) (61). (SHATTON et SCHUBERT) (62). Des procédés d'extraction douce fournissent des mucoprotéines sans séparer leurs

* La figure 5 A (p.13 bis) représente les filaments de fibre d'élastine en microscopie électronique. (A. SERAFINI-FRACASSINI et G.R. TRISTRAM) (52).

* Abréviation : mucopolysaccharide acide = MPA.

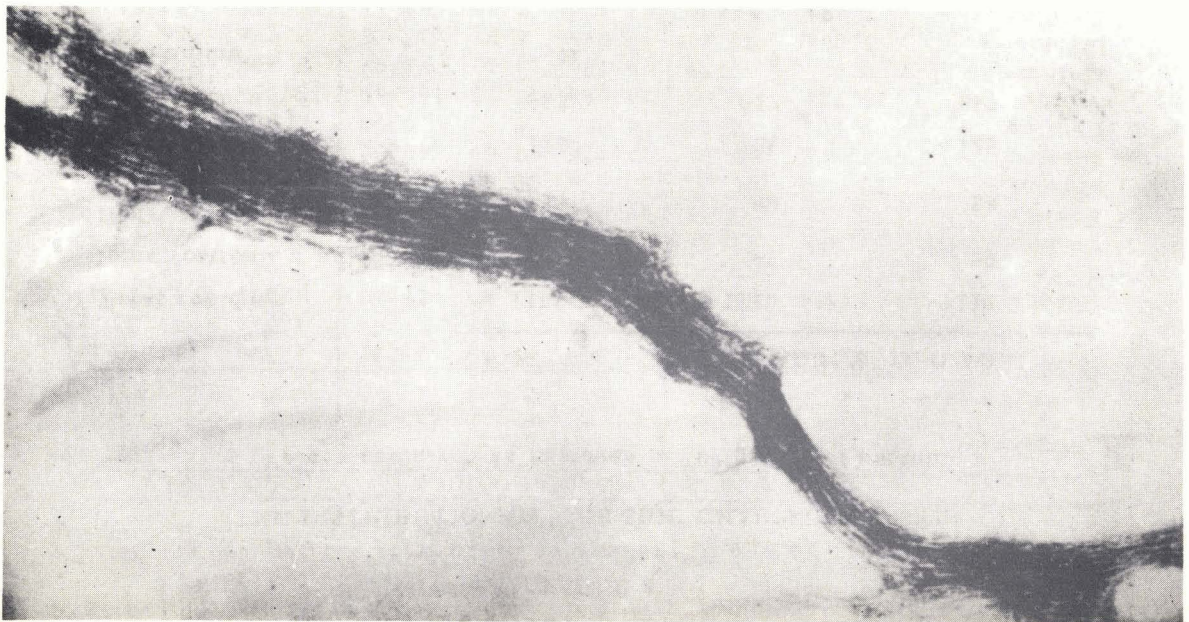
A - Microscopie électronique des filaments des fibres élastiques selon SERAFINI-FRACASSINI et TRISTRAM (53) après traitement préalable des fibres par ultrason. Réactif de révélation : l'acide phosphotungstique à 1,25 % à pH 5. Grossissement x 154.500.
B - Lamelle d'élastine au microscope optique selon PARTIDGE (57)

Figure 5 -

BUS
LILLE



B



A

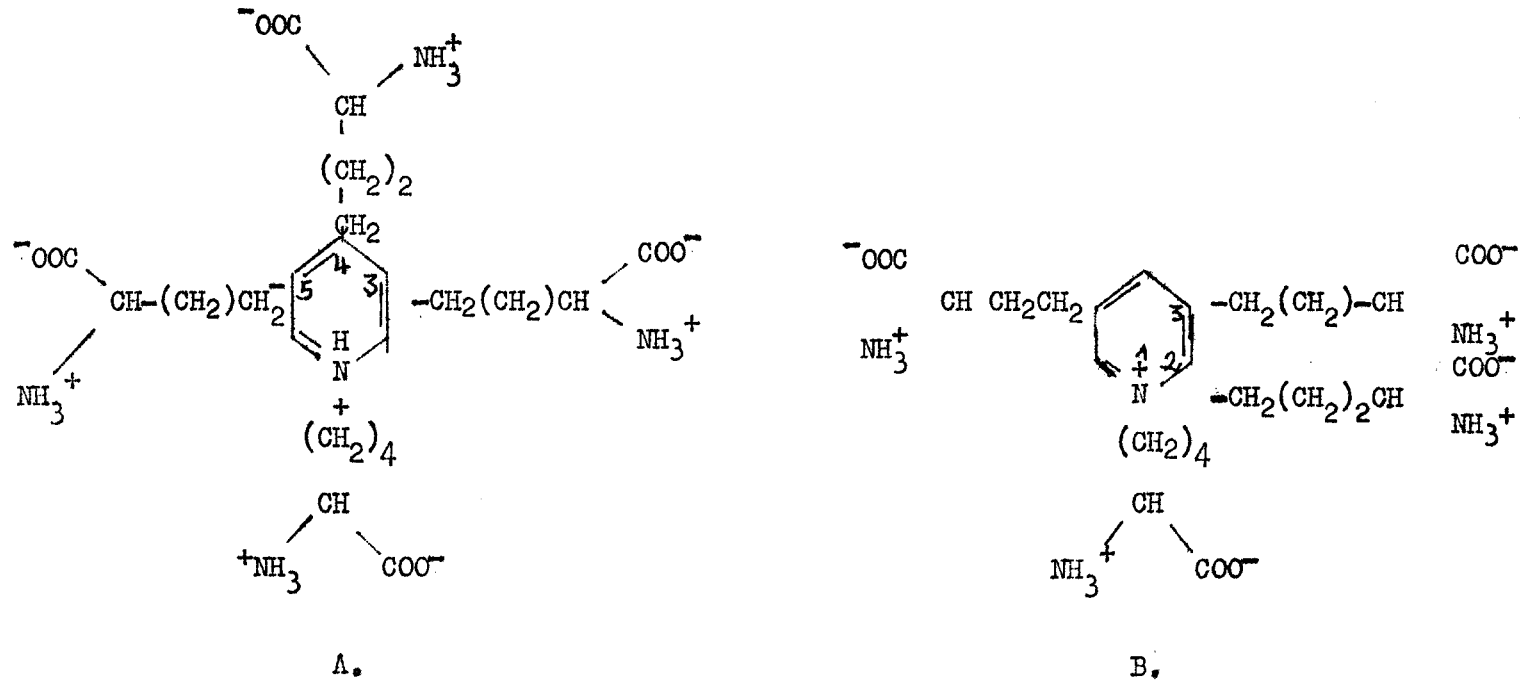


Figure 6

A. DESMOSINE - B. ISODESMOSINE
Selon PARTRIDE (57) et LEDVINA et BARTOS (58).



constituants. Ces complexes mucopolysaccharides-protéines ont des poids moléculaires très élevés (1×10^6) (MATHEWS) (63), (SHATTON et SCHUBERT) (64).

La propriété commune des mucopolysaccharides du tissu conjonctif est leur caractère polyionique. La dernière détermine leurs interactions in vivo et in vitro (MATHEWS) (65). D'autre part, leur polymorphisme et leur microhétérogénéité les distinguent nettement des protéines dont le nombre des variations semble être limité. La plupart des fractions des MPA étudiées apparaît être des mélanges des isomères ou des molécules hybrides (taux de sulfatation, position du groupement sulfate, etc...).

Les MPA renferment les unités alternatives d'un acide uronique et d'une N-acétylhexosamine. Dans la macromolécule de kératosulfate, l'acide uronique est remplacé par le galactose (MEYER) (66).

LINDAHL et RODEN (67); LINDAHL (68), LINDAHL, CIFONELLI, LINDAHL et RODEN (69) MUIR (70) et KAPLAN (71) ont caractérisé la nature de la liaison glycanne-protéine dans l'héparine. La liaison et du type O-glycosidique, elle est formée entre un groupement hydroxyl de la sérine et un groupement de xylose. La xylosylsérine est liée au galactose sous la forme (4 - O - β - D - galactopyranosyl) - O - β - D - xylapyranosyl-La sérine. Dans le protide des acides chondroitines sulfuriques la liaison est également du type O-glycosidique : la présence de O-glycosylsérine a été mise en évidence par ANDERSON, HOFFMAN et MEYER (72), CASTELLANI, ZONTA et de LUCA (73) RODEN (74) (75), RODEN, GREGORY et LAURENT (76).

L'existence d'une liaison O-glycosidique de la sérine et de la thréonine dans les acides chondroitines sulfuriques a été démontré par SENO, MEYER, ANDERSON et HOFFMAN (77), MEYER, SENO, ANDERSON, LIPPMAN et HOFFMAN (78) et ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER (79). La liaison formée entre un groupement hydroxyl de la sérine et un groupement de xylose est décrite par LINDAHL et RODEN (80) RODEN et ARMAND, (81) KATSURA et DAVIDSON (82) MARLER et DAVIDSON (83). Une liaison O-séryl et O-thréonyl-N-acétyl galactosaminidique a été caractérisé par BRAY, LIEBERMAN et MEYER (84).

La composition des MPA est résumée sur le Tableau 2 (p. 16). Les chondroitines sulfate A, B et C. ont des structures similaires. La différence entre les chondroitines sulfate A et C et la position du groupement sulfate : en position 4 sur la N-acétylgalactosamine dans le A et en position 6 pour le chondroitine

sulfate C. Le chondroïtine sulfate B se singularise par sa teneur en acide L-iduronique (BERENSON) (85).

L'héparine possède les fonctions aminées sulfatées. L'héparitine sulfate renferme les mêmes unités que l'héparine et a des fonctions amine sulfurylées et acétylées (MEYER) (86).

Chaque type de tissu conjonctif possède un "spectre" caractéristique des MPA. (BUDDECKE) (87).

TABEAU 1

Teneur en collagène et en élastine de l'aorte humaine, de l'aorte de Porc et de Mouton selon GRANT (88).

Résultats exprimés en % du tissu sec délipidé.

AORTE THORACIQUE	COLLAGENE %	ELASTINE %
HOMME	25	35
PORC	15	52
MOUTON	42	15

En raison de son volume d'hydratation élevé, l'acide hyaluronique pourrait avoir le rôle d'un réservoir d'eau extra-cellulaire (BALAZS) (89). L'interaction des chondroïtine sulfates et des fibres du collagène entraîne la formation des "ponts interfibrillaires". MATHEWS (90) (91) et BUDDECKE (92) concluent de ce fait à la résistance élastique de l'aorte.

CONCLUSIONS

De nombreuses études portent déjà sur le collagène, les mucopolysaccharides et l'élastine de l'aorte. Malgré l'importance des travaux concernant les altérations pathologiques de l'aorte, les informations sur les constituants macromoléculaires liés au "stroma" insoluble de l'aorte sont fragmentaires. L'étude de la structure fine, de la fonction et du caractère métabolique des unités anatomiques de l'aorte en relation avec la genèse de la liaison athéromateuse a suscité beaucoup d'intérêt.

TABEAU 2

Constitution des mucopolysaccharides acides (x.)

	Hexosamine	Sucre monosaccharide	Groupes "N-acétyl"	Groupes "O-sulfuryl"	Groupes "N-sulfuryl"
Acide hyaluronique	Glucosamine	Acide glucuronique	+	-	-
Chondroïtine sulfate A.	Galactosamine	Acide glucuronique	+	+	-
Chondroïtine sulfate B.	Galactosamine	Acide iduronique	+	+	-
Chondroïtine sulfate C.	Galactosamine,	Acide glucuronique	+	+	-
Héparine	Glucosamine	Acide glucuronique	-	+	+
Héparitine sulfate	Glucosamine	Acide glucuronique	+	+	+
Kératosulfate	Glucosamine	Galactose	+	+	-

BUS
MILE

(x) Revue générale : BRIDACOMBE J.S. et WEBBER J.M., Mucopolysaccharides. Elsevier, 1964.

3 - TRAVAUX PERSONNELS

La démonstration récente de la nature antigénique des glycoprotéines de structure de l'aorte tend à montrer que ces GPS ont une importance dans le développement de la lésion athéromateuse (ROBERT et coll.) (93), (SCEBAT et coll.) (94). Nos travaux rapportés ci-dessous traitent de la méthode d'extraction et de fractionnement des GPS de l'aorte de Porc, de Mouton et de Cheval, des propriétés physico-chimiques et chimiques des fractions principales, ainsi que de l'étude des glycopeptides de GPS de l'aorte de Porc et de Cheval.

3.1. - EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DE LA PAROI ARTERIELLE

La méthode utilisée dans ces études est celle que ROBERT, PARLEBAS et ROBERT (95) ont mise au point pour l'extraction des GPS de la cornée. Elle consiste en une série d'extractions schématisées sur la figure 7 (p. 18) qui permettent d'obtenir sous une forme soluble des constituants de la paroi.

En outre, nous avons entrepris une nouvelle série d'extractions dans le but de fractionner les GPS bruts et de caractériser leurs composants. Le procédé est résumé sur la figure 8 (p.19). Ces extraits seront désignés dans le texte comme indiqué sur la figure 8. En vue d'effectuer l'extraction du collagène insoluble ultérieurement par l'acide trichloracétique à 2,7 %, nous avons étudié également l'influence de cet acide sur la fraction glucidique d'un glycopeptide à structure osidique connue, comme par exemple les glycopeptides du fibrinogène, pour observer les modifications éventuelles apportées par l'action de l'acide trichloracétique.

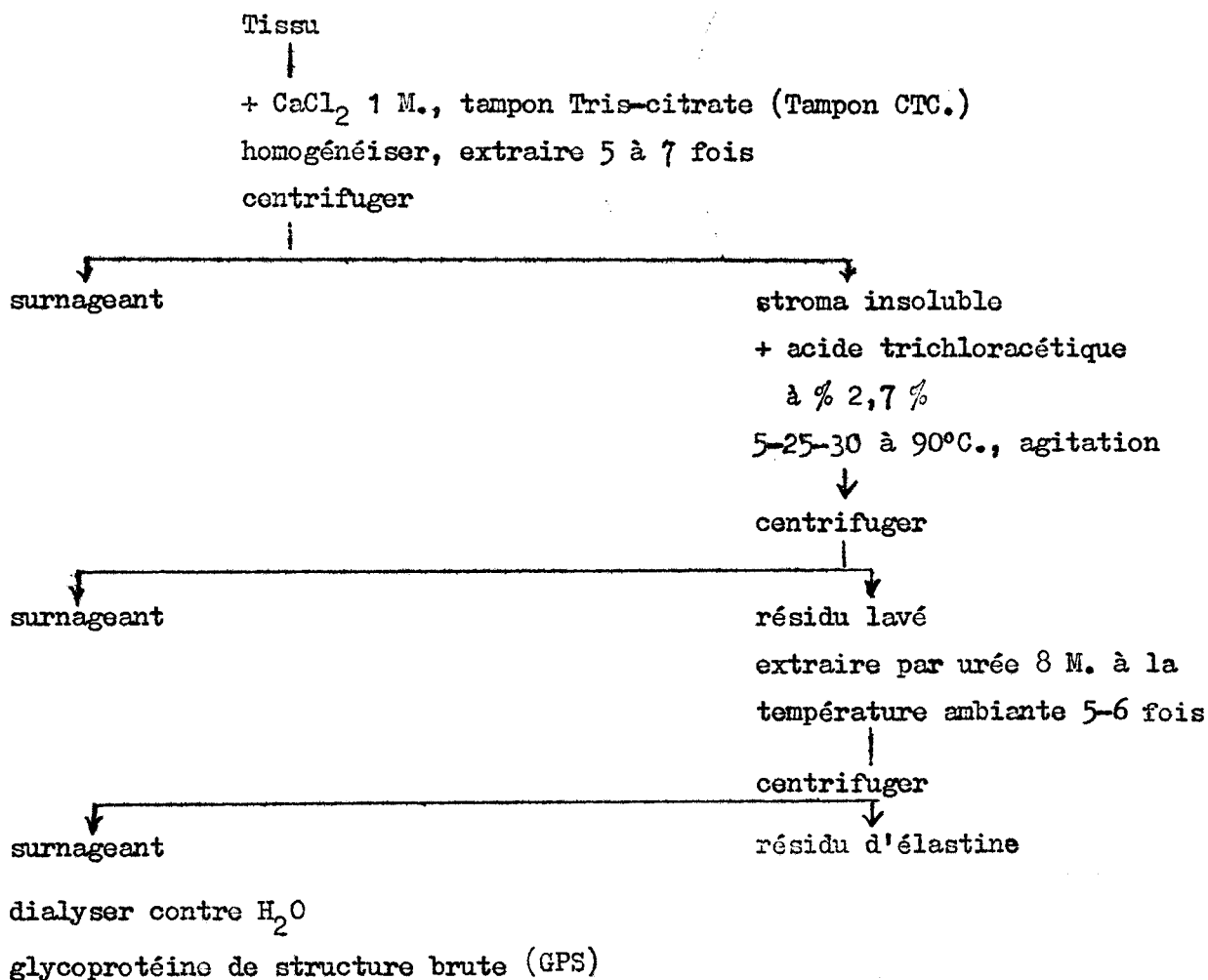


Figure 7



Schéma de la méthode d'extraction et de fractionnement
de l'aorte.

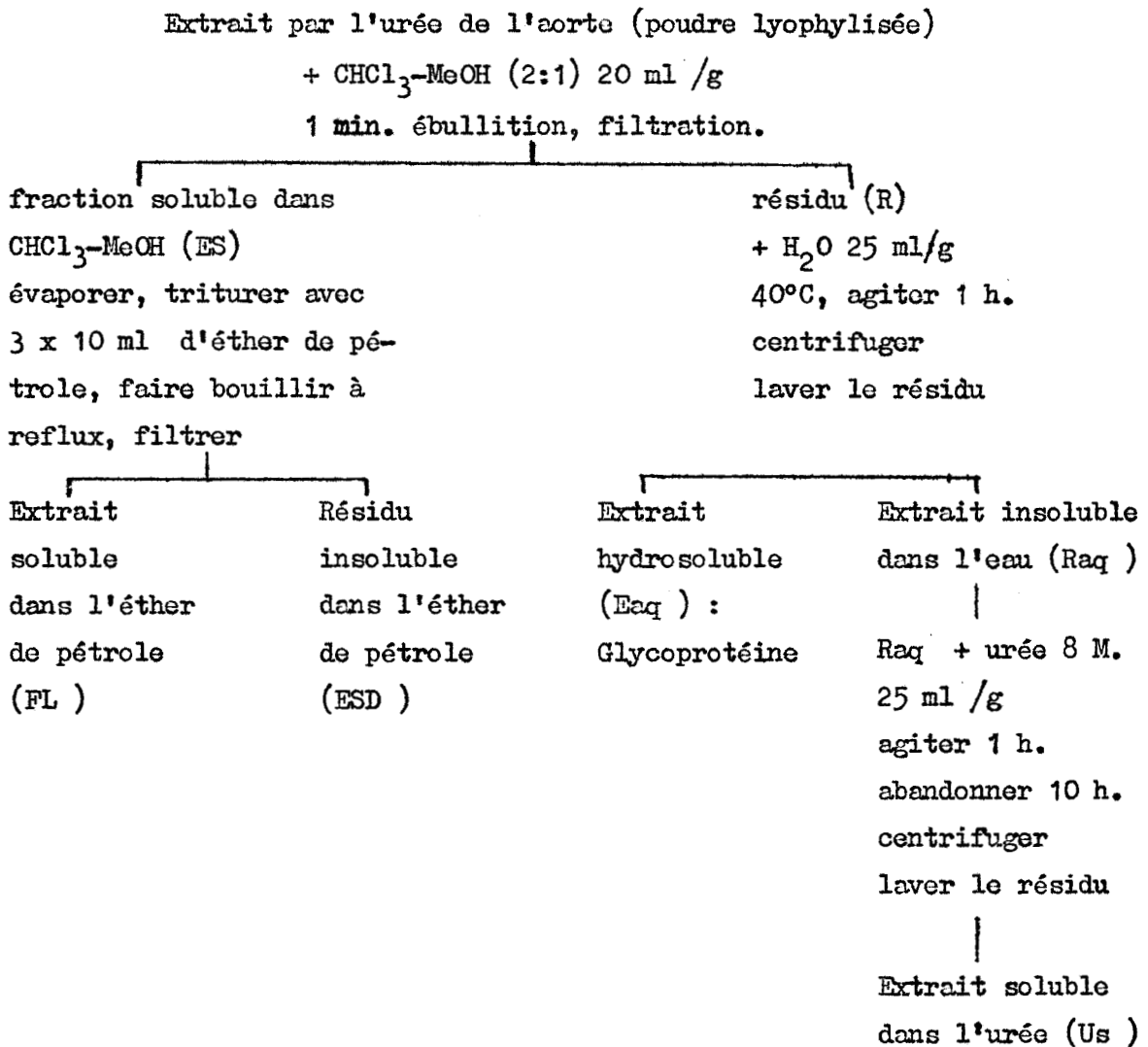


Figure 8

Fractionnement des glycoprotéines de structure brutes



MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

a - Appareillage :

Agitateur type Prolabo.

Homogénéiseur : Biorex (Equipement industriel).

Centrifugeuse.

Electrophorèse à 5.000 v : appareil Gilson.

b - Solvants :

Acétone, butanol, chloroforme, méthanol, éther de pétrole purs (Prolabo).

c - Produits chimiques :

Acide citrique, acide trichloracétique, chlorure de calcium, Tris - (hydroxyméthyl) - aminométhane, urée pure (Prolabo), Fibrinogène (de Boeuf (SIGMA). Colorants : AmidoSchwartz ; Bleu brillant.

d - Solution tampon :

CaCl₂ 1 M , Tris 0,05 M , acide citrique 0,02 M , tamponnée à pH 7,5.

e - Aortes :

Aorte de Porc, de Mouton et de Cheval, prélevés à l'abattoir et conservés en état congelé.

f - Chromatographie et électrophorèse :

Bandes d'acétate de cellulose (Chemetron), Papier Whatman N° 3.

Chromatographie sur couche mince : en cellulose microcristalline (Schleicher, Schüll 1440).

Résines échangeuses d'ions : Amberlite IR 120, Amberlite I R 400.

METHODES

A - TECHNIQUES DE L'EXTRACTION

1 - Découpage de l'aorte

L'aorte thoracique de Porc, de Mouton et de Cheval est débarrassée de l'intima et de l'adventice par arrachement, puis après rinçage à l'eau elle est découpée à la main en fragments de 0,5 cm² environ de tissu.

2 - Extraction de la paroi artérielle. Isolement des GPS brutes.

Les fragments de tissu obtenus par section aux ciseaux sont agités par lot de 500-800 grammes dans trois fois leur volume d'acétone. La phase liquide est décantée et le résidu est repris dans deux fois son volume de butanol, puis est remis à l'agitation. La phase liquide est séparée par centrifugation et le procédé est répété trois fois. Après un nouveau lavage par l'acétone, le résidu est mis en suspension dans l'eau. La durée de chaque extraction est de 12 heures. Les opérations consécutives sont faites en chambre froide à + 5°C.

Les fragments débarrassés ainsi partiellement de la gaine lipidique externe sont filtrés sur gaze et sont débarrassés par pression du liquide qu'ils renferment.

Le résidu est dispersé dans deux fois son volume de la solution tampon : CaCl₂ 1 M, Tris 0,05 M et acide citrique 0,02 M à pH 7,5. Le broyage est réalisé avec l'homogénéiseur "Biorex" à la vitesse de rotation maximale pendant 30 secondes à la température ambiante. La suspension est agitée pendant 8 heures à 5°C., puis la phase liquide est séparée par centrifugation. Le procédé est répété 6 fois. Le culot est lavé à l'eau à la centrifugeuse. L'aorte broyée ainsi traitée est dispersée par agitation dans l'acide trichloracétique à 2,7 % et est soumise aux extractions successives. La durée des manipulations consécutives est de 5, 25 et 30 minutes. La préparation est centrifugée. On obtient ainsi un surnageant qui renferme le collagène insoluble. Le culot est lavé à l'eau distillée.

Le résidu est homogénéisé avec l'homogénéiseur "Biorex" dans deux fois son volume initial de solution d'urée 8 M à la température ambiante pendant 40 secondes. Après broyage, la suspension est agitée pendant 8 heures à la température ambiante. La fraction insoluble est séparée par centrifugation. Après 6 extractions répétées, les surnageants provenant de chaque opération sont réunis et dialysés contre l'eau courante puis contre l'eau distillée. La solution dialysée est centrifugée, puis lyophilisée. Les préparations de ce type seront dénommées glycoprotéine de structure (GPS) brute (ROBERT et DISCHE) (96), (ROBERT et coll.) (97) et elles représentent les produits de départ pour nos expériences.

3 - Fractionnement des glycoprotéines de structure de l'aorte

La poudre lyophilisée de l'extrait d'urée de l'aorte est mise en suspension dans un mélange de chloroforme-méthanol 2 : 1 (v/v) à raison de 20 ml /g. La suspension est chauffée 1 minute au reflux dans un ballon muni d'un réfrigérant. La suspension est essorée. Après 3 extractions consécutives le résidu (R) est mis en suspension dans l'eau à 40°. Concentration : 1 g dans un volume de 25 ml. La suspension est agitée 1 heure à 40°C à l'aide d'un agitateur magnétique. La centrifugation à froid fournit un surnageant : l'extrait hydrosoluble de la GPS brute (Eaq).

Le culot de centrifugation est extrait par la solution d'urée 8 M sous agitation pendant 1 heure à la température ambiante. La suspension est centrifugée. La solution d'urée des GPS de l'aorte ainsi débarrassée au maximum des lipides et de l'élastine est dialysée contre l'eau courante et contre l'eau distillée, et concentrée à 10 ml sous vide au-dessous de 40°C. La solution résiduelle est lyophilisée. La fraction obtenue représente une GPS purifiée, soluble dans la solution d'urée 8 M (Us).

Le filtrat dans le chloroforme-méthanol est évaporé au-dessous de 30°C, et le résidu d'évaporation est extrait 3 fois par l'éther de pétrole (1 g par 10 ml). Ce traitement sépare deux fractions. L'une est soluble dans l'éther de pétrole, c'est la fraction lipidique (FL) ; l'autre forme le résidu délipidé (ESD) (voir Fig. 8, p.).

4 - Etude de l'extraction par l'acide trichloracétique à 2,7 %

Le glycopeptide de fibrinogène de Boeuf est préparé dans les conditions décrites par MESTER, MOCZAR, MEDGYESI et LAKI (98).

a - Hydrolyse acide du glycopeptide de fibrinogène. Libération de l'acide sialique.

50 mg de glycopeptide de fibrinogène sont dissous dans 50 ml d'acide sulfurique à 0,05 N et chauffés pendant 1 heure à 80°C. L'hydrolysât est neutralisé par l'échangeur d'anions (Amberlite IR 401 forme acétate). La solution effluente est lyophilisée. Le résidu est dissous dans 750 µl H₂O et additionné de 4 vol d'éthanol absolu. Le précipité du glycopeptide désialosidé est obtenu par centrifugation.

b - Hydrolyse par l'acide trichloracétique à 2,7 % du glycopeptide natif et désialosidé.

10 mg. du matériel à hydrolyser sont dissous dans 2 ml d'acide trichloracétique à 2,7 % et chauffés dans un tube scellé pendant 1 heure à 90°C. L'hydrolysât est purifié sur des colonnes d'échangeur de cations forme acide, puis d'échangeur d'anions (Amberlite IR 401 forme acétate). La solution effluente est lyophilisée.

B - TECHNIQUES D'ANALYSE

1 - Dosages colorimétriques

Pour les dosages colorimétriques des hexoses, hexosamines, nous nous référons aux travaux de MONTREUIL et SPIK (99).

2 - L'analyse quantitative des acides aminés.

L'analyse est réalisée par l'auto-analyseur d'amino-acides Beckman * à partir des hydrolysats acides des glycoprotéines.

3 - Electrophorèse

a - Sur acétate de cellulose.

Les électrophorèses des différentes fractions obtenues au cours d'extractions (lipides, protéides) sont effectuées sur les bandes d'acétate de cellulose (Cellogel, Chemetron) dans une solution d'urée 7 M et de Tris 0,1 M tamponnée à pH 8,7 sous une tension de 13 V /cm pendant 90 minutes. Le tampon véronal pH 8,2 est utilisé pour la fraction soluble dans l'eau. La fraction soluble dans l'éther de pétrole (FL) est mise en suspension dans la solution tampon.

(*) M. Comte, Centre Technique du Cuir, Lyon.

Les protides sont révélés par le colorant Amidoschwartz, les lipoides par le Bleu brillant. Les "densitogrammes" de la distribution des protides et des lipides sont obtenus au photodensitomètre Photovolt.

b - Sur papier à 5.000 V.

Les glycopeptides de fibrinogène hydrolysés par l'acide trichloracétique à 2,7 % sont soumis à l'électrophorèse sur papier Whatman N° 3 pendant 90 minutes à 5.000 V dans la solution tampon : pyridine-eau-acide acétique (25 : 1 : 225) à pH 6,3. Les fractions séparées sont révélées par la ninhydrine.

4 - Chromatographie sur couche mince

a - Identification des oses

La chromatographie sur couche mince en cellulose microcristalline (Schleicher & Schüll 1440 S) est pratiquée dans les hydrolysats acides des protides purifiés sur des colonnes d'échangeurs d'ions (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA) (100) pour détecter les oses.

Les systèmes-solvants suivants ont été utilisés :

- Solvant N° 1 : Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau
(5 : 5 : 1 : 3)
- Solvant N° 2 : N-butanol-acide acétique-eau (12 : 3 : 5).

Les oses réducteurs sont révélés par le phtalate d'aniline ou par une solution méthanolique de AgNO₃ à 1 % suivie d'une pulvérisation par la potasse dissoute dans le méthanol.

b - Identification des acides aminés

5 mg de chaque fraction sont hydrolysés dans 2 ml HCl 6 N sous une atmosphère d'azote en tube scellé pendant 24 heures à 110°C. Les hydrolysats sont évaporés par lyophilisation.

Les acides aminés sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (cellulose microcristalline, Schleicher & Schüll 1440 S). Le Solvant N° 1 est utilisé dans la première dimension (ascendante) et le solvant N° 2 dans la deuxième dimension. Les taches sont révélées par une solution de ninhydrine à 0,2 %.

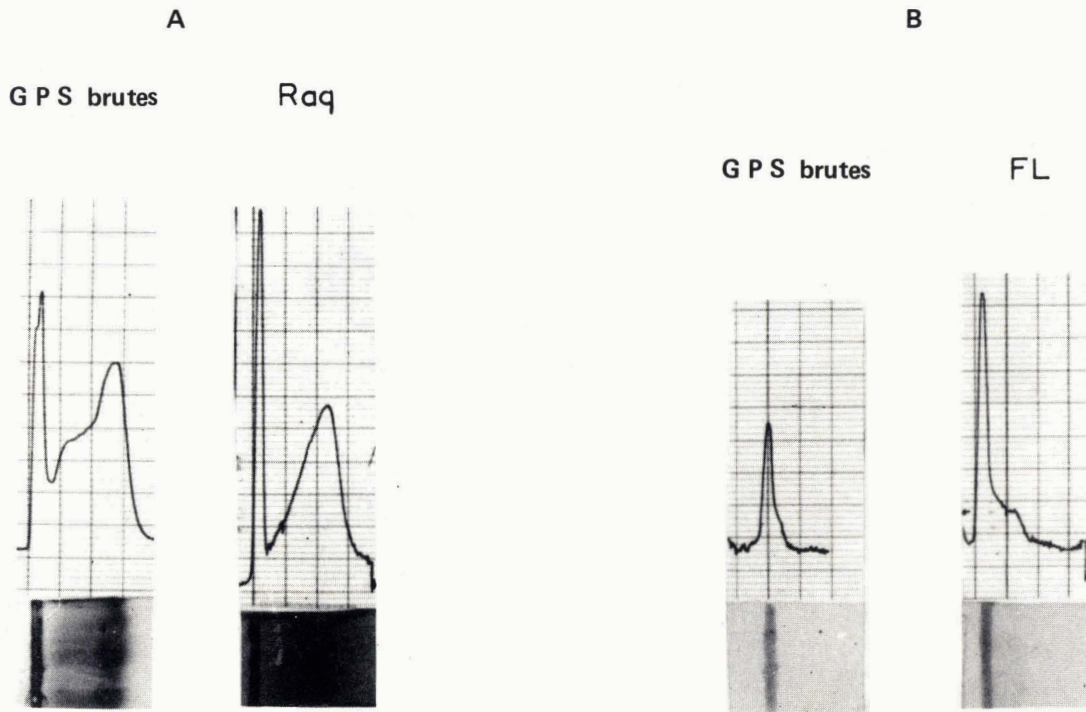


Figure 9 -

Electrophorégrammes des GPS bruts de l'aorte de porc. Bandes d'acétate de cellulose.

A - coloration par Amidoschwartz (pour les protéines).
 B - coloration par Bleu de Brillant (pour les lipides).



c - Identification du groupement phosphate

La présence du phosphate est mise en évidence sur les plaques en cellulose microcristalline (Schleicher & Schüll 1440 S) avec le solvant N° 1 en utilisant la méthode de HANES et ISCHERWOOD (101) pour révéler les taches.

C - DINITROPHENYLATION

La dinitrophénylation des GPS (Eaq) et (Us) de l'aorte de Porc a été effectuée selon SANGER (102), suivie de l'identification chromatographique des DNP-amino-acides dans les conditions décrites au chapitre 3.3. (p.)

D - ULTRACENTRIFUGATION

L'étude de sédimentation est réalisée (CNRS, Station centrale d'ultracentrifugation) avec la fraction hydrosoluble des GPS de l'aorte de Porc et de Mouton et le résidu insoluble dans l'eau mais extractible à l'urée (Us) de GPS de l'aorte du Porc et du Mouton. L'expérience est effectuée à 20° dans une solution d'urée 4 M à pH neutre, à une concentration de 15 mg/ml. (voir tableau 5 p.)
Vitesse de régime : 59.780 t/min, inclinaison de la barre 60. Photographie a été prise après 5, 20, 36, 53, 68, 84 minutes. Temps total de l'expérience : 400 minutes.

R E S U L T A T S

Le procédé préconisé par ROBERT et coll. (103) pour l'extraction sélective des différents types du tissu conjonctif appliquée à l'aorte solubilise les glycoprotéines liées au stroma insoluble de l'aorte. La fraction brute de glycoprotéine de structure extractible à l'urée est hétérogène. En électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose, la bande des protéines révélée par le colorant AmidoSchwartz n'est pas symétrique : elle se présente comme un pic avec une épaule (fig.9 p.25 bis). L'électrophorégramme de cette fraction donne également une réaction positive avec le colorant des lipides (Fig. 9 A).

A - FRACTIONNEMENT DES GPS BRUS

Nous avons réalisé le fractionnement par l'extraction consécutive aux solvants organiques, l'eau, et à la solution d'urée 8 M. (voir Fig. 8 p.19).

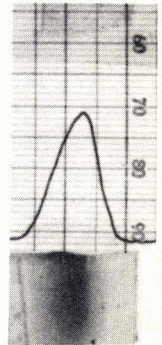
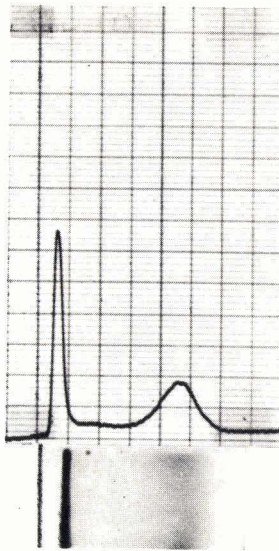
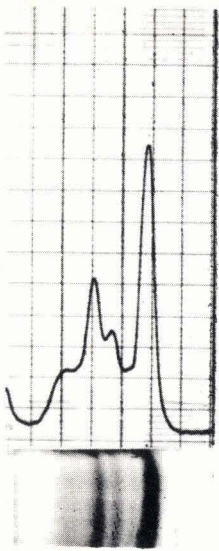
A

SERUM HUMAIN

Eaq PORC

Eaq MOUTON

Eaq CHEVAL



B

Raq PORC

Raq MOUTON

Raq CHEVAL

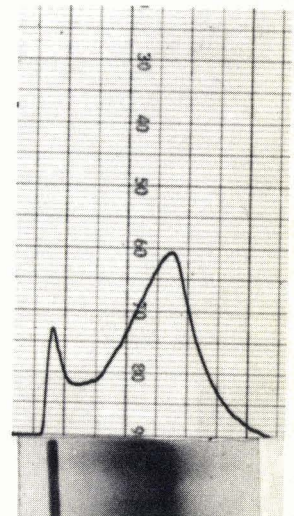
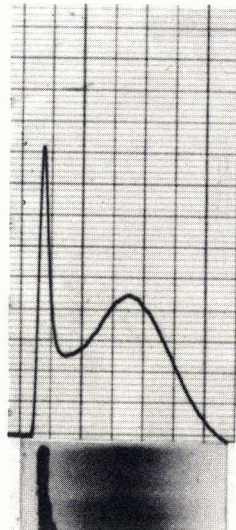
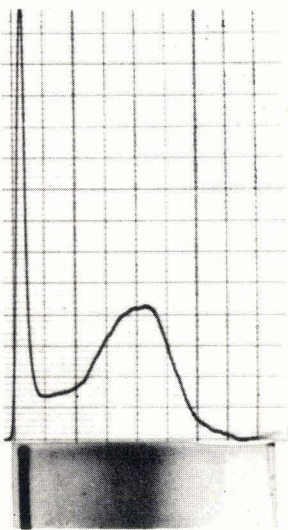


Figure 10 -

Electrophorégrammes sur bandes d'acétate de cellulose des fractions séparées par l'extraction aqueuse.

A - Electrophorèse en tampon véronal (ph 8,2) à 13 V/cm pendant 90 minutes des fractions extractibles à l'eau des glycoprotéines de structure brutes de l'aorte de différentes espèces comparativement au sérum humain. Révélation par le colorant Amidoschwartz.

B - Electrophorèse dans une solution tampon d'urée 7 M et de Tris 0,1 M (ph 8,7) à 13 V/cm pendant 90 minutes du résidu de l'extraction des glycoprotéines de structures brutes de l'aorte de différentes espèces. Révélation par le colorant Amidoschwartz.



Tableau 3

Extraction sélective de la fraction brute extractible à l'urée de la médie de l'aorte.

Rendement en fractions séparées.

g/100 g de fraction extractible à l'urée brute, lyophilisée.

	Fraction	Porc	Cheval	Mouton
I FRACTION SOLUBLE DANS CHCl_3 -MeOH	1 - Extrait soluble dans l'éther de pétrole (FL)	10	8	12
	2 - Résidu insoluble dans l'éther de pétrole (ESD)	13	15	13
II FRACTION INSOLUBLE DANS CHCl_3 -MeOH	3 - Résidu total (R)	66-65	73	60-65
	4 - Fraction extractible à l'eau (Eaq)	16,5	23	18
	5 - Fraction insoluble dans l'eau (Raq)	50	56	46
	6 - Fraction extractible à l'urée	42	40	40

205
1114

Les rendements pour chaque fraction, obtenus au cours de l'extraction des GPS bruts de l'aorte de Porc, de Mouton et de Cheval que nous résumons au Tableau 3 (p.).

Ces résultats font apparaître qu'on solubilise une partie des GPS brutes dans le mélange chloroforme-méthanol et que le résidu de cette extraction peut être divisé en deux fractions différentes.

B - COMPORTEMENTS DES SOUS-FRACTIONS DES GPS BRUTES EN ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE.

Des électrophorogrammes colorés par AmidoSchwartz (pour les protéines) et Bleu de Brillant (pour les lipoides) démontrent que les fractions Eaq (extrait aqueux) et Raq (résidu de l'extrait aqueux) ne réagissent pas avec le colorant de lipoides, et se révèlent avec le colorant des protéines. Le GPS brute contient les protéines et les lipoides (Fig.9, p.25 bis) Fig. 10, p. 26 bis).

Les GPS brutes et les GPS délipidées renferment des protéines qui ne se séparent pas sur Cellogel. La fraction hydrosoluble (Eaq) donne un pic relativement homogène sur les densitogrammes. Il semble donc qu'au moins une fraction protidique présente dans les GPS brutes délipidées (R) soit hydrosoluble.

La fraction lipidique (FL) présente une légère migration vers l'anode. La fraction ESD ne se colore pas avec l'AmidoSchwartz, mais réagit avec la ninhydrine.

Nous démontrons sur les Fig.9 (p.25 bis) et 10 (p.26 bis) les électrophorogrammes sur les bandes d'acétate de cellulose des GPS brutes, des GPS délipidés et des deux fractions séparées par l'extraction aqueuse de ces dernières. Après coloration avec l'Amidoblack, la bande diffuse des GPS brutes de l'aorte de porc a un tracé asymétrique avec un épaulement. Elle se colore également avec le colorant des lipides. Le résultat est représenté sur le Tableau 4 (p.28) pour l'aorte de Porc.

TABIEAU 4

Electrophorèse sur Colloidal à pH 8,7
des fractions séparées de l'extrait d'urée brut de l'aorte de Porc.

		F R A C T I O N S				
Réaction colorée	Fraction extractible à l'urée brute	FL	ESD	R	Eaq.	Raq.
Protéine	1 bande avec épaulement	Négative	(xx)	large bande	1 bande	1 bande
Lipide	1 bande	1 bande	nég.	négative	négative	négative

(xx) Négative à l'Amidoschwartz, positive à l'orcinoï.

BUS
LILLE

TABLEAU 5

Coefficients de sédimentation moyens obtenus par ultra-centrifugation des fractions Eaq et Us de GPS, dans une solution d'urée 4 M à pH neutre.

Fraction de GPS	Concentration (en mg /ml	Coefficient de sédi- mentation moyen S ₂₀
Eaq Porc	15	0,8
Us Porc	12	0,9 constituant prin- cipal) 5,50 (constituant mineur)
Eaq Mouton	15	0,89
Us Mouton	15	0,757




TABLEAU 6

Extraction sélective de la fraction extractible à l'urée, brute.
Substances identifiées par chromatographie sur couche mince.

	F R A C T I O N		
	FL	ESD	R
Hexoses	0	9 galactose mannose glucose traces	galactose glucose mannose xylose (traces)
Acide uronique	0	0	traces
Fonction phosphate	1 tache $R_f = 0,14$	3 taches $R_{f1} = 0,14$ $R_{f2} = 0,18$ $R_{f3} = 0,35$	2 taches $R_{f1} = 0,25$ $R_{f2} = 0,4$
Acides aminés	0	(*)	(*)



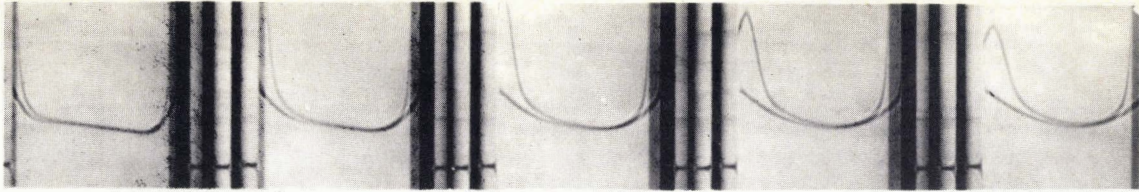
(*) Voir les résultats obtenus par l'Autoanalyseur Beckman.

TABLEAU 7

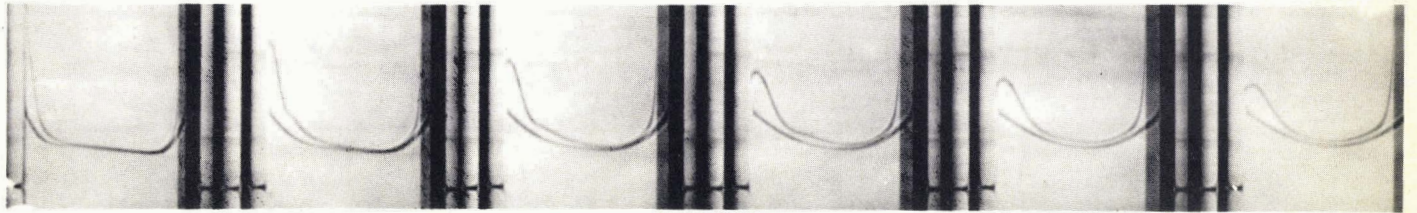
Composition en acides aminés (g p. 100 g protéine) des différentes fractions des "glycoprotéines de structure" de média de l'aorte de Porc et de Cheval.

Acides aminés	Eaq Porc	Raq Porc	ESD Porc	Us. Porc	Eaq Cheval	Raq Cheval
OH-lysine	0,24	traces	0,74	0,15	0,44	traces
Lysine	4,69	7,33	1,52	4,70	6,61	7,11
Histidine	1,76	3,06	1,33	1,82	2,32	2,81
Arginine	4,54	7,16	0,84	5,24	5,77	6,92
OH-proline	néant	néant	2,22	néant	néant	néant
Acide aspartique	7,95	10,34	1,32	8,09	10,86	9,99
Thréonine	3,67	5,51	1,05	3,54	4,60	5,25
Sérine	3,33	4,92	1,53	2,93	4,50	4,60
Acide glutamique	13,40	12,86	1,19	11,69	12,00	13,23
Proline	7,87	5,06	12,89	16,65	9,12	5,75
Glycine	11,80	5,02	2,51	7,12	15,55	5,36
Alanine	12,15	5,75	20,28	6,88	2,30	5,96
Valine	9,21	7,33	16,05	6,02	8,22	7,16
Cystéine	0,10	2,76	14,07	néant	néant	2,40
Méthionine	0,06	0,09	néant	0,44	néant	traces
Isoleucine	3,67	4,92	0,26	4,13	3,53	4,88
Leucine	8,52	8,69	2,41	8,52	7,08	8,83
Tyrosine	2,86	4,57	7,45	4,84	3,40	5,02
Phénylalanine	4,18	4,62	2,81	5,56	3,70	4,71
Inconnu	avant	-	6,66		après	-
	Tyr		acide cys- téique	0,88	Leu	
Ammoniaque	2,29	2,36	2,65		2,00	1,72
Total	100,00	99,99	99,78	99,94	100,00	99,98

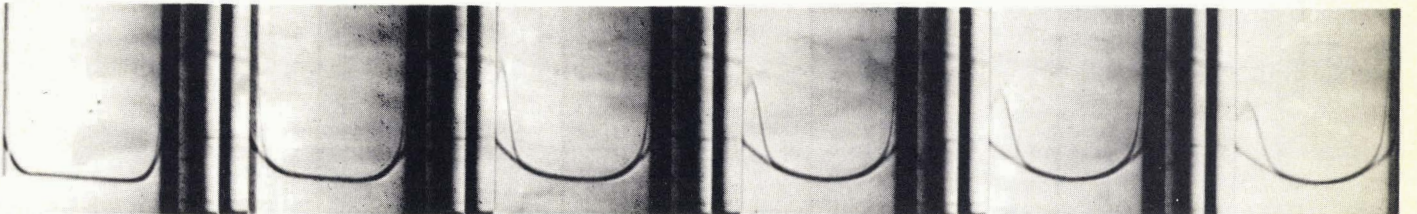
BUS
1976



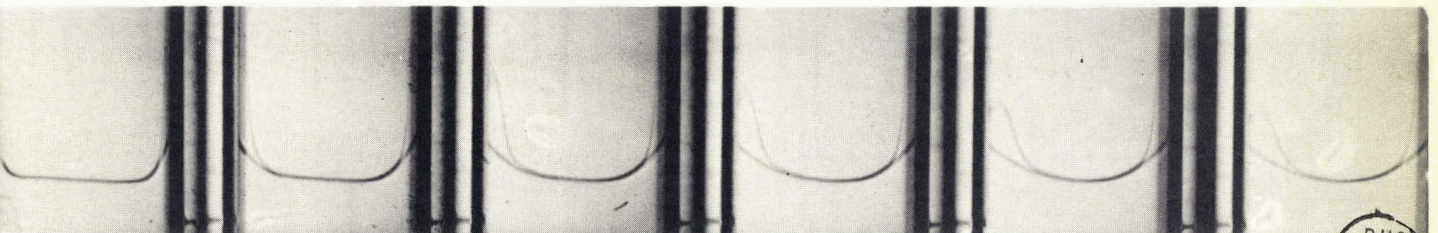
A



B



C



D

Figure 11 -

Ultracentrifugation des glycoprotéines de structure de l'aorte à 20°C en tampon d'urée 4 M à pH neutre. vitesse de régime 59.780 t/min. Inclinaison de la barre 60. Photographie après 4, 20, 36, 52, 68 et 84 min. de sédimentation.

A - Glycoprotéine de structure hydrosoluble (Eaq) de l'aorte de Porc.

B - Glycoprotéine de structure extractible par la solution d'urée 4 M (Us) de l'aorte de Porc.

C - Glycoprotéine de structure hydrosoluble (Eaq) de l'aorte de Mouton.

D - Glycoprotéine de structure extractible par solution d'urée 4 M (Us) de l'aorte de Mouton.

BUS
L.I.E.

C - ULTRACENTRIFUGATION

La GPS hydrosoluble (Eaq) et celle extractible à la solution d'urée (Us) de l'aorte de Porc et de Mouton montrent des courbes de sédimentation ressemblantes. Le pic élargi n'a permis que la détermination d'une valeur moyenne pour le coefficient de sédimentation. Celui-ci se situe à 0,8 environ pour les échantillons examinés. La séparation d'un deuxième pic mineur a été observée pour la fraction (Us) de Porc. Le résultat est représenté sur le Tableau 5 (p.29) et sur la ligne 11 (p.)

D - COMPOSITION CHIMIQUE DES GPS DE L'AORTE DE PORC, DE MOUTON ET DE CHEVAL.

Avant d'aborder les études chimiques détaillées nous avons procédé à la chromatographie qualitative sur couche mince dans le but de repérer les fractions contenant les oses et les acides aminés. Le Tableau 6 (p.) montre que la fraction Eaq. et son résidu (R) renferment les acides aminés, les hexoses, les hexosamines. Dans l'extrait soluble dans l'éther de pétrole, ni acides aminés ni sucres n'ont pu être révélés. La fraction soluble dans le mélange chloroforme-méthanol contient également des oses et des acides aminés. La recherche des phosphates par la chromatographie sur couche mince à l'aide du réactif de HANES et ISHERWOOD (104) s'est montrée positive pour les extraits dénommés ESD, Eaq et R (Tableau 6, p.30).

1 a. Composition en acides aminés

La composition exacte de la partie protéinique a été précisée après avoir hydrolysé la substance à l'aide de l'auto-analyseur Beckman. Les résultats, composition centésimale de la fraction extractible à l'eau (Eaq) et de son résidu (Raq) ainsi que ceux de la fraction Us et ESD sont résumés dans le Tableau 7 (p.31). L'analyse démontre l'absence d'hydroxyproline, la faible teneur en hydroxylysine et la prédominance de l'alanine et du glycocolle dans les substances étudiées. Dans le résidu de l'extraction aqueuse, le glycocolle, l'alanine, la proline, la sérine et la thréonine sont présentes avec les mêmes pourcentages environ, tandis que la fraction hydrosoluble est plus riche en glycocolle.

1 b. Composition en glucides

Notre but était la recherche des fractions renfermant les oses en présence des acides aminés. Les dosages colorimétriques des oses et des osamines, dont les résultats sont démontrés sur le tableau 8 (p.35), indiquent qu'après l'extraction

par le chloroforme-méthanol, c'est le résidu qui est plus riche en glucide que l'extrait. Les résultats du dosage des hexoses et des hexosamines des sous-fractions séparées par extraction successive (Eaq, Raq, Us) par l'eau et la solution d'urée 8 M., sont résumés également sur le Tableau 8 (p.35) pour l'aorte de Porc, de Cheval et de Mouton. La différence dans la teneur en hexoses et hexosamines des fractions séparées par extraction ne semble pas être significative. Les oses présents, démontrés par chromatographie en couche mince sont la galactose, le glucose et le mannose.

2. Dinitrophénylation

L'identification chromatographique de l'acide aminé N-terminal nous a permis d'identifier la DNP-alanine et la DNP- ϵ -lysine pour la fraction urée-soluble et la fraction hydrosoluble.

3. Extraction par l'acide trichloracétique à 2,7 %

Nous avons constaté que la méthode d'isolement employée fournit des glycoprotéides désialosidés. Il était indispensable de vérifier si cette altération ne s'accompagnait pas de l'hydrolyse des autres composants osidiques.

Nous avons abordé ce problème en étudiant l'action de l'acide trichloracétique à 2,7 % sur le glycopeptide de fibrinogène bovin (MESTER et coll.) (104).

Pour cette expérience, le glycopeptide de fibrinogène bovin est hydrolysé par H_2SO_4 0,05 N. 80 C°, pour libérer l'acide sialique.

Le traitement par acide trichloracétique à 2,7 % est effectué :

- 1) sur le glycopeptide natif
- 2) sur le glycopeptide désialidé à 90°C. pendant 1 heure.

Les résultats de la détermination de la teneur en hexoses et du rapport molaire des galactose/mannose des glycopeptides traités par l'acide trichloracétique et du glycopeptide témoin, résumés sur le Tableau 9 (p.35) démontrent que les conditions d'extraction employées dans ce cas n'influencent ni la teneur ni la proportion du galactose et du mannose. Le comportement électrophorétique à 5.000 V et pH 6,3 du glycopeptide traité et du témoin se révèle être identique

Il faut remarquer cependant que cette observation ne peut pas être généralisée. La fraction osidique de la ribonucléase B subit, même à froid, des dégradations partielles sous l'influence de l'acide trichloracétique (JEANLOZ, communication personnelle).

DISCUSSION

La texture de la paroi artérielle, en particulier sa richesse en tissu conjonctif rendent la préparation de l'homogénat du tissu délicat.

L'élasticité du tissu limite la puissance d'action des moyens mécaniques. Il en résulte que de nombreux travaux décrivent l'extraction des macromolécules comme les mucopolysaccharides acides par la soude diluée, ou celle des différentes protéines solubles par les solutions salines cependant les informations sur la nature chimique de la trame fibreuse insoluble de la paroi, à l'exception de l'élastine, sont moins nombreuses. Nous citerons à cet égard les travaux de BUDDECKE (105), KAPLAN et MEYER (106), BERENSON (107), et MEYER et Coll. (108).

Les méthodes employées pour solubiliser les éléments du tissu, plus précisément le collagène, ou pour séparer les composants extractibles de l'élastine, mettent en jeu l'hydrolyse aqueuse sous pression et l'extraction par la soude.

Le procédé mis au point pour le dosage de la distribution du collagène et de l'élastine dans l'aorte de Porc et de Boeuf (NEUMAN et LOGAN) (109) et dans l'aorte humaine (GRANT) (110) semble insuffisamment spécifique pour séparer les macromolécules ayant une copule glucidique (BUDDECKE) (112), (MATHIENS) (113).

La méthode de ROBERT, PARLEBAS et ROBERT (114) mise au point pour l'extraction du stroma cornéen adaptée au fractionnement des éléments insolubles de l'aorte permet un "découpage chimique" systématique de la paroi artérielle. Il faut signaler cependant que la complexité de la structure de l'aorte (vascularisation, richesse en cellules) ne permet pas d'obtenir des entités chimiquement pures (ROBERT et coll.) (115), mais le procédé nous fournit les fractions enrichies en protéines solubles, en mucopolysaccharides, en collagène soluble, en collagène insoluble et en glycoprotéines de structure brutes. La purification de ces dernières peut être réalisée par l'extraction des substances hydrophobes suivie d'une extraction successive par l'eau et la solution d'urée 8 M

TABLEAU 8

Composition centésimale en glucides des fractions des GPS brutes séparées par extraction sélective.

	HEXOSES					HEXOSAMINES			
	Eaq	Raq	Us	R	ESD	Eaq	Raq	R	Us
PORC	1,45	2,1	2,1	2,2	0,29	1,63	1,8	2,4I	2,86
MOUTON	4,8	3,06	3,06	3,7	0,65	1,3	2,0	2,3	2,8
CHEVAL	2,36	2,85	2,9	2,5	0,47	1,8	2,4	2,05	2,3

TABLEAU 9

Composition en hexoses des glycopeptides du fibrinogène hydrolysés par l'acide trichloracétique, comparativement aux glycopeptides natifs (MESTER et coll.) (111).

	Glycopeptides natifs	Glycopeptides hydrolysés par l'acide trichloracétique
Composition centésimale en hexoses	35	34,3
Proportion molaire galactose/mannose	1:1,4	1:1,4



La solubilisation du collagène non extractible, achevée par l'acide trichloracétique exerçant une action hydrolytique et dénaturante ne nous a pas semblé modifier la teneur en hexoses neutres (orcinol) et le rapport molaire du galactose et du mannose, malgré l'hydrolyse de l'acide sialique en position terminale dans un glycopeptide "témoin" étudié. Bien que cette méthode ne nous permette pas d'isoler les glycoprotéines liées au stroma insoluble de média de l'aorte à l'état natif, elle nous rend possible la séparation des "glycoprotéines de structure" du collagène insoluble.

C O N C L U S I O N S

Nos résultats concernant l'isolement des glycoprotéines de structure de l'aorte nous amènent aux conclusions suivantes :

- 1) L'extraction successive de l'aorte par : (a) la solution tampon chlorure de calcium-Tris : (b) l'acide trichloracétique et (c) la solution d'urée 8 M permet d'obtenir les glycoprotéines insolubles (GPS) de la paroi artérielle.
- 2) Les GPS brutes représentent un mélange de protéides et de lipides.
- 3) Les GPS délipidées brutes (fraction R) peuvent être séparées en fraction hydrosoluble et en fraction insoluble dans l'eau (fraction Raq). Cette dernière (Raq) peut être solubilisée dans l'urée 8 M.
- 4) La chromatographie de l'hydrolysate acide révèle la présence de galactose, de mannose, de glucose et des acides aminés dans les fractions hydrosolubles (Eaq) et urée solubles (Us) des GPS de Porc, de Cheval et de Mouton.
- 5) La fraction soluble dans le méthanol-chloroforme 2 : 1 contient des lipides, des acides aminés, des composés phosphates, et de faibles quantités des oses.
- 6) La fraction soluble dans l'éther de pétrole (FL) est une substance lipidique. Elle ne contient ni oses, ni osamines.

- 7) Les fractions Eaq, Us ne renferment pas d'hydroxyproline (Auto-analyseur). Elles sont donc des glycoprotéines, et non pas des fragments provenant du collagène.
- 8) La dinitrophénylation nous a permis d'identifier la DNP-alanine, et la DNP- ϵ -lysine pour la fraction Eaq et Us.
- 9) L'application d'un procédé de séparation du collagène insoluble et des GPS par l'acide trichloracétique à 2,7 % à 90° nous a permis d'isoler les glycoprotéines ne renfermant plus d'acide sialique.

3.2. METHODES ANALYTIQUES MISES AU POINT POUR L'ETUDE
DE LA FRACTION OSIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES

3.2.1. MICRODETERMINATION DES OSES NEUTRES ET OSAMINES PAR CHROMATOGRAPHIE EN
COUCHE MINCE D'UN POLYMERE SYNTHETIQUE.

Au cours de nos travaux sur les glycoprotéines de structure de différents tissus, comme l'aorte et la cornée, la quantité des substances dont nous avons disposé pour l'étude de la structure osidique était de quelques milligrammes. L'intérêt est donc porté à la mise au point d'une méthode suffisamment sensible pour permettre l'identification et la détermination des rapports molaires des oses et des osamines dans des quantités de l'ordre de 0,2-3 μ g.

STAHL et KALTENBACH (116) ont démontré qu'on peut séparer des substances hydrophiles comme les oses par chromatographie en couche mince de Kieselguhr G tamponné par l'acétate de sodium. Depuis, de nombreux travaux publiés ont préconisé l'application de différents types de supports chromatographiques, comme la cellulose microcristalline (WOLFROM, PATIN et LEDERKREMER) (117), la cellulose (SCHWEIGER) (118), (VOMKOFF, TRUITT et TUCKER) (119), le silicate de magnésium (WOLFROM, MUCHNIK et LEDERKREMER) (120) (GRASSHOF) (121), le Silicagel (MICHEL et BERENDER) (122), (DUMAZERT, GHIGLIONE et PUGNET) (123), (INGLIS (124), le mélange de Kieselgel G et de Kieselguhr (WASSERMANN et HANUS) (125), la Célite pigmentée par l'oxyde de fer (HESSE et ALEXANDER) (126), et le Sephadex (BISCHEL et coll.) (127). Récemment, ANDERSON et STODDART (128) ont proposé la séparation chromatographique des hexoses sur les "chromagrams" plus précisément sur les couches de poudre de silice ou d'un polymère synthétique à base de polycarbonate déposé sur le support de polyester.

Les méthodes d'évaluation quantitative des chromatogrammes mettent en jeu l'éluat des taches révélées ou repérées. Le glucide est ensuite dosé dans l'éluat par une méthode suffisamment sensible (spectrophotométrie (VOMKOFF, TRUITT et TUCKER) (129), (BAUCHER, SCHERZ et KAINDL) (130), volumétrie (PASTUSKA) (131). Dans d'autres procédés l'intensité des taches est déterminée à l'aide d'un photodensitomètre (LAMKIN, WARD et WALBORG) (132). Ces techniques se prêtent mal à la détermination des glucides dans les quantités de l'ordre de 0,2-2 μ g, car les méthodes spectrophotométriques nécessitent plus de 10 μ g. de substance. L'évaluation quantitative des taches par photodensitométrie sur les couches déposées à la main peut être difficile à interpréter à cause des irrégularités de ces dernières.

La méthode que nous avons récemment proposée (MOCZAR et coll.) (133) permet une évaluation quantitative suffisante par photodensitométrie des oses séparés dans les quantités de l'ordre de 0,2-2 μ g. Pour réaliser ce travail nous avons fait appel aux couches chromatographiques à la texture régulière et ne réagissant pas avec les réactifs des oses. Nous avons utilisé les feuilles chromatographiques de KODAK 511 V constituées d'une couche mince de polycarbonate sur un support souple de polyester.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL :

Support chromatographique : Feuille chromatographique de KODAK 511 V de dimensions de 10 x 10 cm.

Solution de tampon phosphate 0,2 M à pH 6,8 (TINELLI) (134) : (ANDERSON et STODDART) (135).

Solvants : éthanol, propanol, acétate d'éthyle purs (Prolabo) ammoniacque à 25 %.

Réactifs : chlorure de tétrazolium (Touzart).

Résines échangeuses d'ions : Amberlite IR 120

Amberlite IR 400 forme acétate.

METHODES :

A - Hydrolyse

Avant d'aborder l'étude chromatographique proprement dite des oses, nous nous référons aux travaux de MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (136) pour évoquer les problèmes posés par l'hydrolyse quantitative des osides. Nous avons utilisé 200 ml. d'HCl 2 N pour 1 à 3 mg. de glycopeptide renfermant 10 à 40 % d'hexoses, et 400 ml. d'HCl 2 N pour 1 mg. de glycoprotéine dont la teneur en oses est de 5 % environ. L'hydrolysate est dilué au double du volume initial et neutralisé ensuite par l'échangeur d'anions (forme acétate ou formiate) et purifié sur des colonnes (3 x 30 mm.) d'échangeurs de cations forme acide (Amberlite IR 120 mesh 200-400) puis d'anions (Amberlite IR 400, forme acétate). La solution effluente est lyophilisée.

Pour la détermination des hexosamines les quantités analogues de glycopeptides ou des produits de dégradation enzymatique de mucopolysaccharides sont hydrolysées avec HCl 4 N pendant 4-6 h. suivant les substances, et lyophilisées ensuite.

B - Chromatographie sur couche mince

Le support chromatographique utilisé est la feuille chromatographique de Kodak 511 V. de dimensions 10 x 10 cm. Ces feuilles sont imprégnées d'une solution tampon phosphate 0,2 M à pH 6, 8, puis séchées à l'air. Nous avons effectué les dépôts "en ligne" de 5-6 mm. de quantités des oses de l'ordre de 0,5 µg. (par micro-gouttes de 0,1-0,2 µl.).

Nos solvants de routine sont les suivants :

- pour séparer le galactose, le glucose et le mannose :
n-propanol-acétate d'éthyle - H₂O (5 : 1 : 1),
- pour séparer le galactosamine et le glucosamine :
Ethanol - NH₄OH à 25 % - H₂O (85 : 0 : 5 : 14,5 V/V).

La migration était effectuée sur 8 cm. et durait environ 1 h. à la température du laboratoire.

C - Procédés de révélation

Nous avons étudié l'application de quelques réactifs de révélation des oses décrits à propos de la chromatographie sur papier de ces derniers. Le but recherché était d'appliquer un réactif sensible pour détecter 0,2-1 µg des oses

neutres et des osamines, qui donne une coloration suffisamment forte pour effectuer la photodensitométrie directe des chromatogrammes.

La révélation par le réactif de nitrate d'argent de TREVELYAN et al. (137) est troublée par la présence des phosphates. Le mannose a donné une coloration plus forte que le glucose. L'emploi du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (138) a donné les colorations caractéristiques des oses mais faibles dans notre cas, pour effectuer une évaluation par photodensitométrie.

Nous avons eu recours au réactif de chlorure de triphényltétrazolium de WALLENFELS (139), (140). Les chromatogrammes sont passés rapidement suivant le procédé préconisé par TREVELYAN, PROCTOR et HARRISON (141) dans une solution méthanolique de soude contenant 0,5 g pour 100 ml de chlorure de tétrazolium. La solution est préparée extemporanément en mélangeant 1 volume de solution méthanolique de soude et 1 volume d'une solution de chlorure de triphényltétrazolium à 1 g p. 100 ml de méthanol. Les chromatogrammes sont chauffés ensuite dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau (étuve isotherme) à 90°C. La réduction du réactif en milieu basique à chaud fixe en rouge les taches des oses et osamines. Les couches minces à base de cellulose se prêtent mal au réactif de TTC, ayant les fonctions réductrices libres réagissant avec le TTC. Ainsi la coloration rose prend toute la surface des chromatogrammes, les dosages photodensitométriques sont rarement reproductibles et ne se prêtent pas à des dosages de routine (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA) (142). La couche de polycarbonate présente l'intérêt de ne pas être spécifique des réactifs de révélation des oses.

D - Dosage densitométrique

L'intensité des taches des oses et osamines est mesurée à l'aide d'un photodensitomètre enregistreur (type Photovolt). Nous avons appliqué la méthode "par transmittance". On s'est rapporté ensuite à des courbes de référence représentées par des solutions de glucides prises à des concentrations connues.

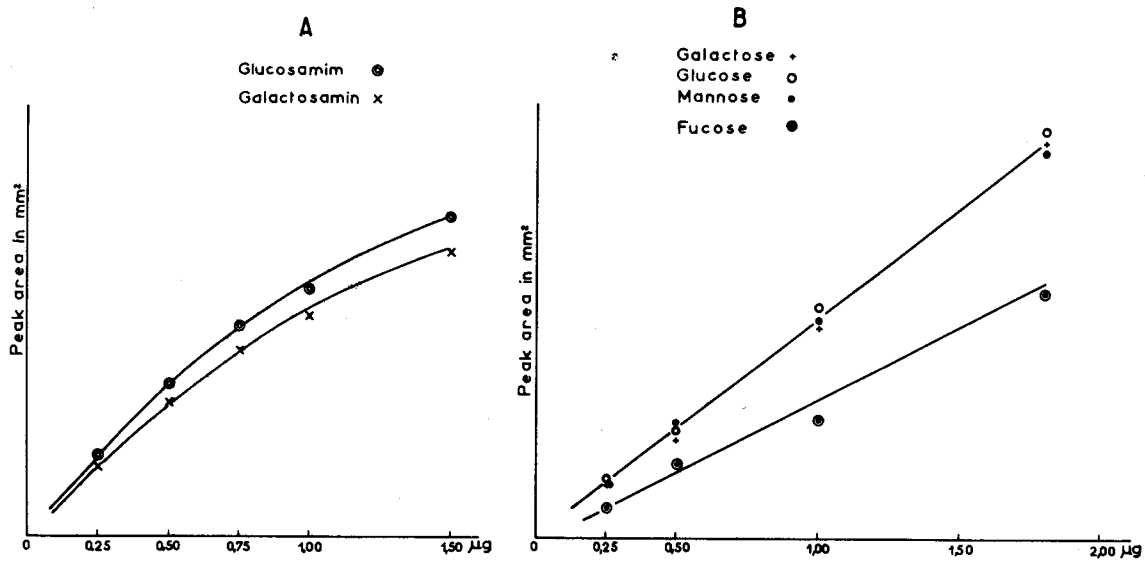


Figure 12 -

Proportionnalité des mesures de "transmittance" en fonction de la concentration.



R E S U L T A T S

La proportionnalité des mesures de "transmittance" en fonction de la concentration est bonne de 0 à 2 μ g. d'oses et de 0 à 1,5 μ g. d'osamines. Les valeurs obtenues s'inscrivent sur une ligne droite comme on peut le voir sur la figure 12 (p. 42 bis).

Nous avons appliqué le dosage par la méthode densitométrique à la détermination des rapports molaires du galactose, du glucose et du mannose. Sur le tableau 10 (p. 43) nous avons résumé les écarts-types calculés au cours de cinq mesures effectuées à partir de la solution de référence contenant le galactose, le mannose, le glucose et le fucose à une concentration identique (1,5 μ g.).

Selon ces mesures la méthode fournit des résultats reproductibles à ± 1 à $\pm 2,4$ % près dans le cas du galactose, du glucose et du mannose et de $\pm 5,4$ % dans le cas du fucose.

Cette technique nous a été utile pour la détermination de la proportion molaire des oses et des osamines au cours du fractionnement et de l'isolement des composants macromoléculaires du tissu conjonctif.

C O N C L U S I O N S

L'emploi de couches minces de polycarbonate sous forme de feuilles chromatographiques KODAK 511 V et du chlorure de tétrazolium comme réactif de révélation d'oses fournit des résultats reproductibles par la méthode densitométrique. En outre, la sensibilité de la méthode conduit à des valeurs acceptables du rapport galactose/glucose/mannose et de rapport galactosamine/glucosamine sur des quantités d'oses et d'osamines de l'ordre de 0,2 à 2 μ g.

TABLEAU IO

Rapports molaires du galactose, du glucose et du mannose déterminés sur des solutions titrées et

Echantillon n°	écarts types (x)			Mannose	Fucose
	Galactose	Glucose			
1	1,00	1,08		0,95	0,82
2	1,02	1,10		1,02	0,67
3	0,95	1,02		0,95	0,61
4	1,06	1,07		1,06	0,82
5	1,03	1,08		0,97	0,74
Ecart-types	± 1,43 %	± 2,37 %		± 1,70 %	± 5,4 %

(x) Mesures effectuées pour une concentration à 1,50 μg.



3.2.2. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES HYDROLYSATS PARTIELS DES OLIGOSIDES.

Nous devons aux travaux de MONTREUIL, CHOSSON (143), MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (144) et de BOURRILLON et MICHON (145) l'étude cinétique de l'hydrolyse partielle des osides des glycoprotéides. Les osides provenant de la dégradation de la fraction polyosidique sont séparés par chromatographie sur papier, chromatographie sur colonne ou par électrophorèse préparative (CHOSSON et MONTREUIL) (146).

Dans le but de pouvoir interpréter le comportement immunologique des GPS provenant de différents organes et espèces, nous avons essayé de trouver une méthode simple, applicable à quelques μ g de substance pour explorer les motifs structuraux de la fraction glucidique des glycoprotéides ou des glycopeptides.

L'application de l'hydrolyse partielle (MONTREUIL, et CHOSSON) (147) ; (MONTREUIL, CHOSSON et SPIK) (148), associée à la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose microcristalline semble être une méthode de choix pour effectuer des études comparatives des oligosides (MOCZAR et MOCZAR) (149).

La méthode a été mise au point sur les fragments glucidiques des glycopeptides du fibrinogène (MESTER et coll.) (150) et de l'ovomucoïde (CHOSSON et MONTREUIL) (151).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL :

Support chromatographique : cellulose micro-cristalline (plaque préfabriquée N° 1440 Schleicher & Schüll).

Solvants : n-butanol, acide acétique, pyridine, acétate d'éthyle purs (PROLABO).

Réactifs : AgNO_3 : acide sulfurique.

METHODES :

A - Préparation des glycoprotéines, glycopeptides et osides

Les polysaccharides immunospécifique de Streptococcus A a été préparé selon FULLER (152) et Mc. CARTY (153) et l'ovomucoïde selon FREDERICQ et DEUTSCH (154).

La N-acétyl-lactosamine provenant de l'hydrolyse ménagée de glycopeptides de l'ovomucoïde ont été isolés suivant la méthode de MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (155). L'échantillon de mannobiose 1,6 a été mise à notre disposition par M. le Professeur MONTREUIL.

L'ovalbumine a été hydrolysée par la pronase et le mélange des glycopeptides a été isolé suivant la méthode de BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (156).

Les fibrino-glycopeptides ont été préparés selon le procédé de MESTER, MOCZAR, MEDGYESI et LAKI (157).

B - Hydrolyse des glycopeptides

La méthode d'hydrolyse ménagée des glycopeptides de MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (158) a été adoptée pour des petites quantités de l'ordre de quelques milligrammes. On a hydrolysé 1 à 5 mg de substance ayant une teneur minimale de 15 p. 100 en glucides, en présence de 100 à 200 mg d'Amberlite IR 120 (mesh 40, sous sa forme acide). Le tube est scellé, puis agité 1 heure au bain-marie à 100°C. On décante la solution, on lave la résine à l'eau distillée et on évapore à sec dans un dessiccateur sous vide, sur anhydrique phosphorique. On reprend le résidu d'évaporation dans 10 μ l d'eau et on en dépose 0,5 à 2 μ l pour un chromatogramme.

C - Chromatographie sur couche mince.

Les chromatogrammes bidimensionnels ont été obtenus sur cellulose microcristalline (plaque préfabriquée N° 1440 de Schleicher et Schüll) ainsi que sur poudres de silice (Kieselgel G "Merck").

Pour le développement des chromatogrammes nous avons utilisé les solvants suivants :

- 1) n-butanol-acide acétique-eau (12 : 3 : 5)
- 2) pyridine-acétate d'éthyle-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3)
- 3) n-propanol-acétate d'éthyle-eau (7 : 2 : 1)

○ Rhamnose

○ GlcNAc

2

1

Figure 13 -

Chromatogramme bidimensionnel des oligosides de polysaccharide immunospécifique de Streptococcus A sur cellulose microcristalline (Schleicher et Schüll 1440).
Solvants : n. butanol - acide acétique - eau (12 : 3 : 5) en première dimension, pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5 : 5 : 1 : 3) en deuxième dimension, Révélation par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISON.

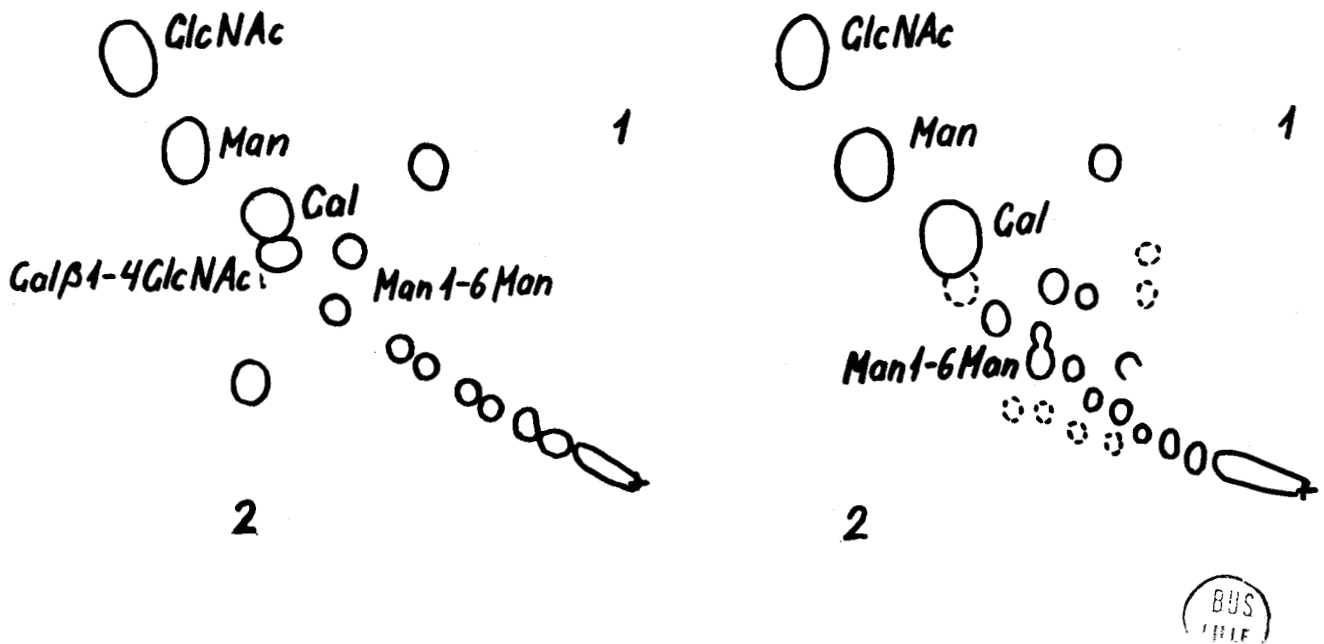


Figure 14 -

Empreintes des oligosides des fractions glucidiques des glycoprotéines sur cellulose microcristalline.
(a) Ovomucoïde ; (b) Fibrinogène.
Solvants : n - butanol - acide acétique - eau (12 : 3 : 5) en première dimension et pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5 : 5 : 1 : 3) en deuxième dimension.
Révélation par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISON (159).

On développe les couches de cellulose avec le solvant 1) en première dimension, puis avec le solvant 2) en deuxième dimension. Les couches de silice ont été développées avec les solvants 1) puis 3).

Pour obtenir une meilleure séparation des oligosides par migration sur une plus longue distance, la cuve de chromatographie doit être munie d'un dispositif de drainage par évaporation, comme décrit par BRENNER et NIEDERWIESER

On a obtenu également de bons résultats reproductibles en laissant les plaques dans la cuve, après que le solvant ait atteint le bord supérieur des plaques.

On développe les plaques pendant 16 heures avec le solvant 1) et pendant 6 à 8 heures avec les solvants 2), 3).

Les taches correspondant aux oligosides sont révélées sur les plaques de silice par pulvérisation avec H_2SO_4 3 N, ou par un mélange de H_2SO_4 3 N et d'une solution d'orcinol à 2 p. 100 (10 : 1) (v/v), suivi d'un chauffage à $110^\circ C$ pendant 15 minutes. Les plaques munies d'une couche de cellulose sont révélées en les trempant successivement dans une solution $AgNO_3$ à 1 p. 100 dans l'alcool à 90 p. 100 et après séchage dans une solution méthanolique de potasse 0,5 %.

RESULTATS ET CONCLUSIONS

La chromatographie des oligosides en deux dimensions sur cellulose microcristalline (plaque Schleicher et Schüll 1440) donne une meilleure séparation que celle obtenue pour chromatographie unidimensionnelle par chromatographie sur papier.

L'étude de la répartition des taches des oligosides de l'hydrolysât partiel des glycopeptides de l'ovomucoïde (CHOSSON et MONTREUIL) (160) et du fibrinogène (MESTER, HOCZAR et SZABADOS (161) isolés par chromatographie préparative sur papier indique que ce sont surtout des disaccharides qui se séparent par la méthode décrite.

Les chromatogrammes représentés par les figures 13 et 14 (p 46 bis) ont été réalisés sur les plaques Schleicher et Schüll 1440 et développés par les solvants 1 et 2.

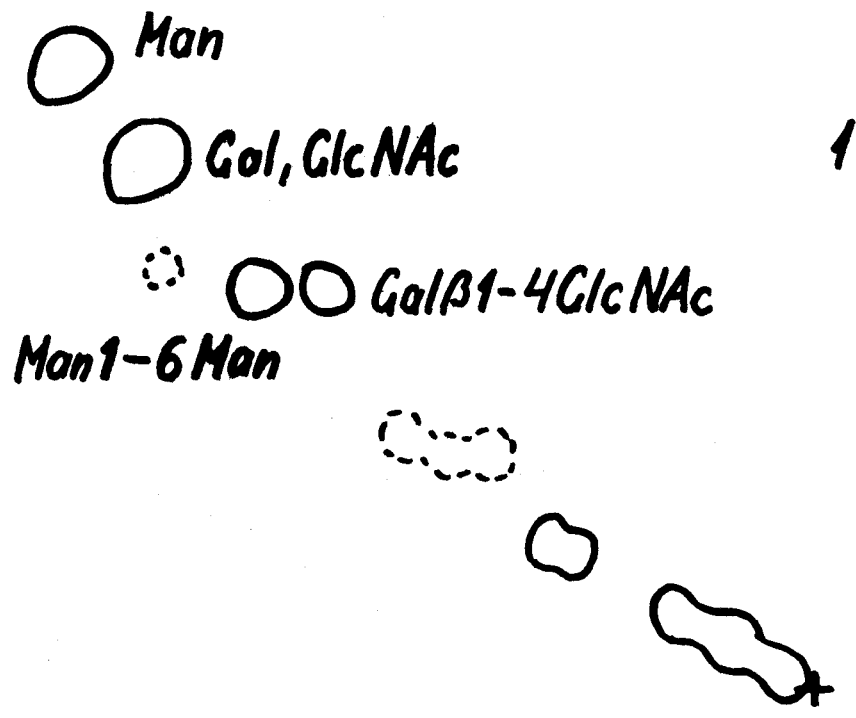


Figure 15 -

Chromatographie bidimensionnelle des oligosides de l'ovomucoïde sur Kieselgel G. développé par les solvants n-busanol-acide acétique-eau (12 : 3 : 5) en première dimension et n-propanol-acétate d'éthyle-eau (7 : 2 : 1) en deuxième dimension. Révélation par l'orcinol-sulfurique.



Le polysaccharide immunospécifique de Streptococcus A (HEYMANN, MANIELLO et BARKULIS) (162) est formé par des unités qui se répètent régulièrement et donne une empreinte très simple, représentée par la figure 13 (p.46 bis).

Les empreintes de l'ovomucoïde (fig. 14)(p.46 bis) et des glycopeptides provenant de l'hydrolyse enzymatique et du fibrinogène (fig. 14) sont plus complexes. Les taches de la N-acétyl lactosamine et d'un mannobiose 1,6 sont caractéristiques dans les chromatogrammes des hydrolysats de ces glycopeptides. Ces résultats sont en bon accord avec les travaux de MONTREUIL et coll. (163) CHOSSON et MONTREUIL (164), de MESTER et Coll. (165).

La fig.15 (p.47 bis) représente l'empreinte des oligosides de l'ovomucoïde sur une couche de Kieselgel G développée par les solvants 1 et 3. Le pouvoir séparateur de ces couches est nettement inférieur à celui des plaques de cellulose microcristalline. Ces chromatogrammes permettent néanmoins d'identifier rapidement la N-acétyl lactosamine.

Les résultats que nous venons d'exposer nous font penser que cette micro-méthode peut être utile pour l'étude comparative des oligosides de polysides ou de glycoprotéines disponibles en faible quantité.

3.3. ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DES GPS DE L'AORTE

Les glycoprotéines de structure de l'aorte pourraient être les substances spécifiques à l'organe. Il nous paraît donc intéressant d'étudier les glycopeptides provenant de l'hydrolyse protéasique de ces glycoprotéines. Ce chapitre expose nos résultats relatifs à la préparation, au comportement électrophorétique, chromatographique et à la composition osidique et peptidique des hydrolysats pronasiques provenant des différentes fractions des GPS :

- fraction extractible à l'eau (Eaq) de l'aorte de Porc et de Cheval
- résidu de l'extraction aqueuse (Raq) de l'aorte de Porc et de Cheval,
- fraction solubilisée dans l'urée 8 M (Us) du résidu de l'extraction aqueuse de l'aorte de Porc (voir fig. 8), (p.19)

Les expériences concernant l'étude du groupement polyosidique, ainsi que la nature du type de la liaison glycanne-protide dans les GPS Eaq et Us de l'aorte de Porc sont décrites au chapitre 3.4 "ETUDE SUR LE GROUPEMENT POLYOSIDIQUE".

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

a - GPS de l'aorte :

Les fractions de GPS Eq Raq de l'aorte de Porc et de Cheval et la fraction Us de l'aorte de Porc sont préparées comme décrit au CHAPITRE 3.1.

b - Enzyme :

Pronase de Streptomyces Griseus (SIGMA), Carboxypeptidase A bovine (SIGMA) repurified type V en suspension dans toluène-eau.

c - Adsorbants chromatographiques :

Sephadex G 25 et G 75 (Pharmacia), Carboxyméthylcellulose type 52 "preswollen" (Whatman) DEAE Cellulose (type DE 52 "preswollen"). ; Chromatoplaques de cellulose micro-cristalline (Schleicher Schüll 1440), de silice (Schleicher Schüll 1550) ; Feuilles chromatographiques de KODAK 511 V ; Résines d'échangeurs d'ions : Amberlite IR 120, Amberlite IR 400.

d - Electrophorèse sous haute tension :

appareil Gilson

support : papier Whatman N° 3.

e - Substances témoins pour l'estimation du poids moléculaire glycopeptide du fibrinogène, (MESTER et coll.) (166) et le cytochrome.

f - Réactifs :

Orcinol (Merck) ; 3,4 diméthylaminobenzaldéhyde (Merck) ; ninhydrine, dinitrofluorbenzène, acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) (Touzart) chlorure de cadmium, Tris (hydroxyméthylamino) méthane (Prolabo) ; Pyridine, acide acétique, butanol, acétate d'éthyle, méthyléthylcétone, chloroforme, alcool butylique tertiaire purs (Prolabo).



METHODES

A - Hydrolyse protéinasique des glycoprotéines de structure

1 - Hydrolyse simple (NEUBERGER, PAKKOFF) (167).

1 g de GPS sont mis en suspension dans 15 ml d'une solution de Tris 0,05 M et CaCl₂ 0,01 M tamponnée par HCl 2 N à pH 8,0 (BUTLER et CUNNINGHAM) (168) en présence de 20 mg de pronase. Le système est maintenu à 47° (pendant 70 h. en présence de toluène.

2 - Hydrolyse successive par la pronase

Les GPS Ea_q et Us de l'aorte de Porc ont été hydrolysés selon le procédé de YAMASHINA et MAKINO (169) : trois hydrolyses successives à 47° C (de chacune 48 h. deux hydrolyses en cas de Us de Porc) par la pronase (rapport substrat/enzyme 1 : 50) à pH 8,0 dans une solution de CaCl₂ 0,1 M de BUTLER et CUNNINGHAM (170). Les hydrolysats provenant de chaque étape ajustés à pH 4,5 avec de l'acide acétique sont concentrés en ne dépassant pas 30°C au vingtième de volume d'original, et additionnés de 20 volumes d'éthanol absolu. Le précipité est obtenu par centrifugation.

B - Isolement des glycopeptides

Nous avons employé la chromatographie d'exclusion sur Sephadex G 25. La colonne (diamètre 2,5 cm , hauteur 80 cm) est éluée à la température ambiante par la solution pyridine acide acétique 0,1 M eau tamponnée à pH 5,3. Dans les fractions éluées des hydrolysats pronasiques les courbes d'élution sont tracées à l'aide de réaction à l'orcinol et du réactif à l'acide trinitrobenzène sulfonique (OKUYAMA et SATAKE) (171). Les fractions correspondantes au maximum de la courbe d'élution obtenue par la réaction à l'orcinol sont concentrées sous vide (1 ml. de vol. environ) puis lyophilisées.

C - Séparation des glycopeptides

1 - Electrophorèse

L'électrophorèse à 5.000 V est réalisée dans un tampon pyridine-acide acétique-eau (25 : 1 : 225) à pH 6,3 et dans une solution tampon de borate de sodium à pH 9,2 sur un support de papier Whatman N° 3. Les taches sont révélées à la ninhydrine.

Les électrophorogrammes préparatifs destinés à l'isolement des fractions séparées sont effectués de la manière suivante : les volumes de 50 à 100 μ l de solutions de glycopeptide (correspondant à 2-6 mg) sont déposés sur les feuilles de papier en un trait continu de 15-18 cm de longueur. Après développement et séchage de l'électrophorogramme, deux bandes sont découpées de part et d'autre de la feuille dans le sens de la migration du système solvant chacune entamant 1,5 cm la ligne de départ. Révélées, elles servent à repérer l'emplacement des fractions positives à la ninhydrine. Les bandes de papier correspondant à chacun de ceux-ci sont découpées et éluées selon la méthode de DENT (172). Les solutions sont recueillies dans des récipients contenant une goutte de toluène pur.

2 - Chromatographie sur CM-Cellulose

La séparation a été pratiquée sur CM Cellulose (type 52 - "preswollen" Whatman) des glycopeptides bruts de l'aorte de Cheval en opérant avec le gradient de concentration linéaire d'acétate de pyridine 0,005 - 0,5 M à pH 4,1 (JOLLES) (173). La colonne (diamètre 1,5 cm ; hauteur 20 cm) est équilibrée avec une solution d'acide acétique 0,005 M tamponnée avec la pyridine 0,05 M à pH 4,1. L'éluion est réalisée avec le gradient linéaire à la température ambiante. La courbe d'éluion des glucides est obtenue par la réaction à l'orcinol (RIMINGTON) (174) et celle des peptides par le réactif à l'acide trinitrobenzène sulfonique (OKUYAMA et SATAKE) (175).

3 - Chromatographie sur DEAE-cellulose

La chromatographie sur DEAE-cellulose a été appliquée aux glycopeptides bruts de GPS (Raq) de l'aorte de Cheval. La colonne d'un diamètre de 1,2 cm et d'une hauteur de 30 cm est équilibrée avec une solution de Tris 0,005 M tamponnée à pH 8,0. (JOLLES) (176) et (SPIRO) (177). La colonne a été éluée par le tampon Tris HCl à pH 8,0 0,005 M pendant 4 heures, puis par le gradient 0,005 - 0,5 M à pH 8,0. Dans les effluents de la colonne la courbe d'oses est tracée à l'aide de réactif à l'orcinol (RIMINGTON) (178).

4 - Dinitrophénylation des glycopeptides bruts

Dans le but de séparer les glycopeptides et les peptides, la méthode de dinitrophénylation selon SANGER (179) a été pratiquée sur les mélanges des glycopeptides isolés après la 3e hydrolyse pronasique du glycoprotéine (Eq) et la deuxième hydrolyse enzymatique de GPS (Us) de l'aorte de Porc.

La séparation des glycopeptides et des substances non glycopeptidiques dinitrophénylés a été tenté par chromatographie bidimensionnelle sur papier et sur couche mince en cellulose microcristalline, et sur silice.

Système de solvants :

- 1) EtOAc - pyridine-eau (5 : 5 : 1 : 3)
- 2) n-BuOH-ACOH-H₂O (12 : 3 : 5) (papier, cellulose microcristalline)
- 3) CHCl₃-tert BuOH-ACOH (72 : 28 : 3) (plaque de silice)
- 4) EtOAc-pyridine-eau (10 : 5 : 1 : 3)

Chromatographie préparative sur papier (feuilles de 35 x 35 cm.) par la méthode ascendante a été suivie d'une élution par la solution de NaHCO₃ à 0,1 %.

D - Recherche de la fonction C-terminale

L'attaque de la fonction C-terminale par la carboxypeptidase A comme décrit par BROWN et coll. (180), DUS, BARTSCH et KALLEN (181) a été effectuée sur Ea_q et Us glycopeptide de l'aorte de Porc. 2 mg. de glycopeptide 100 μ -g. de carboxypeptidase A bovine (SIGMA) en suspension dans toluène-H₂O sont incubés à pH 8,6 à la température ambiante. On a effectué les prélèvements après 30 minutes, 1 h., 2 h., 3 h., 4 h., et 48 h., également à partir des solutions témoins comme :

- 1) glycopeptide seul
- 2) enzyme seul.

Aux solutions aliquotes prélevées, une goutte d'acide acétique est additionnée pour arrêter la réaction. Les échantillons lyophilisés ont été examinés en chromatographie sur couche mince.

E - Recherche de la fonction N-terminale

La méthode de dinitrophénylation selon SANGER (182) a été appliquée sur les composants isolés par électrophorèse préparative.

2 mg. de glycopeptide sont dissous dans 200 μ l NaHCO₃ à 1 % en présence de 200 μ l de solution de dinitrofluorbenzène (DNFB) à 1 % dans l'alcool. Après agitation pendant 2 heures à la température ambiante à l'abri de la lumière, la

solution est diluée par l'eau et extraite par acétate d'éthyle jusqu'à obtention d'une phase organique incolore. La phase aqueuse est acidifiée par addition d'une goutte d'acide acétique, puis extraite par l'acétate d'éthyle jusqu'à décoloration de la couche organique. Le résidu aqueux est extrait par le *n*-butanol. L'extrait doit être incolore. La solution est passée dans une colonne d'échangeurs de cations (faiblement acide) est évaporée à siccité au dessiccateur sous vide sur P_2O_5 .

Après l'hydrolyse acide (acide chlorhydrique 6 N pendant 8 heures à 105° sous une atmosphère d'azote) l'hydrolysate est dilué par 2 volumes d'eau et extrait par l'éther (BISERTE et OSTEU) (183). Les phases séparées sont évaporées en dessiccateur sous vide. Les acides aminés dinitrophénylés sont identifiés par chromatographie sur couche mince selon NIEDERWIESER et PATAKI (184). La chromatoplaque : en silice (Schleicher Schüll 1500) et les systèmes de solvants suivants ont été utilisés :

- $CHCl_3$ - tert - BuOH - ACOH (72 : 28 : 3)
- $CHCl_3$ - MeOH - HCOOH (80 : 20 : 2)
- $CHCl_3$ -MeOH-NH₄OH 17 % (2 : 2 : 1)

La saturation de la cuve chromatographique est assurée en couvrant sa paroi opposée à la chromatoplaque par une feuille de papier Whatman N° 1.

F - L'hydrolyse acide des osides

L'hydrolyse acide à propos de la détermination du rapport molaire en oses neutres et osamines a été réalisé, selon le mode opératoire décrit au chapitre 3.2.1. "Microdétermination des oses neutres et osamines par chromatographie en couche mince d'un polymère synthétique" (Techniques expérimentales p.40)

G - Techniques d'analyse

1 - Dosages colorimétriques

Pour les dosages colorimétriques des hexoses, hexosamines et acides uroniques, nous nous référons aux travaux de MONTREUIL et SPIK (185). Les glycopeptides obtenus après l'hydrolyse pronasique sont soumis à la chromatographie sur Sephadex G 25, suivie d'analyse des fractions aliquotes par la méthode à

l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (186) modifiée par RIMINGTON (187) pour les oses, et à la méthode à l'acide trinitrobenzène sulfonique de OKUYAMA et SATAKE (188) ou par la réaction à la ninhydrine (MOORE et STEIN) (189) pour les peptides. Dans les glycopeptides la teneur en hexoses a été déterminée par la réaction à l'orcinol sulfurique (TILLMANS et PHILIPPI) (190) ; (RIMINGTON) (191), et celle en hexosamines selon la méthode d'Elson-Morgan modifiée par PALMER, SMYTH et MEYER (192). L'acide uronique a été recherché par la méthode colorimétrique de DISCHE (193).

2 - Méthodes chromatographiques sur couche mince

a - Identification des acides aminés

Les acides aminés sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (Cellulose microcristalline, Schleicher Schüll 1440 S).

Le mélange : acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3) est utilisé dans la première dimension (ascendante) et le système de solvant : n-BuOH-acide acétique-eau (12 : 3 : 5) dans la deuxième dimension.

La chromatographie est pratiquée dans une cuve horizontale pendant 16 heures dans la deuxième dimension (drainage continu) (BRENNER et NIEDERWIESER) (194). Les taches correspondant aux acides aminés et hexosamines sont révélées par trempage des plaques dans la solution de diéthylamine-MeCOEt-EtOH (0,1 : 1 : 98,9) suivi d'un séchage rapide par un courant d'air chaud. Les plaques sont trempées successivement dans une solution de ninhydrine à 0,2 % et chauffées à 100°C pendant 1 minute. Ce mode opératoire nous permet d'identifier la sérine et la glycine ayant un R_f voisin, mais donnant une coloration différente.

L'estimation semi-quantitative de l'intensité (relative) des taches correspondant aux acides aminés est effectuée 1) après élution des taches obtenues par la méthode à la ninhydrine et à l'acétate de cadmium de HEILMANN-BARROLIER et WATZKE (195), (MUNIER, THOMMEGAY et SARRAZIN) (196) : 2) par appréciation visuelle de l'intensité des taches révélées à la ninhydrine. On a comparé d'une part l'intensité des taches données par les acides aminés présents et d'autre part par des solutions titrées.

Méthode de MUNIER, THOMMEGAY et SARRAZIN (197) : Les taches sont révélées par le réactif à la ninhydrine et à l'acétate de cadmium. On a procédé à l'élution des taches par un mélange de méthanol/acide acétique glacial (95 : 5) et au dosage spectrophotométrique de l'éluat à 500 m μ .

b - Détermination des rapports molaires des oses et osamines

Les proportions molaires des hexoses et hexosamines présents dans les glycopeptides ont été déterminés par évaluation photodensitométrique des taches correspondantes aux oses séparés par chromatographie sur couche mince en polycarbonate. La technique est décrite au CHAPITRE 3.2.1. (Microdétermination des oses neutres et osamines par chromatographie en couche mince d'un polymère synthétique).

c - Estimation du poids moléculaire selon ROBERTS (198).

Les chromatoplaques en Sephadex G 75 de dimensions 10 x 20 cm ont été utilisées. Les plaques fraîchement préparées en état humide sont équilibrées pendant 14 heures dans une cuve contenant l'acide acétique 0,1 N. On dépose les solutions correspondant aux 50 μ g de substance environ, à partir des substances témoins (cytochrome et glycopeptides du fibrinogène) (NESTER et coll.) (199), et des substances au poids moléculaire inconnu. On laisse développer la plaque en utilisant l'eau comme solvant dans une cuve assurant un drainage continu. On laisse monter le solvant jusqu'à ce que la substance marqueuse, l'acide aspartique dinitrophénylé, atteint la moitié de la plaque. Les peptides sont révélés au réactif du chlore et tolidine : (REINDEL et HOPPE) (200), (STAHL) (201). La plaque est abandonnée dans une atmosphère de chlore (5-10 minutes si le Cl₂ est obtenu d'une bouteille ; 15-20 minutes si le Cl₂ s'est dégagé au cours de la réaction de KMnO₄ à 1,5 % dans l'eau et de HCl à 10 %).

L'excès de chlore est chassé en laissant s'aérer la plaque pendant 2 à 3 minutes à l'air (hotte). On pulvérise la plaque ensuite par un réactif à l'ortho-tolidine et au iodure de potassium dont la composition est la suivante : 160 mg o-tolidine sont dissous dans 30 ml acide acétique glacial. On complète le volume à 500 ml par l'eau distillée et on y ajoute 1 g d'iodure de potassium.

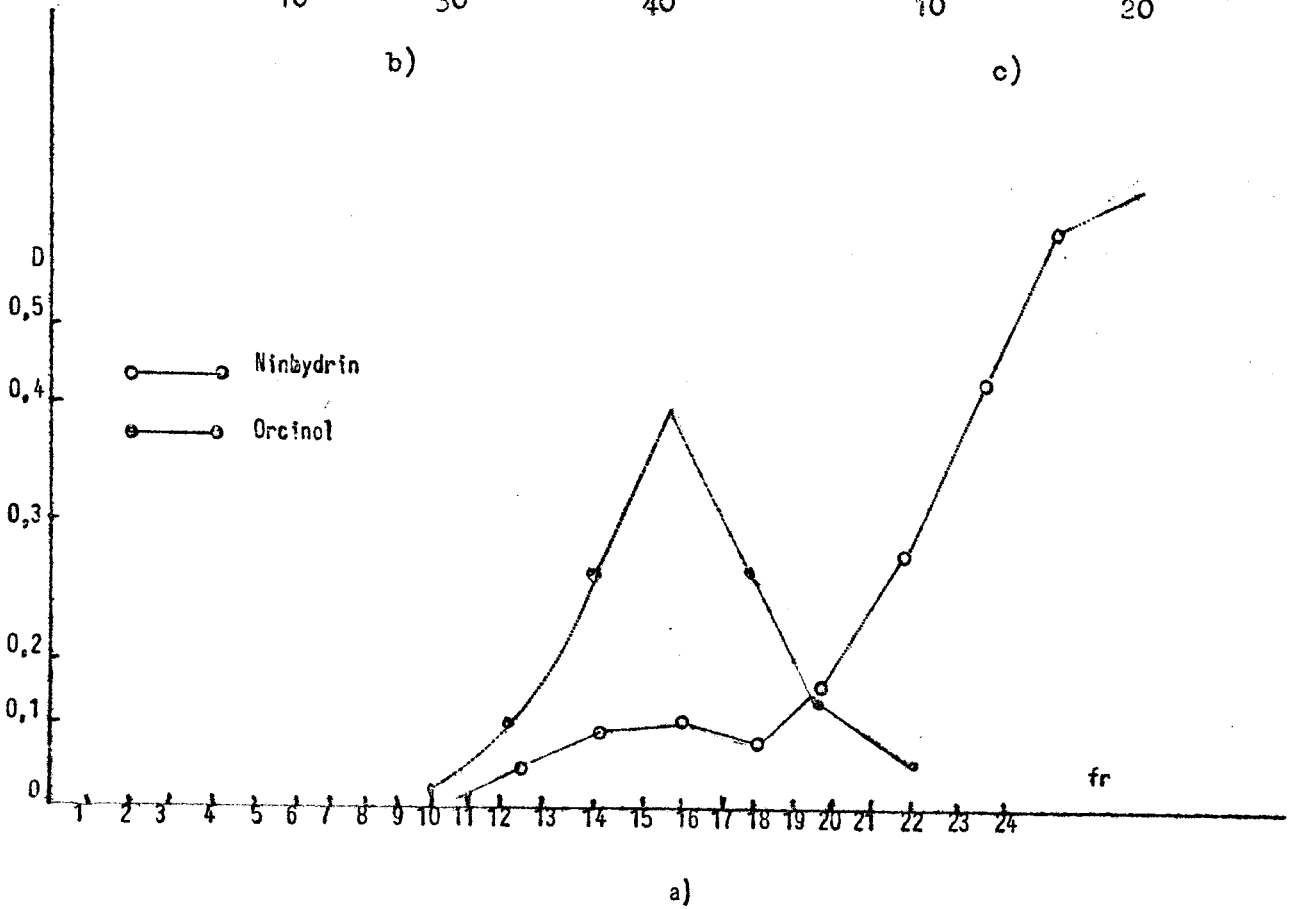
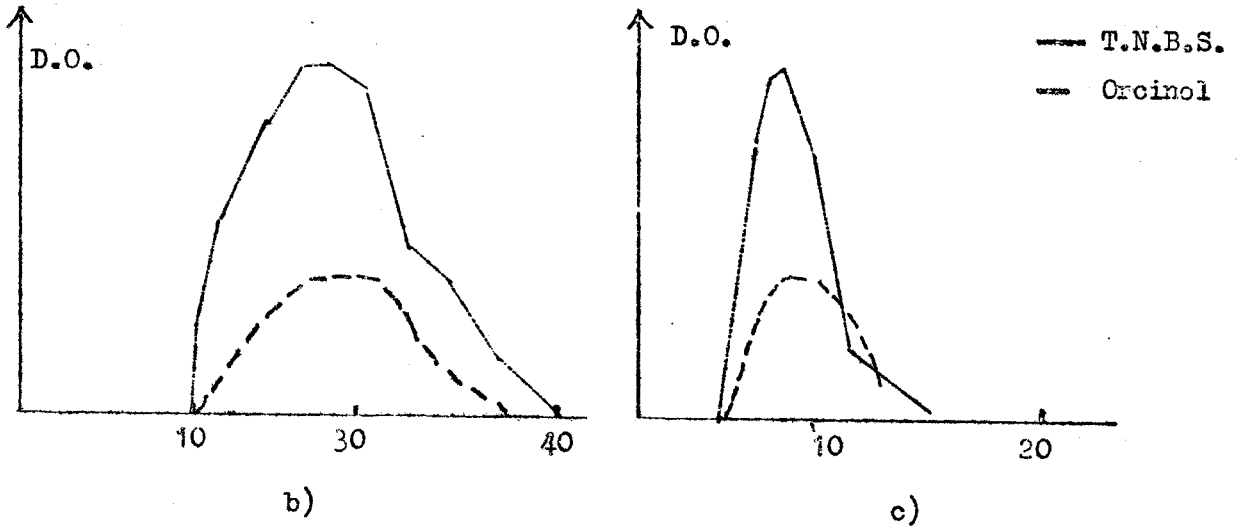


Figure 15



TABLEAU 11

	GLYCOPEPTIDES BRUTS PROVENANT DES FRACTIONS			
	P O R C		C H E V A L	
	Eaq	Raq	Eaq	Raq
<u>TENEUR CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>				
Hexoses	35 %	30 %	20,8 %	19 %
Hexosamines	14 %	13,5 %	14 %	21 %
Acide Uronique	0	0	0	0
<u>PROPORTIONS MOLAIRES DES OSES</u> <u>galactose/glucose/mannose</u> <u>après l'hydrolyse ménagée</u>	1:0,83:0,77	1:0,2:1,1	1:0,4:0,8	1:0,3:1
<u>après l'hydrolyse totale</u>	1:0,33:1,1	1:0,17:1,2	1:0,27:1,1	1:0,23:0,6
<u>PROPORTION MOLAIRES DES OSAMINES.</u> <u>Glucosamine : galactosamine</u>	3:1	5,7:1	4:1	1:0
<u>ACIDES AMINES PRESENTS</u>	Ala, Asp. Gly, Glu OHlys, Thr Cys, Pro Ser	Ala, Asp. Gly, Glu Ser, Thr OHlys, Cys Pro	Ala, Asp. Glu, Gly Ser, Thr Cys, Pro	Ala, Asp, Glu, Gly OHlys, Ser Cys

BUS
LITTLE

R E S U L T A T S

A - Hydrolyse protéinasiqne des glycoprotéines

Les GPS présents dans l'aorte de Porc et de Cheval soumises à l'hydrolyse protéinasiqne suivie d'une chromatographie d'exclusion sur des colonnes de Sephadex G 25 fournissent les effluents que nous avons analysés par la réaction à l'orcinol et de la ninhydrine. La figure 15 (p.56) des courbes d'élution nous indiquent qu'on peut isoler des fragments peptidiques enrichis en hexoses. Les résultats d'analyse des glycopeptides bruts sont résumés dans le tableau 11 (p.57) Galactose, glucose, mannose, glucosamine et galactosamine sont présents dans les fractions glucidiques. L'acide uronique est absent. Parmi les hexosamines, on peut observer une prédominance de glucosamine. La comparaison des rapports molaires du galactose : glucose : mannose après l'hydrolyse ménagée et l'hydrolyse totale démontre une différence dans les deux différentes GPS de l'aorte de Porc et de Cheval étudiées. La composition en acides aminés semble être ressemblante : acide aspartique, alanine, acide glutamique, glycolle, sérine et thréonine sont présents dans chaque glycopeptide brut étudié.

Nous avons appliqué l'hydrolyse successive par la pronase selon le procédé de YAMASHINA et MAKINO (202).

Nous avons tenté d'éliminer les protéides dans l'hydrolysate brut par l'addition d'acide trichloracétique à 10 % (v/v) préconisée par YAMASHINA (203) et MONTREUIL et coll. (204) (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL) (205) (206). L'électrophorèse et l'identification des acides aminés nous confirment l'avantage de cette méthode surtout dans le cas de Eaq glycoprotéine (Fig. 16 p. 59). Nous voudrions signaler cependant que nous avons observé une perte en glycopeptide pendant le traitement par l'acide trichloracétique.

Il est possible que cette perte soit due aux manipulations. Les quantités des glycopeptides dont nous disposons après la 3e digestion est à l'ordre de quelques milligrammes. Nous avons donc poursuivi les hydrolyses successives comme ci-dessus, sans défécation à l'acide trichloracétique.

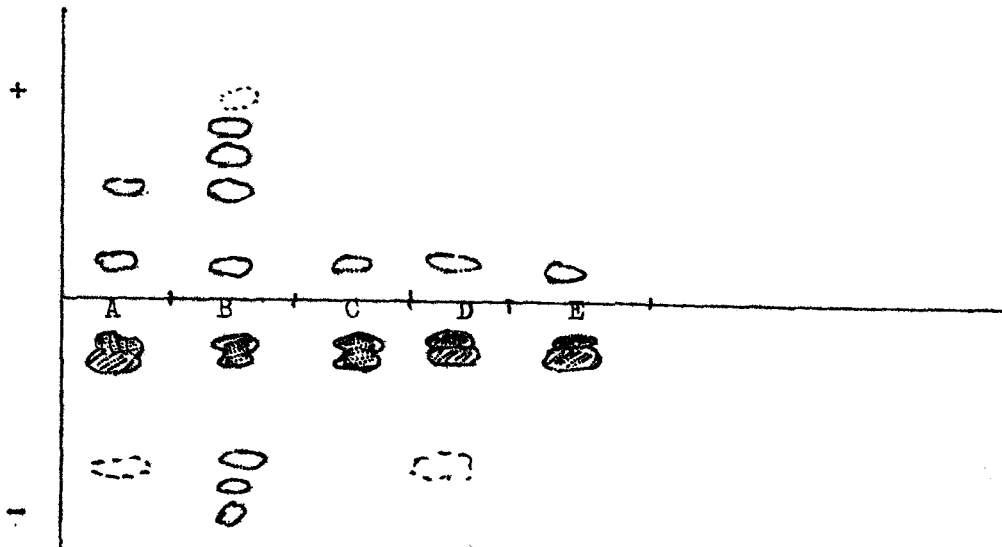


Figure 16

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 en tampon pyridine-acide acétique-eau (25 : 1 ; 225) à pH 6,3 à 50 V/cm. pendant 2 h. Révélation par la ninhydrine

Electrophorégrammes des hydrolysats pronasique à partir de :

- (a) Glycoprotéine hydrosoluble (Eaq de Cheval)
- (b) glycoprotéine insoluble dans l'eau (Raq de Cheval)
- (c) glycoprotéine hydrosoluble (Eaq de Porc) après défécation du glycopeptide par l'acide trichloracétique
- (d) glycoprotéine hydrosoluble (Eaq de Porc), glycopeptide brut sans le traitement par l'acide trichloracétique.
- (e) glycoprotéine insoluble dans l'eau (Raq de Porc).

B - Comportement électrophorétique et chromatographique

1 - Electrophorèse

L'électrophorèse sous haute tension révèle l'hétérogénéité des glycopeptides bruts provenant de la première hydrolyse enzymatique des GPS de l'aorte de porc et de cheval (Fig. 16 p.). Les glycopeptides bruts de GPS de l'aorte de Porc se dissocient en 3 à 4 constituants. Dans les glycopeptides bruts des GPS de l'aorte de Cheval 5 à 10 constituants peuvent être mis en évidence. Les constituants principaux des hydrolysats pronasiques possèdent un caractère "neutre". Ils sont ninhydrine-positifs et migrent très légèrement en partie vers l'anode, et d'autre part vers la cathode.

Les électrophorégrammes révélés à la ninhydrine des glycopeptides bruts des différentes fractions de GPS de l'aorte de Porc sont démontrés sur la figure 17 (p. 61).

On a tenté également la séparation dans une solution borate de soude tamponnée à pH 9,2 pour obtenir des informations sur la présence des osides dans les composants fractionnés en électrophorèse. Après avoir révélé les taches par le réactif à l'acide trinitrobenzène sulfonique, l'électrophorégramme a été difficile à interpréter à cause de la mauvaise séparation des constituants (formation de traînées). Nous avons donc procédé à l'électrophorèse préparative dans le tampon d'acétate de pyridine et à l'analyse des fractions éluées. La chromatographie des acides aminés et l'estimation des proportions des oses a été effectuée sur ces fractions, et les résultats sont représentés sur le tableau 12 (p.62). Les résultats nous montrent que la fraction 2 qui est le constituant majeur, ainsi que les autres constituants révélés (3 ou 4 selon le type de l'hydrolysat) sont tous des glycopeptides.

Les hydrolyses successives par la pronase appliquées aux GPS, Eaq Us de l'aorte de Porc ont été suivies d'électrophorèse sous haute tension à pH 6,3. Les résultats que nous avons obtenus en électrophorèse sont représentés sur la figure 18 (p.63). Les glycopeptides de GPS Eaq se dissocient en 4 et celui de Us en 3 constituants. Nous représentons les rendements sur le tableau 13 (p. 65).

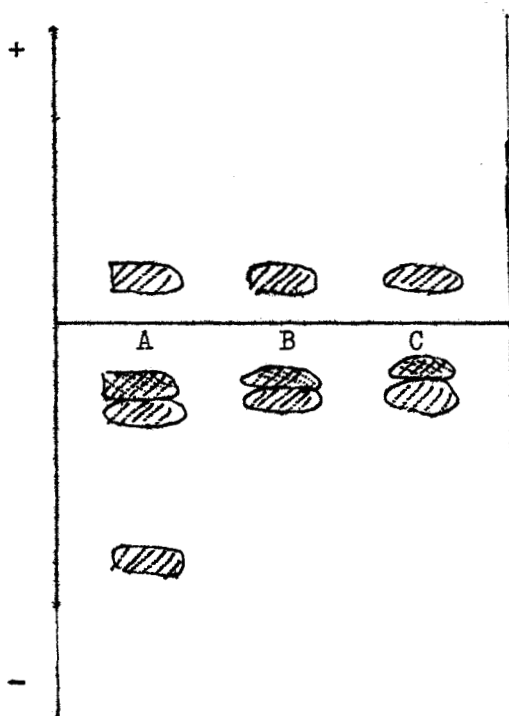


Figure 17

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 à 50 V/cm en tampon pyridine-acide acétique-eau (25 : 1 : 225) à pH 6,3 pendant 2 h des glycopeptides A, Ea_q, B, Ra_q, C, Vs de l'aorte de Porc. Révélation par le réactif à la ninhydrine.



TABLEAU 12

HYDROLYSE PRONASIQUE DES GPS DE L'AOORTE DE PORC.

FRACTIONS Eaq et Raq .

Glycopeptides séparés par électrophorèse		Hexoses	Hexosamines	Acides aminés
Eaq	N° 1	galactose glucose mannose	glucosamine	Ala, Asp, Gly, Glu, Ser, Thr OH Lys
	N° 2	galactose glucose mannose	glucosamine	Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Pro, Thr.
	N° 3	galactose mannose	glucosamine 2 galactosamine 1	Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Pro, Thr.
	N° 4	galactose glucose mannose	glucosamine galactosamine	Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr.
Raq	N° 1	galactose glucose mannose	glucosamine	Glu, Gly, Ser, Thr. OHLys, Pro.
	N° 2	galactose mannose	glucosamine	Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr, OHLys, Pro.
	N° 3	galactose mannose	glucosamine galactosamine	Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr.



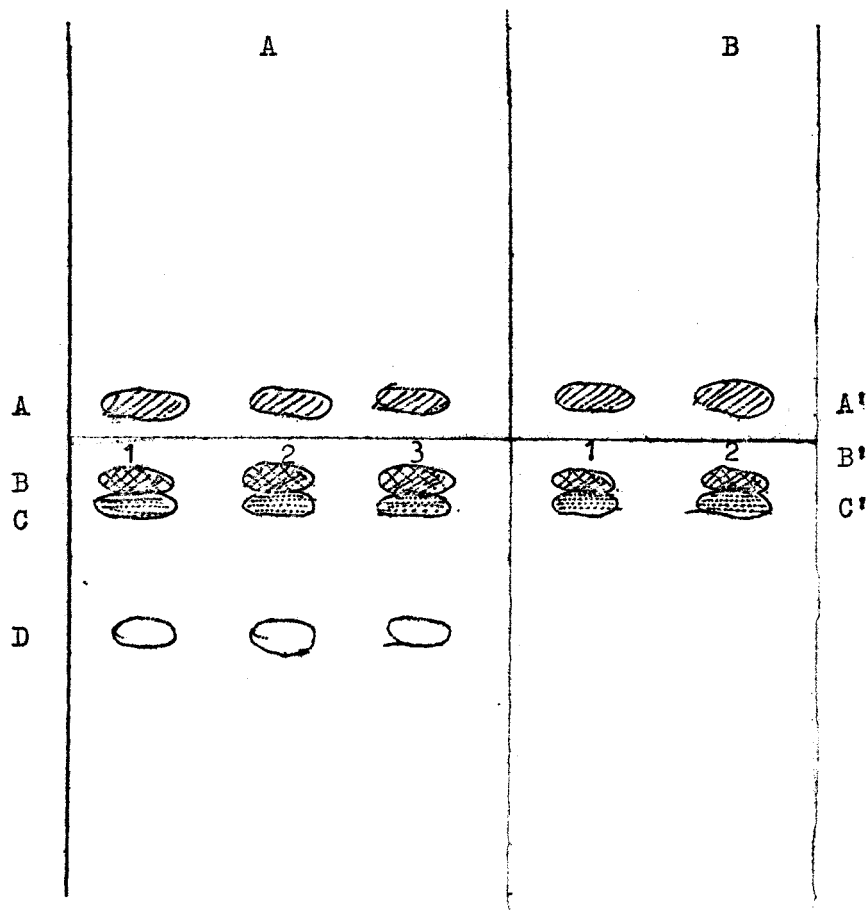


Figure 18

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 à 50 V/cm pendant 2 h en tampon pyridine-acide acétique-eau (25 : 1 : 225) à pH 6,3 des glycopeptides provenant des hydrolyses pronasiques successives des glycoprotéines :

A) Glycoprotéine extractible par l'eau de l'aorte de porc (Eaq)

B) Glycoprotéine insoluble dans l'eau extractible à la solution d'urée 8 M (Us) de l'aorte de porc. Révélation par la ninhydrine. Les chiffres de 1 à 3 désignent le nombre de l'hydrolyse pronasique effectuée.

BUS
LILLE

2 - Chromatographie sur colonne de carboxyméthyl-cellulose

La séparation a été pratiquée sur CM-cellulose (type 52 "preswollen des glycopeptides bruts de l'aorte de Cheval en opérant avec le gradient de concentration d'acétate de pyridine 0,005 M-0,5 M. La courbe d'orcinol et celle de peptide par TNBS obtenues dans la solution effluente montrent deux importants pics des oses, superposables avec les pics des peptides (figure 19) (p.66). Les pics des glucides ne sont pas bien séparés.

Les pics des glucides sont soumis à l'électrophorèse à 5.000 V et révélés par la ninhydrine. Le résultat est représenté sur la figure 20 (p.67).

La tache plus importante (légère migration vers l'anode) est présente dans la fraction N° 1 à l'état apparemment pur, de moins c'est la seule tache ninhydrine positive. Cette tache a été éluée, hydrolysée. La substance ninhydrine positive est un glycopeptide contenant de l'acide aspartique, de l'acide glutamique de la glycine, sérine, glucosamine, galactose et mannose (ces derniers dans la proportion de 1 : 1,72.

3 - Chromatographie sur la colonne de DEAE-cellulose

La courbe d'orcinol obtenue dans les effluents de colonne est représentée sur la figure 21 (p. 69).

La colonne a été éluée par le tampon Tris-HCl à pH 8,0 0,005 M pendant 4 heures puis par le gradient. La première opération a donné deux importants larges pics positifs à l'orcinol, correspondants aux fractions majeures obtenues par électrophorèse. L'électrophorèse des effluents positifs à l'orcinol de colonne de cellulose échangeuse d'ion comparativement à l'hydrolysât pronasique brut n'a pas démontré la supériorité de la séparation chromatographique par rapport à l'électrophorèse.

4 - Estimation du poids moléculaire

Le poids moléculaire estimé sur les plaques de Sephadex G 75 utilisant les glycopeptides de fibrinogène (PM : 2.500) et le cytochrome (poids moléculaire : 12.000) comme substance de référence se situe aux environs de 3.000 comme valeur moyenne

TABLEAU 13

Rendement des glycopeptides séparés par électrophorèse (mg/gGPS)

Fractions séparées en électrophorèse	GPS de l'aorte de Porc	
	EAq	Us
A	-	2,11
B	1,5	3
C	1,2	1,6
D	1,63 (x)	néant



(x) Faible teneur en glucides.

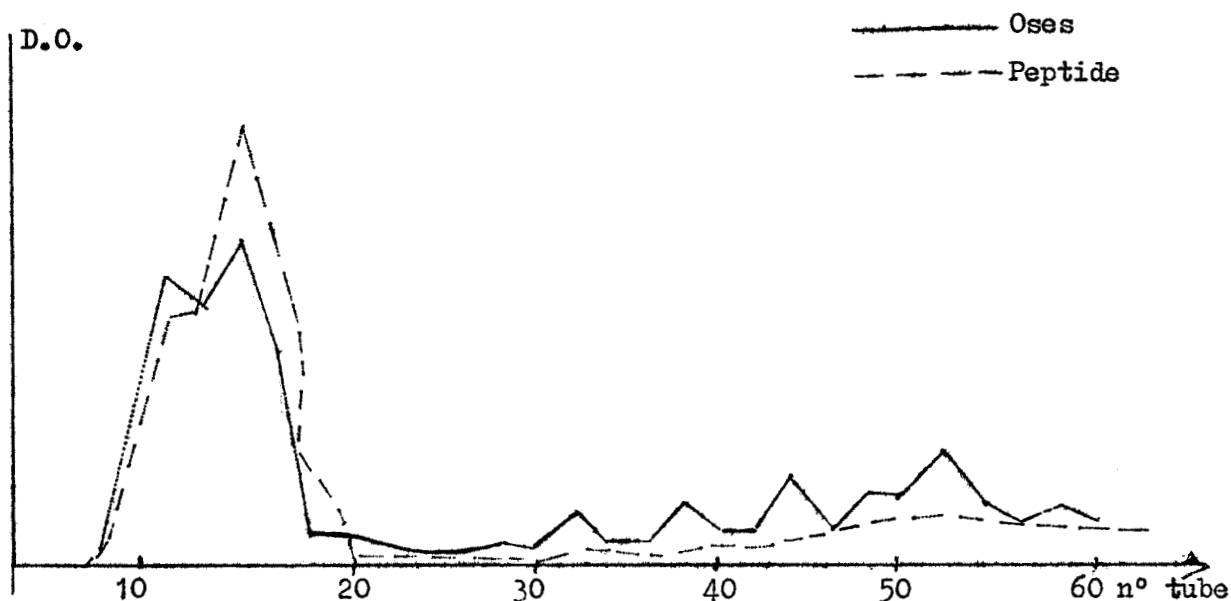


Figure 19

Diagramme de fractionnement des glycopeptides des GPS (Raq) de l'aorte de Cheval préalablement purifiés par chromatographie sur Sephadex G 25, sur colonne (1,5 x 20 cm) de carboxy-méthylcellulose de Whatman (type CM 52 "preswollen") pour 10 mg de préparation. Elution par le gradient linéaire de concentration d'acétate de pyridine 0,005 - 0,5 M à pH 4,1 ; fractions de 2,5 ml, débit 0,2 ml/mn. En traits pleins : dosage des glucides par le réactif à l'orcinol, en traits pointillés : dosage des protides par l'acide trinitrobenzène sulfonique. En ordonnée, densité optique, en abscisse : numéro du tube de l'éluat.

BUS
LII

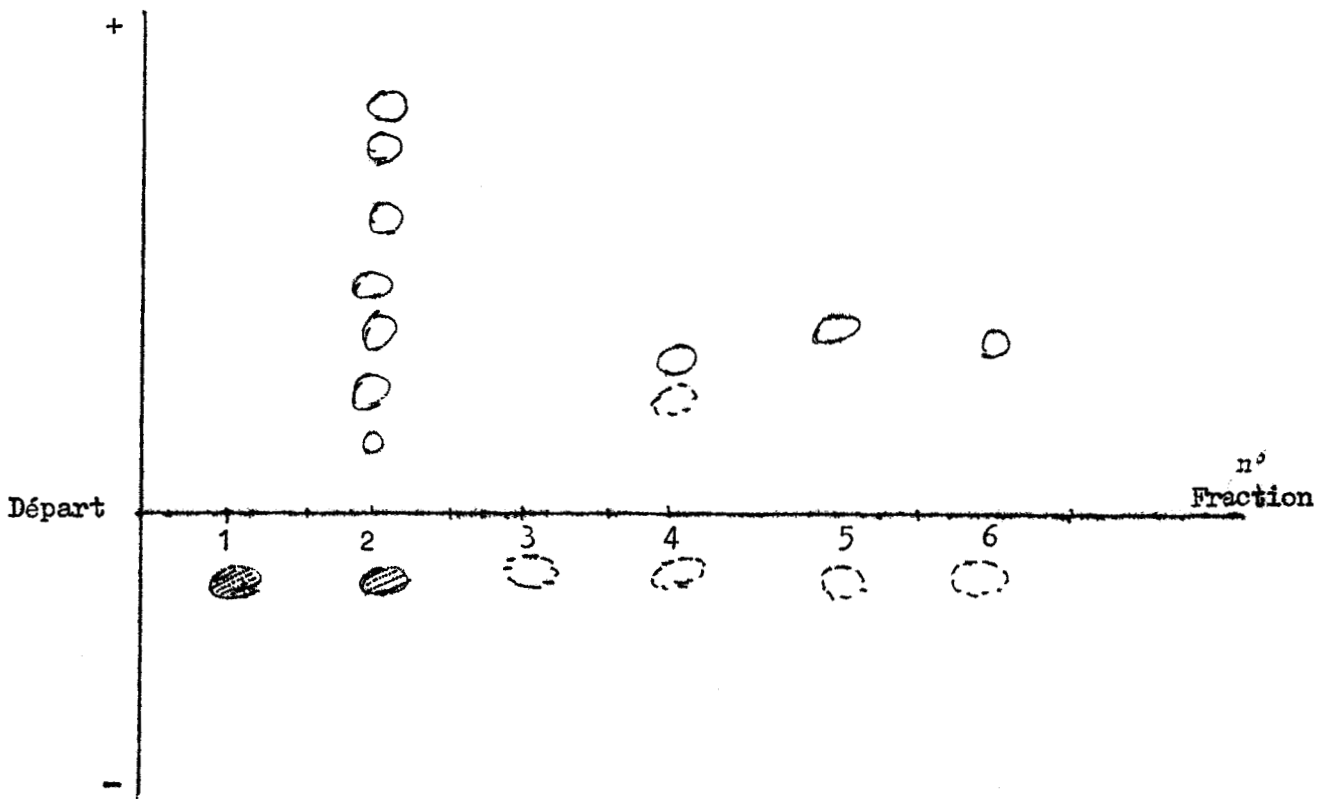


Figure 20

Sous-fractionnement électrophorétique sur papier Whatman n° 3 des fractions des glycopeptides des GPS (Raç) de l'aorte de Cheval obtenues par chromatographie sur CM cellulose, à 50 V/cm car pendant 2 heures, à pH 6,3. Révélation par la ninhydrine.



C - Etude de la séparation des glycopeptides et des substances non glycopeptidiques par dinitrophénylation.

Nos essais ont porté sur la séparation des DNP-glycopeptides-peptides par chromatographie bidimensionnelle sur papier et sur couche mince en silice et cellulose microcristalline. Les systèmes de solvants EtOAc-pyridine-AcOH-H₂O (5 : 5 : 1 : 3) (FISCHER NEBEL) et de CHCl₃ tert. BuOH-AcOH (72 : 28 : 3) dans la première dimension, BuOH-AcOH-H₂O (12 : 3 : 5) ou le mélange de FISCHER-NEBEL en deuxième dimension n'ont pas donné la migration satisfaisante sur plaque de silice.

La chromatographie préparative sur papier suivie d'une élution par NaHCO₃ à 0,1 % nous a démontré la présence de 5-7 % des peptides. L'hétérogénéité de DNP-glycopeptide s'est révélée après l'hydrolyse acide et l'extraction à l'éther (BISERTE et OSTEUR) (207).

D - Composition des glycopeptides

La composition des glycopeptides bruts provenant des fractions GPS Eaq. et Raq est résumée sur le tableau 11 (p. 57). L'électrophorèse sous haute tension de ces substances a démontré qu'elles sont constituées de plusieurs fragments glycopeptidiques (voir tableau 12, (p. 62) figures 16 (p.59) et 17 (p.61)). Les résultats groupés sur le tableau 11 ne peuvent donner que les valeurs d'orientation. Malgré ce fait, ils permettent d'apprécier la nature glycoprotidique des fractions isolées, ainsi que l'absence des mucopolysaccharides acides et des fragments du collagène. Cette observation résulte de l'absence de l'acide uronique et de l'hydroxyproline dans les glycopeptides.

Les résultats relatifs aux 4 composants de Eaq et aux 3 fractions de Us glycopeptides (l'aorte de Porc), séparés par électrophorèse préparative sont groupés sur les tableaux 14 et 15 (p.70,71) Les résultats présentent les valeurs obtenues après la 3e hydrolyse pronasique de GPS (Eq) et la 2e hydrolyse pronasique de GPS Us.

Les fractions du type B et C (léger déplacement vers l'anode) sont les plus riches en hexoses et hexosamines. Le composant D est absent dans les glycopeptides Us. Les chaînes glucidiques du glycopeptide Eaq de l'aorte de Porc renferment le galactose, le glucose, le mannose et la glucosamine. Ceux du

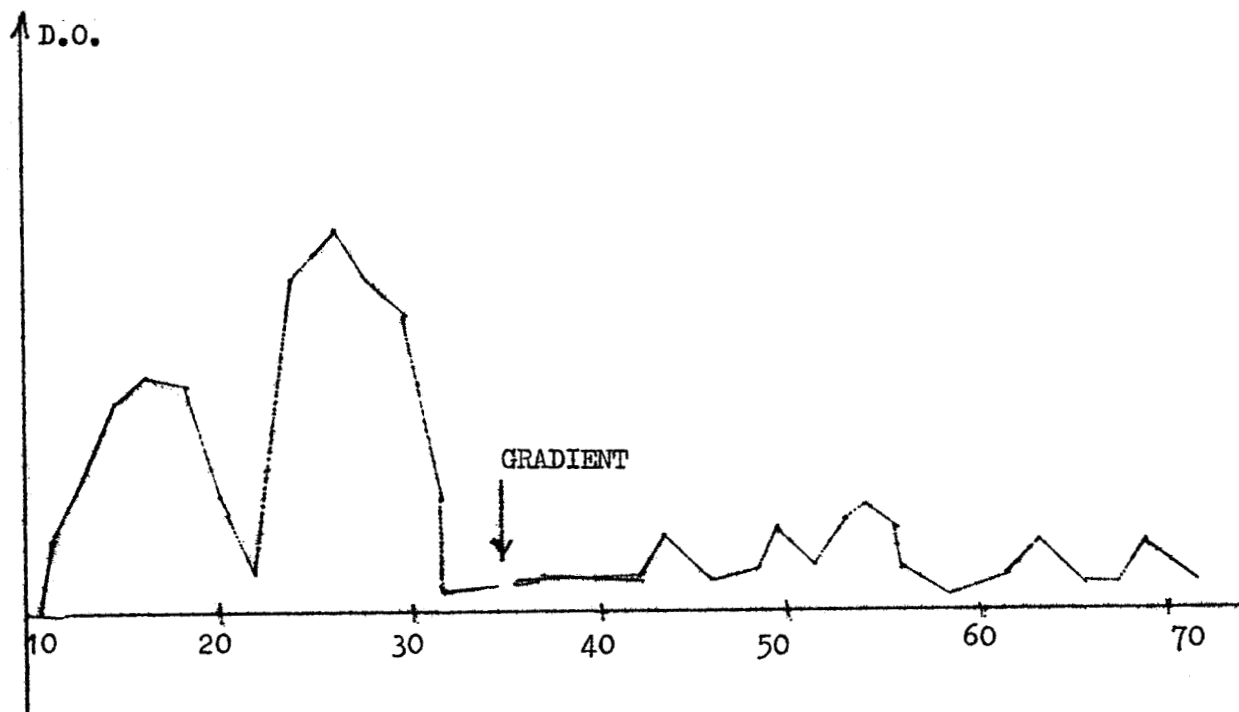


Figure 21

Diagramme de fractionnement des glycopeptides de GPS (Raq) de l'aorte de Cheval préalablement purifiés par chromatographie sur Séphadex G 25, sur colonne de 1,2 x 30 cm. de DEAE Cellulose (Whatman type 52 "preswollen") pour 19,5 mg de préparation. Elution par le tampon Tris-HCl 0,005 M (pH 8,0) pendant 4 h., puis le gradient linéaire de concentration 0,005 0,5 M. du même tampon. Fractions de 2 ml., débit 0,2 ml /mn Repérage des composés glycopeptidiques par le réactif à l'orcinol.



TABLEAU 14

HYDROLYSE SUCCESSIVE DE GPS (Eaq) DE L'AORTE DE PORC.

RESULTATS OBTENUS APRES LA TROISIEME HYDROLYSE PRONASIQUE.

Composition	Fractions séparées par électrophorèse			
	A	B	C	D
Hexoses %	19,5	40	38	20,4
<u>Proportion molaire des oses :</u>				
galactose	1	1	1	1
glucose	0,75	0,35	0	1,1
mannose	1	1,16	1	2
glucosamine	1,70	0,87	0,79	0,65
<u>Proportion des acides aminés (relative à Asp.)</u>				
acide aspartique	1	1	1	1
alanine	2	2,5	2,5	2,5
acide glutamique	0,6	0,5	0,2	0,4
glycocolle	2	2	1,5	2,5
sérine	1	1	1	0,8
thréonine	0,1	0,1	0,1	0,2
hydroxylysine	traces	traces	traces	
Acide aminé N-terminal (par dinitrophénylation)	Ala Asp	Asp	Ala	Ala



TABLEAU 15

HYDROLYSE SUCCESSIVE DE GPS (Us) DE L'AORTE DE PORC.

RESULTATS OBTENUS APRES LA DEUXIEME HYDROLYSE PRONASIQUE.

Composition	Fractions séparées par électrophorèse		
	A'	B'	C'
Hexoses %	28,7	44	31
<u>Proportion molaires des oses :</u>			
galactose	1	1	1
mannose	1,47	2	1,47
glucosamine	2,3	2,18	1,47
<u>Proportion des acides aminés (relative à Asp)</u>			
acide aspartique	1	1	1
alanine	1	0,8	0,8
Acide glutamique	1	0,5	0,2
glycocolle	0,7	1	0,5
sérine	0,7	1	1
thréonine	0,3	0,3	0,2
proline	0,8	0,5	
acide aminé N-terminal (par dinitrophénylation)	Glu, Ala	Asp	Ala

BUS
LILLE

glycopeptide Us contiennent cependant le galactose, le mannose et la glucosamine. L'absence du glucose dans les glycopeptides de la préparation Us de l'aorte de Porc apparaît comme une différence significative comparativement à la GPS Eaq.

Le glucose est présent surtout dans les composants mineurs du glycopeptide Eaq de l'aorte de Porc. Dans les fractions obtenues par passage sur Sephadex du premier hydrolysât pronasique de GPS Eaq de porc, c'est le deuxième petit pic (teneur en hexoses 3 %) qui contient le galactose, le glucose et le mannose dans la proportion 1 : 1,3 : 1.

La proportion des acides aminés est estimée par chromatographie sur couche mince par appréciation visuelle. L'élution du chromophore et le dosage spectrophotométrique des taches éluées à 500 m μ selon MUNIER, THOMMEGAY et SARRAZIN (208) n'ont pas fourni les valeurs reproductibles au point de vue de la teneur en glycocolle et du rapport molaire acide aspartique/hexosamine. En ce qui concerne la composition en acides aminés, les glycopeptides de GPS Eaq se distinguent ceux de GPS Us par leur teneur relativement élevée en alanine et en glycocolle. L'hydroxyproline est absente dans les glycopeptides. On peut identifier l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycocolle, la sérine et la thréonine dans chaque fraction glycopeptidique séparée par électrophorèse de GPS Eaq et Us. La proline a été détectée dans les Eaq et Us-glycopeptides également. Pour l'aorte de Porc, le composant A et le composant C du glycopeptide Eaq, de même que les composants A' et B' du glycopeptide Us renferment la proline.

Les résultats de la dinitrophénylation de la fonction N-terminale des fractions A, A', B et B', séparées par électrophorèse, sont démontrés sur les Tableaux 14 et 15 (p. 70, 71). La fraction majeure B du glycopeptide Eaq (Porc) et la fraction B' du glycopeptide Us (Porc) possèdent l'acide aspartique, et les fractions C et C' l'alanine en position N-terminale. Par contre, les composants A et A' ont fourni deux acides aminés dinitrophénylés différents :

A : DNP-Ala et DNP-Asp

A' : DNP-Ala et DNP-Glu.

La fonction C-terminale a été recherchée par l'action de la carboxypeptidase A bovine. Nous avons constaté que l'enzyme n'a pas dégradé le glycopeptide. L'acide aspartique et le glycocolle sont détectés sous forme d'acides libres, mais présents également dans les solutions témoins.

DISCUSSION

L'hydrolyse pronasique des glycoprotéines isolées par les deux étapes différentes de l'extraction conduit à la formation d'un mélange des glycopeptides. Les analyses ont été effectuées sur les mélanges des glycopeptides bruts pour démontrer l'absence du collagène et des mucopolysaccharides acides. Les expériences d'orientation ont porté sur les GPS extractibles à l'eau et les GPS du résidu d'extraction de l'aorte de Porc et de Cheval. Aucune différence significative n'apparaît quant à la teneur centésimale des hexoses et hexosamines des deux GPS de même espèce. Les rapports molaires galactose/glucose/mannose et les rapports glucosamine/galactosamine se distinguent nettement. La similitude de la composition en acides aminés dans un mélange de glycopeptides des GPS étudiées de Porc et de Cheval ne nous laisse pas tirer de conclusions sur leur structure. Par contre, ces résultats sur la composition des glycopeptides bruts nous semblent confirmer le caractère glycoprotidique des deux extraits précisés plus haut.

Par la suite, il nous est resté à examiner si les fractions Ea_q, Ra_q et Us (l'extrait purifié de Ra_q) représentent des entités chimiquement différentes. Dans ce but nous avons cherché à obtenir des informations sur les glycopeptides de GPS Ea_q et Us de l'aorte de Porc. D'une part, l'aorte de Porc se prête mieux à la préparation de l'homogénat que celle du Cheval. D'autre part les électrophorégrammes de GPS de l'aorte de Porc sont moins complexes. Les glycopeptides brutes de l'aorte de Cheval contiennent 5 à 11 composants, tandis que les glycopeptides de l'aorte de Porc n'en contiennent que 3 à 4.

Les électrophorégrammes des figures 16, (p.59), 17 (p.61), 18 (p. 63) et les profils d'élu_{tion} de la chromatographie sur DEAE et CM-Cellulose (figures 19 et 21)(p.66,67) permettent les constatations suivantes : Le mélange du glycopeptide Ea_q se dissocie en électrophorèse, en 4 composants A, B, C, et D. Le composant D ayant la migration la plus forte vers l'anode n'est présent que dans le glycopeptide Ea_q. Les composants A, A' (légère migration vers l'Anode), B, B' et C, C' (déplacement vers la cathode) possèdent une migration pratiquement identique.

La séparation pratiquée sur CM-Cellulose présente deux pics importants correspondant aux oses superposables avec les pics des peptides. Les pics des oses ne sont pas bien séparés. L'électrophorèse préparative à 5.000 V des effluents (figure 20) (p.67) révèle l'identité de la fraction N° 1 avec le composé B'. Le chevauchement des pics d'éluition provoqué sur CM-Cellulose rend la séparation délicate sur ce type d'échangeurs d'ions. On a tenté donc d'effectuer la séparation de l'hydrolysât pronasique des glycoprotéines sur DEAE-cellulose. La courbe d'éluition des oses sur la figure 21 (p. 69) trace deux pics larges avec les épaulements, et cinq pics mineurs dont 2 ne sont pas symétriques.

La méthode de dinitrophénylation selon SANGER (209) sur les mélanges des glycoprotides isolés après la 3e hydrolyse pronasique du glycoprotéine Eaq et la 2e digestion de GPS Us (Porc) ont été effectués dans le but de séparer les glycopeptides et les substances peptidiques. Cette méthode a été pratiquée par NUENKE et CUNNINGHAM (210) pour des glycopeptides de l'ovalbumine dont les DNP-glycopeptides ont été séparés par la distribution à contre-courant.

Dans nos expériences on a pu démontrer la présence de 5 à 7 % de peptides par chromatographie sur papier. Plusieurs auteurs sont parvenus à dégrader les glycopeptides par agents protéolytiques et à isoler par chromatographie un glycopeptide ne contenant plus que l'acide aspartique. Nous citerons à cet égard les travaux de YAMASHINA et MAKINO (211), SPIK et coll. (212), (213), de MONTREUIL et coll. (214), de MONSIGNY et MONTREUIL, (215) (hydrolyse pronasique) et de NUENKE et CUNNINGHAM (216) (hydrolyse trypsique et chymotrypsique).

Au cours de nos expériences portant sur les glycopeptides isolés après les 2e et 3e hydrolyse pronasique, nous n'avons pas réussi à obtenir des glycopeptides composés uniquement de l'acide aspartique et la fraction glucidique. Les fractions majeures contiennent de l'alanine et du glycolle dans les proportions comparables à celles de l'acide aspartique.

La composition des glycopeptides séparés nous semble confirmer que les GPS Eaq et Us sont les entités glycoprotidiques différentes. Ces deux préparations fournissent les mélanges de glycopeptides par dégradation enzymatique dont les composants majeurs possédant les migrations électrophorétiques analogues se différencient nettement par leur composition glycannique et par leur proportion d'acides aminés relative à l'acide aspartique. L'hydroxyllysine est présente en faible quantité dans les glycopeptides de GPS Eaq.

C O N C L U S I O N S

Les informations obtenues sur l'hydrolyse pronasique des glycoprotéines, la séparation et la composition des glycopeptides peuvent être résumées de la façon suivante :

- 1) L'absence des acides uroniques et de xylose d'une part, et de l'hydroxyproline d'autre part dans les glycopeptides bruts hétérogènes à l'hétérogènes à l'électrophorèse indique que les hydrolysats pronasiques ne sont pas contaminés par des fragments des mucopolysaccharides acides, et ceux du collagène..
- 2) L'électrophorèse préparative nous permet d'isoler trois à quatre glycopeptides différents parmi lesquels les plus abondants ont un caractère "neutre", marquant toutefois un léger déplacement vers la cathode qu'on peut attribuer à l'électro-osmose.
- 3) Les oses neutres présents dans les glycopeptides de GPS Eaq sont : le galactose, le mannose et le glucose. Ce dernier est retrouvé surtout dans les fractions mineures. Les glycopeptides de GPS Us renferment le galactose et le mannose.
- 4) L'osamine présente est la glucosamine. La galactosamine a été identifiée dans un composant mineur de glycopeptide de GPS Eaq en présence de la glucosamine dans la fraction la plus basique.
- 5) Les acides aminés : alanine, acide aspartique, acide glutamique, glyco-colle, sérine et thréonine sont présents dans chaque glycopeptide séparé.
- 6) Malgré l'hétérogénéité des glycopeptides on peut constater une composition analogue en acides aminés.
- 7) La chromatographie des glycoprotides dinitrophénylés démontre la présence des traces des peptides.
- 8) La valeur moyenne du poids moléculaire des glycopeptides bruts se situe aux environs de 3.000.

- 9) L'étude comparative de la fraction majeure séparée par électrophorèse des glycopeptides des GPS Eaq et Us de l'aorte de Porc montre que :
- les deux fractions possèdent le même acide aminé (l'acide aspartique) en fonction N-terminale.
 - L'acide en position C-terminale n'est pas attaqué par la carboxypeptidase A.
 - Les proportions molaires des oses et celles des acides aminés relative à l'acide aspartique ne sont pas identiques.
- 10) Ces résultats nous permettent de conclure que la fraction Eaq et Us des glycoprotéines de structure de l'aorte de Porc séparées par extraction sélective sont des entités chimiques différentes.
-

3.4. ETUDE SUR LE GROUPEMENT POLYOSIDIQUE

Dans ce chapitre, nous rapportons les résultats que nous avons obtenus sur la structure du groupement polyosidique et sur la nature de la liaison glycanne-protide dans les glycopeptides des glycoprotéines de structure de l'aorte de Porc et de Cheval.

MATERIEL et METHODES

MATERIEL

a) Glycopeptides

Les glycopeptides de GPS Eaq, Us de l'aorte de Porc et la fraction Eaq de l'aorte de Cheval sont préparés par hydrolyse pronasique comme décrite au CHAPITRE 3.3.. Les fractions majeures B et B' ont été séparées après la 2e hydrolyse pronasique de Us et le 3e traitement enzymatique de Eaq glycoprotéine par électrophorèse préparative (voir chapitre 3.3. Méthodes C-1) (p. 51). Les glycopeptides de l'ovalbumine ont été obtenus par l'action de la pronase sur l'ovalbumine.

b - Réactifs

Périodate de sodium, aniline, borohydrure de sodium, iodure de méthyle, hydroxyde de barium, acide acétique, acide sulfurique, ninhydrine, chlorure de thionyle distillé, ammoniacque liquide, soude en pastilles, iodure de potassium, amidon, nitrate d'argent, oxyde de barium.

c - Solvants

Acétate d'éthyle, n-butanol, pyridine, diméthylsulfoxyde, méthyl-éthyl-cétone, chlorure de méthylène, méthanol.

d - Echangeurs d'ions et chromatographie

Résine échangeuse de cations : Amberlite IR 120 (mesh 40, sous sa forme acide).

Résine échangeuse d'anions : Amberlite IR 400 (sous sa forme d'acétate).

Sephadex G 25 (Pharmacia).

Chromatoplaques de cellulose microcristalline (Schleicher Schüll 1440) et de silice (Schleicher Schüll 1500).

Electrophorèse : papier Whatman N° 3 : appareil de Gilson.

METHODES

A - Oxydation périodique

5 mg de glycopeptide sont traités par 0,5 ml. de solution de periodate de soude à 1 % pendant 24 h. à 0°C (MALAPRADE) (217), (EYLAR et JEANLOZ) (218) et BOBBIT (219). L'excès de périodate est détruit par addition d'une goutte d'éthylène glycol. L'élimination des ions IO_3^- est réalisée par chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G 25 (diamètre 8 mm, hauteur 140 mm) en utilisant la solution de pyridine-acide acétique 0,1 M tamponnée à pH 5,1 pour élution. Les effluents de 0,2 ml sont recueillis. La présence des ions IO_3^- dans les effluents est démontrée par le réactif au iodure de potassium acide sulfurique-amidon. Les échantillons de 10 μ l. sont prélevés et la coloration est vérifiée par une réaction de goutte. Les fractions exemptes d'iodure sont recueillies et lyophilisées.

D'une part on réduit les groupements aldéhydes présents dans le mélange réactionnel par le borohydrure de sodium (ROTHFUS et SMITH), d'autre part on dose la teneur en hexoses et hexosamines et on détermine les proportions molaires des oses.

Réduction par le borohydrure de sodium : dans 0,3 ml de la solution rigoureusement neutre de 3 mg de résidu de l'oxydation périodique, 5 mg de borohydrure de sodium sont ajoutés. La solution est abandonnée 20 minutes à 5°C,

puis 30 minutes à la température ambiante. L'excès de NaBH_4 est détruit par addition de CH_3COOH 0,1 N puis la solution est purifiée par un passage sur une petite colonne d'échangeur de cations. La solution effluente est évaporée à siccité. On élimine l'acide borique en reprenant le résidu sec plusieurs fois consécutives avec du méthanol et évaporé sous vide. Le polyol est hydrolysé par HCl 2N à 100°C . L'hydrolysate est neutralisé par échangeurs d'anions fortement basique sous sa forme acétate et lyophilisé.

La recherche du glycérol et de l'érythritol est réalisée par chromatographie sur couche mince de cellulose microcristalline (Schleicher Schüll 1440) dans les systèmes de solvants :

- acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3),
- n butanol-acide acétique-eau (12 : 3 : 5)

Les taches sont révélées par le réactif au nitrate d'argent alcalin de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISON.

B - Méthylation

La méthylation des glycopeptides a été effectuée selon KUHN, TRISCHMANN et LOW (220) et WALLENFELS, BECHTLER, KUHN et TRISCHMANN (221).

Dans la solution de 3 mg de glycopeptide dans 20 ml de H_2O et 0,5 ml de DMSO distillé, 50 mg d'oxyde de barium et 0,15 ml d'iodure de méthyle sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 1 heure à la température ambiante à l'abri de la lumière et abandonné ensuite 8 heures à la chambre froide. On verse la suspension dans 3 ml d'eau. Les ions de Ba^{2+} sont éliminés en faisant barboter CO_2 dans la solution, BaCO_3 est centrifugé et le surnageant est lyophilisé. On élimine le DMSO en reprenant le résidu sec plusieurs fois consécutives avec du toluène suivi d'évaporation sous vide. On dissout le résidu dans 1 ml d'eau et la solution est purifiée par passage sur une petite colonne de Sephadex G 25 (1 x 25 cm) (MOCZAR et MESTER) (22 U). Les effluents de 0,5 ml sont recueillis et la présence des ions de I^- est recherchée par le réactif au $\text{NaIO}_3 - \text{H}_2\text{SO}_4$ - amidon. Les fractions exemptes d'iodure sont réunies, concentrées sous vide et sèches par lyophilisation.

Sur le résidu lyophilisé, le procédé de méthylation est appliqué une deuxième fois.

Les glycopeptides aux groupements polyosidiques méthylés sont hydrolysés dans 0,2 ml d'acide formique à 90 % pendant 1 heure au bain-marie bouillant dans une première étape ; puis 1 ml de HCl 0,1 N sont additionnés et l'hydrolyse est continuée pendant 4 h.

La chromatographie des oses méthylés est effectués sur couche mince de silice dans le système de solvants : CH_2Cl_2 - CH_3OH (9 : 1). On révèle par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (222).

C - Chromatographie bidimensionnelle des hydrolysats partiels des oligosides

Nous avons appliqué la méthode décrite au CHAPITRE 3.2.2. (p.44).

D - Détermination du rapport molaire des oses

Le rapport molaire des oses a été déterminé par la méthode chromatographique précisée au CHAPITRE 3.2.1. (p.38).

E - Etude sur la liaison polyside-protéine

1) Recherche d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine.

a - Hydrolyse partielle de l'ovalbumine. L'isolement de la substance témoin.

30 mg de glycopeptide de l'ovalbumine (JEVONS) (223) sont isolés et hydrolysés selon BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (224) par 3 ml d'acide sulfurique 2 N à 100°C pendant 20 minutes. L'hydrolysate est dilué par 15 ml d'eau distillée et le pH est ramené par l'eau de baryte (on utilise le surnageant de la suspension de 4,0 g de BaO dans 50 ml d'eau) à pH 7,2. Le pH final pour éliminer l'excès de Ba (OH)₂, est ajusté à 4,5 par l'acide acétique à 10 %. Après centrifugation l'hydrolysate est concentré au-dessous de 30°C et soumis à l'électrophorèse préparative à pH 6,3 dans la solution tampon pyridine-acide acétique-eau (25 : 12 : 25) et à pH 2,6 dans l'acide acétique 0,25 N. Les taches ayant une mobilité analogue à l'asparagine sont éluées et chromatographiées pendant 36 heures sur couche mince en cellulose microcristalline (Schleicher Schüll 1440) dans les systèmes de solvants suivants :

- n-BuOH - CH_3COOH - H_2O (12 : 3 : 5)
- n-BuOH - pyridine - H_2O (6 : 4 : 3) (BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA) (225).

Après révélation à la ninhydrine précédée d'une pulvérisation de diéthylamine-méthyléthylcétone-éthanol (0,1 : 1 : 98,9) la tache correspondant à une coloration orange-marron (YAMASHINA et MAKINO) (226) ayant un R_f légèrement plus bas comme celui de l'asparagine dans les systèmes de solvants indiqués ci-dessus est éluée et hydrolysée.

b - Hydrolyse partielle des glycopeptides de GPS de l'aorte de Porc et de Cheval.

L'hydrolyse partielle décrite par BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (227) à propos de l'ovalbumine a été appliquée aux glycopeptides bruts de GPS Raq de l'aorte de Cheval et aux glycopeptides purifiés (fraction B et B') des GPS : Ea_q et Us de l'aorte de Porc.

- Aorte de Cheval :

10 mg de glycopeptide de GPS Raq sont hydrolysés avec 1 ml de H₂SO₄ 2N et traités comme précisé en cas de l'ovalbumine ci-dessus.

- Aorte de Porc :

10 mg de glycopeptide bruts de GPS Raq et 2-2 mg de glycopeptide (fraction B et B') de GPS Ea_q et Us sont hydrolysés par 1 et 0,8 ml. H₂SO₄ 2 N respectivement dans les conditions décrites pour l'ovalbumine.

N-β-Aspartyl-N-acétylglucosaminylamine a été identifié par chromatographie sur couche mince à l'aide de la substance témoin isolée à partir de l'hydrolysat partiel du glycopeptide de l'ovalbumine.

2) Recherche d'une liaison O-glycosidique

a - Dinitrophénylation de la fonction N-terminale et estérification et amidification de la fonction C-terminale.

La dinitrophénylation selon SANGER (228) (voir chapitre 3.3. Méthodes D) est appliquée sur 10 mg de glycopeptide bruts des GPS de l'aorte de Porc et de Cheval.

Pour l'estérification nous avons procédé selon la méthode de SOKOLOVSKY, SADEN et PATCHORNIK (229) adaptée également par MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (230) au glycoside des N-carbobenzoxy-L-sérine et L-thréonine.

10 mg de DNP glycopeptide sont dissous dans 0,5 ml d'alcool méthylique absolu et 5,5 mg de chlorure de thionyle distillé sont additionnés à froid. Le mélange est abandonné 3 heures à la température ambiante. La solution est évaporée au dessiccateur sous vide. Le résidu est repris plusieurs fois par méthanol et évaporé. Le résidu sec est traité par ammoniacque liquide (3 ml) puis on l'abandonne 20 minutes à la température ambiante. La solution aqueuse de la substance est purifiée par un passage sur des petites colonnes d'échangeurs d'anions, puis de cations. L'effluent est évaporé au siccité.

b - Hydrolyse par la soude 0,2 N

3,55 mg de glycopeptide estérifié et amidifié comme décrit ci-dessus sont traités par 300 μ l de la soude 0,2 N à 20°C pendant 60 heures. Le pH est ramené à 4 par l'addition d'acide acétique. La substance est lyophilisée.

F - Techniques d'analyse

1) Dosages colorimétriques

Le dosage des hexoses a été effectué par la méthode à l'orcinol de TILLMANN et PHILIPPI (231) modifiée par RIMINGTON (232) (voir aussi MONTREUIL et SPIK (233)). Les hexosamines ont été déterminées selon PALMER, SMYTH et MEYER (234).

2) Chromatographie des acides aminés

Les acides aminés ont été identifiés par chromatographie sur couche sur cellulose microcristalline comme décrit au CHAPITRE 3.3. G. Techniques d'analyse (p. 53).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les GPS de l'aorte ayant une faible teneur en glucides (tableau 8) (p.35) et une faible solubilité dans l'eau et l'acide dilué se prête mal aux expériences de l'étude de structure osidique. Nos travaux ont porté sur les glycopeptides des glycoprotéines de structure : Ea_q et Ra_q de l'aorte de Porc et de Cheval et Us de l'aorte de Porc. Les informations sur la structure du groupement

polyosidique ont été obtenues par méthylation, oxydation périodique et hydrolyse ménagée associés à la chromatographie sur couche mince.

L'étude de la nature du point d'attache glycanne-protéine consiste à mettre en évidence l'existence du composé 1-N- (β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-amino-glucosylamine et à étudier l'action de la sucrase 0,2 N sur les glycopeptides.

A - L'oxydation périodique

L'oxydation périodique nous a démontré la disparition totale du galactose et du glucose et la dégradation partielle du mannose dans les glycopeptides de Ea_q, Ra_q et Us glycoprotéines. Les hexosamines n'ont pas été dégradés en cas des glycopeptides Ea_q, et une perte de 10 % environ a été observée en cas de glycopeptide de GPS Us. La réduction par le borohydrure de sodium a fourni le glycérol provenant des hexoses ayant la fonction OH libre sur les atomes Carbon en position 3 et 4.

B - Méthylation

Nous avons adopté la méthode de KUHN, TRISCHMANN et LOW (235) en utilisant l'iodure de méthyle dans le diméthylsulfoxyde comme agent de méthylation. La réaction a été effectuée en phase hétérogène, due à la faible solubilité du glycopeptide dans le diméthylsulfoxyde.

Le réactif de méthylation et les glycopeptides méthylés sur la fraction glucidique ont été séparés selon par chromatographie d'exclusion sur Sephadex G 25 (MOCZAR et MESTER) (236).

On a identifié le tétraméthylgalactose et le tétraméthylglucose pour des glycopeptides de GPS Ea_q et Ra_q (Porc et Cheval) et le tétraméthylgalactose pour des glycopeptides de GPS Us de Porc.

C - Hydrolyse partielle

1) Etude des oligosides

L'hydrolyse partielle par acide dilué de la fraction glucidique des glycoprotéines a formé des sujets de nombreux travaux (KUHN, GAUHE et BAER) (237);

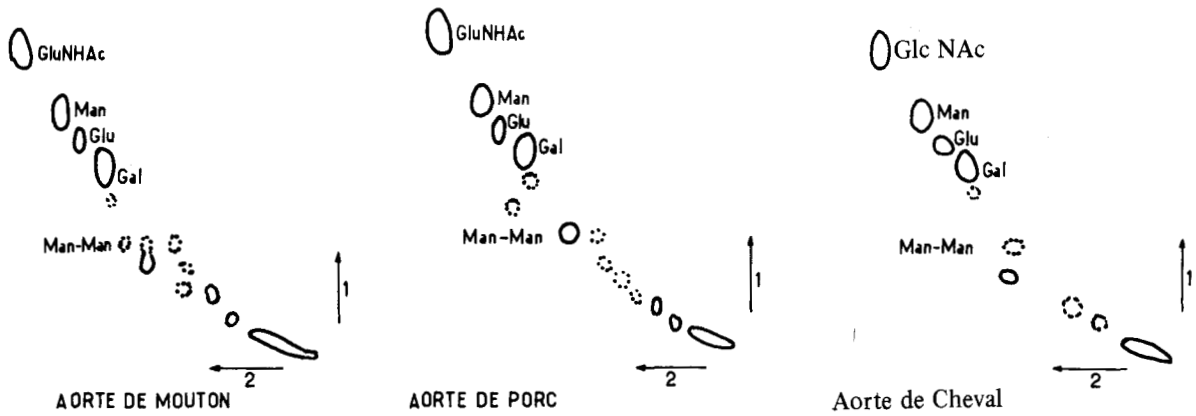


Figure 22 -

Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince des oligosides des glycopeptides de la fraction (R) de GPS de l'aorte de Porc, Mouton et de Cheval sur cellulose microcristalline (Schleicher et Schüll 1440). Système Solvant : n - butanol - acide acétique - eau (12 : 3 : 5) en première dimension, pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5 : 5 : 1 : 3) en deuxième dimension. Révélation par trempage successive dans une solution, AgNO_3 à 1p. 100 dans l'alcool à 90 p. 100 et après séchage dans une solution méthanolique de potasse 0,5 % .



(SCHIFFMANN, LESKOWITZ et KABAT) (238) et (EYLAR et JEANLOZ) (239). Cette méthode permet l'exploration du groupement osidique dans une certaine limite, due à la décomposition des oligosides (CHOSSON et MONTREUIL). Nous avons appliqué l'hydrolyse par résine échangeuse de cations de polystyrène sulfoné selon MONTREUIL et CHOSSON (241) aux glycopeptides de GPS délipidés (R. fig. 8) (p. 19), l'aorte de Porc, de Cheval et de Mouton et aux glycopeptides de Ea_q, Us de Porc.

La chromatographie bidimensionnelle des oligosides des glycopeptides de la fraction R de GPS de l'aorte de Porc, de Cheval et de Mouton, démontre la différence des fragments oligosidiques suivant l'espèce (Figure 22) (p. 84 bis) Le mannobiose-1,6 a pu être identifié dans les glycopeptides des trois espèces étudiées.

Nous remarquons aussi dans l'empreinte de ces glycopeptides l'absence de taches au-dessus de la ligne virtuelle reliant le galactose au mannobiose-1,6. Ce fait indique que la structure osidique de ces glycopeptides doit différer de celle de la plupart des glycoprotéines d'origine animale déjà étudiées (MONTREUIL, CHOSSON et SPIK) (242).

D - Rapport molaire des hexoses après l'hydrolyse totale et l'hydrolyse ménagée

Les valeurs du rapport molaire galactose/glucose/mannose après l'hydrolyse ménagée et l'hydrolyse totale des glycopeptides des GPS Ea_q et Ra_q de l'aorte de Porc et de Cheval sont groupées sur le tableau 11. (p. 57). En comparant la prédominance relative du galactose et du glucose dans l'hydrolysât partiel par rapport à l'hydrolysât total, on peut conclure que le galactose et le glucose forment, au moins en partie, les groupements terminaux non réducteurs de la fraction polysidique. Ce résultat est en bon accord avec la dégradation du galactose et du glucose démontrée au cours de l'oxydation périodique. En nous fondant, d'une part, sur la libération tardive du mannose et la présence de mannobiose - 1,6 dans l'hydrolysât partiel, nous pouvons conclure que le mannose se trouve en position interne des unités polysaccharidiques. Le mannose est lié partiellement par les liaisons du type ^{-1,6}, ce qui explique la dégradation par l'oxydation périodique.

E -- Nature du point d'attache glycanne-protéine

MONTREUIL et SPIK (243) à la base des travaux publiés ont montré qu'on distingue quatre types de liaisons :

- 1) Liaisons "ester"
- 2) liaisons O-glycosidiques
- 3) liaisons amide
- 4) liaison glycosylaminiques.

Les liaisons de type ester formées entre la fonction réductrice de l'ose et la fonction carboxylique d'un acide aminé de la chaîne peptidique sont facilement hydrolysées par les solutions alcalines. Leur présence a été démontrée dans certains mycosides. (CHAPUT, MICHEL et LEDERER) (244).

Dans les liaisons O-glycosidique la glycanne est unie avec la fonction alcoolique d'un hydroxy-amino-acide de la chaîne peptidique. Ce type de liaison peut être hydrolysé par des solutions aqueuses de soude 0,1 N à la température ambiante (TANAKA, BERTOLINI, et PIGMAN (245). Cette modalité de conjugaison a été mise en évidence : dans les mucines sous-maxillaires : liaison O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminidyl ; (GOTTSCHALK (246) (TANAKA et PIGMAN) (247).

- Dans les substances de groupes sanguins : liaison O-séryl et O-thréonyl-galactosaminidyl ou galactosidyl ; (KABAT, BASSEPT, PRYZWANSKY, LLOYD, KAPLAN et LAYUG (248), (WINZLER, PEKAS, JOHNSON et WEBER) (249).

- Dans le collagène liaison 5-O-hydroxylysyl-galactosidyl (BUTLER et CUNNINGHAM) (250) ; CUNNINGHAM, FORD et SEGREEST (251).

- Dans l'extensine (glycoprotéine isolée des cellules de tomate) : liaison O-hydroxyprolylarabinosydy1 (LAMPART) (252).

Le groupement carboxylique d'un acide osamine-carboxylique conjugué avec la fonction amine de l'acide aminé faisant partie de la chaîne peptidique représente une liaison de type amide, comme c'est démontré dans les mucopeptides (WEIDEL et PELZER) (253).

L'autre type de conjugaison du glycanne-protéine est la liaison glycosylaminique entre la fonction réductrice de la N-acétylglucosamine et de la

fonction amide de l'asparagine. Ce type de liaison polyoside-protéine a fait l'objet de nombreuses recherches : Il a été caractérisé.

- Dans les globulines γ du sérum :
(ROSEVEAR et SMITH) (254) ; (DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL) (255),
(DESCAMPS, MONSIGNY et MONTREUIL) (256), (DAWSON et CLAMP) (257), (NOLAN et SMITH) (258),
- dans l'ovalbumine :
(JOHANSEN, MARSHALL et NEUBERGER) (259), (YAMASHINA et MAKINO) (260),
(MAKINO et YAMASHINA) (261) (JEVONS) (262), (BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA) (263).
- Dans l'orosomucoïde :
(YAMASHINA, MAKINO, BAN et KOJIMA) (264),
- Dans la transferrine
(JAMIESON) (265), (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL) (266).
- Dans le fibrinogène
(MESTER, MOCZAR, VASS et SZABADOS) (267).

1) Recherche d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine

Nous avons étendu aux glycopeptides bruts et purifiés (fraction majeure B et B') de GPS Eaq, Us de l'aorte de Porc et Raq de l'aorte de Cheval le procédé de l'hydrolyse partielle décrit par BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (268) à propos de l'ovalbumine. Dans notre cas, l'hydrolyse par l'acide sulfurique 2 N appliquée par les auteurs pour dégrader le complexe acide aspartique-glycane, pour isoler l'aspartylamido-N-acétyl-glucosamine a été appliquée aux glycopeptides de l'aorte.

Avant d'aborder ce problème, la (1-N- β -aspartyl) - 1,2 - didéoxy-2-acétamidoglucosylamine a été isolé à partir de l'hydrolysats sulfurique de glycopeptide de l'ovalbumine dans le but d'obtenir la substance témoin.

A l'aide de la substance témoin, nous avons pu identifier la tache correspondant à l'aspartylamido-N-acétylglucosamine dans l'hydrolysats partiel des glycopeptides bruts de GPS Eaq Raq de Porc et de Cheval, ainsi que dans les glycopeptides purifiés (fraction majeure B et B') des GPS Eaq et Us de l'aorte de Porc.

L'hydrolyse chlorhydrique de la substance identifiée ainsi et isolée par chromatographie préparative sur couche mince suivie d'élution a fourni uniquement l'acide aspartique et la glucosamine.

La vitesse de migration de la 1-N (β -aspartyl) - 1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine relative à l'asparagine dans les systèmes de solvants utilisés est montré dans le tableau 16 (p. 88).

Cette méthode nous a permis de montrer la présence d'une liaison du type 1-N (β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine dans les glycopeptides bruts de la fraction Ea_q, Us de Porc et Ra_q de Cheval, ainsi que dans le glycopeptide purifié par électrophorèse (composant majeur B et B').

2) Recherche d'une liaison O-glycosidique

HARTLEY et JEVONS (269), puis HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (270) ont émis l'hypothèse que la liaison O-glycosidique placée en position γ d'un groupement carboxylique peut être coupée en milieu alcalin à condition que le groupement carbonyle soit conjugué, GOTTSCHALK (271) souligne également que les fonctions amine et carboxyle de la sérine et de la thréonine doivent être bloquées pour que la β -élimination puisse être réalisée. Ces constatations s'appuient en partie sur les travaux de LINSTEAD, OWEN et WEBB (272) et de PHOTAKI (273) sur les esters des acides hydroxylés et acylés en position β .

La preuve de ces hypothèses a été apportée par MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (274) en étudiant l'effet des solutions diluées de soude sur les O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-glucosaminides et sur leurs amides.

Le composant majeur (B) des glycopeptides séparés par électrophorèse de Ea_q. Us (Porc) et Ra_q de Cheval traité par la soude 0,5 N à 20° C pendant 24 et 48 heures (BHAVANANDAN et Coll.) (275) en présence de borohydrure de sodium 0,3 N (TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN) (276) a apporté les résultats suivants :

- la teneur en hexoses et hexosamines ainsi que la proportion des hexoses ne sont pas affectées,
- la composition en acides aminés estimée sur chromatographie en couche mince reste inchangée.

Nous avons tenté donc de transformer le groupement carboxylique libre de l'acide C-terminal en amide. Nous avons procédé à l'estérification du DNR-

TABLEAU 16

La vitesse de migration de 1-N(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glycosylamine relative à l'asparagine.

Chromatographie sur couche mince de cellulose microcristalline.

Solvant	R _f Asparagine
n-BuOH-AcOH-H ₂ O (12:3:5)	0,70
n-BuOH-pyridine-H ₂ O (6:4:3)	0,91



glycopeptide, puis à l'amidification comme décrit par MONTREUIL et coll. (277) pour les amides des N-carbobenzoxy-L-sérine et L-thréonine (SOKOLOWSKY, SADEN et PATCHORNIK (278). L'estérification directe avec le diazométhane sans blocage préalable de la fonction amine n'a pas donné le résultat voulu conformément aux travaux de KUHN et RUEBINS (279).

Le traitement par la soude 0,2 N pendant 60 heures du DNP-glycopeptide amidifié n'a apporté aucun changement dans la composition en acides aminés estimée par appréciation visuelle sur chromatographie en couche mince et par élution du chromophore et dosage spectrophotométrique selon MUNIER, THOMMEGAY et SARRAZIN. Nous n'avons pas pu constater une différence dans l'intensité des taches de la sérine et de la thréonine relative aux autres acides aminés présents dans le glycopeptide soumis à l'action de la soude et dans les glycopeptides témoins.

Dans les glycopeptides étudiés l'existence d'une liaison glycanne-protide du type O-séryl ou O-thréonyl-glycoside n'est donc pas mise en évidence.

C O N C L U S I O N S

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, il se dégage les conclusions suivantes :

- le galactose se trouve en position externe par rapport au reste de la molécule. Les résultats de l'oxydation périodique et de la méthylation sont en faveur de cette conception.
- La libération tardive du mannose au cours de l'hydrolyse ménagée et la stabilité relative d'une faible partie du mannose à l'oxydation périodique indique que le mannose occupe une position "interne" de la chaîne. L'isolement d'un mannobiose - 1,6 et la dégradation d'environ les 3/4 du mannose par l'oxydation périodique sont en faveur d'une liaison de type-1,6.
- La glucosamine se trouve sous sa forme N-acétylée puisque la DNP-glucosamine n'a pas été détecté au cours de la dinitrophénylation.

- La liaison glycanne-protide est du type N- β -aspartyl-N-acétylglucosaminylamine.
- Les osides identifiés sont le mannobiose-1,6 et la N-acétyllactosamine.

Il est intéressant de rapprocher les résultats que nous avons obtenus à propos des glycopeptides des glycoprotéines de structure de l'aorte de deux espèces : le Cheval et le Porc. Dans les deux cas, malgré les différences qui existent dans les rapports molaires du galactose/glucose/mannose et des hexosamines (TABLEAU 11) (p.) une ressemblance structurale semble exister entre la copule glucidique et la partie peptidique qui est liée aux polyosides. D'une part les glycoprotéines de structure extractibles à l'eau (Eaq) et les glycoprotéines de structure provenant du résidu de l'extrait aqueux (Raq Us) de l'aorte de Porc et de Cheval ont les chaînes glycaniques unies à l'acide aspartique de la même manière. D'autre part, ces chaînes glucidiques possèdent un trait commun dans leur structure : le galactose et, selon le cas, le glucose se trouvent en position "externe" par rapport à un "noyau" plus résistant composé de mannose et de N-acétylglucosamine.

Il nous paraît intéressant de rapprocher ce résultat également de ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs avec différentes glycoprotéines. Nous citerons à cet égard les travaux de MONTREUIL et coll. (280), qui en bon accord avec les observations de plusieurs auteurs (JEANLOZ) (281) ; EYLAR et JEANLOZ (282) ont proposé "un schéma général" de structure commune à de nombreux glycoprotéines dans lesquels la N-acétyllactosamine serait toujours présente". Les acides sialiques, le fucose, le galactose et une partie des N-acétyllactosamines formerait une fraction "externe" par rapport à une fraction plus "interne" et plus résistante de la molécule qui contiendrait le reste des osamines et le mannose.

En tenant compte des résultats obtenus au cours de l'étude des glycopeptides des glycoprotéines de structure de l'aorte de Porc et de Cheval, nous pouvons préciser que les différences dans la structure des glycopeptides des GPS de l'aorte et celle de l'orosomucoïde, des immunoglobulines humaines et du fibrinogène bovin sont les suivantes : l'orosomucoïde humain est plus riche en galactose qu'en mannose, la chaîne peptidique renferme la tyrosine. (JEANLOZ) (283), (BOUERILLON, MICHON et de GOT) (284).

La fraction glucidique des immunoglobulines humaines, de Cheval et de Lapin est plus riche en mannose qu'en galactose. La proportion molaire de ces hexoses ressemble à celle trouvée chez les glycopeptides des GPS de l'aorte. Par contre, la partie peptidique des immunoglobulines contient des acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine et 3 moles d'acide glutamique par rapport à l'acide aspartique en formant la séquence : Glu-Glu-Glu-Asp. (PRESS et PORTER (285)).

Les glycopeptides du fibrinogène (MESTER et coll.) (284) diffèrent par les teneurs en lysine (type A) et en arginine et leucine (type B).

De nombreux problèmes restent cependant à résoudre en ce qui concerne la localisation des glycoprotéines dans les tissus, le développement des méthodes d'électromicroscopie peuvent donner la réponse.

CONCLUSIONS GENERALES

ROBERT et al. ont montré que les extraits d'aorte préparés à partir du stroma insoluble de la média après l'extraction du collagène par l'acide trichloacétique aqueux à chaud, a un caractère antigénique et l'injection répétée de ces extraits déclenche un processus athéromateux chez le Lapin. Ces extraits sont composés d'acides aminés, d'oses et d'osamines et ont été dénommés "glycoprotéine de structure" par ROBERT et DISCHE.

La méthode d'extraction sélective mise au point dans notre laboratoire pour les tissus conjonctifs comme la cornée consiste en l'extraction préalable des protéides solubles (comme le collagène soluble, les protéines de sérum et les complexes des mucopolysaccharides) suivie de la solubilisation et l'extraction du "collagène insoluble" par l'acide trichloracétique dilué à 90° G.

Le but de notre étude a été d'essayer d'adapter cette méthode d'extraction à l'aorte dont le tissu est plus riche en élastine et plus complexe que celle de la cornée ; de séparer et caractériser des éléments structuraux extractibles par la solution d'urée 8 M à partir du résidu d'extraction du collagène, ainsi que d'élucider la structure primaire de ces substances en ce qui concerne la composition de la fraction glycanique et la nature du point d'attache glycanne-protide.

Nous avons effectué les extractions à partir de la média de l'aorte thoracique de différentes espèces animales comme le Porc, le Mouton, et le Cheval.

Nous avons obtenu à partir du résidu d'extraction du collagène une fraction extractible par la solution d'urée 8M. Cette fraction s'est révélée hétérogène en électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose. Nous avons fractionné ces extraits de la façon suivante :

- Extraction par le système-solvant chloroforme-méthanol (2:1) a éliminé d'une part les substances réagissant avec les colorants des lipides sur électrophorogramme, d'autre part les corps réagissant avec la ninhydrine mais donnant une réaction négative à l'AmidoSchwartz (colorant des protéines).

- Le traitement par l'eau à 40°C de cette substance délipidée nous a permis d'isoler deux fractions différentes en vue de leur solubilité dans l'eau. La fraction insoluble peut être solubilisée dans la solution d'urée 8M.

Ces deux fractions séparées par extraction aqueuse de l'extrait délipidé présentent un comportement analogue à l'ultracentrifugation : dans la solution d'urée 4M les vitesses de sédimentation ont un même ordre de grandeur. L'électrophorèse sur Collogel des deux fractions donne une bande révélée par le colorant Amidoschwartz. Les méthodes analytiques démontrent l'absence des acides sialiques, et celle de l'hydroxyproline, acide aminé caractéristique du collagène.

L'absence de l'acide sialique peut être due à l'hydrolyse du stroma par l'acide trichloracétique à 2,7 % à 90°C. L'acide sialique est hydrolysé dans ces conditions comme nous l'avons démontré en étudiant les sialoglycopeptides du fibrinogène.

L'hydrolyse pronasique de la fraction délipidée ainsi que celle de la fraction hydrosoluble et de son résidu mais a permis d'isoler les glycopeptides.

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sur l'hydrolyse pronasique des "Glycoprotéines de structure" de l'aorte de Porc sont les suivantes :

- L'électrophorèse préparative sur papier de l'hydrolysate pronasique de la fraction hydrosoluble et celui du résidu de cette extraction solubilisé dans la solution d'urée 8M, nous a permis d'obtenir trois à quatre glycopeptides

différents parmi lesquels les plus abondants ont un caractère "neutre" (léger déplacement vers l'anode).

- Les oses neutres présents dans les glycopeptides de l'extrait hydrosoluble sont : le galactose, le mannose et le glucose. Ce dernier est retrouvé surtout dans les fractions mineures. Les glycopeptides de l'extrait solubilisé dans la solution d'urée 8M (résidu de l'extraction aqueuse) renferment le galactose et le mannose.

- L'osamine présente est la glucosamine. La galactosamine a été identifiée dans le composant le plus basique des glycopeptides provenant de la fraction hydrosoluble.

- Les acides aminés : l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycolle, la sérine et la thréonine sont présents dans chaque glycopeptide séparé.

- La liaison glycanne-protide est du type glycosylaminique.

- Les fractions majeures des glycopeptides provenant des substances séparées par l'extraction aqueuse diffèrent dans leur composition en glucides et dans leur rapport molaire des acides aminés relatif à l'acide aspartique. Malgré les différences de composition en glucides, ces glycopeptides présentent une certaine ressemblance dans leur structure glycannique : le galactose se trouve en position externe par rapport au mannose et aux osamines.

L'étude comparative des "glycoprotéines de structure " de l'aorte de Porc et de Cheval montre que :

- les fractions osidiques sont liées par des liaisons "N-aspartyl-glucosaminylamine" à la chaîne peptidique.

- la différence des rapports molaires des oses, les chromatogrammes bidimensionnels des oligosides indiquent que les glycannes sont différentes.

- une ressemblance structurale existe entre les glycopeptides de ces deux espèces comme le montre l'analogie de la composition en acides aminés et la position terminale du galactose et du glucose par rapport au mannose et aux osamines.

Ces études confirment que le stroma insoluble de la média de Porc et de Cheval renferment les glycoprotéines. Ayant la composition complexe, la structure de la fraction osidique de ces glycoprotéines représente une iso-glycane (dénomination proposée par MONTREUIL et al. pour les glycannes "renfermant de nombreux types d'oses associés en molécules ramifiées"). D'autre part, le trait commun dans la structure des chaînes glucidiques met en évidence une analogie de structure qui existe entre nombreux glycoprotéides animaux.

La signification biologique et biochimique de ces glycoprotéines tissulaires forme pour le moment le sujet de recherche. Toutefois, les expériences démontrent que les "glycoprotéines de structure" ont un rôle dans les phénomènes immunopathologiques.

B I B L I O G R A P H I E

- ANDERSON B., HOFFMAN P. et MEYER K.,
Biochim. Biophys.
Acta, 1963, 74 , 309 et
J. Biol. Chem., 1965, 240 , 156 (72).
- ANDERSON B., SENO N., SAMPSON P., RILEY J.G., HOFFMAN P. et MEYER K.,-
J. Biol. Chem., 1964, 239, PC 2716 (79)
- ANDERSON D.W.H. et STODDART J.F.-
Carbohydrate Res., 1966, I , 417, (128, 135)
- BAHRENS M.
in : Structure and Function of Connective Tissue.
Proc. of Advanced Study Inst, 1964, Butterworth, London (37).
- BALAZS E.,
Federation Proc., 1958, 17 , 1086 (89).
- BAUCHER E., SCHERZ H. et KAINDL K.-
Mikrochim. Technanal. Acta, 1964, 652 (130).
- BENNINGHOF A.,
Ztschr. Zellforsch. Mikroskop. Anat., 1927, 6, 349 (16)
- BERENSON G.S.-
Biochem. Biophys. Acta, 1958, 28, 176, (34, 85, 107).

BHAVANANDAN V.P., BUDDECKE E., CARUBELLI R. et GOTTSCHALK A.-

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 16, 333 (275).

BLSCHEL M.D., AUSTIN J.H., KEMENY M.D., HUBBLE CH., et LEAR R.K.-

J. Chromatog., 1965, 20, 417 (127).

BISERTE G. et OSTEUX R.-

Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 44, 50 (183; 207).

BOBBIT J.M., -

Adv. Carboh. Chem., 1956, 11, I (219).

BOGDANOV V., KAVERZNEVA E. et ANDREJEVA A.-

Biochem. Biophys. Acta, 1962, 65, 168, (156, 224, 225, 227, 263, 268)

BOUISSOU H., SENDRAIL-PESQUE et CASTAGNOL R.-

in : Enzymology et Immunologie dans l'Athérosclérose.

Colloque International de Bordeaux 1964.

Fac. Mixte de Médecine et Pharmacie Ed. H. Bricoud p. 12 (12)

BOURRILLON R. et MICHON J.-

Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 267 (145).

BOURRILLON R., MICHON J. et GOT R.,

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 47, 243 (284).

BOWES J.H., ELLIOTT R.G. et MOSS J.A.,

Biochem. J., 1955, 61, 143 (49)

BRAY B.A., LIEBERMAN R. et MEYER K.-

J. Biol. Chem., 1967, 242, 3373 (84)

BRENNER M. et NIEDERWIERSER A.-

Experientia, 1961, 17, 237, (194)

BROWN J.L., KOORAJIAN S., KATZE J. et ZABIN J.-

J. Biol. Chem., 1966, 241, 2826 (180)

BUDDECKE E.-

Z. Physiol. Chem., 1960, 318, 83, (13, 87, 92, 105, 112)

BURTON A.C.-

Physiol. Rev., 1954, 34, 619 (17)

BUTLER W.J. et CUNNINGHAM L.W. -

J. Biol. Chem, 1966, 241, 3883 (168, 170, 250).

CASTELLANI A., ZONTA L. et DE LUCA L.,

Giorni Biochim., 1965, 14, 135 (73).

CARASSO N., FAVARD P. et OBERLIN A.

Biocristallographie in : C. MAGNAN : *Traité de Microscopie, Electronique*
Hermann, Paris 1961, III9-1206 (46).

CHAPMAN J.A. et STEVEN F.

in : *Biochimie et physiologie du tissu conjonctif*
Symp. Internat. Lyon 1965. Ed. P. COMTE (44).

CHAPUT M., MICHEL G. et LEDERER E.-

Experientia, 1961, 17, 107 et
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 310 (244)

CHOSSON A. et MONTREUIL J.-

Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, 47, 1881 (146, 151, 160, 164, 240).

CUNNINGHAM L.W., FORD J.D. et SEGREST J.P.

J. Biol. Chem. 1967, 242, 2570 (251)

DAWSON G. et CLAMP J.R. -

Biochim. Biophys. Res. Commun., 1967, 26, 349 et
Biochem. J., 1967, 103, 5p (257)

DELAUNAY A. et BAZIN S.

in : *Enzymologie et immunologie dans l'athérosclérose.*
Colloque International de Bordeaux. 1964, p. 130
Fac. Mixte de Médecine et Pharmacie de Bordeaux.
Ed. Bricaud, 1964 (59).

- DENT C.E. -
Biochem. J., 1947, 41, 240 et
1948, 43, 169 (172)
- DESCAMPS J., MONSIGNY M. et MONTREUIL J.-
C.R. Acad. Sci. D. 1968, 266, 1775 (256)
- DISCHE Z.-
J. Biol. Chem. 1947, 167, 189 (193)
- DUMAZERT C., GHIGLIONE C. et PUGNET T.-
Bull. Soc. Chim., 1963, 475 (123).
- DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J.-
C.R. Acad. Sci., 1966, 262, 2535 (255)
- DUS K., BARTSCH R.G. et KAMEN M.D.-
J. Biol. Chem., 1962, 237, 3083 (181)
- EYLAR H. et JEANLOZ R.W.-
J. Biol. Chem., 1962, 237, 1021 (218-282)
- EYLAR H. et JEANLOZ R.W.-
J. Biol. Chem. 1962a, 237, 622, (239)
- FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F.-
J. Biol. Chem. 1948, 181, 499 (154)
- FULLER A.T.-
Brit. J. Exp. Path. 1938, 19, 129 (152)
- GOTTSCHALK A.-
Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1965, 43, 391 (246)
- GOTTSCHALK A.-
The Glycoproteins. Elsevier 1966, p. 287 (271)
- GRANT R.A. -
J. Atheroscler. Res., 1967, 7, 463 (32, 42, 88, 110)

- GRASSHOF H.-
Deut. Apotheker Ztg, 1963, 103, 1396 (121)
- GRASSMAN W.
in : Biochimie et physiology du tissu conjonctif.
Symp. International, Lyon 1965, Ed. P. Comte (47, 48)
- GRASSMAN W., HANNING K, ENDRES H et RIEDL A.
Amino acid séquences of collagén in : Connective tissue : a Symposium Blackwell Scientific Publications Oxford 1957 (50)
- GROSGOGÉAT Y. et LENEGRE J.-
Les lésions aortiques spontanées chez le Lapin. in : Le rôle de la paroi artérielle dans l'athérogénèse.
Colloques internationaux du CNRS n° 169. Paris 1968, p. 240 (11).
- GROSS J.-
Symposium on Atherosclérosis.
National Acad. Sci. Washington Publ., 338, 1954, p. 129 (43)
- GROSS J., HIGHBERGER J.H. et SCHMITT F.O.-
Proc. Nat. Acad. Sci., 1955, 41, 1 (29)
- HANES C.S. et ISHERWOOD F.H.-
Nature, 1949, 164, 1107 (101, 104)
- HARBON S., HERMANN-BOUSSIER G. et CLAUSER H.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 1279 (270)
- HARTLEY F.K. et JEVONS F.R.-
Biochem. J., 1962, 84, 134 (269)
- HEILMANN J., BARROLIER J. et WATZKE E.-
Z. Physiol. Chem., 1957, 309, 219 (195)
- HESSE G. et ALEXANDER M.-
Journées Intern. Etudes Méthodes Sepn. Chromatog. Paris 1961.
p. 229, Publ. 1962 (126).
- HEYMANN H., MANIELLO J.M. et BARKULIS -
J. Biol. Chem., 1963, 238, 502 (162).

INGLIS G.R. -

J. Chromatog., 1965, 20, 417 (124)

JAMIESON G.A.-

Biochem. Biophys. Res. Commun, 1964, 17 , 775 et
J. Biol. Chem., 1965, 240, 2019 (265)

JEANLOZ R.W.-

α -Acid glycoprotein in : Gottschalk : The Glycoproteins. Elsevier
1966, p. 363 (283).

JEANLOZ R.W.-

Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42 , 303 (281)

JEVONS F.R.-

Nature, 1958, 181 , 1346 (223, 262)

JOHANSEN P.G., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A.-

Nature, 1958, 181 , 1345 (259)

JOLLES P.,

Bull. Soc. Chim., 1963, 2923 (173, 176)

KABAT E.A., BASSETT E.W., PRYZWANSKY K., LLOYD K.O., KAPLAN M.E. et LAYUG E.J.-

Biochemistry, 1965, 4 , 1632 (248)

KABAT E.A. et FURTH J.-

Am. J. Path., 1941, 17, 303 (24)

KAPLAN D.

Biochem. Biophys. Acta, 1967, 136, 394 (71)

KAPLAN D. et MEYER K.-

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960, 105 , 78 (106)

KATSURA N. et DAVIDSON E.A. -

Feder. Proc., 1965, 24 , 607 et
Biochem. Biophys. Acta 1966, 121, 120 (82)

KIRK J.E., EFFERS P.G. et CHIANG S.E.-

J. Gerontol, 1954a, 9, 10 (25)

KIRK J.E. et LAURSEN T.J.--

J. Gerontol., 1955a, 10 , 18 (8).

KIRK J.E. et LAURSEN T.J.--

Changes with age in diffusion coefficient of solutes for human tissue membranes. in : CVIBA Fondation Colloquia on ageing, vol. I p. 69-75. Little & Brown Boston (9)

KUHN R., GAUHE et BAER H.--

Chem. Ber., 1956, 89 , 1027 (237)

KUHN R., TRISCHMANN H. et LOW J.--

Angew. Chem., 1955, 67 , 32 (220, 235).

KUHN R. et RUEBINS H.W.--

Chem. Ber., 1952, 85 , 38 (279).

LAMKIN W.M., WARD D.N. et WALBORG E.F.--

Anal. Biochem., 1966, 17 , 485 (132)

LAMPORT D.T.A.--

Nature 1967, 216, 1322 (252)

LANSING A.J. -

The Arterial Wall. William & Wilkins Comp., 1959, Baltimore (5, 14, 22, 53).

LANSING A.J., ROBERTS E., RAMASARMA G.V., ROSENTHAL T.B. et ALEX M.--

Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1951, 76 , 714 (31, 60)

LANSING A.J., ROSENTHAL T.B. et ALEX M.--

J. Gerontol., 1950, 5 211 (30, 51)

LEDVINA M. et BARTOS F.--

J. Chromatog., 1967, 31 , 56 (55, 58)

LEHNINGER A.J.--

The Metabolism of Arterial Wall in : Lansing A : the Arterial Wall p. 220 William & Wilkins Comp. 1959, Baltimore (15)

LINDAHL U.--

Biochem. Biophys. Acta, 1966, 130 , 368 (68)

- LINDAHL U., CIFONELLI J.A., LINDAHL B. et RONDEN L.-
J. Biol. Chem, 1965, 240, 2817 (69)
- LINDAHL U et RODEN L.-
J. Biol. Chem., 1965, 240, 2821 (67)
- LINDAHL U. et RODEN L.-
J. Biol. Chem., 1966, 241, 2113 (80)
- LINSTEAD R.P., OWEN L.N. et WEBB R.F.-
J. Chem. Soc; 1953, 1211 (272).
- Mc CARTY M.,
J. Exp. Med, 1958, 108, 311 (153)
- MAKINO M., YAMASHINA J.-
J. Biochem., 1966, 60 , 262, (261)
- MALAPRADE L.-
Bull. Soc. Chim., 1928, 43 , (4), 683 (217)
- MARLER E. et DAVIDSON E.A.-
Proc. Nat. Acad. Sci U.S. 1965, 54, 648 (83)
- MATHEWS M.B.-
Arch. Biochem. Biophys., 1956; 61 , 367 (63, 90, 91, 113)
- MATHEWS M.B.-
Biochem. j. 1965, 96, 715 -(65).
- MESTER L., MOCZAR E., MEDGYESI G. et LAKI K.-
C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 3210 , (98, 104, 111, 150, 157, 166, 199, 284).
- MESTER L., MOCZAR E. et SZABADOS L.-
C.R. Acad. Sci., 1967, 265, 877 (161, 165)
- MESTER L., MOCZAR E., VASS G. et SZABADOS L. -
Path. Biol., 1965, 13, 540 (267)
- MEYER K.-
Fédération Proc., 25, 1032 (61, 66, 86)

- MEYER K., DAVIDSON E., LINKER A. et HOFFMAN P.-
Biochem. Biophys. Acta, 1965, 21, 506 (35, 41, 108)
- MEYER K., SENO N., ANDERSON B., LIPPMAN V. et HOFFMANN P.-
Feder. Proc., 1964, 23, 484 (78)
- MICHEEL F. et BERENDER O.-
Mikrochim. Ichnoanal. Acta, 1963, 519 (122)
- MOCZAR E. et MESTER L.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 881 (221-236)
- MOCZAR E. et MOCZAR M.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1159 (149)
- MOCZAR M., MOCZAR E. et ROBERT L.-
Biochem. Biophys. Res., Comm, 1967, 28, 380 (38).
- MOCZAR E., MOCZAR M., SCHILLINGER G. et ROBERT L.-
J. Chromatog., 1967, 31, 561 (133)
- MOMMAERTS W.M.F.H.-
Perspectives in the study of Arterial Muscle in : Lansing A : The Arterial Wall p. 46, William & Wilkins Comp. 1959 Baltimore (18)
- MONSIGNY M. et MONTREUIL J.-
C.R. Acad. Sci., 1966, 262, 1780 (215)
- MONTREUIL J. et BISERTE G.-
C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 1898 et
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 959 (27)
- MONTREUIL J. et CHOSSON A.-
C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3071 (143, 147, 241)
- MONTREUIL J., CHOSSON A. et SPIK G.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1867 (144, 148, 155, 158, 163, 242)
- MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T.-
C.R. Acad. Sci., 1967, 264, 2068 (230, 274, 277)
- MONTREUIL J. et SPIK G.-
Microdosage des glucides , méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux.
Monogr. Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille, 1964, Fasc. I (99, 185, 233)

MONTREUIL J. et SPIK G.-

Microdosage des glucides
Monogr. Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille, 1968, fasc. 2 (243)

MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E. et SCHEPPLER N.-

Chromatographie Symposium II.
Bruxelles, 1962, Soc. Belge Sci. Pharm. Ed. 1962, p. 59 (204,
214, 280).

MONTREUIL J. SPIK G. et KONARSKA A.-

Microdosage des glucides. Méthodes chromatographiques de dosage des
oses neutres. Monogr. Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille, 1967, Fasc. 3
(100, 136, 142).

MOORE D.H. et RUSKA H.-

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1957, 3, 457 (21).

MOORE S. et STEIN H.W.-

J. Biol. Chem., 1954, 211, 907 (189)

MUIR H.-

Biochem. J., 1958, 69, 195 (70)

MUNIER R.L., THOMMEGAY C. et SARRAZIN G.-

Bull. Soc. Chim, 1967, 397I (196, 197, 208)

NEUBERGER A. et PAPKOFF H.,

Biochem. Biophys. Acta, 1962, 63, 340 (167)

NEUMANN R.E. et LOGAN M.A.-

J. Biol. Chem., 1950, 186, 549, (109)

NIEDERWIESER A. et PATAKI G.-

Chimia, 1960, 14, 378 (184)

NISHIHARA T.-

Collagen Currents, 1963, 4, 386 (45)

NOLAN C. et SMITH E.L.-

J. Biol. Chem, 1962, 237, 455 (258)

NUENKE R.H. et CUNNINGHAM L.W. -

J. Biol. Chem., 1961, 236, 2452 (210, 216)

OKUYAMA T. et SATAKE K.-

J. Biochem., (Tokyo) 1960, 454 (171, 175, 188)

PALADE G.E.-

J. Biochem. Biophys. Cytol., 1956, 2, suppl. 85 (20)

PALMER J.W., SMYTH E.M. et MEYER K.-

J. Biol. Chem., 1937, 119, 491, (192, 234)

PARTRIDGE S.M.-

Biochem. Soc. Symp., 1949, 3, 52 (138)

PARTRIDGE S.M.-

Nature 1949, 164, 443 (222)

PARTRIDGE S.M. -

The constitution and biosynthesis of the cross-linkages in elastine
in : Biochimie et physiologie du tissu conjonctif.
Symp. International, Lyon, 1965, Ed. P. Comte (56, 57)

PARTRIDGE S.M., ELSDEN D.F. et THOMAS J.-

Nature, 1963, 197, 1297 (54)

PAQUIN R. et PERCHERON F.-

Bulletin Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 101 (28)

PASTUSKA G.-

Z. analyt. Chem., 1961, 179, 427 (131)

PHOTAKI J.-

J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 1123 (273)

PORTMAN O.W., ALEXANDER M. et MARUFFO C.S.-

Arch. Biochem. Biophys., 1967, 122, 344 (40)

PRESS E.M. et PORTER R.R.-

Immunoglobins in : Gottschalk A : The Glycoproteins.
Elsevier 1966, p. 395 (285).

REINDEL F. et HOPPE W.-

Chem. Ber., 1954, 87, 1103, (200)

RIMINGTON C. -

Biochim. J., 1931, 25, 1062 (174, 178, 187, 191, 232)

ROBERT L. et DISCHE Z.-

Biochim. Biophys. Res. Comm., 1963, 10, 209 (2, 96)

ROBERT L., PAYRAU P., POULIQUEN Y., PARLEBAS J. et ROBERT B. -

Nature, 1965, 207, 383 (3)

ROBERT B., PARLEBAS J. et ROBERT L.-

C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 232 (95, 114)

ROBERT L., PARLEBAS J., OUDEA P., ZWEIBAUM A. et ROBERT B.-

Structure and Function of Connective and Skeleral Tissue
Proc. of Advanced Study Inst., 1964, p. 406, Butterworth, London,
(1, 93, 97, 103).

ROBERT L., ROBERT M., MOCZAR M. et MOCZAR E.-

Constituants macromoléculaires de la paroi artérielle in : Le rôle
de la paroi artérielle dans l'athérogénèse.
Colloques du CNRS 1968, n° 169, p. 395 (4, 13, 36, 39, 115).

ROBERTS G.P. -

J. Chromatog., 1966, 22, 90 (198)

RODEN L.-

Feder. Proc., 1964, 23, 484 (74)

RODEN L.-

Feder. Proc., 1966, 25, 409 (75)

RODEN L. et ARMAND G.-

J. Biol. Chem., 1966, 241, 65, (81)

RODEN L, GREGORY J. et LAURENT T. -

Biochem. J., 1964, 91, 2 P (76)

ROSEVEAR J.W. et SMITH E.L.-

J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 250 (254)

ROTHFUS J.A. et SMITH E.L.-

J. Biol. Chem., 1963, 236, 1402.

- SANGER F.-
 Biochem. J., 1949, 45, 563 (102, 179, 182, 209, 228).
- SCEBAT L., RENAI S. J., GROULT N., IRIS L. et LENE GRE G.-
 Rev. Franç. Ed. Clin. Biol., 1965, 122, 441 (94)
- SCHIFFMANN G., LESKOWITZ E.A. et KABAT S. -
 J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, II22 (238)
- SCHWEIGER A. -
 J. Chromatog., 1962, 9, 374 (II8)
- SCOTT J.E.-
 Meth. Biochem. Anal., 1960, 8, 145 (26)
- SENO N., MEYER K., ANDERSON B. et HOFFMAN P.-
 J. Biol. Chem., 1965, 240, 1005 (77)
- SERAFINI-FRACASSINI A. et TRISTRAM G.R.-
 Studies on human aortic elastine in : Biochimie et physiologie du
 tissu conjonctif.
 Symp. International, Lyon, 1965, Ed. Comte (52, 53).
- SHATTON J. et SCHUBERT M.-
 J. Biol. Chem., 1954, 211, 265 (62, 64)
- SMITH J.-
 Chromatographic and Electrophoretic Techniques.
 Vol. 1 p. 32 eme édition 1960 Heinemann London.
- SOKOLOVSKY M., SADEN T. et PATCHORNIK A.-
 J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, I2I2, (229, 278)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J.-
 C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 4282 (205, 212)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. -
 C.R. Acad. Sci., 1966, 263, 893 (206, 213, 266)
- SPIRO R.G.-
 J. Biol. Chem., 1962, 237, 382 (I77)
- STAHL E.-
 Dünnschicht chromatographie. Springer Verlag
 Berlin, Göttingen-Heidelberg, 1962, p. 425 (20I)

STAHL E. et KALTENBACH U.-

J. Chromatog. 1961, 5 , 351 (II6)

TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W.-

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 16 , 404 (245, 276)

TANAKA K. et PIGMAN W.-

J. Biol. Chem., 1965, 204, PC 1487 (247)

TILLMANS J. et PHILIPPI K.-

Biochem. Z., 1929, 215, 36 (186, 190, 231)

TINELLI R.-

Bull. Soc. Chim. Biol. , 1966, 48, 182 (I34)

TRAVELYAN W.E., PROCTOR D.P. et HARRISON J.S.-

Nature, 1950, 166 , 444 (I37, I41, I59)

VOMKOFF D.W., TRUITT J. et TUCKER T.C.-

J. Chromatog., 1966, 21, 335 (II9, I29)

WALLENFELS K.-

Naturwiss. 1950, 37, 491 (I39)

WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H. et EGGE H.-

Angew. Chem., 1963, 519 (22I)

WALLENFELS K., BERNDT E. et LIMBERG G.-

Angew Chem. , 1953, 65, 758I (I40)

WASSERMANN L. et HANUS H.-

Naturwiss., 1963, 50, 351 (I25)

WEIDEL W. et PELZER H.-

Adv. Enzymol., 1964, 26, 193 (253)

WINZLER R.J., HARRIS E.D., PEKAS D.J., JOHNSON C.A. et WEBER P.-

Biochemistry 1957, 6 , 2195 (249)

WOERNER A.C.-

Vasa vasorum of Arteries, their
Demonstration and Distribution in : Lansing A :The Arterial Wall
p. I-I4 William-Wilkins Comp. Baltimore 1959 (6,7,10,19).

WOLFROM M.L., MUCHNIK R. et de LEDERKREMER R.M. --

Anal. Chem., 1963, 35, 1357 (I20)

WOLFROM M.L., PATIN P.L. et de LEDERKREMER R.M.-

J. Chromatog., 1965, 17, 488 (II7).

YAMASHINA J. et MAKINO M.-

J. Biochem, (Japan) 1962, 51, 359 (I69, 202, 203, 2II, 226, 260)

YAMASHINA J., MAKINO M., BAN I.K. et KOJIMA R.-

J. Biochem, 1965, 58, 168, (264)

ZWEIFACH B.W.-

Transactions of the 3rd conference of the Josiah Macy jr
Foundation p. 13-52 Josiah Macy Foundation. New-York 1949 (23)

