

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

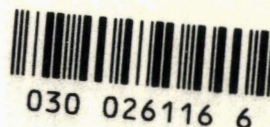
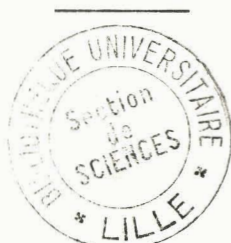
par

Monsieur Pierre CHARET

Ingénieur-Chimiste E. N. S. C. L.

Assistant à l'I.U.T. de Biologie Appliquée de LILLE

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE
DE LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE :
ISOLEMENT ET SEQUENCE DE DEUX GLYCOPEPTIDES
OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE



PRÉSENTÉ LE 20 JUIN 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J. MONTREUIL Président
G. BISERTE Examineur
M. MONSIGNY Rapporteur

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de
Chimie Biologique de la FACULTE des SCIENCES de LILLE, de
Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, sous la direction de
Monsieur M. MONSIGNY, Maître de Conférences.

Mme DRAN Raymonde
 M. GOULMAND Pierre
 M. GRUSON Laurent
 M. GUILBAULT Pierre
 M. HERMAN Maurice
 M. HUARD de la MARRE Pierre
 M. JOLY
 Mlle KOSMANN Yvette
 M. LABLACHE COMBIER Alain
 M. LACOSTE Louis
 M. LANDAIS Jean
 M. LAURENT François
 M. LEHMANN Daniel
 Mme LEHMANN Josiane
 M. LEROY Jean-Marie
 M. LEROY Yves
 M. LOUAGE Francis
 M. LOUCHEUX Claude
 M. MAES Serge
 M. MAIZIERES Christian
 M. MESSELYN Jean
 M. MIGEON Michel
 M. MONSIGNY Michel
 M. MONTEL Marc
 M. MONTUELLE Bernard
 Mme MORIAEZ BOULLET Claude
 M. NICOLE Jacques
 M. PANET Marius
 M. PAQUET Jacques
 M. PARSY Fernand
 M. PONSOLLE
 M. POVY Jean-Claude
 M. RACZY
 M. ROOS Philippe
 M. ROY Jean-Claude
 M. SAADA Georges
 M. SALMER Georges
 M. SMET Pierre
 M. SEGUIER Guy
 M. THOMAS Daniel
 M. WATERLOT Michel
 Mme ZINN Justin Nicole

Chimie Organique
 Chimie Physique
 Mathématiques
 Physiologie Animale
 Physique
 Calcul Numérique
 Biologie Animale
 Mathématiques
 Chimie Générale
 Biologie Végétale
 Chimie Organique
 Automatique
 Mathématiques
 Mathématiques
 E.N.S.C.L.
 I.U.T. Lille
 Sciences Appliquées
 Chimie Physique
 Physique
 Automatique
 Physique
 Sciences Appliquées
 Chimie Biologique
 Physique
 I.U.T. Lille
 I.U.T. Valenciennes
 E.N.S.C.L.
 Electrotechnique
 Sciences Appliquées
 Mécanique des Fluides
 C.S.U. Valenciennes
 Sciences Appliquées
 Radioélectrique
 I.U.T. Lille
 Psychophysiologie
 Physique
 Electronique
 Physique
 I.U.T. Béthune
 C.S.U. Valenciennes
 Géologie Générale
 Mathématiques

M. WATERLOT Gérard
M. WERTHEIMER Raymond

Géologie et Minéralogie
Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BENABOU Jean
M. LUCQUIN Michel
M. LEBRUN André
M. PARREAU Michel
M. SAVARD Jean
M. SCHALLER François
M. SCHILTZ René

Mathématiques
Chimie Physique
C.U.E.E.P.
Mathématiques
Chimie Générale
Biologie Animale
Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean
M. BODART Marcel
M. BOUISSET Simon
M. CELET Paul
M. CONSTANT Eugène
M. DELHAYE Michel
M. DERCOURT Jean-Michel
M. DEVRAINNE Pierre
M. GUILLAUME Jean
Mme LENOBLE Jacqueline
M. LIEDER Robert
Mlle MARQUET Simone
M. MONTARIOL Frédéric
M. PROUVOST Jean
M. VAILLANT Jean

Physique
Biologie Végétale
Physiologie Animale
Géologie Générale
Electronique
Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
Géologie et Minéralogie
Chimie Minérale
Biologie Végétale
Physique
Biologie Végétale
Mathématiques
Chimie Minérale Appliquée
Géologie et Minéralogie
Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCE (et chargés des fonctions)

M. ABBAR
M. AUBIN Thierry
M. BEGUIN Paul
M. BILLARD Jean
M. BKOUCHE Rudolphe
M. BOILLET Pierre
M. BOILLY Bénoni
M. BONNOT Ernest
M. BRIDOUX Michel
M. CAPURON Alfred
M. CARREZ Christian
M. CHOQUET Marcel
M. CORTOIS Jean
M. COULON Jean-Paul

I.U.T. Amiens
Mathématiques Pures
Mécanique des Fluides
Physique
Mathématiques
Physique
Biologie Animale
Biologie Végétale
I.U.T. Béthune
Biologie Animale
Calcul Numérique
I.U.T. Lille
Physique
Electrotechnique

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

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

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre
M. BEAUFILS Jean-Pierre
M. BECART Maurice
M. BLOCH Vincent
M. BONNEMAN Pierre
M. BONTE Antoine
M. BOUGHON Pierre
M. BOURIQUET Robert
M. CORSIN Pierre
M. DECUYPER Marcel
M. DEDECKER Paul
M. le Doyen DEFRETIN René

M. DEHORS
M. DELATTRE Charles
M. DURCHON Maurice
M. FOURET René
M. GABILLARD Robert
M. GLACET Charles
M. GONTIER Gérard
M. HEUBEL Joseph
M. LIEBAERT
M. MONTREUIL Jean
M. MORIAEZ Michel
M. MARTINOT LAGARDE
M. PEREZ Jean-Pierre
M. PHAM MAU QUAN
M. POUZET Pierre
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène
M. TILLIEU Jacques
M. TRIDOT Gabriel
M. VIDAL Pierre
M. VIVIER Emile

Astronomie et Calcul Numérique
Chimie Générale
I.U.T. Lille
Psychophysiologie
Chimie Industrielle
Géologie Appliquée
Mathématiques
Biologie Végétale
Paléobotanique
Mathématiques
Mathématiques
Directeur du Laboratoire de Biologie
Maritime de Wimereux
Automatique
Géologie Générale
Biologie Animale
Physique
Electronique
Chimie Organique
Mécanique des Fluides
Chimie Minérale
I.U.T. Lille
Chimie Biologique
I.U.T. Valenciennes
Mécanique des Fluides
Physique
Mathématiques
I.U.T. Lille
Mathématiques
Physique
Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.L.
Automatique
Biologie Animale

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	2
I - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	3
A - <u>FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE</u>	3
1 - FIXATION DU FER ET DE DIVERS METAUX	3
2 - CAPACITE DE FIXATION DU FER	4
3 - CONDITIONS DE FIXATION DU FER	4
4 - MODALITES DE LA FIXATION DU FER	4
B - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE</u>	4
C - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	
1 - COMPOSITION CENTESIMALE	5
2 - COMPOSITION MOLAIRE	5
D - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	9
E - <u>POLYMORPHISME DE LA TRANSFERRINE HUMAINE</u>	9
II - <u>STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE HUMAINE</u>	12
A - <u>STRUCTURE DE LA PROTEINE</u>	12
1 - NATURE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX	12
2 - NATURE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX	13
B - <u>STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	13
C - <u>MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE</u>	14
D - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE L'APO-ASIALOTRANSFERRINE</u>	14
TRAVAUX PERSONNELS	18
ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES	19
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	19
A - <u>MATERIEL</u>	19
B - <u>HYDROLYSE TRYPSIQUE</u>	20

C - <u>FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE</u>	21
1 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION	22
2 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS	23
3 - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE PREPARATIVE, SUR PAPIER	23
D - <u>RUPTURE DES PONTS DISULFURES PAR OXYDATION PERFORMIQUE</u>	23
E - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	23
F - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	24
1 - COMPOSITION CENTESIMALE	24
2 - COMPOSITION MOLAIRES	24
II - <u>RESULTATS</u>	
A - <u>ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES A PARTIR DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE L'APOTRANSFERRINE</u>	25
1 - PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX G 50	25
2 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS	25
3 - CONCLUSIONS	26
B - <u>PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES</u>	26
1 - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE A	26
2 - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE B	26
3 - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE C	29
C - <u>PURIFICATION DU GLYCOPEPTIDE C</u>	32
1 - <u>ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR PAPIER</u>	32
2 - <u>RUPTURE DES PONTS DISULFURES</u>	34
D - <u>CONCLUSIONS</u>	37

DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES
--

I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	39
A - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR DOSAGE DES GROUPEMENTS NH₂ LIBRES</u>	39
B - <u>RUPTURE DES PONTS DISULFURES</u>	
1 - OXYDATION PERFORMIQUE	40
2 - REDUCTION ET ALKYLATION	40
C - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX</u>	
1 - METHODE D'HYDRAZINOLYSE	42
2 - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES	47
D - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX</u>	48
1 - METHODE DES DNP-AMINO-ACIDES DE SANGER	48
2 - METHODE DES DANSYL AMINO-ACIDES	49
3 - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN	52
E - <u>METHODE DE RUPTURE SPECIFIQUE DES CHAINES PEPTIDIQUES</u>	54
1 - METHODE ENZYMATIQUE	54
2 - METHODE CHIMIQUE	54
II - <u>RESULTATS</u>	56
A - <u>SEQUENCE PEPTIDIQUE DU GLYCOPEPTIDE B</u>	56
1 - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE	56
2 - RUPTURE DES PONTS DISULFURES	56
3 - ACIDES AMINES N-TERMINAUX	56
4 - ACIDES AMINES C-TERMINAUX	59
5 - HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE	59

6 - HYDROLYSE PAR LA CHYMOTRYPSINE	62
2 7 - HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE	64
8 - HYDROLYSE PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE DILUE	66
B - <u>ETUDE DU GLYCOPEPTIDE C</u>	68
1 - FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE C TOTALE	68
2 - FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE COa ₁ , COa ₂ et COa ₃	68
3 - SEQUENCE DU GLYCOPEPTIDE COb	68
C - <u>CONCLUSIONS</u>	69
III - <u>RECHERCHE DES ACIDES AMINES TERMINAUX DE LA</u> <u>TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE</u>	71
A - ACIDES AMINES C-TERMINAUX	71
B - ACIDES AMINES N-TERMINAUX	72
CONCLUSIONS GENERALES	73
BIBLIOGRAPHIE	73

INTRODUCTION

Le travail dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre des recherches effectuées au Laboratoire sur la structure de la transferrine sérique humaine. Bien qu'elle soit isolée depuis 1952 et qu'elle présente un intérêt biologique considérable, on ignore pratiquement tout de sa structure.

Dans une première série de travaux, nous nous sommes limité à l'étude de la structure de la fraction glucidique et aux séquences peptidiques au voisinage du point d'attache du ou des groupements glycaniques sur la protéine. La connaissance de ces séquences est fondamentale en ce qui concerne le problème du codage par la chaîne peptidique, de la fixation sur l'asparagine du premier résidu de N-acétyl-glucosamine qui constitue la première étape de la biosynthèse du groupement glycanique.

Dans ce but, nous nous sommes proposé d'isoler les deux glycannes sous la forme de deux glycopeptides suffisamment différents par la composition de leurs chaînes peptidiques pour que leur séparation puisse être réalisée par chromatographie d'échange d'ions ou par électrophorèse. La trypsine nous a semblé, à cet égard, l'enzyme le plus satisfaisant, l'action de la pronase s'effectuant, en effet, d'une manière à la fois profonde et incontrôlable.

Dans un premier chapitre de Généralités, nous exposerons l'état actuel de nos connaissances sur la structure de la transferrine et les raisons qui nous ont guidé dans le choix de l'enzyme protéolytique.

Nous décrirons ensuite les procédés que nous avons employés pour isoler les glycopeptides en utilisant, non pas les différences de composition des fractions glucidiques, mais en tirant parti des différences de compositions et de séquences des acides aminés au voisinage de l'attache glycanne-protide. Puis comment nous avons déterminé la séquence des acides aminés dans les glycopeptides que nous avons obtenus.

GENERALITES

Chez l'Homme comme chez de nombreux animaux, la transferrine sérique est une glycoprotéine dont le principal rôle est de transporter le fer au travers de tout l'organisme (*). On la trouve à la concentration d'environ 2 g par litre dans le sang humain. Mais elle existe aussi dans de nombreux liquides biologiques comme les urines, le liquide céphalo-rachidien, le lait, la bile, les sécrétions nasales, la salive, la lymphe ainsi que dans de nombreux tissus, notamment le foie et le rein.

I - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La transferrine sérique humaine est obtenue avec les meilleurs rendements à partir de préparations enrichies provenant de fractionnement du plasma par le procédé à l'éthanol de COHN et coll. (1) ou par le procédé au rivanol de HOREJSI et SMETANA (2).

Dans les laboratoires de la firme BEHRINGWERKE, SCHULTZE et coll. ont mis au point plusieurs procédés généraux de fractionnement du sérum qui associent le relargage par les sels neutres et par l'éthanol, la précipitation au rivanol, la chromatographie préparative d'absorption et d'échanges d'ions, l'électrophorèse préparative de convection ou sur gels divers. Ils obtiennent ainsi à l'échelle industrielle de la transferrine à 99 p.100 de pureté.

Nos recherches ont été effectuées sur de tels échantillons.

A - FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE

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

1 - FIXATION DU FER ET DE DIVERS METAUX

La propriété que possède la transferrine de fixer le fer a été mise en évidence pour la première fois par SCHADE et CAROLINE (3).

Un peu plus tard, HOLMBERG et LAURELL (4) démontrent que, dans le plasma, la transferrine fixait uniquement le fer. Mais d'autres auteurs et notamment JONES et PERKINS (5) ont montré que la transferrine pouvait, in vitro, fixer les ions comme le calcium, le cuivre, le zinc, le cobalt.

(*) La transferrine interviendrait aussi dans le fonctionnement de certaines chaînes respiratoires.

2 - CAPACITE DE FIXATION DU FER

Actuellement, tous les auteurs s'accordent pour affirmer que la transferrine fixe 2 ions ferriques par molécule de glycoprotéine.

3 - CONDITIONS DE FIXATION DU FER

Les expériences de conjugaison du fer sur la transferrine ont montré que :

a - Le complexe fer-transferrine se dissocie réversiblement en milieu acide ;

b - La présence de chélateurs oriente la fixation du métal sur des sites spécifiques ;

c - La présence d'ions bicarbonates favorise et stabilise cette dernière.

4 - MODALITES DE LA FIXATION DU FER

Actuellement, l'accord est généralement fait sur la participation de la fonction phénolique de la tyrosine à la fixation du fer, à raison de 3 résidus de cet acide aminé par atome de fer. D'autre part, il est vraisemblable que deux atomes provenant du noyau imidazole de l'histidine interviennent dans la fixation du fer.

Enfin, certains auteurs affirment que les deux sites de fixation du fer ne possèdent pas la même activité.

En conclusion, il est bien établi que la transferrine fixe deux atomes de fer sous forme d'ions ferriques sur deux sites spécifiques. Il semble, en outre, démontré que les fonctions phénoliques de 3 résidus de tyrosine par atome de fer sont impliquées dans la conjugaison, la participation de 2 résidus d'histidine restant à confirmer.

Quant à la différence de réactivité des deux sites de fixation, elle n'est pas encore démontrée. Toutefois, il est acquis que la fixation du fer modifie la forme et les propriétés de la molécule et stabilise celle-ci, notamment vis-à-vis de l'action des protéinases (SPIK (6) et SPIK et MONTREUIL (7)).

B - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

Actuellement, l'accord est loin d'être parfait sur la valeur de la masse moléculaire de la transferrine qui oscille suivant les auteurs entre 70 000 et 114 000. Ces différences s'expliquent, d'une part, par des variations des principaux paramètres qui permettent de calculer la masse

moléculaire (constante de sédimentation, constante de diffusion, coefficient de viscosité) et, d'autre part, par la nature des procédés utilisés (ultra-centrifugation, diffusion de la lumière, filtration sur gel, quantité de fer fixé). Nous avons rassemblé dans le Tableau I (p.6) les valeurs de masse moléculaire obtenues par différents auteurs, dans le Tableau II (p.7) les résultats obtenus par SPIK (8) lors d'une étude critique systématique des différents procédés. Ces résultats relativement homogènes nous ont incité à choisir 80 000 comme valeur de la masse moléculaire.

C - COMPOSITION EN GLUCIDES

La nature glycoprotéinique de la transferrine a été démontrée dès 1952 par KOEHLIN (9) et par SURGENOR, KOEHLIN et STRONG (10) qui ont trouvé un taux d'oses neutres de 1,8 p.100.

1 - COMPOSITION CENTESIMALE

La première détermination complète de la composition centésimale en glucides de la transferrine a été effectuée par SCHULTZE, GOLLNER et coll. (11). D'autres travaux furent réalisés par la suite et nous avons rassemblé dans le Tableau III (p.8) les résultats obtenus par les auteurs. L'examen de ces tableaux montre, par exemple, qu'à côté de 2,3 p.100 d'oses neutres, il existe 2 p.100 d'hexosamines et 1,35 p.100 d'acide sialique.

Les résultats donnés par différents auteurs révèlent très peu de différences puisque les valeurs en oses neutres oscillent entre 2,3 et 2,8 p.100, les valeurs en acides sialiques entre 1,2 et 1,4, des différences plus grandes apparaissent dans les valeurs données pour les hexosamines : 1,3 à 2. Cette discordance peut s'expliquer par la présence du fer dans la transferrine, celui-ci catalysant notablement la destruction des osamines lors de l'hydrolyse.

2 - COMPOSITION MOLAIRE

Les oses neutres ont été identifiés pour la première fois par chromatographie sur papier au galactose et au mannose par SCHULTZE, SCHMIDT-BERGER et coll. (12) en 1958. En outre, ces auteurs ont signalé la présence de traces d'acide uronique et de fucose, mais ces résultats ne reçurent ultérieurement aucune confirmation. La présence de galactose et de mannose a été vérifiée en 1961 par MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (13), puis par JAMIESON (14) en 1964. L'osamine a été identifiée, pour la première fois, à la glucosamine et l'acide sialique à l'acide N-acétyl-neuraminique en 1961 par MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (15). Ce dernier

Tableau I

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

Procédés utilisés	Masse moléculaire	Références
<u>Diffraction de la lumière</u>	90 000 88 000	MORRISON et LOUTIE, 1952 (16) SCHONENBERGER, 1955 (17)
<u>Osmométrie</u>	93 000 73 200	ONCLEY, SCATCHARD et coll., 1947 (18) ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (19)
<u>Sédimentation + diffusion</u>	89 000 82 500 91 000 92 000 86 000 73 800	SCHULTZE, HEIDE et coll., 1957 (20) HAZEN, 1963 (21) BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (22) BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (23) BEZKOROVAINY, 1966 (24) ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (25)
<u>Sédimentation + viscosité</u>	93 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (26)
<u>Equilibre de sédimentation</u>	82 700 69 700 93 000 + 3 000 114 000 + 5 000 73 400 80 000	ALLERTON, 1962 (27) CHARLWOOD, 1963 (28) BEZKOROVAINY, RAFELSON et LIKHTE, 1963 (29) ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (30) TANFORD, 1967 (31)
<u>Diffusion + Viscosité</u>	95 000	BEZKOROVAINY, RAFELSON, 1964 (32))
<u>"Gel filtration"</u>	70 000	SILBERZAHN, RICHARD et coll., 1967 (33)
<u>Teneur en fer à la saturation</u>	90 000 90 000 86 000 86 000 93 000 74 100	SURGENOR, KOECHLIN et coll., 1949 (34) KOECHLIN, 1952 (35) KATZ, 1961 (36) JANDL et KATZ, 1963 (37) BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (38) ROBERTS, MAKEY et coll., 1966 (39)

Tableau II

Masse moléculaire de la transferrine déterminée par différents procédés (d'après SPIK) (40).

Méthodes appliquées	Masse moléculaire
Equilibre de sédimentation	72 900
Constantes de sédimentation et de diffusion	79 700 (a) 77 600 (b)
Chromatographie de filtration sur gel Sephadex G-100 Sephadex G-200	74 à 78 000 76 000
Teneur en fer	75 980
Teneur en acide sialique (c)	74 000

(a) Pour $D_{20}^{\circ} 5,4 \times 10^{-11}$ MKSA

(b) Pour $D_{20}^{\circ} 5,54 \times 10^{-11}$ MKSA

(c) Pour 3,5 résidus et 1,46 p.100

Tableau III

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

Hexoses (a)	Fucose	Osamines (b)	Acides sialiques (c)	Acides uroniques	Références
2,4	0,07	1,7-2	1-1,4	0,05	SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et coll., 1958 (41)
2,4	0,07	2	1,4	-	HEIMBURGER, HEIDE et coll., 1964 (42)
2,8	-	1,8	1,2	-	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (43)
2,5	-	1,3	1,4	-	JONES et PERKINS, 1965 (44)
2,6	-	-	1,3	-	JAMIESON, 1964 (45)
2,3(d)	-	1,98(d) (e)	1,43	-	SPIK, 1968 (46)

(a) Galactose + mannose.

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

(c) Exprimée en acide N-acétylneuraminique.

(d) Etabli de manière statistique et par différentes méthodes.

(e) L'osamine est la glucosamine.

résultat concernant l'acide sialique a été confirmé par JAMIESON (47) en 1966.

Nous avons précisé dans le Tableau IV (p.10) la composition molaire en oses de la transferrine suivant SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT en 1958 (48) et JAMIESON en 1965 (49) ainsi que les résultats, donnés en 1965 par MONTREUIL, SPIK, MONSIGNY, DESCAMPS, BISERTE et DAUTREVAUX (49). Ces derniers ont été obtenus après une étude critique systématique des techniques utilisées.

En effet, si les auteurs sont d'accord en ce qui concerne les acides sialiques (3-4 résidus par molécule de transferrine) et les hexosamines (8 résidus par molécule de transferrine) il n'en est pas de même au sujet des oses neutres. Ces différences peuvent s'expliquer par les conditions d'hydrolyse et par les méthodes de dosage des oses après hydrolyse et séparation chromatographique.

D - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les premiers dosages d'acides aminés de la transferrine ont été effectués par SCHULTZE, HEIDE et MULLER (50) en 1957. Ils ont été répétés à plusieurs reprises par les mêmes auteurs et nous avons fait figurer dans le Tableau V (p.11) les résultats les plus récents que ces derniers auteurs nous ont fournis. Nous y avons ajouté ceux qui ont été effectués ensuite par PARKER et BEARN (51) en 1962, par BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll. (52) en 1963, ainsi que les résultats les plus récents obtenus dans notre Laboratoire.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus par les différents auteurs sont assez concordants sauf dans le cas, très important du point de vue de l'application des procédés de rupture sélective des chaînes peptidiques, de la cystéine, de la méthionine et du tryptophane.

E - POLYMORPHISME DE LA TRANSFERRINE HUMAINE

Le manque d'homogénéité des résultats concernant les propriétés physico-chimiques de la transferrine peut s'expliquer dans une certaine mesure par le polymorphisme de ce protide qui a été révélé par SMITHIES (52) en 1957 à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon.

Cet auteur montre qu'en plus de la bande habituelle de transferrine désignée par les lettres β C, il existe dans certains sérums, une bande supplémentaire plus rapide (bande β B) ou une bande plus lente β D, qui ont été identifiées à de la transferrine.

Chacune des bandes B et D présente, en outre, des variations

Tableau IV

Composition molaire en oses de la
transferrine suivant différents auteurs

	SCHULTZE, SCHMIDT- BERGER et HAUPT 1958 (a)	JAMLESON 1965 (b)	SPIK (53)
Galactose	8	4	5
Mannose	4	8	5
Fucose	1	-	-
N-acétyl glucosamine	8	8	8
Acide N-acétyl neuraminique	4	4	3 ou 4

(a) Pour une masse moléculaire de 88 000.

(b) Pour une masse moléculaire de 90 000.

(c) Pour une masse moléculaire de 76 000.

Tableau V

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

	Résultats de PARKER et BEARN 1962	Résultats de BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963	Résultats de HEIMBURGER et coll., 1964	Résultats de ROOP et PUTNAM 1967	Résultats de SPIK 1968	
Valeur de la masse moléculaire	90 000	92 000	90 000	90 000	90 000	76 000
Acide aspartique	82	80	89	91,0	91	77
Acide glutamique	62	62	71	66,1	73	62
Arginine	28	25	30	30,1	24	20
Histidine	19	21	22	21,5	20	17
Lysine	60	60	68	67,5	64	54
Alanine	59	58	63	65,7	65	55
Cystine / 2	40	23	44	39,6	30	26
Glycocolle	51	54	54	58,0	57	48
Isoleucine	15	14	17	16,8	18	15
Leucine	60	57	66	69,8	69	58
Méthionine	10	24	9	9,4	6	5
Phénylalanine	28	30	31	33,2	34	29
Proline	36	35	35	38,8	43	36
Sérine	42	39	44	42,9	50	42
Thréonine	32	25	32	33,5	35	30
Tryptophanne	8	22	10	-	7	5 ou 6
Tyrosine	26	18	25	29,1	31	26
Valine	47	46	48	48,7	48	41
Total	705	694	827	762	765	646

de mobilité. On connaît actuellement 18 variants génétiques de la transferrine. Ces variants possèdent les caractères identiques suivants :

- 1 - Taux de fixation du fer (ALLISON) (54)
- 2 - Réactions immunologiques (ALLISON) (54 bis) (PARKER et BEARN) (55)
- 3 - Teneur en acide sialique
- 4 - Constante de sédimentation (PARKER et BEARN) (56)

Toutefois, on observe des différences dans la composition et dans la structure des fractions protéiques par l'application de l'électrochromatographie aux hydrolysats protéasiques. Ces variants se différencieraient donc par certains de leurs enchaînements peptidiques.

II - STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE HUMAINE

Les résultats dont on dispose actuellement sont encore très fragmentaires et seul, le problème de la modalité de la liaison glycanne-protide peut être considéré comme définitivement résolu.

A - STRUCTURE DE LA PROTEINE

Les recherches se limitent actuellement aux résultats suivants :

1 - NATURE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Un seul acide aminé N-terminal, la valine, a été identifié par de nombreux auteurs : GOLLNER en 1955 (57) ; PUTNAM en 1955 (58) ; MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (59) ; BEARN et PARKER en 1966 (60) ; JEPPSSON en 1967 (61) ; SPIK (62).

La présence d'un seul résidu acide aminé N-terminal a longtemps fait penser que la protéine était constituée par une seule chaîne polypeptidique. Cette manière de voir avait trouvé une confirmation dans les travaux de PARKER, CRESTFIELD et BEARN en 1963 (63) ainsi que dans ceux de GREEN et FEENEY (64) et plus récemment de BEZKOROVAINY (65) qui n'ont pas mis en évidence de sous-unités par réduction et alkylation des ponts disulfures. Cependant, JEPPSSON (66) affirme que la rupture des ponts disulfures entraîne l'apparition de deux chaînes de masse moléculaire de 39 000 et 40 000. En outre, sur la carte peptidique de l'hydrolysate tryptique de l'une de ces deux sous-unités existe un peptide qui ne se révèle pas à la ninhydrine mais seulement avec le réactif de RYDON et SMITH.

L'auteur conclut qu'il existe donc, outre la valine, un autre amino-acide N-terminal dont la fonction NH_2 est bloquée.

2 - NATURE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

SPIK (67) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (68) ont identifié la proline et le glycolle ainsi que des traces de sérine comme acides aminés C-terminaux. Nous avons nous-mêmes retrouvé et étendu ces résultats en identifiant, en plus, une cystine comme résidu C-terminal. Ce résultat sera discuté dans la partie réservée aux travaux personnels.

B - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

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

1 - La transferrine contient deux groupements glycanniques (JAMIESON en 1964 (69); SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL en 1965 (70) ; SPIK (71). La composition en oses des 2 groupements glycanniques semble être identique pour SPIK (72). Au contraire, ils seraient différents pour CHEN et SUTTON (73).

2 - L'hydrolyse partielle des glycannes fournit les enchaînements suivants : N-acétyl-lactosamine, deux mannobioses isomères, un mannobiose, comme dans de nombreuses autres glycoprotéines (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON en 1962 (74) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK en 1965 (75) ; SPIK (76) ; SPIK et MONTREUIL (77)).

3 - L'acide sialique se trouve en position externe (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON en 1962 (78) ; JAMIESON en 1964 (79) ; ROBINSON et PIERCE en 1964 (80) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK en 1967 (81) ; SPIK (82) et SPIK et MONTREUIL (83). L'élimination de l'acide N-acétylneuraminique s'accompagne de modifications profondes de la mobilité électrophorétique qui ont été étudiées par POULIK (84) dès 1959-1961, par PARKER et BEARN en 1961 (85) et par BLUMBERG et WARREN en 1961 (86). Ces auteurs ont montré, en faisant varier la concentration en enzyme qu'on pouvait obtenir jusqu'à 5 bandes en électrophorèse en gel d'amidon qui correspondent à des transferrines contenant 0,1,2,3 ou 4 résidus d'acide N-acétylneuraminique.

4 - L'action successive de la neuraminidase, puis de la galactose-oxydase montre que l'acide sialique est conjugué à des résidus de galactose (ROBINSON et PIERCE) (87), résultats également obtenus par SPIK (88) et par SPIK et BOUQUELET (communication personnelle) qui ont précisé que 3 résidus de galactose étaient liés à l'acide N-acétylneuraminique.

C - MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

SPIK (89) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (90) ont démontré sans ambiguïté que les deux glycanes étaient conjugués, dans la transferrine, par une liaison de type N-(-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine. Ce mode d'attache avait été posé en hypothèse, mais non démontré par JAMIESON (91) en 1964 et en 1965. Cet auteur a confirmé ces résultats en 1967 (92) en isolant par dégradation récurrente de SMITH d'un glycopeptide de la transferrine le chaînon "asparaginyl-N-acétylglucosamine".

D - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE L'APO-ASIALOTRANSFERRINE

SPIK (93) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (94) ont établi la nature exacte de l'attache glycanne-protide en isolant des hydrolysats pronasiques de l'apo-asialotransferrine par chromatographie de gel filtration et électrophorèse préparative 2 fractions glycopeptidiques de masse moléculaire 2 800 : glycopeptide I et glycopeptide II, identiques par leur composition en oses mais différents par leur composition en acides aminés. Des fractions glycopeptidiques semblables avaient été également obtenues par JAMIESON, par chromatographie sur DEAE-cellulose (95)

Les compositions molaires en glucosamine et acides aminés ainsi que les compositions centésimales en oses de chacun de ces glycopeptides sont précisées dans les Tableaux VI (p.15) et VII (p.15). Les proportions molaires galactose : mannose étant de 1:1 dans chacun des glycopeptides. L'application des procédés classiques de détermination des séquences peptidiques a permis aux auteurs de démontrer que la fraction glycanne était attachée dans le glycopeptide I à un reste séryl-aspartique et dans le glycopeptide II à un reste aspartyl-lysine.

L'ensemble de ces résultats leur a permis de préciser la structure des glycopeptides I et II (voir Fig.1 ; p.16) sans qu'il leur soit possible d'affirmer avec certitude avoir obtenu les deux groupements polysaccharidiques de la transferrine. En effet, les fractions pouvaient provenir du même enchaînement peptidique Ser-Asn-Lys par hydrolyse de la liaison ^{Fou} séryl-asparagine^{de} la liaison asparaginyl-lysine. Or l'obtention à l'état pur des groupements polysaccharidiques est une nécessité si on désire effectuer leur structure détaillée. Nous nous sommes donc attaché, la composition en oses semblant ne pas le permettre, à séparer les chaînes glycanne en jouant sur des variations de séquence des acides aminés au voisinage du point d'attache ose-acide aminé. Pour cela nous devons utiliser un procédé de rupture enzymatique des chaînes peptidiques ayant une spécificité

Tableau VI

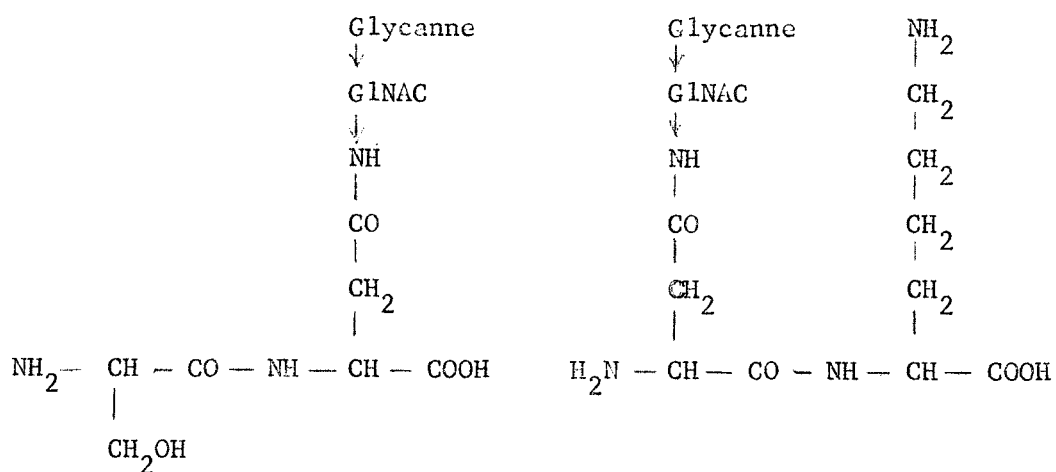
Composition molaire en glucosamine et en acides aminés des glycopeptides I et II provenant de l'hydrolyse pronasique de la transferrine (d'après SPIK) (96).

	Glycopeptide I	Glycopeptide II
Glucosamine	8	8
Acide aspartique	1,64 à 2,24	2,04
Sérine	1,50 à 2	0
Lysine	0	1,88

Tableau VII

Composition centésimale en oses des glycopeptides I et II (d'après SPIK) (Communication personnelle).

	Glycopeptide I	Glycopeptide II
Osés "neutres"	44,7	50,4
Osamines	24,3	26,46
<u>Osés "neutres"</u> Osamines	1,83	1,90



Glycopeptide I

Glycopeptide II

Figure 1

Schéma de structure des glycopeptides I et II obtenus à partir d'hydrolysat pronasique de l'apo-asialotransferrine par SPIK (97) et par SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (98).

très étroite et conduisant à des chaînes peptidiques relativement courtes.
C'est pour ces raisons que notre choix s'est fixé sur la trypsine.

TRAVAUX PERSONNELS

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

L'utilisation de la trypsine comme agent de coupure de chaînes peptidiques pour isoler les chaînes glycaniques se justifie pour de nombreuses raisons.

Tout d'abord, nous désirions obtenir des glycopeptides ne risquant pas de dériver les uns des autres à cause de ruptures secondaires. Or la trypsine est l'enzyme protéolytique la plus spécifique puisqu'il coupe exclusivement et totalement les liaisons arginyl et lysyl (les souillures chymotripsiques étant éliminées par un inhibiteur). D'autre part, dans le but de déterminer la séquence des amino-acides au voisinage du point d'attache, il était intéressant d'obtenir des composés possédant une chaîne peptidique relativement courte. Comme la transferrine contient environ 80 résidus d'arginine et de lysine, le choix de la trypsine se justifiait parfaitement. Enfin, la trypsine a une grande souplesse d'utilisation car on peut facilement réduire ou augmenter les points de ruptures spécifiques des chaînes peptidiques. En effet, l'action de l'enzyme peut être limitée aux seules liaisons arginyl en "dénaturant" les résidus de lysyl par substitution de la fonction ϵ -aminée ou aux seules liaisons lysyl en substituant la fonction guanidyle. Au contraire, l'action de l'enzyme peut être étendue aux liaisons cystéinyl par aminoéthylation de la cystéine. C'est pourquoi nous avons choisi d'hydrolyser l'apotransferrine par la trypsine. Nous avons ensuite fractionné les hydrolysats par différents procédés, notamment par chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions. Enfin, nous nous sommes attaché à démontrer que les glycopeptides ainsi isolés provenaient de sites différents de la chaîne peptidique.

I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

1 - Nous utilisons l'apotransferrine fournie par la firme BEHRINGWERKE. Les préparations donnent un arc unique de précipitation en immuno-électrophorèse et une seule bande en électrophorèse sur différents supports, sauf en gel d'amidon où, en plus d'une bande majeure, il apparaît plusieurs bandes mineures qui correspondent vraisemblablement à des variants génétiques (voir p. 9). Enfin, elle est homogène en ultracentrifugation (SPIK) (99).

2 - La trypsine utilisée est traitée par le D.C.C. (chlorure de diphényl carbamyle) afin d'inhiber la chymotrypsine qui souille généralement les préparations. Elle est fournie par la firme SERAVAC qui indique que son activité chymotrypsique ne dépasse pas 0,5 p.100.

B - HYDROLYSE TRYPSIQUE

1 - Le procédé que nous avons appliqué dérive de la méthode de HIRS, MOORE et STEIN (100).

L'hydrolyse est effectuée à 37°C au pH-stat pendant 8 heures. A une solution aqueuse d'apotransferrine à 2 g p.100 ml, ajustée à pH 8,5 par de l'ammoniaque diluée, on ajoute, en 2 fois à 4 heures d'intervalles, une quantité de trypsine dans un rapport enzyme-substrat de $\frac{1}{50}$. La quantité nécessaire de trypsine est diluée dans une solution centimolaire d'acétate de calcium et maintenue pendant au moins une demi-heure à la température du Laboratoire avant d'être utilisée. On active, de cette manière, la trypsine et on détruit, en outre, la chymotrypsine éventuellement présente. L'hydrolysats ainsi obtenu est congelé et lyophilisé après arrêt de la réaction par abaissement du pH à 6 par addition de quelques gouttes d'acide acétique.

2 - CONTROLE DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE

Nous avons systématiquement vérifié que les hydrolyses étaient satisfaisantes, en appliquant la méthode d'électrochromatographie bidimensionnelle des peptides et des amino-acides de BISERTE et coll. (101). Le mode opératoire est le suivant :

Des volumes d'hydrolysats tryptiques correspondant à 1 mg de protéide sont déposés en plusieurs additions de 100 µl sur des feuilles de papier Whatmann n°3 et soumis à une électrochromatographie bidimensionnelle effectuée dans les conditions suivantes :

- Electrophorèse dans le tampon pyridine/acide acétique/eau (3:10:387) de pH 3,9, sous une tension de 10 V/cm, pendant 18 heures. Après séchage, les électrophorégrammes sont soumis à la chromatographie, dans la seconde dimension ;

- Chromatographie descendante dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) pendant 18 heures.

Après séchage, les électrochromatogrammes sont soumis à l'un des procédés de révélations suivants :

- a - Révélation des protides par la ninhydrine

Le réactif (solution à 1 g de ninhydrine dans 94 ml d'acétone et 6 ml d'acide acétique) est finement pulvérisé sur les feuilles qui sont

ensuite maintenues à 100°C pendant 5 à 15 minutes. L'emplacement des composés aminés est marqué par l'apparition de taches rouge-violacé.

Nota : Cette coloration est instable et, pour conserver les chromatogrammes ou les électrophorégrammes, on pulvérise le réactif de KAWAREAU (102) obtenu en mélangeant 1 ml de solution aqueuse saturée de nitrate cuivrique, 0,2 ml d'acide nitrique à 10 p.100 dans l'eau et 500 ml d'éthanol absolu. Les taches rouge-violacé virent au rouge brique par formation d'oxyde cuivreux inaltérable.

b - Révélation des liaisons peptidiques

La révélation des liaisons peptidiques est effectuée suivant la technique de RYDON et SMITH (103).

Le chromatogramme ou l'électrophorégramme est placé pendant 2 heures dans une atmosphère saturée en chlore (obtenue en faisant réagir de l'acide chlorhydrique sur du permanganate de potassium). Après une ventilation de 2 heures dans un courant d'air frais, le papier est imprégné par pulvérisation d'une solution obtenue en mélangeant extemporanément à volumes égaux, une solution aqueuse d'iodure de potassium à 1 g p.100 ml et une solution aqueuse de thiodène. L'emplacement des composés contenant des liaisons peptidiques se révèle par la formation de taches brunes sur un fond blanc. Ces taches sont fugaces et il convient de les délimiter très rapidement.

c - Révélation des glycanes par le réactif à l'acide periodique-benzidine

Les fractions glycaniques, après chromatographie ou électrophorèse, sont révélées selon le procédé de MONTGOMERY et WU (104). Le papier est trempé rapidement dans une solution acétonique d'acide periodique fraîchement préparée (acide periodique 0,1 M/acétone) (1:19). Après 5 minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée extemporanément de benzidine dans l'acétone (0,15 g p.100 ml). L'emplacement des glycanes est révélé par l'apparition de taches blanches sur un fond uniformément bleu.

C - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE

Les fractionnements des hydrolysats tryptiques de la transferrine ont été effectués en appliquant successivement les procédés suivants :

- 1 - Chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Sephadex ;
- 2 - Chromatographie d'échanges d'ions ;
- 3 - Chromatographie ou électrophorèse préparative sur papier.

1 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

La poudre de Sephadex G-50 ("medium") est mise à gonfler pendant 24 heures dans une très grande quantité d'eau. Le gel obtenu est introduit, sous la forme d'une bouillie épaisse, dans une colonne de verre (3 x 120 cm) très propre. La "stabilisation" de la colonne de Sephadex est réalisée par le passage d'une dizaine de litres d'une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7 (débit : 120 ml/h).

Une telle colonne permet de chromatographier des quantités de 500 mg d'hydrolysats tryptiques. Ceux-ci, dissous dans 10 ml de tampon, sont introduits au sommet de la colonne avec une pipette à bout recourbé après avoir éliminé l'excès de tampon surmontant le gel. Dès que l'hydrolysat a entièrement pénétré dans le gel, on ajoute du tampon. Des fractions de 5 ml sont recueillies au collecteur de fractions (débit de 60 ml/heure). Le repérage des glycopeptides dans l'effluent est effectué par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et coll. (105) qui est spécifique des glucides. Les fractions qui donnent une réaction positive sont rassemblées, concentrées à quelques millilitres et additionnées de 10 volumes d'éthanol absolu. Le précipité de glycopeptide est recueilli par centrifugation et dissous dans une faible quantité d'eau distillée. La solution est ensuite soumise à la chromatographie d'échange d'ions.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Une chromatographie sur résines échangeuses d'ions du type Dowex 50 x 2 (forme acide ; "mesh" 200-400) permet de fractionner les glycopeptides. La résine est préalablement lavée et activée puis régénérée en colonne par le passage de 500 ml d'acide chlorhydrique 1 N pour 100 ml de résine, et rincée à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent devienne neutre.

La résine ainsi préparée est introduite dans une colonne de verre (1 x 80 cm) et "stabilisée" par le passage d'eau distillée. Une colonne ainsi préparée permet de fractionner 100 à 200 mg de glycopeptides.

L'élution est réalisée par le passage de 300 ml d'eau distillée, puis, à pH constant (pH 3), par un gradient de concentration en formiate de pyridine de 0,2 M à 4 M formé à l'aide d'un système de deux réservoirs cylindriques contenant, le premier : 8 ml de pyridine, 12,5 ml d'acide formique et 479,5 ml d'eau distillée et, le second : 160 ml de pyridine, 250 ml d'acide formique et 90 ml d'eau distillée.

Le débit d'élution est de 25 ml/heure. Les fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions. Les fractions

glycopeptidiques, repérées par la méthode au phénol sulfurique, sont rassemblées, concentrées à quelques millilitres sous pression réduite et les glycopeptides sont précipités par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu.

La pureté des fractions obtenues est contrôlée par électrophorèse sur papier Whatman n° 3, sous une tension de 10 V/cm dans les systèmes-tampons suivants :

pH 1,5 : acide formique/acide acétique/eau (5:15:80)

pH 2,4 : acide acétique/eau (6:94)

pH 3,9 : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387)

3 - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE PREPARATIVES SUR PAPIER

Les fractions obtenues peuvent être soumises à une dernière purification par électrophorèse effectuée dans un des systèmes cités ou par chromatographie préparative descendante, sur papier MACHEREY-NAGEL 281 dépourvu d'acides aminés, avec le système-solvant de PARTRIDGE (106) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

D - RUPTURE DES PONTS DISULFURES PAR OXYDATION PERFORMIQUE

Nous utilisons le procédé préconisé par HIRS (107). L'acide performique est préparé en ajoutant à 9,5 ml d'acide formique pur, 0,5 ml d'eau oxygénée à 110 volumes et en abandonnant le mélange pendant 2 heures à la température du Laboratoire.

D'autre part, 20 mg de protéine ou de glycopeptide sont dissous dans 1 ml d'acide formique pur additionné de 0,3 ml de méthanol absolu pour éviter la congélation.

Les solutions sont refroidies séparément à - 10°C et mélangées volume à volume. Après 2,5 heures de réaction à - 10°C, la solution est diluée avec 10 volumes d'eau distillée et lyophilisée.

E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les constituants aminés des protides sont dosés dans les hydrolysats acides par chromatographie automatique à l'Auto-analyseur TECHNICON selon le procédé de PIEZ et MORRIS (103).

L'hydrolyse est effectuée en tubes scellés sous-vide, par de l'acide chlorhydrique 5,6 N, pendant 24, 48 et 72 heures, à 105°C.

Les hydrolysats sont ensuite dosés à l'Auto-analyseur TECHNICON suivant le principe général de MOORE et STEIN (109), adapté par MONSIGNY (110) à l'analyse des constituants des glycoprotides et, en particulier, des osamines.

Le tryptophane est recherché systématiquement dans les glycopeptides en effectuant le spectre U.V. et par la réaction d'Ehrlich au para-diméthylaminobenzaldéhyde.

F - COMPOSITION EN GLUCIDES

1 - COMPOSITION CENTESIMALE

a - Dosage des oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (111), modifiée par RIMINGTON (112). Les "témoins internes" sont des solutions titrées de galactose + mannose, en proportions égales.

b - Dosage des osamines

Les osamines sont dosées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (113), modifiée par BELCHER et coll. (114) (après avoir été libérées par une hydrolyse effectuée à 100°C, en tube scellé sous vide, avec de l'acide chlorhydrique 4 N, pendant 4 heures) et par chromatographie à l'Auto-analyseur TECHNICON suivant le procédé préconisé par MONSIGNY (115).

c - Dosage des acides sialiques

L'acide N-acétylneuraminique est dosé par la méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (116).

2 - COMPOSITION MOLLAIRE

Les oses neutres sont dosés par chromatographie sur papier (MONTREUIL, DUMAISNIL, SPIK et MONSIGNY) (117). Les glycopeptides sont d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N, pendant 1,5 heure, à 100°C et les hydrolysats sont purifiés par passage sur échangeurs de cations (Dowex 50 ; forme acide ; "mesh" 25-50) puis d'anions (Duolite A-102-D ; forme formiate ; "mesh" 25-50). Les solutions effluents neutres sont évaporées à siccité et le résidu est repris par 0,2 à 0,5 ml d'eau distillée et soumises à l'analyse par chromatographie sur papier.

Les oses neutres sont alors dosés par le procédé de DATE (118) modifié ; les taches d'oses neutres, révélées par un réactif au citrate d'aniline, sont traitées pendant 2 heures par une solution d'éthanol chlorhydrique et l'absorbance des solutions est mesurée à 390 nm par rapport à des témoins internes contenant des quantités connues d'oses. (voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK) (119).

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES A PARTIR DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE

L'APOTRANSFERRINE

L'électrochromatographie bidimensionnelle de l'hydrolysats tryptique indique qu'il ne reste pratiquement aucun "noyau" enzymatico-résistant malgré un temps d'hydrolyse relativement court (afin d'éviter toute rupture secondaire). D'autre part, la révélation par l'acide periodique benzidine montre la présence de deux fractions glycopeptidiques.

1 - Purification par chromatographie sur gel de Séphadex G-50

Le tamisage moléculaire sur une colonne de Séphadex G-50 fournit, une seule fraction glycopeptidique élue immédiatement après le noyau enzymatico-résistant et la trypsine. Après concentration, les "glycopeptides totaux" sont précipités par l'éthanol. Le rendement est de 100 mg environ pour 1 g de transferrine. Dans un second temps, les "glycopeptides totaux" sont soumis à la chromatographie sur échangeurs d'ions.

2 - Chromatographie sur résine échangeuses d'ions

La fraction glycopeptidique est dissoute dans la quantité d'eau distillée nécessaire pour obtenir une solution à 5 p. 100, et chromatographiée sur résine échangeuse de cations faiblement réticulée (Dowex 50 x 2 ; "mesh" 200-400).

L'élution à l'eau fournit deux fractions glycopeptidiques, glycopeptide A et glycopeptide B. Ceux-ci sont récupérés et lyophilisés. L'élution par un gradient formiate de pyridine fournit une autre fraction glycopeptidique correspondant au glycopeptide C qui est récupéré par précipitation éthanolique.

3 - Conclusions

Nous avons rassemblé dans la Figure 2 (p.27) les différentes étapes du fractionnement que nous avons appliqué. Le bilan pondéral est le suivant : à partir de 100 mg de "glycopeptides totaux" (correspondant à 1 g de transferrine), nous obtenons, en moyenne :

Glycopeptide A	3 mg
Glycopeptide B	19 mg
Glycopeptide C	30 mg
soit un rendement de 50 p. 100.	

B - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

Chacune de ces fractions a été soumise aux différents essais permettant d'en déterminer l'homogénéité. Sa composition chimique a ensuite été précisée.

1 - Etude du glycopeptide A. L'électrophorèse sur papier effectuée dans des tampons de pH 1,5, 2,4 et 3,9 révèle la présence de nombreux constituants peptidiques et glycopeptidiques.

Les faibles quantités que nous avons isolées ne nous ont pas permis, jusqu'à présent, d'effectuer une étude poussée de cette fraction.

2 - Etude du glycopeptide B. Le glycopeptide B soumis à l'électrophorèse sur papier dans les tampons de pH 1,5 - 1,4 et 3,9 se révèle homogène : il donne, en effet, une seule tache après révélation par le réactif à la ninhydrine et par le réactif à l'acide périodique benzidine.

a - Composition en acides aminés. La composition en acides aminés, pour une masse moléculaire de 3 200 est précisée dans le Tableau VIII (p.28).

On voit que les acides aminés sont entre eux dans des rapports simples, ce qui peut être considéré comme une preuve supplémentaire de l'homogénéité du glycopeptide. En outre, la présence de deux résidus de cystéine permet d'envisager l'existence d'un pont disulfure. Enfin, il convient de noter l'absence de lysine et d'arginine, ce qui, en tenant compte de la spécificité de la trypsine est en faveur d'une provenance C-terminale du glycopeptide B par rapport à la transferrine native.

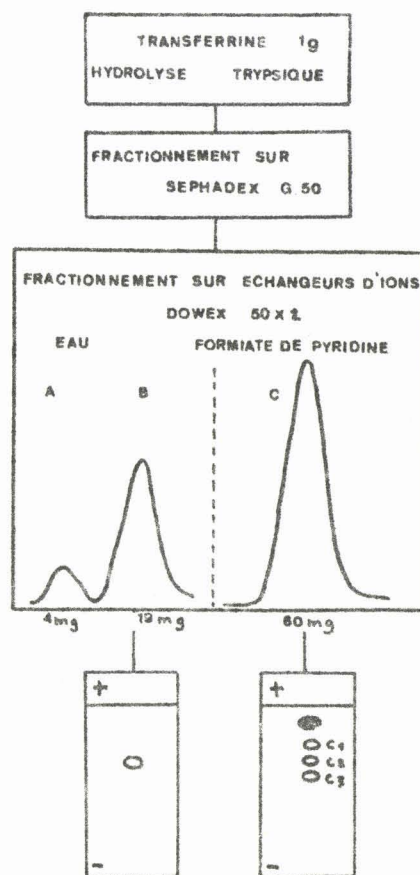


Figure 2

Schéma de fractionnement des glycopeptides présents dans les hydrolysats tryptiques de la transferrine.

Tableau VIII

Composition molaire des glycopeptides B et C

	Glycopeptide B	Glycopeptide C
Oses neutres (a)	5	5
N-acétylglucosamine	4	4
Acide N-acétylneuraminique	2	2
Acide aspartique	3	4
Thréonine	1	1,1
Sérine	2	1,3
Acide glutamique	-	1
Glycocolle	2,1	1,6
Alanine	-	0,6
Valine	0,9	1
Cystéine	2,1	1,4
Leucine	1,1	1,3
Tyrosine	-	0,4
Phénylalanine	2,1	1
Lysine	-	2

(a) Galactose et mannose (1:1)

b - Composition en oses

COMPOSITION CENTESIMALE (*). La composition en oses est donnée par le Tableau IX (p.30). Cette composition correspond à celle de la transferrine, en tenant compte des masses moléculaires.

COMPOSITION MOLAIRE. La composition molaire en oses est donnée par le Tableau VIII (p.28). Elle correspond sensiblement au rapport molaire de la transferrine native.

3 - Etude du glycopeptide C. Le glycopeptide C, soumis à l'électrophorèse sur papier dans les différents tampons, est hétérogène.

En utilisant le tampon de pH 2,4, 3 taches correspondant à des glycopeptides apparaissent (Fig. 3 ; p.31). Il existe, en outre, une tache uniquement révélée par la méthode à l'acide periodique benzidine et que nous avons identifiée à de l'acide sialique libre.

a - Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de la fraction C est décrite dans le Tableau VIII (p.28).

L'hétérogénéité de cette fraction, se confirme à l'analyse de ce tableau car les nombres de résidus d'acides aminés ne sont pas, entre eux, dans des rapports simples. On note, en outre,

1 - la présence de lysine ;

2 - la présence de cystéine qui correspond vraisemblablement à l'existence d'un pont disulfure dans le glycopeptide.

b - Composition en oses. La composition centésimale en oses du glycopeptide C est précisée dans le Tableau IX (p.30). Sa composition molaire en oses "neutres" est identique à celle de la transferrine native (Tableau VIII ; p.28).

(*) Nous remercions vivement Mlle R. VANDERSYPPE et M. L. BERTHIAUX pour leur précieuse collaboration technique.

Tableau IX
Composition centésimale en glucides
des glycopeptides B et C

	Glycopeptide B	Glycopeptide C
Oses neutres	26	27
Glucosamine	15	17,5
Acide N-acétylneuraminique	19	17

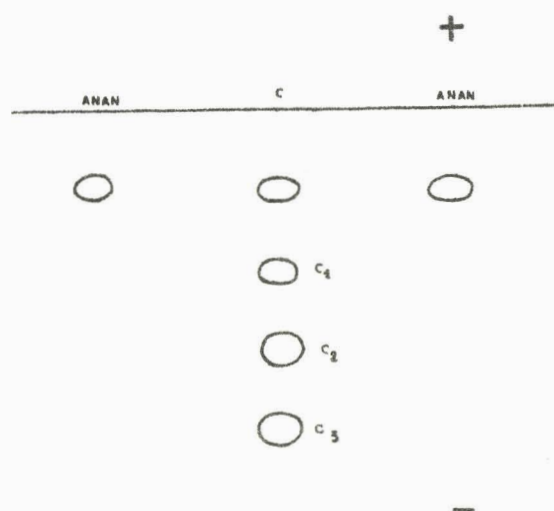


Figure 3

Electrophorèse à pH 2,4 (papier Whatman W₃ MM ; 8 V/cm ; 15 h)
de la fraction glycopeptidique C. L'acide N-acétyl-neuraminique
est utilisé comme témoin latéral,

4 - Conclusions

Si le glycopeptide B est suffisamment homogène pour que l'étude de sa structure puisse être effectuée, il n'en est pas de même de la "fraction glycopeptidique C". Nous nous sommes donc attaché à purifier cette fraction.

C - PURIFICATION DU GLYCOPEPTIDE C.

1 - Electrophorèse préparative sur papier

A partir du glycopeptide C, par électrophorèse préparative dans le tampon de pH 2, 4, nous obtenons 3 fractions glycopeptidiques que nous avons appelées fractions C_1 , C_2 et C_3 (Figure 3 ; p. 31) dont les compositions en acides aminés sont pratiquement identiques à celle du glycopeptide C natif (Tableau X ; p. 33).

La composition centésimale en oses neutres et en acide sialique est précisée dans le Tableau Xbis (p. 33bis). La composition en oses neutres est la même pour chacune des fractions et correspond à la composition en oses neutres du glycopeptide C natif.

Au contraire, les compositions en acide sialique sont nettement différentes pour chacun des glycopeptides et, en considérant que la masse molaire de ces glycopeptides est de l'ordre de 3 600, les glycopeptides C_1 , C_2 et C_3 possèderaient respectivement 3 résidus, 2 résidus et 1 résidu d'acide sialique.

L'hétérogénéité du glycopeptide C est donc due en partie aux différences de composition en acides sialiques des glycopeptides. Nous pensons que cette hétérogénéité s'explique, non pas par la préexistence de glycannes différents dans la transferrine native mais par une hydrolyse partielle des liaisons sialyl au cours de la chromatographie sur résines échangeuses de cations. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, de l'acide sialique libre est présent dans les préparations de glycopeptide C (voir l'électrophorégramme de la figure 3 ; p. 31).

Mais les fractions C_1 , C_2 et C_3 sont encore hétérogènes car les résidus d'acides aminés ne sont pas, entre eux, dans des rapports simples.

Pour pouvoir effectuer une séparation chromatographique ou électrophorétique, il était donc nécessaire de modifier la masse moléculaire.

Tableau X

Composition molaire des glycopeptides C_1 , C_2 et C_3

	Glycopeptides		
	C_1	C_2	C_3
Oses neutres	5	5	5
N-acétylglucosamine	4	4	4
Acide N-acétylneuraminique	3	2	1
Acide aspartique	5	5	5
Thréonine	0,8	1	0,8
Sérine	1,9	2	2
Acide glutamique	1	1	1
Glycocolle	2	2,5	2
Alanine	1	1	0,8
Valine	1	1	1
Cystéine	2,1	2	2
Leucine	2	2	2
Tyrosine	0,6	0,6	0,7
Phénylalanine	1	1,8	1,3
Lysine	4	4	4

Tableau X bis

Composition centésimale en glucides des glycopeptides C_1 , C_2 et C_3

	Glycopeptides		
	C_1	C_2	C_3
Oses neutres p.100	28,5	29,3	26,5
N-acétylglucosamine p.100	15,3	15,3	-
Acide N-acétylneuraminique p.100	33	23	13
<u>Acide N-acétylneuraminique</u> Oses neutres	1,16	0,7	0,5

ou les groupements ionisables de chacun des constituants glycopeptidiques du mélange.

Nous avons coupé les ponts disulfures par oxydation performique. De cette manière, nous avons, d'une part, fait varier les masses moléculaires des glycopeptides constituant le mélange, par libération des peptides liés aux glycopeptides par des ponts disulfures et, d'autre part, introduite dans certains glycopeptides des groupements SO_3H fortement acides.

2 - Rupture des ponts disulfures

a - Fractionnement du "glycopeptide C" oxydé

Après oxydation performique la fraction glycopeptidique C est lyophilisée et soumise à une chromatographie sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 2 ; forme acide). L'élution par l'eau fournit 3 fractions glycopeptidiques "acides" COa (glycopeptide C oxydé, fraction acide) : les fractions COa 1, COa 2 et COa 3.

L'élution par un gradient de formiate de pyridine (0,2 à 4 M) fournit une fraction "basique" COb.

Pondéralement, pour 300 mg de glycopeptide C traité, nous avons récupéré :

68 mg de glycopeptide de COa 1
20 mg de glycopeptide de COa 2
30 mg de glycopeptide de COa 3
70 mg de glycopeptide de COb

Chaque fraction glycopeptidique est alors purifiée par chromatographie préparative sur papier. Les glycopeptides restent au trait de départ. On débarrasse ainsi les glycopeptides des souillures peptidiques.

b - Propriétés électrophorétiques et compositions chimiques des glycopeptides

1°) Chaque fraction est soumise à électrophorèse à bas voltage dans les différents tampons de pH 1,5, 2,4 et 3,9. Chacun des glycopeptides se décompose en plusieurs fractions d'importance variable (Fig. 4 ; p.35).

2°) La composition en acides aminés de chacune des fractions COa 1, COa 2 et COa 3, est décrite dans le tableau XI (p.36).

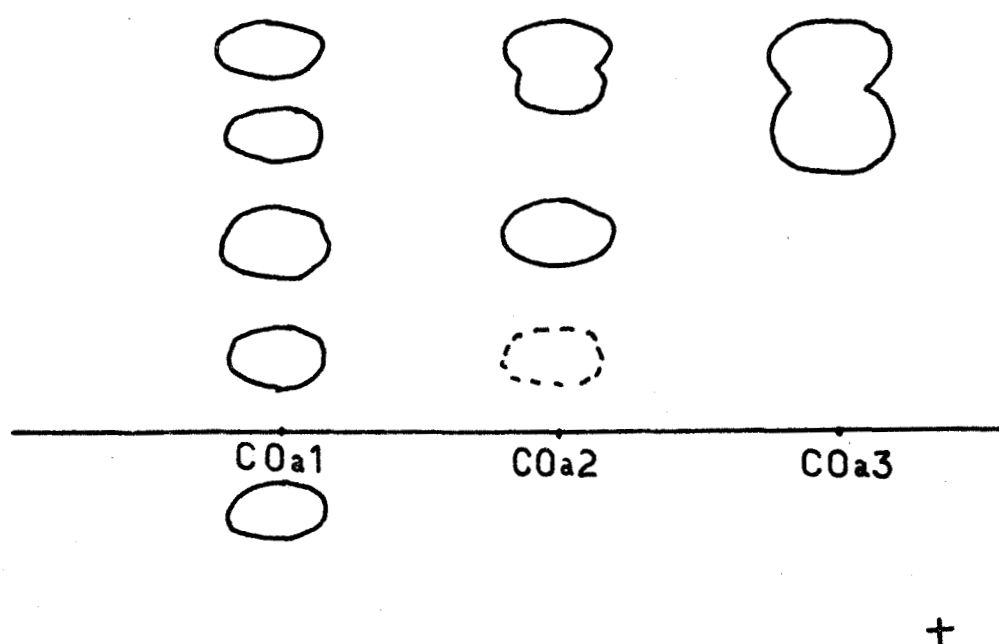


Figure 4

.Electrophorèse à pH 2,4 (papier Whatman W₃ ; 8 V/cm ; 15 h)
des fractions glycopeptidiques COa₁ ; COa₂ et COa₃ .

Tableau XI

Composition en acides aminés des glycopeptides

COa₁, COa₂, COa₃

	COa ₁	COa ₂	COa ₃
Cy SO ₃ H	2	1,7	2
Asp	4,5	3,6	4,2
Thr	1	1	1
Ser	1,7	1,7	1
Glu	0,7	1,1	2
Pro	1 à 2	1 à 2	2
Gly	3,1	2,1	1,9
Ala	0,5	0,6	0,8
Glc NH ₂	4	4	4
Val	1,5	1,5	1,9
Leu	1,5	1,3	1,9
Tyr	0,2	0,3	0,5
Phe	1,5	1,1	0,8
Lys	0,3	0,7	1,2
Arg	0,3	0,4	0,2

L'hétérogénéité des fractions COa 1, COa 2, COa 3, se confirme à l'analyse de ce tableau, car les nombres de résidus ne sont pas entre eux dans des rapports simples.

3°) Le glycopeptide COb possède une composition en amino-acides beaucoup plus simple ; en effet, il contient 1,1 résidu d'acide aspartique pour 0,9 résidu de lysine souillé par des traces d'autres amino acides.

4°) La composition centésimale en oses est donnée dans le tableau XII (p.38). Elle correspond, compte tenu des masses moléculaires, à celle de la transferrine native.

5°) La simplicité de la composition en acides aminés du glycopeptide nous permet d'aborder l'étude de sa séquence peptidique. L'hétérogénéité électrophorétique provenant des modifications de la fraction glucidique au cours des divers traitements chimiques.

D - CONCLUSIONS

L'hydrolyse trypsique nous fournit deux glycopeptides dans un état de pureté tel que l'étude des séquences peptidiques de part et d'autre du point d'attache puisse être envisagée de façon à confirmer ou à infirmer les hypothèses concernant le problème du codage par la chaîne peptidique, de la conjugaison sur l'asparagine du premier résidu de N-acétylglucosamine qui constitue la première étape à partir de laquelle s'édifie le groupement glucidique.

Cette étude doit également nous permettre de montrer : 1° - que les séquences d'acides aminés au voisinage du point d'attache sont suffisamment différentes ; 2° - que chacun des glycopeptides est issu d'un endroit différent de la molécule de transferrine ; 3° - que nous avons ainsi isolé chacune des 2 chaînes glucidiques dont l'existence a été démontrée par le calcul par JAMIESON (120) et SPIK et MONTREUIL (121).

L'exploration de la structure de deux groupements glucidiques ainsi séparés pourrait donc dès à présent être envisagée.

Tableau XII

Composition centésimale en glucides du glycopeptide COb

Oses "neutres	28,5
N-acétyl glucosamine	15,9
Acide N-acétyl-neuraminique	10,9
<u>Oses "neutres "</u> N-acétyl glucosamine	1,8

DETERMINATION DES SEQUENCES
 PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES

I - MATERIEL ET METHODES

Les glycopeptides, une fois isolés, sont soumis aux différents procédés d'exploration de structure des chaînes peptidiques : composition en acides aminés ; masse moléculaire ; nature des acides aminés N- et C-terminaux. La séquence complète de 2 glycopeptides a été déterminée.

A - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR DOSAGE DES GROUPEMENTS NH_2

LIBRES

La méthode que nous utilisons est adaptée du procédé original de GHUYSEN et al. (122).

- Mode opératoire : Dans un tube à hémolyse (8 x 70 mm) on introduit 200 microlitres de substrat contenant 25 à 100 nanomoles de groupements aminés libres et 200 microlitres d'une solution aqueuse de borate de sodium à 2 p. 100 (p:v) et après agitation, 50 μl d'une solution de fluorodinitrobenzène (FDNB) obtenu en dissolvant 0,65 ml de FDNB dans 65 ml d'éthanol absolu.

Le mélange est maintenu pendant une demi-heure au bain-marie à 60°C.

Après avoir refroidi sous eau courante, on ajoute 400 μl d'acide chlorhydrique 10 N.

L'absorbance est déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm et l'absorbance est comparée à celles que donne une gamme étalon obtenue à partir d'une solution titrée de nor-leucine.

Le nombre de groupement NH_2 libres dans une quantité connue de glycopeptides est ainsi déterminé et sa masse moléculaire peut alors être calculée.

B - RUPTURE DES PONTS DISULFURES

Nous avons utilisé, pour rompre les ponts disulfures, l'oxydation performique et la réduction par le mercapto-éthanol suivie du blocage des groupements SH par l'acide iodoacétique ou par l'éthylène-imine.

1 - OXYDATION PERFORMIQUE

Nous avons utilisé, la méthode de HIRS (123) qui a été exposée précédemment (voir p. 23).

2 - REDUCTION ET ALKYLATION

Le principe de la réduction et du blocage des ponts disulfures d'un protide est illustré par le schéma de la figure 5 (p. 41).

a - Réduction

Nous utilisons la méthode générale de réduction par le mercapto-éthanol.

Dans le cas d'une protéine, 100 mg sont dissous dans 10 ml d'une solution 0,55 M en "Tris" et 4 M en urée, ajustée à pH 8,6 avec de l'acide chlorhydrique. Après dégazage de la solution sous vide pendant 5 mn, une quantité de mercapto-éthanol 100 fois supérieure à la quantité théoriquement nécessaire est ajoutée et la solution est maintenue pendant 2 h sous un courant d'azote.

Dans le cas d'un glycopeptide, le même procédé est utilisé mais il n'est pas utile de se trouver en milieu urée 4 M.

b - Blocage des groupements SH par l'acide iodoacétique

Une quantité d'acide iodoacétique, légèrement supérieure à la quantité théorique, est dissoute dans du tampon "Tris" 0,55 M et est ajoutée à la solution précédente dans laquelle passe continuellement un courant d'azote. Le pH du mélange est maintenu à 8,6 par addition d'une solution aqueuse de triéthyl-amine à 25 p. 100. La réaction est terminée quand l'essai suivant au nitroprussiate est négatif : à une aliquote d'une solution de nitroprussiate de sodium à 1 g p. 100 ml d'ammoniac 2 N, une goutte de mélange réactionnel ne doit plus donner de coloration rouge. On élimine alors l'excès des réactifs :

1 - Dans le cas d'une protéine, la solution est dialysée 3 fois contre une grande quantité d'eau distillée ;

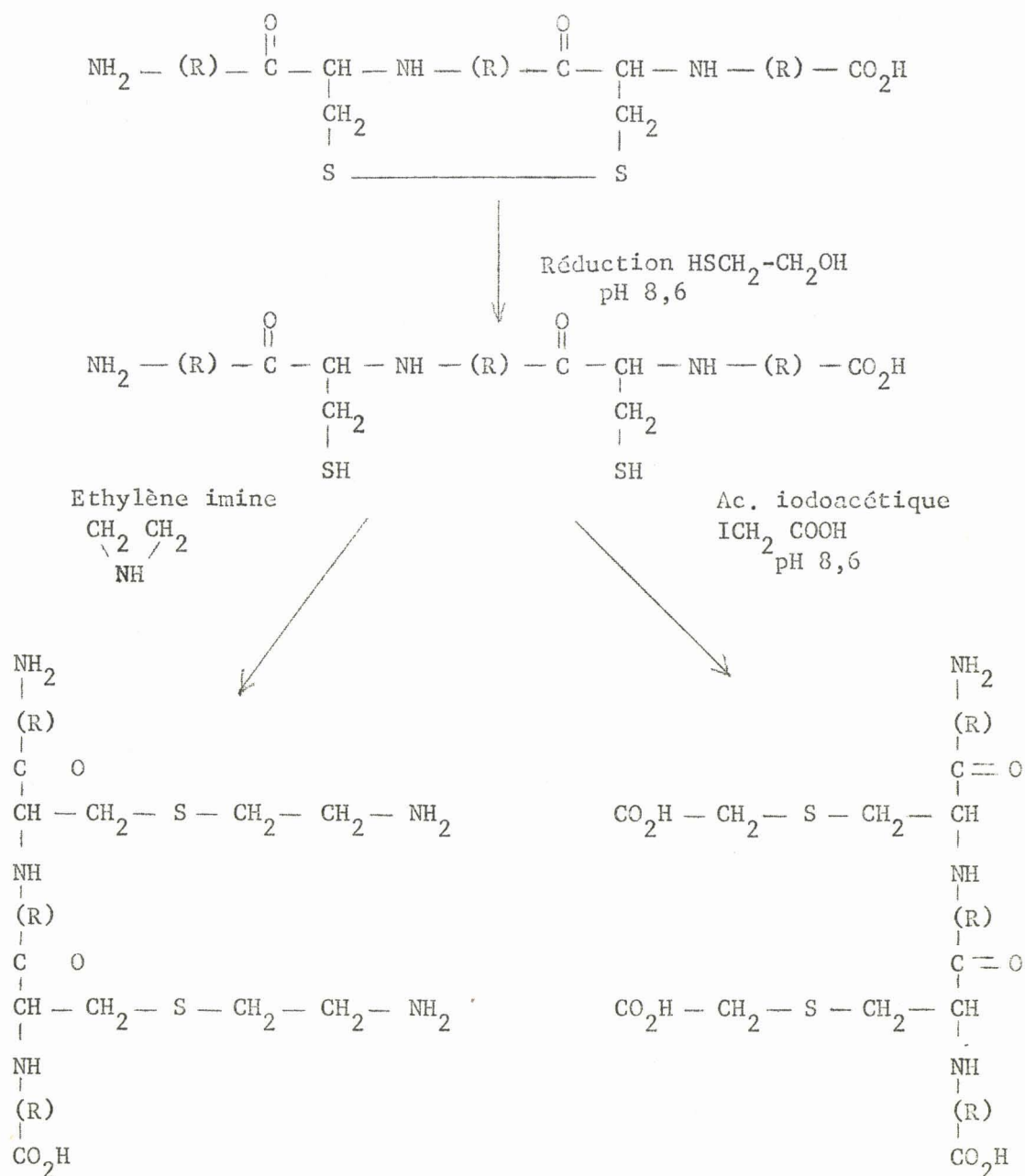


Figure 5

Réduction des ponts disulfures et alkylation des groupements SH

2 - Dans le cas d'un glycopeptide, la solution est ramenée à pH 7 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et précipitée par addition de 10 volumes d'éthanol absolu.

c - Blocage par l'éthylène-imine

L'action de l'éthylène-imine sur les groupements SH de la cystéine transforme celle-ci en S-aminoéthyl-cystéine qui, étant un isostère de la lysine, voit ses liaisons coupées par la trypsine et est sensible à l'action de la carboxypeptidase B (Fig. 6 ; p.43).

La réduction est menée de la même manière que dans le cas précédent. Le blocage des groupements SH libres est réalisé par l'éthylène-imine liquide. Une quantité supérieure à la quantité théoriquement nécessaire est ajoutée en 3 ou 4 fois. Le pH est rigoureusement maintenu 8,6 tout au long de la réaction par addition continue d'acide acétique 2 N. Quand la réaction est terminée, la solution est traitée comme dans les autres cas.

C - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Nous avons utilisé pour identifier les acides aminés situés en position C-terminal la méthode d'hydrazinolyse et l'action des carboxypeptidase A et B.

1 - METHODE D'HYDRAZINOLYSE

a - PRINCIPE

Nous avons utilisé la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI et al. (124), dont le principe général illustré par la figure 7 (p.44) est le suivant : l'hydrazine coupe les liaisons peptidiques en transformant les acides aminés constituant le protéide en hydrazide sauf l'acide aminé **C-terminal** qui reste intact. Après purification, cet acide aminé peut être identifié et dosé.

Nota : Dans le cas d'une cystine en position C-terminale, celle-ci doit préalablement être oxydée ou réduite et alkylée avant d'effectuer l'hydrazinolyse. (Fig. 8 ; p.45 et Fig.9 ; p.43).

b - MODE OPERATOIRE

Une micromole de protéine ou de glycoprotéine convenablement desséchée est dissoute dans 1 ml d'hydrazine anhydre obtenue suivant le

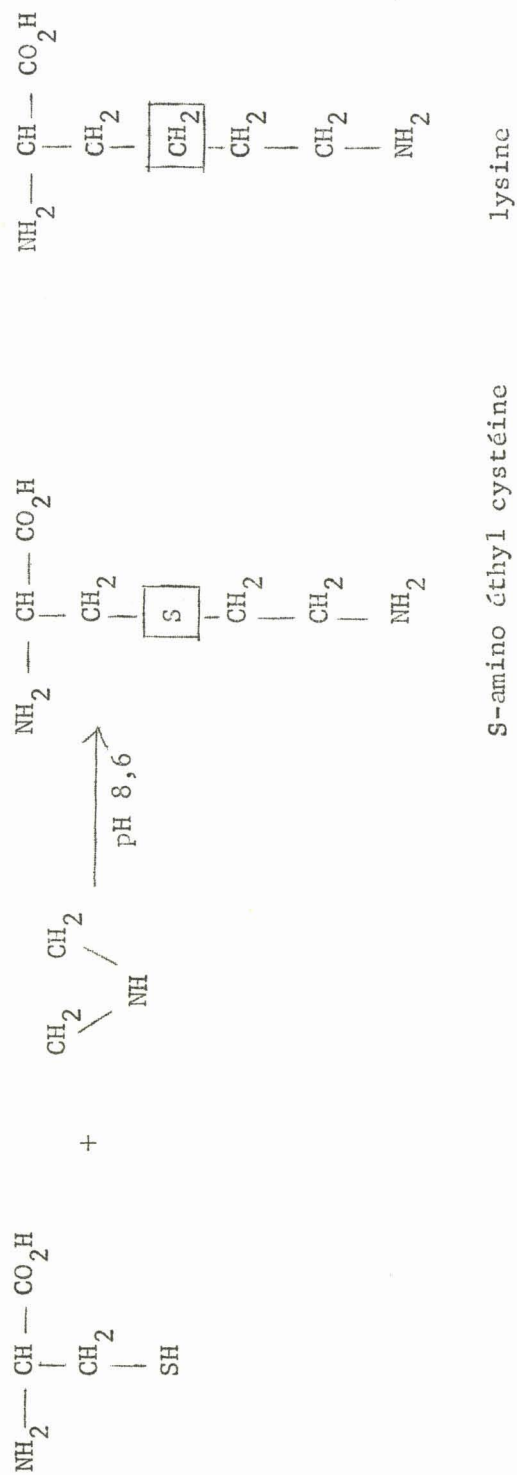


Figure 6

S-amino-éthylation de la cystéine. Isostérie avec la lysine

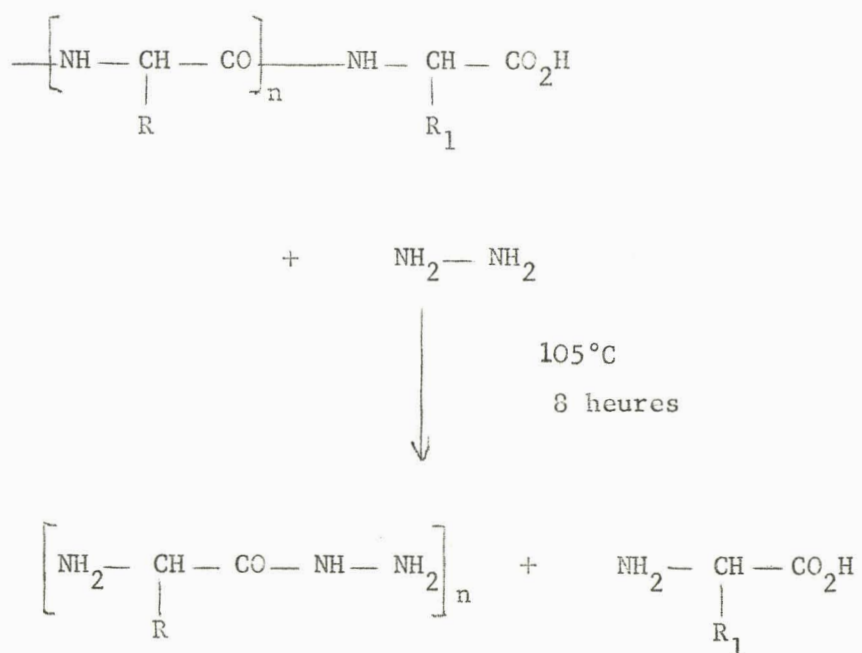


Figure 7

Principe de la méthode d'hydrazinolyse

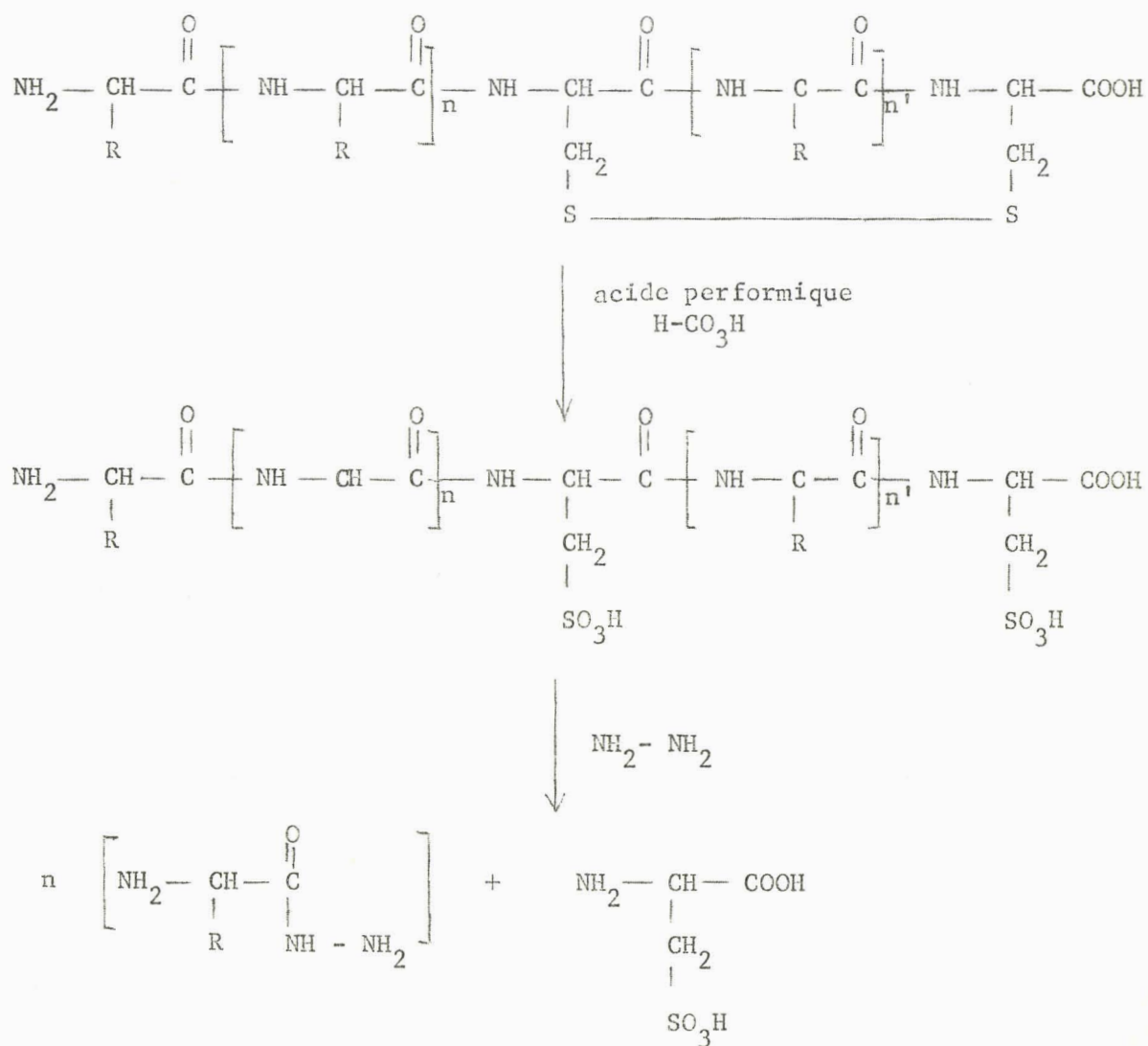


Figure 8

Oxydation par l'acide performique des ponts disulfures suivi de l'hydrazinolyse qui libère l'acide aminé en position C-terminale.

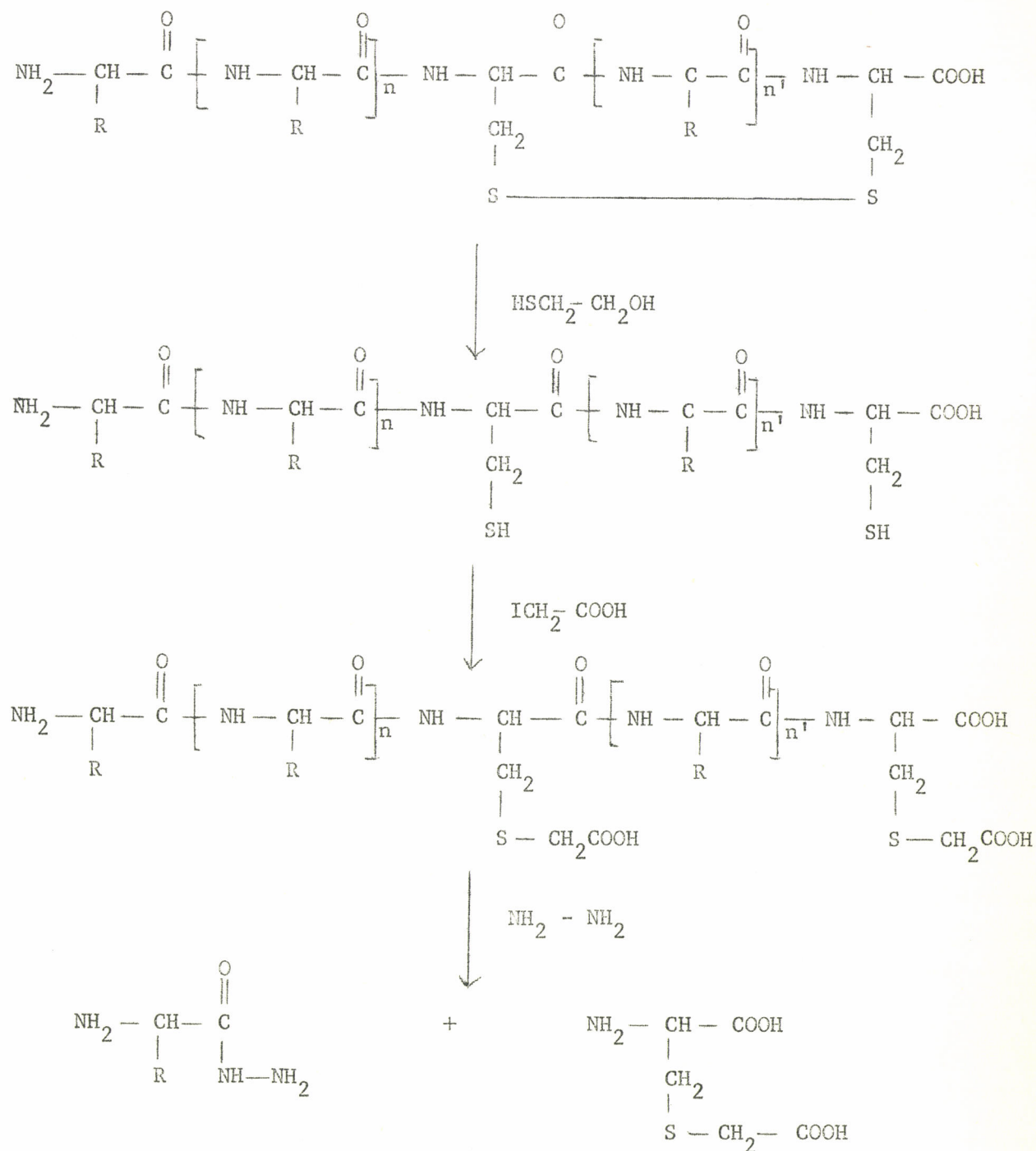


Figure 9

Réduction et S-carboxylation des ponts disulfures suivies de l'hydrazinolyse qui libère l'acide aminé en position C-terminale

procédé de KUSAMA (125) puis maintenue en tube scellé 8 heures à 105°C.

Le mélange réactionnel est ensuite séché une nuit en exsiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique.

Le résidu est purifié sur résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite IRC-50 "mesh" 150-200, suivant le protocole décrit par DE LA LLOSA et coll. (126).

Le résidu repris par 2 ml d'eau distillée est introduit sur la colonne de résine (0,9 x 2 cm).

L'élution est réalisée :

1 - par 40 ml d'eau distillée : élution des acides aminés neutres et acides et de l'asparthydrazide 4 et le glutamhydrazide 5 (*).

2 - par 15 ml d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7 : élution des acides aminés basiques et l'asparthydrazide 1 et le glutamhydrazide 1.

Les éluats sont concentrés à sec sous pression réduite et les acides aminés sont identifiés et dosés par l'Auto-analyseur TECHNICON.

2 - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

Nous utilisons les préparations enzymatiques fournies par la firme WORTHINGTON. Les préparations sont préalablement traitées par le DIFP (Diisopropyl fluoro phosphate) de façon à inhiber les traces de trypsine et chymotrypsine souillant les préparations.

a - TRAITEMENT DE L'ENZYME. On prélève 1 mg d'enzyme qui est dissous dans 0,100 ml de tampon acétate de N-éthyl morpholine 0,2 M ajusté à pH 8,5, on ajoute alors 2 ml de DIFP pur. Le mélange est maintenu 2 heures à la température ambiante puis une nuit à 4°C. La solution est ensuite conservée à -20°C.

b - HYDROLYSE ENZYMATIQUE. Une quantité exactement connue de peptide ou glycopeptide correspondant à 3 ou 4 µmoles est dissoute dans 3 ml d'une solution de nor-leucine 0,5 mM ; la solution obtenue est lyophilisée.

(*) Dans le cas où un résidu d'asparagine ou de glutamine se trouve en position C-terminale.

La poudre est reprise par 2 ml de tampon acétate de N-éthyl morpholine 0,2 M, pH 8,5. La carboxypeptidase est ajoutée à raison de 0,005 μ moles par μ mole de substrat. Les prélèvements de 200 μ l sont effectués aux temps 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 8 - 20 heures.

- Chaque prélèvement est immédiatement acidifié par de l'acide acétique, puis congelé et lyophilisé.

- Les acides aminés libérés sont identifiés et dosés à l'analyseur d'acides aminés TECHNICON.

D - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

1 - METHODE DES DNP AMINO-ACIDES DE SANGER

Nous utilisons deux techniques différentes de dinitrophénylation selon que le substrat était une protéine ou un glycopeptide.

a - Dinitrophénylation des glycoprotéines

1 à 2 μ moles de protéines sont dissoutes dans 10 ml d'une solution 0,1 M de KCl ajusté à pH 8,5 par de la soude 1 N, puis 0,2 ml de fluorodinitrobenzène (FDNB) sont ajoutés en deux fois. La dinitrophénylation est menée 24 h au pH stat, à une température de 37°C et sous une agitation efficace de façon à maintenir le FDNB en suspension.

L'excès de FDNB est alors extrait par l'éther, acidifié à pH 1 et de nouveau extrait.

Si la glycoprotéine ne précipite pas en milieu acide, on ajoute 5 volumes d'un mélange éthanol-éther (v:v), le milieu devenant moins polaire favorise alors la précipitation.

b - Cas d'un glycopeptide

Nous utilisons la technique décrite par MONSIGNY (127). Deux μ moles sont dissoutes dans 5 ml d'eau contenant 200 mg de bicarbonate. A cette solution, on ajoute 5 ml d'une solution éthanolique à 5 p. 100 (v:v) de FDNB et le mélange est agité pendant 4 heures à l'obscurité et à la température du laboratoire. On ajoute alors, à nouveau 200 mg de bicarbonate de sodium et 5 ml de solution éthanolique de FDNB et la réaction est prolongée pendant 24 h.

La purification du DNP glycopeptide est effectuée suivant la technique préconisée par MONSIGNY (128).

On ajoute à la solution de l'éther éthylique jusqu'à apparition d'un louche. Après un repos d'une heure, le précipité est redissous dans la quantité minimale d'eau distillée. La solution obtenue est additionnée d'un volume d'éthanol absolu et les sels minéraux sont de nouveau précipités par l'éther. Les deux solutions surnageantes sont réunies et évaporées à siccité sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par l'eau distillée et la solution obtenue est débarrassée du FDNB en excès de la même façon que précédemment. La fraction aqueuse est enfin évaporée à siccité sous pression réduite à l'évaporateur rotatif.

c - Hydrolyse des DNP glycoprotides et analyse des hydrolysats

Les DNP glycoprotides sont ensuite hydrolysés et analysés suivant les techniques décrites par BISERTE et al. (129). En outre, nous avons parfois dosé les acides aminés non dinitrophénylés qui se trouvent dans la phase aqueuse.



2 - METHODE DES DANSYL AMINO-ACIDES (*)

Nous avons utilisé la méthode de GRAY et HARTLEY (130) dont le principe est rappelé dans le schéma de la figure 10 (p. 50).

a - Dansylation des glycopeptides

Une nanomole de peptides dans 10 μ l d'eau est placée dans un tube de verre spécial.

On ajoute 10 μ l de solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et 20 μ l de solution acétonique de chlorure de l'acide diméthylamino-5 naphthalène sulfonique (DNSCl).

(*) Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur G. BISERTE et à Monsieur P. SAUTIERE qui nous ont accueilli dans leur Laboratoire, et nous ont enseigné cette technique.

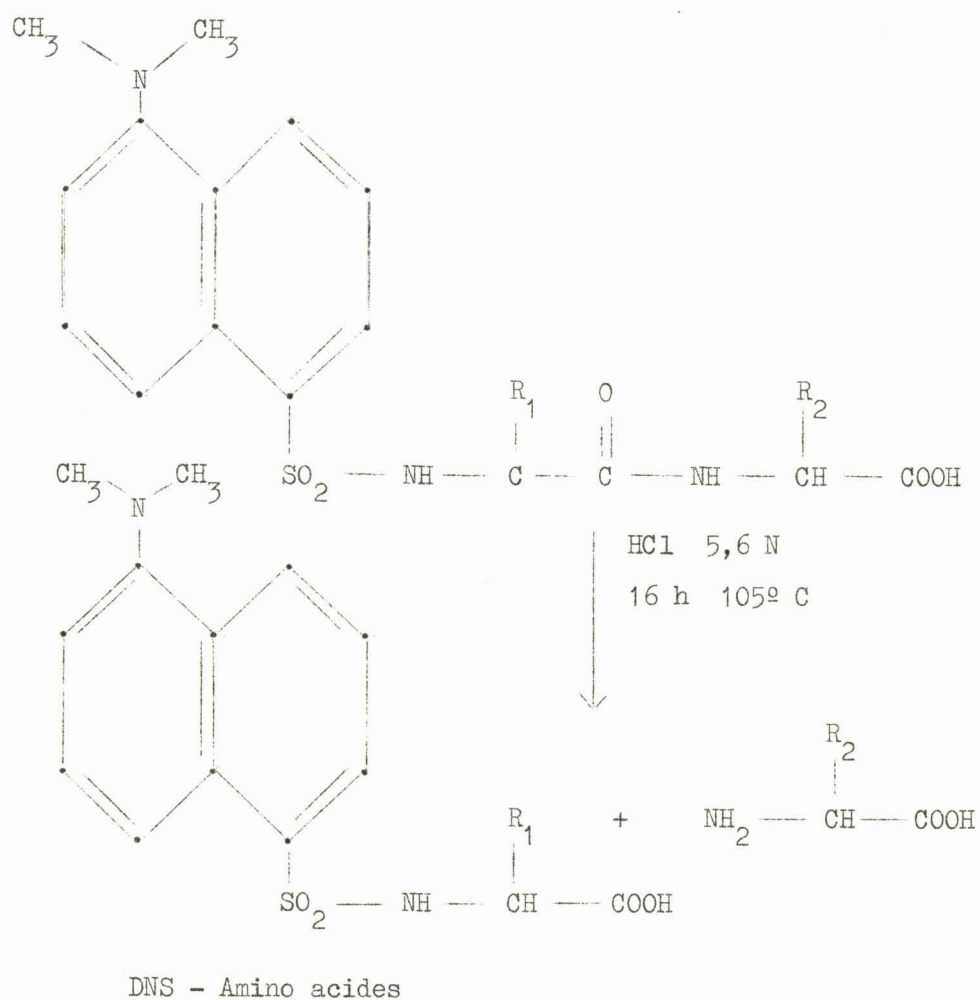
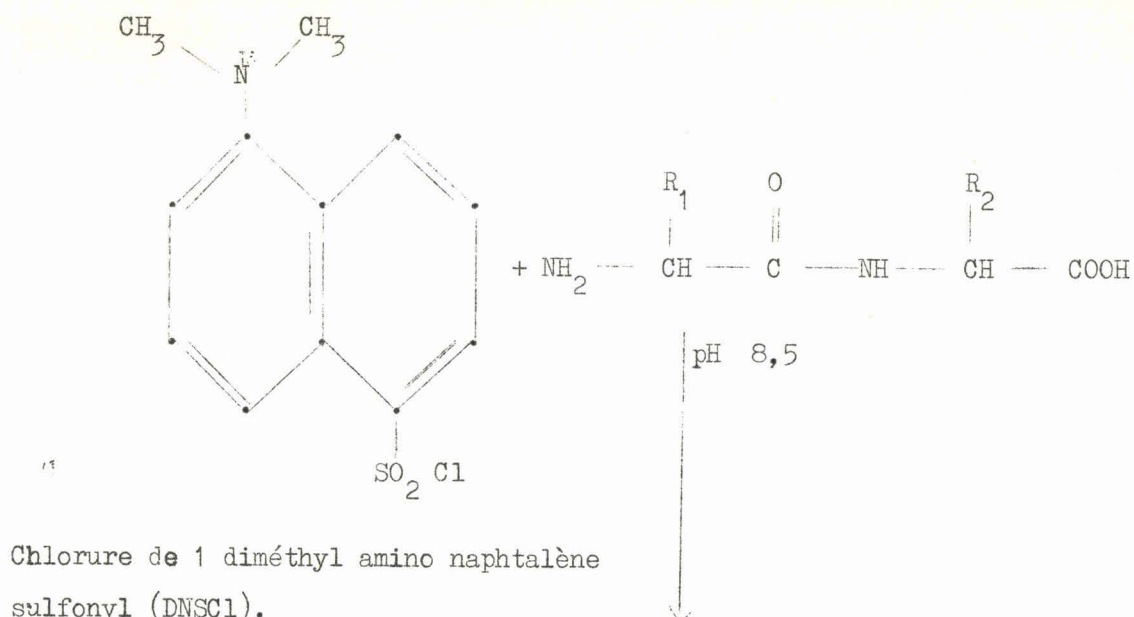


Figure 10

Identification des acides aminés N-terminaux. Méthode des DANSYL amino-acide de GRAY et HARTLEY.(131).

On bouche le tube avec une feuille de papier paraffiné et on laisse en contact 2 à 6 heures à l'obscurité et à température ambiante. Le tube est ensuite placé dans un dessiccateur en présence d'acide sulfurique et son contenu évaporé à sec sous vide partiel. On introduit ensuite dans le tube 50 μ l d'acide chlorhydrique 5,6 N et on hydrolyse à 105°C pendant 16 heures.

L'hydrolysate est séché dans un dessiccateur en présence de pastilles de soude sous vide partiel puis repris dans 20 μ l de pyridine à 50 p. 100 en vue de la chromatographie.

b - Chromatographie des DANSYL amino-acides

Nous avons utilisé la chromatographie en couche mince sur gel de silice G₁ en suivant la technique préconisée par STEHELIN et DURANTON (132) qui par migrations successives dans différents systèmes solvants, sépare tous les Dansyl-amino-acides.

Dans les cas simples que nous avons rencontrés ; nous avons utilisé un système solvant unique : benzène, pyridine, acide acétique, acide formique 75 : 25 : 1 : 0,2.

Sur la plaque de silicagel de 0,25 mm d'épaisseur, nous traçons à la pointe sèche des couloirs de 1 cm de large perpendiculairement au sens de coulage de la plaque. La plaque est activée une heure à 100°C, refroidie en exciccateur.

Dans chaque couloir est alors déposé soit un ou plusieurs Dansyl-acides aminés étalons judicieusement choisis, soit un échantillon à analyser. La plaque est saturée pendant 0,5 h avant la première migration.

La plaque est alors séchée à l'air libre et placée 5 mn à 100°C de façon à éliminer le solvant, puis est examinée en lumière ultraviolette.

Préparation des DNS-dérivés étalons

Dans les tubes à essais contenant 10 μ moles de chaque acide aminé, on ajoute 0,5 ml de solution tamponnée à pH 9,5 (borate, acide borique 0,05 N) puis 0,5 ml d'une solution à 10 mg/ml de chlorure de dansyl dans l'acétone. Les tubes sont mis à l'obscurité à température ambiante, pendant 30 mn avant de pouvoir être utilisés. Si les réactifs sont trop concentrés, on les dilue par l'acétone. A l'obscurité, ces dérivés se conservent plusieurs semaines.

3 - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

Nous avons utilisé la méthode de dégradation récurrente selon EDMAN (133). Le principe en est rappelé par la schéma réactionnel de la figure 11 (p. 53).

Les phenylthiohydantoïnes formées ne sont pas systématiquement identifiées. Nous avons couplé cette méthode avec les méthodes des Dansyl amino-acides après chaque dégradation, le nouvel amino-acide N-terminal est identifié. Nous avons également utilisé la méthode de HIRS (134) de dosage des amino-acides restant après chaque dégradation.

Le protocole expérimental utilisé est celui que DOPHEIDE, MOORE et STEIN (135) ont adapté, à partir de celui qu'EDMAN préconise pour son appareil automatique.

Une micromole de peptide ou de glycopeptide est dissoute dans 1 ml de tampon pyridine, H_2O , N-éthyl morpholine (150:100:29) ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique. Puis 50 μ l de phenylisothiocyanate sont ajoutés et l'ensemble placé sous courant d'azote est maintenu à 37°C pendant 1 à 2 h 30.

Le phenylisothiocyanate en excès est alors extrait à 5 reprises par du benzène saturé d'eau.

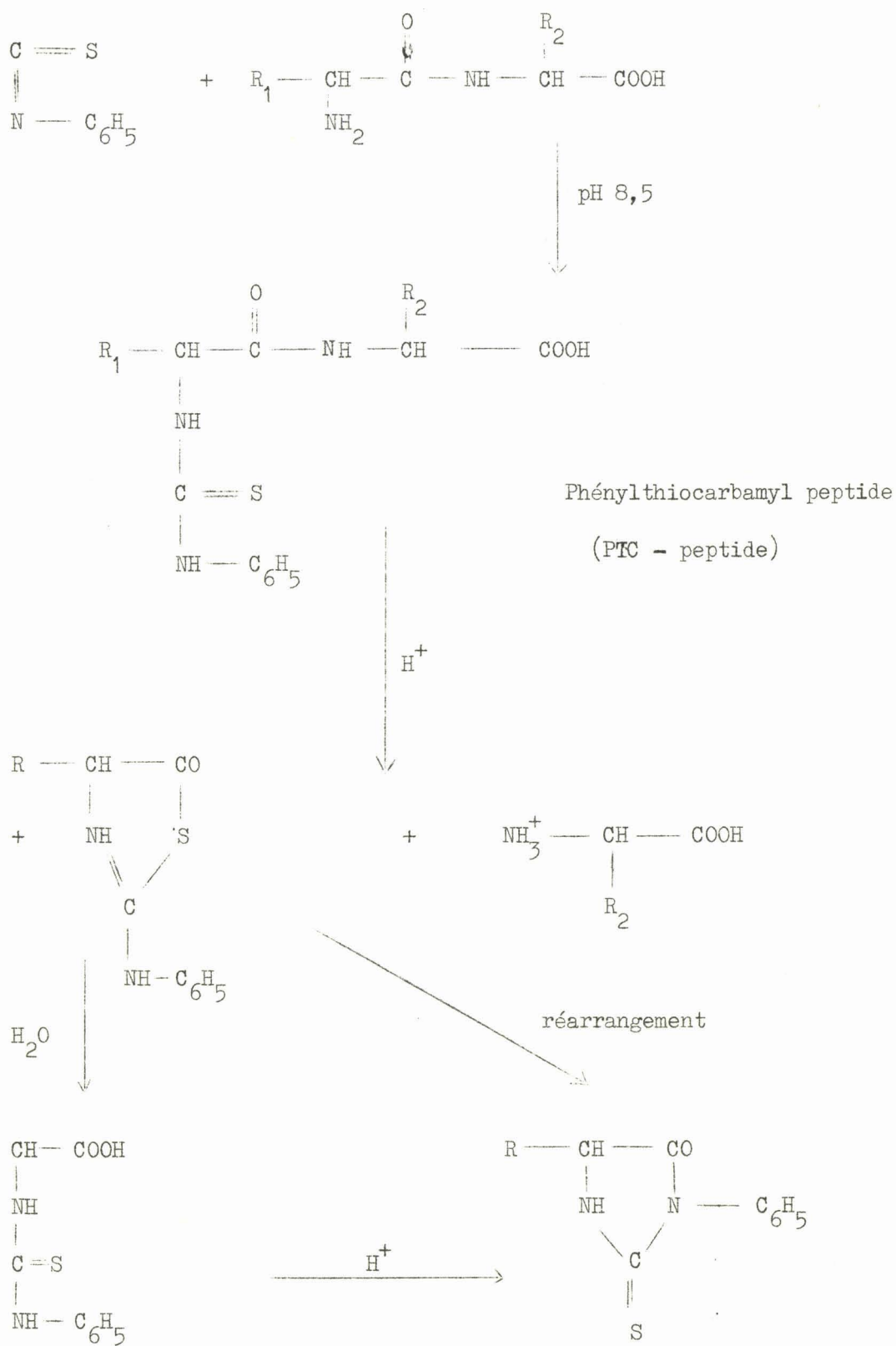
La phase aqueuse est lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite desséché sous vide pendant une demi-heure en présence de P_2O_5 .

Le résidu est alors repris par 100 μ l d'acide trifluoracétique qui cyclise et libère la thiazolinone de l'acide N-terminal ; cette réaction s'effectue à 37°C pendant 0,5 heure sous azote.

L'acide trifluoracétique est ensuite chassé par un courant d'azote et le résidu est repris par 1 ml d'acide acétique 0,4 M. La phenylthiohydantoïne formée est extraite par 3 fois 2 ml de benzène.

Une aliquote est prélevée pour dansylation, une autre pour le dosage des amino-acides.

Le reste lyophilisé est alors prêt pour subir un nouveau cycle.



Phényl thiocarbamyl amino acide

Figure 11

Mécanisme de la dégradation récurrente d'EDMAN

E - METHODE DE RUPTURE SPECIFIQUE DES CHAINES PEPTIDIQUES

Afin de déterminer la structure primaire du glycopeptide B, nous avons été amené à recouper les chaînes peptidiques, de façon à isoler des peptides et glycopeptides plus courts.

† - METHODE ENZYMATIQUE

a - Hydrolyse par la chymotrypsine

A une solution à 2 p. 100 du glycopeptide de 0,001 M en acétate d'ammonium ajusté à pH 8,5, on ajoute de la chymotrypsine en quantité suffisante pour obtenir un rapport enzyme/substrat de 1 p. 50. La chymotrypsine a été au préalable activée par incubation d'une demi-heure à température ambiante dans une solution 0,001 M d'acétate de calcium.

L'hydrolyse est menée pendant 2 heures à une température de 37°C. La réaction est arrêtée par acidification à pH 1 par de l'acide acétique.

b - Hydrolyse par la subtilisine

L'hydrolyse est menée dans les conditions identiques à celles utilisées avec la chymotrypsine. Elle est prolongée pendant 8 heures, et arrêtée par acidification.

c - Hydrolyse par la thermolysine

Nous avons utilisé la thermolysine fournie par la firme CALBIOCHEM. Cette protéinase coupe préférentiellement les liaisons valine, phénylalanine et leucine. Elle a été utilisée dans les mêmes conditions que les autres protéinases.

2 - HYDROLYSE CHIMIQUE

Hydrolyse par les acides dilués. Nous avons utilisé l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,03 N qui libère préférentiellement l'acide aspartique. Comme l'indique le schéma de la figure 12 (p. 55).

L'asparagine est libérée plus lentement, car il y a d'abord désamidation. Le résidu d'asparagine lié au glycanne, il n'est pas libéré car la liaison asparaginy-l-glucosamine joue un rôle protecteur.

Nous utilisons le protocole préconisé par TSUNG et FRAENKEL-CONRAT (136) :

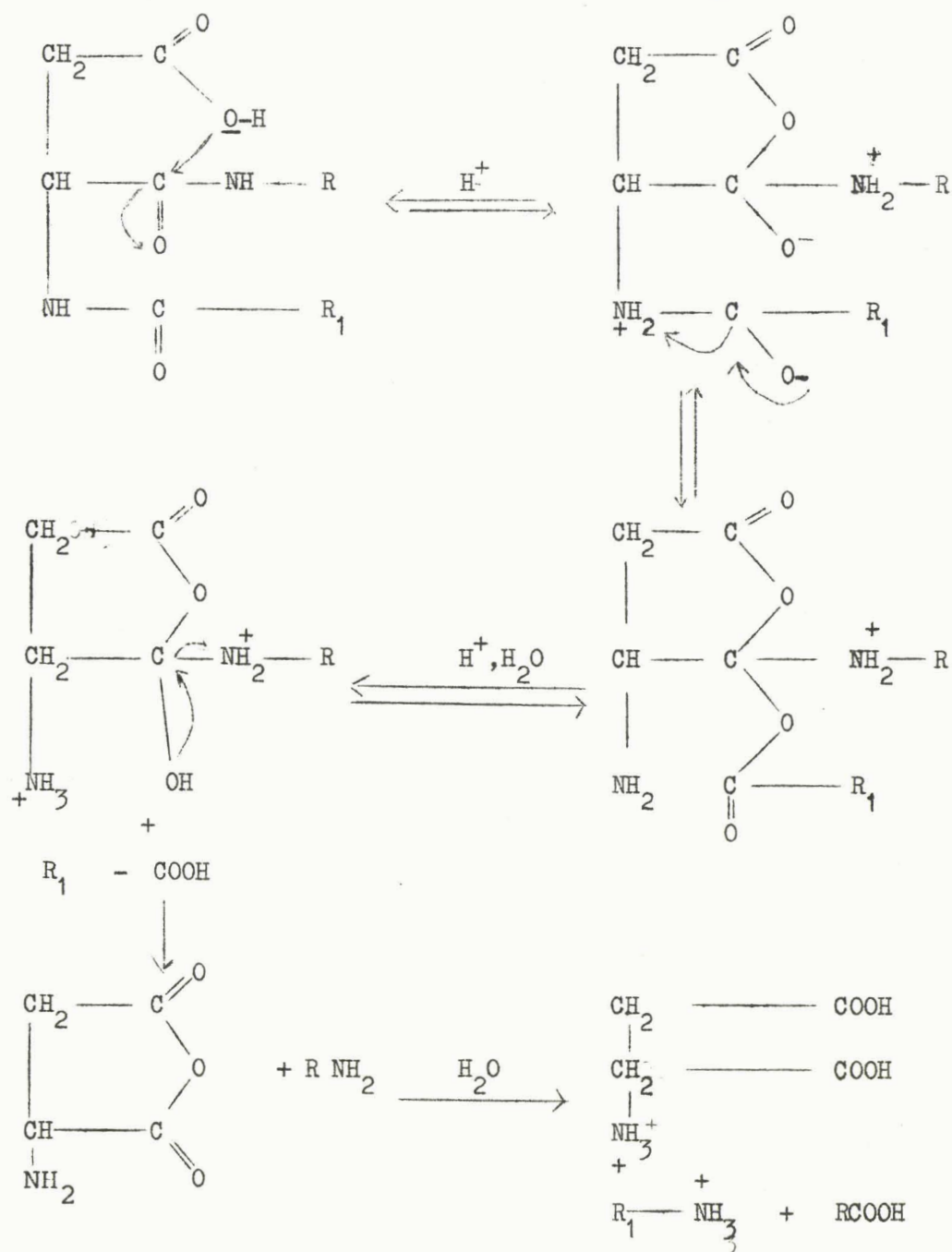


Figure 12

Mécanisme de libération préférentielle de l'acide aspartique
par l'acide chlorhydrique 0,03N.

Le glycopeptide est dissous dans l'acide chlorhydrique 0,03 N à une concentration de 2 mg par ml.

L'hydrolyse est menée en tube scellé sous vide pendant 16 h.

L'hydrolysate est congelé et lyophilisé.

II - RESULTATS

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE DU GLYCOPEPTIDE B

L'ensemble des opérations qui nous ont permis de déterminer la séquence du glycopeptide B est résumée dans la figure 13 (p.57).

1 - Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire déterminée par le dosage des fonctions amines libres est de 3 200 pour un groupement NH_2 libre. Cette valeur est très certainement faible car il peut rester dans le glycopeptide des traces d'acides aminés libres.

2 - Rupture des ponts disulfures

La présence de deux résidus de cystéine suggérerait l'existence d'un pont disulfure dans le glycopeptide B. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons oxydé le glycopeptide par l'acide performique. Les électrophorèses dans les divers tampons n'ont alors donné qu'une seule tache de nature glycopeptidique (Fig. 14 ; p. 58). Or si le glycopeptide B avait possédé 2 chaîne peptidiques liées par un pont disulfure, un peptide aurait été libéré et aurait été mis en évidence par électrophorèse.

Ce résultat est en faveur d'un pont disulfure intra-caténaire.

3 - Acides aminés N-terminaux

La présence d'un seul résidu d'acide aminé N-terminal, le glycocolle, confirme l'existence d'une seule chaîne peptidique.

La dégradation récurrente d'EDMAN couplée avec la méthode des dansylations de GRAY et HARTLEY, nous a permis de déterminer sur le glycopeptide la séquence N-terminale suivante :

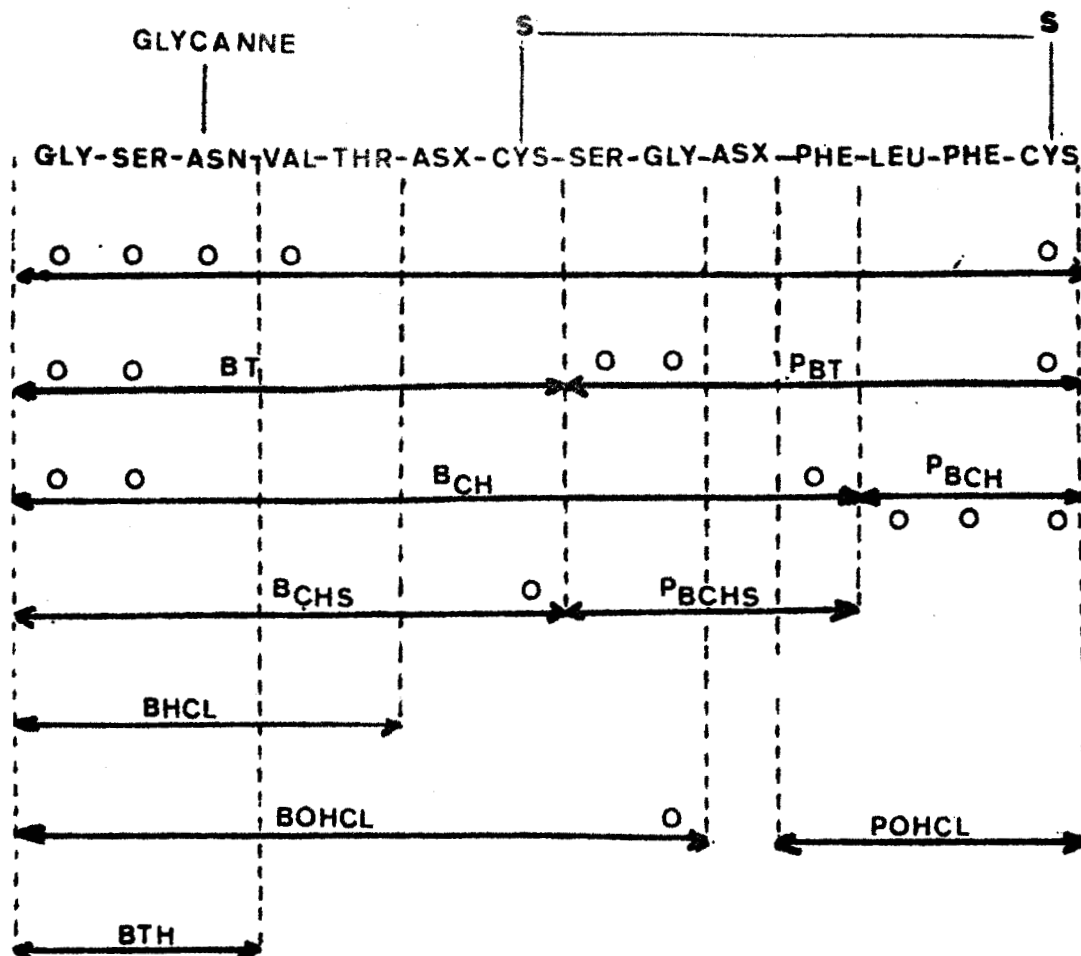


Figure I3

Schéma de structure du glycopeptide B .

O indique les amino-acides dont la position a été définie par les méthodes de détermination des amino-acides N et C terminaux .

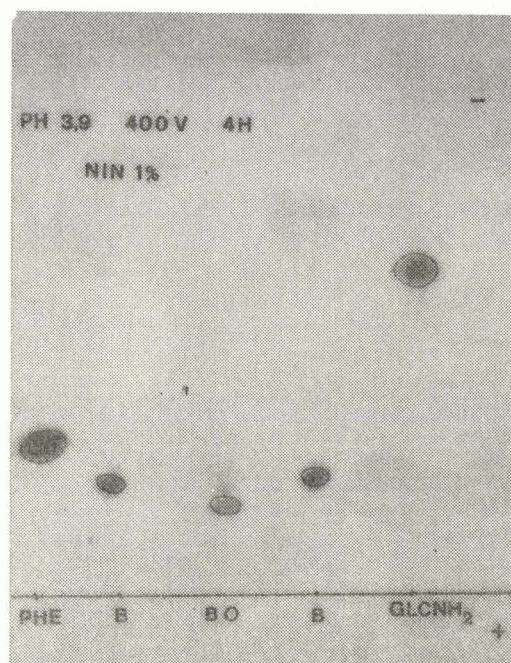
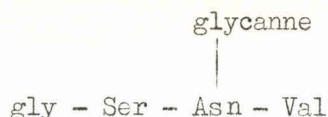


Figure I4

Electrophorèse à pH 2,4 (papier Whatman W₃MM ; 8v/cm ; 15 h)
 du glycopeptide B avant et après oxydation performique (B O)
 La glucosamine et la phényl alanine sont utilisées comme témoins de
 migration



4 - Acides aminés C-terminaux

L'hydrazinolysé effectuée sur le glycopeptide natif ne libère aucun acide aminé. Au contraire, après oxydation performique, elle libère l'acide cystéique, le glycopeptide possède donc une cystine en position C-terminale. Le résultat a été confirmé par l'action de la carboxypeptidase B. En effet, sur le glycopeptide B réduit et S-amino-éthylé (c'est-à-dire, dont la cystine est transformée en isostère de la lysine), nous avons fait agir la carboxypeptidase B qui libère l'amino-éthyl cystéine. Cette préparation de carboxypeptidase B était souillée de carboxypeptidase A. Il apparaît donc en même temps de la phénylalanine et de la leucine. La vitesse de libération est telle que l'interprétation de la séquence est délicate (Tableau XIII ; p.60).

Elle nous indique cependant la présence d'un résidu de leucine et de 2 résidus de phénylalanine au voisinage de la cystine située en position C-terminale dans le glycopeptide B.

5 - Hydrolyse par la trypsine

Nous avons fait agir la trypsine sur le glycopeptide B réduit en S-amino-éthylé.

L'hydrolyse a été effectuée pendant 24 heures en ajoutant trois fois de la trypsine dans le rapport enzyme-substrat 1:50 de façon à bien couper les liaisons S-amino-éthyl cystéinyl qui sont moins labiles que les liaisons lysyl.

Par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex-G 50, nous avons isolé 2 fractions : un glycopeptide B et un peptide P_{BT} . Le glycopeptide est repéré par la réaction au phénol-sulfurique effectuée sur 0,2 ml d'éluat prélevé de chaque tube. Le peptide est repéré par coloration à la ninhydrine effectuée automatiquement à l'auto-analyseur TECHNICON.

Le glycopeptide B_T possède la composition en amino-acides fourni par le tableau XIV (p.61).

Tableau XIII

Nombre de résidus d'acides aminés libérés par action du mélange carboxypeptidase A et B sur le glycopeptide B réduit et S-aminoethyle

temps en heures	0.25	0.5	1	2	3	8	24
Phé	0.68	0.68	0.85	1.04	1.01	0.90	1.1
Leu	0.40	0.45	0.46	0.50	0.51	0.57	0.59
CyAE	0.52	0.60	0.65	0.80	0.80	0.83	0.84

Représentation graphique

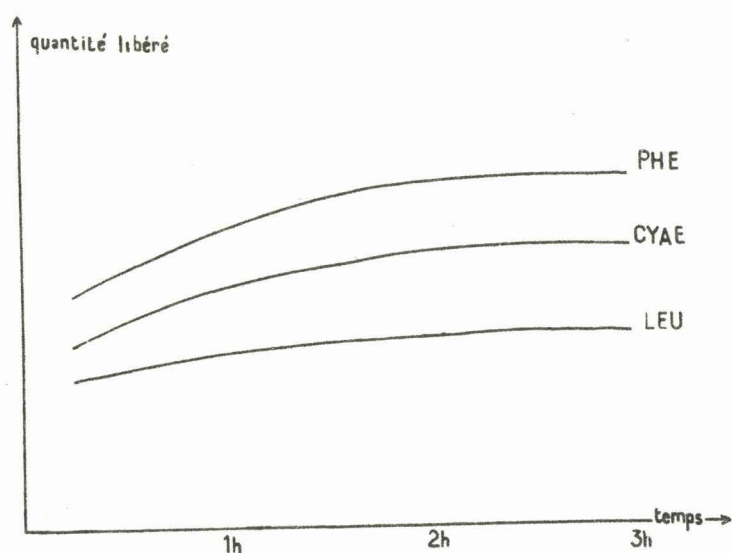


Tableau XIV

Composition en amino acide du glycopeptide B_T et du peptide P_{BT}
 obtenu après action de la trypsine sur le glycopeptide
 B réduit et S-amino-éthylé.

	Glycopeptide B_T	Peptide P_{BT}
Asp	2,0	1,0
Thr	0,9	—
Ser	1,2	1,1
Gly	1,0	0,8
Val	1,1	—
Leu	—	1,2
Phe	—	0,9
Cys AE	1,1	0,3

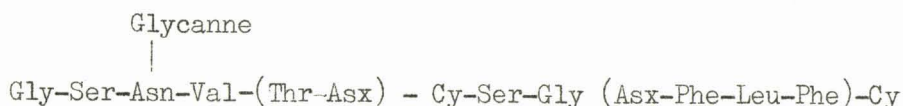
La dégradation récurrente d'EDMAN appliquée à ce glycopeptide libère du glycolle puis de la sérine.

Le peptide P_{BT} possède la composition fournie par la tableau XIV (p.61). Ce peptide a été purifié par électrophorèse sur papier dans le tampon de pH 3,9.

La dégradation récurrente d'EDMAN effectuée sur le peptide libère de la sérine puis du glycolle.

Le manque en phénylalanine et en amino-éthyl-cystéine s'explique par le fait que la trypsine utilisée possède une activité chymotrypsique non négligeable qui a libéré partiellement les fragments Phe-Cys AE éliminés par électrophorèse préparative à pH 3,9 dans la fraction basique.

En tenant compte, d'une part, des résultats obtenus antérieurement par SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (137) démontrant l'existence d'une chaîne Ser-Asn (glycane) et, d'autre part, de la spécificité de la coupure par la trypsine des liaisons S-amino-éthyl-cystényl, nous pouvons attribuer à la chaîne peptidique du glycopeptide B la séquence suivante :



6 - Hydrolyse par la chymotrypsine

Le glycopeptide B oxydé par l'acide performique est hydrolysé par la chymotrypsine pendant 2 heures, la réaction est arrêtée par acidification ; la solution est ensuite congelée et lyophilisée.

Le seul amino-acide libre présent dans l'hydrolysat est l'acide cystéique ce qui est en faveur d'une séquence Phe-Cys.

La dégradation récurrente d'EDMAN a été effectuée sur l'hydrolysat complet. Nous avons dosé les amino-acides avant et après chaque cycle. Ces résultats sont résumés dans le tableau XV (p. 63). Au premier cycle 0,9 résidu d'acide cystéique disparaissent ainsi que du glycolle (en position N-terminale dans le glycopeptide B natif) et de la leucine. Au deuxième cycle, nous voyons disparaître de la sérine et de la phénylalanine.

Ces résultats confirment la séquence Gly-Ser- N-terminale

Tableau XV

Dégradation récurrente d'EDMAN effectuée sur le glycopeptide B oxydé et hydrolysé par la chymotrypsine.

Dosage des amino acides après chaque cycle.

	Glycopeptide oxydé	1er cycle	2e cycle
Cy SO ₃ H	1,9	1,2	1,1
Asp	3,3	3,3	3
Thr	1	1	1
Ser	2,2	2,2	1,5
Gly	2,3	1,2	1,2
Val	1	1	1
Leu	1	0,8	0
Phe	1,9	1,9	1,2

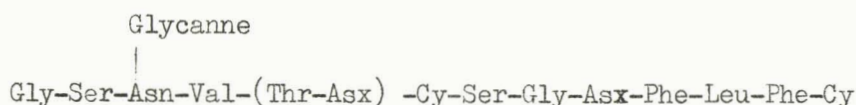
dans le glycopeptide B natif et démontrent, compte tenu de la spécificité d'action de la chymotrypsine, la séquence C-terminale Leu-Phe-Cy pour le glycopeptide.

D'autre part, après chromatographie préparative sur papier, nous avons isolé, 2 fractions, à partir du glycopeptide B oxydé et hydrolysé pendant 8 heures par la chymotrypsine.

L'une des fractions est un peptide Pch qui est composé d'acide cystéique (voir Tableau XVI ; p. 65) 0,6, de leucine 0,6 et de phénylalanine 1,0. Nous avons identifié l'acide cystéique en position **C-terminale**.

L'autre fraction est un glycopeptide de B_{Ch} qui possède la composition donnée par le tableau XVI (p.65), et dans lequel la phénylalanine se trouve en position C-terminale.

Cet ensemble de résultats nous permet de fournir pour le glycopeptide de B natif le schéma de structure suivant :



Enfin le glycopeptide de B_{Ch} fournit, sous l'action de la subtilisine : - un peptide PBchS un glycopeptide PBchS (voir tableau XVI ; p. 65).

Le glycopeptide possède de l'acide cystéique en position C-terminale.

Ces résultats confirment l'existence de la séquence Cys-Ser-Gly-Asx-Phe.

7 - Hydrolyse par la thermolysine

L'hydrolyse par la thermolysine du glycopeptide B oxydé a permis d'isoler par chromatographie préparative sur papier un glycopeptide B_{Th} dont la composition très simple est la suivante :

Asp 1 ; Ser 0,85 ; Gly 0,8.

Ce résultat compte de la spécificité d'action de la thermolysine qui coupe préférentiellement les liaisons valines, nous permet de confirmer la position de ce résidu de valine par rapport à l'asparagine liée au glycanne.

Tableau XVI

Composition en amino-acides du glycopeptide B_{Ch} , du peptide P_{Ch} obtenus par hydrolyse chymotrypsique du glycopeptide B oxydé, et du peptide P_{ChS} et du glycopeptide B_{ChS} obtenus après hydrolyse par la subtilisine du glycopeptide B_{Ch} .

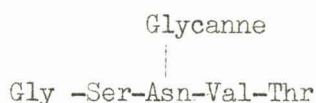
	B_{Ch}	P_{BCh}	B_{ChS}	P_{BChS}
CyS 03H	1	0,6	0,25	0,75
Asp	3,1	-	2,0	1,0
Thr	0,8	-	1,0	-
Ser	2,0	-	1,0	1,0
Gly	2,1	-	1	0,85
Val	1,0	-	1	-
Leu	-	0,6	-	-
Phe	1,1	1,0	-	0,55

8 - Hydrolyse par l'acide chlorhydrique dilué

a - Hydrolyse du glycopeptide B natif

L'hydrolyse du glycopeptide B natif, par l'acide chlorhydrique 0,03 N fournit par chromatographie sur papier un glycopeptide B_{HCl} (B hydrolysé par HCl) dont la composition est la suivante (voir tableau XVII ; p. 67).

Le seul amino-acide libéré dans l'hydrolysate est l'acide aspartique. Ces résultats, compte tenu de la spécificité de ce type d'hydrolyse qui libère préférentiellement l'acide aspartique et compte tenu de la séquence N-terminale du glycopeptide B natif, nous permet de proposer la séquence suivante pour ce glycopeptide :



b - Hydrolyse du glycopeptide B oxydé

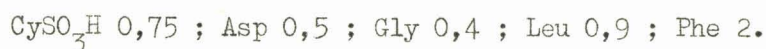
Le glycopeptide préalablement oxydé par l'acide performique a été hydrolysé par HCl 0,03 N dans les mêmes conditions : l'hydrolysate ne contient qu'un seul amino acide libre : l'acide aspartique.

Par chromatographie sur papier nous isolons :

1^o) un glycopeptide de BO_{HCl} (glycopeptide B oxydé et hydrolysé par HCl) dont la composition en acides aminés est la suivante (voir tableau XVII ; p. 67).

Ce glycopeptide possède en position C-terminale, un résidu de glycocolle et des traces de thréonine, d'acide aspartique et de sérine.

2^o) une fraction peptidique P_{BO HCl} dont la composition est la suivante :



Ce résultat, compte tenu de la spécificité de l'hydrolyse, confirme la séquence Gly-Asx du glycopeptide dont la structure est donc la suivante :

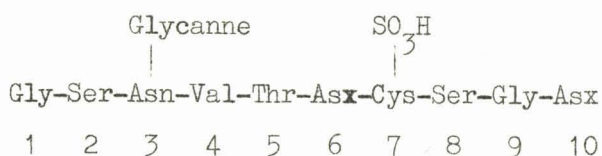


Tableau XVII

Composition en amino acides du glycopeptide B_{HCl} , du glycopeptide BO_{HCl} et du peptide P_{BOHCl} obtenu par action de l'acide chlorhydrique 0,03 N sur le glycopeptide B natif et oxydé.

	B_{HCl}	BO_{HCl}	P_{BOHCl}
CyS O_3H	-	0,8	0,75
Asp	1,1	1,8	0,5
Thr	0,9	1,1	-
Ser	1	1,7	-
Gly	0,9	1,5	0,4
Val	0,9	1,1	-
Leu	-	-	0,9
Phe	-	-	2

Il faut remarquer que la présence d'un groupement fortement acide : le groupement sulfurylé de l'acide cystéique, empêche la libération de l'acide aspartique numéro 6.

CONCLUSIONS

Le glycopeptide B correspond donc au schéma de structure présenté à la figure 13 (p. 57).

Il nous reste encore à préciser la nature des amino acides 6 et 10, acide aspartique ou asparagine. Pour cela l'étude systématique par des méthodes enzymatiques des séquences de chacun des glycopeptides isolés est en cours.

B - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE C

1 - Fraction glycopeptidique C totale

Sur la fraction glycopeptidique C, nous avons identifié, par la méthode de dinitrophénylation, du glycocolle et de l'acide aspartique en position N-terminal, ainsi que de la lysine en position C-terminal.

2 - Fraction glycopeptidique COa 1, COa 2 et COa 3

Chacune des fractions glycopeptidiques est encore hétérogène.

Nous avons cependant, sur le mélange de ces 3 fractions, déterminé par dégradation récurrente d'EDMAN, l'existence d'une séquence glycocolle-sérine en position N-terminale.

D'autre part, nous avons identifié sur le mélange de chacune de ces fractions de la phénylalanine et des traces de lysine en position C-terminale.

Ces résultats semblent indiquer que ces glycopeptides sont libérés par ruptures secondaires chymotrypsiques.

3 - Séquence du glycopeptide COb

La composition très simple en amino-acides de ce glycopeptide nous a permis d'envisager l'étude de la séquence des amino acides.

a - Amino acide N-terminal : Les méthodes de dinitrophénylation et de dansylation révèle la présence d'acide aspartique en position

N-terminale dans le glycopeptide COb.

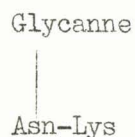
b - Amino acide C-terminal : La méthode d'hydrazinolyse nous a permis d'identifier la lysine en position C-terminale.

c - La dégradation récurrente d'EDMAN libère exclusivement la phénylthiohydantoïne de l'acide aspartique liée au glycanne et de l' ϵ -phénylthio-carbamyl-lysine.

Nous avons séparé (Fig. 15 ; p.70) ces deux composés par chromatographie sur papier dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Le glycanne lié à la phénylthiohydantoïne de l'acide aspartique reste au trait de départ. Il est révélé par le réactif de CHERBULLIEZ (138) spécifique des hydantoïnes mais n'est pas révélé par le réactif à la ninhydrine, la fonction NH_2 n'étant plus libre.

Par contre, l' ϵ -phényl-thiocarbamyl-lysine qui possède un R_f de 0,8 est révélée, à la fois, par la ninhydrine et par le réactif de CHERBULLIEZ.

Cet ensemble de résultats nous permet d'attribuer au glycopeptide COb le schéma suivant :



C - CONCLUSION

1 - Les schémas de structure des glycopeptides B et COb sont suffisamment différents pour que nous puissions conclure que les 2 glycopeptides proviennent de points différents de la chaîne protéique de la transferrine.

2 - La présence d'une cystéine en position C-terminale ne correspond pas à la spécificité de la trypsine, puisque cet enzyme coupe exclusivement les liaisons arginyl-et lysyl. Le glycopeptide B correspond donc à une séquence C-terminale de la transferrine native. Nous devons donc retrouver ce résidu en position C-terminale dans la glycoprotéine native. Or SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (139), dans une étude comparative antérieure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines, n'avaient identifié que le glycocolle, la proline et des traces de sérine en position C-terminale

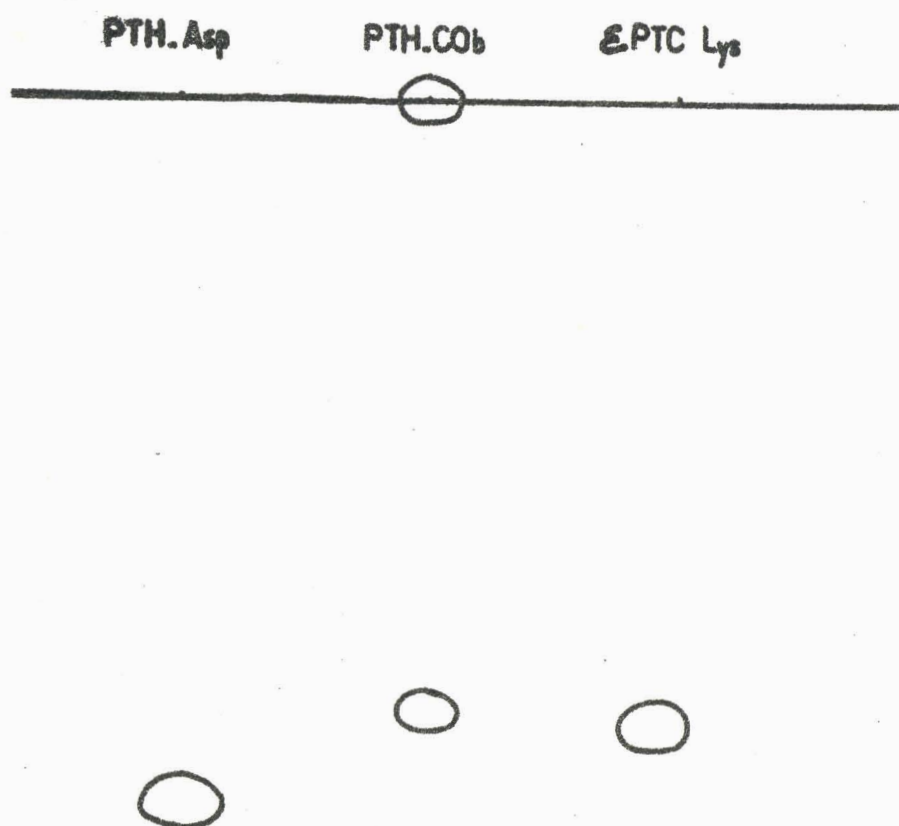


Figure 15

Chromatographie sur papier Whatman W1 dans le système - solvant
n-butanol/acide acétique/ eau (4:1:5) pendant 15 heures du glycopeptide CO6
après un cycle de P.T.H.

de la transferrine. C'est pourquoi nous avons repris leurs travaux dans le but de confirmer l'hypothèse précédente et de montrer qu'un demi-résidu de cystine se trouvait en position C-terminale dans la transferrine native.

III - RECHERCHE DES ACIDES AMINES TERMINAUX

DE LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE

A - ACIDE AMINES C-TERMINAUX

Ce résultat avait été obtenu en appliquant à l'apotransferrine la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI. Or celle-ci ne libère pas la cystine en position terminale.

C'est pourquoi, nous avons appliqué la même méthode sur l'apotransferrine préalablement oxydée par l'acide performique et sur l'apotransferrine réduite, puis alkylée par l'acide iodo-acétique (voir les schémas de principe des Figures 8 et 9 ; p.45 et 46). Dans le premier cas, l'hydrazinolyse a libéré outre le glycocolle, la proline et une faible proportion de sérine, un résidu d'acide cystéique.

Dans le deuxième cas, l'hydrazinolyse a détaché, outre les acides aminés déjà identifiés, un résidu de S-carboxyméthyl-cystéine.

La transferrine sérique humaine possède donc bien, en position C-terminale, trois acides aminés : le glycocolle, la proline et la cystine.

Donc la molécule de transferrine possède au moins 3 chaînes peptidiques.

D'autre part, la présence parmi le produit de l'hydrazinolyse de 0,4 résidu de sérine p.mole de protéide (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL) (140) peut s'expliquer soit par l'existence d'une quatrième chaîne peptidique et, dans ce cas, on s'explique mal le déficit que l'on observe, soit par l'existence de deux ~~trans~~ferrines (voir, à ce sujet, JEPPSSON et SJOQUIST (141)), l'une possédant la sérine en position C-terminale à la place de l'un des autres résidus.

B - ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Par contre, GREEN et FEENEY (142), BEZKOROVAINY (143) affirment que la transferrine est constituée d'une seule chaîne peptidique. Or, il n'a été identifié qu'un seul résidu amino acide en position N-terminale : la valine.

Nous avons effectué la dinitrophénylation sur la transferrine réduite et S-carboxyméthylée de façon à identifier un éventuel résidu de cystine en position N-terminale. Le dinitrophényl dérivé de la S-carboxyméthyl cystéine a été recherché suivant le protocole préconisé par MOSCHETTO et BISERTE (144).

Nous avons uniquement identifié la valine en position N-terminale. En conséquence, si la transferrine est réellement constituée par plusieurs chaînes peptidiques, elle doit posséder des acides aminés N-substitués qu'il serait intéressant de mettre en évidence.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur la transferrine humaine sont les suivantes :

1 - L'hydrolyse trypsique nous a permis d'atteindre le but que nous nous étions fixé : isoler deux glycopeptides, chacun portant un des deux groupements glucidiques. Ce résultat a été obtenu en fractionnant les hydrolysats trypsiques de la transferrine. L'exploration de la structure des deux groupements glycaniques ainsi séparés peut donc, à présent être envisagée.

2 - Les séquences Ser-Asn-Glycane et Glycane-Asn-Lys déterminées par SPIK (145) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (146) et par SPIK et MONTREUIL (147), sont confirmés ainsi que l'existence de deux groupements glucidiques par mole de transferrine.

3 - Dans le glycopeptide B la position la position du résidu de thréonine en β de l'asparagine lié au glycane, du côté C-terminal de la chaîne peptidique confirme l'hypothèse proposée par MONTREUIL en 1964 (148), puis par EYLAR en 1965 (149), et par NEUBERGER en 1968 (150) selon laquelle la présence d'un hydroxy-amino-acide en position β de l'asparagine est nécessaire pour que le premier résidu de N-acétyl-glucosamine se fixe sur cette dernière.

4 - Nous avons démontré qu'un résidu de cystine se trouvait en position C-terminale dans la transferrine sérique humaine.

Ce résidu vient s'ajouter aux résidus de glycolle et de proline déjà mis en évidence. La transferrine possède donc une structure pluricaténaire.

5 - Deux glycopeptides ont été isolés, dont la séquence en amino-acides a été déterminée. Dans l'un d'eux, la fraction glucidique est conjuguée à un résidu d'asparagine voisin du résidu de demi-cystine qui se trouve en position C-terminale d'une des 3 chaînes peptidiques de la transferrine que nous avons caractérisées jusqu'à présent.

BIBLIOGRAPHIE

- AKABORI S., OHNO K. et NARITA K. - Bull. Chem. Soc. Japan, 1952, 25, 214 (124)
- ALLERTON S.E. - Thèse Doct. Harvard, 1962 (27)
- ALLISON A.C. - Experientia, 1959, 15, 281 (54, 54 bis)
- BEARN A.G. et PARKER W.C. - Gottschalk A. in Glycoproteins, Elsevier, 1966, 4, 13 (60)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M. - Analyst 1954, 79, 201 (114)
- BEZKOROVAINY A. et GROLICH D. - Biochem. Biophys. Acta, 1967, 147, 497 (65)
- BEZKOROVAINY A., GROLICH D. et GERBECK C.M., Biochem. 1968, 110, 765 (143)
- BEZKOROVAINY A. - Biochem. Biophys. Acta, 1966, 127, 535 (24)
- BEZKOROVAINY A. et RAFELSON M.E. - Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 302 (23, 26, 32)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M.E. et LIKHITE V. - Arch. Biochem. Biophys., 1963 103, 371 (22, 29, 38, 43, 52)
- BISERTE G., HOLLEMAN J. W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P. - J. Chromatograp., 1959, 2, 225 (129)
- BISERTE G., PLAQUET-SCHOONAERT T., BOULANGER P. et PAYSANT P. - J. Chromatog., 1960, 3, 25 (101)
- CHARLWOOD P.A. - Biochem. J., 1963, 88, 394 (28)
- CHEN et SUTTON - Génétics, 1967, 56, 425 (73)
- CHERBULLIEZ E., BAEHLER B. et RABINOWITZ J. - Helv. Chim. Acta, 1964, 47, 1350 (138)
- COHN E.J. - Science, 1945, 101, 51 (1)
- DATE J.W. - Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 et 444 (118)
- DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M. - Experientia, 1964, 20, 204 (126)
- DOPHEIDE T.A.A., MOORE S. et STEIN N.H. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 1833 (135)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. - Anal. Chem. 1956, 28, 350 (105)
- EDMAN P. et BEGG G. - European J. Biochem, 1967, 1, 80 (133)

- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. - Biochem J., 1933, 27, 1824 (113)
- EYLAR E.H. - J. Théoret. Biol., 1965, 10, 89 (149)
- GHYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.M. et STROMINGER J.L. - Biochemistry, 1965, 4, 2245 (122)
- GOLLNER I. - Behringwerk. Mitt., 1955, 30, 42 (57)
- GRAY W.R. et HARTLEY B.S. - Biochem J., 1963, 89, 59 et 379 (130, 131)
- GREENE F.C. et FEENEY R.E. - Biochem., 1968, 7, 1367 (142)
- HAZEN E.E. - Thèse Doct. Med. Harvard, 1963 (21)
- HEIMBURGER N., HEIDE K., HAUPT H. et SCHULTZE H.E. - Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 293 (42)
- HIRS C.H.W. - J. Biol. Chem., 1956, 219, 611 (107, 123)
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. - J. Biol. Chem., 1960, 235, 663 (134)
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.A. - J. Biol. Chem., 1956, 221, 151 (100)
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. - Acta Chem. Scand., 1947, 1, 944 (4)
- HOREJSI J. et SMETANA R. - Acta Med. Scand., 1966, 115, 66 (2)
- JAMIESON G.A. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 2914 (49, 79, 91, 95)
- JAMIESON G.A. - Biochim. Biophys. Res. Commun, 1964, 17, 775 (14, 45, 69, 79, 120)
- JAMIESON G.A. - Biochim. Biophys. Acta, 1966, 121, 326 (47)
- JAMIESON G.A. - 14ème Colloque de Bruges, 1966, Elsevier (Ed), 1967, 71 (92)
- JANDL J.H. et KATZ J.H. - J. Clin. Invest., 1963, 42, 314 (37)
- JEPPSSON J.O. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 140, 477 (61)
- JEPPSSON J.O. - Acta Chem. Scand., 1967, 21, 1686 (66)
- JEPPSSON J.O. et SJOQUIST J. - Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 658 (141)
- JONES H.D.C. et PERKINS D.J. - Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 122 (5, 44)
- KATZ J.H. - J. Clin. Investig., 1961, 40, 2143 (36)
- KAWERAU E. et WIELANG T. - Nature, 1951, 168, 77 (102)
- KOECHLIN B.A. - J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 2649 (9, 35)
- KUSAMA K. - J. Biochem., 1957, 44, 375 (125)
- MONTGOMERY R. et WU Y.C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (104)

- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47
1867 (75, 81)
- MONTREUIL J., BISERTE G. MULLET S., SPIK G. et LEROY N. - C.R. Acad. Sci.,
1961, 252, 4065 (13, 15, 59)
- MONTREUIL J., SPIK G. et KONARSKA A. - Méthodes chromatographiques de dosage
des oses "neutres" - Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci.,
éd., Lille, 1967 (119)
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A. - C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493 (74,
78)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BISERTE G. et DAUTREVAUX M.,
Experienta, 1965, 21, 254 (49)
- MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M. - Bull. Soc. Chim., 1965,
239 (117)
- MONTREUIL J., MONSIGNY M., SPIK G., DUQUESNE N., CHERON A., DESCAMPS J. et
FOURNET B. - Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 664 (148)
- MONSIGNY M. - C.R. Symposium, Technicon, Paris, 1965 (110)
- MONSIGNY M. - C.R. Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2188 (115)
- MONSIGNY M. - Thèse Doc. Lille 1968 (127, 128)
- MOORE S. et STEIN W. - J. Biol. Chem., 1954, 211, 893 (109)
- MORRISON F.R. et LOUTIE R. - J. Amer. Chem. Soc., 1952, 2649 (16)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 75 (144)
- NEUBERGER . - Communication personnelle Symposium de Bochum 1968 (150)
- ONCLEY J.L., SCATCHARD G. et BROWN A. - J. Phys. Colloid Chem., 1947, 51,
184, (18)
- PARKER W.C. et BEARN A.G. - Science, 1961, 133, 1014 (85)
- PARKER W.C. et BEARN A.G. - J. Exp. Med., 1962, 115, 83 (51, 55, 56)
- PARKER W.C., CRESTFIELD A.M. et BEARN A.G. - Gottschalk A. Glycoproteins,
Elsevier, 1966, 423 (63)
- PARTRIDGE S.M. - Biochem. J., 1948, 42, 238 (106)
- PIEZ K.A. et MORRIS L. - Anal. Biochem., 1960, 1, 187 (108)
- POULIK M.D. - J. Immunology, 1959, 82, 502 et Clin. Chim. Acta, 1961, 6,
493 (84)
- PUTNAM F.W. - Science, 1955, 122, 275 (58)

- RIMINGTON C. - Biochem. J., 1931, 25, 1062 et 1940, 34, 931 (112)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G. et SEAL U.S. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 4907
(19, 25, 30, 39)
- ROBINSON J.C. et PIERCE J.E. - Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106, 348 (87)
- RYDON H.N. et SMITH P.W.G. - Nature, 1953, 169, 922 (103)
- SCHADE A.L. et CAROLINE L. - Science, 1946, 104, 340 (3)
- SCHONENBERGER M. - Z. Naturf., 1955, 10b, 474 (17)
- SCHULTZE H.E., GOLLNER I., HEIDE K., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G. -
Z. Naturf., 1955, 106, 463 (11)
- SCHULTZE H.E., HEIDE K. et MULLER H. - Behringwerk Mitt., 1957, 32, 25
(20, 50)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R. et HAUPT H. - Biochem. Z., 1958, 329, 490
(12, 41, 48)
- SILBERZAHN P., RICHARD G.B. et CREYSSSEL R. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1967,
49, 495 (33)
- SMITHIES O. - Nature, 1957, 180, 1482 (52 bis)
- SPIK G. - Thèse Doct., Lille 1968 (6, 8, 40, 46, 53, 62, 67, 71, 72, 76, 82,
88, 89, 93, 96, 97, 99, 145)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - International Symposium IV Chromatographie
Electrophorèse, Bruxelles 1966, Prem. Acad. Européennes ed.
Bruxelles, 1968, 386 (77, 83)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 94 (7)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1271 (147)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137
(70, 90, 94, 98, 121, 137, 146)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 50,
2186, (68, 139, 140)
- SURGENOR D.M., KOECHLIN B.A. et STRONG L.E. - J. Clin. Investig., 1949,
28, 73 (10, 34)
- TANFORD C. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 2484 (31)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K. - Biochem. Z., 1929, 215, 36 (14)
- TSUNG C.M. et FRAENKEL-CONRAT H. - Biochemistry, 1965, 4, 793 (436)
- WERNER I. et ODIN L. - Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (116)

