

50376  
1973 N° d'ordre: 270.  
46

50376  
1973

46

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

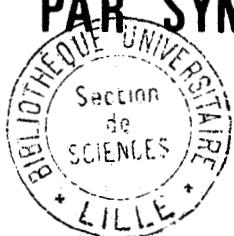
pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

par

Mme. LENKE SZABADOS  
attaché de Recherches au C.N.R.S.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE  
DES GLUCIDES DANS L'HEMOSTASE:  
ENRICHISSEMENT DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE  
EN ACIDE SIALIQUE PAR SYNTHESE ENZYMATIQUE



Membres du Jury: M. MONTREUIL, Président

Mlle. SPIK, Examinateurs

MM. MESTER,

CAEN,

PERCHERON.

Soutenue le 5 Avril 1973.

A Monsieur le Professeur M-M.JANOT  
Membre de l'Institut  
Directeur de l'Institut de Chimie  
des Substances Naturelles du C.N.R.S.

qui m'a fait l'honneur insigne de  
m'intégrer dans son Institut et qui  
a toujours témoigné d'une attention  
bienveillante à la préparation de  
cette thèse

En témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.MONTREUIL  
Université des Sciences et Techniques de Lille

qui a bien voulu me faire l'honneur  
d'accepter la présidence du Jury de  
cette thèse et qui par sa haute  
compétence m'a guidé pour approfondir  
une discipline difficile

En témoignage de respect et de reconnaissance très sincère.

A Mademoiselle Geneviève SPIK  
Maître de Conférence  
Faculté des Sciences de Lille

qui m'a toujours témoigné sa sympathie  
et qui a bien voulu accepter de faire  
partie du Jury de cette thèse

En témoignage d'estime et d'amitié.

A Monsieur le Professeur L.MESTER  
Directeur de Recherches  
Institut de Chimie des Substances Naturelles  
Gif-Sur-Yvette

qui a dirigé ce travail dont le sujet  
lui est particulièrement cher, qui a  
encouragé mes efforts par ses idées  
éclairées et par son enthousiasme  
pour la recherche,

En témoignage de mon respectueux attachement et de ma profonde  
gratitude.

A Monsieur le Professeur J.CAEN  
Faculté de Médecine, Paris

qui a bien voulu accepter de faire  
partie du Jury de cette thèse, et  
qui par sa grande compétence et par  
ses avis pertinents, m'a apporté  
une aide précieuse

En témoignage de reconnaissance très sincère.

A Monsieur le Professeur F.PERCHERON  
Faculté de Pharmacie, Paris

sous le parrainage de qui mon activité au CNRS a été placée, qui m'a toujours encouragé dans l'accomplissement de mes travaux. Qui a bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse après m'avoir prodigué ses conseils avisés.

En témoignage de profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur G.V.R. BORN  
Royal College of Surgeon's of England  
Londres,

A Monsieur le Professeur M. SAMAMA  
Hôpital Hôtel Dieu, Paris

A Monsieur le Docteur T. ERDOS  
Laboratoire d'Enzymologie du  
C.N.R.S., Gif-sur-Yvette

qui m'ont rendu possible l'exécution  
de certaines expériences spéciales  
dans leur laboratoire

En témoignage de reconnaissance très sincère.

A mes collègues et amis

qui m'ont apporté le soutien  
de leur sympathie

En témoignage de ma fidèle amitié

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE  
DES GLUCIDES DANS L'HEMOSTASE :

ENRICHISSEMENT DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE  
EN ACIDE SIALIQUE PAR SYNTHESE ENZYMATIQUE.

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire des Glucides de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

Certaines expériences spéciales ont été exécutées au Laboratoire d'Hémostase, Service de Pr. J. Caen, Hôpital St Louis, Paris,

au Département de Pharmacologie, Pr. G.V.R. Born, Royal College of Surgeon's of England, Londres,

au Laboratoire d'Hémostase, Service de Pr. Agr. M. Samama Hôpital Hôtel Dieu, Paris, et

au Laboratoire d'Enzymologie du C.N.R.S., Service de Dr. T. Erdos, Gif-sur-Yvette.

## TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>IDEES DIRECTRICES DES TRAVAUX</u> .....	2
<u>LE PLAN DES TRAVAUX ET LES METHODES EMPLOYES DANS L'ETUDE DU ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE DANS LES FONCTIONS PLAQUETTAIRES</u> .....	3
 <u>RAPPEL DES CONNAISSANCES SUR LES PLAQUETTES SANGUINES..</u>	4
 <u>C H A P I T R E 1 : APERCU GENERAL</u> .....	5
1. RAPPEL HISTORIQUE.....	5
2. ULTRASTRUCTURE ET ORIGINE DES PLAQUETTES.....	6
3. ROLE DES PLAQUETTES DANS L'HEMOSTASE.....	7
a) Physiologie de l'hémostase.....	7
b) Hémostase primaire.....	8
a) Adhésion des plaquettes aux fibres de collagène.....	8
b) "Release".....	8
γ) Agrégation des plaquettes.....	9
δ) Métamorphose visqueuse.....	10
c) Hémostase finale.....	10
 <u>C H A P I T R E 2 : COMPOSANTS CHIMIQUES DES PLAQUETTES.</u> .....	12
1. INTRODUCTION.....	12
2. PROTEINES.....	13
3. LIPIDES .....	14
4. FACTEURS PLAQUETTAIRES .....	14

5. ENZYMES .....	22
6. GLYCOGENE ET GLYCOCALIX-SYNTETASE.....	27
7. NUCLEOTIDES.....	31
8. SEROTONINE INTRAPLAQUETTAIRE.....	32
9. GLUCIDES .....	35
10. COMPOSANTS MINERAUX.....	37

C H A P I T R E 3 : LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE..... 38

1. ULTRASTRUCTURE.....	39
2. STRUCTURE CHIMIQUE ET ROLE SPECIFIQUE.....	39
3. CHARGE NEGATIVE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE.....	43

EXPOSE DES TRAVAUX ORIGINAUX

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDES ANALYTIQUES DE LA PARTIE GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES

C H A P I T R E 1 : ETUDE DES PLAQUETTES NORMALES..... 50

1. INTRODUCTION.....	50
2. COMPOSITION GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES NORMALES.....	52
a) Glucides des plaquettes entières.....	52
b) Glucides des fractions subcellulaires.....	52
3. ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES.....	56
a) Isolement des glycopeptides issus de la dégradation pronasique des plaquettes normales.....	58
b) Caractérisation des glycopeptides par leur teneur en glucides.....	58

C H A P I T R E 2 : ETUDE DES PLAQUETTES PATHOLOGIQUES..64

1. CARACTERISATION DES PLAQUETTES PATHOLOGIQUES PAR LA VARIATION DE LEUR TENEUR EN GLUCIDE.....	64
2. LES DIFFERENTS DEGRES DE DIMINUTION DE LA TENEUR EN ACIDE SIALIQUE.....	67
3. TAUX AUGMENTE DE L-FUCOSE.....	70
4. ANOMALIES DANS LA REPARTITION DU TAUX D'ACIDE SIALIQUE ENTRE LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE LA PLAQUETTE.....	73

D E U X I E M E P A R T I E

ETUDES ENSYMATIQUES.....75

C H A P I T R E 1 : BIOSYNTHÈSE DES GLYCOPROTEINES.....76

1. INTRODUCTION.....	76
2. MECANISME ET LOCALISATION.....	76
a) L'appareil de Golgi.....	78
b) Nucléotide-sucres.....	79
a) Forme active de l'acide sialique : CMP-NANA.	80
b) Biosynthèse de CMP-NANA.....	81
c) Synthèse de CMP-NANA.....	81
c) Glycosyltransférases : Sialyltransférases.....	82

C H A P I T R E 2 : DOSAGE DES SIALYLTRANSFERASES ET LEUR UTILISATION DANS L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LES PLAQUETTES.....84

1. NATURE ET LOCALISATION DES SIALYLTRANSFERASES DU FOIE DE RAT.....	84
2. NATURE ET LOCALISATION DE SIALYLTRANSFERASES DES FRACTIONS DU SANG : DU SERUM, DU PLASMA RICHE EN PLAQUETTES, DES PLAQUETTES.....	85

3. ROLE DES ANOMALIES DE L'ACTIVITE DE SIALYLTRANSFERASES DANS L'HEMOSTASE PATHOLOGIQUE.....	87
a) Correlations entre les sialyltransférases du sérum et les anomalies de la structure du fibrinogène.....	87
b) Effet des neuraminidases.....	90
c) Corrélation entre les sialyltransférases, les anomalies de la structure des glycoprotéines plaquettaires et leurs fonctions.....	90

**C H A P I T R E 3 : ENRICHISSEMENT DES PLAQUETTES EN  
ACIDE SIALIQUE**.....93

1. INTRODUCTION.....	93
2. INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE.....	94
3. POUVOIR RECEPTEUR DES PLAQUETTES LAVEES ET DES PLA- QUETTES EN MILIEU PLASMATIQUE.....	95
4. L'EFFET DE NEURAMINIDASE SUR L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LES PLAQUETTES.....	98
5. REPARTITION DE L'ACIDE SIALIQUE RADIOACTIF INCORPORE ENTRE GLYCOPROTEINES ET GLYCOLIPIDES PLAQUETTAIRES.....	99

**C H A P I T R E 4 : NATURE DE LA LIAISON ENTRE LES  
PLAQUETTES ET L'ACIDE SIALIQUE  
RADIOACTIF INCORPORE**.....101

1. INTRODUCTION.....	101
2. DETERMINATION DE LA LIAISON ENTRE PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE INCORPORE PAR METHODE CHIMIQUE.....	102
Hydrolyse acide.....	102
3. DETERMINATION DE LA NATURE ENTRE PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE PAR DES METHODES ENZYMATIQUES.....	107
a) Cinétique de la libération de l'acide sialique incorporé par dégradation avec de la neuramini- dase.....	107
b) Identification des sialoglycopeptides marqués au ( <sup>14</sup> C) par hydrolyse enzymatique avec de la pronase.....	109

## T R O I S I E M E   P A R T I E

<u>    ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE.....</u>	111
<u>    I N T R O D U C T I O N.....</u>	112
<u>    C H A P I T R E 1 : ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE EN TANT         QUE PORTEUR DE CHARGE ELECTRIQUE...113</u>	
1. ACIDE SIALIQUE ET CHARGE ELECTRIQUE DE LA SURFACE PLAQUETTAIRE.....113	
2. RAPPORT ENTRE LE TAUX D'ACIDE SIALIQUE ET LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES.....114	
a) Diminution.....114	
- par dégradation par la neuraminidase	
b) Augmentation par incorporation de l'acide sialique.....114	
3. MODIFICATION DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES PLAQUETTES.....118	
- par fixation de sérotonine	
<u>    C H A P I T R E 2 : ETUDE DE L'EFFET DE L'ACIDE SIALI-         QUE INCORPORE SUR LES FONCTIONS             PLAQUETTAIRES PAR DES TESTS BIO-             PHYSIQUES.....122</u>	
1. INTRODUCTION.....122	
2. MODIFICATION DE L'AGREGATION DES PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE.....123	
a) Agrégation induite par l'ADP.....123	
b) Agrégation induite par la sérotonine.....123	
3. EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR L'ECHANGE DU POTASSIUM EN PRESENCE DE LA SEROTONINE.....126	
4. L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR LA FIXATION DE LA SEROTONINE PAR LES PLAQUETTES.....128	
<u>    C O N C L U S I O N.....131</u>	

QUATRIEME PARTIE

ANNEXE TECHNIQUE..........136

METHODES DE PREPARATION DES MATIERES UTILISEES AU COURS DES ETUDES ANALYTIQUES..........137

1. PREPARATION DE LA SUSPENSION DES PLAQUETTES LAVEES INTACTES.....	137
a) Par centrifugation.....	137
b) Par gelfiltration.....	137
c) Numération des plaquettes par méthode microscopique.....	138
d) Numération des plaquettes par comptage électronique.....	138
2. PREPARATION DE L'HOMOGENAT DE PLAQUETTES BROYES.....	140
3. SEPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DES PLAQUETTES.	140
4. LIBERATION DES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES.....	141
5. EXTRACTION DES LIPIDES.....	141
6. EXTRACTION DE LA SEROTONINE.....	142
7. DOSAGE DES PROTEINES.....	144

DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES..........145

1. LIBERATION DES GLUCIDES LIES AUX PROTEINES PAR HYDROLYSES ACIDES.....	145
2. PURIFICATION DES HYDROLYSATS.....	146
- des plaquettes	
- des glycoprotéines solubles	
3. DOSAGES COLORIMetriQUES DIRECTS DES GLUCIDES LIBERES...147	
- d'hexoses neutres.....	148
- d'hexosamine.....	148
- de l'acide sialique.....	149
- identification qualitative des glucides sur les chromatogrammes.....	149
- Dosage des glucides par élution des chromophores..150	

4. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES GLUCIDES.....	151
5. DOSAGE DE L-FUCOSE.....	153
6. CHROMATOGRAPHIE DES GLUCIDES SUR COUCHES MINCES.....	154
 <u>DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES ET SEPARATION DES GLYCOPROTEINES.....</u>	 157
1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES BROYES PAR LA PRONASE.....	157
2. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE SEPHADEX DES FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUES.....	158
3. SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES PAR ELECTROPHORESE ET OBTENTION DES GLYCOPEPTIDES PAR ELUTION.....	158
 <u>DOSAGE DE SIALYLTRANSFERASE ET LEUR UTILISATION DANS L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE PAR LES PLAQUETTES..</u>	 159
1. PREPARATION D'HOMOGENAT DE FOIE DE RAT.....	159
2. FRACTIONNEMENT DE L'HOMOGENAT.....	160
a) par centrifugations differentielles.....	160
b) par centrifugations en gradient de concentration de saccharose.....	162
3. PREPARATION DES FRACTIONS RICHES EN SIALYLTRANSFERASE A PARTIR DU SANG HUMAIN.....	163
a) Préparation du sérum.....	163
b) Préparation de plasma riche en plaquettes.....	163
c) Isolement des plaquettes.....	163
4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES ISSUES DES SOURCES DIFFERENTES.....	164
a) Incubation.....	164
b) Electrophorèse.....	164
5. INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE DES SIALYLTRANS- FERASES DE SOURCES DIFFERENTES.....	166

6. EFFET DE LA NEURAMINIDASE SUR L'ACTIVITE DES SIALYLTRANS-	
FERASES DU SERUM.....	166
7. INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE ( <sup>14</sup> C) PAR LES	
PLAQUETTES.....	167
a) Incubation.....	167
b) Electrophorèse.....	167
8. L'EFFET DE LA NEURAMINIDASE SUR L'INCORPORATION DE NANA	
PAR LES PLAQUETTES.....	168
a) en fonction du taux de neuraminidase.....	168
b) en fonction du temps d'incubation.....	168
9. REPARTITION DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE ENTRE	
LES PROTEINES ET LES LIPIDES PLAQUETTAIRES.....	169
 <u>NATURE DE LA LIAISON ENTRE PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE</u>	
<u>INCORPORE</u> .....	170
1. HYDROLYSE ACIDE.....	170
2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....	170
 <u>TESTS BIOPHYSIQUES UTILISES DANS L'ETUDE DE L'EFFET DE</u>	
<u>L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR LES FONCTIONS PLAQUET-</u>	
<u>TAIRES</u> .....	172
1. MODIFICATION DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES PLAQUETTES.....	172
a) Dégradation par la neuraminidase.....	172
b) Mesures de la mobilité électrophorétique.....	173
2. AGREGATION PLAQUETTAIRE IN VITRO.....	175
3. MESURE DE L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR	
L'ECHANGE DE POTASSIUM EN PRESENCE DE LA SEROTONINE.....	175
4. FIXATION DE LA SEROTONINE PAR LES PLAQUETTES.....	179
 <u>B I B L I O G R A P H I E</u> .....	
	182

## INTRODUCTION

Cette thèse a pour objet l'étude de la structure de fractions glucidiques des plaquettes et de leur rôle dans l'hémostase. Nos travaux portent en particulier sur l'importance de l'acide sialique.

Le point de départ de nos recherches a été l'hypothèse que certaines manifestations pathologiques des plaquettes pouvaient avoir leur cause dans des anomalies de la constitution des chaînes glucidiques des glycoprotéines des membranes plaquettaires.

Cette hypothèse nous a conduit à provoquer des changements dans la composition de la partie glucidique et à caractériser le comportement des membranes ainsi modifiées.

o o  
o

IDEES DIRECTRICES DES TRAVAUX

Les plaquettes sanguines jouent un rôle important dans l'hémostase primaire, et il est couramment admis que les phénomènes de thromboses reposent essentiellement sur leur faculté d'adhésion et agrégation.

Les activités plaquettaires ont leur point de départ dans les réactions de la membrane. Celle-ci est riche en glucides. Les composants glucidiques sont : le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose, le L-fucose des hexosamines et des acides sialiques.

Ayant constaté que des cas pathologiques (p.e. thrombasthénie (110,111,112) sont caractérisés par un écart avec la teneur normale en acide sialique, nous nous sommes proposés de provoquer expérimentalement la modification de la teneur en acide sialique des chaînes glucidiques plaquettaires. La méthode employée consiste à enrichir des plaquettes en acide sialique et à appliquer *in vitro* des tests biophysiques pour étudier les fonctions plaquettaires. Notre but est de reconnaître si l'on peut mettre en évidence un parallélisme entre des anomalies de fonction des plaquettes et des modifications de la composition de leurs chaînes glucidiques.

Le plan de ces travaux et les méthodes employées peuvent être résumés de la façon suivante :

o o  
o

LE PLAN DES TRAVAUX ET LES METHODES UTILISEES DANS L'ETUDE  
DU ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE DANS LES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

Etude analytique :

- Détermination par des méthodes chimiques et biochimiques de la composition glucidique des plaquettes normales et pathologiques.

Etude enzymatique :

- Dosage des sialyltransférases et leur utilisation dans l'incorporation de l'acide sialique par les plaquettes.
- Enrichissement des plaquettes en acide sialique.
- Détermination par des méthodes chimiques et enzymatiques de la nature de la liaison entre plaquette et l'acide sialique incorporé.

Rôle de l'acide sialique :

- Etude par des tests biophysiques de l'effet de l'acide sialique incorporé sur les fonctions plaquettaires.

Avant d'exposer nos travaux sur les plaquettes sanguines, nous résumons les connaissances nécessaires pour la compréhension de ces études.

o o  
o

RAPPEL DES CONNAISSANCES SUR LES PLAQUETTES SANGUINES

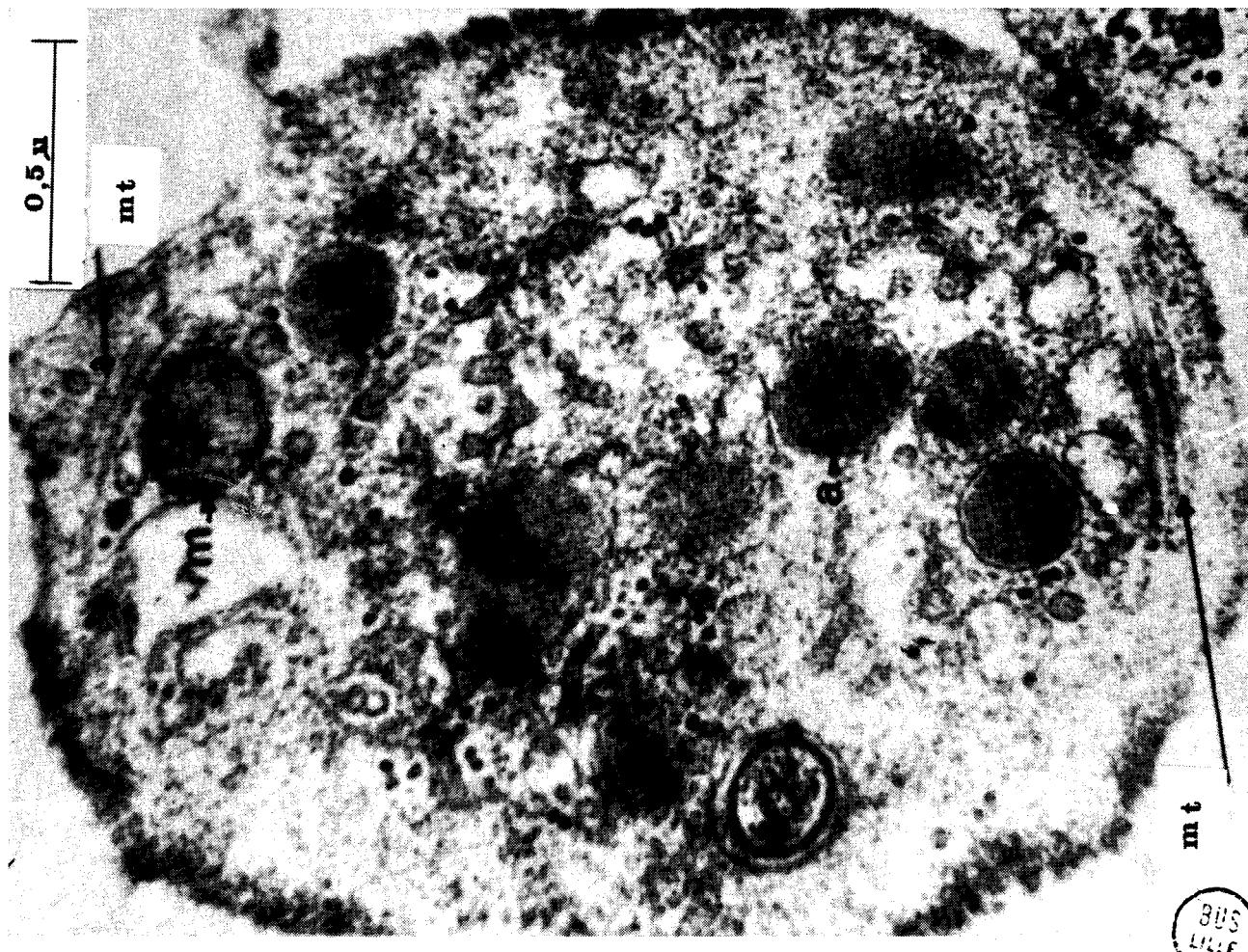
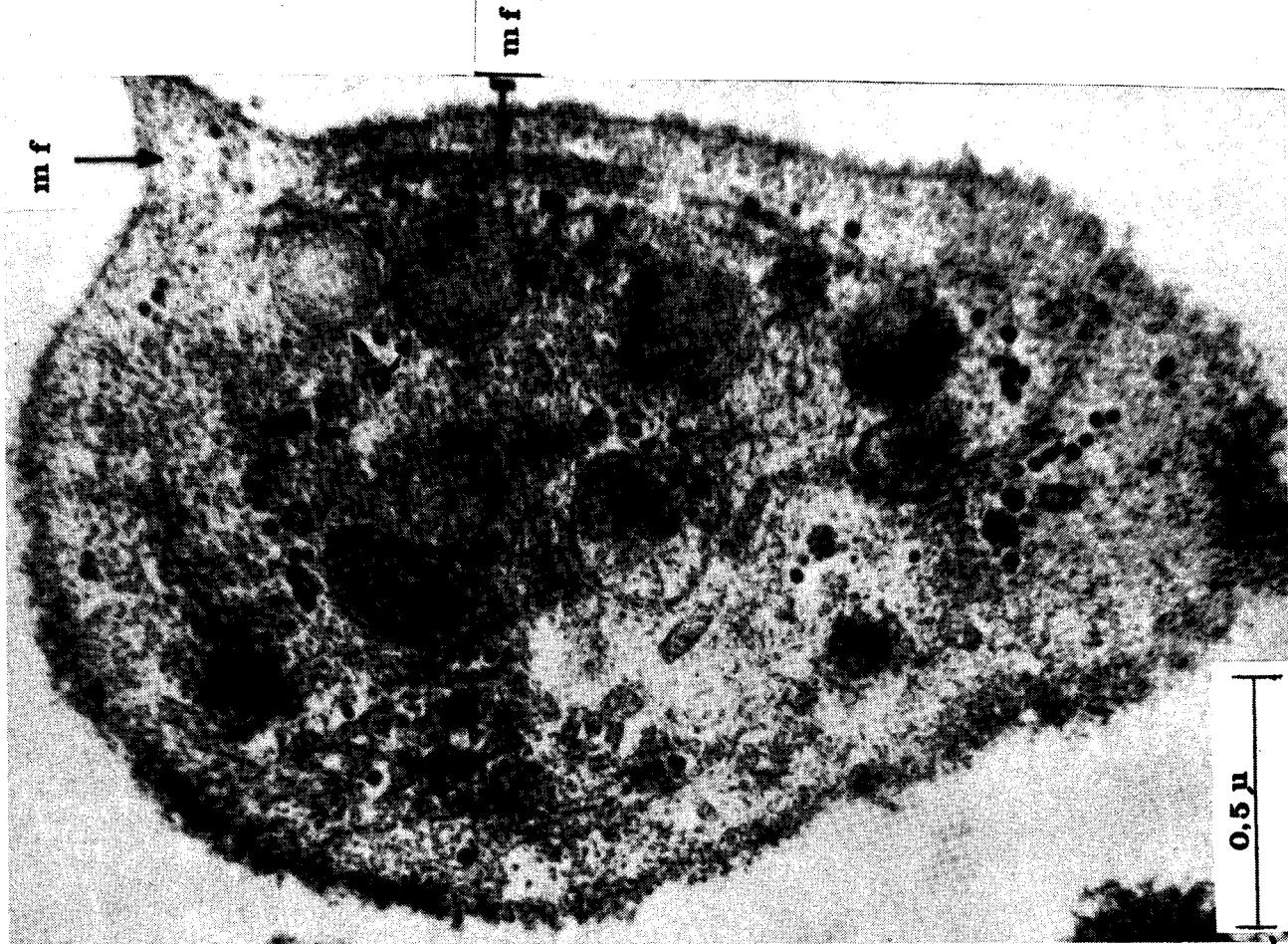


Figure 1

PLAQUETTES NORMALES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE :  
d'après SIXMA et MOLENAAR (155a)

a = granules  
g = granules de glycogène  
mt = microtubules  
mf = microfibrilles  
v = vacuoles  
m = mitochondries

## C H A P I T R E    1

### APERÇU   GENERAL

#### 1. RAPPEL HISTORIQUE

Parmi les éléments figurés du sang, les plaquettes ont été les derniers à être découverts à cause de leur taille très petite.

Les premières observations concernant les plaquettes ont été faites en 1842 par Alfred DONNE (51) ; et la participation de cet élément au phénomène de l'hémostase a été décrite en 1882 par George HAYEM (65).

Cependant l'étude de l'ultrastructure des plaquettes n'a été possible qu'avec l'apparition du microscope électronique.

La conjonction des moyens représentés par la microscopie électronique, par la microélectrophorèse des cellules, par la néphéломétrie d'agrégation, etc..., a permis d'étudier *in vitro*, sur les plaquettes isolées, leurs fonctions ainsi que les changements de leur structure au cours des manifestations de leur activité (3,4,14,20,41,71,126,180).

Les résultats des analyses chimiques et biochimiques ont complété ces informations mais malgré la masse des travaux réalisés, il reste encore beaucoup à faire pour expliquer complètement le mécanisme des fonctions biologiques des plaquettes.

## 2. ULTRASTRUCTURE ET ORIGINE DES PLAQUETTES

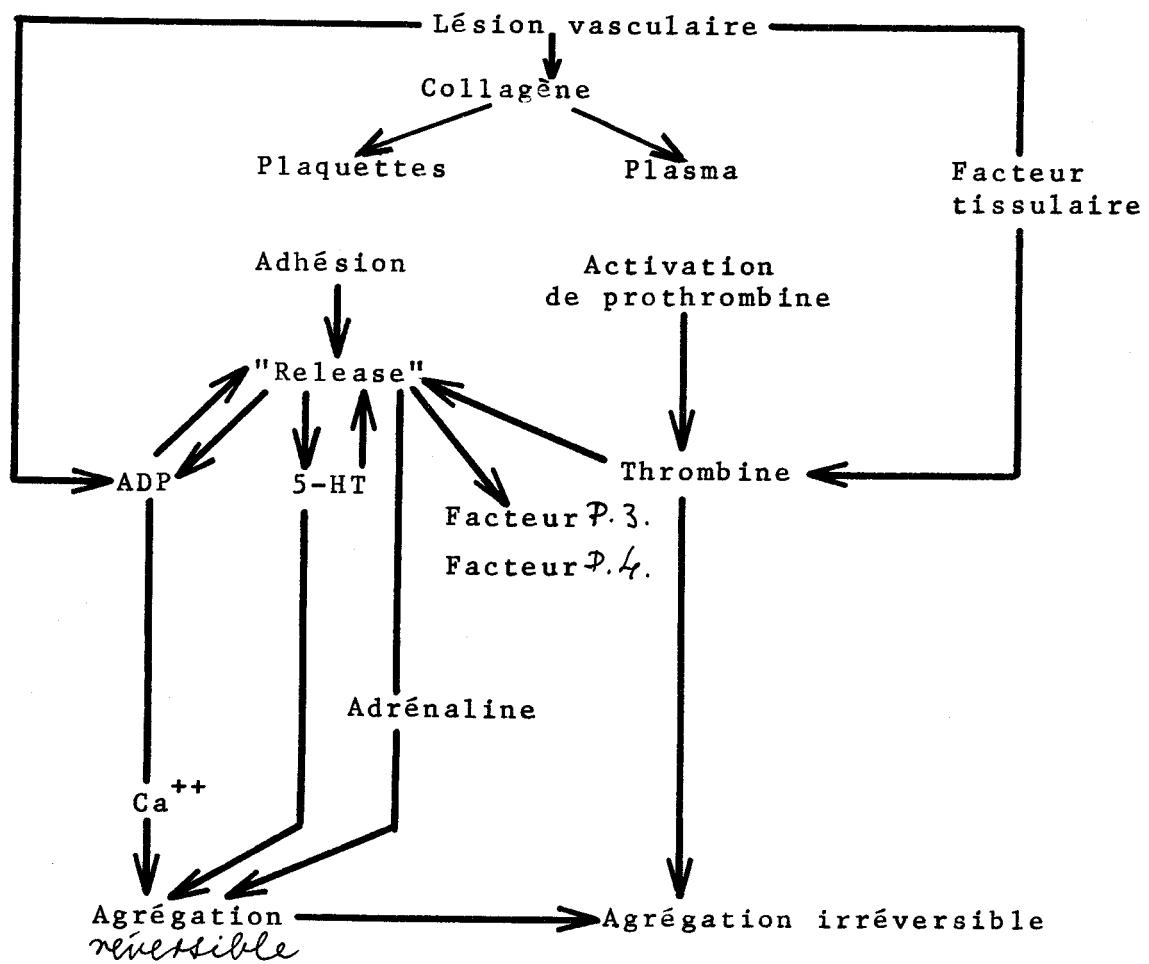
Dans le sang, les plaquettes sont présentes comme des structures individuelles d'une forme irrégulière et d'un diamètre de 1,5 à 4 Å, avec une surface lisse en général. Ce sont des cellules anucléées dont le cytoplasme est séparé du plasma par un système de membranes. Le cytoplasme renferme plusieurs éléments limités chacun par une membrane (Figure 1).

A l'intérieur de la membrane on distingue (14,71) des granules de tailles et de formes différentes (granules phospholipidiques et lysosomes), des mitochondries ayant le rôle respiratoire, des vacuoles, des microtubules formés par groupement de microfibrilles, des microfibrilles flottantes, des granules de glycogène, et de 5-HT\*. Dans certains cas, plus rares, on peut observer un système dense de membranes internes formées d'un empilement de tubules aplatis. Cette structure est identique à celle de l'appareil de Golgi. Des observations ultérieures suggèrent que ces systèmes denses sont des débris d'appareils de Golgi provenant des mégacaryocytes (130). Ceci tient à l'origine des plaquettes. Ces dernières sont produites uniquement par fragmentation cytoplasmique des cellules géantes de la moelle des os, appelées mégacaryocytes. Les plaquettes arrivent dans le sang et elles restent intravasculaires pendant toute la durée de leur vie (132). Chez l'homme leur durée de vie est d'environ 8-10 jours. Pendant ce temps elles peuvent apporter une contribution métabolique au système vasculaire.

---

\* 5-hydroxytryptamine

Figure 2  
SCHEMA DE L'HEMOSTASE PRIMAIRE



BUS  
LILLE

### 3. ROLE DES PLAQUETTES SANGUINES DANS L'HEMOSTASE

#### a) Physiologie de l'hémostase

Le rôle principal des plaquettes s'accomplit dans l'hémostase, ou arrêt de l'épanchement sanguin d'un vaisseau lésé. (Figure 2).

L'hémostase est un phénomène complexe dans le déroulement duquel on distingue deux phases : l'hémostase spontanée ou primaire, et l'hémostase finale ou secondaire. L'hémostase primaire correspond à la formation du clou plaquettaire et l'hémostase finale, à la formation du clou hémostatique (12,72).

Décrit d'une façon simpliste, le déroulement du phénomène se présente de la façon suivante :

#### Hémostase primaire

- α) Adhésion des plaquettes aux fibres de collagène mises à nu par la lésion du vaisseau sanguin, ou de la membrane basale ou même des microfibrilles.
- β) "Release" ; libération de l'ADP intraplaquettaire (entre autres)
- γ) Agrégation des plaquettes les unes aux autres : c'est le premier mur qui est perméable et peu résistant : c'est le clou plaquettaire.
- δ) Agrégation irréversible des plaquettes : c'est une modification irréversible. Les lacunes entre les agrégats (entre les pierres du mur) se comblient.

#### Hémostase finale

Formation de fibrine. C'est l'injection et le revêtement de ciment de l'édifice. On aboutit au clou hémostatique.

L'hémostase prise dans son ensemble met en jeu une succession de réactions, en plusieurs séquences, avec par moments des interactions entre élément d'une séquence et élément d'une autre séquence.

Nous donnons ci-après un schéma de cet ensemble de réactions et interactions et l'accompagnons de commentaires.

b) Hémostase primaire

a) Adhésion des plaquettes aux fibres de collagène

Dans les vaisseaux intacts le sang est fluide et les facteurs de coagulation sont inactifs, probablement grâce à un mécanisme régulateur complexe. Les plaquettes n'ont normalement aucune tendance à adhérer à l'endothélium non lésé de la paroi des vaisseaux, ni à d'autres cellules du sang, ni entre elles-mêmes. Lorsqu'un vaisseau est lésé, les plaquettes adhèrent au collagène ou à la membrane basale mis à nu sur la paroi endommagée et s'y rassemblent avec rapidité pour effectuer la première phase de l'obturation de la lésion (72). L'adhésion des plaquettes aux fibrilles de sous endothéliales déclenche une sorte de réaction en chaîne ; les membranes des plaquettes subissent une transformation morphologique et chimique qui leur permet d'adhérer entre elles.

Le contact entre la surface des plaquettes et le collagène provoque la libération de l'ADP intraplaquettaire ; phénomène dit "release" (58). En plus de l'ADP se trouvent libérés d'autres composants intraplaquettaires (68).

b) "Release"

D'après HOLMSEN et Coll. (1971) (69), le mécanisme de "release" plaquettaire peut être présenté de la façon suivante :

1. Induction
2. Transmission intracellulaire
3. Expulsion.

1. La réaction de "release" est induite par le contact entre la membrane plaquettaire et les fibrilles sous endothéliales.
2. L'énergie d'ATP disponible sous l'effet de cette induction. Cette énergie sera utilisée pour libérer certaines substances.
3. L'expulsion : les substances libérées à partir des granules seront expulsées à travers la membrane.

γ) Agrégation réversible des plaquettes

Le mécanisme de l'agrégation des plaquettes n'a pas été complètement élucidé à ce jour. On peut cependant admettre comme bien établi que le rôle de l'ADP est prépondérant mais qu'interviennent aussi la thrombine et l'adrénaline (21, 44, 58, 63, 68, 133, 148).

Les molécules d'ADP libérées au moment du "release" induisent l'agrégation plaquettaire.

D'après BORN (1970) l'action de l'ADP sur l'agrégation se passe en trois étapes :

1<sup>ère</sup> étape : Modification morphologique par gonflement rapide ; les plaquettes deviennent plus sphériques.

2<sup>ème</sup> étape : Adhésion des plaquettes gonflées, entre elles-mêmes, sous forme d'agrégats lâches. Cette étape nécessite déjà l'intervention du fibrinogène et du calcium.

3<sup>ème</sup> étape : Accélération de l'agrégation. La concentration de l'ADP dans le plasma environnant augmente par la libération de molécules d'ADP intraplaquettaires et aussi par l'intervention de molécules d'ADP provenant des érythrocytes. Par suite de cette augmentation du taux d'ADP, l'adhésion plaquette-plaquette s'accélère, et dans les agrégats les plaquettes se resserrent plus étroitement.(21).

Les agrégats subissent l'effet de la thrombine dans la dernière phase de l'hémostase primaire, puisque pendant l'agrégation plaquettaires réversible, les autres éléments libérés par le phénomène de "release" agissent avec des éléments de coagulation du plasma : c'est-à-dire que la prothrombinase active la prothrombine en thrombine qui, à son tour, agit sur différents substrats au niveau des plaquettes (facteur XIII, fibrinogène, fibrine).(31)

### δ) Agrégation irréversible

Nous pensons devoir revenir encore sur le phénomène de "release", car l'agrégation irréversible correspond à la phase finale de ce phénomène ; divers granules et substances contenus initialement dans le cytoplasme, à l'intérieur de la membrane, s'en trouvant expulsés ce qui, en fait, conduit à la mort de la cellule. Se manifestant dès l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène, le phénomène de "release" se développe et s'achève sous l'effet de la thrombine, renforcé par l'adrénaline. Il a été démontré que les taux des éléments libérés pendant la "release" au niveau de l'agrégation réversible et au niveau de l'agrégation irréversible sont différents :

Taux des éléments libérés  
par induction du contact  
avec le collagène :

50 % ADP et ATP  
50 % 5-HT, adrénaline  
fibrinogène  
 $\beta$ -glucuronidase



AGREGATION REVERSIBLE

Taux des éléments libérés  
par induction de la  
thrombine :

100 % ADP et ATP  
100 % 5-HT  
Fibrinogène, albumine,  
enzymes lysosomales,  
mucopolysaccharides,  
 $PO_4$  potassium, sodium et  
calcium.



AGREGATION IRREVERSIBLE

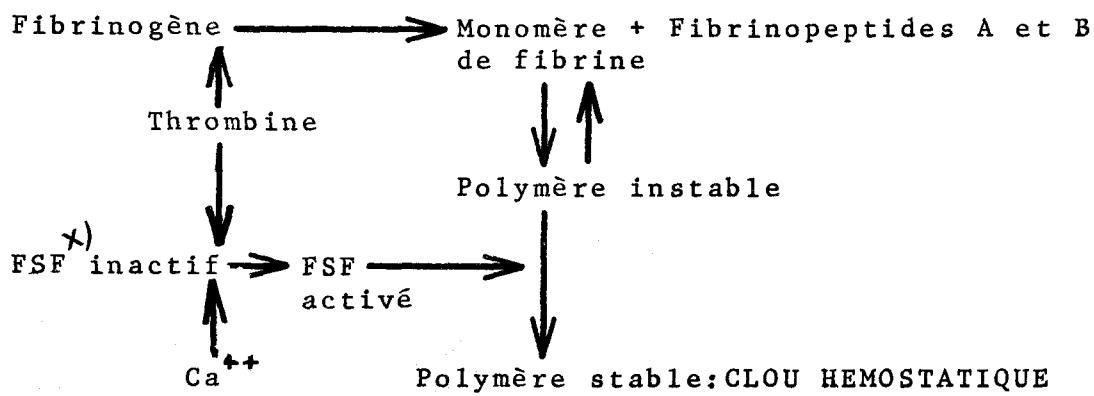
Les modifications morphologiques et les modifications biochimiques se développent de façon concomitante pour aboutir à cette métamorphose visqueuse qui correspond à un état encore fragile du caillot (44,69).

### c) Hémostase finale

L'hémostase finale correspond à la rétraction du caillot et à son renforcement par un réseau de fibrine. Cette rétraction

est en relation avec le métabolisme de l'ATP intraplaquettaire par intervention de la protéine contractile qu'est la thrombasthénine ayant une activité d'ATP-ase (36,127).

Après rétraction du caillot ou peut-être, de façon concordante à cette rétraction, se produit le renforcement du caillot par le réseau de fibrine : le fibrinogène qui imprègne le caillot est transformé en fibrine par hydrolyse protéolytique sous l'effet de la thrombine puis il y a polymérisation de la fibrine sous l'action du calcium et du facteur XIII (91,157).



o o  
o

+ ) FSF = facteur XIII

## C H A P I T R E 2

### COMPOSANTS CHIMIQUES DES PLAQUETTES

#### 1. INTRODUCTION

Les plaquettes, conformément à leurs rôles définis, comportent des éléments cellulaires qui se prêtent à fonctionner les uns après les autres en formant une chaîne continue de réactions partielles. La structure chimique de chacun de ces éléments actifs est ordonnée en fonction du rôle qu'il accomplit.

De ce fait les analyses biochimiques sont d'une importance primordiale dans la recherche d'une explication concernant le mécanisme complexe des fonctions plaquettaires.

Dans ce chapitre nous résumons les connaissances actuelles sur les composants chimiques des plaquettes : les protéines, les lipides (y compris les enzymes et les facteurs plaquettaires de coagulation), les glucides, etc.. Pour chacune de ces familles nous donnerons les composants identifiés dans la plaquette prise globalement. Les composants identifiés dans la membrane de la plaquette seront exposés dans le chapitre suivant, où nous reprendrons à part les données concernant les membranes pour éclaircir les différents aspects de leur rôle.

Pour caractériser la composition chimique des plaquettes dans son ensemble citons d'abord quelques paramètres (100) :

- Les plaquettes contiennent 87 % d'eau
- $10^9$  plaquettes ont un poids sec de 2,8 mg
- Sur leur poids sec les plaquettes contiennent :
  - 57 % de protéines
  - 8 % de glucides
  - 17 % de lipides
  - 0,5 % de glycogène

- de la sérotonine, de l'adrénaline, des nucléotides adényliques du potassium, du sodium, du calcium, du magnésium, etc...

## 2. LES PROTEINES PLAQUETTAIRES

Les protéines plaquettaires dont le rôle peut être structural ou fonctionnel sont soit des protéines sans glucides et des glycoprotéines, soit des lipoprotéines et des glycolipoprotéines.

Les protéines structurales sont résumées dans le tableau ci-dessous (43,45) : Tableau I.

Composants	Teneurs		Références
	%/poids sec	%/protéines totales	
Protéines	57	100	Maupin (1961)
Thrombasthénine	8,5	15	Bettex-Galland et Lüscher (1965)
Fibrinogène	3,9	5	Lüscher (1959)
"		10	Sokal et Heremans (1966)
"		16,4	Bezkorovainy et Rafelson (1964)
Albumines	1	2,2	"
Glycoprotéines	1	1,4	"
Autres composants thrombasthénine inclue			
- albuminoides	25	44	"
- euglobulines	7	13	"
- insolubles	13	23	"

Les protéines identifiées selon leurs fonctions sont des facteurs plaquettaires de la coagulation et les enzymes plaquettaires. Nous les présenterons dans les paragraphes suivants.

### 3. LIPIDES DES PLAQUETTES

Dans les plaquettes on peut observer au microscope électronique des inclusions de lipides libres, dont le taux est en relation avec la concentration en lipides du sang. D'après HOVIG (1968) (71) le type le plus fréquent de ces inclusions dans les plaquettes sont des petites vacuoles presque vides dans leur partie centrale et dont la zone périphérique contient un matériau dense et homogène constitué de lipides.

Tous les éléments plaquettaires contiennent des lipides comme constituants de leurs structures.

D'après COHEN (1970) (38) le métabolisme des lipides dans les plaquettes est un processus autonome en contraste avec celui des lipides des érythrocytes et les leucocytes du sang.

Selon les résultats de MARCUS et Coll. (1969) (100,101), les lipides représentent 15-17 % sur le poids sec des plaquettes, et environ 80 % des lipides plaquettaires sont des phosphatides.

Le sujet de cette thèse étant centré sur l'importance de l'acide sialique de la membrane plaquettaire, nous reprenons l'exposé sur la nature et le rôle des glyco-lipides dans le chapitre consacré aux membranes.

### 4. FACTEURS PLAQUETTAIRES

Une partie des protéines des plaquettes se trouve sous forme de "facteurs plaquettaires" lesquels, en état d'activité, contribuent à la coagulation du sang avec d'autres facteurs.

plasmatiques (43,38). Avant de parler de facteurs plaquettaires nous donnons d'abord la liste des facteurs de coagulation dans le tableau ci-dessous :

Facteur I	Fibrinogène
Facteur II	Prothrombine
Facteur III	Thromboplastine
Facteur IV	Calcium
Facteur V	Proaccélérine (accélérine)
Facteur VII	Proconvertine
Facteur VIII	Facteur antihémophilique A
Facteur IX	Facteur Christmas
Facteur X	Facteur antihémophilique B
Facteur XI	Facteur Stuart-Prower
Facteur XII	Plasma thromboplastine antécédent (PTA)
Facteur XIII	Hageman Facteur (HF)
	Facteur Fibrin-stabilisant (FSF)

Les facteurs plaquettaires se divisent en deux groupes selon leur localisation (49 ,13).

1. Ceux qui sont adsorbés dans l'atmosphère périplaquettaire : Fibrinogène, Facteurs V, VII, VIII, IX, XI, XII, XIII
2. Ceux qui se trouvent à l'intérieur de la cellule : Facteurs 2, 3, 4 et ensuite fibrinogène et FSF intraplaquettaire.

Nous n'insisterons que sur quelques-uns parmi ces facteurs, ceux que nous trouvons les plus intéressants pour notre sujet parce que leur partie glucidique a été étudiée.

a) Facteur plaquettaire I : Fibrinogène

Le fibrinogène plaquettaire fait partie intégrante de la cellule. Il se trouve en partie localisé à la surface des plaquettes, dans l'atmosphère périplaquettaire et en partie à l'intérieur de la cellule comme constituant de sa structure (57).

Il a été démontré par CASTALDI et CAEN (1965) (34) qu'on peut éliminer par lavage les molécules de fibrinogène adsorbées à la surface plaquettaire, mais qu'après destruction des plaquettes lavées on trouve encore un certain taux de fibrinogène intraplaquettaire. De plus les mêmes auteurs ont mis en évidence, en utilisant un fibrinogène radioactif, qu'il n'existe pas d'échange entre les molécules de fibrinogène intraplaquettaires et celles de la surface ou du plasma environnant. Ceci fait penser que les plaquettes synthétisent leur fibrinogène.

La teneur totale en fibrinogène des plaquettes humaines a été estimée à 13,5 % par BEZKOROVAINY et RAFELSON (1964) (57) et celle des plaquettes bovines à 14 % par SOLUM et LOPACIUK (1969) (158,159).

La question de savoir s'il y a une différence entre la nature du fibrinogène plasmatique et celle du fibrinogène plaquettaire a été le sujet de nombreuses études.

Il est couramment admis (McKEE et Coll. 1966) (98), BLOMBERG et Coll. (1968) (18,19) que la molécule de fibrinogène du plasma est composée de trois chaînes :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  avec des poids moléculaires respectifs de 64,000 ; 56,000 et 47,000 et qu'ensuite la chaîne  $\alpha$  se divise encore en sous-unités :  $\alpha_1 \alpha_2$ .

Les résultats de GANGULY (1972) (56) ont démontré que le fibrinogène des plaquettes humaines a une structure moléculaire similaire à celle du fibrinogène du plasma en ce qui concerne les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  mais au niveau des sous-unités on constate des différences. Notamment il y a une seule chaîne  $\alpha$ , mais deux chaînes  $\beta$ , et deux chaînes  $\gamma$ .

Selon les mêmes auteurs, le poids moléculaire moyen du fibrinogène plaquettaire est d'environ 270,000 g/mol, tandis que celui du fibrinogène plasmatique est d'environ 330,000 g/mol.

Concernant la structure chimique, les résultats de SOLUM et LOPACIUK (1969) (159) obtenus sur des plaquettes d'origine bovine, ont démontré que les fibrinogènes plaquettaires et plasmiques sont très semblables quant à leur mobilité électrophorétique et leur composition en acides aminés, y compris les acides aminés N-terminaux.

Par contre ils sont différents au point de vue de la coagulation : la polymérisation des monomères de fibrine plaquettaire est plus lente que celle des monomères de fibrine plasmatique. Concernant la partie glucidique, dans le cas des fibrinogènes bovins la teneur en glucides se montre plus élevée dans le fibrinogène plaquettaire que dans le fibrinogène du plasma. (Tableau II).

#### Rôle du fibrinogène dans l'agrégation

L'agrégation *in vitro* des plaquettes lavées induite par l'ADP nécessite des ions de calcium, mais on peut stimuler l'agrégation en ajoutant du fibrinogène. Bien que les plaquettes aient une teneur en fibrinogène qui semble être une partie fonctionnelle de la structure plaquettaire, les plaquettes lavées perdent les molécules de fibrinogène adsorbées sur la surface et, par conséquent, les plaquettes lavées nécessitent une source externe de fibrinogène lequel stimule bien l'agrégation induite par l'ADP. De ce fait le fibrinogène plaquettaire semble participer ensemble avec ADP à une séquence de réactions biochimiques distinctes qui aboutit à l'agrégation des plaquettes.

Tableau II

Teneur en glucides du fibrinogène des plaquettes  
bovines et du fibrinogène du plasma bovin

Glucides	Fibrinogène plaquettaire      plasmique	Auteurs
Acide sialique	0,56	0,53 0,60
Hexoses	1,56	1,01 1,75
Hexosamines	1,37	1,09 1,00

glucides exprimés g/100 g de protéines.

☒ réf. (158)

☒☒ réf. (104-106)



Sous l'effet de la thrombine, le fibrinogène est transformé en monomère de fibrine. L'hydrolyse protéolytique par la thrombine au niveau des liaisons arginine - glycine de la chaîne peptidique libère deux fibrinopeptides à partir de chaque molécule de fibrinogène (6). La charge négative du fibrinogène plaquettaire qui représente 14 % de la teneur en protéines des plaquettes n'est pas négligeable.

De nombreuses études ont eu pour objet de déterminer si des anomalies de la fonction plaquettaire n'auraient pas leur origine dans des variations de la teneur en fibrinogène et dans des anomalies de sa structure (30).

#### Facteur plaquettaire 2 et 4

Les facteurs plaquettaires 2 et 4 sont des protéines intraplaquettaires.

Le facteur plaquettaire 2 est un accélérateur de la transformation du fibrinogène en fibrine.

#### Facteur plaquettaire 4

Le facteur plaquettaire 4 a une activité antihéparine en accélérant la réaction entre le fibrinogène et la thrombine. POPLAWSKY et Coll. (1964) (138) ont démontré que le facteur 4 isolé et purifié à partir des plaquettes des pigeons consiste en une protéine dans laquelle ils ont trouvé les composants glucidiques suivants :

- glucosamine 0,4 %
- L-fucose 0,08 %

#### Facteur plaquettaire 3.

Le facteur 3 appartient à la fraction phospholipidique qui est formée de phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, inositol-phosphatide, lécithine et sphingomyéline. Le rôle du facteur 3 s'implique dans l'activité coagulante des plaquettes (33,78).

Facteur plaquettaire VIII adsorbé sur la surface des plaquettes

Le facteur antihémophilique A ou facteur VIII est une protéine de poids moléculaire très élevé. Au cours du fractionnement du plasma, le facteur VIII suit le fibrinogène pour lequel il présente une affinité remarquable. Les composants glucidiques du facteur VIII bovin d'après SCHMER et Coll. (1972) (154) sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Composants	µg/100 µg protéine	%
Acides aminés	100	80,4
Hexose	13,8	11,1
Hexosamine	2,1	1,7
Acide sialique	8,5	6,8

Les teneurs en glucides de facteur VIII humain, selon les résultats de MARCHESI et Coll. (1972) (99) sont :

- 1-2 % d'hexoses
- 2,8 % d'hexosamine
- 1,0 % d'acide sialique.

Facteur XII, ou facteur Hageman (FH) adsorbé sur les plaquettes

Le facteur Hageman est une sialoglycoprotéine ayant une activité enzymatique estérase (155).

La structure de la partie glucidique des molécules du facteur Hageman est la suivante :

Hexoses totaux 5,9 % ou      - D-galactose : 3,6 %  
    - D-mannose : 1,8 %  
    - L-fucose : 0,5 %

Hexosamine totale 4,8 % ou - D-glucosamine : 3,2 %  
    - D-galactosamine : 1,6 %

Acide sialique 4,4 %

Total : 15,1 %

e) Facteur XIII (FSF)

La présence de FSF dans les plaquettes a été mise en évidence par les travaux de LUSCHER E.F. (1958) (95) puis, très récemment, P.GANGULY (1971) (55) l'a isolé et purifié à partir des plaquettes humaines. Les molécules protéiques de FSF sont en majorité adsorbées sur la surface des plaquettes, mais il en existe un certain taux intraplaquettaire.

Il a été démontré que le poids moléculaire de FSF plaquettaire est supérieur à celui de FSF du plasma (55), (167b). La composition glucidique du facteur XIII plasmatique, d'origine bovin et humain est constituée de D-galactose, D-mannose des hexosamines, de L-fucose et de l'acide sialique (112a).

Le facteur XIII (FSF) existe sous forme de précurseur inactif qui se transforme en enzyme actif sous l'effet de la thrombine. Son activité enzymatique s'accomplit dans la formation des polymères insolubles de la fibrine, catalysée par des ions calcium. (82, 160, 91).

Nouveau facteur plaquettaire : activateur de la phospholipase

J.M.DUCHESNE et Coll. (1972) (51/a) ont mis en évidence l'existence d'un facteur plaquettaire qui peut activer le zymogène de l'enzyme phospholipase du plasma. Ses résultats sont résumés de façon suivante :

- Le plasma renferme une prophospholipase activable par la trypsine brute. Les plaquettes de rat contiennent un activateur qui joue le même rôle que la trypsine brute et transforme le zymogène en phospholipase active.

### Nouvelle protéine plaquettaire coagulable

Environ 5 % du taux des protéines plaquettaires est représenté par une protéine, sensible à l'effet de la thrombine mais qui diffère du fibrinogène, de la thrombosthénine et du FSF, comme le montre la structure de la partie glucidique de cette protéine plaquettaire : (5),

Acide sialique	3,9 %
N-Ac-glucosamine	1,6 %
Poids moléculaire :	190,000 g/mol.

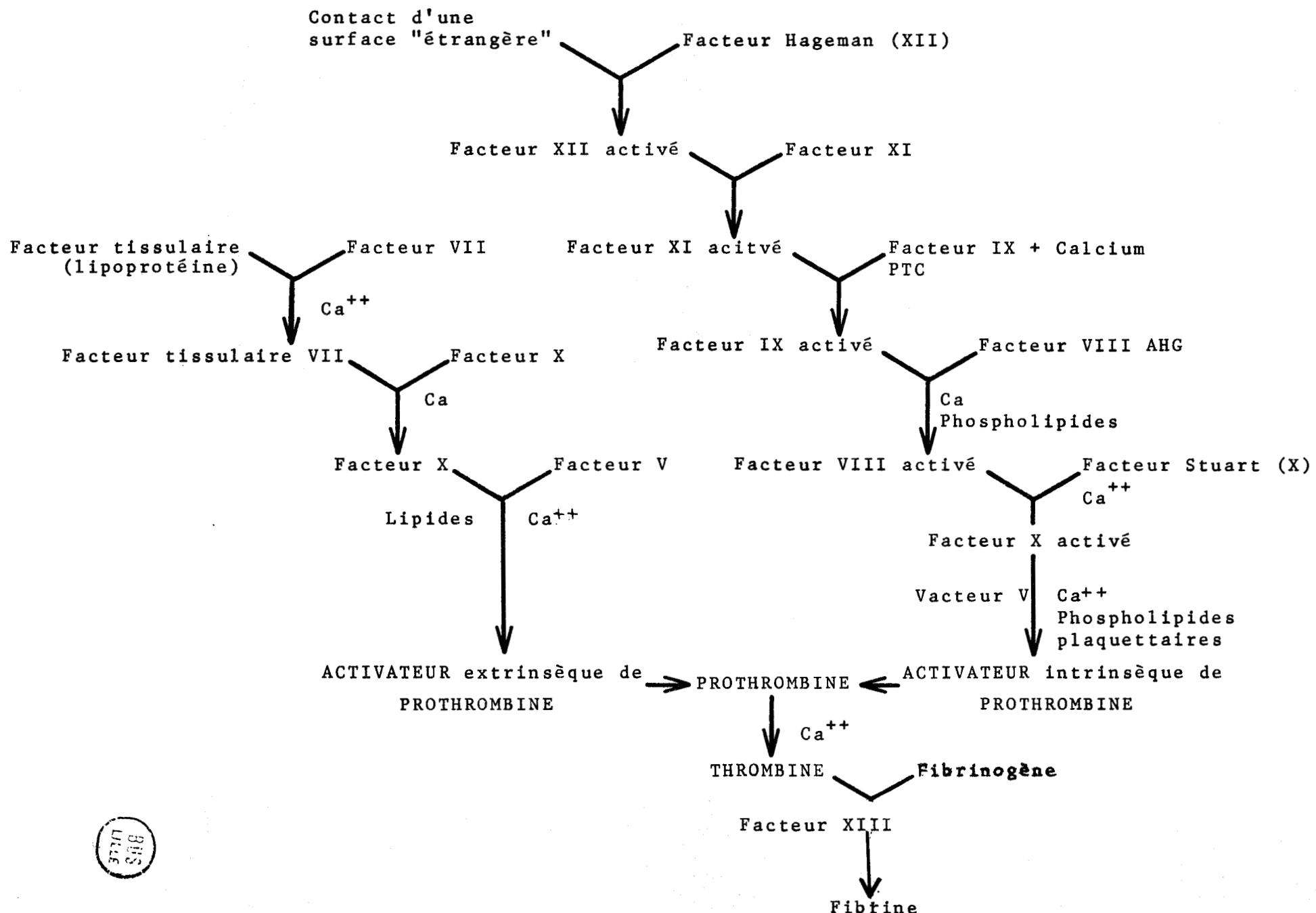
### 5. ENZYMES PLAQUETTAIRES

Les plaquettes contiennent de très nombreux enzymes, ce qui explique leurs fonctions multiples.

Nous présentons ci-dessous les enzymes plaquettaires dont l'activité a été identifiée (1,7,16,27,28,34,87,88,90, 92,128,147,156,171,172,178).

Glycogène-synthétase	Enzymes de cycle Embden-Meyerhof
ATP-ases	Glycosidases
Pyrophosphatase inorganique	Glycosyltransférases
Béta-glucuronidase	Enzymes lysosomales
Catalase	Succinique-déhydrogénase
Cathepsine	Phosphatase-alcalin
Lactate dehydrogénase	Leucine aminopeptidase
Phosphatase-acide	Estérase
Adénosine déaminase	Phosphodiésterase
Adénylate kinase	Activateur de plasminogène
Pyruvate kinase	Antiplasmine
Cytochromoxidase	Elastase

SCHEMA DE L'ACTIVATION DES FACTEURS DE COAGULATION



La détermination de la répartition de l'activité des enzymes entre les fractions cellulaires des plaquettes peut être considérée comme une tentative de localisation des fonctions plaquettaires. Les résultats obtenus dans ce but par MARCUS et Coll. (1969) (101) sont présentés dans le tableau III.

REPARTITION SUBCELLULAIRE DE QUELQUES UNS DES ENZYMES PLAQUETTAIRES

Enzyme	N° d'expériences	Granules	Membranes	Fraction soluble
		%	%	%
Phosphatase acide	6 (6)	51.1 ± 7.2 (60.2)±10.7	16.0 ± 9.5 (17.0)±8.5	31.6 ± 7.3 (22.8)±7.7
Béta-glucuronidase	2	38.6 ± 8.7	7.9 ± 0.5	53.6 ± 8.2
Cathepsine	1 (2)	58.1 (61.7)±10.5	2.5 (1.9)±2.6	39.5 (36.5)±13.2
Catalase	1 (3)	2.6 (6.5)± 1.7	3.2 (5.3)±0.4	94.3 (88.2)± 1.2
Lactate-déhydro-génase	1	2.0	0.2	97.8
MARCUS (1969) (101)				

La nature et le niveau d'activité d'un enzyme qu'on peut localiser et dont on peut observer le déplacement pendant le déroulement des fonctions plaquettaires, peut fournir des informations précieuses pour pouvoir attribuer aux éléments des plaquettes des rôles spécifiques dans les étapes de l'hémostase.

Les enzymes intraplaquettaires libérés pendant l'agrégation sont probablement en relation avec cette étape de la fonction plaquettaire. HOLMSEN et DAY (1971) (69) ont démontré que l'agrégation plaquettaire *in vitro*, induite par la thrombine libère plusieurs composants protéiques qui ont été identifiés comme ayant une activité enzymatique.

### ATP-ases plaquettaires

#### a) Localisation

WHITE et KRIVIT (1965) (178) ont étudié la répartition de l'activité d'ATP-ases dans les plaquettes, et ils l'ont repérée aussi bien dans la membrane plaquettaire que dans les granules et dans les mitochondries intraplaquettaires.

SABA et Coll. (1969) (147) ont démontré que le niveau d'activité d'ATP-ase est similaire dans les plaquettes entières et dans les fractions des membranes isolées. Une partie de l'activité d'ATP-ase plaquettaire est due à la thrombosthénine plaquettaire (127).

b) Thrombosthénine

Plusieurs auteurs ont suggéré une similitude entre l'organisation complexe des plaquettes et celle du système des muscles. En effet, les plaquettes contiennent des fibrilles de 80 à 100 Å, qui ressemblent aux fibrilles des muscles lisses. La capacité de contraction de la membrane plaquettaire est attribuée à une protéine contractile similaire à l'actomyosine des muscles (178). BETTEX-GALAND et LUSCHER (1961) (16), ont isolé une protéine contractile, la thrombosthénine, à partir des plaquettes. Celle-ci correspond aux fibrilles vues au microscope électronique. Ces fibrilles de thrombosthénine sont localisées dans les microtubules (71) qui se trouvent dans la zone équatoriale de la membrane plaquettaire et maintiennent la forme discoïde des plaquettes à l'état de repos. Pendant l'agrégation, les microfibrilles de thrombosthénine se transforment en un système de microfibrilles contractiles. (178,84)

La thrombosthénine représente 15 % de la totalité du taux en protéine des plaquettes et son poids moléculaire est estimé à 542,700 g/mol environ (90,127).

c) ATP-ases dépendant des cations mono et divalents

WHITE et KРИVIT (1967)(178) ont démontré la présence dans les plaquettes d'enzymes ATP-ases  $Mg^{++}$  dépendants, distincts de la thrombosthénine.

La thrombosthénine ne provoque pas la déphosphorylation de la totalité de l'ATP plaquettaire, c'est-à-dire que c'est seulement une partie de l'activité d'ATP-ase qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction de la membrane.

L'autre partie du taux d'ATP-ase présent dans la plaque doit avoir des fonctions similaires aux ATP-ases des autres cellules, à savoir notamment le transfert des cations à travers les membranes biologiques, fonction qui est liée à l'activité ATP-asique  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  et  $K^+$  dépendante (156,76).

### Pyrophosphatase minérale

Localisé dans la membrane plaquettaire, un enzyme pyrophosphatase inorganique a été identifié, par ABDULLA et Mc FARLANE (1972) (1). Une particularité de cet enzyme qui pourrait éclairer un rôle dans le phénomène d'adhésion des plaquettes au collagène est intéressante. En effet cet enzyme hydrolyse les phosphates inorganiques, mais seulement en présence du collagène.

### Plasminogène et antiplasmine

CASTALDI et CAEN (1965)(34) ont déterminé l'activité proactivatrice du plasminogène, et l'activité de l'antiplasmine. Ce sont deux enzymes qui permettent aux plaquettes de participer au phénomène de fibrinolyse qui suit nécessairement le phénomène de l'hémostase.

### Glycosyltransférases

BARBER et Coll. (1971) (7,8) ont mis en évidence la présence de deux enzymes glycosyltransférases :

- Galactosyltransférase
- Glucosyltransférase

Tous les deux sont localisés dans la membrane plaquettaire et ils ont une spécificité pour les molécules du collagène comme accepteurs. Les auteurs suggèrent que ces enzymes glycosyltransférases sont impliquées dans le phénomène d'adhésion entre plaquette et collagène.

Nous avons déterminé le niveau d'activité de deux glycosyltransférases plaquettaires notamment : (166a)

- N-acétylglucosaminyltransférase
- N-acétyl-sialyltransférase

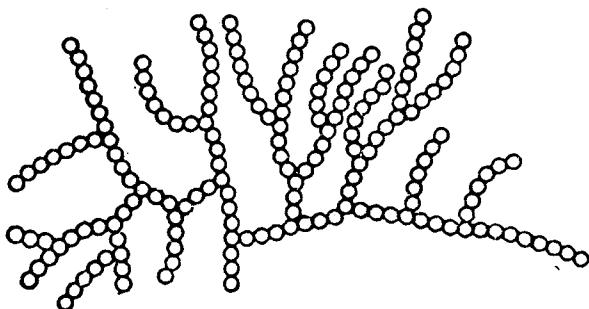
parmi les enzymes adsorbés sur la surface plaquettaire.

### Glycosidases plaquettaires

H.B.BOSMANN (1972) (27,28) a mis en évidence l'activité des enzymes glycosidases présents dans les plaquettes. Ces glycosidases correspondent aux glucides plaquettaires et forment trois groupes selon leur niveau d'activité. Ces niveaux d'activité sont en relation avec leurs teneurs de glucides.

## 6. GLYCOGENE ET GLYCOGENE-SYNTETASE PLAQUETTAIRE

### a) Glycogène



O = 1 unité de glucose

(Structure du glycogène d'après K.H.MEYER).

Dans le cytoplasme plaquettaire se trouvent de petits granules constitués de glycogène. Ils sont dispersés entre les organelles intracellulaires comme des éléments isolés ou sous forme d'agrégats.<sup>(71)</sup>

Le glycogène, constitué par des molécules de D-glucose, semble être un des matériaux énergétiques principaux présents dans les plaquettes : sa teneur est d'environ 92 µg/10<sup>9</sup> plaquettes.

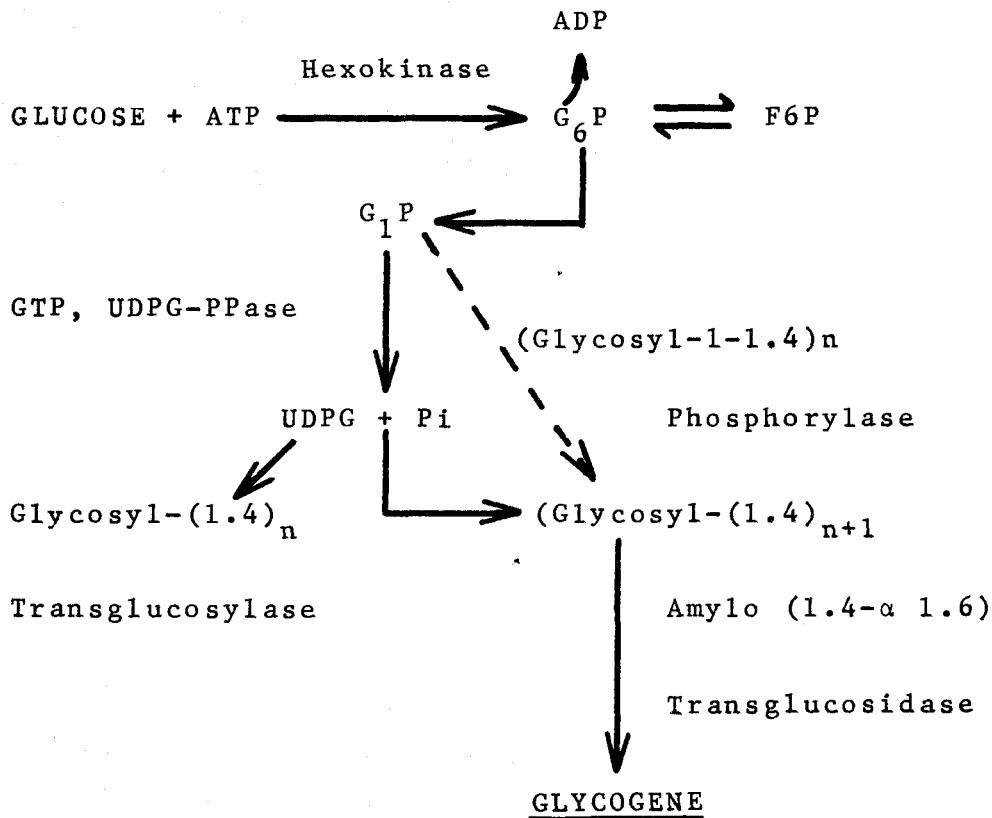
Les travaux de VAINER et WATTIAUX (1968) (171) et les récents résultats de VAINER (1971) (172) ont mis en évidence :

- l'abondance du glycogène dans les plaquettes à l'état normal
- la diminution de la teneur en glycogène au cours de l'agrégation
- le renouvellement rapide de la teneur de glycogène pendant l'agrégation à cause de l'augmentation de la glycolyse et de la glycogenèse dans les plaquettes agrégées ou pendant la rétraction du caillot. En conclusion de ces observations ils ont mis en évidence l'aptitude des plaquettes à effectuer la synthèse de leur propre glycogène.

La glycogénèse et les activités associées au cycle de KREBS ont été démontrées dans les plaquettes humaines, le pyruvate et le citrate étant convertis en glycogène plaquettaire.

La synthèse du glycogène dans les plaquettes implique une phosphorylation du glucose à l'intérieur de la cellule, réaction catalysée par l'hexokinase en présence d'ATP.

La plaquette effectue la biosynthèse du glycogène selon la voie métabolique suivante :

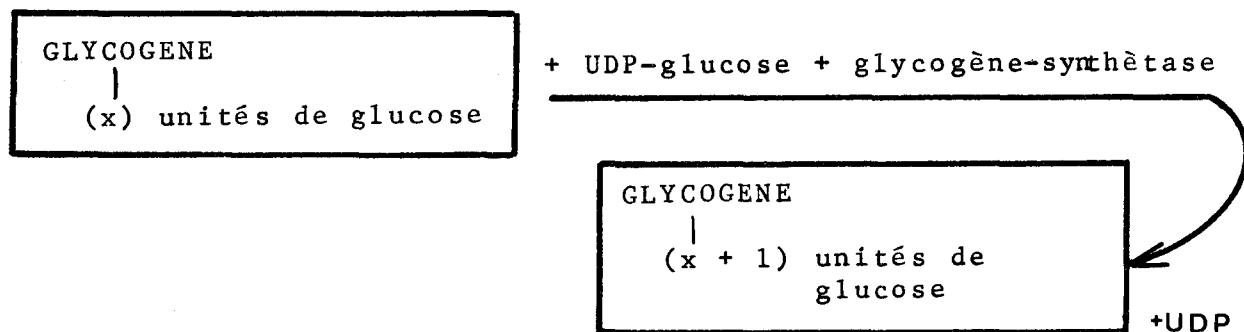


b) Glycogène-synthétase

LELOIR et Coll. (1967) (87), (1969) (88), ont démontré que l'enzyme qui est impliqué dans le processus de la synthèse du glycogène est :

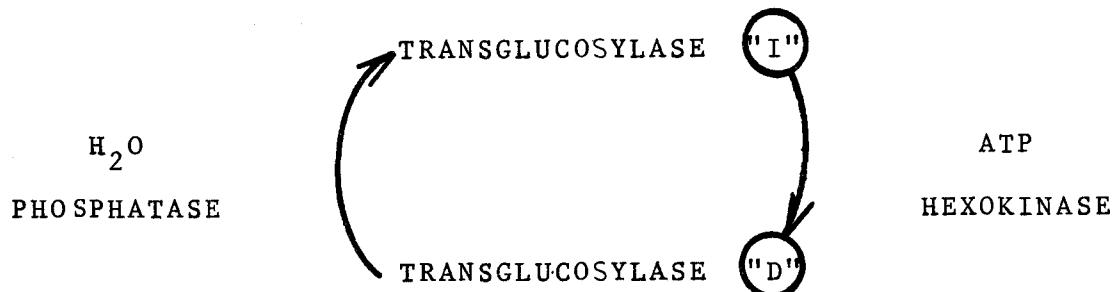
- UDP-glucose: 1-4 glucane - 4 - glucosyltransférase, et ils lui ont donné le nom glycogènesynthétase. L'activité de l'enzyme a été repérée notamment dans le foie, dans les tissus des muscles, dans les leucocytes et dans les plaquettes sanguines. (171)

Les étapes suivantes catalysées par la glycogène-synthétase conduisent à la formation de la chaîne de polysaccharide par l'addition d'unités glucose liées en position  $\alpha$ -1-4.



L'activité de glycogène-synthétase des plaquettes se manifeste sous deux formes interconvertibles : **D** glycogène-synthétase dépendante de  $G_6P$ , et **I** glycogène-synthétase indépendante de  $G_6P$ . C'est un enzyme régulateur, sensible aux variations du niveau des intermédiaires glycolytiques comme  $G_6P$ , ATP, ADP et AMP.

La relation entre l'action des deux formes de la glycogène-synthétase illustrée par le schéma selon LARNER et Coll: (172) est la suivante :



La glycogène-synthétase est un marqueur de l'âge des plaquettes ; on trouve dans les plaquettes jeunes une quantité d'enzymes 2-3 fois supérieure à celle des plaquettes vieillies. (79, 98).

## 7. LES NUCLEOTIDES PLAQUETTAIRES

Les plaquettes accumulent une quantité de nucléotides, dérivés d'adénine, dont ADP et ATP constituent la majeure partie. Selon les résultats de Holmsen et Coll. (1972) (67) leur métabolisme localisé dans le cytoplasme en état de repos a des fonctions différentes de celui qui se déroule au dehors des plaquettes.

Le métabolisme des nucléotides, qui se déroule à l'intérieur des plaquettes, en état de repos, résulte de la réserve d'ADP et d'ATP accumulée dans les granules.

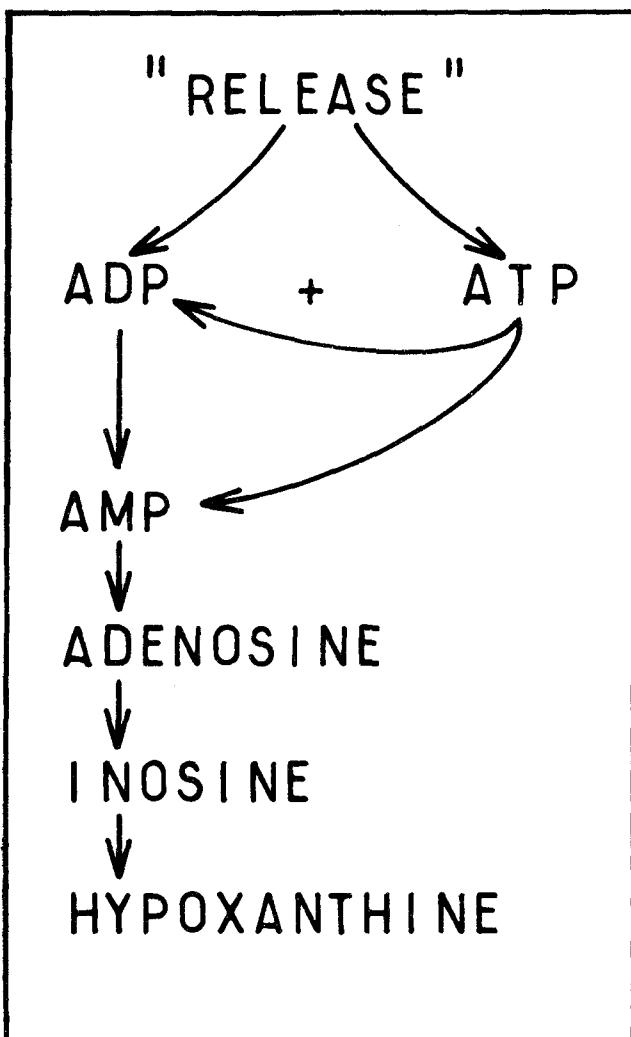
Les dérivés déphosphorilés des nucléotides dont le métabolisme est interne traversent la membrane vers le plasma sous forme d'hypoxanthine ; ils la retraverseront vers le cytoplasme sous forme d'adénine et d'adénosine.

Les nucléotides emmagasinés dans les granules quittent la plaquette en état stimulé sous forme d'ADP et d'ATP. L'ATP et l'ADP, libérés au cours de l'hémostase au moment du "release", apparaissent dans le plasma environnant.

Le plasma, lui, contient des enzymes qui ont pour fonction de déphosphoriler ces nucléotides libérés. Cette fonction enzymatique est très importante pour le contrôle du taux de l'adénosine qui est un inhibiteur de l'agrégation.

La situation entre les plaquettes et le plasma environnant après le "release", qui met en jeu des nucléotides d'adénosine, peut être expliquée selon HOLMSEN et DAY (1971) (69). Les nucléotides d'adénine plaquettaires libérés et déphosphorilés en plusieurs étapes dans le plasma ont des effets différents sur l'agrégation plaquettaire.

L'ADP active l'agrégation plaquettaire, l'ATP qui est librée en même temps que l'ADP sera converti dans une proportion de 10% alors que le reste sera déphosphorylé directement en AMP celuici- rapidement transformé en adénosine. ADENOSINE est un inhibiteur d'agrégation qui rend inactive la plaquette adhésive. L'effet combiné de l'INOSINE et de l'HYPOXANTHINE renforce l'action inhibitrice de l'ADENOSINE (33a, 77a).



#### 8. SEROTONINE INTRAPLAQUETTAIRE

Les organelles constituant les sites d'accumulation de sérotonine (5-HT) dans le cytoplasme des plaquettes sont des granules osmophiles d'une structure optiquement dense au microscope électronique (48,182). Ces granules sont limités par des membranes dont la composition en phospholipides a été démontrée par les résultats d'analyses chimiques de DA PRADA et Coll. (1972) (47).

Ces granules contiennent un certain taux d'ATP et, quand les plaquettes relâchent leur 5-HT pendant l'agrégation, la plus grande partie de leur taux d'ATP disparaît en même temps. Ceci confirme l'hypothèse que <sup>la</sup> 5-HT intraplaquettaire est liée à l'ATP. Les plaquettes vivantes incorporent de la sérotonine quand elles passent à travers les capillaires intestinaux (22,115).

#### Fixation de la sérotonine par les plaquettes

La capacité que possèdent les plaquettes pour se lier, *in vivo* comme *in vitro*, à des amines variées, suggère que ce phénomène pourrait avoir une signification physiologique. La fixation de sérotonine est considérée comme une fonction plaquettaire primordiale. Des expériences faites par BORN, sur le chien, ont montré que les plaquettes fixent *in vivo* de 5 à 10 % du total de la sérotomine injectée à des concentrations très basses dans le plasma. Par contre, la fixation *in vitro* nécessitait de hautes concentrations dans l'environnement (22). Quand le PRP est soumis à une incubation à 37°C avec de 5-HT, les plaquettes fixent la 5-HT jusqu'à un point tel que leur concentration en sérotomine dépasse largement celle du plasma. A la limite, les plaquettes s'enrichissent en 5-HT jusqu'à en extraire la totalité de ce qui est présent dans le plasma (22, 23,24,61,177).

D'après BORN, la vitesse de l'incorporation *in vitro* atteint son maximum quand la concentration de 5-HT dans le milieu plasmique est 1,5 µg/ml.

Puisque le plasma vivant (par exemple chez le chien) (74) contient au plus 0,006 µg/ml de 5-HT, on peut dire que les plaquettes *in vivo* ne rencontrent jamais des concentrations de 5-HT aussi élevées que celles qui produisent l'incorporation maxima *in vitro*.

Sur la surface des plaquettes normales le nombre des sites récepteurs pour fixer la sérotonine est  $10^4$  par plaquette, mais cette capacité de la fixation pour la sérotonine n'est pas la même des plaquettes de poids et d'âge différent (24,32).

Quant à la vitesse même de l'incorporation de 5-HT par les plaquettes soit *in vivo* soit *in vitro*, elle est très faible si on la compare avec celle des cations minéraux ou des acides aminés par les cellules des mammifères dans des conditions comparables. Exprimé en  $\mu\text{mole/sec/cm}^2$  de surface cellulaire, l'influx de  $\text{K}^+$  dans les plaquettes humaines est : 0,68 - 1,13 et l'influx de  $\text{K}^+$  dans les érythrocytes est environ 0,5 et le temps nécessaire pour saturer la moitié des plaquettes avec de la 5-HT est de 30 à 60 minutes (23).

#### Rôle de la sérotonine dans l'agrégation plaquettaire

Le rôle de la sérotonine intraplaquettaire commence avec le "release" quand les plaquettes libèrent la 5-HT accumulée dans les granules de leur cytoplasme (11).

Les observations d'ALEDORT et Coll. (2) sur la libération de 5-HT intraplaquettaire, en réponse aux agents d'agrégation *in vitro* ont montré :

- que les plaquettes ont libéré au moment de la rétraction du caillot entre 60 et 100 % de leur taux en sérotonine
- qu'entre les agents d'agrégation comme l'ADP, la thrombine et le tissu conjonctif (collagène), ce dernier est le plus efficace pour libérer la sérotonine intraplaquettaire.

Ceci concorde avec les hypothèses concernant le rôle du contact entre les plaquettes et le collagène dans la première étape de l'hémostase, qui provoque le phénomène de "release".

## 9. GLUCIDES DES PLAQUETTES

Les protéines plaquettaires représentent 57 % du poids sec des plaquettes. Les glycoprotéines qui ont été identifiées correspondent à 20 %, à savoir :

- 15 % fibrinogène
- 5 % une autre protéine coagulable
- Facteur 4,2
- Facteur XIII

Cependant si l'existence et les fonctions de beaucoup d'autres protéines ayant une partie glucidique ont été démontrées, leur constitution chimique n'a pas été établie dans la plupart des cas. Les difficultés que présentent l'isolement et l'analyse de si faibles quantités de matériaux sont bien connues.

Par contre sur la totalité des glucides appartenant aux glycoprotéines et glycolipides plaquettaires, les méthodes biochimiques ont permis d'obtenir des informations. Le taux des glucides des plaquettes varie selon différents auteurs entre 5 et 8 % par rapport à leur poids sec.(98,77,100).

La structure de la partie glucidique des plaquettes est composée de D-galactose, de D-mannose, de D-glucose, de L-fucose, de D-glucosamine, de D-galactosamine et d'acide sialique.

En associant les résultats qui ont été mis en évidence par de nombreux chercheurs, on peut tirer quelques conclusions concernant la structure chimique de la partie glucidique des plaquettes d'une part et celle de la membrane plaquettaire d'autre part. PEPPER et Coll. (1968) (136) ont étudié l'effet de dégradation de courte durée sur les plaquettes intactes avec différents enzymes protéolytiques et ils ont isolé des précurseurs des glycopeptides relativement peu contaminés par des peptides non glucidiques. Les hydrolyses des plaquettes avec la trypsine, la pronase, et la papaïne libèrent notamment trois glycopeptides principaux, caractérisés par des poids moléculaires

différents :

Composition des glycopeptides plaquettaires

	GP I	GP II	GP III
Poids moléculaire	120,000	22,500	5000

Les taux en glucides g/100 g

Fucose	0,65	2,1	—
Mannose	0,83	3,7	1,0
Galactose	16,5	16,5	8,6
Glucose	0,92	3,8	7,7
Acide sialique	22,4	31,8	6,5
Glucosamine	15	13,5	6,8
Galactosamine	14	10,6	17,1

MULLINGER et Coll. (1968) (125) ont isolé deux fractions glycopeptidiques à partir des plaquettes des pigeons :

1. La majeure fraction obtenue par hydrolyse enzymatique par la papaine est un glycopeptide dont la composition est la suivante :

- galactose : 16,5 %
- hexosamine : 15 %
- acide sialique : 9,6 %
- fucose : 1,2 %

2. Comme deuxième fraction on a obtenu un glucosaminoglycane. En quantité, la deuxième fraction est trois fois plus faible que la première.

Que les plaquettes contiennent des glucosaminoglycanes, cela a été signalé déjà par ANDERSEN (1964) et ensuite confirmé par OLSON et GARDELL (1966) (131). Ces derniers ont démontré la structure chondroitine-4-sulfate pour la fraction obtenue par

hydrolyse avec la papaïne. Ce composant représente de 0,8 à 1 % des plaquettes. Il contient 20,7 % d'hexosamine, 25 % d'acide uronique, 11 % de sulfate par rapport à son poids sec.

JAMIESON et Coll. (1971) ont déterminé la répartition de l'hexosamine dans les produits de dégradation trypsique des plaquettes. Leurs résultats suggèrent que les glucosaminylglycannes plaquettaires sont localisés dans le cytoplasme d'où ils peuvent être libérés par hydrolyse enzymatique mais ils ne font pas partie des fractions de la membrane extérieure des plaquettes. (77)

#### 10. COMPOSANTS MINERAUX

Les composants minéraux (100) présents dans les plaquettes sont :

- Potassium	2,9	mg/gr poids sec
- Sodium	0,57	"
- Magnésium	0,30	"
- Calcium	2,92	"
- Phosphore	12,00	"

o o  
o

C H A P I T R E      3

LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

1. ULTRASTRUCTURE

Les observations au microscope électronique (71,14,181, 37) ont mis en évidence que la membrane des plaquettes est composée de trois couches, (comme toutes les cellules des mammifères) (53) le tout ayant une épaisseur de 70-90 Å. Ce système de membranes comprend, selon DANIELLI, les parties suivantes (46) :

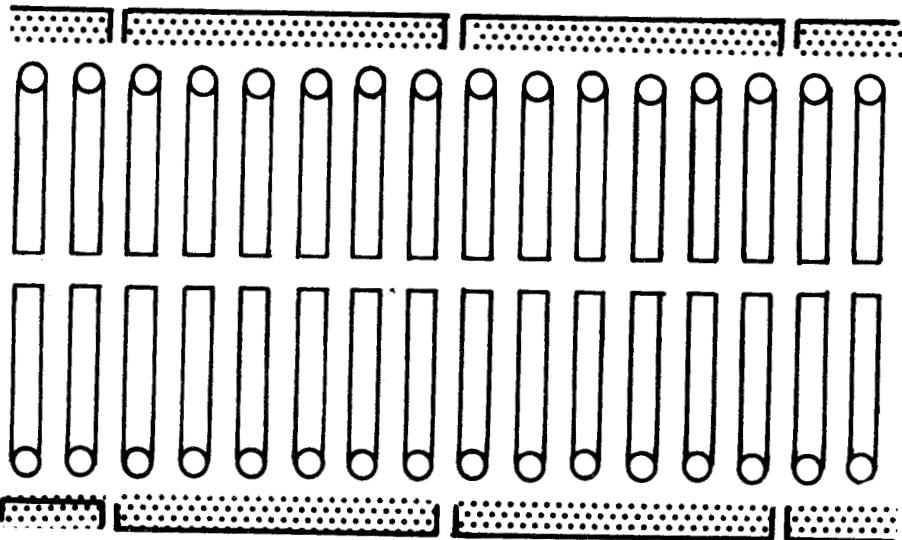
1. La couche externe de la cellule constituée de protéines et de glycoprotéines.
2. La partie intermédiaire : un système de "double-couches" constitué de lipides.
3. La couche interne au cytoplasme : constituée de protéines.

Mais à l'extérieur de ce système de "triple-couches", on observe un enrobage (71). Cette zone périphérique, constituée d'une substance amorphe, a une épaisseur d'environ 100-150 Å. ROSKAM (1922) (145) appelait cette zone "l'atmosphère plasmique périplaquettaire". Les résultats de plusieurs études ont démontré que cette "atmosphère" qui enrobe la cellule contient des protéines telles que le fibrinogène, des enzymes et des facteurs de coagulation.

Figure 4

MODELE DE MEMBRANE CELLULAIRE D'APRES DANIELLI (4, 46)

I



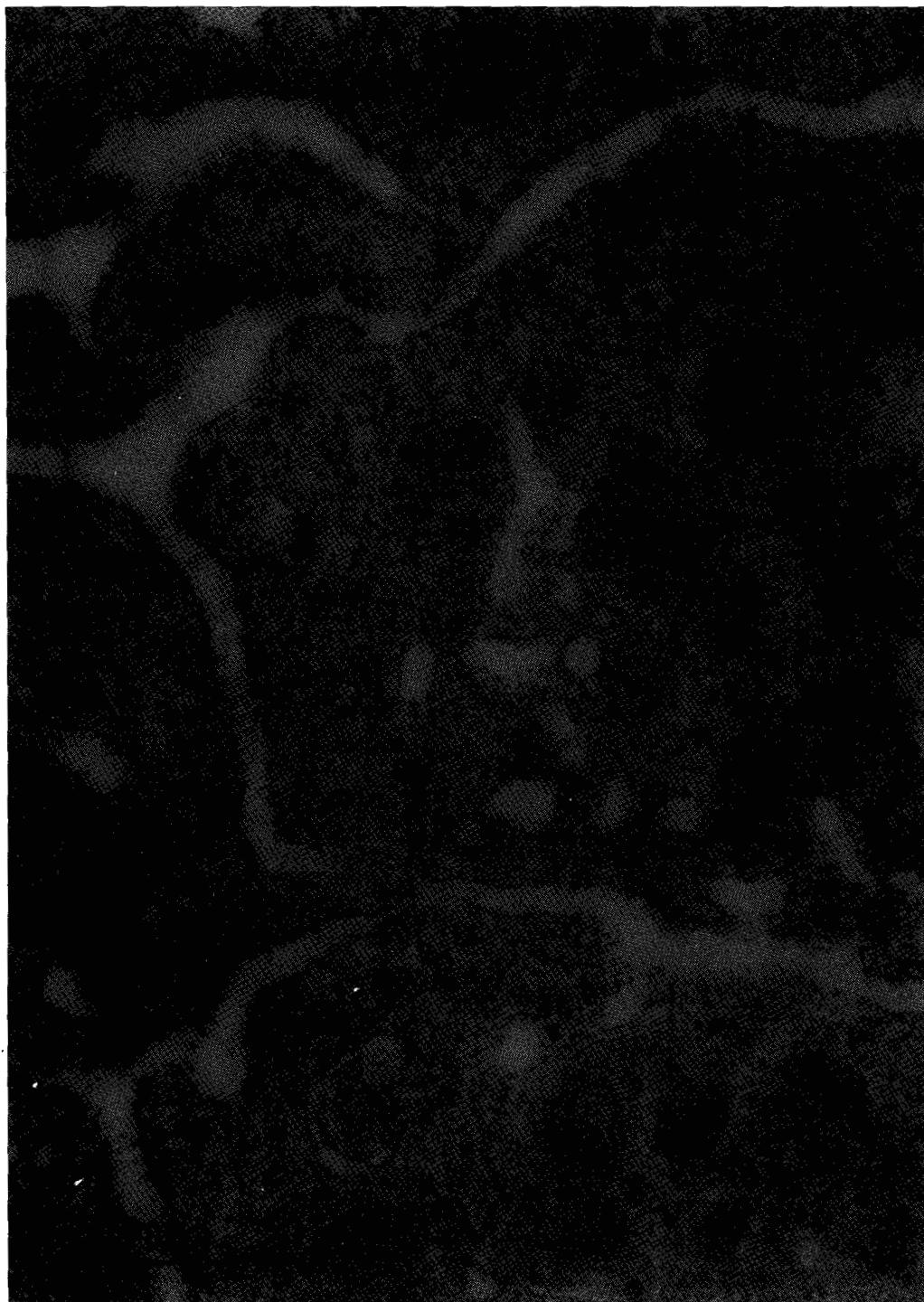
I \_ : Surface interne avec des couches, des enzymes, des microfibrilles et des microtubules, etc..

E \_ : Surface extérieure constituée de protéines, mucoides et mucopolysaccharides.

BUS  
LULF

Photo 1

AGREGAT DES PLAQUETTES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (71)



805  
LILLE

L'enrobage correspondant à "l'atmosphère périplaquettaire" (ROSKAM, 1922, 145) contient des polysaccharides, des muccoprotéines et des glycoprotéines occupant beaucoup d'espace, parce que facilement hydratés. Photo 2.

Quand les plaquettes forment un agrégat *in vivo* ou *in vitro*, elles se transforment de cellules librement flottantes en un tissu plaquettaire. La distance que l'on peut observer au microscope électronique entre les plaquettes voisines dans un agrégat est due probablement à cette zone d'enrobage autour des plaquettes. Son rôle peut être d'empêcher un contact direct entre les membranes des plaquettes. Il semble raisonnable de penser que les composants de cette atmosphère périplaquettaire présentent des sites responsables de l'adhésion entre les plaquettes, surtout en connaissant la présence des glycoprotéines adsorbées comme le fibrinogène et les autres facteurs de coagulation.

## 2. STRUCTURE CHIMIQUE ET ROLE SPECIFIQUE

La membrane des plaquettes est composée chimiquement de 57 % de protéines, 33 % de lipides et 8 % de glucides (100,101, 9). Chacun des composants semble être disposé pour jouer un rôle spécifique dans la fonction de la membrane :

- les glucides ont la capacité de maintenir une phase hydratée,

- les lipides étant hydrophobes servent comme frontière d'un milieu approprié pour les réactions métaboliques cellulaires, mais aussi ils peuvent constituer une barrière au passage des molécules en assurant une semi-perméabilité de la cellule,

- les enzymes, qui sont composés de protéines et de lipides sont les constituants essentiels de tout système biologiquement actif.

On peut considérer que la membrane cellulaire est essentiellement une barrière de lipides modifiée par des protéines, des polysaccharides et des enzymes, ce qui implique des interruptions dans les chaînes des lipides (53).

Le rapport quantitatif entre lipides et protéines de la membrane d'une cellule est en relation avec la capacité métabolique de la membrane en question. La membrane des plaquettes a une teneur en protéines très élevée par rapport à celle des lipides ; ceci indique une forte activité métabolique, et en effet on peut leur attribuer plusieurs fonctions biologiques. La membrane des plaquettes a un rôle capital en dehors de son rôle similaire à celui des autres cellules plasmatisques : il s'agit de leur faculté d'adhésion et d'agrégation. L'adhésion au collagène et l'adhésion entre elles-mêmes, d'une part, agrégation, dilatation, formation des pseudopodes et enfin contraction, d'autre part, sont des fonctions caractéristiques de la membrane plaquettaire.

La composition chimique de la membrane plaquettaire, particulièrement celle des glucides, peut être caractérisée par les résultats d'analyses de BARBER et JAMIESON (1970) (9) résumés sur le tableau ci-après.

La colonne I concerne les plaquettes entières et les colonnes II et III les fractions de la membrane plaquettaire.

Tableau IV

Composants	I g/100 g	II g/100 g	III g/100 g
Acides aminés .....	64,51	31,90	40,09
Carbohydrate.....	5,81	7,27	6,85
Glucose.....	2,11	0,96	1,32
Galactose.....	1,51	1,76	1,24
Mannose.....	0,82	1,63	1,59
Fucose.....	0,09	0,27	0,20
Glucosamine .....	0,79	1,79	1,71
Galactosamine ....	0,19	0,31	0,27
Acide sialique....	0,30	0,55	0,52
Lipide.....	24,00	55,92	48,21
Phospholipide....	20,30	44,87	39,33
Cholestérol.....	3,70	11,05	8,88
RNA.....	0,23	0,33	0,39
DNA.....	0,09		
Total.....	94,64	95,42	95,54

D'après MARCUS et Coll. (1969) (100,101) la classe principale des lipides de la membrane, aussi bien que des granules interplaquettaires et des plaquettes intières, est celle des phospholipides (80 %).

Les gangliosides plaquettaires représentent 0,5 % de la teneur totale en lipides et ils portent 6 % de la teneur totale en acide sialique des plaquettes.

MARCUS et Coll. (1972) (103) ont mis en évidence trois fractions principales de gangliosides plaquettaires :

1<sup>ère</sup> fraction : Hématoside G<sub>6</sub> qui constitue 92 % de la teneur totale en gangliosides, contenant :

[ D-glucose  
D-galactose      dans le rapport 1:1:1  
acide sialique ]

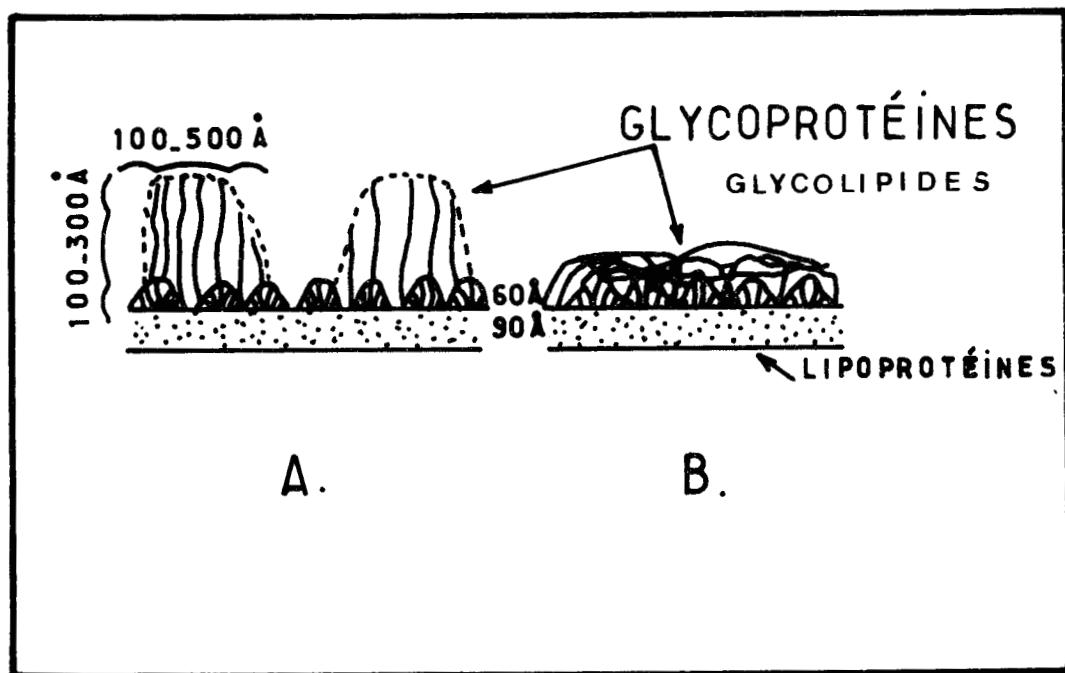
2<sup>ème</sup> fraction : représentant 5 % de la totalité et contenant :

[ D-glucose  
D-galactose  
acide sialique      dans le rapport 1:2:1:1  
glucosamine  
galactosamine ]

3<sup>ème</sup> fraction : représentant 2 % de la totalité et  
contenant :

Disialyl-lactosyle-céramide

L'hypothèse de LEHNINGER (1968) (86) suggérant que les gangliosides chargés négativement peuvent se prolonger au-delà de la surface de la membrane extérieure vers le milieu environnant est en accord avec les résultats de l'observation faite sur les érythrocytes de PARSON et Coll. (1972) (134) qui ont proposé un modèle pour la structure des polysaccharides de la surface des érythrocytes. (Figure 5)



Le modèle illustré par la figure est basé sur les observations recueillies au microscope électronique et représente l'enveloppe de la cellule des érythrocytes du sang.

On voit, explicités, des filaments de glycoprotéines qui se dégagent sur une longueur de 100 à 300 Å au-dessus de la couche des lipides de la membrane.

Modèle A : les glycoprotéines conservent une structure filamenteuse à l'état humide ; Modèle B : sous l'effet de séchage sous vide il y a un tassemement des filaments dont l'épaisseur se réduit à environ 60 Å.

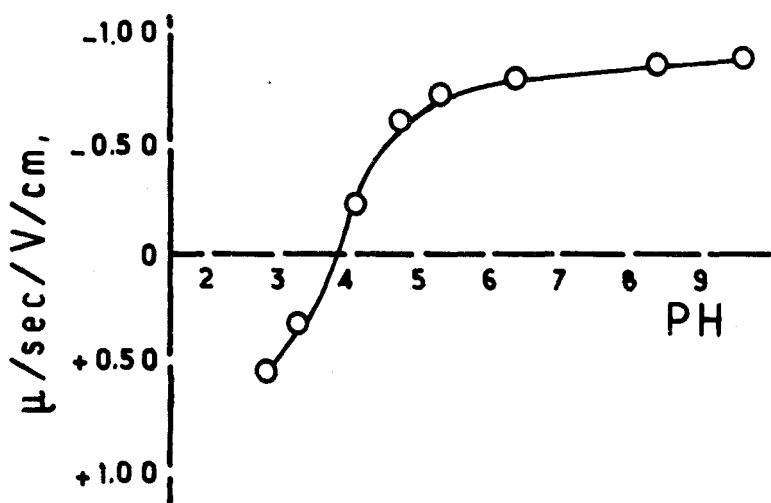
### 3. CHARGE NEGATIVE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

Parmi les caractéristiques impliquées dans les fonctions des plaquettes, qui sont dues à la structure chimique des glucides de la membrane, prenons d'abord la charge négative de la surface plaquettaire.

Le potentiel électrocinétique des plaquettes humaines normales dans le sérum est égal à 25-35 mV.

La charge négative des plaquettes peut être mesurée par leur mobilité électrophorétique dans l'appareil de micro-électrophorèse des cellules (cytosphéromètre) (164).

La mobilité électrophorétique des plaquettes en fonction du pH est réversible avec des pH situés entre 3,5 et 9,5 et la courbe de la figure ci-dessous indique l'allure d'une surface amphotère rappelant les protéines (59,60). (Figure 6)



L'effet du pH sur la mobilité électrophorétique des plaquettes lavées.

Ceci concorde avec des résultats de SEAMAN et VASSAR (1965, 153) qui ont trouvé que la mobilité électrophorétique des plaquettes isolées et suspendues dans une solution de NaCl isotonique est :

0,85  $\mu$ /sec/V/cm, avec un point isoélectrique à pH 3,6.

La relation entre le pH et la mobilité des plaquettes diffère de façon frappante de celle qui existe pour les globules rouges du sang, car les globules rouges migrent toujours vers l'anode dans tous les pH qui dépassent 1,7 (152, 153).

Rôle de l'acide sialique dans la charge négative des plaquettes

L'acide sialique a été trouvé comme le constituant de toutes les surfaces cellulaires des mammifères étudiées jusqu'à présent. Il a été démontré qu'environ les 2/3 de la teneur totale en acide sialique des cellules est localisée sur leur surface extérieure.

La charge négative de la surface des plaquettes peut être attribuée à l'acide sialique parce que leur mobilité électrophorétique se montre diminuée après élimination de 50 à 60 % de la teneur de l'acide sialique par un traitement avec les enzymes neuraminidases. Les 60 % d'acide sialique libérés correspondent aux molécules d'acide sialique situées sur la surface extérieure de la plaquette (125, 60).

Rapport entre le taux d'acide sialique et la charge négative des plaquettes

D'après les calculs, basés sur le potentiel de la charge négative correspondant à une quantité de groupes-COOH ionisés d'acide sialique, une plaquette ayant  $28,3 \mu^2$  de surface cellulaire contient  $3,2 \times 10^4$  molécules d'acide sialique par  $\mu^2$  de sa surface.

La valeur qu'on obtient par les méthodes chimiques selon Aminoff (4a) et Warren (174) est environ trois fois plus élevée c'est-à-dire  $10^5$  molécules par  $\mu^2$  de la surface. Un écart similaire (rapport 1 à 3) a été trouvé pour les globules rouges du sang (39).

Modifications possibles de la charge négative des plaquettes (152)

Les mesures de mobilité électrophorétique qui ont été utilisées comme indice des changements induits par des réactifs variés à la surface des plaquettes ont démontré que :

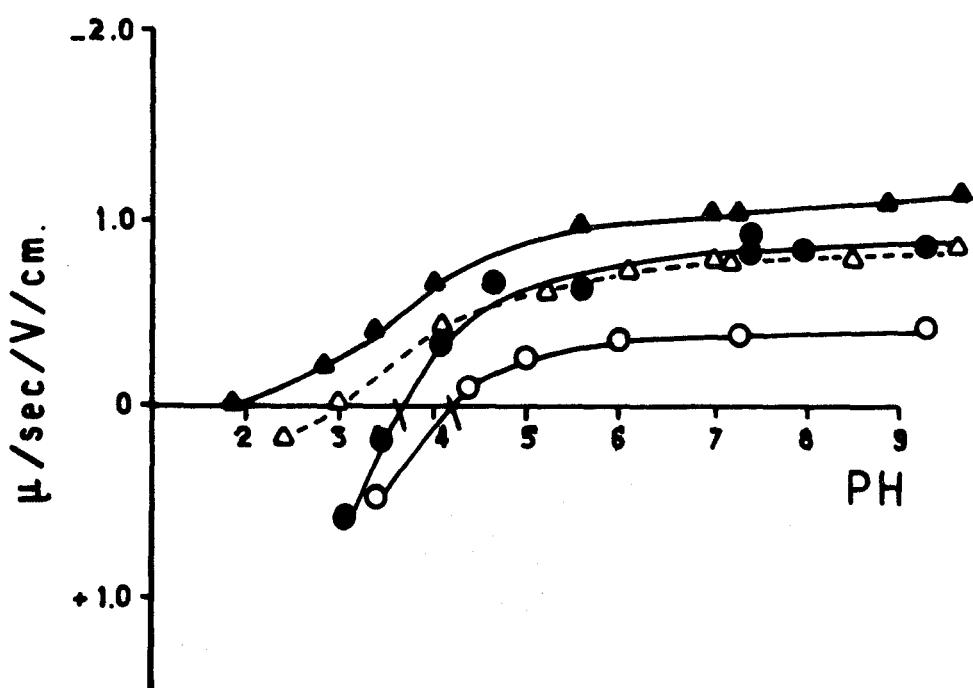
- a) Il est possible d'augmenter la charge négative des plaquettes par élimination des ions à charge positive,
  - b) Il est possible d'augmenter la charge positive en bloquant les ions à charge négative,
  - c) la mobilité électrophorétique change pendant l'agré-gation plaquettaire.
- a) La présence des groupes amino et SH qui ont une charge positive a été démontrée sur la surface des plaquettes (60). On peut bloquer les groupes amino protéiques par l'anhydride de l'acide maléique, les groupes SH avec de l'acide 6,6'-dithiodinicotinique, et provoquer ainsi l'augmentation de la mobilité électrophorétique due à la charge négative. Les taux de l'augmentation sont de 28 et 17 % respectivement.
- b) Les plaquettes isolées et fixées par l'acétaldéhyde montrent une mobilité électrophorétique modifiée sous l'influence de la présence d'un nombre important de groupes amino ( $NH_2$ ) sur la surface plaquettaire.

La mobilité électrophorétique des plaquettes natives à pH 7 est  $0,85 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$  ; après traitement à la neuraminidase cette valeur diminue, devient  $0,4$ . Les plaquettes fixées en acétal-déhyde montrent une mobilité électrophorétique de  $1,02 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$  et ces plaquettes fixées en acétaldéhyde et traitées à la neuraminidase ensuite montrent une mobilité électrophorétique de  $0,8 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ .

Figure 7

RELATION ENTRE pH ET MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES :

- des plaquettes natives
- les plaquettes désialinisées
- ▲—▲ des plaquettes fixées en acétaldéhyde
- △—△ des plaquettes fixées en acétaldéhyde et ensuite désialinisées.



c) Modification de la charge négative en relation avec l'agrégation plaquettaire in vivo :

D'après BORN (140) la mobilité électrophorétique des plaquettes (du chien) diminue pendant la durée du saignement et du traumatisme, et en même temps les taux de l'ADP et de la 5-HT augmentent dans le plasma environnant. Ceci suggère la possibilité de changements subits par la charge négative quand l'ADP ou la 5-HT, ou tous les deux, agissent sur les plaquettes.

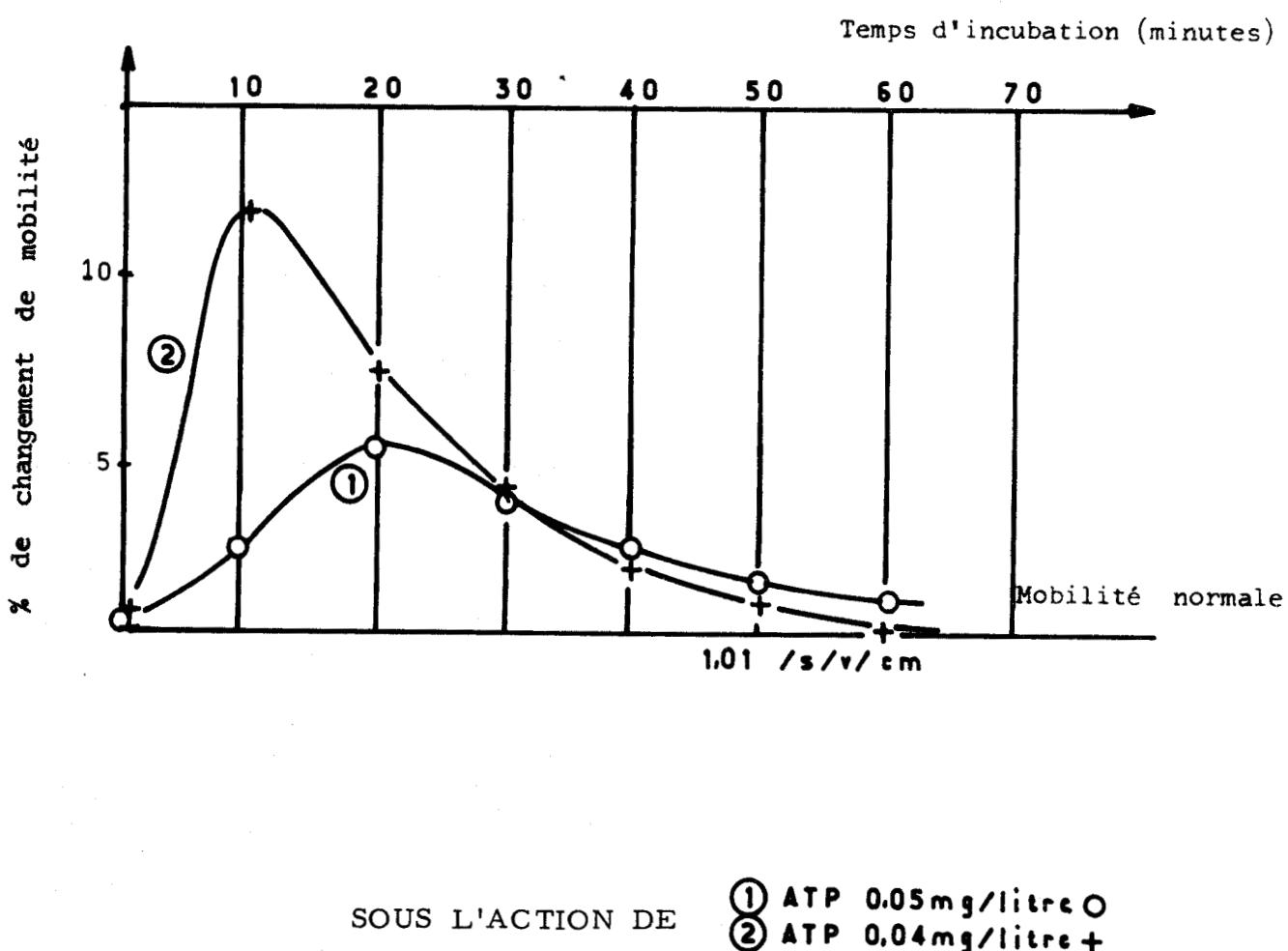
Modification de la charge négative in vitro :

Les travaux de STOLTZ et Coll. (1968) (165) ont démontré que, dans le milieu du plasma, l'ADP et l'ATP produisent d'abord une augmentation de mobilité électrophorétique puis une diminution. La variation relative de la mobilité des plaquettes en fonction du temps, sous l'action de l'ADP et de l'ATP montre qu'il y a retour à la mobilité normale au bout d'une heure (Figure 8). Ces courbes traduisent peut-être la formation de l'équilibre physiologique ATP → ADP → (AM)P → ... → inositol.

Les agents d'agrégation comme ADP, thrombine, accélèrent la mobilité électrophorétique des plaquettes jusqu'à une certaine concentration, au delà ils ralentissent la vitesse de migration. L'héparine qui est un cofacteur anticoagulant accélère modérément la vitesse de la mobilité électrophorétique, l'anti-héparine, le sulfate de protamine ralentissent la mobilité. L'effet de ces deux derniers varie dans le même sens que leur concentration (Figure 9).

FIGURE 8

ACTION DE L'ATP ET DE L'ADP SUR LA MOBILITE  
ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES :  
VARIATION EN FONCTION DU TEMPS



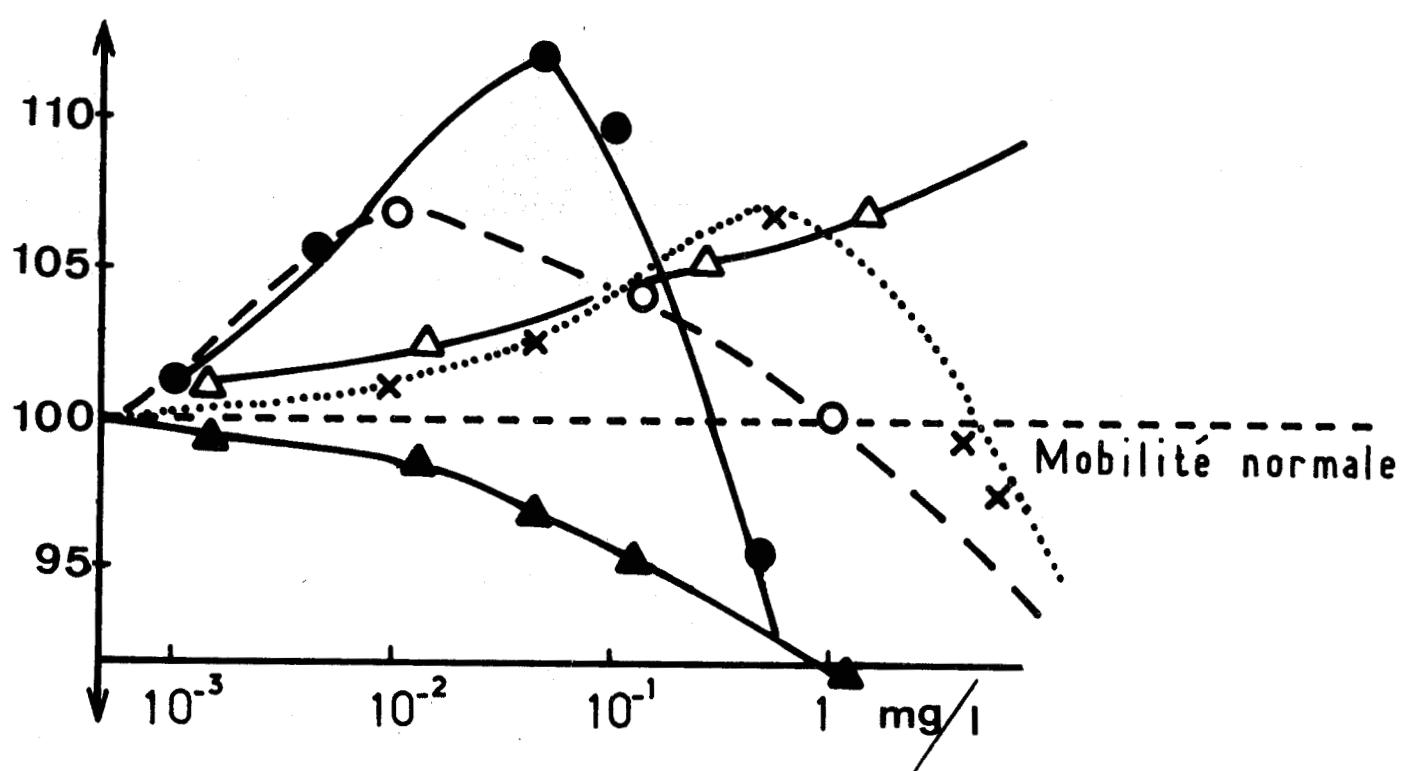
BUS  
LILLE

Figure 9.

MODIFICATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES  
DANS LE MILIEU PLASMATIQUE SOUS L'ACTION DE :

●—● ADP                      △—△ Héparine  
×-----× ATP                      ▲—▲ Sulfate de protamine  
○---○ Thrombine                      (antihéparine)

%  
de changement  
de la mobilité



BUS  
LILLE

Agrégation plaquettaire in vitro : induite par ADP et par 5-HT

L'agrégation plaquettaire in vitro induite par l'ADP se déroule en deux "vagues". Première "vague" : lorsqu'on ajoute de l'ADP au plasma riche en plaquettes les plaquettes subissent l'agrégation qui provoque le phénomène de "release". Ensuite l'ADP intrinsèque libéré par le "release" produit la seconde vague de l'agrégation.

L'agrégation des plaquettes induite par la sérotonine est faible et aussitôt réversible et n'entre jamais en seconde "vague" d'agrégation. C'est-à-dire que la sérotonine ajoutée au PRP ne provoque pas le phénomène de "release" pour libérer l'ADP intrinsèque. La vitesse d'agrégation et celle de désagrégation atteint son maximum quand le taux de 5-HT ajouté au plasma se situe entre 5 et 10  $\mu$ moles de 5-HT par ml de plasma. Les doses plus élevées ont un effet de ralentissement des deux phénomènes. Pour expliquer le mécanisme des fonctions de la 5-HT l'hypothèse suggérée par Born serait, que la 5-HT produise ces effets en combinaison avec des récepteurs spécifiques de la membrane plaquettaire qui sont identiques avec des récepteurs impliqués dans la fixation de la 5-HT. Cette fixation de 5-HT est la première étape de l'accumulation de la 5-HT et aussi du processus de l'agrégation.

Accumulation : les récepteurs de la surface plaquettaire fixent d'abord et transportent ensuite la 5-HT très rapidement à travers la membrane. Dans la zone granulomère des plaquettes ces complexe-récepteurs se dissocient. La 5-HT se diffuse dans le cytoplasme et s'incorpore aux organelles d'accumulation par son affinité pour l'ATP.

Agrégation induite par la 5-HT : se commence aussi par la fixation utilisant les mêmes récepteurs, et la possibilité d'agrégation subsiste aussi longtemps que ces récepteurs en proportion suffisante sont libres à réagir avec les molécules de 5-HT. Le taux élevé, ajouté au PRP exerce une influence stabilisatrice sur la membrane plaquettaire. La saturation des sites récepteurs

probablement par le changement de leur charge électrique négative conduit au développement d'un effet inhibiteur sur l'agrégation "reversal effect". Ainsi le pouvoir des plaquettes d'adhérer et de s'agréger ne peut être induit que si l'ADP et la 5-HT rencontrent sur la surface plaquettaire des sites récepteurs en nombre suffisant.

Sur la surface des plaquettes normales le nombre des récepteurs pour l'ADP est de l'ordre de  $10^5$ , et pour la 5-HT est  $10^4$  par plaquette. En accord avec ceci on trouve une différence importante entre la dose de ces deux agents d'agrégation grâce à laquelle on peut provoquer les maxima d'agrégation *in vitro* :

- 30 - 100  $\mu$ moles de l'ADP
- 5 - 10  $\mu$ moles de 5-HT

De plus la vitesse d'agrégation induite par l'ADP est trois fois plus élevée que celle induite par la 5-HT.

EXPOSE DES TRAVAUX ORIGINAUX

PREMIERE PARTIE

ETUDE ANALYTIQUE DE LA PARTIE GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES

## CHAPITRE I

### ETUDE DES PLAQUETTES NORMALES

#### 1. INTRODUCTION

La pathologie des plaquettes peut se manifester sous plusieurs formes qui ont été mises en évidence par de très nombreuses observations cliniques. DAVID (1971) a donné un résumé des caractéristiques des cas de pathologie plaquettaire, notamment d'après des auteurs comme BERNARD et SOULIER (1948), HARDISTY (1966), HIRSCH (1967), O'BRIEN (1967), CAEN et Coll. (1967), BOWIE et Coll. (1969), GROTTUM et SOLUM (1969), MILLS et HARDISTY (1970), WEISS et HOLMSEN (1971).((42)).

Nous nous contenterons de citer les cas pathologiques pour lesquels les changements dans la structure chimique des plaquettes ont été étudiés, démontrant qu'il existe des perturbations dans les fonctions plaquettaires dont la cause réside dans des anomalies de la structure chimique des glucides.

Les maladies congénitales (saignement congénital) dues aux défauts qualitatifs des plaquettes sont généralement séparées en deux catégories principales :

- Thrombasthénie
- Thrombocytopatie

La thrombasthénie plaquettaire est caractérisée par le fait que les plaquettes sont inaptes à agréger sous l'effet de l'ADP.

D'après CAEN, il y a deux sortes d'affections de thrombasthénie (30,31a):

1. L'une caractérisée par un taux bas de fibrinogène plaquettaire qui se traduisent par une rétraction anormale du caillot.
2. L'autre caractérisée par la diminution des enzymes de la glycolyse de l'ATP, mais un fibrinogène plaquettaire subnormal et une rétraction subnormale du caillot.

Les thrombocytopathies sont souvent caractérisées par une anomalie de l'utilisation de la prothrombine et souvent une libération incomplète de l'ADP intraplaquettaire. BERNARD et SOULIER (1948) (15) ont observé une forme spéciale de thrombocytopathie congénitale caractérisée par des plaquettes géantes. Pour des cas similaires de thrombocytopénia congénitale, GROTTUM et SOLUM (1969) (59,60) ont trouvé que les plaquettes géantes présentent une mobilité électrophorétique réduite et une teneur en acide sialique diminuée ce qui caractérise une défectuosité de la membrane plaquettaire.

Depuis 1967 nous avons poursuivi l'étude de la composition glucidique des plaquettes sanguines dans les cas pathologiques (111) en raison de l'importance supposée de ses anomalies dans les perturbations fonctionnelles des plaquettes. En rapport avec ces perturbations plusieurs travaux ont démontré la diminution du taux d'acide sialique. Cependant la composition de la partie glucidique ou la variation précise de la teneur en autres glucides n'a pas été caractérisée dans des cas pathologiques.

Pour définir des anomalies par rapport aux valeurs normales des glucides, nous avons effectué plusieurs séries d'analyses sur les plaquettes normales. Il nous semble nécessaire de noter que les méthodes appliquées dans l'isolement des plaquettes à partir du plasma sanguin ont été largement développées dans les dernières années. Au fur et à mesure de ces développements méthodiques, nous avons obtenu les suspensions des plaquettes isolées intactes et peu contaminées par d'autres hématoïdes ou par les protéines plasmatiques. Ainsi les analyses chimiques et biochimiques que nous avons achevées en 1972 ont donné des résultats qui sont vraisemblablement plus proches de la réalité concernant la composition chimique des plaquettes.

Les sujets du chapitre suivant seront nos résultats d'analyses obtenus sur les plaquettes normales d'abord et ensuite sur les plaquettes des cas pathologiques.

## 2. COMPOSITION GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES NORMALES

### a) Glucides des plaquettes entières

Les dosages des glucides effectués sur les échantillons de plaquettes normales isolées nous ont fourni des résultats globaux concernant la partie glucidique des plaquettes :

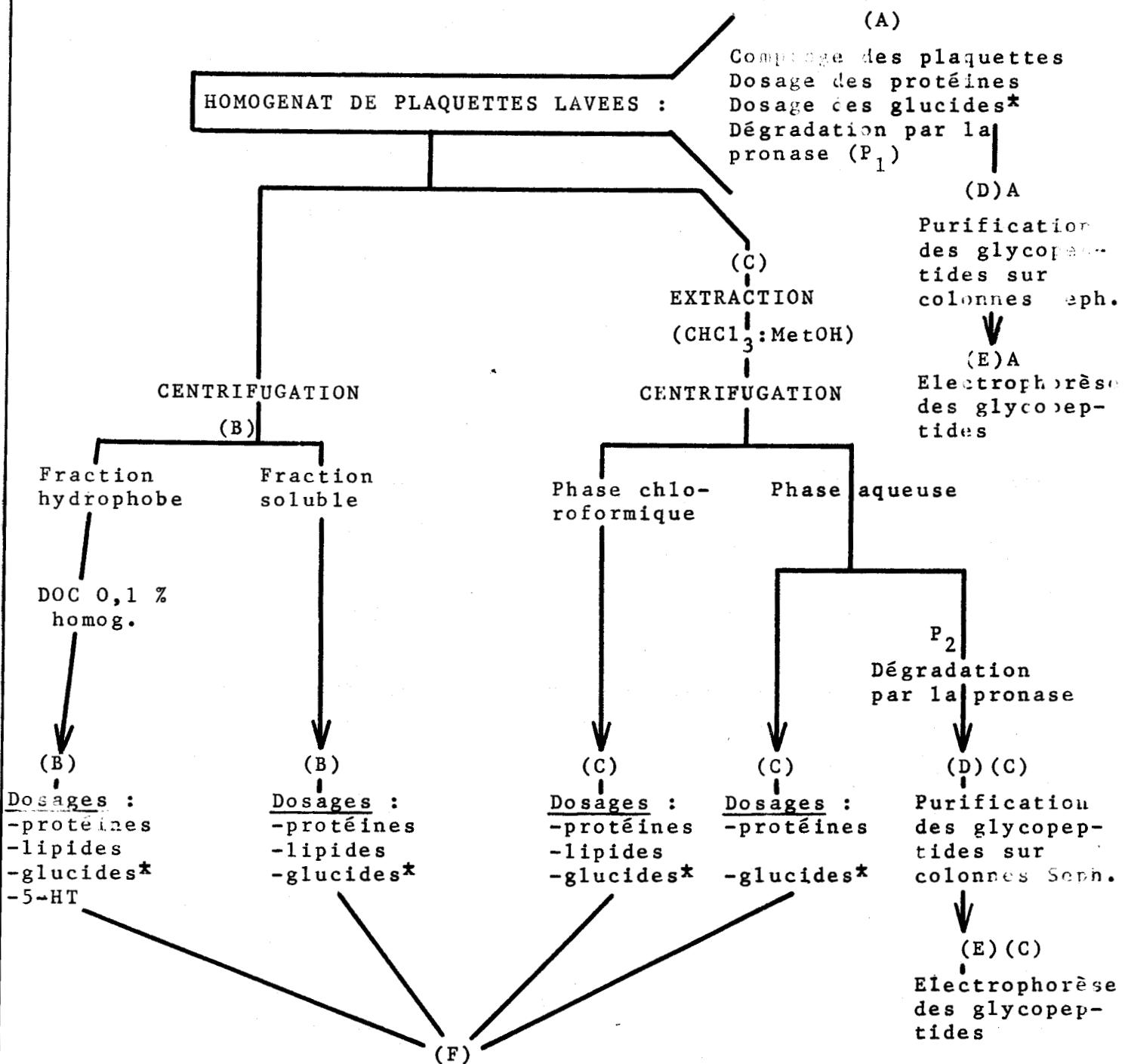
Tableau A

Hexoses neutres.	4,10 % ou 22,79 $\mu$ molécules par 100 mg protéines
Hexosamines.....	1,45 % ou 8,05 $\mu$ molécules "
Acide sialique..	0,84 % ou 2,70 $\mu$ molécules "
Total.....	<u>6,39 % ou 33,72 <math>\mu</math> molécules de glucides par 100 mg de protéines plaquettaires.</u>

### b) Glucides des fractions subcellulaires

Il est intéressant de distinguer dans ce taux de glucides la part qui se trouve dans la membrane et celle qui se trouve à l'intérieur de la plaquette, et de plus de faire la distinction entre les glucides constituant les glycoprotéines et ceux constituant les glycolipides. Dans ce but nous avons suivi un protocole d'analyse présenté sur la figure suivante.

Figure 1.1  
PROTOCOLE D'ANALYSE DES PLAQUETTES ISOLEES



Les lettres entre parenthèses (A B C D E F) indiquent les tableaux que nous présentons avec les résultats obtenus dans chacune de ces étapes de la Figure 1.1.

\* GLUCIDES = Hexoses Hexosamines, acide sialique et fucose.

BUS  
LILLE

Tableau B

HOMOGENAT DES PLAQUETTES LAVEES :

25 ml de suspension plaquettaire (en sol. isotonique de NaCl) + 0,25 ml de sol. 1 % de digitonine.

Ceci correspond à :

100 mg de protéines et  
6,39 mg de glucides

CENTRIFUGATION

10,000 t/min. pendant 60 min.

(culot)

(surnageant)

	FRACTION HYDROPHOBE	FRACTION HYDROPHYLE
Quantités totales de protéines (Lowry)	68,50 mg	31,50 mg

DOSAGES DES GLUCIDES DES FRACTIONS :

	μg	%	μg	%
HEXOSES NEUTRES	28,45	4,15	10,30	3,27
HEXOSAMINES	23,00	2,22	9,20	0,71
ACIDE SIALIQUE	9,00	1,36	1,80	0,57
TOTAL GLUCIDES	7,72 %			4,45 %
LIPIDES	42 mg			8,7 mg



Tableau C

HOMOGENAT DES PLAQUETTES BROYEEES

mélangé avec MetOH:CHCl<sub>3</sub> (1:3)

$4,1 \times 10^9$  plaquettes  
dans 2 ml d'eau +  
5 ml de MetOH:CHCl<sub>3</sub>

CENTRIFUGATION (3 fois répétée)

3000 t/min. pendant 10 min.

PHASE MetOH:CCl<sub>3</sub>  
évaporation :  
poids sec : 2,38 mg

PHASE AQUEUSE  
évaporation :  
poids sec : 6,45 mg

Séparation par  
CHROMATOGRAPHIE  
SUR COUCHE MINCE  
(séparation)

LIPIDES  
SANS GLUCIDES 2,095 mg  
87,60 %

GLYCOLIPIDES 0,30 mg  
12,42 %

GLUCIDES \*)  
déterminés par chromatographie sur couche mince.

ACIDE SIALIQUE	3,6 %	2,0 %
HEXOSES NEUTRES	4,0 %	6,0 %
HEXOSAMINES	8,0 %	3,0 %

\*) Sur poids sec.



### 3. ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES

D'après les résultats des autres chercheurs et d'après ceux que nous avons, nous-mêmes, obtenus il est évident que 5 à 8 % des glucides sont liés à des protéines ou à des lipides. Pour connaître la nature des glycoprotéines ou plutôt la composition de leurs chaînes glucidiques nous avons entamé l'étude de ces glycopeptides en soumettant des plaquettes à l'hydrolyse par des enzymes protéolytiques comme la pronase.

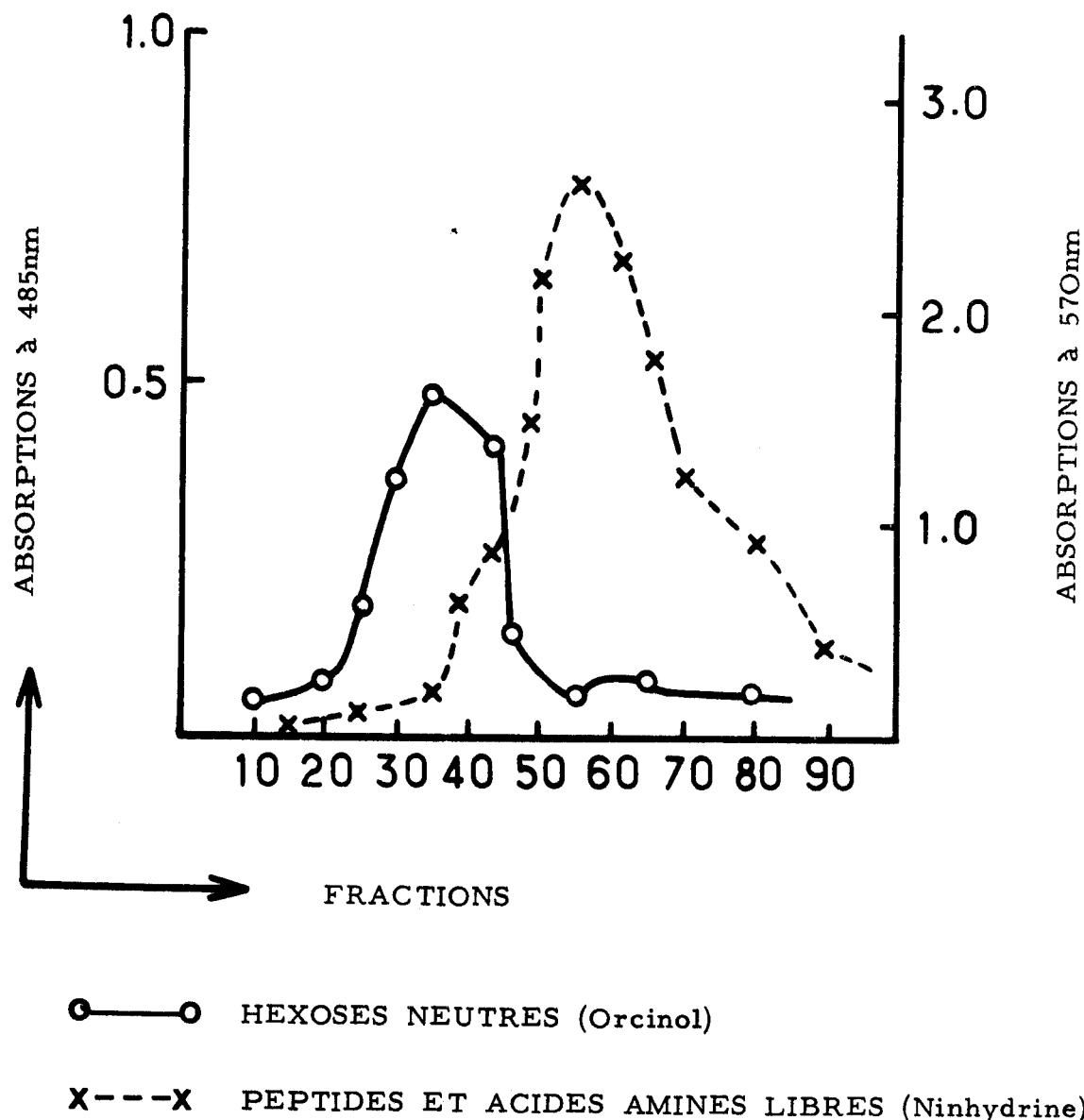
Mode opératoire : nous avons effectué les étapes suivantes :

- dégradation par la pronase
- isolement des glycopeptides : par chromatographie sur colonne Sephadex, et par électrophorèse sur papier
- dosages des glucides dans les glycopeptides,

selon les méthodes décrites dans l'annexe technique.

Figure D.  
A. 1.

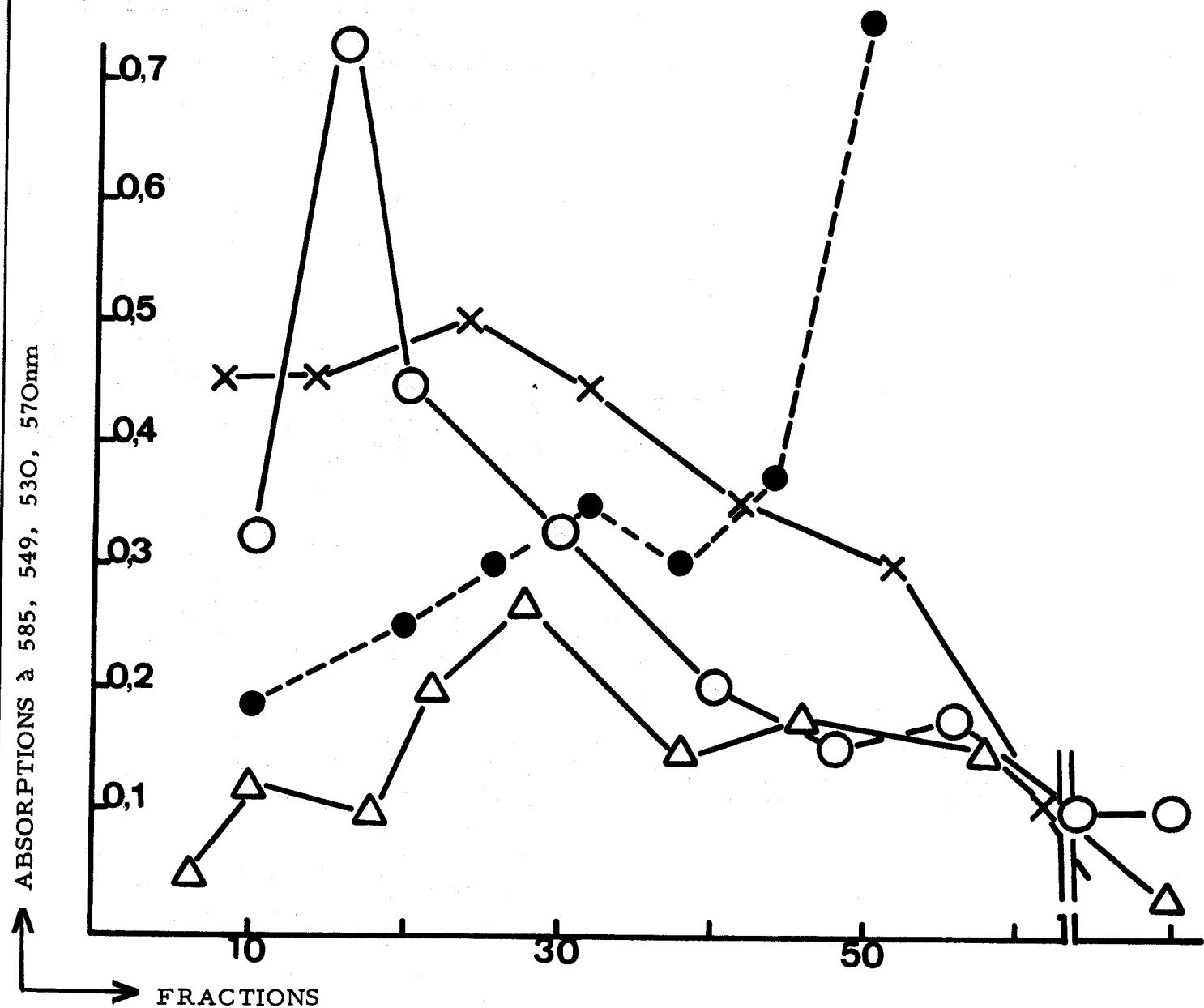
CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE SEPHADEX G-25 D'UN  
HYDROLYSAT PRONASIQUE DES PLAQUETTES NORMALES



BUS  
UILLÉ

Figure D.  
A. 2 (+)

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DEAE-SEPHADEX  
DU MELANGE DES GLYCOPEPTIDES PLAQUETTAIRES



Les courbes correspondent avec les taux des glucides et acides aminés dans les éluats recueillis.

**X** HEXOSES NEUTRES (Anthrone)

**O** HEXOSAMINES (Erlich)

**Δ** ACIDE SIALIQUE (Warren)

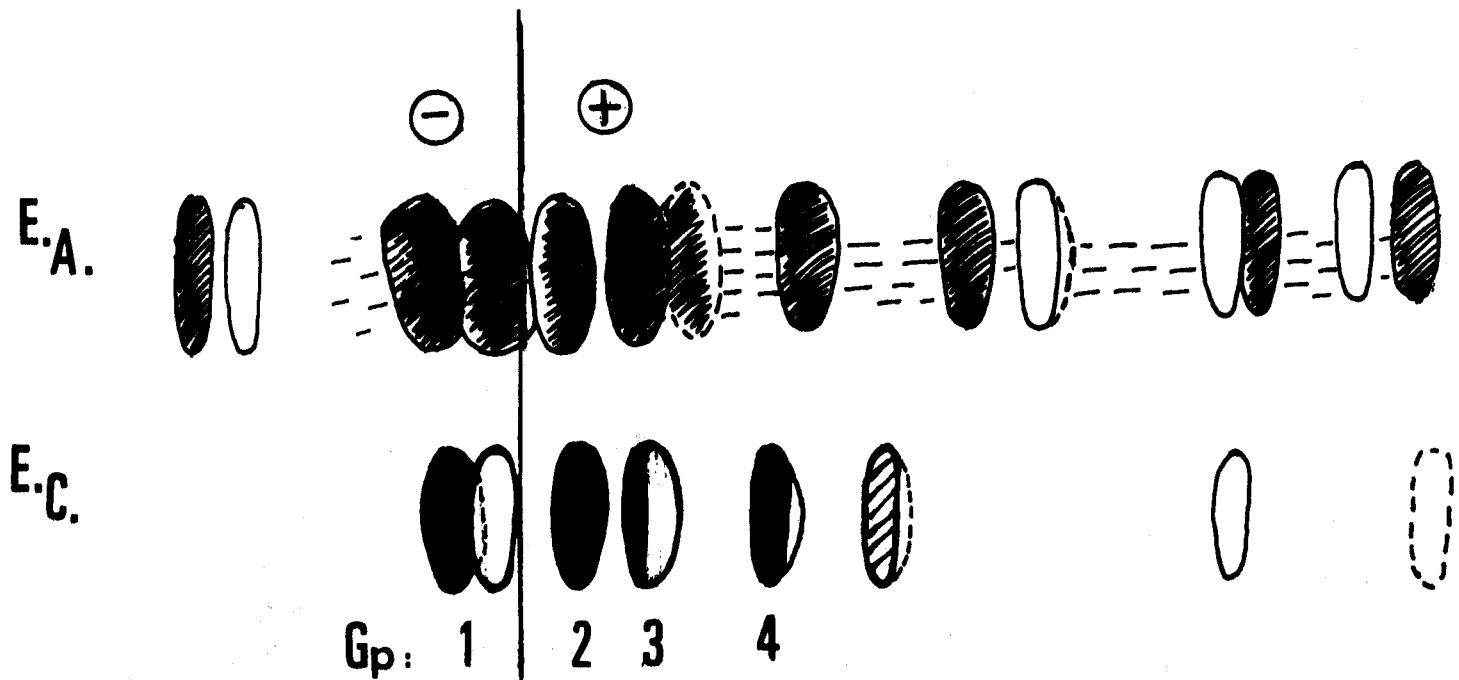
**—●—** PEPTIDES ET ACIDES AMINES  
(Ninhydrine)

+ (voir protocole d'analyse p. 53)



a) Isolement des glycopeptides issus de la dégradation pronasique des plaquettes normales par électrophorèse sur papier

Figure E. A. E. C.



Selon la migration sous haut voltage de l'électrophorèse sur papier on peut distinguer les principaux glycopeptides : 1, 2, 3, 4.

b) Caractérisation des glycopeptides par leur teneur en glucides

"L'éluat riche en glucides" contenant un mélange des glycopeptides plaquettaires a été dosé pour obtenir des teneurs globales en glucides.

Composition glucidique de mélange des glycopeptides purifiés :

HEXOSES NEUTRES....18 ± 5 %

HEXOSAMINES.....29 ± 5 %

ACIDE SIALIQUE.....15 ± 10 %

L-FUCOSE..... 2 ± 10 %

Au total 64 % de glucides ont été trouvés sur le poids sec de substances lyophylisées.

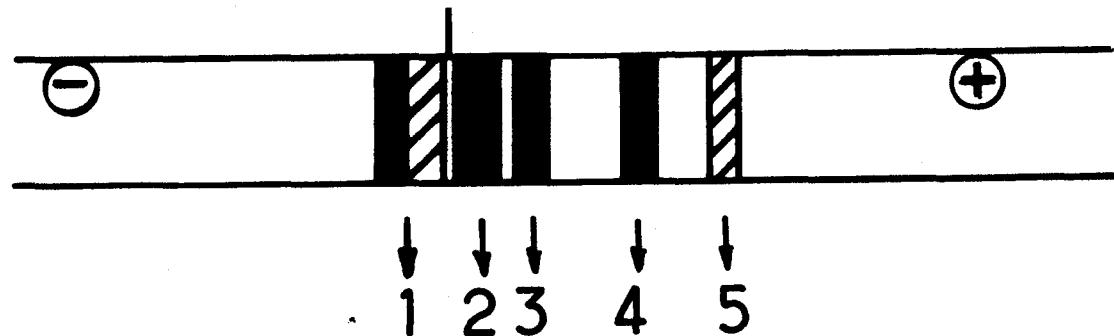
Nous résumons les résultats des 3 étapes de l'analyse des glycoprotéines plaquettaires sur le tableau 1.I

1. Electrophorèse,
2. Analyse qualitative des glucides,
3. Dosages quantitatifs des glucides.

Tableau 1.I

Etape 1 : Electrophorèse sur papier des glycopeptides plaquettaires issus d'un hydrolyse pronasique, après purification sur colonne Sephadex.

Figure 1.2.



Etape 2 : Chromatographie qualitative des glucides des glycopeptides issus d'une hydrolyse acide (des taches éluées du papier d'électrophorèse) :

	1	2	3	4	5
Acide sialique	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	-	+	-
D-mannose	+	+	-	+	-
D-glucosamine	+	+	+	+	+
D-galactosamine	-	+	-	+	-
L-fucose	+	+	-	-	+

Etape 3 : Résultats des dosages quantitatifs des glucides des glycopeptides :

	Gp 1	Gp 2	Gp 4	
ACIDE SIALIQUE.....	7,0	15,0	22,0	µg/100 µg de substances lyophylisées
HEXOSES.....	20,0	21,0	15,0	µg/100 µg "
HEXOSAMINES.....	30,0	25,0	30,0	µg/100 µg "

Les glycopeptides principaux notamment le 1, 2 et 4 peuvent être caractérisés par les rapports de leurs teneurs en glucides de la façon suivante : (Figure 1.3)

BIG  
LILLE

Figure 1.3

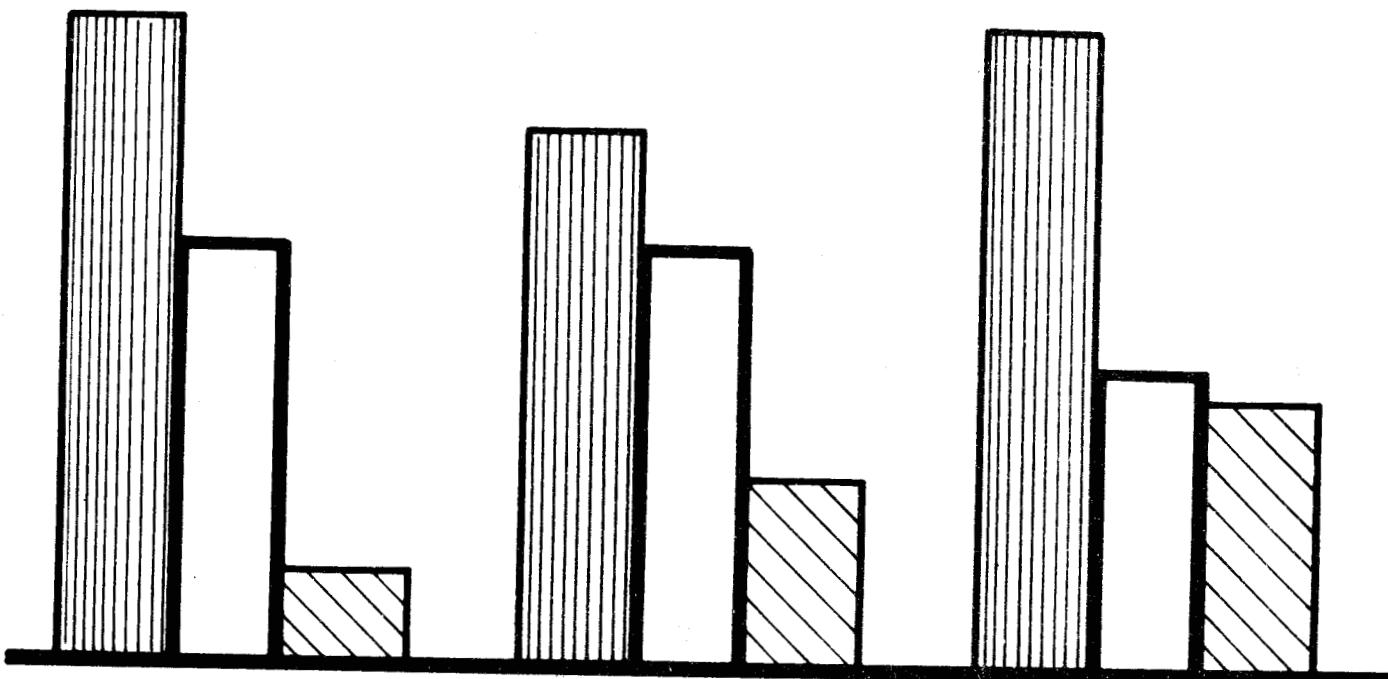
CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES PLAQUETTAIRES  
PAR LEUR TENEUR EN GLUCIDES

	1	2	4
ACIDE SIALIQUE	2,3 résidus	5,0 résidus	7,3 résidus
HEXOSES	11,0 "	11,0 "	8,0 "
HEXOSAMINES	17,0 "	14,0 "	17,0 "

GP.1.

GP.2.

GP.4.



HEXOSAMINES



HEXOSSES



ACIDE SIALIQUE

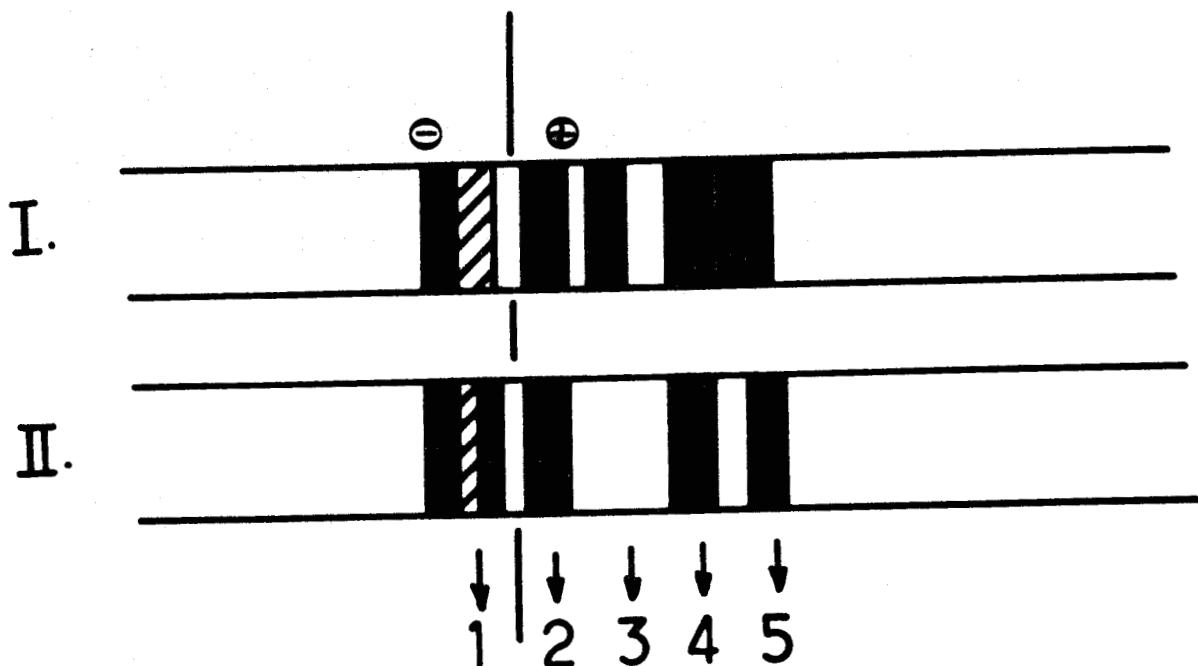


Nous avons tenté de différencier les glycopeptides provenant des glycoprotéines de ceux qui ont leur origine dans les glycolipides. Pour cela nous avons pratiqué des électrophorèses comparatives sur les hydrolysats pronasiques :

- I - d'une part d'un homogénat de plaquettes entières (D.A.)  
II - d'autre part d'un homogénat de plaquettes dont la partie lipidique avait été extraite (D.C.)

Figure 1.4

ELECTROPHORESE DES ECHANTILLONS D.A. ET E.C. (Protocole p: 53)



On peut observer sur le chromatogramme la disparition de la tache 3. Les dosages gravimétriques ont montré que les glycopeptides 1 et 4 sont aussi diminués.

Electrophorèse à 4000 V - 30 min., pH 6,3.

E<sub>A</sub> : Mélange des glycopeptides élués de colonne Séphadex G 25.

E<sub>C</sub> : Mélange des glycopeptides purifiés sur colonne DEAE Séphadex

En conclusion de ces résultats, on pourrait dire :

- que les glycopeptides "1" et "2" présentent les chaînes glucidiques caractéristiques des GLYCOPROTEINES PLASMATIQUES, comme le fibrinogène et le FSF, etc..
- que le glycopeptide "4" présente les chaînes glucidiques qui caractérisent les GLUCOSAMINYLGLYCANNES,
- que le glycopeptide "3" doit être issu d'un glycolipide
- que les 8 %, 1,4 % et 2,5 % de glycopeptide "1", "2" et "4" respectivement, sont issus des glycolipides (non identifiés).

TABLEAU F. (voir protocol p:53)

COMPOSITION DES PLAQUETTES ENTIERES ISOLEES, LAVEES.

PROTEINES	54,5	%	sur poids sec
LIPIDES	20,9	%	" "
(GLYCOLIPIDES	2,9	%	)
GLUCIDES	6,39	%	sur protéines
SEROTONINE	2,4	%	sur poids sec
GLYCOGENE (en D-GLUCOSE)	1,8	%	" "

COMPOSITION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DES PLAQUETTES

<u>FRACTIONS INSOLUBLES</u>	<u>FRACTIONS SOLUBLES</u>
PROTEINES 68,5 %	31,5 % sur poids sec
LIPIDES 33,84 %	8,7 % "
( GLYCOLIPIDES 3,10 %)	( 1,1 % )
GLUCIDES 7,7 %	4,5 % sur protéines
( ACIDE SIALIQUE 1,7 %)	( 0,57 % ) sur protéines

## C H A P I T R E 2

### ETUDE DES PLAQUETTES PATHOLOGIQUES

#### 1. CARACTERISATION DES PLAQUETTES PATHOLOGIQUES PAR LA VARIATION DE LEUR TENEUR EN GLUCIDES

Nos recherches sur les cas pathologiques ont eu pour but la caractérisation des changements chimiques des chaînes glucidiques correspondant aux anomalies fonctionnelles des plaquettes.

Nous avons effectué des séries d'analyses sur des échantillons des plaquettes isolées de 17 cas normaux parallèlement avec des échantillons de plaquettes de 4 cas de thrombopathie congénitale et de 3 cas de thrombopathie, acquise, ou syndrome préleucémique.

Les résultats obtenus nous ont permis de caractériser la structure de leurs constituants glucidiques.

Les anomalies des taux d'acide sialique et celles des taux du L-fucose dans les cas pathologiques se manifestent dans les rapports avec des autres sucres et avec la teneur totale en glucides.

Compte tenu du nombre limité des cas étudiés, compte tenu aussi du fait qu'il n'a pas été possible de suivre dans le temps l'évolution des cas pathologiques, il serait prématuré de vouloir en tirer des conclusions définitives. Nous espérons cependant que nos travaux ouvrent une voie qu'il est valable de poursuivre.

### Mode opératoire

Nous avons effectué l'analyse de la structure des glucides des cellules lavées en deux temps. Dans une première série nous avons dosé les oses, hexoses, hexosamines, acides sialiques, pour obtenir les teneurs totales. Dans une autre série de travaux nous avons effectué une étude cinétique de l'hydrolyse sur les échantillons de plaquettes intactes par différents agents chimiques pour obtenir les taux de glucides dans les meilleures conditions.

Les résultats obtenus peuvent être résumés de la façon suivante :

Tableau 1.IV

### DOSAGES DES GLUCIDES PAR LES METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES

#### PLAQUETTES

GLUCIDES	de 17 cas normaux	de 4 cas de Thrombasthénie congénitale *	de 3 cas de syndromes ** préleucémiques
HEXOSSES NEUTRES	4,70	4,47	4,54
HEXOSAMINES	1,45	1,66	1,62
ACIDE SIALIQUE	0,84	0,57	0,44
L-FUCOSE	0,18	0,24	0,27
TOTAL	7,17 %	6,94 %	6,87 %

Les valeurs sont exprimées en microgramme par 100 microgrammes de protéines plaquettaires (Lowry).

\* Les 4 cas de thrombasthénie congénitale sont : Ca...A, LIE, BLA, Ca...M.

\*\* Les 3 cas de syndromes préleucémiques sont : BRO-Mir., LAG, FEN

Déterminés par des méthodes de chromatographie sur papier et sur couche mince, les sous-unités des composants glucidiques se présentent dans la proportion suivante :

Tableau 1.V

GLUCIDES*	PLAQUETTES		
	NORMALES	THROMBASTHENIQUES	PRELEUCEMIQUES
	%	%	%
D-MANNOSE	1,04	0,92	0,98
D-GLUCOSE	1,30	1,29	1,22
D-GALACTOSE	1,62	1,38	1,30
D-GLUCOSAMINE	1,35	1,54	1,45
D-GALACTOSAMINE	0,17	0,24	0,27
ACIDE SIALIQUE N-acétyle	0,80	0,57	0,42
ACIDE SIALIQUE N-glycolyle	0,07	0,06	0,09
L-FUCOSE	0,19	0,22	0,23
TOTAL	6,54 %	6,25 %	5,95 %

\* Exprimé en % sur la teneur en protéines (Lowry).

On peut noter un écart entre les valeurs du taux des glucides issus de deux séries d'analyses : cet écart est dû aux méthodes peut-être insuffisamment adaptées aux quantités faibles de substances et aux taux très bas des composants.

D'après les moyennes des résultats obtenus par des méthodes différentes, la proportion de chaque composant de la partie glucidique des plaquettes peut être illustrée de façon suivante : chaque glucide est exprimé en % sur la totalité de la teneur des glucides des cas étudiés, où les teneurs totales sont respectivement de : 6,39 - 5,95 - 5,78 %.  
(Tableau 1.VI, Figure 1.5).

Tableau 1.VI

REPARTITION DES TAUX DES COMPOSANTS DE LA PARTIE GLUCIDIQUE  
DES PLAQUETTES NORMALES ET PATHOLOGIQUES  
EN POURCENT SUR DES GLUCIDES TOTAUX

GLUCIDES	PLAQUETTES		
	normales	thrombasthéniques	préleucémiques
TOTAL soit 100 %	6,39	5,95	5,78
D-MANNOSE	16,20 %	15,56 %	17,03 %
D-GLUCOSE	19,80 %	21,70 %	21,10 %
D-GALACTOSE	25,10 %	23,08 %	22,50 %
HEXOSAMINES	22,65 %	26,10 %	27,28 %
ACIDE SIALIQUE	13,06 %	9,47 %	7,10 %
L-FUCOSE	2,81 %	3,80 %	4,50 %
Bilan	99,62 %	99,81 %	100,03 %

2. LES DIFFERENTS DEGRES DE DIMINUTION DE LA TENEUR EN ACIDE  
SIALIQUE

L'analyse de la portion d'acide sialique et de L-fucose dans la partie glucidique des plaquettes des cas pathologiques est d'une importance primordiale. Nous avons comparé les taux d'acide sialique des plaquettes des cas de thrombasthénie congénitale et des cas de thrombopathie acquise préleucémique.

Mode opératoire

L'acide sialique a été dosé après l'hydrolyse cinétique des plaquettes de 4 cas de thrombasthénie congénitale et 3 cas de préleucémie par rapport à la moyenne de 17 témoins (cas normaux).

Les moyennes des résultats que nous avons obtenus par des analyses effectuées parallèlement sur les plaquettes des sujets témoins (normaux) et sur celles des sujets malades (cas de thrombasthénie et préleucémiques) sont illustrées dans la figure 1.6. Les courbes tracées montrent des caractères différents en fonction des temps d'hydrolyse où les valeurs maximales ont été enregistrées. La diminution de la teneur en acide sialique est plus importante pour les plaquettes des sujets préleucémiques que pour les plaquettes des sujets atteints de thrombasthénie.

Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

- La teneur en acide sialique des plaquettes des cas de thrombasthénie congénitale par rapport à la moyenne des plaquettes normales :

PLAQUETTES

Moyenne des cas normaux..... 100 %

THROMBASTHENIES  
CONGENITALES

LIE.....	66 %
ANI.....	60 %
MAR.....	61 %
BLA.Chr.....	56 %

- La teneur en acide sialique des plaquettes lavées des cas de thrombopathie acquise (préleucémie) par rapport à la moyenne des plaquettes normales :

PLAQUETTES

Moyenne des cas normaux..... 100 %

THROMBOPATHIES  
ACQUISES

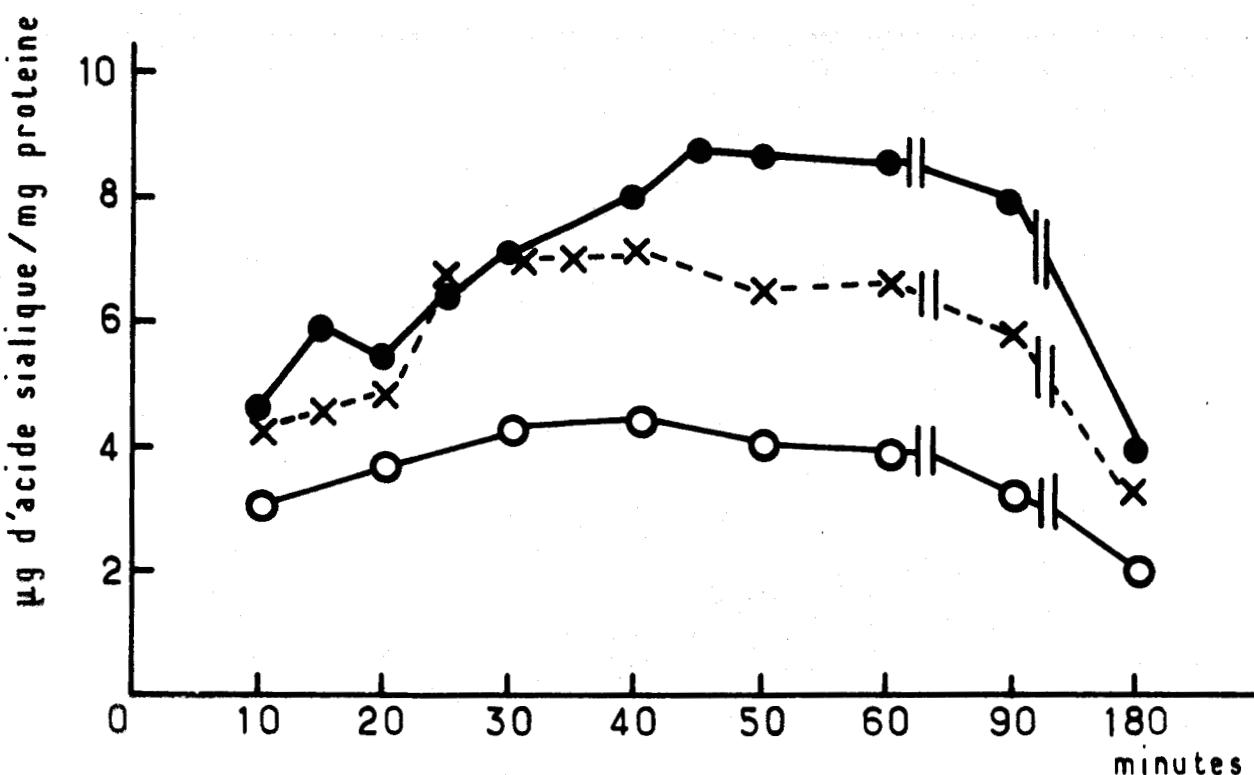
LAG.....	77 %
FEN.....	53 %
BRO.mir.....	28 %

En conclusion des résultats que nous avons exposés, il semble permis de dire que l'on peut caractériser les cas précités de pathologie plaquettaire par le degré de la diminution du taux d'acide sialique des plaquettes (111).

Figure 1.6.

LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE AU COURS DE L'HYDROLYSE  
ACIDE DES SUSPENSIONS DE PLAQUETTES LAVEES

- PLAQUETTES NORMALES
- ✖ PLAQUETTES THROMBASTHENIQUES
- PLAQUETTES PRELEUCEMIQUES



SGS  
LILLE

### 3. TAUX AUGMENTÉ DE L-FUCOSE.

Dans les cas pathologiques il ne s'agit pas d'une simple élimination d'acide sialique, mais un changement complexe de la partie glucidique. Si on regarde la composition des chaînes glucidiques (présentée plus haut dans le tableau III et figure I) on peut constater que dans la plupart des cas, la diminution de l'acide sialique est compensée par l'accroissement de la teneur en L-fucose.

Pour mettre en évidence le rapport entre les taux d'acide sialique et du L-fucose dans les différents cas de pathologie plaquettaire nous avons exécuté les analyses sur les plaquettes des cas précités.

#### Mode opératoire

Selon les figures que nous avons présentées plus haut les hydrolyses partielles des plaquettes lavées nous ont permis d'établir les courbes de la libération d'acide sialique en fonction du temps d'hydrolyse et en même temps d'en obtenir la teneur dans les conditions optimales. Le taux du L-fucose a été déterminé par chromatographie sur papier et sur couche mince.

#### Résultats;

Nous présentons sur le tableau ci-dessous les résultats d'analyses des trois types précités d'anomalies et nous les comparons avec ceux des plaquettes normales :

Tableau 1.VII

PLAQUETTES	ACIDE SIALIQUE μg/100 μg	L-FUCOSE μg/100 μg	RAPPORT SIA/FUC
NORMALES	0,84	0,18	4
Type I THROMBASTHENIQUES	LIE	0,64	non déterminé
	Ca.A	0,54	0,20
	CA.M	0,57	0,22
Type II	BLA.	0,52	0,24
	HER	0,71	0,27
Syndromes PRELEUCEMIQUES	BRO	0,26	0,24
	Mir.		1,1
	FEN	0,43	0,20
	LAG	0,60	0,21
			2,9

Selon les moyennes des valeurs présentées ci-dessus les rapports d'acide sialique/L-fucose seront pour les plaquettes normales  $0,84/0,18 = 4$ , pour les plaquettes thrombastheniques  $0,57/0,22 = 2,5$  et pour les plaquettes de syndromes préleucémiques  $0,42/0,22 = 2$

Figure 1.7

VARIATION DES TAUX D'ACIDE SIALIQUE ET DU L-FUCOSE DES  
PLAQUETTES PATHOLOGIQUES

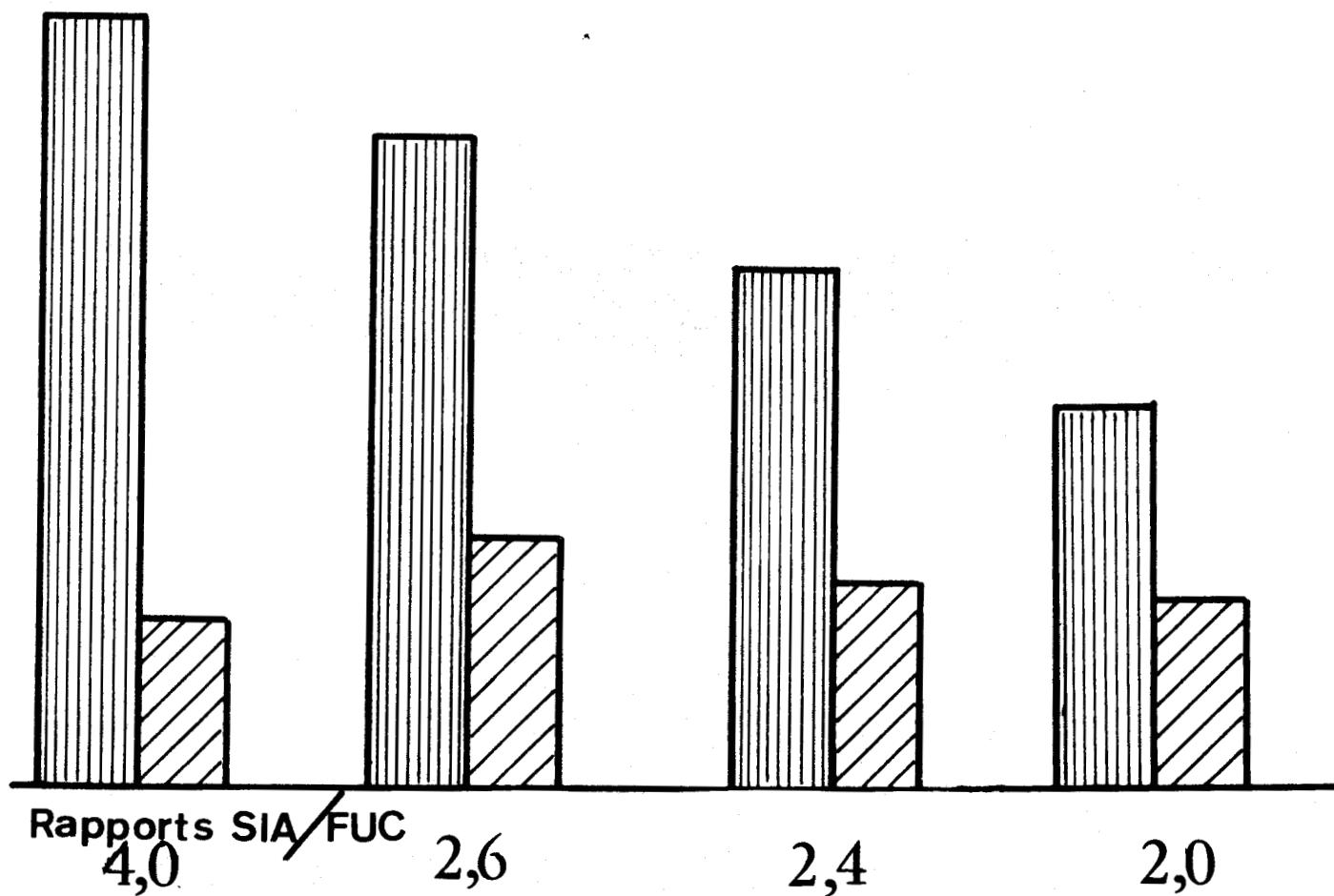
PLAQUETTES :

NORMALES

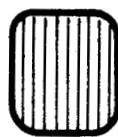
THROMBASTHENIQUES  
TYPE II rare

TYPE I  
fréquente

SYNDROMES  
PRELEUCEMIQUES



ACIDE SIALIQUE



L-FUCOSE



## 6. ANOMALIES DANS LA REPARTITION DU TAUX D'ACIDE SIALIQUE ENTRE LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DES PLAQUETTES PATHOLOGIQUES

Nos résultats suggèrent qu'il existe des modifications de la charge négative de la surface plaquettaire pour des causes différentes :

- il y a les cas où l'acide sialique est anormalement bas et où l'acide sialique manquant est remplacé par le L-fucose ;
- il y a les cas où le taux d'acide sialique est normal, mais sa charge négative est masquée, par un taux accru de L-fucose.

Pour confirmer ces hypothèses nous n'avons que des résultats préliminaires. D'abord nous avons essayé de localiser l'acide sialique dans les plaquettes entières par des dosages faits sur les parties insolubles et solubles des plaquettes broyées (normales et des plaquettes des cas de thrombopathie plaquettaire).

Les rapports entre le taux d'acide sialique des fractions insolubles et celui des fractions solubles sont les suivants :

Plaquettes normales	4,8
Plaquettes thrombasthéniques	{ Type I 3,1 Type II 2,7

Nos résultats présentés ne concernent que la répartition approximative de l'acide sialique. Il sera très utile de pouvoir mettre en évidence la répartition de L-fucose dans les cas précités. Ceci permettrait de prouver que la cause de la modification de la charge négative des plaquettes dépend de ces deux sucres terminaux.

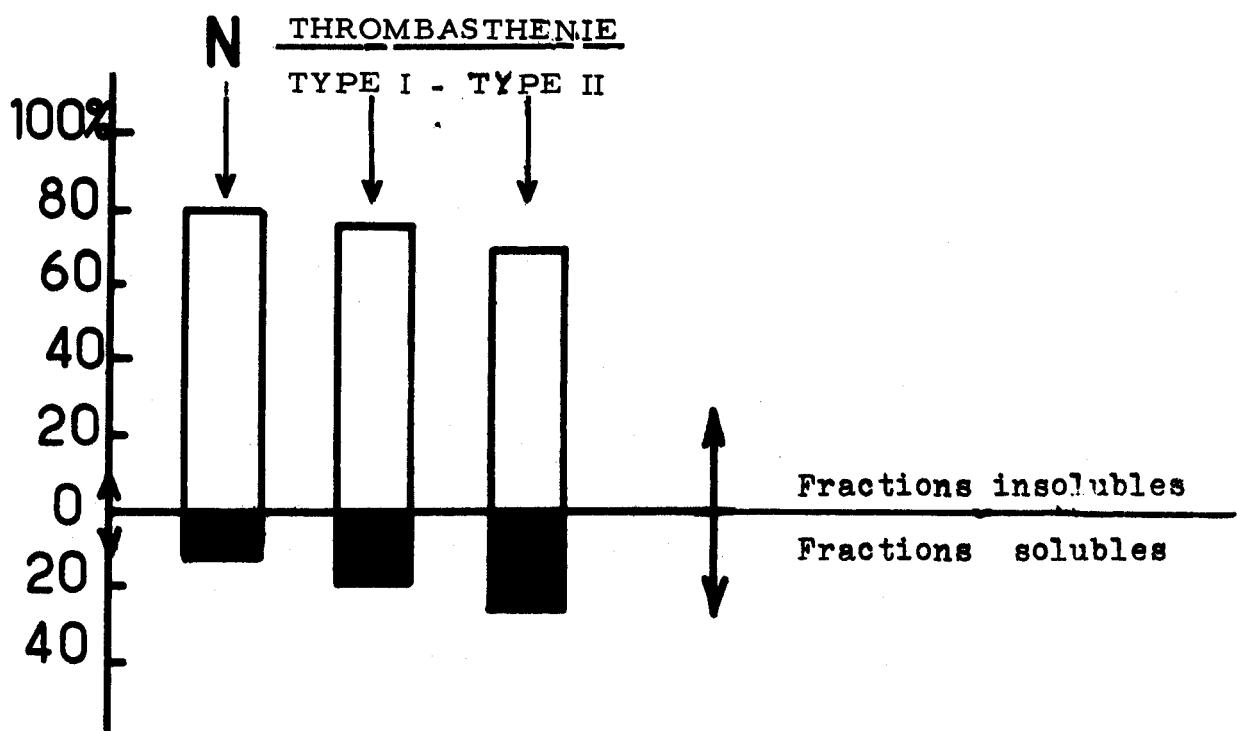
Tableau 1.IX

TENEUR EN ACIDE SIALIQUE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES  
DES PLAQUETTES PAR RAPPORT A LA TENEUR DES PLAQUETTES ENTIERES

Fractions cellulaires	PLAQUETTES :					
	normales		thrombasthéniques			
	$\mu$ g NANA*	%	$\mu$ g NANA	%	$\mu$ g NANA	%
Insolubles	6,72 $\mu$ g	80	5,51 $\mu$ g	76	3,57 $\mu$ g	70
Solubles	1,38 $\mu$ g	16	1,41 $\mu$ g	19	1,27 $\mu$ g	25
Plaquettes entières	8,4 $\mu$ g	100	7,2 $\mu$ g	100	5,12 $\mu$ g	100
Bilan		96		95		95

BBS  
LILLE

REPARTITION DU TAUX DE L'ACIDE SIALIQUE ENTRE LES FRACTIONS  
SUBCELLULAIRES DES PLAQUETTES NORMALES (N) ET DES  
PLAQUETTES DES CAS PATHOLOGIQUES  
(THROMBASTHENIE TYPE I ET TYPE II)



DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDES ENZYMATIQUES

## CHAPITRE 1

### BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

#### 1. INTRODUCTION

Pour mettre en évidence le rôle de l'acide sialique dans les fonctions de la surface plaquettaire, nous avons modifié son taux initial : d'une part nous l'avons diminué par dégradation enzymatique, et, d'autre part, augmenté par incorporation de molécules d'acide sialique.

Avant d'exposer nos travaux dans ce domaine il nous semble nécessaire de rappeler des connaissances sur la biosynthèse des glycoprotéines plasmatiques.

#### 2. MECANISME ET LOCALISATION

Les microsomes des cellules du foie sont les sites fondamentaux de la biosynthèse des glycoprotéines plasmatiques à l'exception des immunoglobulines.

La chaîne polypeptidique des glycoprotéines est synthétisée au niveau des ribosomes par le mécanisme de message génétique qui détermine le nombre et la séquence des acides aminés. Le tout est commandé par un unique système enzymatique probablement sans spécificité.

Au contraire la biosynthèse des chaînes glucidiques des glycoprotéines se produit sous l'action d'un système spécifique

de multiglycosyltransferases. La structure des chaînes glucidiques est déterminée très probablement par un contrôle génétique indirect. Les enzymes glycosyltransferases exigent des substrats appropriés à leur spécificité, ils transfèrent des glucides à partir des nucléotides-sucres correspondants vers les accepteurs (glycoprotéines) incomplets. (143)

De nombreuses hypothèses ont été avancées sur la localisation de la biosynthèse des chaînes glucidiques des glycoprotéines. Les travaux de MOLNAR, ROBINSON et WINZLER (1965) (114), LAWFORD et SCHACHTER (1966) (84), MOLNAR et SY (1967) (123), LOUISOT et Coll. (1970) (93) ont démontré que :

- la N-acétylglucosamine initiale est vraisemblablement attachée à la chaîne polypeptidique dont la synthèse est encore en cours sur les ribosomes,
- après la séparation des polypeptides d'avec les ribosomes la glycosylation se déroule au cours du passage des glycoprotéines dans les canaux du reticulum endoplasmique et de l'ergastoplasme.

Les travaux de LOUISOT et GOT (1968) (92) ont mis en évidence que l'acquisition des chaînes glucidiques d'une glycoprotéine peut s'effectuer au niveau de trois sites cytoplasmiques différents, à savoir : les ribosomes, les membranes endoplasmiques, et la phase cytoplasmique isolée à partir de cellules. Ces fractions subcellulaires montrent des sites de glycosylation indépendants les uns des autres.

Selon les auteurs précités, la présence de glycoprotéines (observée au microscope électronique) dans les (92) appareils de Golgi ne signifie pas qu'il s'agisse là d'un site préférentiel de glycosylation. Le rôle des appareils de Golgi se manifeste dans la concentration et la déshydratation précrétoire des protéines destinées à l'excrétion.

a) Appareils de Golgi

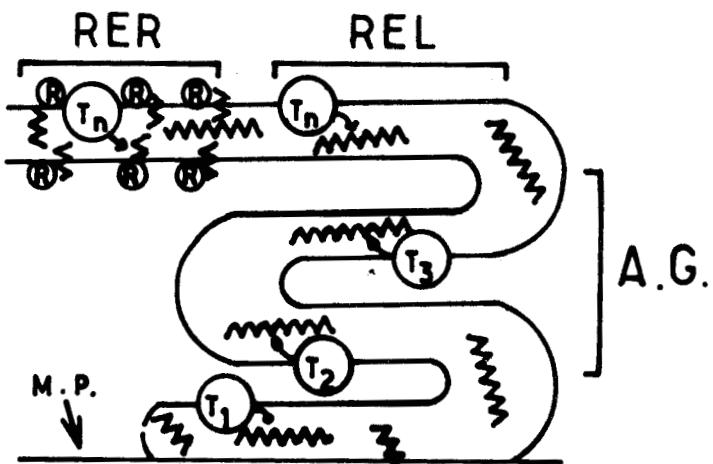
Les fractions subcellulaires du foie riches en appareils de GOLGI montrent une activité très élevée de sialyltransférases. Les membranes des tubules des appareils de GOLGI présentent des sites de glycosylation (84,139).

Le cheminement que les glycoprotéines suivent dans les tubules de l'appareil de GOLGI en se complétant avec des glucides, a été suggéré par SCHACHTER et Coll. (1970) (150). En effet, HEATH (1971) (66) par application d'une technique de coloration sélective pour les glucides, a pu mettre en évidence au microscope électronique que l'appareil de GOLGI présente des substances osidiques en quantité importante du côté aval où se trouvent les glycoprotéines secrétées. Par contre, on trouve très peu de coloration due aux sucres, dans la partie amont de l'appareil de GOLGI, par où les précurseurs des glycoprotéines entrent dans l'appareil de GOLGI.

La localisation subcellulaire des glycosyltransférases dans l'appareil de GOLGI, et leur fonction a été étudiée par ROSEMAN et Coll. (1970) (144). Les transférases sont initialement localisés dans la membrane, des glycoprotéines se trouvent dans les tubules et les nucléotides sucres sont présents dans le cytoplasme de l'appareil de GOLGI. On trouve donc de part et d'autre de la membrane : les oses nucléotides et les glycoprotéines incomplètes. Pour qu'une quantité d'ose issue d'un nucléotide puisse être transférée sur une glycoprotéine, il faut bien supposer que les transférases traversent la membrane des tubules et établissent à travers celle-ci un relais permettant aux unités d'oses de la traverser. Cette hypothèse s'accorde avec les résultats des observations faites sur les membranes des bactéries.

Figure 2.1

LE CHEMINEMENT DES GLYCOPROTEINES PENDANT LEUR BIOSYNTHESE  
DANS L'APPAREIL DE GOLGI (150)



AG : appareil de GOLGI

T<sub>n</sub> : glycosyltransférases

RER : reticulum endoplasmique  
de surface rugeuse

T<sub>3</sub> : N-acétylglucosaminyl  
transférase

REL : reticulum endoplasmique  
de surface lisse

T<sub>2</sub> : galactosyltransférase

MP : membrane plasmique de  
cellule de foie

T<sub>1</sub> : sialyltransférases

R : ribosomes

: précurseurs des glycopro-  
téines.

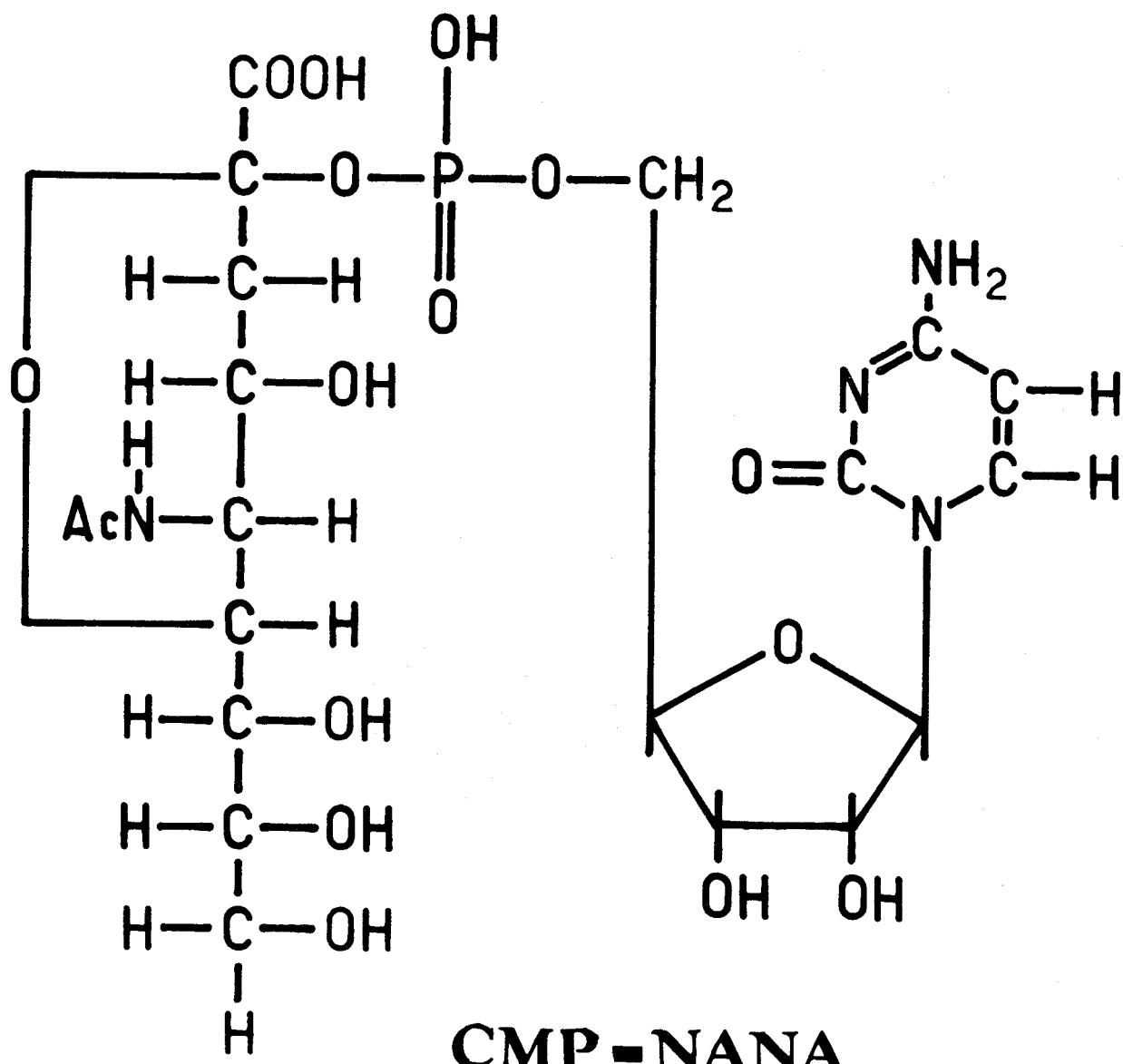
b) Nucléotides-sucres

Les nucléotides-sucres ou glycosyldiphosphonucléosides sont d'après LELOIR et CARDINI (1957) (87) les formes actives des glucides dans la biosynthèse des glycoprotéines :

Tableau 2.I

Unité de glucides	Nucléotides	Abréviation
GALACTOSE	URIDINE-DIPHOSPHOGALACTOSE	UDP-Gal
MANNOSE	GUANOSINE-DIPHOSPHOMANNOSE	GDP-Man
GLUCOSE	URIDINE-DIPHOSPHOGLUCOSE	UDP-Glu
FUCOSE	GUANOSINE-DIPHOSPHOFUCOSE	GDP-Fuc
N-ACETYLGLUCOSAMINE	UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE	UDP-GluNAc
N-ACETYLGALACTOSAMINE	UDP-N-ACETYLGALACTOSAMINE	UDP-GalNAc
ACIDE N-ACETYLNEURAMINIQUE	ACIDE CYTIDINE-MONOPHOSPHO-N-ACETYLNEURAMINIQUE	CMP-NANA

a) Forme active de l'acide sialique



BUS  
LILLE

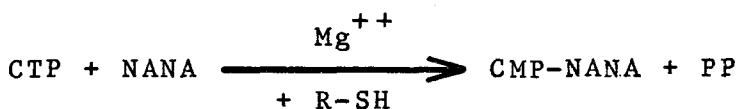
β) Biosynthèse de CMP-NANA

HULTSCH et Coll. (1972) (75) ont démontré qu'une fraction soluble du foie de rat peut convertir le N-acétylglucosamine en acide sialique en présence de ATP et UTP. De plus ce système, quand il est complété avec un taux additionné de CTP peut fournir le CMP-NANA.

Les analyses cinétiques ont montré que les intermédiaires se produisant au cours de la synthèse de CMP-NANA - par la méthode précitée - sont identiques à ceux qui ont été mis en évidence par les travaux de LELOIRE (88,89).

γ) Synthèse de CMP-NANA

Forme activée de l'acide sialique, l'acide cytidine-monophospho-N-acétylneuraminique (KEAN et ROSEMAN, 1966, (80) est préparé par condensation du CTP (cytidine triphosphate) avec l'acide N-acétylneuraminique en présence de l'enzyme sialyl-synthétase extrait des glandes sous-maxillaires de boeuf :



La réaction est effectuée en présence de groupements-SH apportés par le glutathion qui intervient comme protecteur vis à vis de l'enzyme en complexant les ions métalliques éventuellement présents.

c) Glycosyltransférases : sialyltransférases

Les enzymes glycosylférases catalysent le transfert des glucides à partir de son dérivé nucléotide, sur des chaînes glucidiques incomplètes de glycoprotéines. Parmi eux, les sialyltransférases sont impliquées dans le transfert de l'acide sialique. Ces enzymes exigent des substrats appropriés à leur spécificité. Ainsi les sialyltransférases repèrent sur les chaînes glucidiques des protéines incomplètes, les sites récepteurs qui correspondent :

- au dérivé de l'acide sialique
- à la structure de glucide accepteur
- et enfin à la position sur laquelle la liaison sera établie entre l'accepteur glucide et l'acide sialique.

Compte tenu de la grande variété des sialoglycoprotéines qui sont présents dans le sang, on pourrait imaginer qu'il y a plusieurs sialyltransférases qui interviennent dans leur biosynthèse. L'incorporation de l'acide sialique par la sialyltransférase de sérum et du foie a été étudiée par HUGGIN et Coll. (73). Ils ont trouvé que pour l'activité de sialyltransférase du sérum humain deux facteurs sont essentiels :

1. le résidu galactose en position terminale lié avec une liaison (1-4)
2. le résidu N-acétylhexosamine dans la position avant dernière.

La sialyltransférase de sérum est capable d'incorporer l'acide sialique :

- sur la glycoprotéine acide désialisé
- sur la fétuine
- sur la N-acétyl-lactosamine

et selon nos études,

- dans les plaquettes natives.

La sialyltransférase du foie du rat est capable de transférer l'acide sialique :

- dans les glycoprotéines désialisées
  - dans le fibrinogène désialisé,
- et selon nos résultats,
- dans les plaquettes natives et désialisées.

o o  
o

## C H A P I T R E 2

### DOSAGE DES SIALYLTRANSFERASES ET LEUR UTILISATION DANS L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LES PLAQUETTES

#### 1. NATURE ET LOCALISATION DE LA SIALYLTRANSFERASE DU FOIE DE RAT

L'activité de l'enzyme sialyltransférase du foie de sources différentes a été mise en évidence par les travaux de ROSEMANN (143), SPIRO (163), SCHACHTER et Coll. (150), PRICER et ASHWELL (139), LAWFORD et Coll. (84).

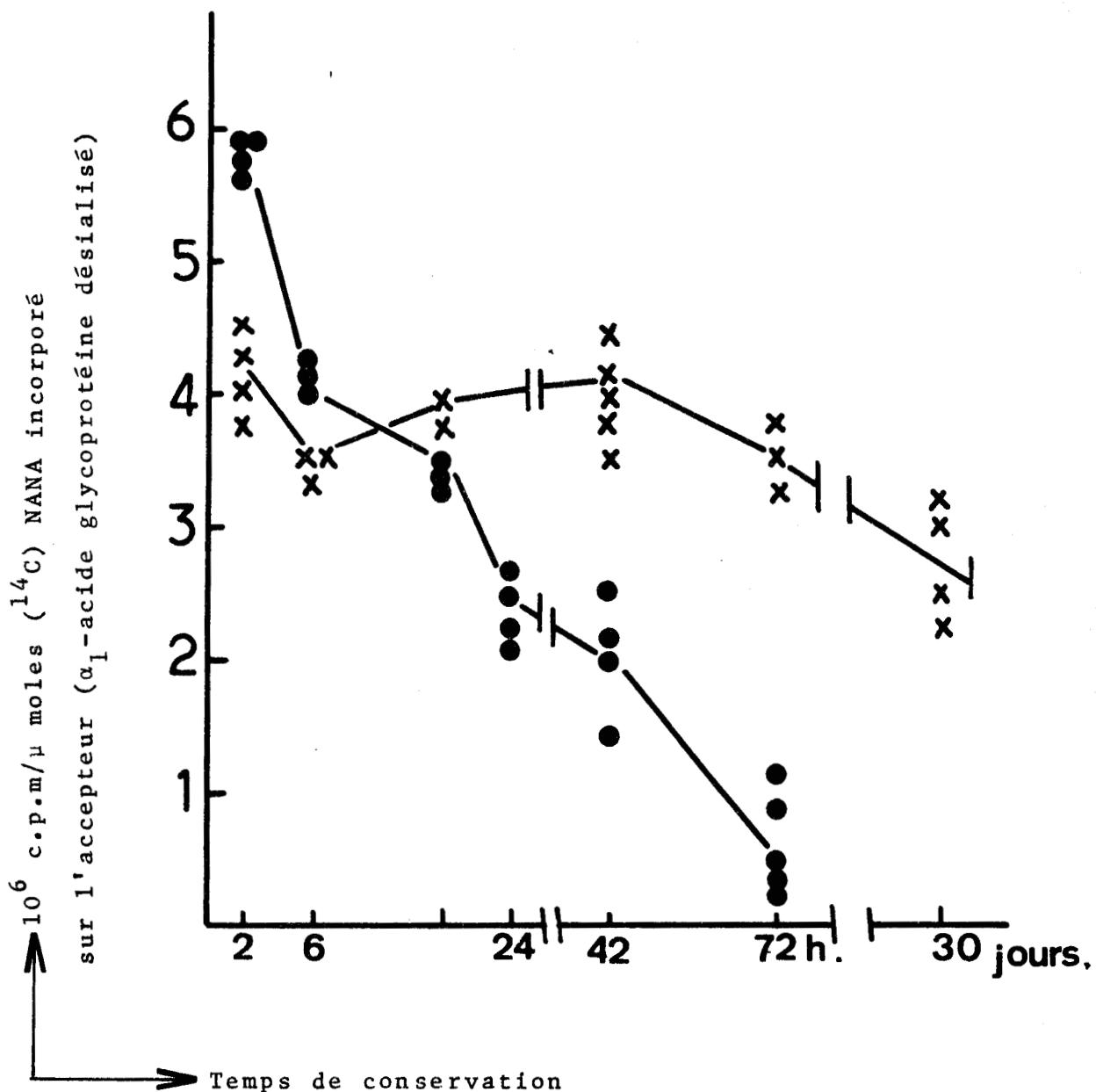
Les sialyltransférases présentes dans le foie sont liées à la membrane lisse et rugueuse des cellules. (Reticulum endoplasmique, appareils de Golgi). Ces enzymes, isolés, sous forme des fractions d'homogénat de foie, peuvent être conservés à - 20°C pendant plusieurs semaines.

Les sialyltransférases sont solubles dans les solvants organiques et, par extraction des fractions microsomaies hépatiques avec l'acétone, on obtient des fractions riches en sialyltransférases. Cependant l'enzyme ainsi purifié montre une activité peu durable. Après 42 heures les préparations d'enzyme perdent totalement leur activité (Figure 2.3).

On peut conclure de ce fait que la membrane sert avec son complexe de lipides, comme conservateur de l'activité de sialyltransférase dans les homogénats de foie. Ensuite, pendant l'incubation, l'enzyme est libéré par des détergents et peut entrer instantanément en action pour transférer l'acide sialique présent dans le mélange réactionnel, sous forme de CMP-NANA, vers le substrat approprié. (L'influence des détergents sur l'activité de sialyltransférases de l'homogénat de foie de rat est montrée sur la figure 2.4).

Figure 2.3

CONSERVATION DES FRACTIONS RICHES EN SIALYLTRANSFERASE DE FOIE DE RAT



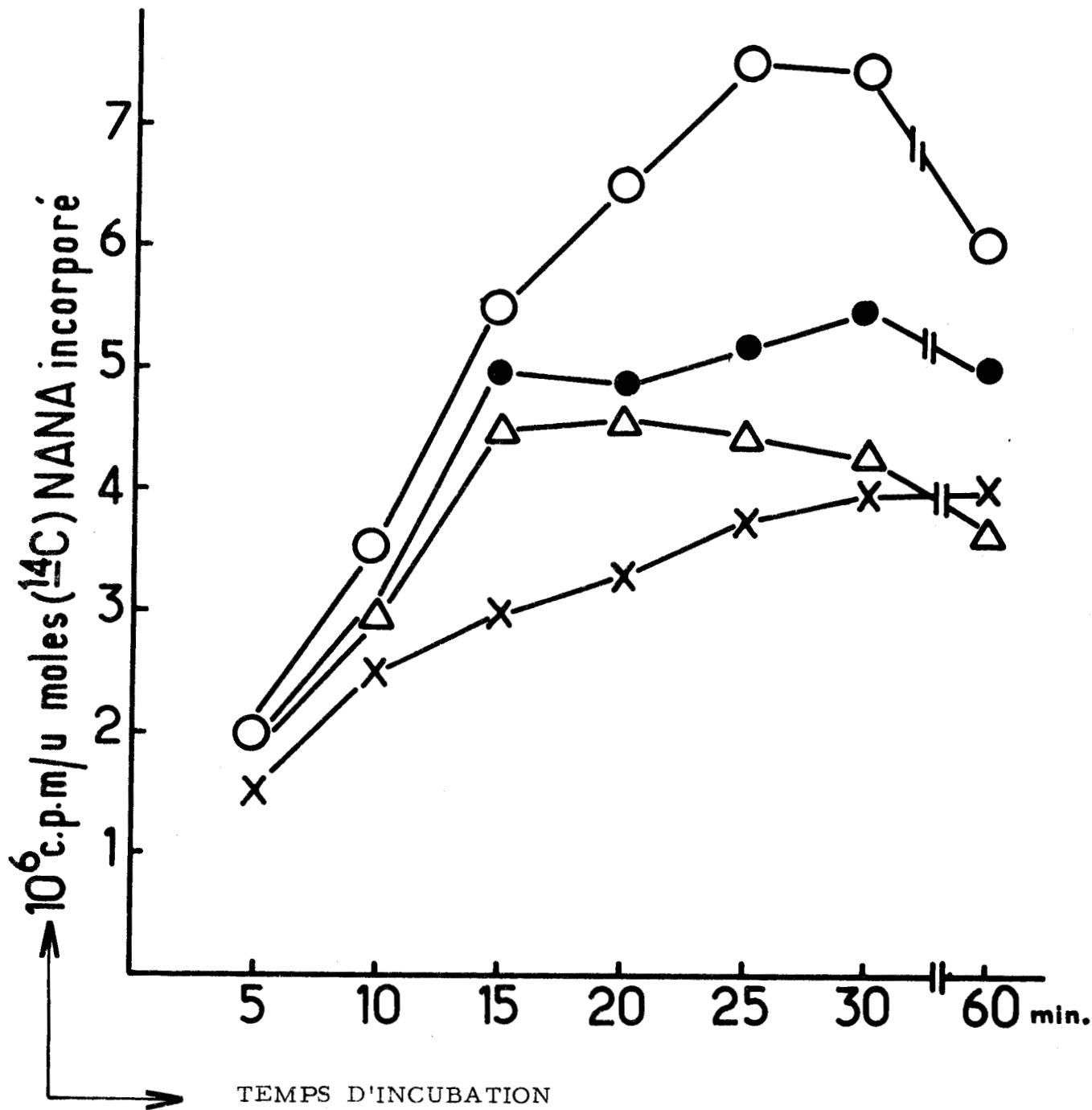
COMPARAISON DES ACTIVITES RESPECTIVES DANS LE TEMPS

- des fractions microsomales de foie de rat
- de l'extrait (par acétone) de l'enzyme sialyltransférase de foie de rat.



Figure 2.4

INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE DE SIALYLTRANSFERASE  
DE FOIE DE RAT



Mélange d'incubation : acide  $\alpha$ 1-glycoprotéine désialinisée + CMP-NANA + homogénat de foie de rat purifié

X sans détergent,

● avec PIPES+Triton-X (mélange habituel)

○ avec désoxycholate de sodium (DOC 0,12 %)

BUS  
LILLE

2. NATURE ET LOCALISATION DE SIALYLTRANSFERASES DES FRACTIONS DU SANG : DU SERUM, DU PLASMA RICHE EN PLAQUETTES, DES PLAQUETTES

La présence de l'activité de sialyltransférase dans le sérum humain a été mise en évidence par KIM et Coll. (1971) (81), SCHACHTER et Coll. (1971) (151), HUDGIN et Coll. (1971) (73). Il a été suggéré que les cellules du sang peuvent être une source des sialyltransférases du sérum. Du fait que l'activité de l'enzyme du sérum augmente d'une façon notable quand un échantillon de sang total est laissé pendant une heure à température ambiante, il est possible que la sialyltransférase soit secrétée par des cellules ou soit libérée par dégradation de certaines cellules.

Nous avons démontré que les plaquettes ont aussi une activité de sialyltransférase\*. En ce qui concerne la localisation de ces enzymes dans les plaquettes, il y a deux possibilités : selon la première, ils se trouvent dans les appareils de GOLGI, provenant des mégacaryocytes, situés ou dans le cytoplasme des plaquettes ou dans l'atmosphère périplaquettaire adsorbés sur la membrane plaquettaire. Selon la deuxième, il est possible que la source des sialyltransférases des plaquettes soit identique à celle des sialyltransférases du sérum, à savoir les membranes de certaines cellules du sang, et parmi elles, celles des plaquettes.

Dans une série d'expériences, nous avons effectué les incubations en présence et en absence de détergent "Triton X-100". Les résultats sont montrés dans le tableau suivant :

---

\* Réf. : (112<sub>b</sub>)

Figure 2.5

L'INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE DE SIALYL-  
TRANSFERASE DE :

I - SERUM

II - PLASMA RICHE EN PLAQUETTES

III - PLASMA DEPOURVU DE PLAQUETTES

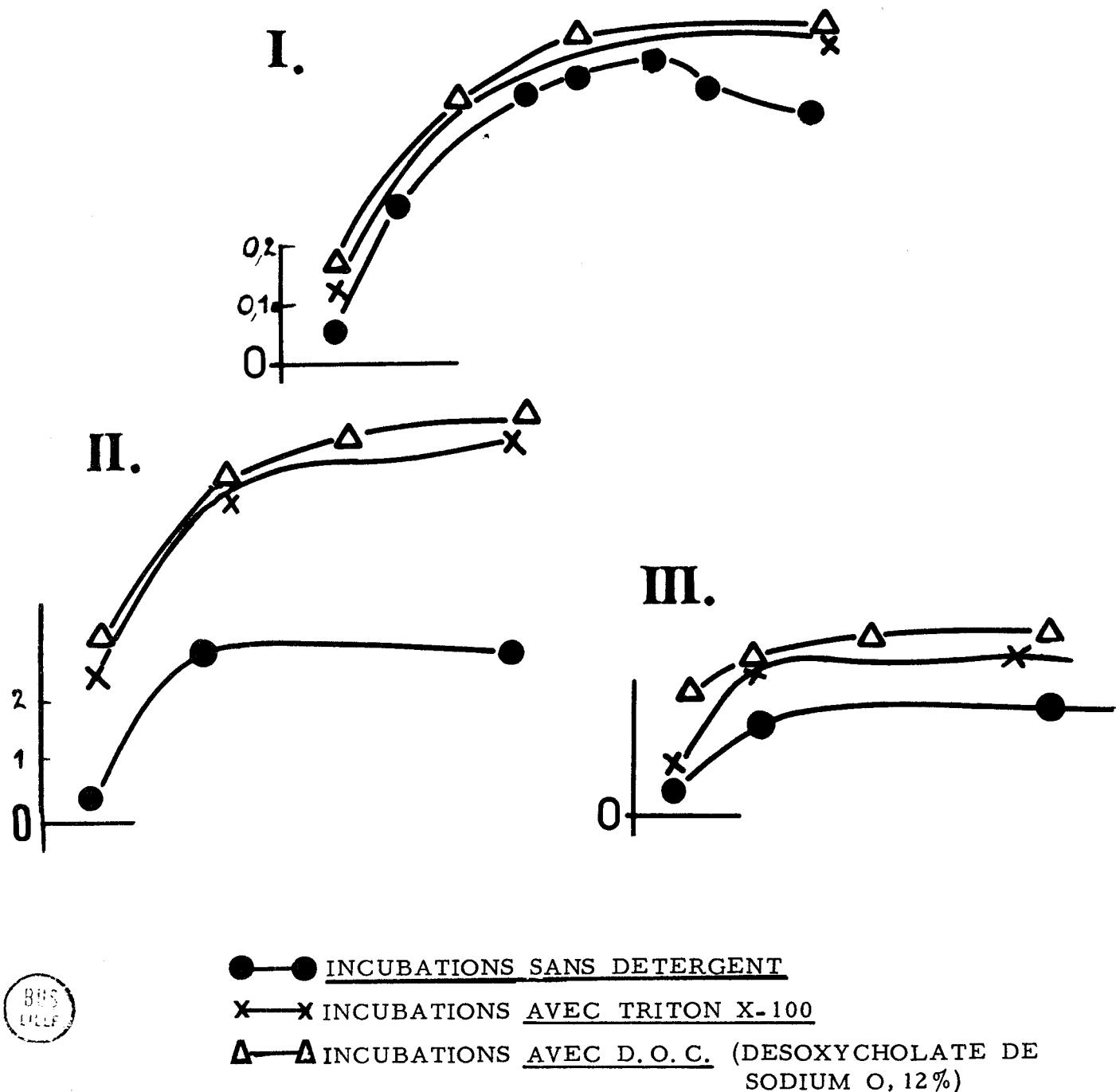


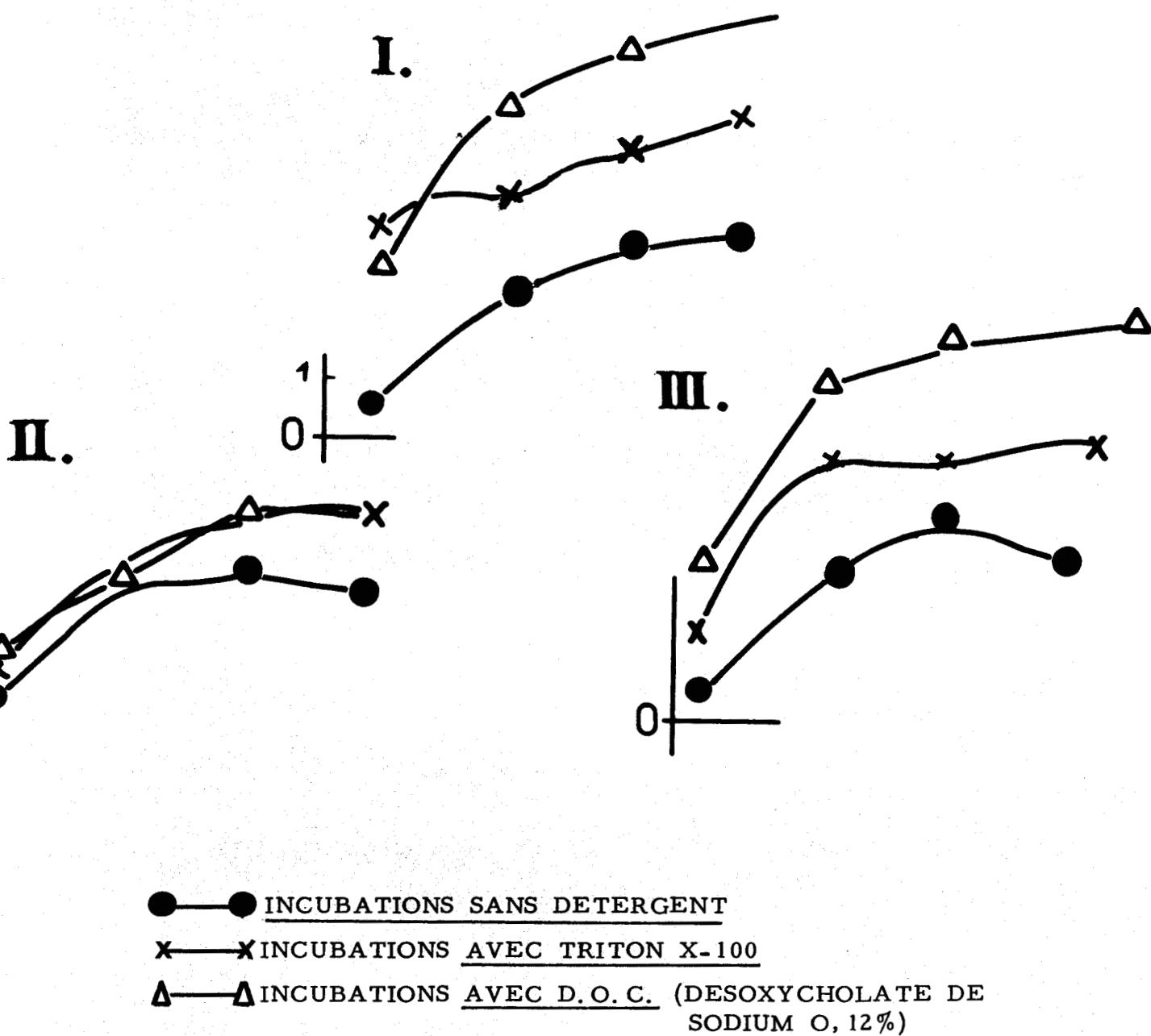
Figure 2.6

L'INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE DE SIALYL-  
TRANSFERASE DES PLAQUETTES :

I - PLAQUETTES ENTIERES

II - FRACTIONS SOLUBLES

III - FRACTIONS INSOLUBLES (MEMBRANAIRES)



BUS  
LILLE

Tableau 2.II

L'INFLUENCE DES DETERGENTS SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'ACTIVITE  
DE SIALYLTRANSFERASE PRESENTE DANS L'HOMOGENAT DE FOIE DE RAT  
ET DANS LES FRACTIONS DU SANG HUMAIN NORMAL

	FOIE DE RAT		SANG HUMAIN		
	HOMOGENAT ENTIER	FRACTIONS PURIFIEES	SERUM	PRP	PLAQUETTES
Mélange (habituel) d'incubation avec	5,4 $\mu$ moles*	6,7 $\mu$ moles	0,85	10	4,6
TRITON X-100	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
sans	1,45	0,83	0,9	3,1	2,2
TRITON X-100	30 %	11 %	100%	32%	50%

\* Les valeurs sont exprimées en  $10^{-9}$  moles NANA incorporées sur l'accepteur ( $\alpha_1$ -acide glycoprotéine désialisée sous l'effet de 1 mg de l'enzyme (exprimé en protéines Lowry)

Dans une autre série d'expériences nous avons suivi l'évolution dans le temps de l'activité des sialyltransférases de sources différentes en présence, et en absence, de détergents. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 2.5 et 2.6.

On peut constater :

- que les détergents n'ont pas d'effet sur le développement de l'activité du sialyltransférase de sérum, ce qui veut dire que l'enzyme est soluble dans le sérum (73,81).
- que les détergents exercent un effet sur le développement de l'activité de l'enzyme, effet qui est cependant diversifié du fait qu'une partie de l'enzyme est soluble dans le plasma, et que l'autre est liée à la membrane des cellules se trouvant dans ce plasma.
- que dans le plasma riche en plaquettes l'effet de détergent augmente avec la teneur du plasma en plaquettes,

- que dans le plasma pauvre en plaquettes l'effet de détergent diminue compte tenu du petit nombre de plaquettes qu'il contient,
- que les plaquettes entières, aussi bien que les fractions membranaires isolées\*, montrent une activité augmentée du sialyltransférase sous l'effet des détergents.

### 3. ROLE DES ANOMALIES DE L'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES DANS L'HEMOSTASE PATHOLOGIQUE

#### a) Corrélations entre les sialyltransférases du sérum et les anomalies de la structure du fibrinogène

Au cours de nos études analytiques sur la structure de la fraction glucidique des glycoprotéines qui sont impliquées dans l'hémostase, nous avons mis en évidence des modifications de la composition glucidique du fibrinogène dans les cas de dysfibrinogénémie congénitale et acquise (107,108,109). Ces cas pathologiques sont caractérisés par des anomalies de formation du caillot hémostatique et les fibrinogènes des cas précités montrent des différences notables dans leur teneur en acide sialique.

Dans le tableau ci-après nous présentons les résultats d'une série d'analyses exécutées sur le fibrinogène provenant des cas de dysfibrinogénémie acquise.

Nous avons constaté une augmentation du taux d'acide sialique dans chacun des cas de dysfibrinogénémie congénitale ou acquise que nous avons étudiés.

En conclusion, il nous semble que dans les cas de dysfibrinogénémie congénitale ou acquise, la biosynthèse des chaînes glucidiques soit perturbée.(108)

---

\* Voir page 140

Du fait que la biosynthèse du fibrinogène s'effectue dans le foie, il est normal que dans l'état pathologique du foie la biosynthèse des chaînes glucidiques et plus particulièrement celle de l'acide sialique, soit la plus affectée.

Tableau 2.III

TENEUR EN ACIDE SIALIQUE DES FIBRINOGENES ANORMAUX

	Acide sialique
Fibrinogène témoin	0,54
1.Cas de dysfibrinogénémie acquise	0,96
2.Cas de dysfibrinogénémie acquise	1,21

Tableau 2.IV

TENEUR EN ACIDE SIALIQUE DU FIBRINOGENE  
DANS LES CAS DE DYSFIBRINOGENEMIE ACQUISE

Fibrinogène			
N°	Cas	isolé par	Acide sialique*
1	Normal	D.Ménaché	0,66
2	Malade : GIC Cirrhose	J.Soria	0,66
3	GAR Cirrhose	J.Soria	0,65
4	COT Cirrhose	J.Soria	1,35
5	BOD Cirrhose	J.Soria	1,10
6	BER Cirrhose	J.Soria	1,43
7	LAN Cirrhose	J.Soria	1,12
8	GUI Cirrhose	J.Soria	0,95
9	LET Ictère	D.Ménaché	0,96
10	PRE Ictère	D.Ménaché	1,21

\* mg d'acide sialique/100 mg de protéine coagulable.

Tableau 2.VA

**ACTIVITÉ DE SIALYLTTRANSFERASE DES SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES**

Cas	Maladie	Temps de thrombine	Nature du caillot	mg protéines par ml serum	μ moles NANA - $^{14}\text{C}$ incorporées par mg protéines
Témoin	Moyennes de 9 cas normaux	normal	opaque	73	0.687 μ moles
TAB	Hépatite cytolytique virale	très allongé	translucide	63	1.460 μ moles
LES	Cirrhose éthylique	allongé	translucide	67	1.260 μ moles
PAL	Cirrhose gravissime	allongé	translucide	79	1.200 μ moles
HAT	Maladie inflammatoire	normal	opaque	76	0.900 μ moles
HES	Maladie inflammatoire	normal	opaque	69	1.380 μ moles
ROC	Cancer	normal	opaque	76	1.680 μ moles

Bij  
16

On peut supposer que le taux élevé d'acide sialique dans ces cas est le résultat d'une teneur plus grande de l'enzyme "sialyltransférase" dans le foie des sujets atteints de ces maladies.

A partir de cette donnée SCHACHTER et Coll. (1968) ont étudié l'activité de l'enzyme sialyltransférase par dosage effectué sur des prélèvements tissulaires de foie de ces malades. Par suite des difficultés pour obtenir des fragments de foie humain *in vivo*, MESTER (1969) a suggéré de pratiquer les dosages de l'enzyme sur le sérum des malades.

L'hypothèse que le sérum doit refléter les anomalies de la biosynthèse du fibrinogène a été vérifiée par une étude effectuée sur l'activité de l'enzyme sialyltransférase dans le sérum des malades atteints d'hépatite grave.

#### Mode opératoire

Les dosages sont effectués à l'aide de l'acide CMP-N(<sup>14</sup>C)-acétyl-neuraminique et de  $\alpha_1$ -glycoprotéine désialisée comme substrat. (150)

Tableau 2.V

#### NIVEAU D'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES DES SERUMS HUMAINS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

Sérum	$\mu$ moles NANA( <sup>14</sup> C) incorporées, par mg de protéines sériques
Moyennes de 9 cas normaux	0,687
3 cas pathologiques :	
TAB	1,460
LES	1,260
PAL	1,200

b) Effet des neuraminidases

Bien que les résultats obtenus sur le sérum de malades atteints d'hépatite grave semblent confirmer que la teneur élevée en acide sialique du fibrinogène est due à une activité plus poussée des sialyltransférases chez ces malades, on peut se demander quelle est l'influence des enzymes neuraminidases présents dans le sérum. Dans un système aussi complexe que le sang, les enzymes ont le rôle de maintenir un équilibre : les enzymes dégradants ont le rôle de limiter l'effet des transférases.

Dans les cas des anomalies structurales des glycoprotéines on peut supposer un accroissement de l'action des enzymes glycosyltransférases, mais il serait également possible qu'un manque d'activité dégradante soit en cause. Pour trancher entre ces deux possibilités, nous avons réalisé le dosage de l'activité des sialidases dans les sérums des sujets atteints de disfibronogénémie acquise parallèlement au dosage de l'activité des sialyltransférases (Figure 2.7).

A la suite de nos résultats, on ne peut pas considérer qu'un manque de sialidases soit impliqué dans ces cas pathologiques. Au contraire, il semble raisonnable de chercher la cause de l'accroissement du taux d'acide sialique dans l'activité accrue des enzymes sialyltransférases des sérums étudiés.

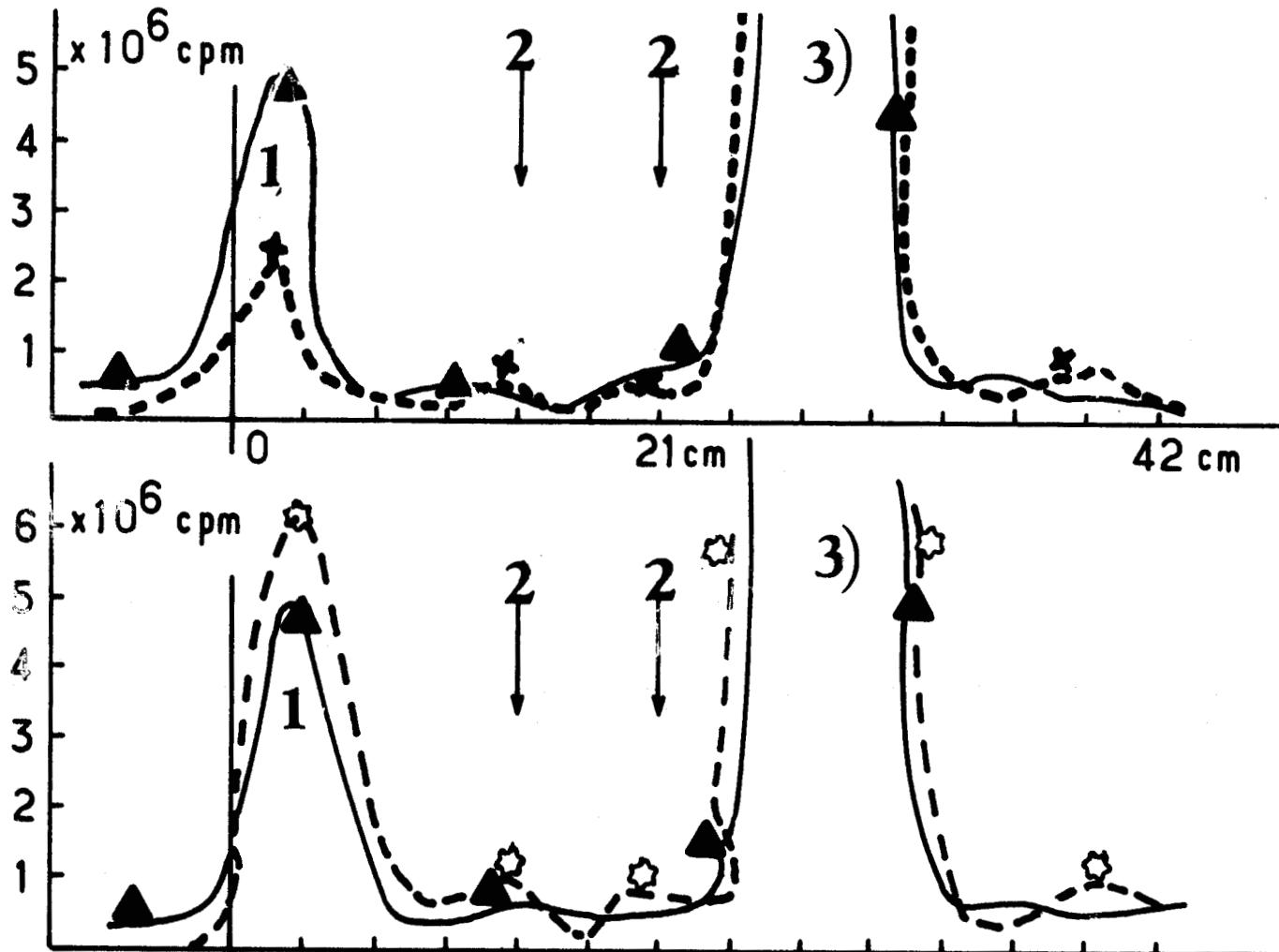
c) Corrélation entre les sialyltransférases, les anomalies de la structure des glycoprotéines plaquettaires et leurs fonctions.

Le taux modifié de sialyltransférases dans la membrane des plaquettes peut être le responsable des anomalies de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire.

Ces anomalies fonctionnelles sont reflétées par la variation de taux de glucide des glycoprotéines qui sont les constituants

Figure 2.7

L'EFFET DES NEURAMINIDASES ENDOGENES  
SUR L'ACTIVITE DE SIALYLTRANSFERASES DU SERUM



DOSAGES DE SIALYLTRANSFERASE ET MESURES DE RADIOACTIVITE UTILISANT COMME SOURCES DE L'ENZYME DES :

—▲— SERUMS NORMAUX

\*--- SERUM DE CAS PATHOLOGIQUE (THROMBASTHENIE) (BLA)

○— SERUM DE CAS PATHOLOGIQUE (HEPATITE GRAVE) (TAB)

1)  $(^{14}\text{C})\text{-NANA}$  INCORPORE SUR  $\alpha_1$  GLYCOPROTEINE ACIDE DE SIALIDEE, 2) NANA RADIOACTIF LIBRE ET DES PRODUITS DE DEGRADATION NON IDENTIFIES, 3) CMP- $(^{14}\text{C})\text{-NANA}$ ,  
(0 → 42 cm : migration en cm).

BUS  
LILLE

TABLEAU 2. VI.A

ACTIVITÉ DE SIALYLTRANSFERASE DES SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES (PLAQUETTAIRES)

Cas	Maladie	Teneur en acide sialique des plaquettes μg / mg protéines	μ moles NANA- <sup>14</sup> C incorporées par mg protéines
MAR	Thrombasthenie plaquettaire	6.00	0.44 μ moles
ANI	Thrombasthenie plaquettaire	6.00	0.52 μ moles
BLA	Thrombasthenie plaquettaire	5.20	0.41 μ moles
LAG	Syndrome préleucémique	6.40	0.46 μ moles
FEN	Syndrome préleucémique	4.40	0.46 μ moles
BRO	Syndrome préleucémique	2.40	0.29 μ moles
Témoin	Moyenne de 9 cas normaux	9.00	0.69 μ moles

BUS  
LILLE

des sites actifs de la surface plaquettaire. La charge de ces sites dépend directement de la structure des chaînes glucidiques s'y trouvant. ROSEMAN et Coll. (144) ont étudié le processus de l'adhésion intracellulaire pour déterminer si des glucides étaient impliqués dans ce processus ou non.

Les plaquettes contiennent des glucides sur leurs surfaces, mais les membranes contiennent également des glycosyltransférases et des glycosidases (neuraminidase). Par conséquent, il est possible d'attribuer un rôle aux glycosyltransférases et aux glycosidases dans l'adhésion interplaquettaire (144).

Nous avons dosé l'activité des sialyltransférases dans les sérums de plusieurs cas de pathologie plaquettaire. Nos résultats obtenus montrent que la diminution de la teneur en acide sialique des plaquettes est accompagnée d'une activité diminuée des sialyltransférases dans le sérum du même sujet (malade) (Tableau 2.VIA).

Par recouplement des résultats obtenus au cours de nos études d'incorporation d'acide sialique par les plaquettes normales et thrombasthéniques d'une part, et le niveau d'activité des sialyltransférases de sérum et PRP d'autre part : nous pouvons distinguer les plaquettes normales et les plaquettes thrombasthéniques.

Les valeurs illustrées dans le tableau (2.VIB) montrent :

- que les plaquettes des cas de thrombasthénie plaquettaire incorporent l'acide sialique dans une quantité plus faible que les plaquettes normales, quand on les soumet à une incubation avec de l'homogénat de foie de rat, qui est riche en enzymes sialyltransférases.

- que le sérum et le PRP normaux ont un taux plus faible en sialyltransférase que l'homogénat de foie, mais le pouvoir accepteur des plaquettes normales et pathologiques varie à peu près dans les mêmes proportions que ce qui a été constaté lors de l'utilisation de l'homogénat de foie.
- que le sérum et le PRP thrombasthénique ont une activité de sialyltransférase diminuée qui se manifeste également dans les cas où nous avons choisi comme accepteur les plaquettes normales ou les plaquettes thrombasthéniques.

Tableau 2.VI<sub>B.</sub>

INCORPORATION D'ACIDE SIALIQUE RADIOACTIF PAR LES PLAQUETTES NORMALES ET PATHOLOGIQUES EN FONCTION DES SOURCES DE SIALYLTRANSFERASE

SOURCE DE L'ENZYME SIALYLTRANSFERASE	$10^{-9}$ moles NANA( $^{14}\text{C}$ ) incorporées par $10^9$ plaquettes lavées	
	NORMALES	THROMBASTHENIQUES
HOMOGENAT DE FOIE DE RAT	14,40	8,98
SERUM NORMAL	1,30	0,85
PRP NORMAL	1,65	0,97
SERUM THROMBASTHENIQUE	0,70	0,70
PRP THROMBASTHENIQUE	0,73	0,72

o o  
o

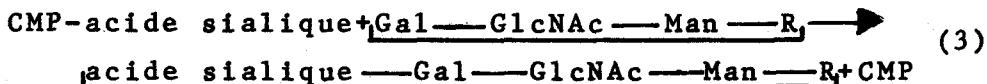
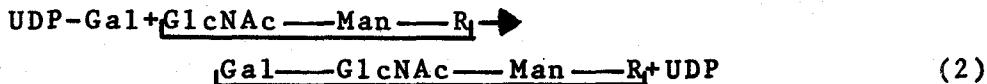
## CHAPITRE 3

### ENRICHISSEMENT DES PLAQUETTES EN ACIDE SIALIQUE

#### 1. INTRODUCTION

Nous avons déjà mentionné que la biosynthèse des chaînes glucidiques des glycoprotéines se produit sous l'action d'un système spécifique des glycosyltransférases. La succession des glucides dans la voie de la biosynthèse des chaînes glucidiques des glycoprotéines plasmatiques a été démontrée par les travaux de ROSEMAN et Coll. (143,144).

#### SCHEMA DE LA BIOSYNTHÈSE DES UNITES OLIGOSACCHARIDIQUES TERMINALES



La dernière étape aboutit à l'incorporation de l'acide sialique en position terminale sur la chaîne glucidique des glycoprotéines.

Notre but était de reproduire sur les plaquettes la dernière phase de la biosynthèse précitée à l'aide de sialyl-transférase de foie de rat et de CMP-NANA radioactif.

## 2. INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

Au cours d'une incubation ménagée des plaquettes avec le CMP-N-(<sup>14</sup>C)-acétyl acide sialique et en présence de sialyl-transférase, l'acide sialique radioactif est fixé au niveau des membranes.

### Mode opératoire

Un plasma humain contenant  $4,27 \times 10^8$  plaquettes par ml était soumis à l'incubation à 37°C pendant 10 ou 30 minutes avec CMP-NANA marqué au (<sup>14</sup>C), en présence de sialyltransférase de foie de rat. A chaque prise de 5 ml PRP (plasma riche en plaquettes) étaient ajoutés 0,5 ml de tampon pH 7,4, 45 µl de l'enzyme et 200 µl d'une solution 10 mM de CMP-(<sup>14</sup>C)-NANA.

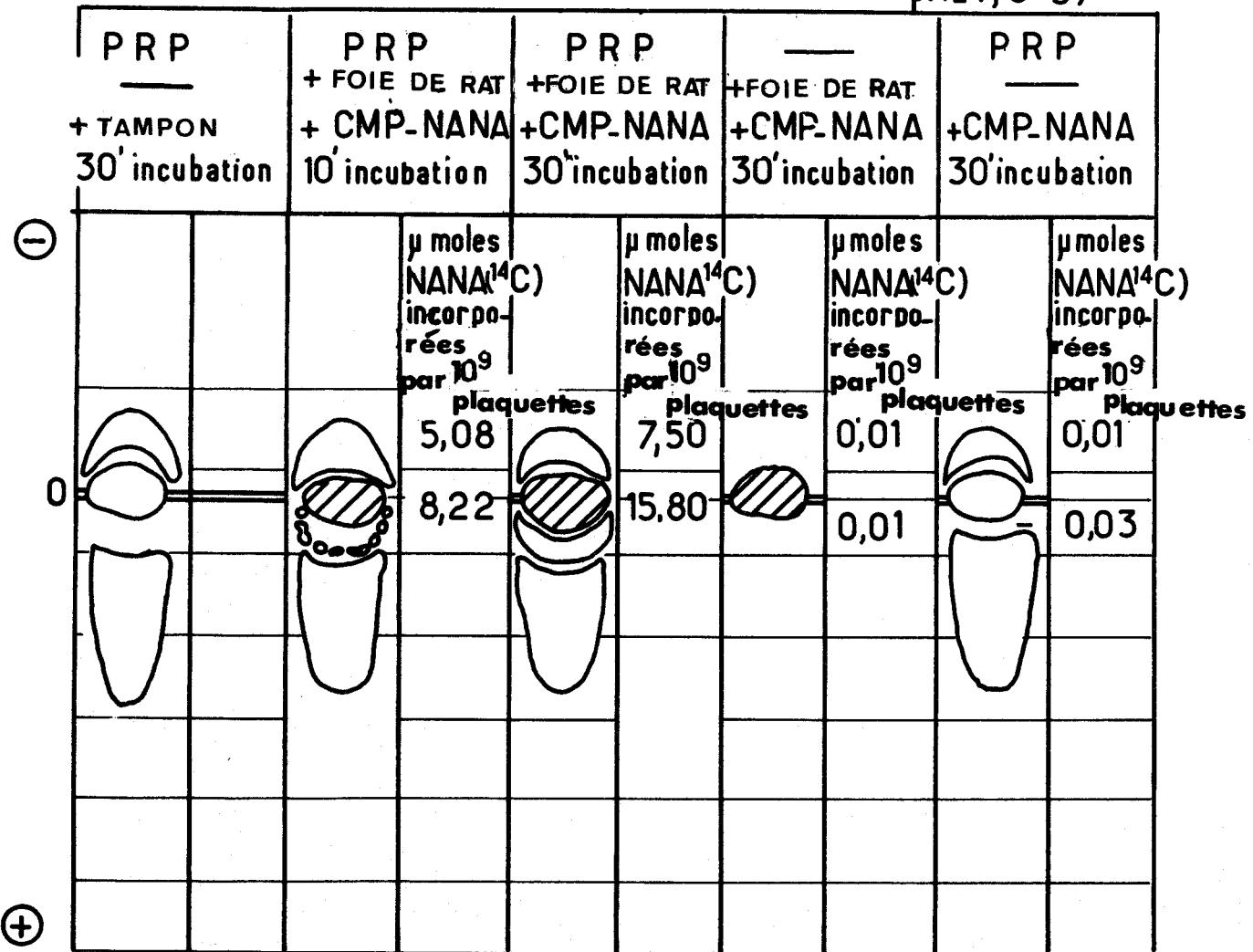
Les plaquettes ainsi traitées ont été séparées des protéines du plasma par électrophorèse sous haut voltage (4000 V, 45 min., papier Whatmann 3MM, solvant Pyridine - eau - acide acétique = 250:50:1, pH = 7,4). Des mesures de radioactivité montrent une augmentation du taux en acide sialique des plaquettes (Figures 2.8<sub>a</sub> et 2.8<sub>b</sub>).

Cette augmentation était de  $13,3 \times 10^{-9}$  moles d'acide sialique par  $10^9$  plaquettes après 10 minutes d'incubation et de  $22,3 \times 10^{-9}$  moles par  $10^9$  plaquettes après 30 min. d'incubation. Compte tenu de la teneur en acide sialique généralement admise pour les plaquettes humaines normales, les quantités incorporées représentent respectivement un accroissement de 19 et 32 %.

Figure 2.8.a.

ELECTROPHORESE ET MESURES DE RADIOACTIVITE DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR LES PLAQUETTES en milieu plasmatique.

pH=7, C° 37

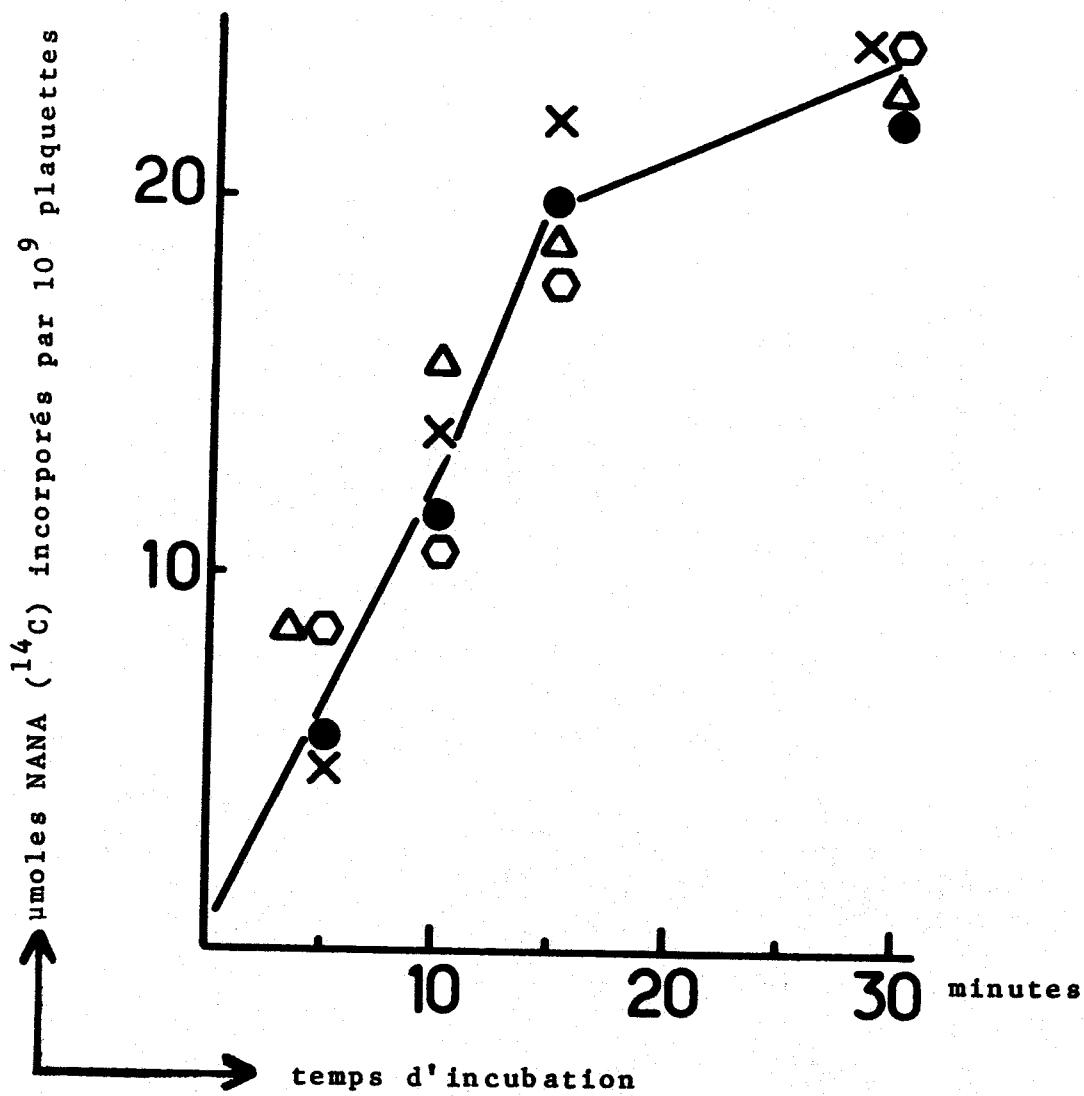


ELECTROPHORESE 4000 V, 45 minute, papier Whatmann 3MM, TAMPON: pyridine-eau-acide acétique; 250:50:1, à pH 6,4. Révélation des taches par la ninhydrine.

BUS  
LILLE

Figure 2.8.b.

CINETIQUE D'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE PAR  
LES PLAQUETTES EN MILIEU PLASMATIQUE (PRP)



VALEURS DE QUATRE SERIES D'EXPERIENCES SUR LES  
PLASMAS RICHES EN PLAQUETTES DE SUJETS NORMAUX.

A.S. DE CMP (- $^{14}\text{C}$ )-NANA :  $3,7 \times 10^6$  c.p.m./ $\mu$  moles.



### 3. POUVOIR ACCEPTEUR DES PLAQUETTES LAVEES ET DES PLAQUETTES EN MILIEU PLASMATIQUE

Les plaquettes survivent à une incubation enzymatique ménagée soit sous forme de suspension de plaquettes isolées lavées, soit sous forme de plasma riche en plaquettes (PRP).

De ce fait, il a été possible de provoquer l'incorporation d'un taux supplémentaire d'acide sialique radioactif sur des sites récepteurs glycoprotéiques de la membrane de cellules intactes.

En tant que récepteurs pour l'incorporation de l'acide sialique les plaquettes dans leur milieu plasmatique se comportent différemment des plaquettes lavées en suspension.

Nos travaux ont démontré que l'incorporation de l'acide sialique est fonction du temps d'incubation jusqu'à 30 minutes, période pendant laquelle les molécules de l'acide sialique sont fixées principalement au niveau de la membrane des plaquettes "vivantes". Ensuite il semble que plus les plaquettes ont subit l'effet de l'incubation, plus est accentuée la pénétration de (<sup>14</sup>C)-NANA à l'intérieur des plaquettes.

Dans le cas des plaquettes isolées, entre 10 et 30 minutes d'incubation, l'incorporation atteint un niveau constant suivi d'une diminution subite, si l'incubation est prolongée jusqu'à 1 heure (Figure 2.9). Par contre dans le cas de PRP on n'a constaté ce plafond qu'après 2 heures d'incubation. Après 30 minutes d'incubation l'incorporation augmente en flèche, mais celle-ci se produit sur les autres fractions du plasma, après la saturation des plaquettes.

D'après les valeurs obtenues on peut considérer que dans les conditions données le temps d'incubation optimum est de 30 minutes et le pouvoir récepteur de  $10^9$  plaquettes normales augmente jusqu'à incorporation de 11 à 17 micromoles

d'acide sialique par les plaquettes lavées, alors que les plaquettes restant dans leur milieu plasmatique en incorporent de 17 à 22,50 micromoles (Tableau 2.VII).

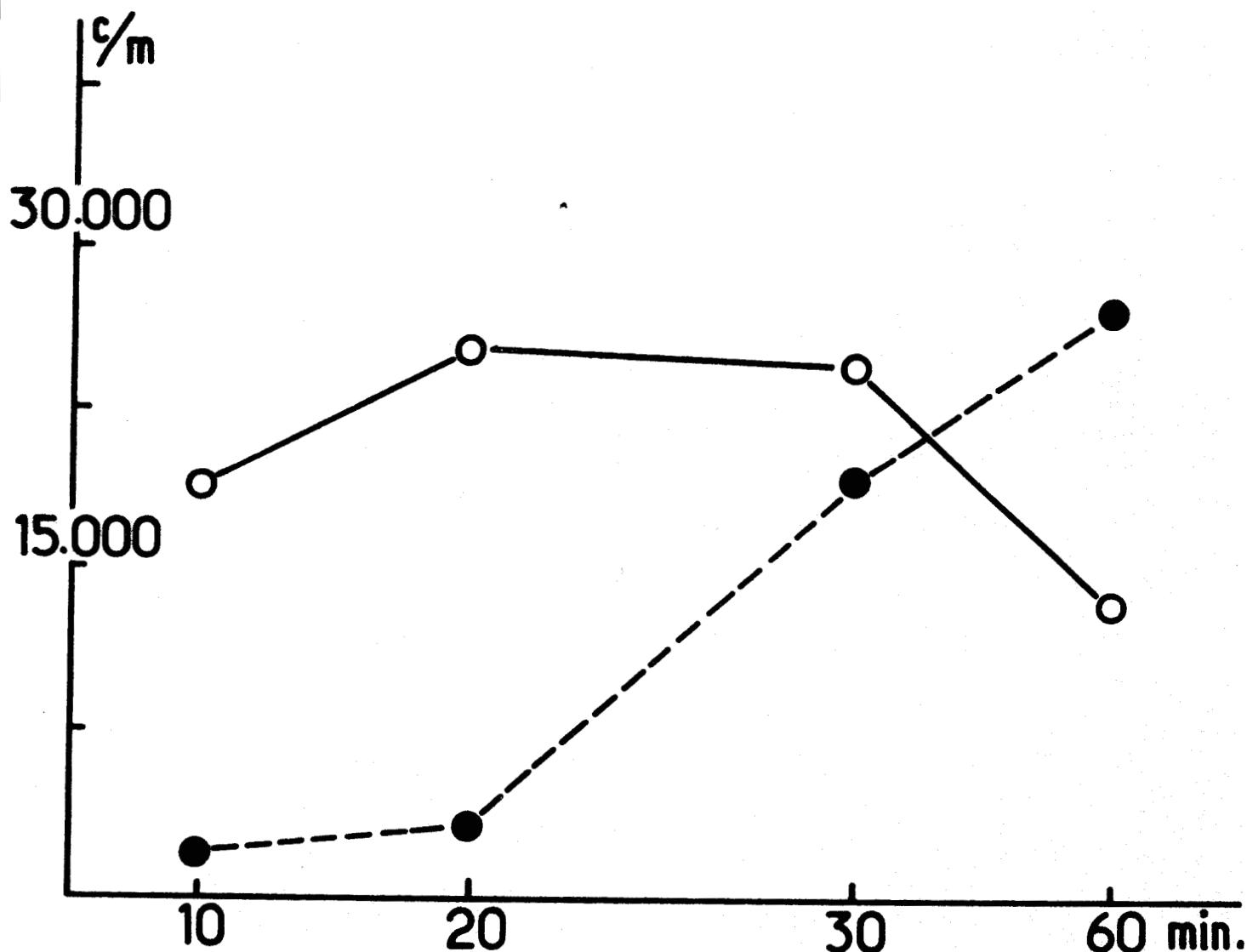
Nous comprenons par là une incorporation sur les sites accessibles de la surface des membranes plaquettaires, car nous avons constaté que la vitesse initiale d'incorporation de l'acide sialique sur les plaquettes est fonction de la concentration en enzyme sialyltransférase du mélange d'incubation.

Nous avons étudié les conditions optimales d'incorporation de l'acide sialique par les sites accepteurs de la membrane des plaquettes. Les figures suivantes illustrent les variations du pouvoir récepteur de la membrane en fonction de la concentration de l'enzyme quand les autres éléments du milieu sont restés constants (Figure 2.10).

La comparaison entre le pouvoir récepteur des plaquettes en milieu plasmatique et celui des plaquettes lavées a montré que dans cette dernière préparation, ce pouvoir est inférieur à celui des plaquettes restant dans leur plasma.

Figure 2.9/

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE PAR  
LES PLAQUETTES LAVEES



○ NANA ( $^{14}\text{C}$ ) INCORPORE PAR LES PROTEINES MEMBRANAIRES  
● NANA ( $^{14}\text{C}$ ) INCORPORE PAR LES PROTEINES INTRAPLAQUETTAIRES

A.S. de ( $^{14}\text{C}$ -NANA) =  $0,5 \times 10^6$  cpm par micromole



Figure 2.10

INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE PAR LES PLAQUETTES  
EN FONCTION DU TAUX DE SIALYLTRANSFERASE

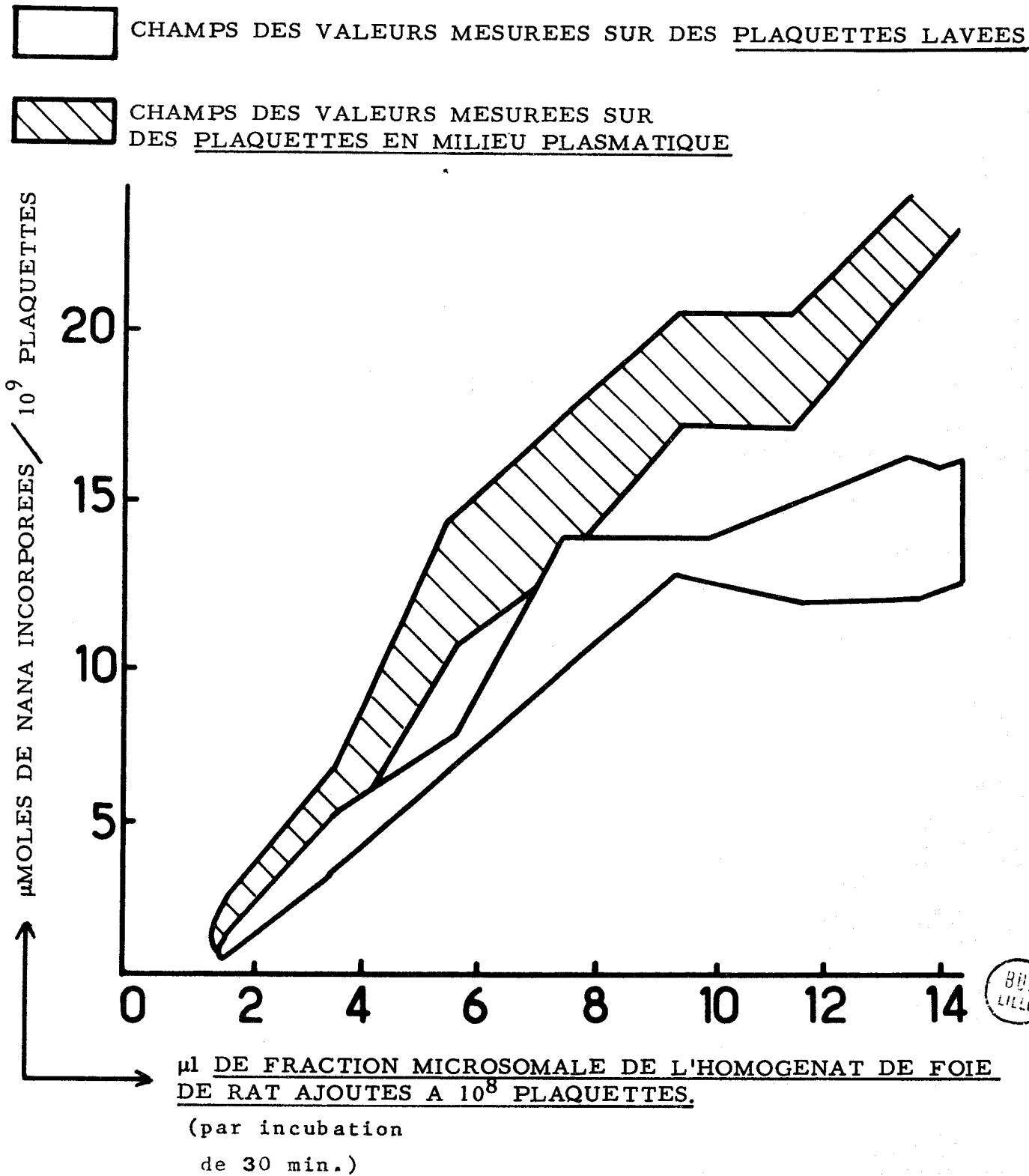


Tableau 2.VII

TAUX D'ACIDE SIALIQUE FIXE PAR  $10^9$  PLAQUETTES ET AUGMENTATION CONSEQUENTE DE LA TENEUR INITIALE EN ACIDE SIALIQUE DES PLAQUETTES

Temps d'incubation	μmoles NANA-( $^{14}\text{C}$ ) incorporées par $10^9$ plaquettes	Teneur initiale en acide sialique par $10^9$ plaquettes (0,81%/protéines)	Augmentation de la teneur initiale %
Incorporation de l'acide sialique radioactif mesurée sur les plaquettes isolées lavées			
10 min	6,9 - 7,1 7,5 - 6,7	7,0 61,6 μmoles	11,30
20 min	6,4 - 9,30 7,8 - 11,0	8,3 "	13,40
30 min	12,0 - 14,2 17,0 - 16	14,8 "	23,70
60 min*	19,5 - -- 27,0 - 22,4	22,4 "	36,0
Incorporation de l'acide sialique mesurée sur les plaquettes en milieu plasmatique			
10 min	9,70-13,15 11,8 - 7,5	10,5 "	16,9
20 min	17,2 - 15,4 16,5 - 18,3	16,8 "	27
30 min	19,36-20,4 20,14-17,70 18,30-22,50	19,58 "	31,5
60 min*	46,2 - 42,5 19,3 - 37,2 28,70	* Ces valeurs ne concernent plus les plaquettes avec des membranes intactes	BBG L'U

4. L'EFFET DE NEURAMINIDASE SUR L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LES PLAQUETTES

Pour établir si un enzyme dégradant présent dans les plaquettes ou dans l'homogénat de foie de rat pourrait être responsable d'une perte de l'activité d'incorporation d'acide sialique, nous avons étudié l'effet de la neuraminidase sur l'activité sialyltrasférasique d'une part et sur le pouvoir récepteur des plaquettes d'autre part.

Nous avons soumis à l'incubation des échantillons de plaquettes lavées avec la sialyltransférase en présence d'une quantité faible de neuraminidase de *Clostridium perfringens*. Nous avons constaté qu'en présence de neuraminidase l'incorporation sur les plaquettes se montre diminuée.

Les résultats sont présentés dans la figure 2.11 dont la légende est la suivante :

	temps d'incubation
1. Courbe de c/m de 25 $\mu$ mole de NANA( $^{14}\text{C}$ )	—
2. Courbe	$10^9$ plaquettes + 25 $\mu$ moles NANA( $^{14}\text{C}$ )                            30 minutes 10 $\mu\text{l}$ de fraction de foie de rat
3. Courbe	$10^9$ plaquettes + 25 $\mu$ moles NANA( $^{14}\text{C}$ )                            30 minutes 10 $\mu\text{l}$ de fraction de foie de rat 0,0001 U.I. de neuraminidase de <i>Clostridium perfringens</i>
4. Courbe	le même mélange que pour la                    2 heures courbe 3

Les picks correspondent :

a = CMP-NANA( $^{14}\text{C}$ ) étalon

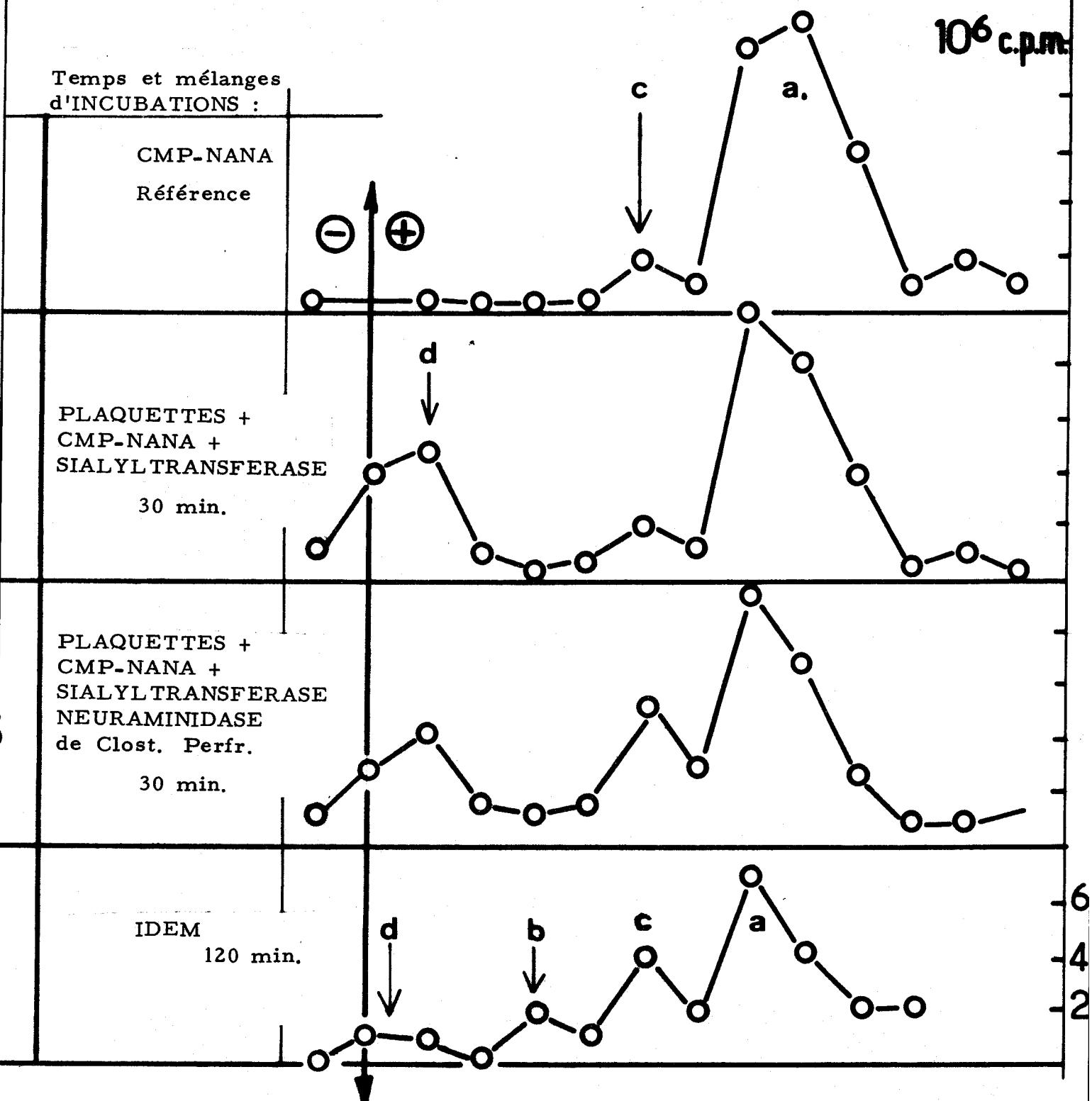
b = NANA-( $^{14}\text{C}$ ) libre

c = produits de dégradation non identifiés

d = NANA-( $^{14}\text{C}$ ) incorporé

Figure 2.11

INFLUENCE DE LA NEURAMINIDASE SUR L'INCORPORATION  
DE L'ACIDE SIALIQUE PAR LES PLAQUETTES



MESURES DE LA RADIOACTIVITE APRES ELECTROPHORESE DES ECHANTILLONS D'INCUBATION.

a) CMP(<sup>14</sup>C)-NANA étalon, b) (<sup>14</sup>C)-NANA libre

c) produits de dégradation non identifiés, d) (<sup>14</sup>C)-NANA incorporé.

BUS  
LILLE

## 5. REPARTITION DE L'ACIDE SIALIQUE RADIOACTIF INCORPORE ENTRE GLYCOPROTEINES ET GLYCOLIPIDES PLAQUETTAIRES

Nous avons tenté de localiser les résidus d'acide sialique incorporés sur les glycoprotéines et glycolipides de la membrane des plaquettes.

### Mode opératoire

En utilisant la méthode d'extraction des lipides par les solvants, nous avons déterminé la radioactivité des glycoprotéines et des glycolipides.

Tableau 2.VIII

### L'INCORPORATION RESPECTIVE DE L'ACIDE SIALIQUE SUR LES GLYCOPROTEINES ET SUR LES GLYCOLIPIDES PLAQUETTAIRES

Temps de l'incubation  
d'incorporation de NANA(<sup>14</sup>C)

BUS  
VILLE

	30 minutes		60 minutes	
	µmoles NANA-( <sup>14</sup> C) fixées par $10^9$ plaquettes	en %	µmoles NANA-( <sup>14</sup> C) fixées par $10^9$ plaquettes	en %
Incorporation totale	14,84	100	22,40	100 %
Fraction des glyco- protéines	9,40	63	13,57	60,5
Fraction des lipides	1,95	13,2	2,24	8,4
Perte, ou autres fractions solubles non identifiées	3,49	23,0	6,59	29,0
Bilan		99,2%		97,9%

D'après ces résultats, on peut conclure, que pour le CMP-NANA dans les conditions d'incubation précitées plus haut, le taux de la fixation est de 9,4 à 13,6  $\mu$ moles d'acide sialique pour les protéines, tandis que pour les lipides il n'est que de 1,9 à 2,25  $\mu$ moles d'acide sialique, c'est-à-dire 4 et 6 fois plus faible.

On peut noter aussi qu'entre 30 et 60 minutes d'incubation le taux d'acide sialique incorporé sur les protéines est augmenté d'environ 44 %, cependant que le taux incorporé par les glycolipides ne montre que 14 % d'augmentation entre 30 et 60 minutes d'incubation.

Vraisemblablement, après 30 minutes d'incubation les sites des glycolipides de la surface plaquettaire sont saturés. Si l'incubation se prolongeait jusqu'à la destruction partielle des plaquettes, celle-ci permettrait probablement l'entrée en jeu de protéines intraplaquettaires présentant des sites accepteurs pour les molécules de NANA.

Cependant les glycolipides intraplaquettaires ne présentent que peu de sites pour l'incorporation d'acide sialique.

Ceci concorde avec le rapport entre les taux en glycoprotéines et en glycolipides des plaquettes.

o o  
o

## CHAPITRE 4

### NATURE DE LA LIAISON ENTRE LES GLYCOPROTEINES DE LA SURFACE PLAQUETTAIRE ET L'ACIDE SIALIQUE RADIOACTIF INCORPORE

#### 1. INTRODUCTION

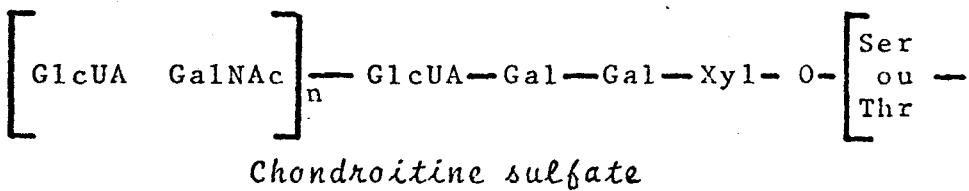
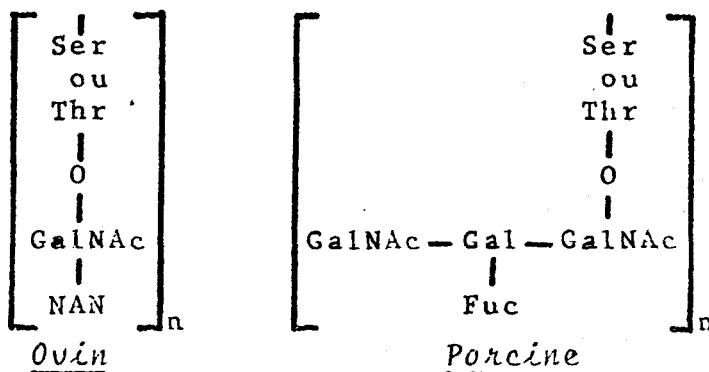
Comment peut-on imaginer l'incorporation *in vitro* de l'acide sialique sur des chaînes glucidiques de la membrane des plaquettes ?

Les différentes sortes de glycoprotéines sont caractérisées par leur chaîne glucidique et par la nature de la liaison de cette chaîne glucidique avec la partie protidique. En ce qui concerne la nature des glycoprotéines on peut les illustrer par les schémas généraux des 3 classes des glycoprotéines (66) :

#### Glycoprotéines plasmatiques



#### Glucosaminoglycannes



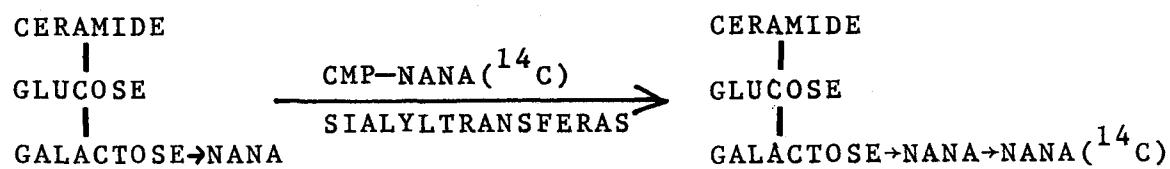
Les glycoprotéines du groupe 1 ont les unités terminales non-réductrices de la chaîne glucidique : l'acide sialique ou le L-fucose. Le galactose et une partie de N-Ac-glucosamine constituent les résidus liés aux unités terminales, le reste du N-Ac-glucosamine et le mannose se trouvent habituellement à l'intérieur de la chaîne en liaison avec la partie peptidique des protéines. Cette liaison se réalise par une attache N-glycosidique entre le N-Ac-glucosamine et un résidu de l'asparagine de la protéine.

Les glycoprotéines des groupes 2 et 3 ont les chaînes glucidiques sans des unités de mannose, et elles sont attachées par une liaison O-sérine ou O-thréonine.

A l'intérieur de la chaîne glucidique des glycoprotéines, les molécules d'acide sialique peuvent être liées aux résidus de galactose ou N-acétylglucosamine mais aussi à d'autres résidus d'acide sialique. De ce fait, les glycoprotéines comportant des chaînes glucidiques complètes sont aussi des accepteurs d'acide sialique. Par exemple, des glycoprotéines plasmiques comme le fibrinogène, même à l'état natif incorporent un certain taux d'acide sialique.

Nous avons choisi comme source de sialyltransférase les fractions microsomaies de foie de rat. Le tableau ci-contre présente les qualités différentes des préparations de sialyltransférase provenant de sources différentes (Tableau 2.IX).

L'incorporation d'acide sialique sur les glycolipides plaquettaires semble être possible. D'après MARCUS et Coll. (1969) (103) la membrane des plaquettes contient au moins trois sortes de gangliosides dont le plus important est l'hématoside. Selon le schéma décrit par STOFFEL (1968) (164) l'enzyme sialyltransférase est impliquée dans la synthèse des gangliosides de la façon suivante :



Hématoside

Disialoganglioside

Tableau 2.XI.

NEURAMINYL TRANSFERASES

SUBSTRATE	ACCEPTOR	PRODUCT	OCCURRENCE (isolated)
CMP-NANA	$\alpha$ -D-GalpNAc 1-Ser <sup>1</sup> Thr <sup>2</sup> PRO	$\alpha$ .NA 2.6 $\alpha$ -D-GalpNAc - PRO	sheep submaxillary gland
	$\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-GpNAc 1... PRO	$\alpha$ - NA 2.3 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-GpNAc1... PRO	goat colostrum rat
	$\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-GpNAc 1-1 CER	$\alpha$ - NA 2.3 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-Gp1-1CER (G <sub>Lact</sub> )	mammary gland, liver preparations embryonic chicken brain
G <sub>Lact</sub>		$\alpha$ -NA 2.8 $\alpha$ -NA 2.3 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-Gp1.1CER (G <sub>Lact</sub> )	embryonic chicken brain
	$\beta$ -D-Galp1.4 $\beta$ -D-GpNAc 1... PRO	$\alpha$ .NA 2.6 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-GpNAc1... PRO	rat colostrum
	$\beta$ -D-Galp1-3 $\beta$ -D-GalpNAc1-4 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-Gp1-1CER	$\beta$ -D-Galp1-3 $\beta$ -D-GalpNAc1-4 $\beta$ -D-Galp1-4 $\beta$ -D-Gp1-1CER 3 (Ganglioside G <sub>4</sub> ) 2 $\alpha$ -NA	embryonic chicken brain
	$\beta$ -D-Galp1-3 D-GpNAc	$\beta$ NA 2.3 $\beta$ -D-Galp1-3 D-GpNAc	rat colostrum
	D-GalpNAc 1... PRO	$\alpha$ NA 2.3 D-GalpNAc 1... PRO	postulated

3771  
S148

De ce fait, on peut penser qu'à partir de l'hématoside plaquettaire, la sialyltransférase catalyse la formation d'une liaison entre deux molécules d'acide sialique et il en résulte une disialoganglioside.

2. DETERMINATION DE LA LIAISON ENTRE PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE INCORPORE PAR HYDROLYSE ACIDE.

Du fait que les dosages de radioactivité effectués sur les plaquettes enrichies en acide sialique ( $^{14}\text{C}$ ) ont donné des valeurs reproductibles on peut conclure qu'une liaison entre plaquette et acide sialique incorporé a été établie. De plus nous avons démontré que les glycoprotéines et les glycolipides plaquettaires ont participé comme accepteurs à l'incorporation d'acide sialique dans la membrane plaquettaire.

Il nous reste encore à caractériser la nature de cette liaison entre plaquette et l'acide sialique radioactif :

- s'agit-il simplement d'adsorption, ou
- d'une liaison chimique, ou
- des deux ?

Dans ce but précis, nous avons déterminé le taux d'acide sialique radioactif incorporé, chimiquement lié.

La nature des liaisons entre les glycoprotéines de la membrane plaquettaire et l'acide sialique radioactif incorporé peut être déterminé :

- 1) par hydrolyse acide
- 2) par dégradation enzymatique

Hydrolyse acide

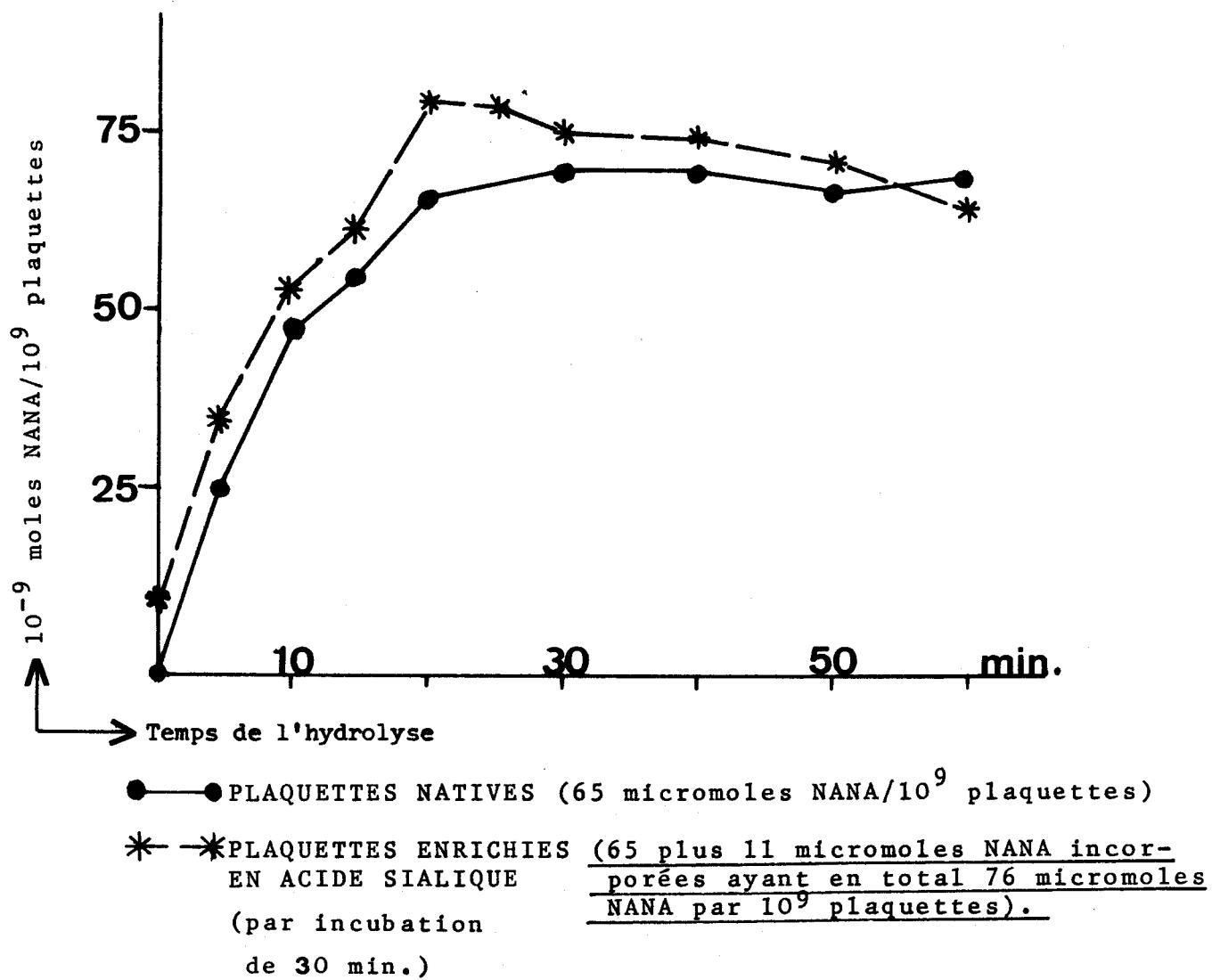
Afin de vérifier la stabilité de ces liaisons, les plaquettes précédemment enrichies en acide sialique sont soumises

à l'hydrolyse par 0,1 N  $H_2SO_4$  à 80°C en utilisant comme témoin des plaquettes natives. La cinétique de libération de l'acide sialique à partir des plaquettes enrichies et des plaquettes natives ont été comparées par dosage selon WARREN.

Nos résultats sont illustrés sur les figures 2.12.a et 2.12.b. Ils montrent que sous l'action d'une hydrolyse acide la liaison des molécules d'acide sialique ( $^{14}C$ ) fixées sur les plaquettes résiste d'une façon similaire à celle des molécules d'acide sialique d'origine sur les plaquettes natives, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une liaison chimique.

Figure 2.12.a

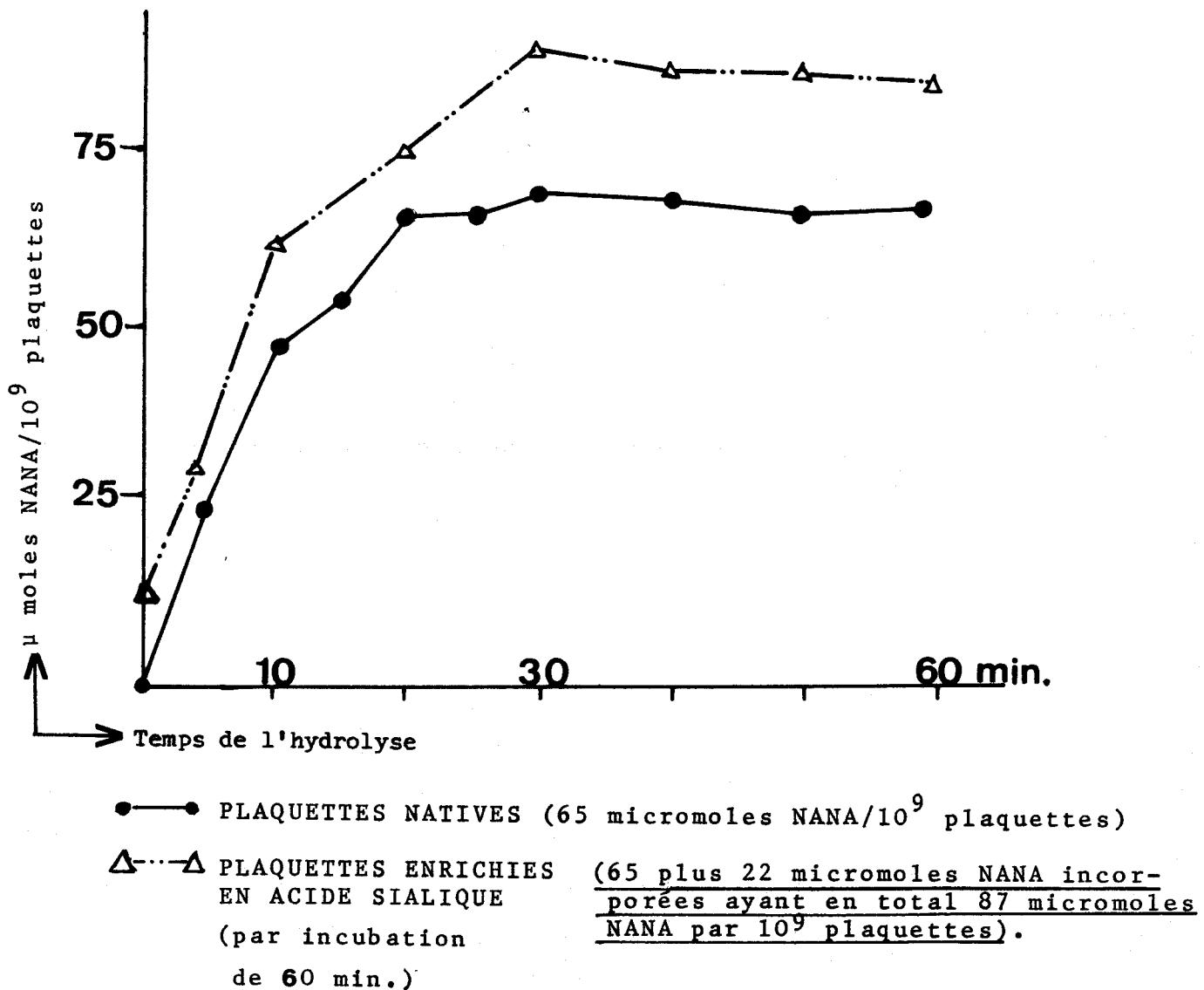
CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE AU COURS DE  
L'HYDROLYSE ACIDE DES PLAQUETTES LAVEES



BUS  
ELLE

Figure 2.12.b

CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE AU COURS  
DE L'HYDROLYSE ACIDE DES PLAQUETTES LAVEES



BUS  
LILLE

Tableau 2.XI

	SYNTHESE IN VITRO		DEGRADATION SUBSEQUENTE (par hydrolyse acide)
	I	II	III
	Teneur en acide sialique $\mu$ moles/ $10^9$ pla- quettes *	$(^{14}\text{C})\text{-NANA}$ incorporé $\mu$ moles/ $10^9$ pla- quettes	$(^{14}\text{C})\text{-NANA}$ incorporé, et libéré par hydrolyse acide $\mu$ moles/ $10^9$ plaquettes
	W.	R.	W.
<u>PLAQUETTES NATIVES</u>	65	0,00	0,00
<u>PLAQUETTES ENRICHIES</u> (par 30 minutes d'incubation)	77	14,8	11,
<u>PLAQUETTES ENRICHIES</u> (par 60 minutes d'incubation)	87	29,5	22

\*)  $10^9$  plaquettes = 2,43 mg de protéine plaquettaire,  
déterminé selon Lowry

W) Acide sialique déterminé selon la méthode Warren

R) Acide N-acétyl-neuraminique acide marqué au  $^{14}\text{C}$  carbone  
dosé par comptage ( $^{14}\text{C}$ ).

Il existe un écart entre les valeurs de l'incorporation mesurées par comptage de radioactivité et les valeurs déterminées par les dosages purement chimiques. De 14,8  $\mu$ moles NANA incorporées nous n'avons retrouvé sur les plaquettes enrichies que 11  $\mu$ moles NANA supplémentaires, sur 29,5  $\mu$ moles nous avons retrouvé 22  $\mu$ moles. Ces résultats ne sont pas caractéristiques pour incorporation parce qu'ils reflètent aussi la sensibilité de la méthode de Warren et encore les pertes de matériel pendant les nombreuses manipulations.

### 3. DETERMINATION DE LA NATURE DE LA LIAISON ENTRE PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE PAR DES METHODES ENZYMATIQUES

#### a) Cinétique de libération de l'acide sialique radioactif dégradé par la neuraminidase

L'enrichissement en acide sialique des plaquettes lavées de divers sujets normaux a montré que la saturation des sites récepteurs de la membrane pour l'acide sialique est atteinte après 30 minutes d'incubation à 37°C. Dans ces conditions les plaquettes ont incorporé environ 20 µmoles de NANA par  $10^9$  plaquettes.

Dans une autre série d'expériences où  $10^9$  plaquettes lavées intactes ont incorporé 19,32 µmoles NANA radioactives, nous avons isolé les plaquettes enrichies par centrifugation et nous avons préparé 3 échantillons que l'on a soumis à une incubation avec de la neuraminidase pendant 2, 24 et 72 heures respectivement. Ensuite les molécules de NANA marquées libérées par la neuraminidase étaient identifiées par électrophorèse sur papier et dosées par comptage du ( $^{14}\text{C}$ ) (Figures 2.13 et 2.14).

Les courbes de la figure 2.14 représentent :

- les molécules de NANA-( $^{14}\text{C}$ ) libérées par la neuraminidase
- les molécules de NANA-( $^{14}\text{C}$ ) résistantes à l'activité de la neuraminidase.

On peut donc noter que 0,8 µmoles de NANA-( $^{14}\text{C}$ ) seulement existent à l'état libre avant l'action de la neuraminidase. Après 72 heures de dégradation par la neuraminidase 5,6 µmoles de NANA-( $^{14}\text{C}$ ) préalablement incorporées résistent encore à la dégradation enzymatique. Cette quantité est semblable à celle constatée lors des dégradations par la neuraminidase des glycoprotéines d'origine diverse.

Des liaisons entre les plaquettes et les molécules d'acide sialique incorporées semblent être différentes pour les plaquettes enrichies en acide sialique par rapport au temps d'incubation de synthèse avec l'enzyme sialyltransférase et CMP-NANA. Notamment la liaison créée après 10 et 30 minutes est plus résistante que celle après 60 ou 120 minutes d'incubation de synthèse. Le tableau ci-dessous montre :

- I. le taux de l'incorporation en fonction du temps d'incubation,
- II. les molécules résistantes en fonction du temps de dégradation.

I. S Y N T H E S E		II. D E G R A D A T I O N		
Temps d'incubation	<u>μmoles NANA</u> <u>incorporées par</u> <u><math>10^9</math> plaquettes</u>	Temps d'incubation		
		2 heures	24 heures	72 heures
10'	14,28	9,15	6,78	4,86
30'	19,32	12,36	13,28	5,19
60'	19,12	9,60	5,58	3

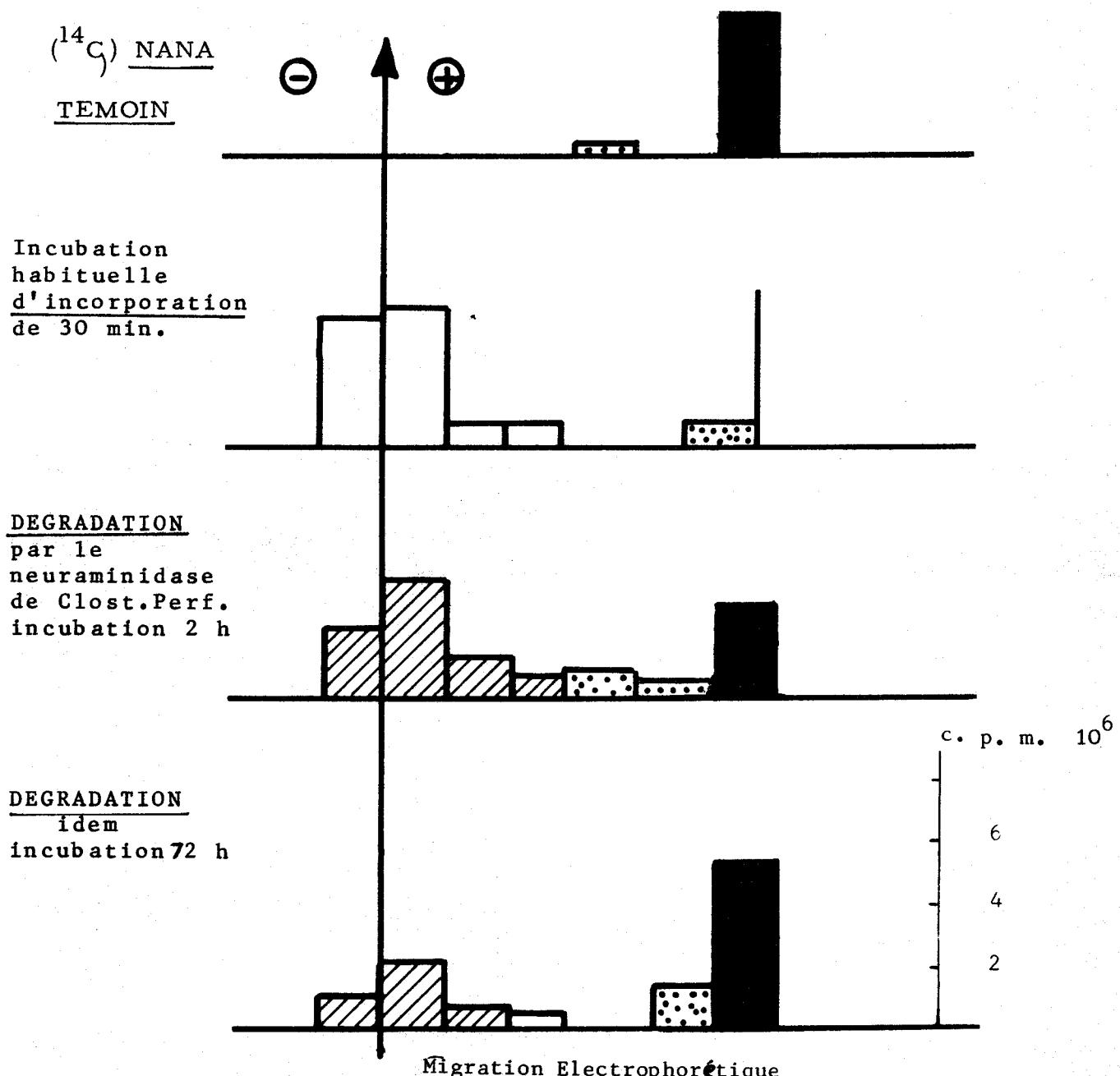
Les valeurs sont déterminées par comptage du ( $^{14}\text{C}$ )-NANA.

Ces résultats permettent de conclure :

- que 67 à 78 % (selon les durées d'incubation) des molécules d'acide sialique marqué au ( $^{14}\text{C}$ ) qui sont fixées au cours de la biosynthèse *in vitro*, sont liées par des LIAISONS CHIMIQUES avec les glycoprotéines de la surface des plaquettes.

Figure 2.13.

ELECTROPHORESE DES PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE  
SIALIQUE AVANT ET APRES TRAITEMENT A LA NEURAMINIDASE.



( $^{14}\text{C}$ ) NANA INCORPORE



( $^{14}\text{C}$ ) NANA RESISTANT A LA NEURAMINIDASE



( $^{14}\text{C}$ ) NANA LIBERE PAR LA NEURAMINIDASE

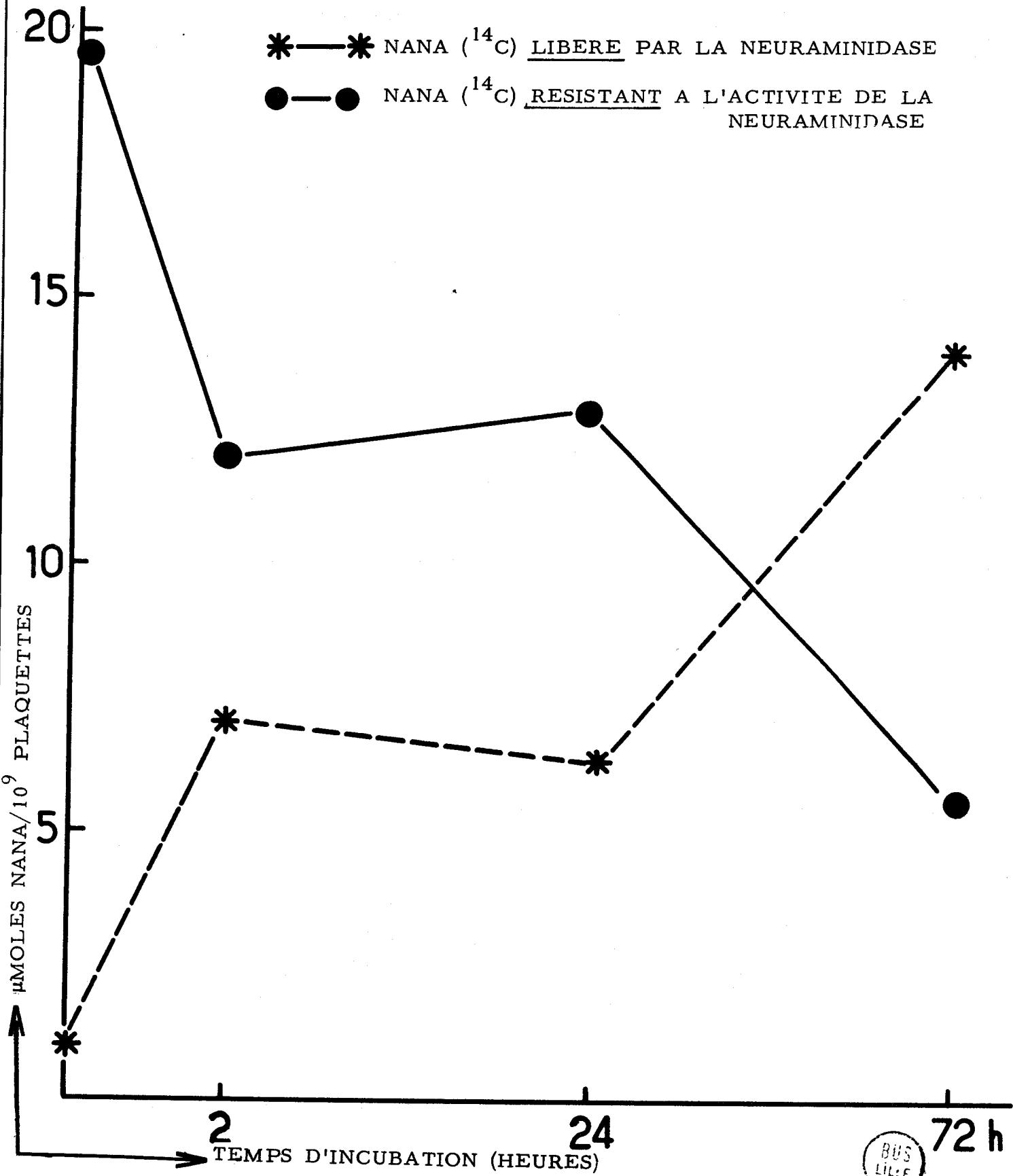


PRODUITS DE DEGRADATION NON IDENTIFIES

805  
LILLE

Figure 2.14

CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE ( $^{14}\text{C}$ ) PAR  
DEGRADATION ENZYMATIQUE PAR LA NEURAMINIDASE



BUS  
LILLE

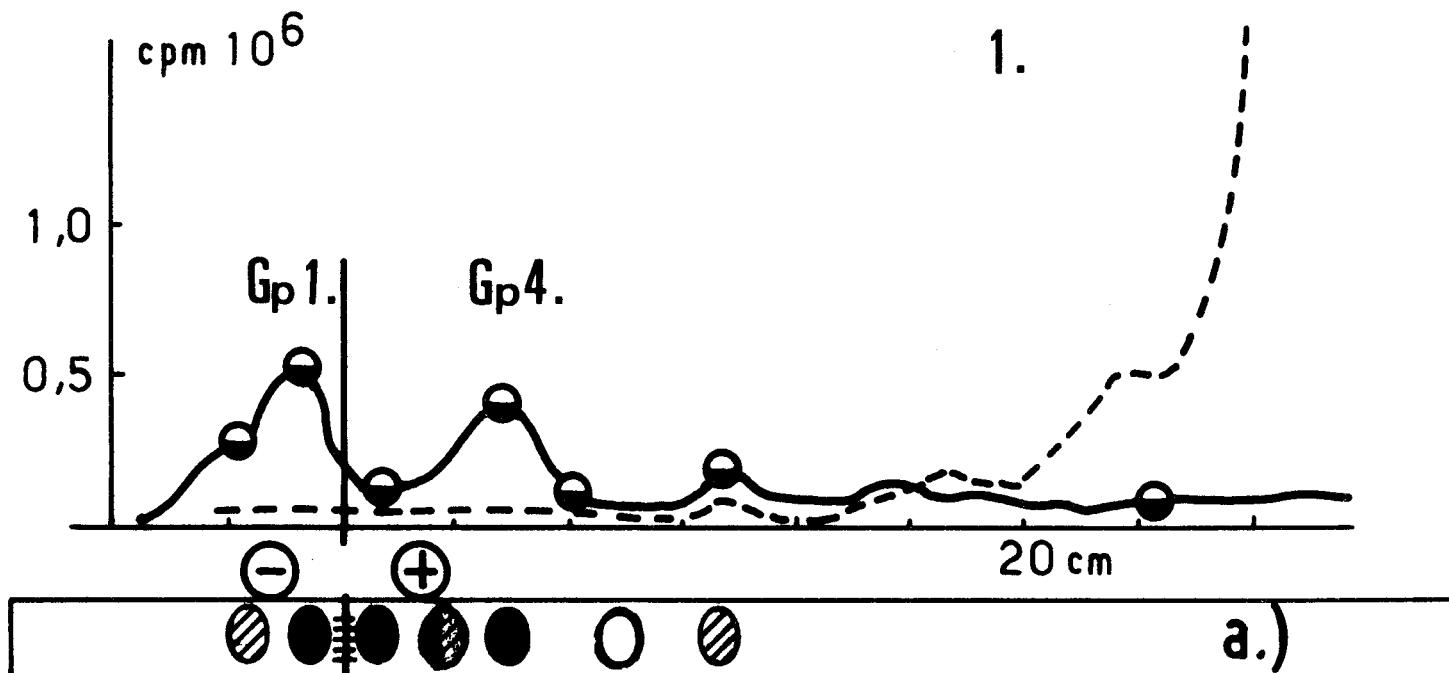
b) Libération de la membrane plaquettaire des sialoglycopeptides marqués au (<sup>14</sup>C) par hydrolyse enzymatique par la pronase

Les plaquettes enrichies en acide sialique-<sup>14</sup>C ont été traitées par la pronase. Utilisant les conditions et les méthodes habituelles, nous avons identifié des sialoglycopeptides marqués au (<sup>14</sup>C) par électrophorèse et comptage du <sup>14</sup>C.

Nos résultats sont résumés dans la figure suivante :

Figure 1

COMPTEUR DE (<sup>14</sup>C) DANS LES SIALOGLYCOPEPTIDES RADIOACTIFS



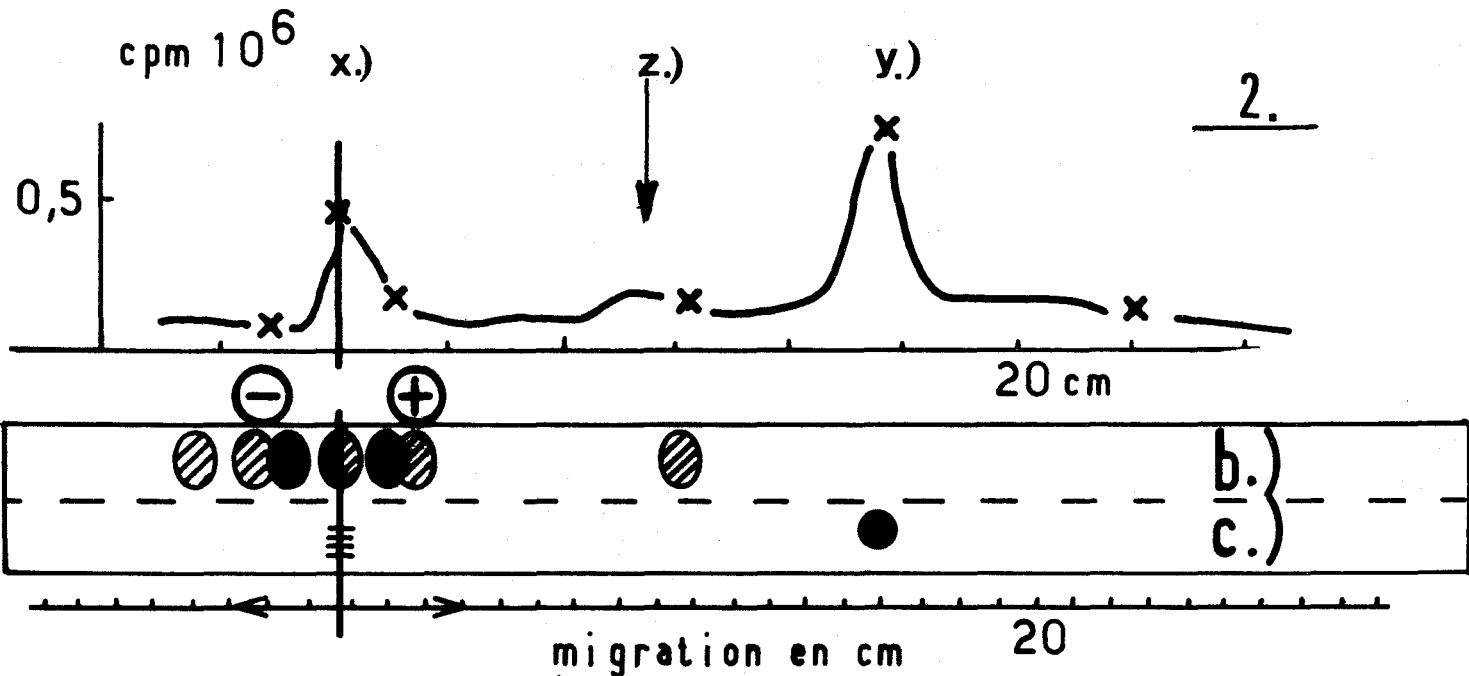
- 1. Mesures de la radioactivité des glycopeptides issus de l'hydrolyse pronasique des plaquettes enrichies en acide sialique marqué au (<sup>14</sup>C).
- a.) Migration des glycopeptides : taches révélées par la ninhydrine.
- — — BLANC : Le mélange des glycopeptides provenant des plaquettes natives incubés avec du CMP-NANA sans enzyme.

On constate l'incorporation d'acide sialique manifestant dans les glycopeptides 1 et 4.

Ensuite nous avons traité le mélange de ces glycopeptides radioactifs par la neuraminidase de Clostridium Perf. à pH 5,5, à 37°C pendant 6 heures. La figure 2 présente la migration (b) des glycopeptides désialinés, modifiée par rapport à la migration initiale (a). Les mesures de radioactivité montrent la quantité d'acide sialique ( $^{14}\text{C}$ ) libéré par la neuraminidase (y), et montrent également qu'une partie de l'acide sialique résistante au traitement par la neuraminidase (x) reste dans les glycopeptides.

Figure 2

ELECTROPHORESE ET MESURES DE RADIOACTIVITE DES GLYCOPEPTIDES  
DES PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE  
APRES TRAITEMENT PAR LA NEURAMINIDASE



2. Mesures de radioactivité de l'acide sialique ( $^{14}\text{C}$ ) :  
X) résistant au traitement à la neuraminidase,  
Y) libéré par la neuraminidase  
Z) produits de dégradation non identifiés

- b) Migration des glycopeptides désialinés (révélation par la ninhydrine)  
c) Migration de l'acide sialique libre (Témoin) (Révélation par  $\text{AgNO}_3$ )

**TROISIEME PARTIE**

**ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE**

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

Les activités biologiques des plaquettes vues au cours de l'hémostase comme l'adhésion et l'agrégation peuvent être reproduites *in vitro* dans le plasma riche en plaquettes ou dans les suspensions de plaquettes isolées. L'induction par les activateurs ou l'empêchement par des inhibiteurs de ces réactions constituent des moyens pour recueillir des informations précises sur le comportement des plaquettes dans leurs fonctions spécifiques. Dans le cas des plaquettes normales, le déroulement de ces tests reflète une surface plaquettaire munie des sites actifs. Proprement dit, les composants chimiques de la surface : protéines, lipides et glucides sont en équilibre. Par conséquent des enzymes, des facteurs plaquettaires de la coagulation, la charge électrique de la surface se manifestent comme étant prêts à fonctionner.

Les plaquettes des cas pathologiques montrent des anomalies dans les tests *in vitro*, lesquels reflètent les perturbations caractéristiques dans leur fonction *in vivo*. Les deux manifestations de la perturbation fonctionnelle accusent une anomalie dans l'équilibre entre les composants de la surface des plaquettes pathologiques.

Dans plusieurs cas pathologiques, comme nous les avons présentés, les composants glucidiques montrent les anomalies au niveau de l'acide sialique, par conséquent au niveau fonctionnel de la charge électrique de la surface plaquettaire. Nous avons essayé de mettre en évidence s'il y a ou non un rôle attribuable à ce glucide dans les anomalies. Nous avons considéré que les changements provoqués sur les plaquettes normales sont significatifs dans la mesure où l'on pourrait les démontrer et vérifier par les tests utilisés pour la caractérisation des fonctions plaquettaires pathologiques.

## C H A P I T R E    1

### ROLE DE L'ACIDE SIALIQUE EN TANT QUE PORTEUR DE CHARGE

#### 1. ACIDE SIALIQUE ET CHARGE ELECTRIQUE DE LA SURFACE PLAQUETTAIRE

Le rôle de l'acide sialique comme responsable de la charge négative et de certaines activités de la surface plaquettaire a été mis en évidence par SPAET et ZUCKER et par MADOFF, EBBE et BALDINI (96,162). Les auteurs ont rapporté que le traitement des plaquettes par la neuraminidase diminue considérablement leur mobilité électrophorétique.

Le rôle éventuel de l'acide sialique dans le comportement des plaquettes pathologiques a été étudié par GROTTUM et SOLUM (59) qui ont signalé les premiers, en 1969, les teneurs faibles en acide sialique dans deux cas de thrombocytopénie avec plaquettes géantes. Ils ont envisagé que le comportement anormal des plaquettes au cours de l'agrégation et la diminution de la mobilité électrophorétique de ces plaquettes pouvaient être attribués au défaut d'acide sialique.

Partant des observations et des hypothèses des auteurs précités, nous nous sommes donné pour tâche de vérifier expérimentalement le rapport entre les variations de la charge négative des plaquettes et les variations de leur taux en acide sialique. Appliquant des méthodes permettant de diminuer la teneur en acide sialique des plaquettes ou au contraire de l'augmenter au delà de la normale, nous avons pu montrer que toutes choses égales par ailleurs, les variations de la teneur en acide sialique se répercutent directement sur la charge négative des plaquettes.

## 2. RAPPORT ENTRE LE TAUX D'ACIDE SIALIQUE ET LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES

a) La diminution de la teneur en acide sialique a été obtenue en soumettant les plaquettes à une dégradation par la neuraminidase.

b) L'augmentation de la teneur en acide sialique a été obtenue par synthèse enzymatique sous l'action de sialyltransférase. Les charges négatives ont été déterminées par mesure de la mobilité électrophorétique des plaquettes.

Nous avons mesuré à l'aide d'un appareil de cytosphéromètre, la mobilité électrophorétique des plaquettes natives et des plaquettes dont la charge a été modifiée.

Nous avons utilisé l'objectif 8x, et le courant 200 volts. Nous avons observé, sur l'oculaire quadrillé, la durée de parcours des plaquettes, en secondes ; dix fois dans les deux sens opposés, le champ électrique étant interrompu après chaque migration. Nous avons constaté que la vitesse de la migration s'est trouvée modifiée (Tableaux 3.I et 3.II). Nous avons déduit la mobilité électrophorétique des plaquettes normales, désialisées et enrichies en acide sialique (Tableau 3.3). Les courbes de GAUSS établies à partir de ces valeurs montrent que les migrations de ces trois catégories de plaquettes dans un champ électrique sont différentes (Figure 3.1).

On peut conclure que les charges électriques portées par les plaquettes sont donc profondément modifiées par l'appauvrissement ou l'enrichissement, en acide sialique.

Tableau 3.I

MESURES DE LA MOBILITE DES PLAQUETTES : EN SECONDES SUR 120  $\mu$   
 (moyennes de 5 échantillons)

natives	traitées à la neuraminidase		enrichies en acide sialique	
4,8 $\pm$ 5,0		8,0 $\pm$ 7,0		4,0 $\pm$ 5,0
6 5,5		10,5 6,5		3,8 4,0
5 5		10 6		3,4 4,0
5,5 6,0		8,0 5,6		4,2 4,0
5,5 6,0		10,5 5,6		3,5 4,2
6,0 5,5		9 7,0		4,1 4,4
5,2 5,2		7 10,0		4,4 4,8
4,8 4,6		5 8		4,6 5,2
6,0 7,0		13 6		4,3 3,0
5,2 4,4		9,0 8,5		4,7 4,5

Tableau 3.II

VITESSE DE LA MIGRATION DES PLAQUETTES :

natives 1) sec/120 $\mu$	Traitées à la neuraminidase sec/120 $\mu$	Enrichies en acide sialique sec/120 $\mu$
5,25 5,52	* 7,25 6,90	*** 4,47 4,22
	** 7,77 7,32	**** 4,38 4,16
	<u>diminution de la vitesse de la migration</u>	<u>Augmentation de la vitesse de la migration</u>
	31,3 %	8,77 %
	40,75 %	10,60 %

1) Les valeurs correspondent à un parcours de 120  $\mu$

\* Temps d'incubation des plaquettes avec de la neuraminidase de Closi Perfr. ont été 1 et 2 heures respectivement pour \* et \*\*. - Temps d'incubation des plaquettes avec du sialyl-transférase et du CMP-NANA ont été 30 et 45 minutes respectivement pour \*\*\* et \*\*\*\*.

BUS  
LILLE

Tableau 3.III

MODIFICATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES

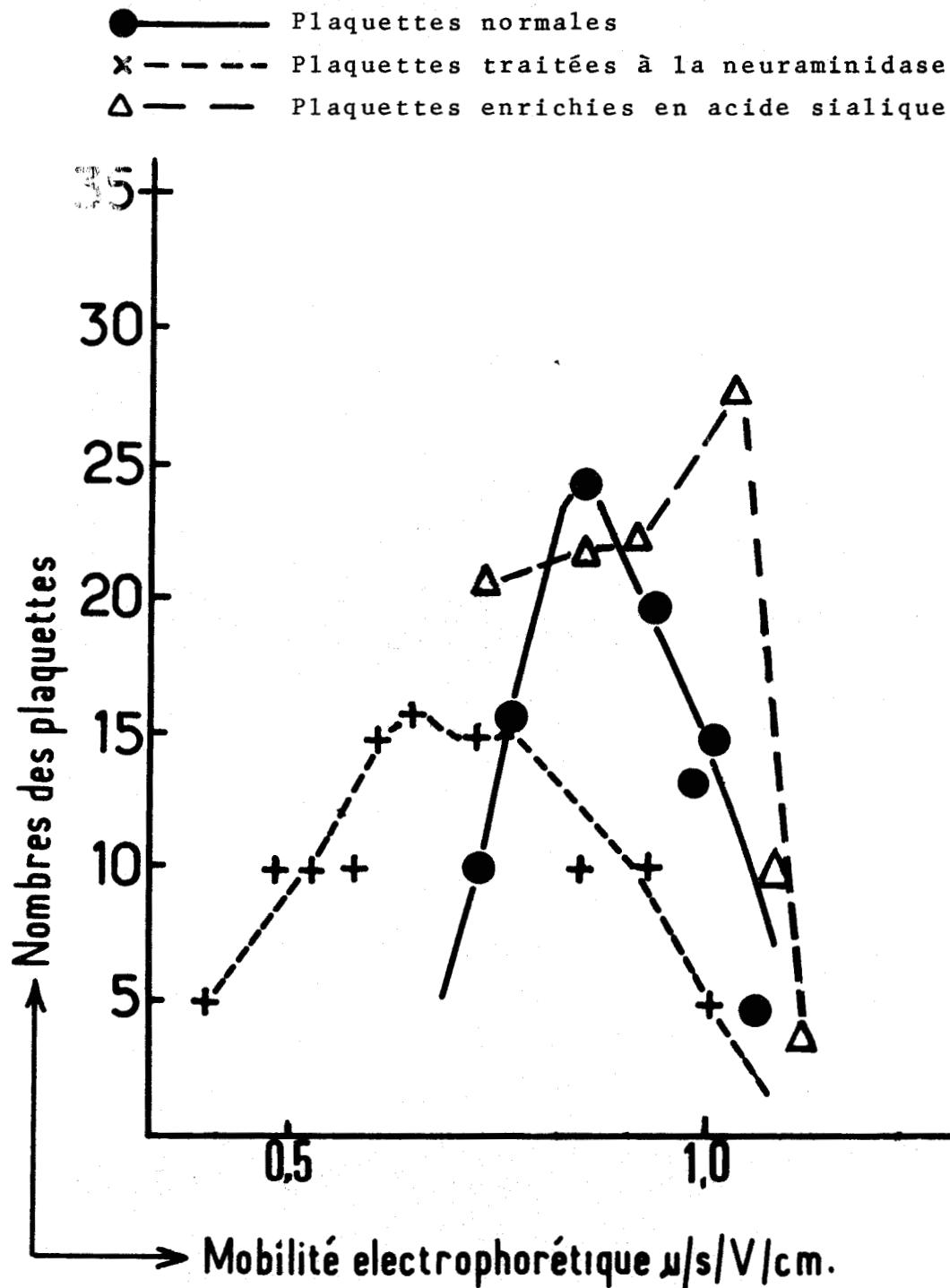
PLAQUETTES	Mobilité électrophorétique en $\mu/\text{sec}/\text{V/cm}$	
	I	II
NATIVES	1,05	1,0
		$\pm 10\%$
traitées à la neuraminidase 30 min. d'incubation	0,85	0,85
idem		
1 H d'incubation	0,85	0,85
idem		
2 H d'incubation	0,80	0,72
Enrichies en acide sialique 10 min. d'inc. d'incorporation	1,09	1,04
idem		
20 min. d'incubation	1,13	1,07
idem		
30 min. d'incubation	1,19	1,10
TRAITEMENTS **)		
ENZYMATIQUES DES PLAQUETTES effectués :	en PRP	en suspension des plaquettes lavées

\*) Les valeurs sont des moyennes de  $2 \times 10$  mesures effectuées sur chaque échantillon, correspondant avec l'observation de 10 particules individuelles.

\*\*) Les traitements (incubation) par les enzymes sialyltransférases et neuraminidases ont été effectués sur les plaquettes en milieu plasmatique (colonne I) d'une part, et sur les plaquettes lavées (colonne II).

Figure 3.1

REPARTITION DES PLAQUETTES SELON LEUR MOBILITE ELECTROPHORETIQUE



Données : Le champ est de  $200/10 = 20$  volts par cm. Objectif 8x, l'intervalle entre deux lignes verticales est de 120 microns ; la vitesse d'une plaquette est donc de 120 secondes mesurées (temps pour un intervalle).

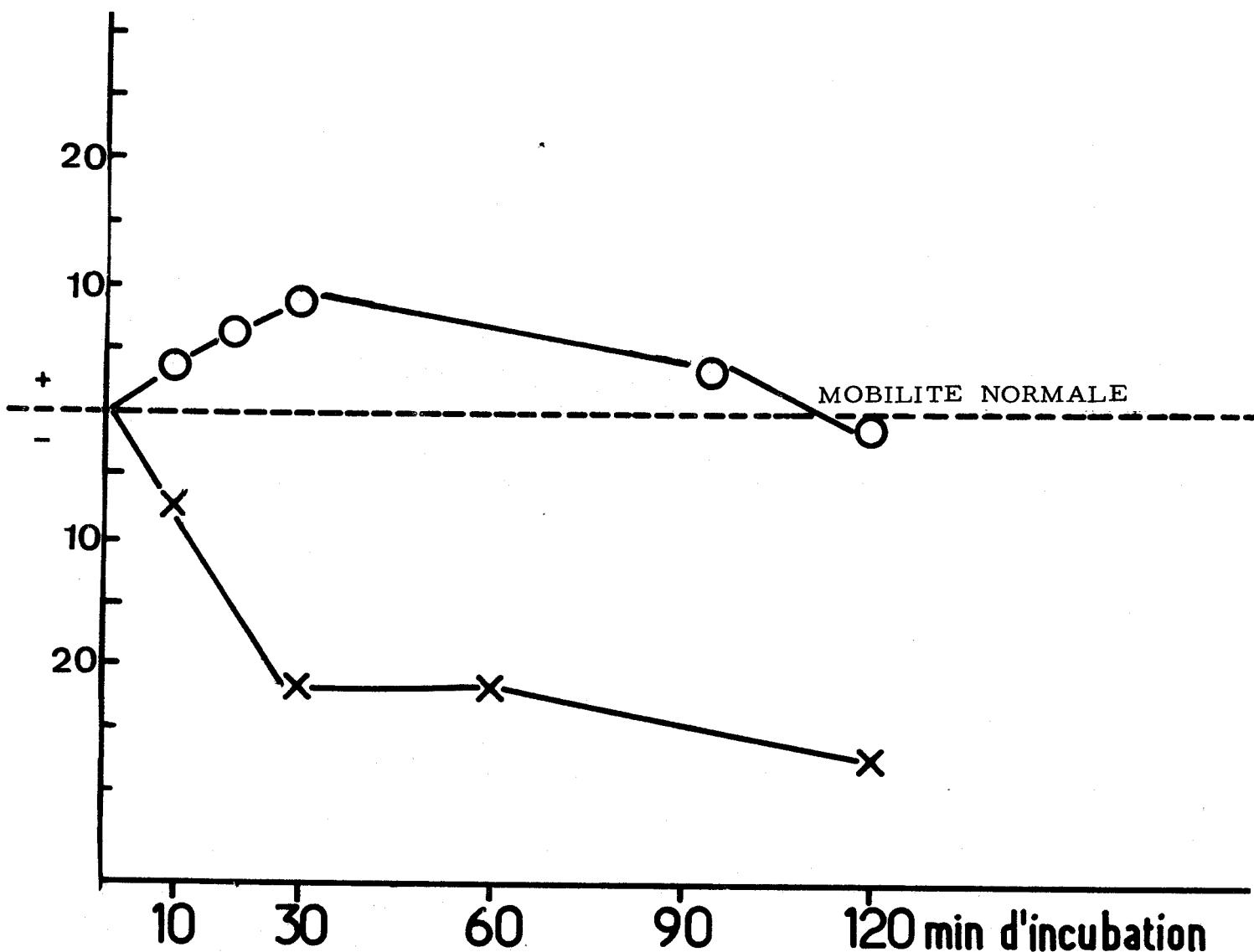
La mobilité est exprimée en micron par seconde par volt et par cm.

BUS  
LILLE

Figure 3.2

CHANGEMENT DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES PLAQUETTES ENRICHIES ET APPAUVRIES EN ACIDE SIALIQUE.

% DE CHANGEMENT  
DE LA MOBILITE



MOBILITE NORMALE DES PLAQUETTES LAVEES NATIVES

X—X MOBILITE DES PLAQUETTES TRAITEES A LA NEURAMINIDASE

O—O MOBILITE DES PLAQUETTES INCUBEES AVEC DE SIALYLTRANSFERASE ET DE CMP-NANA



3. MODIFICATION DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES PLAQUETTES  
PAR FIXATION DE SEROTONINE

Nous avons vu que la charge électrique des plaquettes natives est négative et son potentiel peut être caractérisé par la mobilité électrophorétique des plaquettes.

La charge négative peut être augmentée expérimentalement par incorporation de molécules supplémentaires d'acide sialique et diminuée par élimination de molécules d'acide sialique par la neuraminidase. La charge négative des plaquettes peut être diminuée aussi par fixation de la sérotonine électropositive sur des sites accepteurs de la membrane plaquettaire.

- Fixation de sérotonine électropositive sur des sites accepteurs.

La sérotonine possède une charge électropositive. La fixation de molécules de cette sérotonine sur des sites accepteurs de la membrane plaquettaire va d'abord masquer progressivement la charge électronégative conférée par l'acide sialique, mais cette fixation peut se poursuivre au delà du point isoelectrique. La fixation de molécules de la sérotonine peut aller jusqu'à conférer aux plaquettes natives une charge électropositive, et ceci sans que la teneur en acide sialique ait été modifiée.

Nos travaux expérimentaux sur la modification de la charge électrique des plaquettes par fixation de molécules de sérotonine ont porté non seulement sur les plaquettes natives mais aussi sur des plaquettes préalablement enrichies en acide sialique.

Dans le cas des plaquettes natives la fixation de sérotonine peut aller jusqu'à leur conférer une charge électropositive importante mais dans le cas des plaquettes enrichies en acide sialique on n'arrive pas à une charge électropositive aussi forte, car alors le nombre requis de molécules de sérotonine est plus grand.

Pour augmenter ou diminuer la charge négative, nous avons mis en pratique les méthodes habituelles conduisant à l'incorporation ou à la dégradation d'acide sialique dans les plaquettes. Pour donner une charge positive aux plaquettes nous avons utilisé la méthode de fixation du 5-HT décrite par BORN et GILSON (1959) (24).

Les changements de la charge électrique de la membrane plaquettaire ont été mis en évidence par la mobilité électrophorétique des plaquettes modifiées, au cours d'électrophorèses sur papier sous haut voltage et pendant de longues durées (400 V pendant 4 heures). Après développement du papier d'électrophorèse avec des réactifs appropriés on peut distinguer des taches correspondantes des plaquettes et mesurer la distance de migration des plaquettes (la méthode ne permet pas de calculer la vitesse de migration). (Figure 3.3).

Légende de la figure : Les taches 1, 2 et 3 illustrent la migrations des plaquettes natives et des plaquettes dont le degré de la charge négative a été augmenté par des taux d'acide sialique incorporés.

Les taches 4, 5, 6, 7 illustrent la migration des plaquettes natives et celle des plaquettes dont la charge négative a été modifiée en charge positive.

On peut constater que les plaquettes natives (taches 1 et 4) migrent à peine vers la partie positive du papier tandis que les plaquettes enrichies en acide sialique (taches 2 et 3) migrent davantage.

Les plaquettes qui ont fixé des molécules de 5-HT (taches 5 et 6) migrent vers le côté négatif du papier. L'échantillon 7 (tache 7) représente les plaquettes enrichies en acide sialique

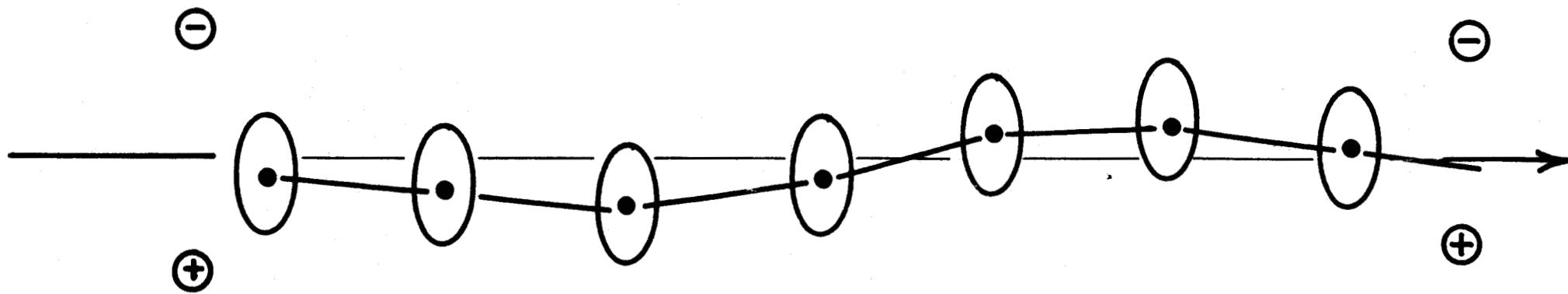
qui ont incorporé 22 nanomoles d'acide sialique par  $10^9$  plaquettes, et sur lesquelles on a ensuite fixé 43  $\mu$ moles du 5-HT/10<sup>9</sup> plaquettes. Dans ce cas, les plaquettes migrent à peine vers le bout négatif du papier, indiquant que la charge électrique négative positive ne l'est que faiblement.

Il faut noter que les valeurs obtenues seront toujours relatives à cette méthode d'électrophorèse dont la sensibilité est limitée.

Figure 3.3.

MOBILITE ELECTRIPHORETIQUE DES PLAQUETTES NATIVES ET DES PLAQUETTES DONT LA CHARGE ELECTRIQUE A ETE MODIFIEE.

(ELECTROPHORESE SUR PAPIER 4000 V, pH 7, mesure du papier 25x57cm, révélation par la ninhydrine.)



- 121 -

1	2	3	4	5	6	7
PLAQUETTES NATIVES	PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE : ayant incorporé respectivement ;		PLAQUETTES NATIVES	PLAQUETTES AYANT FIXE respectivement :		PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE.
14,6 uMOLES 22, uMOLES de $(^{14}\text{C})\text{NANA}$ par $10^9$ plaquettes	22, uMOLES de $(^{14}\text{C})\text{NANA}$ par $10^9$ plaquettes			20 et 39uMOLES de la SEROTONINE marquée au $(^3\text{H})$ par $10^9$ plaquettes.		(par 22 umoles NANA incorporées) et ayant fixe ensuite 39 u MOLES de la SEROTONINE par $10^9$ plaquettes.

## C H A P I T R E 2

### ETUDE PAR LES TESTS BIOPHYSIQUES IN VITRO DE L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE-INCORPORE SUR LES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

#### 1. INTRODUCTION

Nos résultats ont démontré que les plaquettes qui ont incorporé un taux supplémentaire d'acide sialique présentent des caractéristiques modifiées.

D'abord leur mobilité électrophorétique due à la charge négative de leurs surfaces est augmentée. Ensuite nous avons constaté des changements dans leurs fonctions in vitro comme :

- l'agrégation induite par l'ADP
- l'agrégation induite par la sérotonine
- accélération d'échange de potassium en présence de la sérotonine
- fixation des molécules de sérotonine marquée au (<sup>3</sup>H)

Nous allons maintenant décrire ces changements dans les fonctions in vitro précitées, observés sur les plaquettes enrichies en acide sialique.

## 2. MODIFICATION DE L'AGREGATION DES PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE

### a) Agrégation induite par l'ADP

Après avoir enrichi des plaquettes sous forme de plasma riche en plaquettes, nous avons étudié leurs agrégations sous l'effet du diphosphate d'adénosine (ADP).

L'effet sur l'agrégation de l'acide sialique ( $^{14}\text{C}$ ), fixé par les plaquettes a été mesuré par la méthode photométrique (BORN, 1962) (12) en utilisant comme base de référence des échantillons de mélange réactionnels privés de CMP-( $^{14}\text{C}$ )-NANA, mais soumis à l'incubation pendant les mêmes temps.

On a constaté que le degré de l'agrégation des plaquettes provoqué par l'ADP décroissait progressivement avec l'augmentation progressive de la teneur en acide sialique (Figure 3.4).

### b) Agrégation induite par la sérotonine

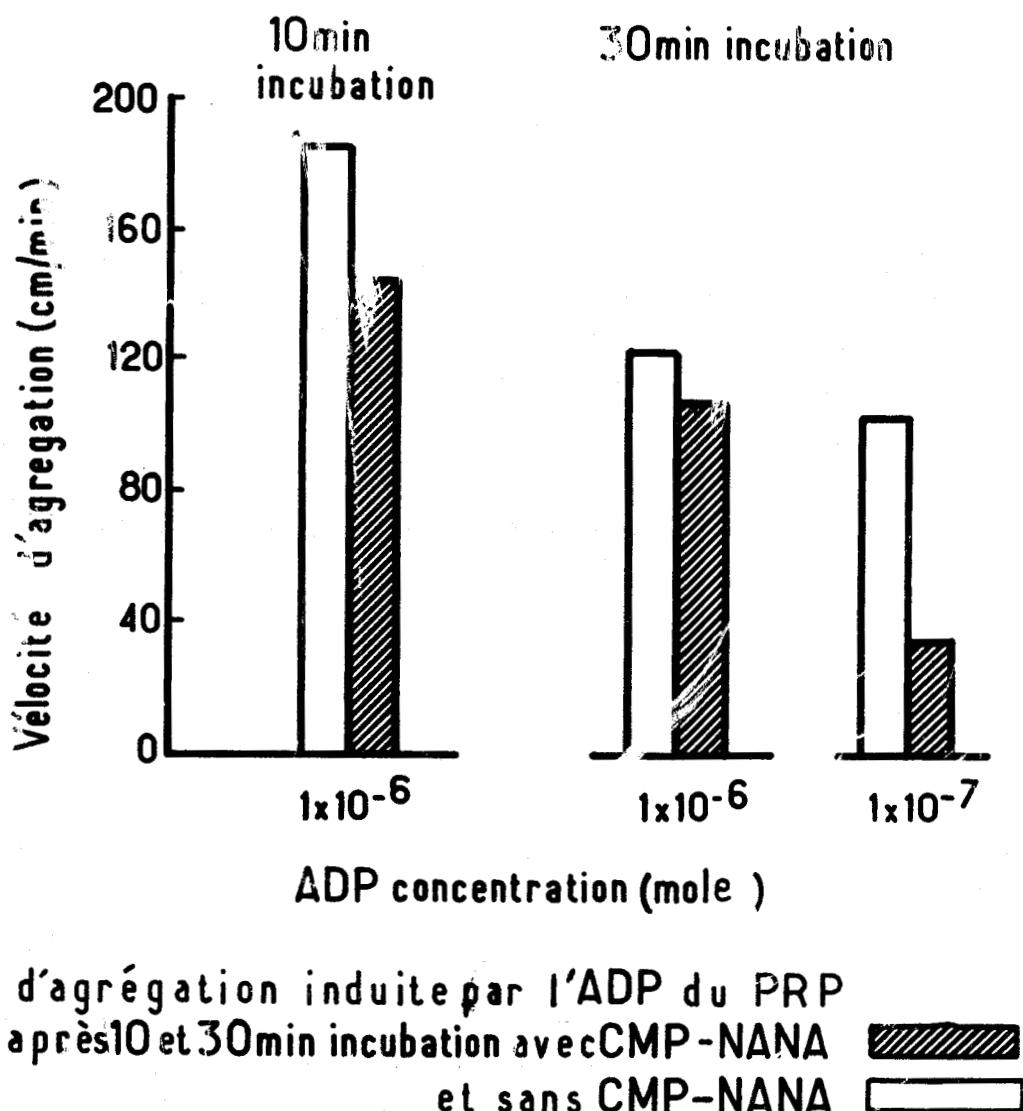
Il a été suggéré que l'acide sialique pouvait jouer un rôle dans le complexe récepteur de 5-HT de la membrane plaquettaire. Une augmentation de l'acide sialique fixé sur la membrane pourrait par conséquent être considérée comme devant favoriser et activer l'agrégation des plaquettes sous l'action de 5-HT. Cette hypothèse a été démontrée par nos résultats.

La capacité d'agrégation a augmenté considérablement sous l'action de la 5-HT lorsque les plaquettes avaient subi une incubation de 10 minutes avec de la CMP-NANA. La figure 3.5. illustre l'agrégation des plaquettes de ce plasma riche en plaquettes, induite par la 5-HT à différentes concentrations.

Après 30 minutes d'incubation on a constaté que l'accélération de l'agrégation était moins importante dans certains cas, (phénomène connu sous le nom de "reversal"effect").

Figure 3.4

MODIFICATIONS DE L'AGREGATION DES PLAQUETTES  
ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE INDUITES PAR L'ADP



BUS  
LILLE

Figure 3.5

AGREGATION MODIFIEE DES PLAQUETTES ENRICHIES  
EN ACIDE SIALIQUE INDUITE PAR LA SEROTONINE

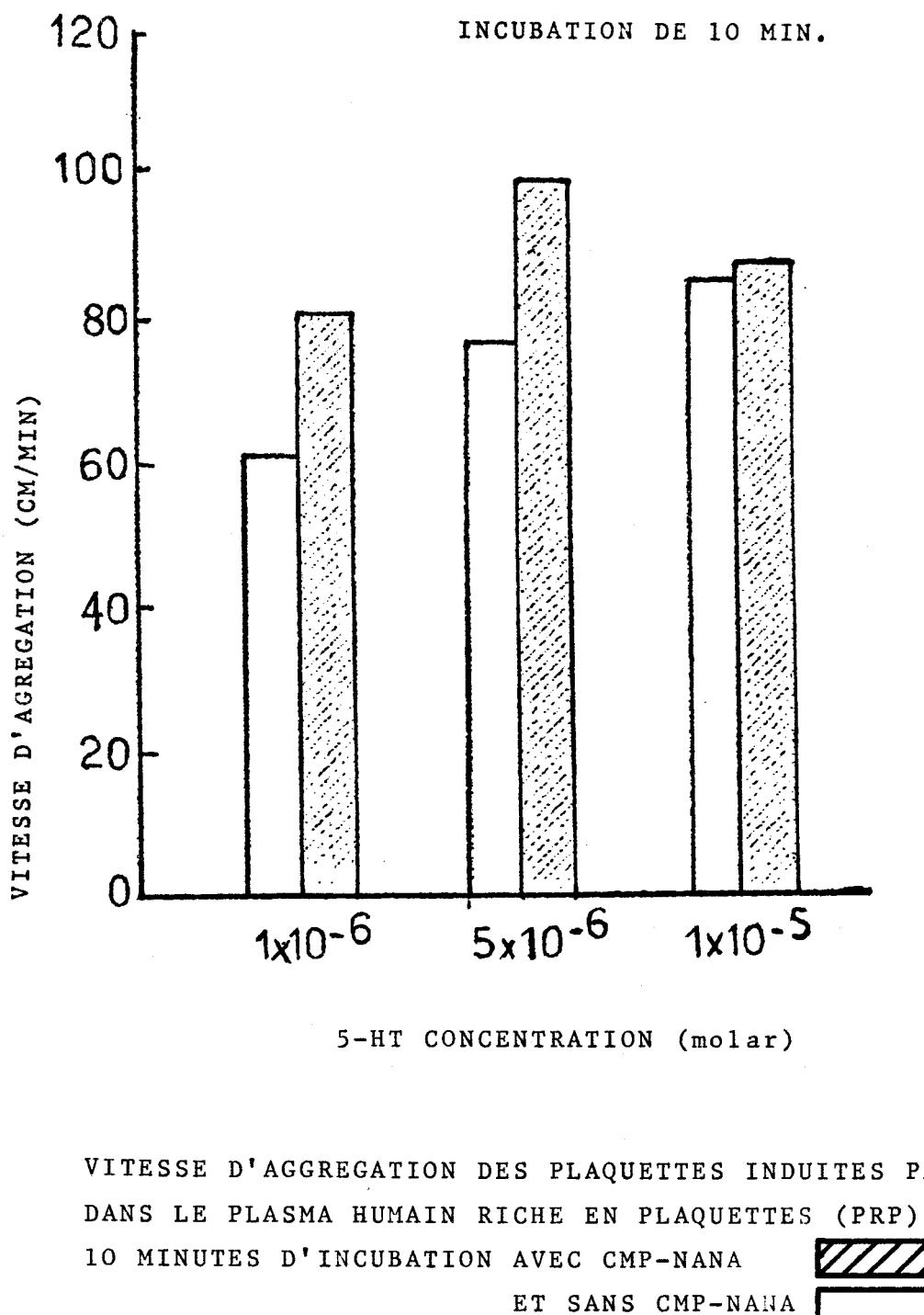


Tableau 3.IV

L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR L'AGREGATION  
DES PLAQUETTES INDUITE PAR LA SEROTONINE

				Incubation avec ( $^{14}\text{C}$ ) CMP-NANA (min.)	% des changements	
	Temps après prélèvement du sang	uM			V	VI
1	1,5	5-HT	5,0	30	+33	
			10,0		+21	
			20,0		+ 8	+24,0
		ADP	0,5		-31	
			1,0		-20	
			2,0		-18	
	5,5	ADP	1,0	15	-40	+13,6
2	4,0	ADP	0,5	30	-22	
			1,0		-20	
		5-HT	5,0		+78	+19,8
			10,0		+92	
			20,0		+62	
	4,5	ADP	0,5	10	-26	
			1,0		-23	
		5-HT	1,0		+21	+13,3
			5,0		+15	
			10,0		+11	
3,5	2,0	ADP	1,0	30	-29	+22,3
			5-HT		+10	
	2,5	5-HT	1,0	10		
			5,0			
			10,0			
4	3,5	ADP	1,0	30		
			5-HT			
	0,5	5-HT	10,0	10	+30	+24,7
			10,0		+52	+27,9

Colonne V : Action sur la vitesse de l'agrégation

BUS  
LILLE

Colonne VI : Augmentation de la teneur en acide sialique.

(Moyennes des résultats obtenus de 4 séries d'expériences sur les plaquettes normales).

### 3. L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR L'ECHANGE DU POTASSIUM EN PRESENCE DE LA SEROTONINE

Un critère sensible de la fonction de la membrane cellulaire est l'allure du transfert du potassium. Les plaquettes échangent leur potassium intracellulaire à l'allure d'environ  $18 \text{ mol/sec}/10^{11}$  plaquettes.

Ainsi l'échange du potassium des plaquettes natives s'effectue à raison d'environ 1,5 % de leur teneur totale en potassium. Selon les expériences de BORN, quand le plasma contient environ 5  $\mu\text{g/ml}$  de 5-HT l'influx de  $K^+$  dans les plaquettes se trouvait augmenté aussi longtemps qu'elles fixaient de la sérotonine.

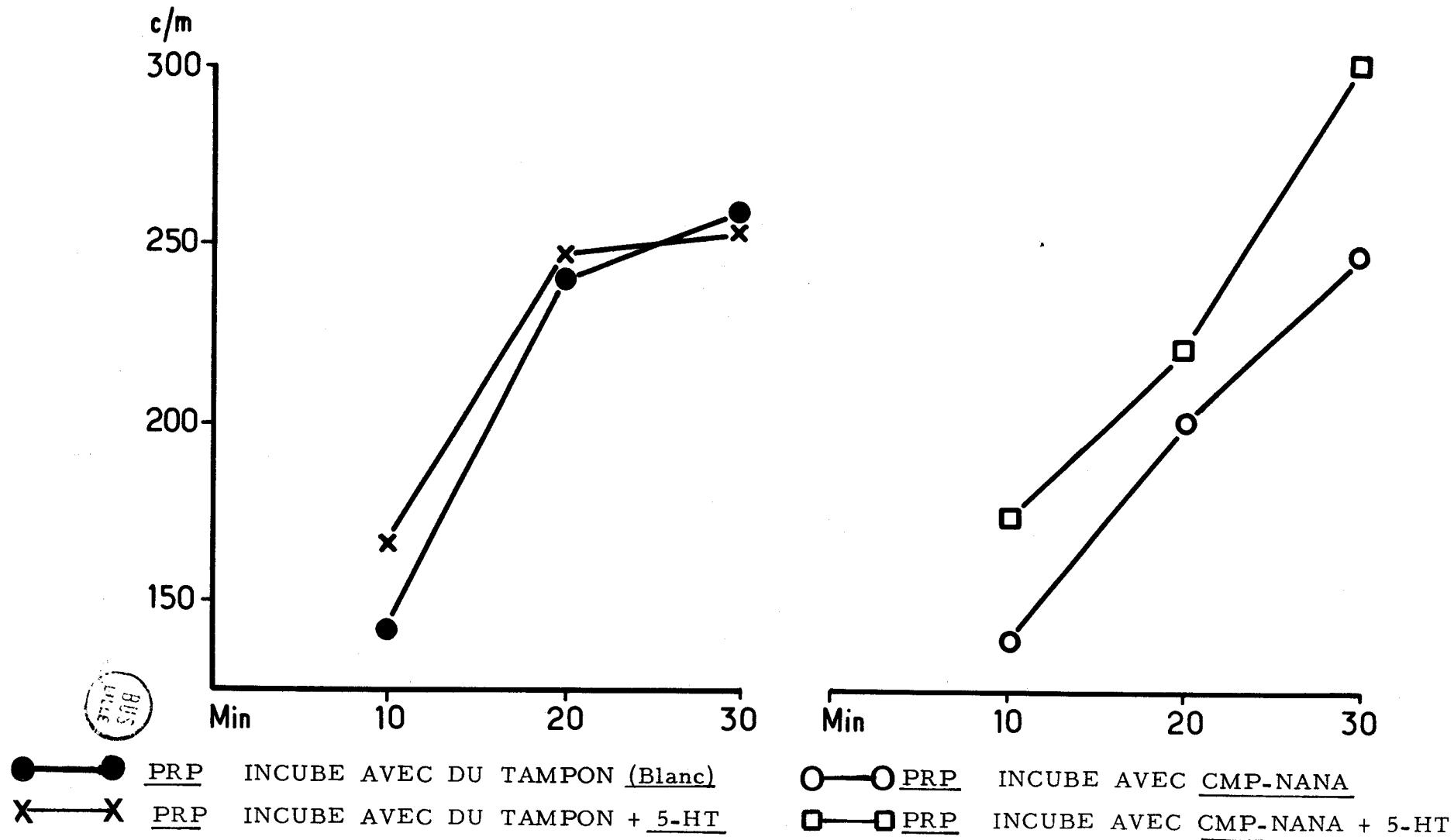
Ces expériences ont suggéré que la réaction entre la membrane plaquettaire et la 5-HT accélérerait le mouvement de potassium vers l'intérieur des plaquettes. L'allure de l'échange peut être augmentée jusqu'à 24 % au cours de la fixation de la 5-HT par les plaquettes (BORN, 1967, 26).

Partant du fait que l'incorporation d'acide sialique augmente le nombre de sites récepteurs de la sérotonine, et afin de découvrir si l'incorporation d'acide sialique influence le transfert de potassium vers l'intérieur des plaquettes, nous avons étudié l'effet du taux d'acide sialique incorporé sur la fixation de potassium radioactif dans les plaquettes en absence et en présence de la sérotonine (120).

En effet nos résultats, que nous présenterons, montrent que la pénétration du potassium radioactif dans les plaquettes natives est facilitée par la fixation d'une quantité du 5-HT par les plaquettes, jusqu'au moment où celle-ci atteint un niveau constant. Dans le cas des plaquettes enrichies en acide sialique, on n'observe pas un tel niveau de ralentissement de l'allure de l'échange de potassium. L'accélération de l'échange entre potassium et  $^{42}\text{potassium}$  continue de s'accentuer, car la fixation de la sérotonine est facilitée par la présence d'une quantité accrue d'acide sialique.

Figure 3.6

ECHANGE DU  $^{42}\text{POTASSIUM}$  DANS LES PLAQUETTES NORMALES ET DANS LES  
PLAQUETTES ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE AVEC ET SANS 5-HT



D'après les valeurs des mesures de radioactivité du potassium nous avons établi 4 courbes dont 2 concernent le plasma riche en plaquettes natif, et 2 autres le plasma riche en plaquettes contenant des plaquettes enrichies en acide sialique. Nous avons utilisé pour chacune des quatre courbes trois points donnant la mesure du  $^{42}\text{K}$  après des durées d'incubation de 10, 20 et 30 minutes (Figure 3.6) dont :

- la courbe 1 correspond au cas du PRP incubé avec  $^{42}\text{K}$  et tampon (2) seulement
- la courbe 2 correspond au cas du PRP incubé avec  $^{42}\text{K}$  et tampon en présence de 5-HT
- la courbe 3 correspond au cas du PRP incubé avec CMP-NANA et tampon et  $^{42}\text{K}$
- la courbe 4 correspond au cas du PRP incubé avec CMP-NANA et tampon et  $^{42}\text{K}$  en présence de 5-HT.

Les différences que l'on constate dans l'allure des courbes 1 et 2 d'une part, et celle des courbes 3 et 4 d'autre part illustrent donc l'influence de l'enrichissement des plaquettes en acide sialique.

Nos résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

- Avec les plaquettes NORMALES la présence de la sérotonine augmentait toujours la fixation de  $^{42}\text{K}^+$
- Dans trois expériences la teneur en acide sialique des plaquettes, déterminée grâce au ( $^{14}\text{C}$ ) de l'acide sialique utilisé, s'est montrée être supérieure de 19 à 31 % à la teneur normale. Cette augmentation de la teneur en acide sialique n'était accompagnée d'aucune augmentation de la fixation de  $\text{K}^+$  radioactif.
- En présence de la sérotonine : les pourcentages d'augmentation de la teneur en acide sialique et d'augmentation de l'échange de  $^{42}\text{K}^+$  étaient similaires.

#### 4. L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR LA FIXATION DE SEROTONINE PAR LES PLAQUETTES

Les travaux de BORN (1967) (151) ont démontré que l'accélération de l'échange de potassium ne se produit que lorsque la 5-HT elle-même est déjà fixée par les plaquettes. Pour trouver si la fixation de 5-HT est augmentée effectivement par l'incorporation d'acide sialique, nous avons entamé une série d'expériences sur la capacité des plaquettes natives et des plaquettes enrichies en acide sialique avec laquelle elles fixent la sérotonine. D'abord nous avons constaté une différence entre la fixation de 5-HT par les plaquettes lavées et par les plaquettes en milieu plasmatique. Ensuite nous avons constaté que l'acide sialique incorporé offre des sites plus nombreux sur la surface des plaquettes enrichies en acide sialique.

La figure 3.7 montre nos résultats qui nous ont permis de comparer le pouvoir accepteur des plaquettes natives incubées en milieu plasmatique avec celles des plaquettes lavées suspendues dans une solution isotonique de NaCl.

On peut constater que le pouvoir accepteur des plaquettes lavées est inférieur à celui des plaquettes restant dans leur plasma (PRP) en ce qui concerne la fixation de la sérotonine.

L'explication réside probablement dans le rôle très certain de l'atmosphère périplaquettaire dans chaque fonction de la membrane.

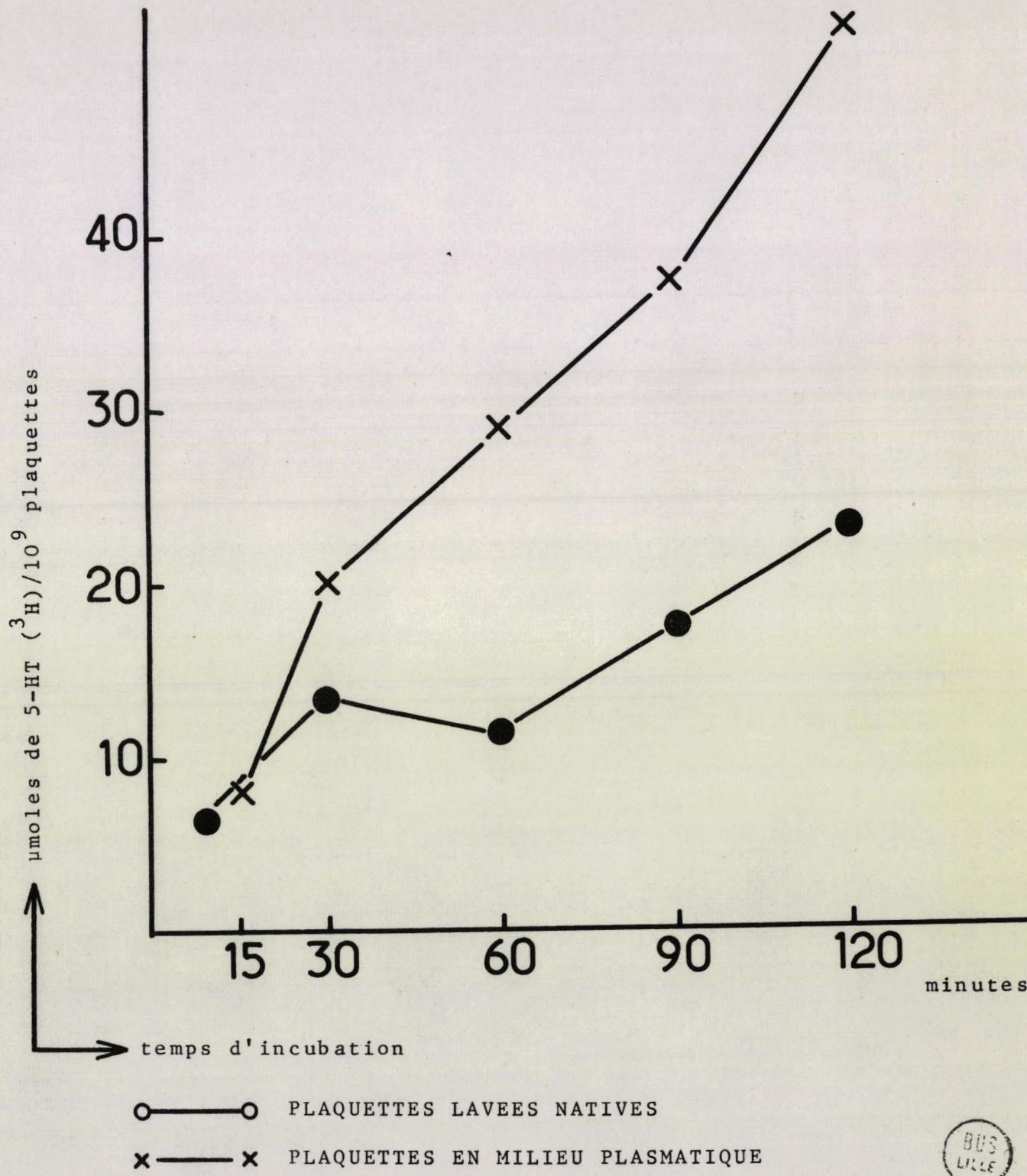
##### Fixation de la sérotonine par les plaquettes enrichies en acide sialique.

La comparaison de la fixation de 5-HT sur les plaquettes natives et les plaquettes enrichies en acide sialique a été opérée par la méthode de BORN (24) adaptée à nos expériences.

Les résultats ainsi obtenus ont montré que le taux de l'acide sialique incorporé aux plaquettes modifie sensiblement la capacité de fixation de la sérotonine des plaquettes: figures 3.8 et 3.9, tableau 3.V .

Figure 3.7

CINETIQUE DE FIXATION DE LA SEROTONINE PAR LES PLAQUETTES



BUS  
VILLE

Figure 3.8.

L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE AUX PLAQUETTES  
SUR LEUR CAPACITE DE FIXATION DE SEROTONINE  
EN MILIEU PLASMATIQUE.

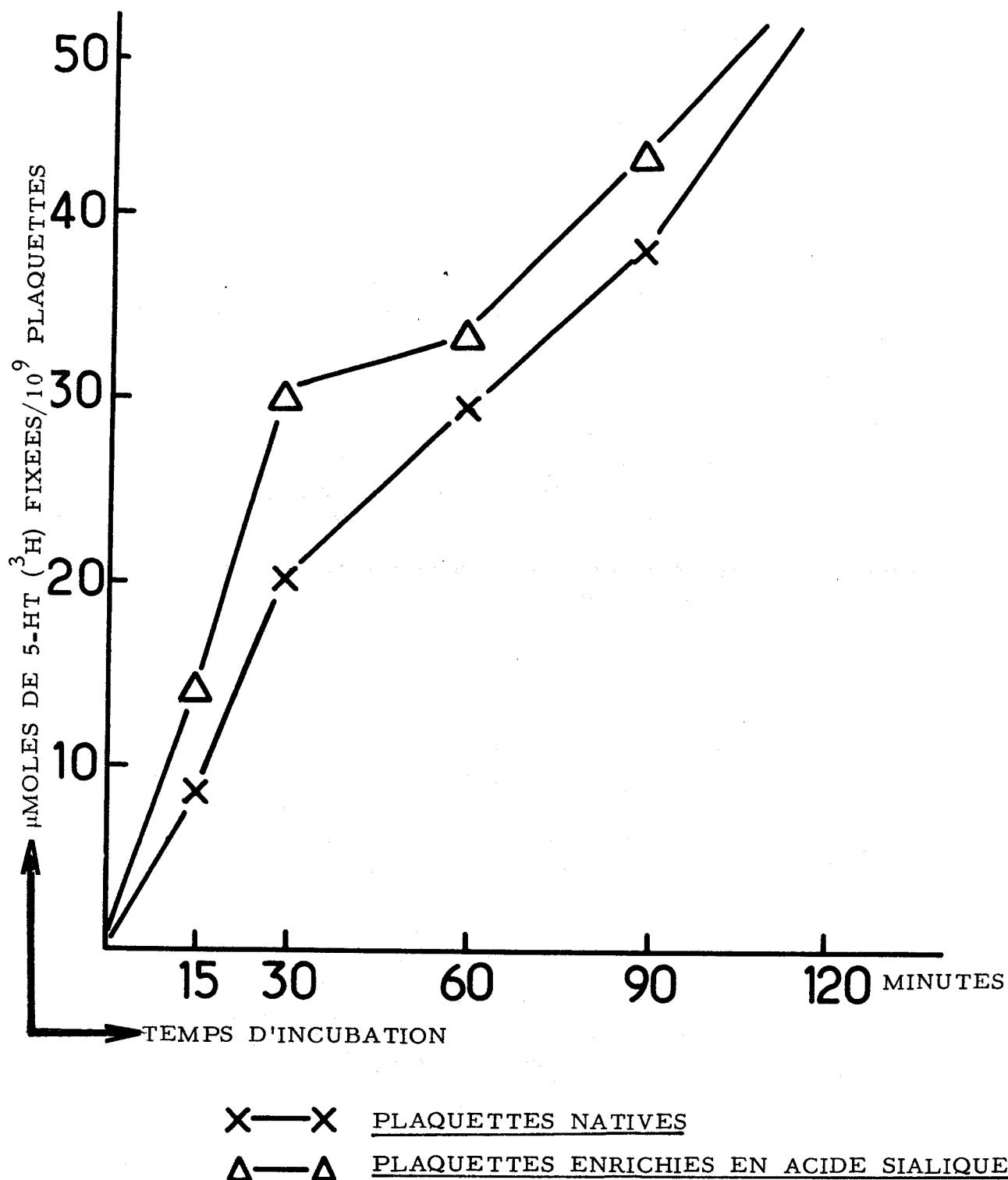
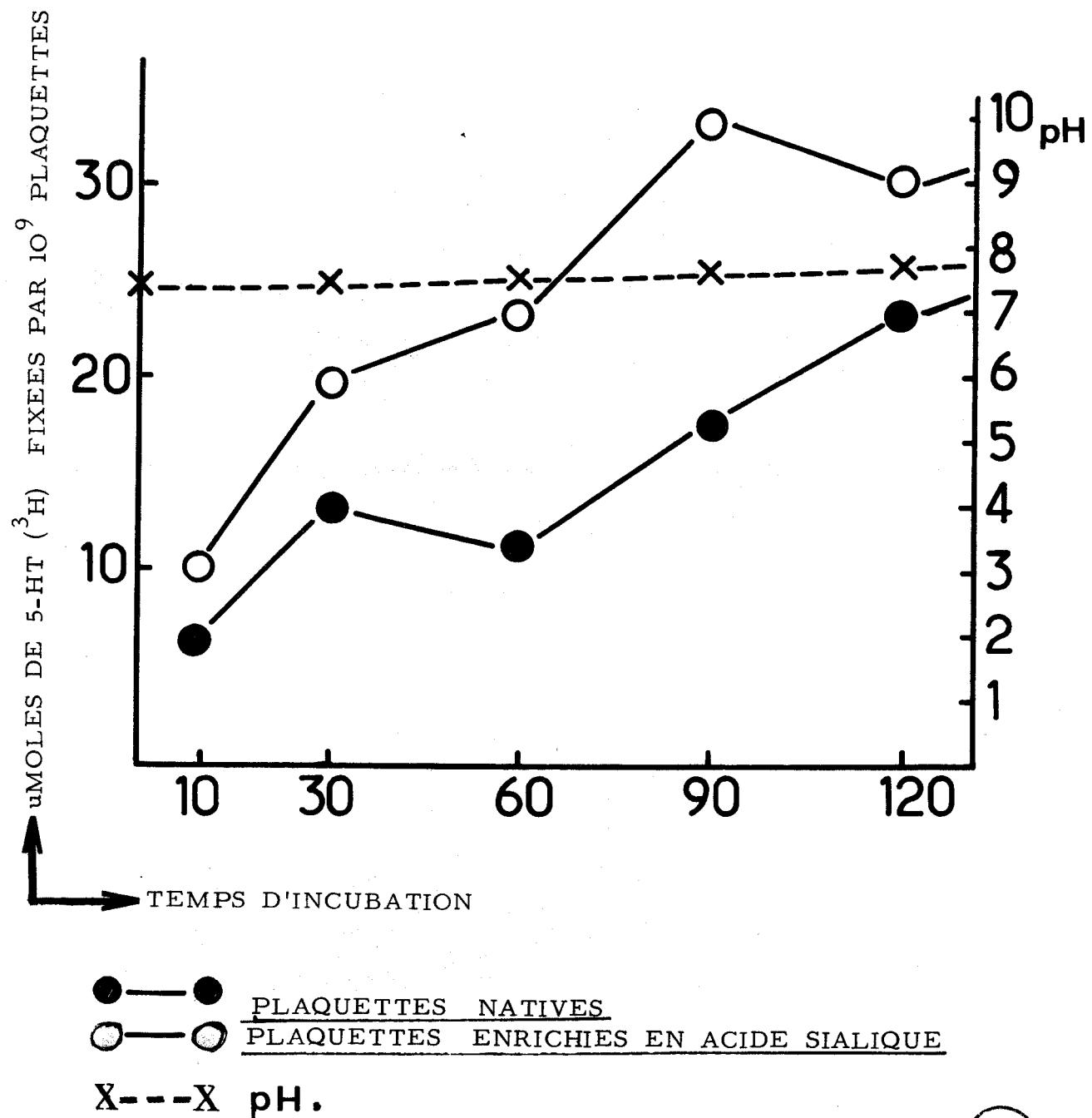


Figure 3.9.

L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE AUX PLAQUETTES  
SUR LEUR CAPACITE DE FIXATION DE SEROTONINE EN  
SUSPENSION DES PLAQUETTES ISOLEES.



BUS  
VILLE

Tableau 3.V

FIXATION DE LA SEROTONINE PAR LES PLAQUETTES NATIVES ET  
ENRICHIES EN ACIDE SIALIQUE ( $\mu$ moles/ $10^9$  plaquettes)

Plaquettes isolées natives	8	13	17	23	28	
Plaquettes enrichies en acide sialique ou $10^9$ plaquettes contenant (11,4 $\mu$ moles d'acide sialique dépassant sa teneur d'origine)	10,5	20	24	32,5	29,5	33,5
PRP natif	8	20	29,5	39	52	
PRP dont les plaquettes ont incorporé 22 $\mu$ moles de NANA/ $10^9$ plaquettes	14,5	30	34	42,5	54	
Temps d'incubation ou	10 15	30	60	90	120	minutes

Nos résultats présentés montrent que l'acide sialique incorporé aux plaquettes modifie le pouvoir récepteur des plaquettes pour la sérotonine et que cette capacité augmente en fonction du taux d'acide sialique incorporé.

Ceci vient à l'appui de la conclusion que les sites récepteurs de la sérotonine des plaquettes contiennent de l'acide sialique et suggère que la réaction intervenant entre sérotonine et ces sites récepteurs accélère l'échange de potassium.

De plus ces observations confirment les résultats obtenus précédemment dans les travaux expérimentaux sur l'agrégation, résultats qui mettaient en évidence qu'une augmentation de l'incorporation de l'acide sialique sur la membrane plaquettaire favorise l'agrégation induite par la sérotonine. Cela serait en relation avec une augmentation du pouvoir récepteur des plaquettes pour la sérotonine.

o o  
o

## C O N C L U S I O N S

Partant de l'observation que dans les cas de thrombopathie congénitale ou acquise, les anomalies de l'agrégation des plaquettes sont en rapport avec des changements de la partie glucidique, nous avons provoqué des modifications dans la composition chimique des fractions glucidiques afin d'étudier leurs répercussions sur les fonctions plaquettaires.

Ces recherches conduisent aux constatations suivantes :

I. L'acide sialique joue un rôle multiple dans les fonctions plaquettaires

a) Par sa charge négative, l'acide sialique contribue aux phénomènes électrostatiques de la surface plaquettaire.

b) Faisant partie de certains complexes récepteurs de la membrane, il participe à la fixation sur les plaquettes de nombreux produits, comme par exemple de la sérotonine.

c) L'activité des sialyltransférases joue un rôle décisif dans la biosynthèse des chaînes glucidiques des glycoprotéines de la membrane et influe ainsi sur les fonctions plaquettaires.

d) Par suite des modifications dans la biosynthèse des chaînes glucidiques dans les cas pathologiques, l'acide sialique peut être en compétition avec le L-fucose.

II. Il est possible de modifier la structure chimique des plaquettes.

Travaillant aussi bien sur les plaquettes lavées que sur les plaquettes dans leur milieu plasmatique, nous avons modifié leur teneur en acide sialique :

- a) soit : en la diminuant par le traitement à la neuraminidase
  - b) soit : en l'augmentant par l'incorporation de l'acide sialique par voie enzymatique.
- Nous avons étudié la nature des liaisons entre les constituants de la membrane plaquettaire et l'acide sialique.
- Les résultats obtenus par :
- a) hydrolyse acide
  - b) hydrolyse enzymatique
  - c) dégradation par la pronase
- prouvent unanimement qu'il s'agit d'une liaison chimique.
- La répartition de l'acide sialique incorporé entre les glycoprotéines et les glycolipides a également été établie.

III. De nombreuses fonctions plaquettaires sont directement influencées par l'enrichissement ou par l'appauvrissement des plaquettes en acide sialique à l'exclusion de toute autre modification de structure.

Ceci a été mis en évidence par l'étude des variations de :

- a) la mobilité électrophorétique des plaquettes.
- b) l'agrégation sous l'effet de l'ADP.
- c) l'agrégation sous l'effet de la sérotonine.
- d) l'afflux des ions de potassium.
- e) la fixation de la sérotonine sur la membrane.

IV. Les effets sur les fonctions plaquettaires de plusieurs modifications chimiques simultanées ne peuvent être évalués que dans leur résultante d'ensemble.

Si d'autres changements chimiques interviennent simultanément à la modification du taux d'acide sialique, l'action de ce dernier peut être masquée ou compensée par l'effet des autres modifications.

Cette constatation est particulièrement illustrée par l'étude des plaquettes pathologiques dans lesquelles on rencontre souvent des changements multiples de structure chimique qui peuvent se traduire sur les fonctions plaquettaires par des effets souvent opposés.

En résumé, par modification de leur taux dans les glycoprotéines de la membrane on peut obtenir des informations très significatives sur le rôle de certains constituants glucidiques des plaquettes. Ceci a été démontré dans les cas de l'acide sialique, responsable de nombreuses fonctions plaquettaires.



QUATRIEME PARTIE

ANNEXE TECHNIQUE

METHODES DE PREPARATION DES MATIERES UTILISEES  
AU COURS DES ETUDES ANALYTIQUES

1. PREPARATION DE LA SUSPENSION DES PLAQUETTES LAVEES INTACTES

a) Par centrifugation (Méthode CRONBERG et CAEN) (40)

92,5 ml de sang sont additionnés de 7,5 ml de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0,077 M et centrifugés à 180 g pendant 12 minutes à 4°C. Le surnageant est un plasma riche en plaquettes contenant environ  $3,5 \times 10^8$  plaquettes par ml.

Ce plasma riche en plaquettes est centrifugé à 3.000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les plaquettes (le sédiment) seront reprises dans le tampon EDTA\* 0,077 M et centrifugées à 3.000 g pendant 5 minutes. Ensuite les plaquettes seront reprises dans une solution de 0,15 M NaCl à pH 7.

b) Par gelfiltration sur colonne Sépharose B. (Méthode TANGEN et Coll.) (168)

Un échantillon de 5 ml de plasma riche en plaquettes est introduit à la surface du gel au-dessous de la solution d'élution. La colonne utilisée est remplie avec un mélange d'agarose : résine. La solution d'élution est : 0,154 M NaCl ajustée à pH 7,4 avec une solution de tampon 0,005 TRIS\*\* et 0,25 mM  $\text{CaCl}_2$ . La séparation entre les plaquettes et les protéines du plasma qui ne se trouvent pas absorbées dans la membrane cellulaire des plaquettes, est contrôlée en utilisant sur la même colonne le sérum albumine bovin comme marqueur, de la manière suivante : 1 mg de sérum albumine est ajouté au PRP. Après homogénéisation,

\* EDTA = Acide-éthylendiamine tétraacétique

\*\* TRIS (hydroxyméthyl)aminométane

ce mélange est passé sur la colonne Sépharose B.2 dans les mêmes conditions qu'auparavant pour le PRP. On a établi la courbe de PRP et parallèlement celle du mélange de sérum albumine comme référence. Le dosage des plaquettes dans les éluats est effectué par mesure de D.O. à 220 nm.

c) Numération des plaquettes par méthode microscopique  
(140)

La dilution de plasma riche en plaquettes ou la suspension des plaquettes lavées est au 1/100 en oxalate d'ammonium, avec la technique de dilution automatique dans un dilutateur spécial "Unopette". Avant la lecture il faut agiter vigoureusement le dilutateur ; rejeter les deux premières gouttes. Ensuite remplir la cellule de Malassez recouverte d'une lamelle.

Les comptages sont effectués au microscope à contraste de phase, objectif 40. Il faut compter 20 rectangles soit deux bandes complètes. Le chiffre obtenu "n" est à multiplier par 500 (facteur de dilution 1/100, volume 1/5).

d) Numération des plaquettes par comptage électronique, à l'aide d'un compteur COULTER (142)

La dilution réalisée est au 1/5.000 dans tampon NaCl isotonique. Les comptages des plaquettes de tailles différentes sont effectués selon la méthode qui relève du principe général de comptage différentiel à seuil variable. L'expression finale est une courbe de distribution, établie sur 16 comptages explicitant les pourcentages relatifs des groupes de plaquettes de volume croissant.

## 2. PREPARATION DE L'HOMOGENAT DE PLAQUETTES BROYES

Le sédiment plaquettaire provenant du dernier lavage des plaquettes est remis en suspension dans une solution de 0,05 % de digitonine dans un tampon 0,15 M NaCl à pH 7. Ensuite les plaquettes sont broyées à l'aide d'un homogénéiseur fonctionnant sous une tension de 110 volts, pendant 3 fois 10 secondes, à + 4°C.

## 3. SEPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DES PLAQUETTES

a) L'homogénat des plaquettes broyées est soumis à une centrifugation 10.000 t/min. pendant 60 min. La digitonine a détruit les plaquettes et après centrifugation on obtient les fractions hydrophobes (culot) et hydrophiles (surnageant).

b) Lyse des plaquettes selon la méthode de Barber et Coll. (1971) (10)

La méthode consiste à charger les plaquettes à une haute concentration intracellulaire en glycérine, en centrifugeant les plaquettes très lentement à travers un gradient isotonique de glycérine :

30 ml (de 0 à 40 %) pendant 30 min. à 500 t/min.

ensuite pendant 10 min. à 3000 t/min., à 4°C.

La solution de glycérine surnageante est entièrement retirée par aspiration ; puis une solution froide de tampon TRIS (0,01 M TRIS-HCl pH 7,5) est ajoutée en volume égal à environ 5 fois le volume du culot des plaquettes : les plaquettes sont suspendues et broyées par une rapide agitation.

#### 4. LIBERATION DES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES (128,129)

Pour libérer les glycoprotéines à partir des structures subcellulaires encore présentes dans les deux fractions, on utilise le désoxycholate de sodium (DOC). La fraction hydrophobe (le culot) est reprise dans une solution de 0,02 % DOC et la fraction hydrophile (surnageant) est additionnée de 10 µl d'une solution 0,1 % de DOC : ensuite le mélange est homogénéisé pendant 2 fois 5 min. de la manière décrite plus haut.

#### Extraction des lipides selon la méthode Folch et Coll. (54) :

- homogénéisation des plaquettes broyées dans le mélange chloroforme : méthanol : HCl (3:1:01)
- agitation intense pendant 10 minutes à 25°C
- centrifugation.

Après avoir répété trois fois ces manipulations la phase cloroformique sera évaporée à 20°C, la phase aqueuse à 50°C sous vide ; ensuite elles seront séchées dans un dessicateur sous vide.

#### Identification des lipides :

Aliquots de la fraction chloroformique sont appliqués sur les plaques de couche mince, et le chromatogramme est révélé par Rodamine B-4 (solvant N).3.page 155). Plaques CCM : gel de silice F 254, Merck.

Dosages de la teneur en glucides des lipides et les protéines hydrophiles :

- hydrolyse acide (HCl, N, pendant 1, 2, 3 h) (119,120)
- hexoses par anthrone (185)
- hexosamine et acide sialique par chromatographie sur papier ou sur couche mince (166),(135)

## 6. EXTRACTION DE LA SEROTONINE (61)

L'homogénat des plaquettes broyées est mélangé avec de l'acétone 95 % v/v agité pendant 5 min. et ensuite centrifugé. L'opération est répétée trois fois et les surnageants recueillis sont évaporés : l'identification de 5-HT (présent dans le surnageant) est faite par chromatographie sur couche mince.

La figure 4.2 montre un chromatogramme sur couche mince spécialement traité pour identifier la sérotonine et les lipides plaquettaires sur une même plaque.

Légende de la figure 4.2 : Extrait des plaquettes broyées selon la méthode FOLCH (Taches 1). Les plaquettes broyées sont traitées préalablement avec de l'acétone 95 % v/v. Après centrifugation du mélange le culot est repris en solution MetOH:CHCl<sub>3</sub>:HCl pour donner des lipides, dépourvus du 5-HT (taches 2). Le surnageant de l'extrait des plaquettes avec de l'acétone a donné la sérotonine plaquettaire (taches 3).  
Témoin : Sérotonine keratinine-sulfate, (Merck) (tache 4).

Révélation du chromatogramme :

On sépare la plaque en deux parties en éliminant la couche active à l'aide d'une spatule sur une largeur d'environ 5 mm, on évite ainsi la diffusion des solutions qui seront pulvérisées sur chacune des deux plages ainsi créées.

Pendant qu'on pulvérise la ninhydrine en solution alcoolique sur la plage de droite, on couvre l'autre moitié de la plaque par une feuille d'aluminium. On développe ensuite par chauffage à 80°C les taches de la sérotonine. La plage de gauche recevra alors une pulvérisation de Rhodamine B4.

Dosage colorimétrique de la sérotonine. La 5-HT isolée, sèche, provenant de l'extrait des plaquettes broyées avec de l'acétone, sera repris dans de l'eau et dosé selon la méthode de S.Udenfriend et Coll. (170a).

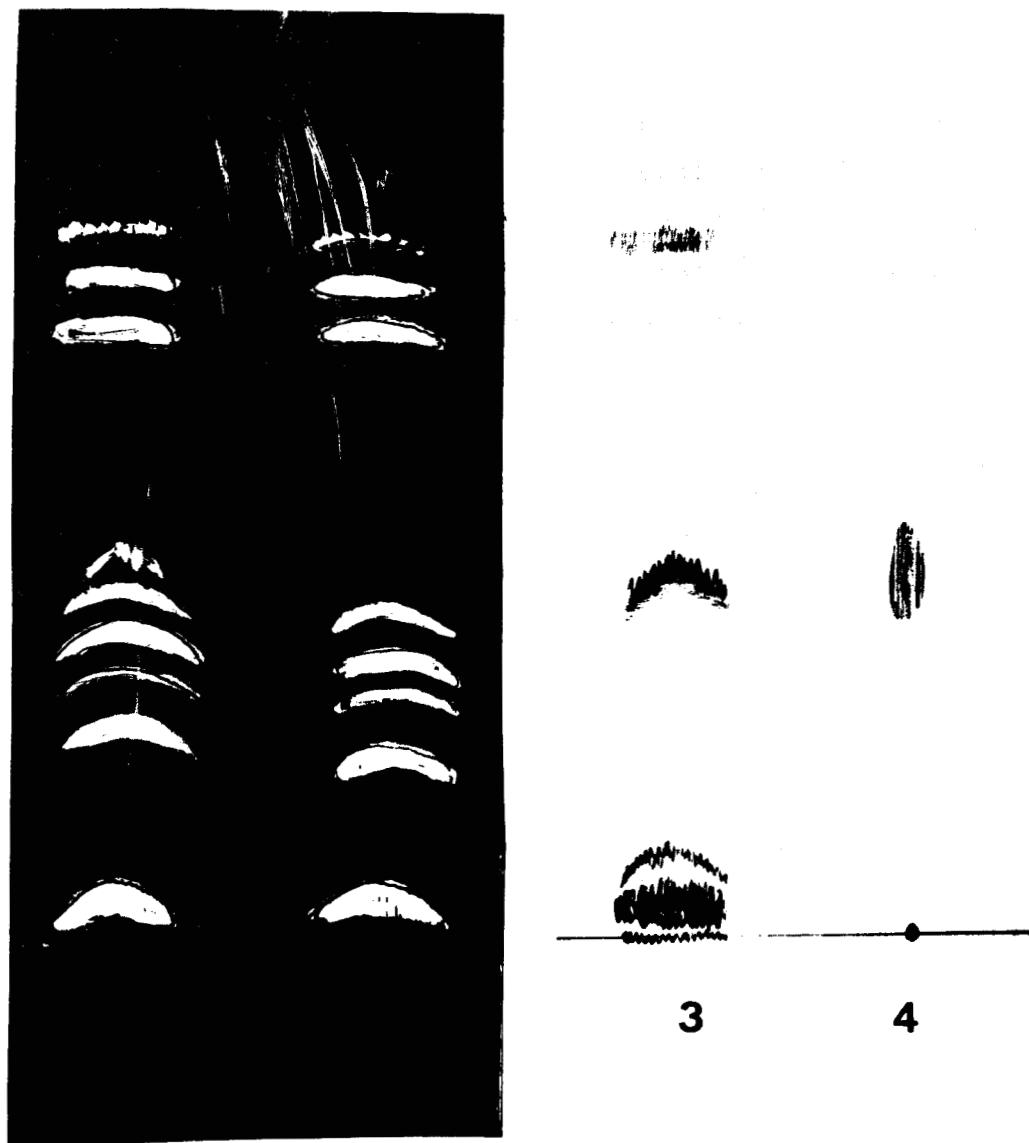
Réactifs utilisés : 1) solution 1% de 1-nitroso-2-naphthol dans EtOH 95°  
2) Mélange de 5 ml de  $H_2SO_4$  2N et 0,2 ml d'une solution 5% de  $NaNO_2$

Mode opératoire : 1 ml de solution aqueuse du 5-HT  
+ 0,5 ml de réactif 1)  
+ 0,5 ml de réactif 2)  
+ 50°C pendant 5-7 minutes, ensuite refroidissement  
+ 3 ml éthylène dichlorure, agitation pendant 1 min. Centrifugation à 500 t/min pendant 5 minutes.

L'absorption des phases aqueuses est mesurée à 540 nm.

Figure 4.2

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE  
DES LIPIDES ET DE LA SEROTONINE PLAQUETTAIRE



1. Lipides et sérotonine plaquettaires
  2. Lipides plaquettaires
  3. Sérotonine plaquettaire
  4. Témoin : sérotonine

Chromatographie sur plaque dans solvant N° 3,  
ascendante, (2 fois 3H de migration).



## 7. DOSAGE DE PROTEINES

La teneur en protéines de sérum, du plasma riche en plaquettes ou d'une suspension des plaquettes lavées peut être déterminée par la méthode LOWRY et Coll. (94). Comme référence on utilise une solution d'albumine de sérum bovin, de titre connu.

Réactifs :

- a) Le réactif de Folin (acides phosphotungstique et phosphomolybdique)
- b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % dans  $\text{NaOH}$  0,1 N
- c)  $\text{CuSO}_4$  0,5 % dans tartrate de Na et K 1 %
- d) Au moment de l'emploi mélanger 50 ml b) + 1 ml c).

## DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE DES PLAQUETTES

((119- 122), (135), (8-10), (104-112).)

Détermination quantitative des glucides : l'analyse quantitative comporte deux étapes

- Libération des glucides liés à la partie peptidique des protéines, à partir des fractions subcellulaires des plaquettes.
- Séparation et dosages des glucides libérés.

### 1. LIBERATION DES GLUCIDES LIES AUX PROTEINES PAR HYDROLYSES ACIDES

Pour obtenir les glucides libres à partir des glycoprotéines nous devons choisir pour chaque glucide les conditions optimales d'hydrolyse.

Pour les acides sialiques nous avons utilisé  $H_2SO_4$  0,1 normal et nous avons établi chaque fois la courbe cinétique en fonction de la durée de l'hydrolyse entre 0 et 90 minutes, soit des plaquettes normales, soit des plaquettes de cas pathologiques entières ou broyées (Figure 4.2 et 4.3).

Pour les glucides neutres, comme D-glucose, D-galactose, D-mannose et L-fucose, nous utilisons : HCl, N, pendant 2,3 et 4h. Pour avoir dans les mêmes échantillons les sucres neutres et les hexosamines, nous avons prolongé le temps de l'hydrolyse avec HCl, N jusqu'à 6 heures.

Pour la libération totale des hexosamines seules, nous avons utilisé HCl, 2 N pendant 2 et 3 heures d'hydrolyse.

## 2. PURIFICATION DES HYDROLYSATS

- des plaquettes
  - des glycoprotéines

- Les hydrolysats acides des plaquettes ou ceux des fractions subcellulaires des plaquettes contiennent des débris cellulaires. Ces hydrolysats ont été soumis à des centrifugations et des lavages. Les surnageants recueillis ont été concentrés. Ces surnageants concentrés sont des hydrolysats proprement dits des glycoprotéines plaquettaires.

- Les hydrolysats des glycoprotéines ont été purifiés en utilisant des colonnes à échangeurs d'ions (Dowex, Amberlite, Séphadex) selon les techniques décrites par MONTREUIL et SPIK (1967)

Figure 4.3

## Solution glucidique acide

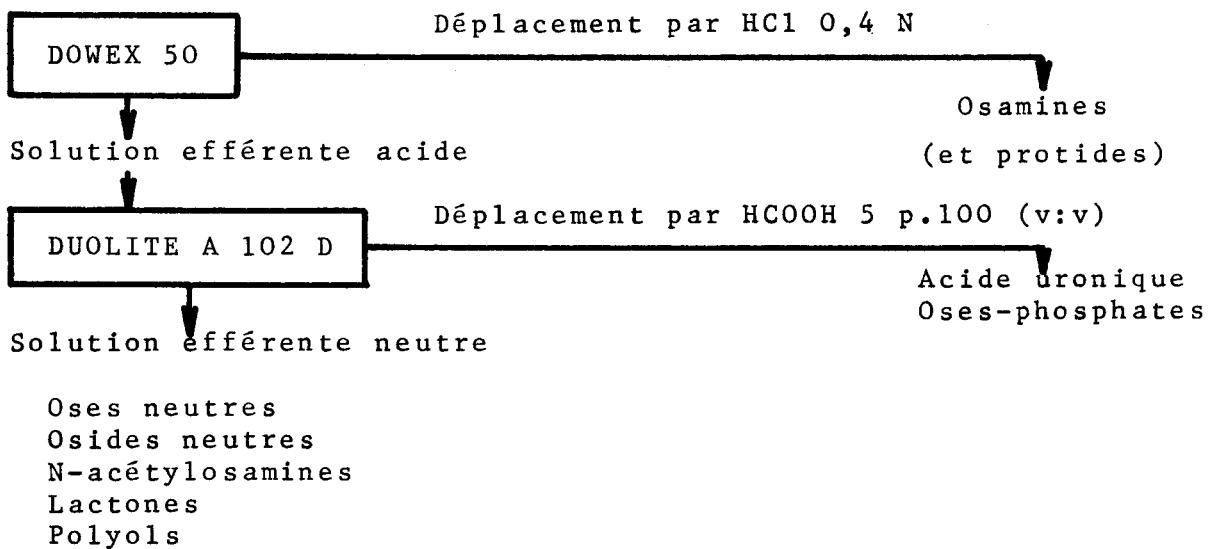


Schéma de purification et de fractionnement des hydrolysats acides d'osides sur des échangeurs d'ions (120a, page 11).

### 3. DOSAGES COLORIMETRIQUES DIRECTS DES GLUCIDES LIBERES

Les hydrolysats des plaquettes broyées ou des fractions subcellulaires sont centrifugés. Les dosages des glucides (d'hexoses, d'hexosamines, et d'acide sialique) sont effectués sur les parties aliquotes des surnageants.

Par contre le L-fucose ne peut être dosé selon la méthode de DISCHE et SCHETTLES (1962) (50) qu'après avoir été séparé du D-glucose, D-galactose, et D-mannose présents dans les hydrolysats des protéines plaquettaires.

Dosage des hexoses neutres (selon la méthode de YEMM et WYLLIS, 1960) (185).

Préparation du réactif : 0,150 g d'anthrone pour 100 ml de solution de 70 à 80 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Procédure : 1 ml de solution à doser

+ 5 ml de réactif + 10 à 12 minutes au bain-marie bouillant doucement et à l'abri de toute vapeur.  
Refroidir et laisser reposer 35 minutes à température ambiante.

Mesurer à 585 nm et 700 nm (la lecture à 700 nm est destinée à diminuer les absorptions incohérentes)

### Détermination de l'hexosamine

Les plaquettes contiennent un taux important de D-glucose. De ce fait nous avons choisi la méthode de CESSI et PILIEGO (1960) (35) pour les dosages spectrophotométriques de l'hexosamine, en présence des acides aminés et de D-glucose. Le processus est basé sur l'observation de SCHLOSS (1951) que les amino-sucres forment des chromogènes volatils par chauffage avec de l'acétylacétone en solution alcaline, tandis que les "artefacts" de D-glucose et des acides aminés forment uniquement des chromogènes non volatils.

La méthode de CESSI et PILIEGO consiste en une séparation de la fraction volatile par distillation en évitant ainsi des interférences qui seraient dues aux acides aminés en présence de D-glucose. L'absorbance des chromophores rouges violacés formés par réaction des chromogènes volatils avec le p.diméthylamino-benzaldéhyde est mesurée à 545 nm.

Dosage de l'acide sialique selon la méthode de WARREN (174) et selon la méthode d'AMINOFF (4/a) s'effectue avec le même réactif mais des tampons différents.

L'échantillon d'acide N-acétylneuraminique est traité par un excès d'acide périodique.

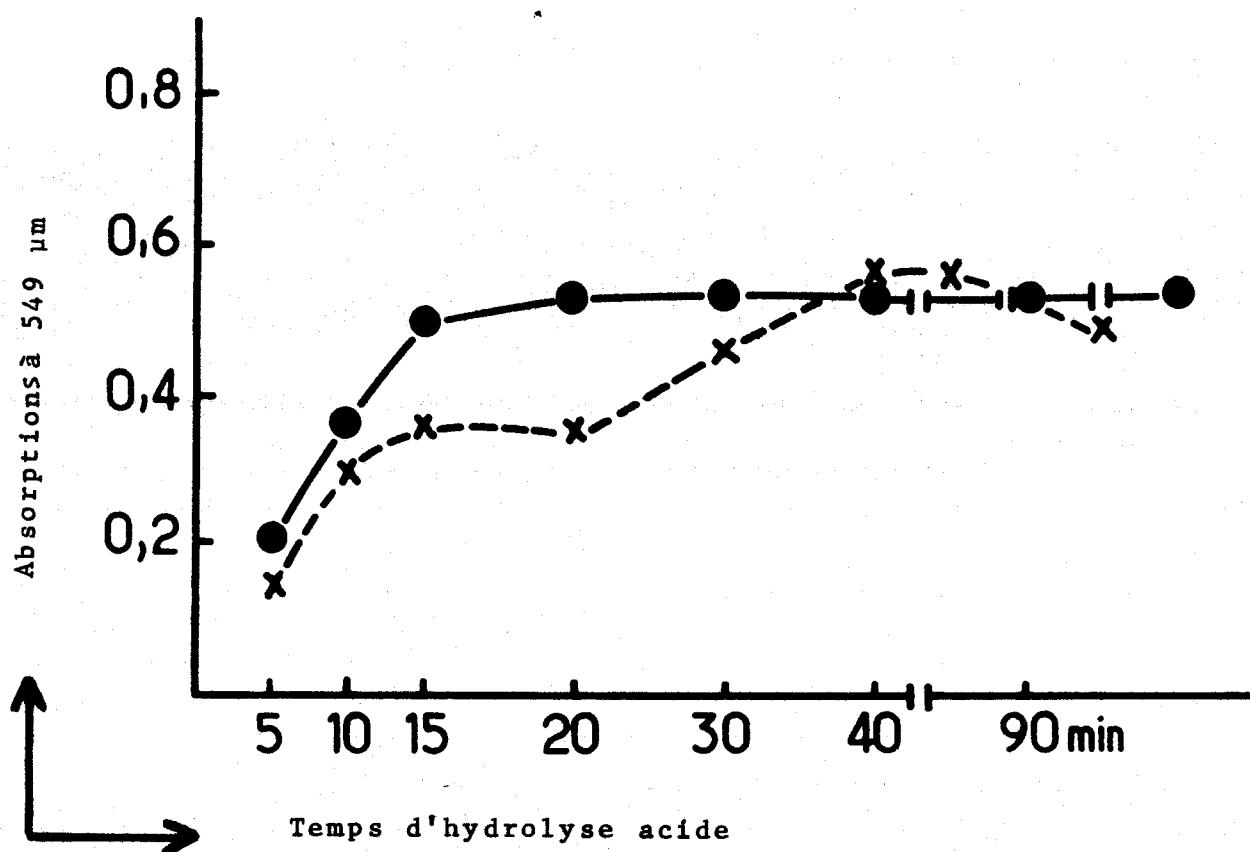
L'excès d' $\text{HIO}_4$  est ensuite réduit par une solution d'arsénite. On y ajoute une solution d'acide thiobarbiturique à 0,6 % et on porte à 100° pendant 15 minutes. L'acide bêtaformylpyruvique formé se condense avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique.

On extrait le chromogène formé par un volume connu de cyclohexanone, et la densité optique est mesurée à 549 nm. et à 532 nm. L'action de déoxyribose est éliminée par la formule de correction d'après Warren.

Figure 4.2

CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE DES

● — PLAQUETTES INTACTES X  
X - - HOMOGENAT DES PLAQUETTES BROYEEES ●



Hydrolyse acide (0,05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 90°C)  
Dosages selon Warren



Identification qualitative des glucides sur les chromatogrammes selon la méthode de TREVELYAN et Coll. (1950) (170)

Le processus de révélation des taches nécessite l'emploi de deux solutions successives :

1. 1 ml de solution aqueuse saturée de nitrate d'argent est mélangé avec 200 ml d'acétone. Le précipité formé peut être redissous par quelques gouttes d'eau distillée.
2. Solution 1 N de soude caustique en éthanol 90°.

Le chromatogramme préalablement séché est trempé dans la solution 1, et il est maintenu à l'obscurité à la température ambiante pendant 10-20 minutes. Ensuite il est trempé dans la solution 2. Après apparition des taches brunâtres des glucides, le chromatogramme est fixé dans une solution de 1 N de  $\text{NH}_4\text{OH}$  pendant 10 minutes et lavé ensuite à l'eau.

En utilisant le papier Whatmann MM3 nous avons obtenu des taches de glucides bien séparées et peu allongées.

Identification des acides sialiques sur les chromatogrammes selon la méthode de Percheron (1965) (135)

1) Mode opératoire :

Après développement et séchage des chromatogrammes, on applique le réactif, et porte le papier à l'étuve, à 100-105° pendant 5 à 7 mn. Les cétoses apparaissent sous forme de taches jaune orangé.

2) Réactif :

Solution contenant : acide TB : 0,5 g ; alcool éthylique à 80° : 100 ml ; acide orthophosphorique à 85 % : 2 ml (conservation à l'abri de la lumière).

Dosage des glucides par élution des chromophores  
(Formazane)

Les glucides préalablement séparés par chromatographie sur papier seront dosés par élution des taches de formazan développées par la méthode de WALLENFELLS (1953) (173). Cette méthode relève du principe que la réduction de TTC<sup>\*</sup> incolore pour les sucres en milieu alcalin donne les chromophores rouges de formazane.

Mode opératoire

La feuille de papier du chromatogramme est trempée dans un mélange 1:1 des solutions fraîchement séparées et filtrées de 0,1 N KOH en EtOH (90°) et 1 % de TTC<sup>\*</sup> aqueuse. La feuille est séchée sous courant d'air et ensuite suspendue dans une étuve isothermique saturée de vapeur d'eau chauffée à 70-80°C pendant 10 ou 20 minutes. Au cours de ces manipulations, le papier reste toujours maintenu à l'obscurité.

En 10-15 minutes la coloration rouge de formazane est développée. Ensuite la feuille de papier est mise au repos pendant 1 heure entre des feuilles d'aluminium et maintenues à l'obscurité.

Le papier est découpé pour isoler chaque tache des glucides, ensuite les chromophores sont élués par un mélange de MetOH:AcOH/9:L/v/v.

Les absorbances des solutions d'élution sont mesurées à 482 nm. Les références : nous utilisons pour chaque glucide sur chaque chromatogramme des témoins internes.

---

\* TTC : Chlorure de triphényltétrazolium.

#### 4. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES GLUCIDES

##### Exemple type de mode opératoire (166)

Les glycoprotéines sont hydrolysées à pH 2,3 dans  $H_2SO_4$  5 mM à 70°C. Le pH est ensuite ajusté à 4 par addition de NaOH.

L'hydrolysat est introduit dans une colonne Dowex 1 (acétate) de 0,5 cm de diamètre sur 12 cm de longueur. La colonne est lavée avec 5 ml d'eau.

L'acide sialique est élué avec de l'acide formique 0,5 M et isolé par lyophilisation.

L'acide sialique est remis en solution et soumis à une chromatographie descendante sur papier Whatmann n° 1, migration pendant 48 heures dans le solvant 3.

La révélation des taches d'acide sialique par le chlorure de triphényltétrazolium est effectuée selon la méthode décrite précédemment.

Elution des taches de formazane par Pyridine : HCl 10/1.  
L'absorbance est mesurée à 482 nm.

##### Les solvants de chromatographie

1	2	3
But. OH : 12	Prop. OH : 4 vol.	Prop. OH : 4 vol.
AcOH : 3	But. OH : 3 vol.	But. OH : 3 vol.
$H_2O$ : 5 (PARTRIDGE, 1948)	Pyridine : 1 vol.	Pyridine : 2 vol.
	HCl 0,1 N : 1 vol.	HCl 0,1 N : 1 vol.

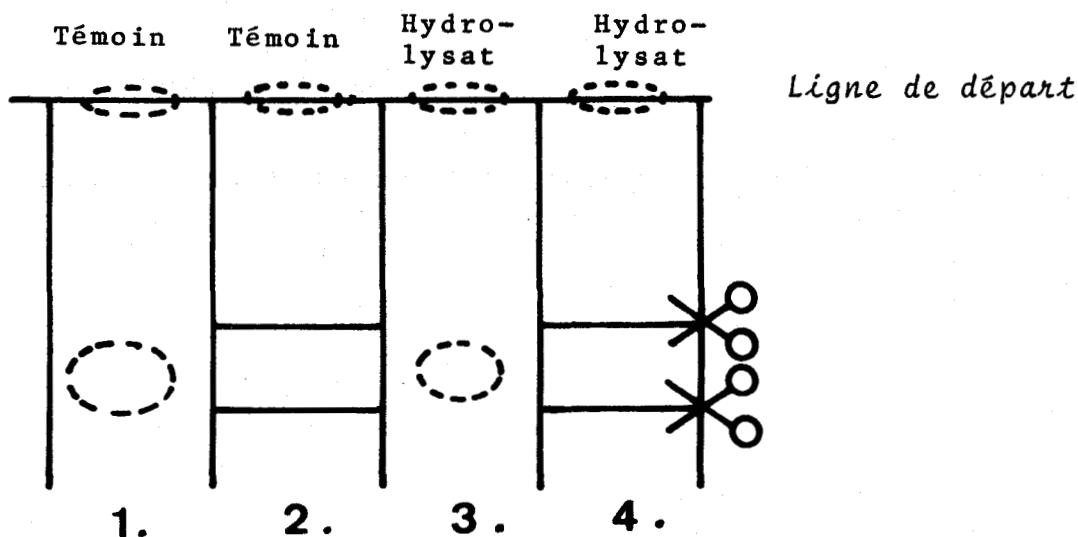
Les temps de migration sont entre 18 et 72 heures

5. DOSAGE DE L-FUCOSE

Le dosage du L-fucose selon la méthode colorimétrique de DISCHE et SHETTLES (1962) (160) effectué directement sur les hydrolysats ne donnent pas de résultats satisfaisants à cause de la présence d'un excès de D-galactose, de D-mannose et de D-glucose. Nous avons donc préalablement séparé le L-fucose par chromatographie sur papier et élué les taches de L-fucose selon le schéma suivant :

Figure 4.5

SCHEMA DE LA DISPOSITION DE CHROMATOGRAMME POUR  
LE DOSAGE QUANTITATIF DE L-FUCOSE



Les bandes 1 et 3 sont révélées par un réactif des sucres neutres ( $\text{Ag NO}_3$ -acétone) et les bandes 2 et 4 seront découpées et soumises à l'élution par  $\text{H}_2\text{O}$ .

Les solutions d'élution sont filtrées soigneusement, et dosées par la méthode à la cystéine sulfurique (160). L'absorbance des chromophores est mesurée sur 400 nm et 430 nm.

La différence entre les deux valeurs mesurées donne la base pour le calcul du taux de L-fucose.

#### 6. CHROMATOGRAPHIE DES GLUCIDES SUR COUCHES MINCES

Du fait que les quantités de matière que nous possédions dans le cas des plaquettes humaines des sujets malades et même dans le cas de sujets normaux, étaient faibles, nous avons dû choisir la méthode qui s'adapte à ces données. La chromatographie sur papier est satisfaisante mais demande encore plus de matière que la chromatographie sur couche mince. Nous avons trouvé que les résultats provenant des deux méthodes s'accordent avec un écart de  $\pm 5 \%$ .

De plus la présence de sels minéraux dans les hydrolysats soumis à la chromatographie n'influe pas sur la forme des taches des glucides lorsque l'on utilise des couches minces du moins tant que la quantité de sel n'est pas trop élevée. Ainsi, dans certains cas nous avons pu éviter la purification des hydrolysats sur colonnes Dowex : lorsque la quantité de matière a été trop faible (et le taux de glucides entre 1-3  $\mu\text{g}$ ) nous avons pris la précaution d'utiliser un deuxième témoin des solutions de glucides qui étaient préparées dans les mêmes conditions que les hydrolysats.

A la suite d'essais effectués sur les supports différents, nous avons préféré les couches minces : feuilles d'aluminium CCM : cellulose, épaisseur de la couche 0,1 mm, Merck (Figure 4.6).

### Solvants utilisés

Les mélanges que nous avons utilisés au cours des analyses sont les suivants :

1. But-OH : Pyridine : HCl 0,1 N : Acétate d'éthyle (5:3:1:1)
2. But-OH : Pyridine :  $H_2O$  : AcOH (12:3:5:1)
3. Chloroforme : MetOH :  $H_2O$  : AcOH (65:25:0,4:0,1)
4.  $CHCl_3$  : MetOH : Pyridine : HCl 0,1 N (50:30:25:5)

### Durée de migration

Dans le cas des plaques précitées (de dimensions 20x20 cm) la ligne tracée dans la partie supérieure est atteinte par les solvants 1 et 3 en une durée variant de 4 à 6 heures à 18°C et par les solvants 2 et 4 en une durée de 3 à 5 heures.

Pour améliorer la séparation surtout dans le cas des acides sialiques, des dérivés d'hexosamine ou encore de D-glucose et D-galactose, nous avons réalisé une double et même triple migration, de la façon suivante :

- après la première chromatographie, nous avons retiré la plaque et l'avons séchée sous courant d'air,
- la deuxième chromatographie a été faite dans le même solvant jusqu'à ce que celui-ci atteigne à nouveau la ligne supérieure.
- la troisième migration a été conduite de la même façon.

Le dosage quantitatif des glucides peut être effectué par récupération des taches sur les plaques des chromatogrammes de couche mince.

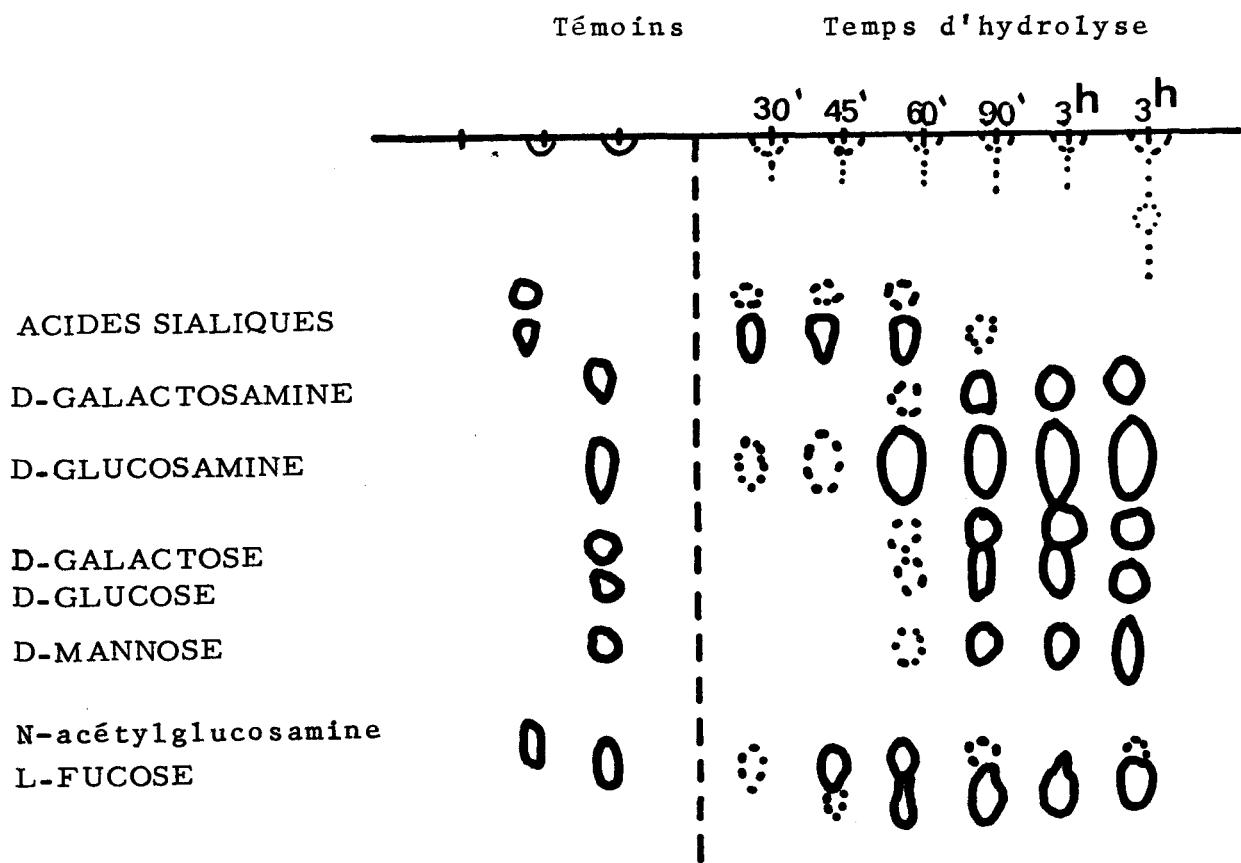
Les taches des glucides développées par la TTC ont été récupérées à l'aide d'une spatule fine. La prise de support de couche mince contenant le chromophore a été introduite dans des tubes contenant une solution de pyridine : HCl/1:1/v/v. Après avoir filtré ou centrifugé les éluats, l'absorbance de couleur rouge du formazane est mesurée à 482 m $\mu$ .

Nous avons appliqué la méthode d'étalonnage interne  
sur chaque plaque de couche mince pour chaque glucide.

Figure 4.6

IDENTIFICATION QUALITATIVE DES GLUCIDES

Chromatographie sur couche mince des sucres libérés de glyco-peptide plaquettaire (Gp 2)



Les hydrolyses partielles des glycopeptides plaquettaires ont été effectuées par 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (taches 1,2,3) par 0,2 N HCl (taches 4,5) et par 2 N HCl (taches 6) (révélation par p-anisidine-1 % dans éthanol). Solvant N° 1 ; migration ascendante pendant 5 H ; 2 fois répétée.

o o  
o

## DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES ET SEPARATION DES GLYCOPROTEINES

### 1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES BROYÉES PAR LA PRONASE

L'homogénat (10ml) des plaquettes lavées et broyées a été mélangé avec 50ml d'une solution NaCl (0,15 M), tamponnée avec de la solution 0,001 M PO<sub>4</sub> à pH 7,5. 10mg de pronase a été ajouté à ces 50ml d'échantillon, et le tout a été soumis à une incubation à 37°C pendant différentes durées. Les mélanges d'incubation ont été centrifugés à 10.000 tours min. à 0°C pendant 5 min. et les surnageants ont été concentrés à 5ml par évaporation à 20°C. Ensuite, on a ajouté 25ml d'ET-OH 60 % et on a laissé reposer pendant une nuit à 0°C. Le précipité a été décanté et séché sous courant d'air et repris dans 1 ml de Ac-OH 0,1 N, et passé sur une colonne de Séphadex G.25 (30 × 1,2 cm). Par élution avec une solution Ac-0,01 N nous avons séparé des fractions contenant un mélange de glycopeptides plaquettaires encore contaminées par les peptides non glucidiques.

#### Rendement

Nous sommes partis de 42ml de suspension plaquettaire dont 1 ml correspond à environ  $3,7 \times 10^9$  plaquettes. La teneur en protéines (selon LOWRY) étant de l'ordre de 8 mg par ml de suspension, nous avions au total 336 mg de protéines plaquettaires. Nous avons finalement obtenu 28,4 mg de substances, représentant le mélange des glycopeptides provenant des glycoprotéines plaquettaires.

## 2. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE SEPHADEX DES FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUES

La fraction des glycopeptides provenant de colonne Séphadex g25 est concentrée par lyophylisation, ensuite passée sur une colonne DEAE-Séphadex A-200 (0,5 × 45 cm). Les fractions riches en glucides ont été identifiées par dosage des glucides dans les éluats.

La figure D.<sub>A.1</sub> illustre la chromatographie sur colonne DEAE Séphadex A.25 de l'hydrolysat pronasique purifié des plaquettes lavées dont les fractions ont été éluées par CH<sub>3</sub>COOH 0,1 N. Nous avons dosé les hexoses (x - x) par anthrone, les acides sialiques (A - A) par TB, les hexosamines (O - O) par Elson Morgan, la partie péptidique et les acides aminés libres par la (. - .) ninhydrine. Les "fractions riches en glucides" des tubes 5 à 32 étaient collectées et évaporées ensemble. Ensuite ce mélange de glycopeptides est soumis à une électrophorèse sous haut voltage (Figure E.<sub>A.</sub>E.<sub>C.</sub>)

## 3. SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES PAR ELECTROPHORESE ET OBTENTION DES GLYCOPEPTIDES PAR ELUTION

Les glycopeptides sont isolés par électrophorèse préparative : papier Whatmann MM3, tampon : pyridine : AcOH : eau (25 : 1 : 225), pH 6,3, sous haut voltage (4000 V) pendant 60 minutes.

(voir figure E.<sub>A.</sub> page 58)

Les taches isolées correspondant aux glycopeptides éluées du papier par de l'eau. Après filtration, l'éluat sera lyophilisé.

DOSAGE DE SIALYLTRANSFERASES ET LEUR UTILISATION DANS  
L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE PAR LES PLAQUETTES

1. PREPARATION D'HOMOGENAT DE FOIE DE RAT

Prélèvement de foie (152)

Le rat a été privé de nourriture pendant 20 heures et anesthésié à l'éther. Le foie a été prélevé et lavé instantanément avec une solution aqueuse de 0,25 M saccharose à la température de la glace fondante.

Toutes les manipulations suivantes ont été exécutées à 4°C. Le foie finement morcelé avec des ciseaux est mis en suspension dans 4 volumes d'une solution de tampon A) contenant 0,25 M de saccharose; 0,05 M Tris, 0,01 % Triton X-100 ; 0,001 MgCl et 0,005 M KC1. La suspension est homogénéisée dans un homogénéiseur Potter-Elveljem et l'homogénat est filtré à travers 4 épaisseurs de gaze.

Un contrôle au microscope a été exécuté sur l'homogénat filtré pour éviter que la préparation du foie ne contienne des fibrilles flottantes. Dans certains cas on a été obligé de filtrer plusieurs fois l'homogénat en choisissant une épaisseur suffisante de gaze. La dilution définitive est faite pour avoir une concentration d'environ 4 mg de protéine hépatique par ml. Les dosages de la teneur en protéines d'homogénat de foie ont été effectués par la méthode de LOWRY : après refiltration de l'homogénat nous avons dilué à une concentration de 3,190 mg/ml de protéine.

## 2. FRACTIONNEMENT DE L'HOMOGENAT

### a) par centrifugations différentielles (LAWFORD et SCHACHTER) (84)

Une partie aliquote d'homogénat de foie de rat (15 ml contenant 60 mg de protéine) a été soumise à une centrifugation à 10,000 g pendant 10 minutes à 0°C dans une centrifugeuse Servall. Le culot  $C_1$  a été homogénéisé dans 8 volumes de saccharose 0,25 M. Une partie aliquote (4 ml) de ce mélange a été posée sur la surface d'une solution de sucrose 0,34 M, ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 900 g. Le culot  $(C_1)_2$  a été éliminé. Le surnageant a été soumis à une centrifugation à 10,000 g pendant 10 min. Le culot  $(C_1)_3$  composé de noyaux et de mitochondries a été éliminé et le surnageant  $(C_1)S/a$ <sup>3</sup> a été gardé dans un congélateur à - 20°C jusqu'au moment du dosage. Le surnageant  $1(S_1)$  a été centrifugé à son tour dans une centrifugeuse Spinco pendant 1 heure à 139,000 g pour donner le culot  $(S_1 C_2)$  (Figure 4.7).

Figure 4.7

HOMOGENAT DE FOIE DE RAT

Centrifugation à 10.000 g pendant 10 min.

Culot  $C_1$

Le culot  $C_1$  est homogénéisé dans 8 volumes de saccharose 0,25 M et posé sur la surface d'une solution de sucre 0,34 M et centrifugé pendant 10 min. à 900 g

Surnageant  $S_1$

centrifugé à 139.000 g pendant 1 heure

culot  $(S_1)C_2$

surnageant  $(S_2)$   
éliminé

Culot  $(C_1)_2$   
éliminé

surnageant  
 $(C_1)(S)_2$

centrifugé pendant  
10 min. à 10.000 g

Culot  $(C_1)_3$   
mitochondries

surnageant  $(C_1S_3)$

et mis en congélateur  
moins 20°C

Tampon A : 0,25M saccharose dans 0,05 M Tris à pH 7,6 ou 0,25 M sucrose dans 0,01 Triton X-100, 0,005 M  $Mg^{2+}$ , 0,025 M KCl à pH 7,6



b) par centrifugations en gradient de concentration de saccharose (152)

Nous avons opéré selon la technique de MORE modifiée par SCHACHTER et Coll. (1970). Les solutions de saccharose sont préparées dans le tampon TRIS - 0,05 M à pH 7, dans les concentrations 0,5, 0,7, 1,7. On dépose 10 ml de la solution de saccharose à 1,7 M au fond du tube, préalablement à la constitution du gradient. 4 ml de la fraction I d'homogénat de foie de rat sont déposés au sommet des gradients.

La centrifugation est effectuée dans le rotor SW 25-1 d'une ultra centrifugeuse Spinco modèle L à 139,000 g pendant 2 heures à 4°C.

On obtient 4 fractions entre les phases de gradient de concentration de sucrose. Ces fractions peuvent être recueillies par ponction à l'aide d'une seringue.

Les dosages de l'activité de sialyltransférases ont donné les résultats suivants :

Fractions	Activité
Homogénat de foie de rat	100 %
Fractions I	5 %
Fractions II	34 %
Fractions III	9 %
Fractions IV	5 %

(La fraction II est recueillie entre les phases 0,7 et 1,3 M de sucrose).

3. PREPARATION DES FRACTIONS RICHES EN SIALYLTRANSFERASE A PARTIR DU SANG HUMAIN

a) Préparation du sérum (81)

Le sang recueilli dans du matériel en verre siliconé a été centrifugé à 3.000 g pendant 5 min. à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu a servi comme source de l'enzyme sialyltransférase.

b) Préparation de plasma riche en plaquettes

90 ml de sang sont additionnés de 10 ml d'une solution de citrate trisodique (3,8 %) et centrifugés à 138 g pendant 10 min. à 4°C. Ensuite les échantillons sont laissés au repos pendant 15 min. afin que le surnageant (PRP) soit séparé des globules rouges encore flottants. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source de l'enzyme sialyltransférase.

c) Isolement des plaquettes

Le PRP est centrifugé à 3.000 g pendant 15 min. à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall. Le culot (les plaquettes) est repris dans une solution de sucre 0,25 M dans un tampon TRIS 0,05 M à pH 7. Pour débarrasser la suspension des globules rouges contaminants on peut effectuer une centrifugation à 5.000 g pendant de très courtes durées (quelques secondes). La suspension ainsi dépourvue des érythrocytes est utilisée comme source de sialyltransférase plaquettaire.

4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES ISSUES DE SOURCES DIFFERENTES

a) Incubation (152)

Mélanges d'incubation : 1 mg de glycoprotéine acide traité à la neuraminidase 0,025  $\mu$ moles CMP-( $^{14}$ C) NANA pour aboutir à un volume final de 40  $\mu$ l, on ajoute 20  $\mu$ l de tampon en solution de 0,25 M sucrose. Les incubations ont été exécutées à 37°C pendant 30, 60, 120 minutes. La réaction étant stoppée par addition de 20  $\mu$ l d'une solution de 2 % Na BH<sub>4</sub>.

b) Electrophorèse

Après incubation, le dosage de ( $^{14}$ C) incorporé est effectué par électrophorèse sur papier (réf. 152.) 50  $\mu$ l de mélange d'incubation sont portés sur papier Whatmann 3 MM préalablement saturé avec le tampon choisi pour l'électrophorèse. (Nous utilisons deux tampons alternativement, 1. Pyridine - AcOH-H<sub>2</sub>O, 2. Tétraborate de sodium, tous les deux à pH 6,3). Le papier est submergé dans le "solvant aliphatique" (Shell 505) : il mesure 57 cm entre les deux extrémités submergées. Le tampon atteint les deux extrémités du papier et monte à environ 5 cm de chaque côté. Les opérations d'électrophorèse sous 4.000 volts ont été conduites pendant des durées de 45 et de 60 minutes respectivement.

Les glycoprotéines migrent peu : on peut les identifier autour de la ligne de départ, l'excès de CMP-NANA radioactif, les produits de dégradation et l'acide sialique libre, migrant rapidement vers le côté positif du papier. (Figure 4.8a et b)

# ELECTROPHORESE ET COMPTAGES DE RADIOACTIVITE de:

Témoin s: CMP( $^{14}\text{C}$ )-NANA ●, ( $^{14}\text{C}$ )-NANA libre: - - - - -  
 $(^{14}\text{C})$  NANA incorporé par  $\alpha_1$ -glycoprotéine désialidée - ■  
 $(^{14}\text{C})$  NANA incorporé par des plaquettes ▲

$10 \times 10^6$  C.P.M.

Figure 4.8 a

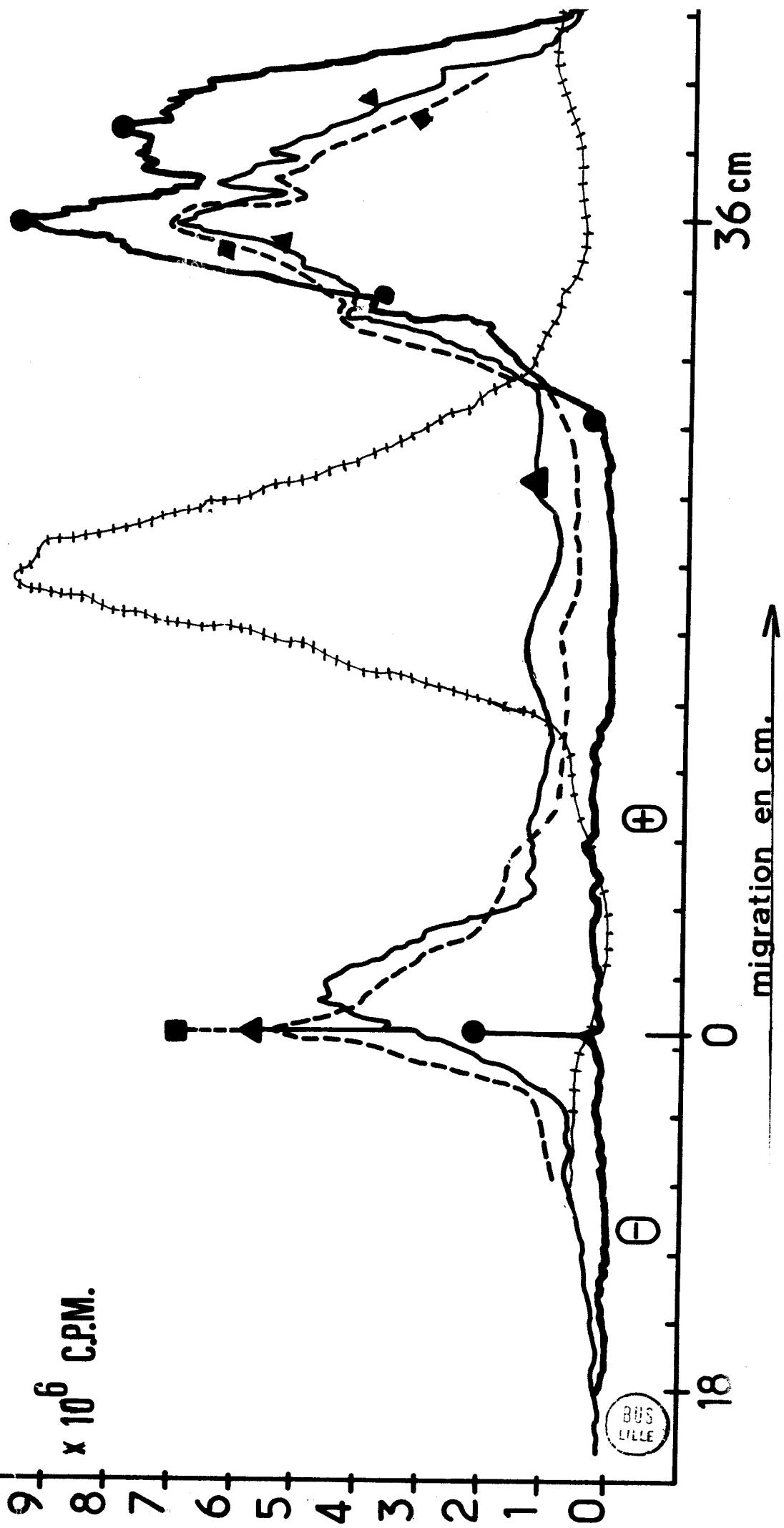
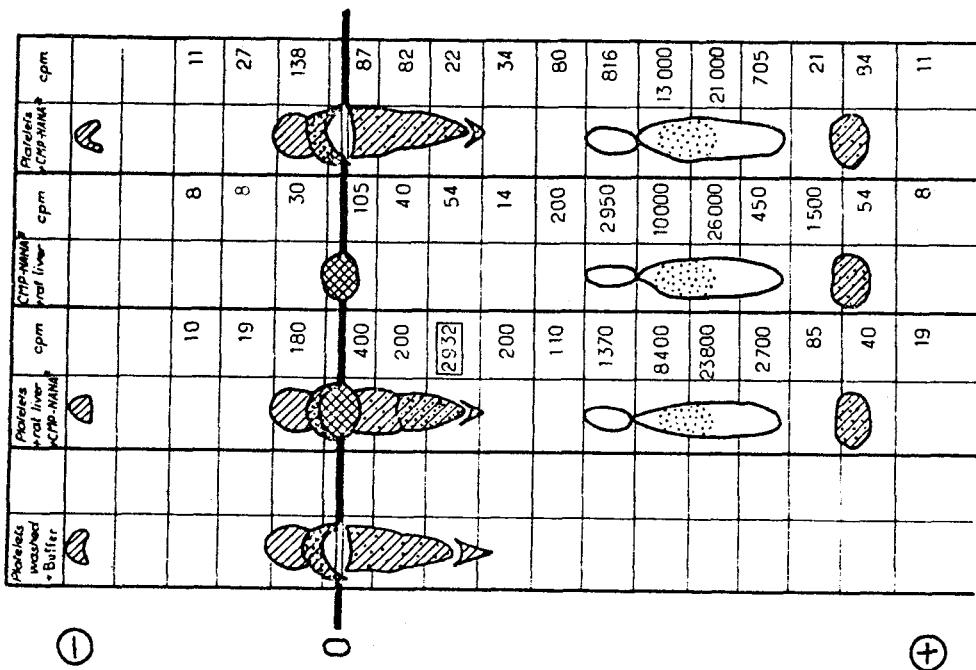


Figure 4.8-b



L'acide sialique radioactif est fixé sur les glycoprotéines restées près de la ligne zéro et cette partie de papier est séchée et soumise à un comptage dans un compteur à scintillation de liquide (Packard TRI-C) dans du toluène contenant 0,4 % "Omnifluor" \*\*. Des incubations de contrôle ont été faites en l'absence d'accepteur glycoprotéine et les valeurs c/m d'incorporation endogène ont été soustraîtes pour le calcul d'activité de l'enzyme. Les valeurs endogènes représentaient moins de 5 % des valeurs obtenues en présence d'accepteur.

\*\* Les comptages en scintillation liquide en présence de 13 ml du liquide scintillateur suivant : 4 g de diphenyl 2,5-oxazole et 0,1 g de p-phényle-2,2'-bis (methyl-4-phényl-5-oxazole) dans 1 litre de toluène (Merck).

\* A.S.  $3,4 \times 10^6$  C/m par μmole.

## 5. INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES DE SOURCES DIFFERENTES

Nous avons effectué les incubations habituelles en présence et en absence de détergents, utilisant comme

- Accepteurs : glycoprotéines désialisés, et comme sources de

- Sialyltransférases :

- . les fractions microsomales ( $C_1/3$ , S3), de foie de rat
- . le sérum
- . le plasma riche en plaquettes, et
- . les plaquettes isolées.

## 6. EFFET DE LA NEURAMINIDASE SUR L'ACTIVITE DES SIALYLTRANSFERASES DU SERUM

### Mode opératoire

La méthode habituelle de dosage de l'activité de l'enzyme sialyltransférase nous a fourni simultanément les résultats concernant le niveau d'activité des neuraminidases présents dans les sérums étudiés. Figure 4.9

Les courbes tracées de la bande I. sont des étalons :

— ● — CMP-( $^{14}\text{C}$ )NANA ; A.S.  $3,7 \times 10^6$  par  $\mu\text{moles}$

— - - - - ( $^{14}\text{C}$ )-NANA, libres, A.S.  $0,5 \times 10^6$  par  $\mu\text{moles}$

Les courbes tracées de la bande II. représentent les mesures des échantillons d'incubation suivants :

— — — acide 1 glycoprotéines + CMP-NANA + sialyltransférase de foie de rat

— ▲ — acide 1 glycoprotéine + CMP-NANA + sérum humain NORMAL

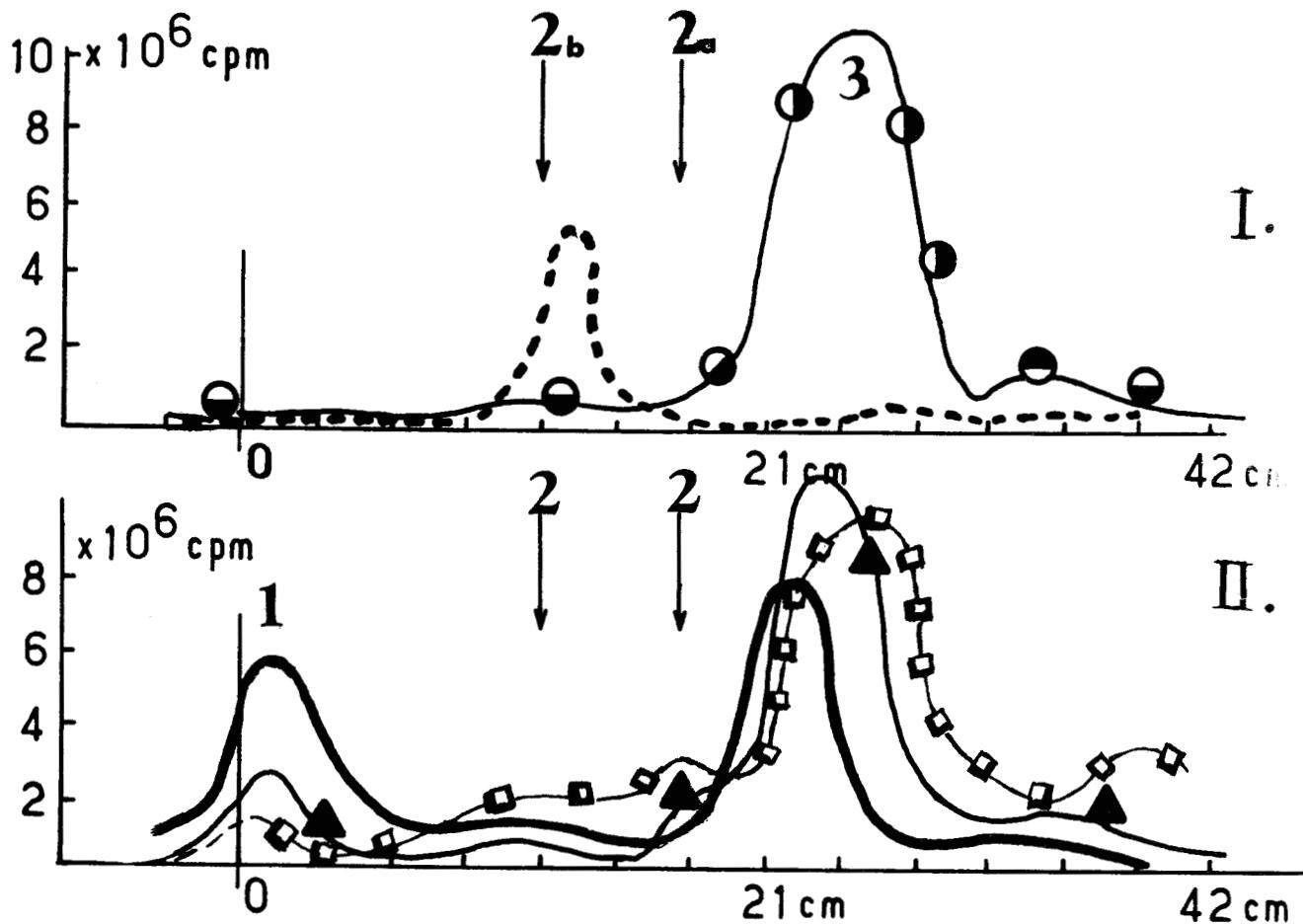
— ■ ■ ■ ■ — acide 1 glycoprotéine + CMP-NANA + sialyltransférase de sérum humain normal + 0,2 U. de neuraminidase de Clost. Perfr.

Incubation des échantillons : 30 minutes, à  $37^\circ\text{C}$ .

Figure 4.9

MESURES DE RADIOACTIVITE PAR "BANDE LECTEUR" DES  
ECHANTILLONS DU SERUM INCUBES, APRES ELECTROPHORESE

(4.000 volts - 45 min. papier Whatmann MM3 46×56 cm,  
solvant tétraborate de sodium à pH 6,3)



- 1)  $(^{14}\text{C})\text{-NANA}$  incorporé sur  $\alpha_1$  glycoprotéine acide désialisée,
- 2) NANA libre et des produits de dégradation non identifiés
  - 2a) des produits de dégradation non identifiés,
  - 2b) NANA radioactif libre.



## 7. INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE ( $^{14}\text{C}$ ) PAR LES PLAQUETTES

### a) Incubation

Des échantillons de 0,30 ml de plasma riche en plaquettes contenant  $10^8$  plaquettes ou des échantillons de 0,2 ml de suspension des plaquettes lavées contenant  $10^8$  plaquettes, ont été préparés. A chaque échantillon on a ajouté 20  $\mu\text{l}$  de tampon Pipes - Triton - X (100) dans une solution de sucrose 0,25 M à pH 7. Ensuite 50 nanomoles de CMP-NANA radioactif dans 10  $\mu\text{l}$  solution aqueuse, et également 10 ou 20  $\mu\text{l}$  de fractions riches en sialyltransférase d'homogénat de foie de rat. Après avoir complété les échantillons au même volume (0,7 ml) avec le tampon, nous les avons soumis à l'incubation à 37°C. Ensuite nous avons procédé selon la méthode habituelle décrite plus haut.

### b) Electrophorèse

L'électrophorèse des aliquots des échantillons d'incubation est effectuée par la méthode décrite plus haut.

La migration des plaquettes enrichies est presque similaire à celle de l' $\alpha_1$  glycoprotéine acide, bien que la migration des plaquettes soit fonction du taux d'acide sialique incorporé.

Comme le montre la figure 4.8 le papier d'électrophorèse est découpé en carrés numérotés ( $3 \times 3 \text{ cm}$ ).

Après avoir été séchés et aérés les carreaux individuels sont introduits directement dans les flacons de comptage.

8. L'EFFET DE LA NEURAMINIDASE SUR L'INCORPORATION DE NANA  
PAR LES PLAQUETTES

a) En fonction du taux de neuraminidase

Pour étudier l'influence de l'enzyme neuraminidase sur l'incorporation de l'acide sialique par les plaquettes, nous avons mis en oeuvre les deux enzymes d'activité opposée de la façon suivante : 5 échantillons de plaquettes en suspension ont été préparés dans les conditions habituelles. A chaque échantillon il a été ajouté 50 nanomoles de CMP-NANA radioactif dans 10 µl de solution aqueuse, et également 20 µl d'homogénat de foie de rat. Ensuite, dans les échantillons 3, 4, 5 il a été additionné respectivement 0,01, 0,02, 0,03 unité de l'enzyme neuraminidase de Clost. Perf.

Après avoir complété les échantillons au même volume (0,70 µl) avec le tampon (sucrose - pipes - Triton) nous les avons soumis à l'incubation à 37°C pendant 30 minutes.

b) En fonction du temps d'incubation, en présence d'une quantité constante de l'enzyme dégradant.

Mode opératoire

Nous avons préparé 7 tubes avec des échantillons de plaquettes lavées. A chaque tube, nous avons ajouté 50 nanomoles de CMP-NANA (<sup>14</sup>C). Les tubes 1° et 2° nous ont servi de référence ; 1° pour sialyltransférase, 2° pour neuraminidase. Les 5 autres ont été additionnés de deux enzymes, c'est-à-dire 20 µl d'homogénat de foie de rat et 0,03 unités de neuraminidase. Dans les conditions habituelles nous les avons soumis à incubation pendant des temps différents.

(Les références 1 et 2 pendant 30 minutes seulement).

9. REPARTITION DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE ENTRE LES PROTEINES  
ET LES LIPIDES PLAQUETTAIRES

Après l'incorporation habituelle, les échantillons de plaquettes enrichies en acide sialique ont été lavés et centrifugés deux fois avec le tampon d'incubation habituel à température 4°C.

Le culot a été repris deux fois dans une solution de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1), agité à 25°C pendant 5 minutes ensuite centrifugé. Le dernier culot a été repris dans l'eau et lyophilisé. (La substance lyophilisée contient la partie hydrophile des plaquettes). La phase chloroformique contenant les glycolipides (surnageante) est évaporée à sec. Les deux fractions sont introduites directement dans les fioles de comptage.

o o  
o

NATURE DE LA LIAISON ENTRE  
PLAQUETTE ET ACIDE SIALIQUE INCORPORE

1. HYDROLYSE ACIDE

Les échantillons d'incubation ont été centrifugés et lavés 3 fois avec le tampon Cornberg. Le culot a été repris en solution de NaCl isotonique. Ensuite des hydrolyses acides des plaquettes enrichies en acide sialique ont été opérées dans les conditions décrites pour les plaquettes natures. L'acide sialique libéré a été dosé selon Warreu.

2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Une série d'expériences de synthèse suivies de dégradation enzymatique ont été effectuées sur les plaquettes isolées. Utilisant les méthodes habituelles nous avons obtenu les résultats suivants :

- Taux d'incorporation de l'acide sialique radioactif par  $10^9$  plaquettes :

Numéro d'échantillon	Temps d'incubation	Taux d'incorporation
I	10 min.	14,28 $\mu$ moles NANA( $^{14}\text{C}$ )
II	20 min.	19,32 $\mu$ moles "
III	60 min.	19,12 $\mu$ moles "

Dégradation

3 aliquots de chacun de ces 3 échantillons (I - II - III) ont été soumis à une dégradation enzymatique avec de la neuraminiidase de Clost. Perf. F. pendant différentes durées : 2 h, 24 h, 72 h, en rajoutant de l'enzyme après chaque 8 heures.

Les échantillons d'incubation ont été filtrés sur "millipore" :

Les plaquettes enrichies sont lavées sur le filtre 2 fois avec du tampon Cornberg et 2 fois avec NaCl isotonique. La membrane "millipore" est directement introduite dans le flacon du comptage.

- Les molécules d'acide sialique incorporé par  $10^9$  plaquettes se montraient :

	RESISTANTES	LIBERÉES
<u>APRES DEUX HEURES DE DEGRADATION</u>		
Aliquot de l'échantillon		
I	9,15	5,13 µmoles
II	12,36	6,36
III	9,60	16,72
<u>APRES 24 HEURES DE DEGRADATION</u>		
I	6,78	7,50
II	13,28	6,14
III	5,58	17,74
<u>APRES 72 HEURES DE DEGRADATION</u>		
I	4,86	9,42
II	5,19	14,13
III	3,00	19,32

o o  
o

TESTS BIOPHYSIQUES UTILISES DANS L'ETUDE DE L'EFFET DE L'ACIDE  
SIALIQUE INCORPORE SUR LES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

1. MODIFICATION DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES PLAQUETTES

a) Dégradation par la neuraminidase

Nous avons préparé 6 échantillons de PRP contenant  $0,380 \times 10^8$  plaquettes par ml. Nous avons ajouté au 1<sup>er</sup> et au 2<sup>e</sup> échantillons 10  $\mu$ l d'une solution tamponnée\* de neuraminidase de Clostridium perfringens, et nous les avons incubés à 37°C pendant 1 et 2 heures respectivement. Comme référence nous avons utilisé l'échantillon 3 avec tampon seulement, mais incubé de même façon que les autres.

Aux échantillons 4 et 5 nous avons ajouté 25  $\mu$ moles de CMP-NANA radioactif dans le tampon habituel\*\* et avec 10  $\mu$ l d'homogénat de foie de rat nous les avons incubé pendant 30 et 45 minutes respectivement. Comme référence nous avons préparé l'échantillon 6 avec 10  $\mu$ l d'homogénat de foie de rat et nous l'avons incubé dans les mêmes conditions que les échantillons 4 et 5.

La mobilité électrophorétique des plaquettes natives a été mesurée sur les échantillons de PRP natif et sur les suspensions des plaquettes lavées natives d'une part mais aussi sur les échantillons des préparations natives précités après les avoir soumis à l'incubation dans les mêmes conditions que les échantillons 1-6 traités.

Tampon utilisé :

\* Mélange des solutions de saccharose 0,25 M ; Pipes 0,5 M, Mg Cl<sub>2</sub> 0,1 % (8:1:1) à pH 7

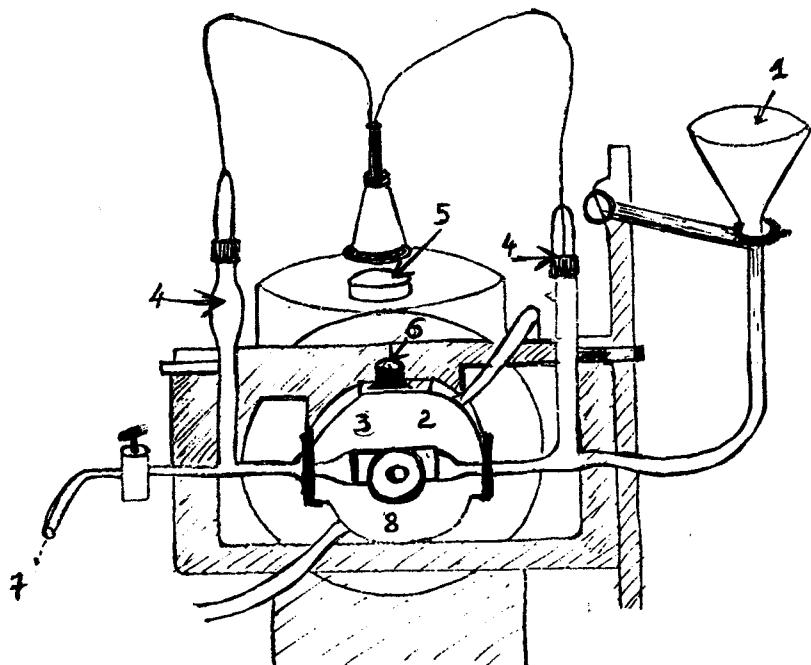
\*\* idem sans Mg Cl<sub>2</sub>.

b) Mesures de la mobilité électrophorétique

Les mesures de la mobilité électrophorétique des plaquettes ont été effectuées dans un appareil de microélectrophorèse (164) spécial pour les cellules (cytosphéromètres.) Le système de l'appareil consiste en une chambre cylindrique illuminée par une lumière transversale. Dans chaque échantillon la vitesse de migration a été établie sur 10 plaquettes individuellement. La vitesse de migration a été obtenue dans les directions alternées d'une suspension contenant environ  $10^8$  plaquettes par ml. Les mesures étaient commencées à 25°C.

Figure 4.10

SCHEMA DU SYSTEME D'ELECTROPHORESE DU CYTOSPHEROMETRE



1. Remplissage de la cellule
2. Cellule d'électrophorèse
3. Système thermostaté
4. Electrodes
5. Niveau à bulle de dégrossissage
6. Niveau à bulle de cellule
7. Evacuation de la suspension
8. Objectif fixé à la chambre thermostatée.

Figure 4.11

COUPE SCHEMATIQUE DES ELECTRODES DU CYTOSPHEROMETRE

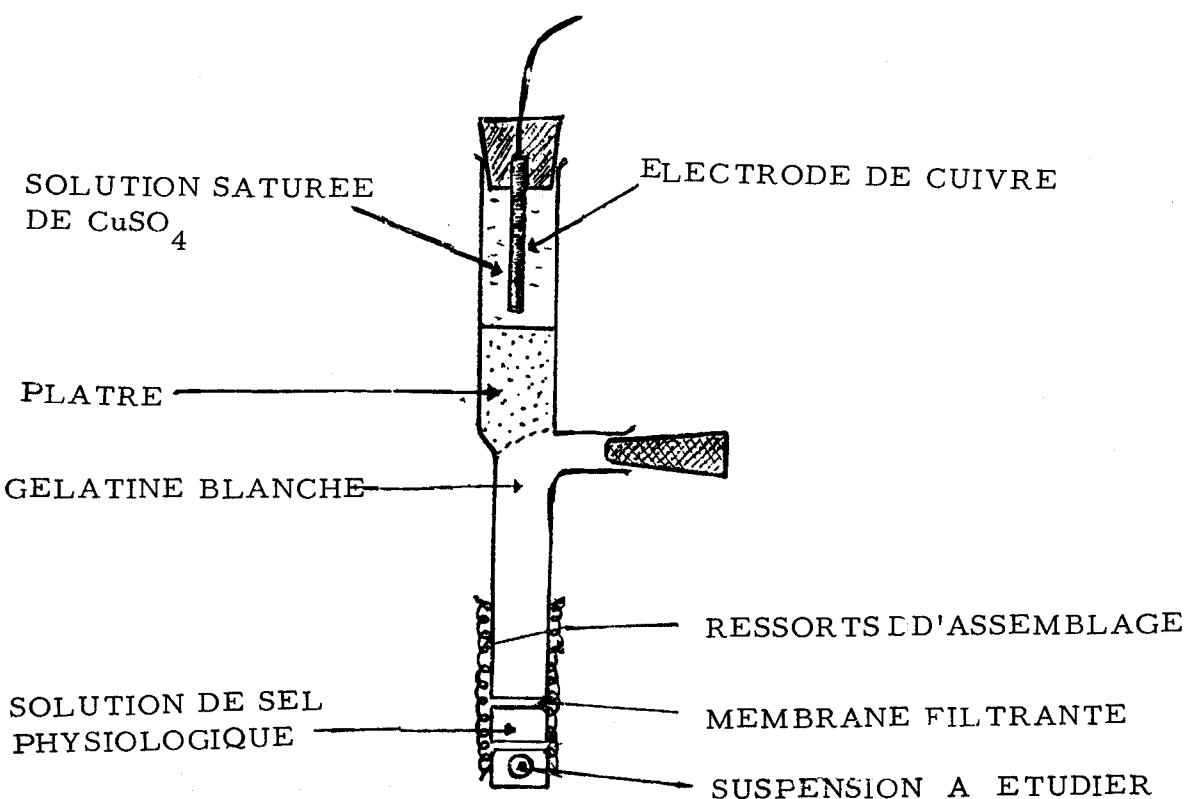
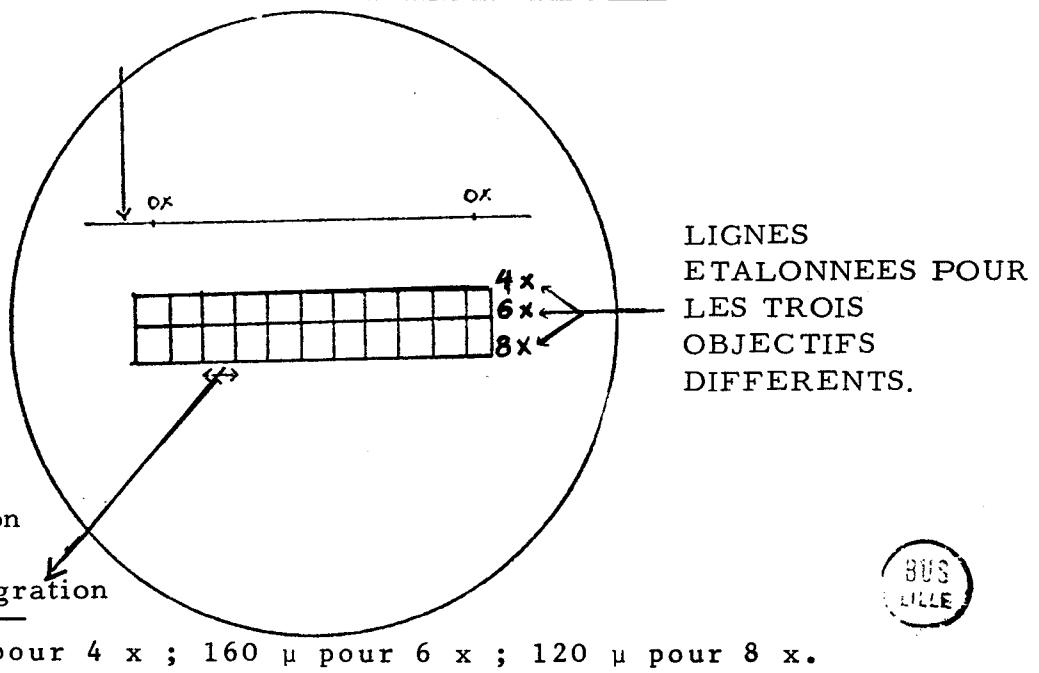


Figure 4.12

REGLAGE DU MICROMETRE OCCULAIRE



\* Distance entre deux graduation permettant l'  
étude de la migration

\* 240  $\mu$  pour 4 x ; 160  $\mu$  pour 6 x ; 120  $\mu$  pour 8 x.

## 2. AGREGATION PLAQUETTAIRE IN VITRO (20,29,141)

L'agrégation des plaquettes peut être mesurée en milieu du plasma riche en plaquettes ou dans les suspensions de plaquettes lavées. La méthode que nous avons utilisée est photométrique avec l'enregistrement graphique des modifications de la densité optique pendant la formation des agrégats (Figures 4.13, 4.14), dans les échantillons qui sont agités continuellement. (113)

Dans les cas des expériences faites avec des mélanges d'incubation avec incorporation de NANA nous avons utilisé 0,6 ml de mélange d'incubation en question en ajoutant 0,05 ml de solutions des activateurs. Comme référence nous avons préparé les échantillons sans CMP-NANA mais incubés de façon identique.

## 3. MESURE DE L'EFFET DE L'ACIDE SIALIQUE INCORPORE SUR L'ECHANGE DE POTASSIUM EN PRESENCE DE LA SEROTONINE

Nous avons procédé selon la méthode de BORN (12). Les échantillons du plasma riche en plaquettes citraté ont été préparés par centrifugation 150 g pendant 10 min.).

A chaque ml de ce plasma riche en plaquettes a été ajouté 0,1 ml de tampon (pH 7,4) préparé en mélangeant 9 volumes de solution de sucre 0,25 M avec 1 volume de solution 1% de Pipes, et avec 40 µl d'une solution 10 mM de CMP-NANA marquée du (<sup>14</sup>C) et enfin avec 9 µl de foie de rat homogénéisé comme source de sialyltransférase.

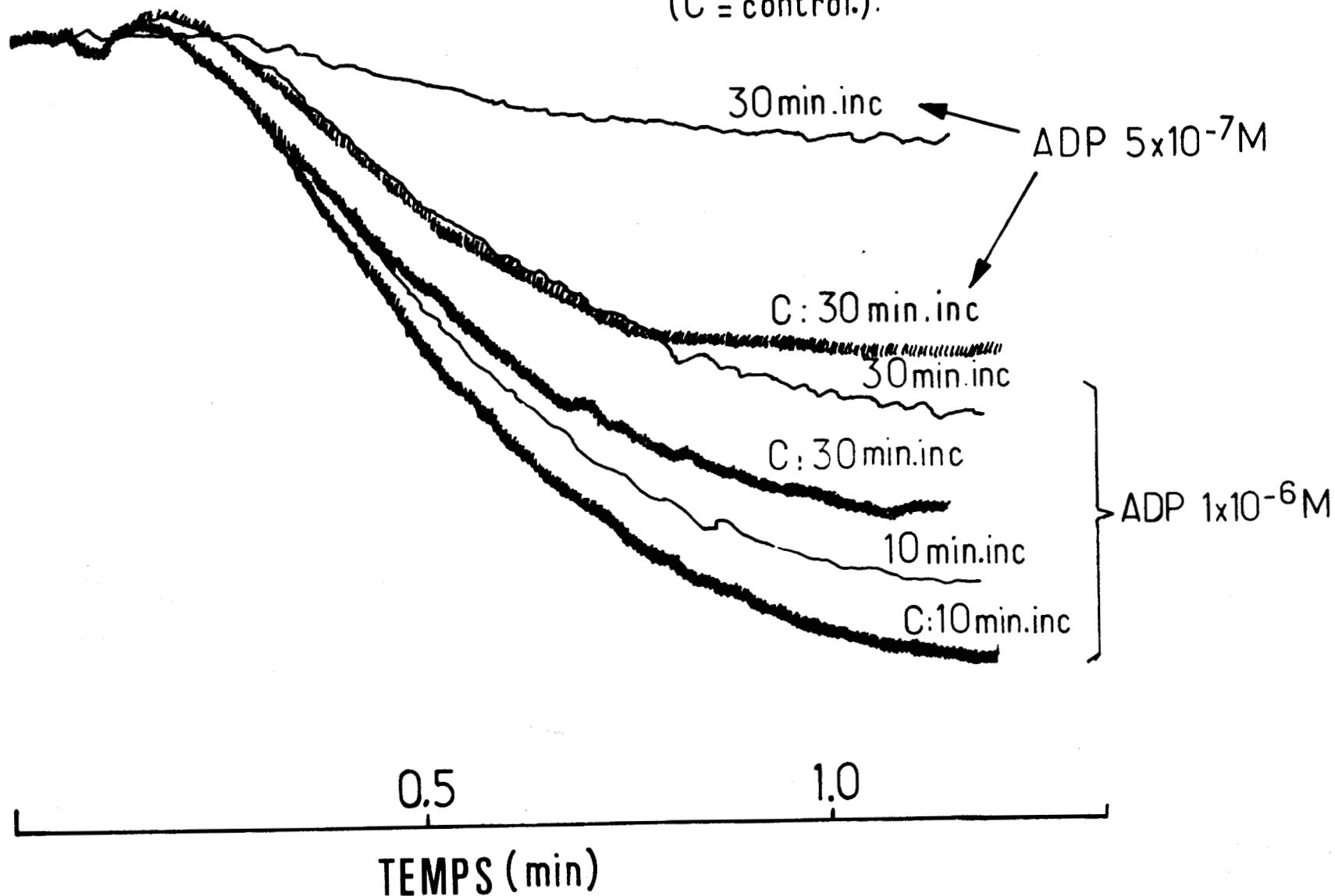
Des échantillons de 1 ml de ce mélange étaient incubés à 37°C pendant 30 min. (dans une expérience aussi pendant 10 min.).

Figure 4.13.

INFLUENCE DE L'ADP SUR  
L'AGGREGATION D'UN PLASMA  
RICHE EN PLAQUETTES, APRES  
10 et 30 minutes d'incubation avec  
CMP - NANA radioactif en présence  
de SIALYLTRANSFERASE de foie  
de rat, à 37°C.

(C = control.)

TRANSMISSION %

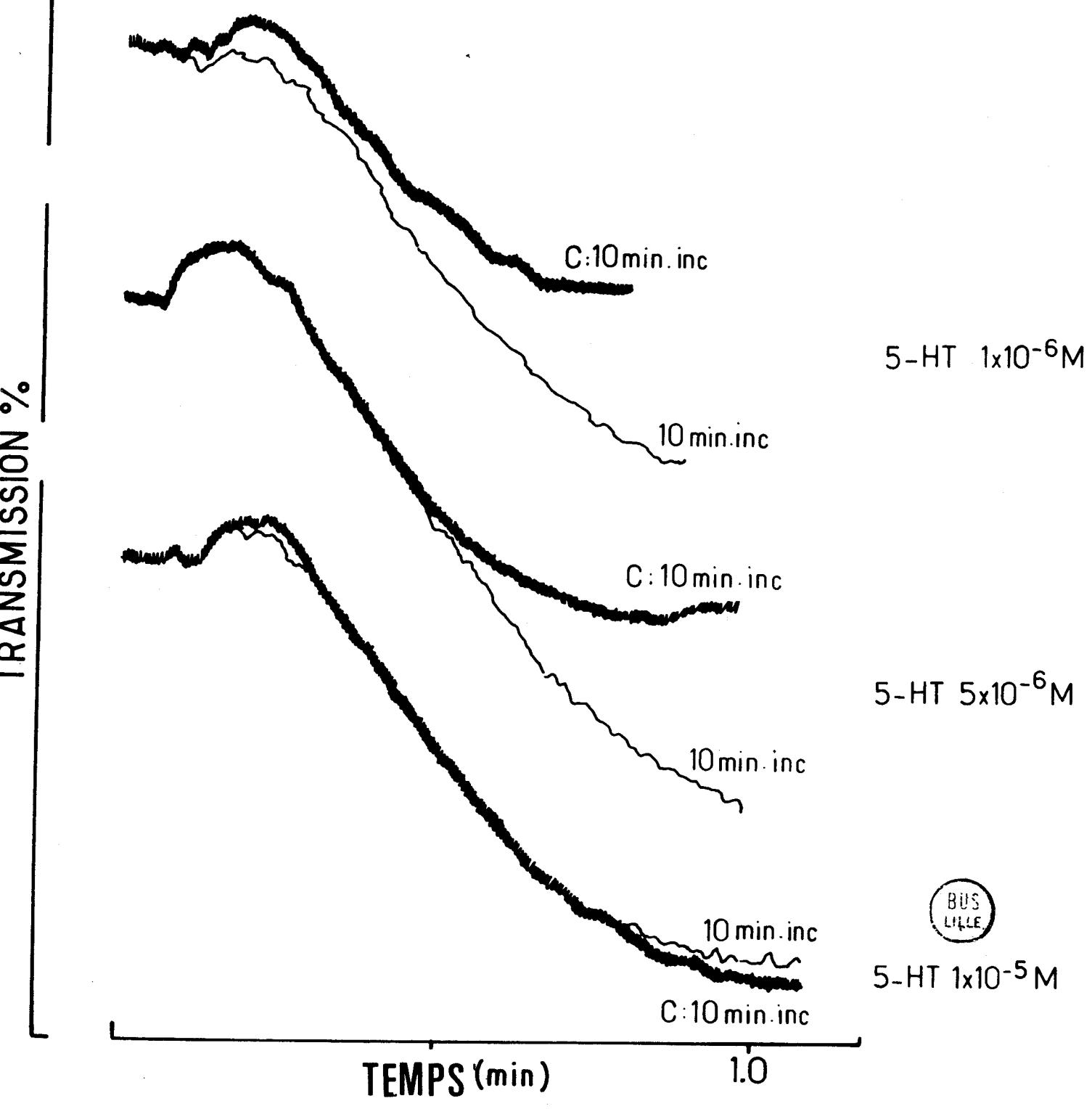


BIBS  
ULLE

Figure 4.14.

INFLUENCE DE LA SEROTONINE  
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION  
SUR L'AGREGATION D'UN PLASMA  
RICHE EN PLAQUETTES après  
10 minutes d'incubation avec CMP-NANA  
radioactif en présence de  
SIALYLTRANSFERASE de foie de rat,  
à 37°C.

(C=control.).



BUS  
LILLE

5-HT  $1 \times 10^{-5} M$

- 178 -

TEMPS (min)

0.5

1.0

1.5

Figure 4.1

BIBS  
ULISSE

INFLUENCE DE LA SEROTONINE  
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION  
SUR L'AGREGATION D'UN PLASMA  
RICHE EN PLAQUETTES après 10 et  
30 minutes d'incubation avec CMP-NANA  
radioactif en présence de  
SIALYL TRANSFERASE de foie de rat,  
à 37°C.

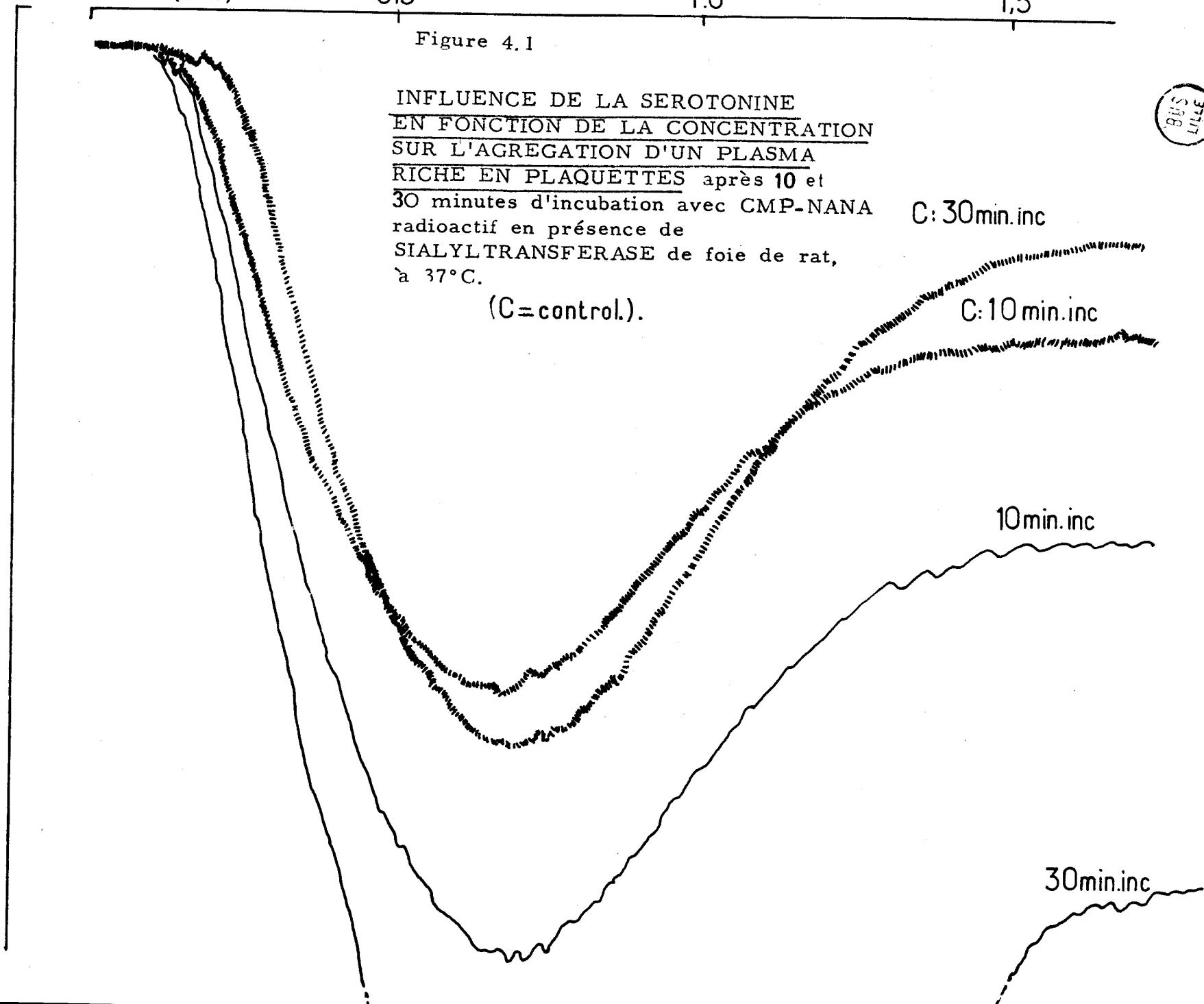
(C=control).

C: 30 min. inc

C: 10 min. inc

10 min. inc

30 min. inc



La moitié de ces échantillons contenait 5HT à une concentration finale de 10 mM.

Dans le quart des échantillons la sérotonine a été remplacée par une solution saline et dans un autre quart des échantillons la solution de CMP-NANA et le foie de rat homogénéisé ont été remplacés par des volumes égaux de solution de saccharose 0,25 M. (116)

A la fin de la période d'incubation les plaquettes ont été séparées par centrifugation\* et la quantité de  $^{42}\text{K}$  échangée a été déterminée par un compteur de scintillation liquide.

La quantité d'acide sialique incorporé a été déterminée par mesures de radioactivité due au ( $^{14}\text{C}$ ) après séparation des plaquettes des protéines du plasma et de l'excès de CMP-NANA par la méthode de l'électrophorèse sur papier sous haut voltage.

Résultats de 3 séries d'expériences :

Tableau 4.I

L'EFFET DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE SIALIQUE SUR  
L'INFLUX DE POTASSIUM ( $^{42}\text{K}$ ) DANS LES PLAQUETTES EN PRE-  
SENCE DE 5-HT, EXPRIME EN POURCENTAGE D'AUGMENTATIONS (+)  
OU REDUCTIONS (-)

Expérience N°	Temps d'incuba- tion (min)	( $^{14}\text{C}$ )CMP-NANA seulement	Contrôle Tampon +5-HT	( $^{14}\text{C}$ )CMP-NANA +5-HT	Augmentation en acide sialique
1	10	- 4	+ 11	+ 25	+ 19
	30	- 7	+ 1	+ 32	+ 31
2	30	+ 2		+ 16	+ 16
3	30	- 3	+ 9	+ 24	+ 23

(Concentrations de plaquettes : expériences N° 1 :  $4,27 \times 10^8/\text{ml}$  ; N° 2 :  $3,92 \times 10^8/\text{ml}$  ; et N° 3 :  $3,89 \times 10^8/\text{ml}$ ).

\* 3000 g pendant 10 minutes.

4. FIXATION DE LA SEROTONINE : PAR LES PLAQUETTES LAVEES ET  
PAR LES PLAQUETTES EN MILIEU PLASMATIQUE (24)

Nous avons préparé 5 échantillons de 1 ml de suspension plaquettaire et nous avons préparé 5 échantillons de 0,2 ml de plasma riche en plaquettes contenant chacun  $10^8$  plaquettes. A chaque échantillon, nous avons ajouté 5  $\mu$ l d'une solution (0,2 mM) du 5-HT radioactive. Ces échantillons ont été soumis à l'incubation à 37°C avec différentes durées. Au cours de l'incubation pour maintenir le pH (7,4) quelques  $\mu$ l d'une solution 0,1 mM de bicarbonate de soude ont été ajoutés. L'isolement des plaquettes et le comptage de radioactivité dus à ( $^3$ H) ont été effectués par les méthodes décrites plus haut.

Fixation de la sérotonine par les plaquettes enrichies en  
acide sialique

Deux séries d'échantillons de plasma riche en plaquettes et deux séries d'échantillons des plaquettes lavées ont été soumis à l'incubation à 37°C ; les premières séries avec CMP-NANA radioactif et d'homogénat de foie de rat, et les autres sans \* enzyme et sans CMP-NANA.

Après 10 minutes d'incubation 5  $\mu$ l de 5-HT ( $^3$ H) à la concentration de 2,5 mM ont été ajoutés.

Tous les échantillons ont été à nouveau soumis à l'incubation à 37°C mais avec des durées différentes.

Au cours de l'incubation pour maintenir le pH à 7,4 quelques  $\mu$ l d'une solution 0,1 mM de bicarbonate de soude ont été ajoutés.

---

\* Les mélanges réactionnels se composent : 1 ml PRP + 100  $\mu$ l de tampon (à 0,17 mM de sucrose dans une solution NaCl isotonique ajustée à pH 7,4 avec une solution de 1 mM TRIS) plus 10  $\mu$ l d'une solution de CMP-NANA 1 mg/ml ayant une activité spécifique de  $3,4 \times 10^3$  C/m par  $\mu$ mole + 25  $\mu$ l de l'homogénat de foie de rat.

A la fin de l'incubation les plaquettes étaient isolées des protéines du plasma et aussi de 5-HT non fixé, par la méthode d'électrophorèse sous haut voltage (papier Whatmann MM3 : 40×50 cm ; 3.000 V pendant 45 min. dans un tampon de tétraborate de soude à pH 6,3. Nous avons effectué les comptages des deux éléments radioactifs ( $^3\text{H}$ ), ( $^{14}\text{C}$ ) parallèlement. Selon l'étalonnage préliminaire, nous avons calculé les valeurs pour les deux éléments radioactifs d'après les formules suivantes :

$$(^3\text{H}) \text{ cpm net} = (A - X) \cdot (\frac{100}{18}) = (A - X) \cdot 5,5$$

$$(^{14}\text{C}) \text{ cpm net} = (B - X) + (B \cdot 0,014)$$

ou      X égal : (B.0,014) - (B.0,0015)

Le rendement du canal A a été 18 % pour ( $^3\text{H}$ ) et celui du canal B a été 45 % pour ( $^{14}\text{C}$ ).

La correction pour la valeur de ( $^3\text{H}$ ) est 14 % des C/M comptés sur le canal B(X).

La correction pour la valeur des C/M de ( $^{14}\text{C}$ ) est 1,5 % des C/M comptés sur le canal B.

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

- (1) ABDULLA, Y.H., MACFARLANE, E. : The action of collagen on an inorganic pyrophosphatase in blood platelets. Biochem. Biophys. Acta., 1972, 258, p.337.
- (2) ALEDORT, L.M., GILBERT, H.S., PUSZKIN, E. : Pattern of endogenous platelet 5-HT release. Transfusion (Ph), 1971, 11(5), p.266.
- (3) ADAMS, E.P., NURDEN, A.T. and FRENCH, J.E. : Comparative study of the bound carbohydrates in platelets, plasma and vascular endothelium. Symp. Zool. Soc. London, 1970, 21, p.91.
- (4) AMBROSE, E.J. : Electrophoretic behaviour of cells. Advances in Physiol., 1968 Ch.8, p.243.
- (4a) AMINOFF, D. : Methodes for the quantitative estimation of N-acetylneuramnic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J., 1961, 81, p.384.
- (5) BAENZIGER, N.L.L. : Membrane metabolic activity and function in human platelets. Dissert. Abst., 1972, 32, B. 5006.
- (6) BAILEY, K., BETTELHEIM, F.R. : Coagulation du fibrinogène. Biochem. Biophys. Acta, 1955, 18.4, p.495.
- (7) BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. : Platelet collagen adhesion characterisation of collagen glycosyltransferase of plasma membranes of human blood platelets. Biochem. Biophys. Acta, 1971, 252, p.533.
- (8) BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. : Collagen glucosyltransferase of human platelet membranes. Fed. Proc., 1971, 30, p.540.
- (9) BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. : Isolation and characterisation of plasma membranes from human blood platelets. J. Biol. Chem., 1970, 245, p.6357.

- (10) BARBER, A.J., PEPPER, D.S., JAMIESON, G.A. : A composition of methods for platelet lysis and isolation of platelet membranes. *Thromb.Diath.Haemorrh.*, 1971, 26, p.38.
- (11) BAUMGARTNER, H.B., BORN, G.R.V. : Effect of 5-HT on platelet aggregation, *Nature*, 1968, 218, p.137.
- (12) BOUNAMAUX, Y. : L'accolement des plaquettes aux fibres sousendothéliales. *Thromb.Diath.Haemorrh.* (Stuttg.), 1961, 6, p.504.
- (13) BOUNAMAUX, Y. : Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique des plaquettes humaines, *Rev.Franç.Et.Clin.Biol.*, 1957, 2, p.52.
- (14) BEHNKE, O. : Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets. *J.Ultrastructure Research*, 1968, 24, p.51.
- (15) BERNARD, J. and SOULIER, J.P. : Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire congénitale. *Sem.Hop.Paris*, 1948, 24, p.3217.
- (16) BETTEX-GALLAND, M., LÜSCHER, E.F. : Thrombosthenin - a contractile protein from thrombocytes. Its extraction from human blood platelets and some of its properties. *Biochim.Biophys.Acta*, 1961, 49, 536.
- (17) BEZKOROVAINY, A. and RAFELSON, M.E.,Jr. : Characterisation of some proteins from normal human platelets. *J.Lab.Clin.Med.*, 1964, 64 , p.212.
- (18) BLOMBACK, B., BLOMBACK, M., HENCHEN, A., HESSEL, B., IWANAGA, S., WOODS, K.R. : N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Nature*, 1968, 218, p.130.
- (19) BLOMBACK, M., BLOMBACK, B., MAMMEN, E.F., PRASAD, A.S. : Fibrinogen Detroit - a molecular defect in the N-terminal disulphide knot of human fibrinogen, *Nature*, 1968, 218, p.132.
- (20) BORN, G.V.R. : Quantitative investigations into aggregation of blood platelets. *J.Physiol.London*, 1962, 64, p.584.
- (21) BORN, G.V.R. : Observation on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate. *J.Physiol.* 1970, 209, p.478.

- (22) BORN, G.V.R. : Adenosine triphosphate (ATP) in blood platelets. *Biochem.J.*, 1965, 62, p.33.
- (23) BORN, G.V.R., INGRAM, G.I., STACEY, R.S. : The relationship between 5-HT and ATP in blood platelets. *Brit.J.Pharmac.Chemother.*, 1958, 13, p.62.
- (24) BORN, G.V.R., GILSON, R.E. : Studies on the uptake of 5-HT by blood platelets. *J.Physiol.*, 1959, 146, p.472.
- (25) BORN, G.V.R. : Uptake of adenosine and ADP by human blood platelets. *Nature*, 1965, 206, p.1121.
- (26) BORN, G.V.R. : The effect of 5-HT on the potassium exchange of human platelets. *J.Physiol.*, 1967, 190, p.273.
- (27) BOSMANN, H.B. : Identification and characteristics of glycosidases of human blood platelets. *Biochem.Biophys.Acta*, 1972, 258, p.265.
- (28) BOSMANN, H.B. : Platelet adhesiveness and aggregation. *Biochem.Biophys.Acta*, 1972, 279, p.456.
- (29) CAEN, J.P., MICHEL, H. : Agrégation des plaquettes à l'ADP (acide adénosine diphosphorique). *Rev.Fr.Et.Clin.Biol.*, 1964, 9, p.999.
- (30) CAEN, J., CASTALDI, P.A., LECLERC, J.C., INCEMAN, S., LARRIEU, M.J., PROBST, M., BERNARD, J. : Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. *Amer.J.Med.*, 1966, 41, p.4.
- (31) CAEN, J.P., VAINER, H., LEVY-TOLEDANO, S., SULTAN, Y. : L'effet de l'ADP et de la thrombine sur les protéines plaquettaires normales. *Nouv.Rev.Fr.Hémat.*, 1967, 7, 5, p.683.
- (31a) CAEN, J.P., VAINER, H., GAUTIER, A. : Thrombasthénie. Platelets : their role in hemostasis and thrombosis. Ed : Brinkhaus, K.M., (Schattauer V. Stuttgart), 1967, p.224.
- (32) CAEN, J.P., communication personnelle.
- (33) CAEN, J., JOSSO, F., SULTAN, Y., MEYER, D., ALLAIN, J.P., L'hémostase. Edit. : L'expansion Scient.Franç., 1970.
- (33a) CAEN, J.P., JENKINS, C.S.P., MICHEL, H., BELLANGER, R. : Adenosine inhibition of human platelet aggregation by ADP. *Nature New Biol.*, 1972, 94, p.211.
- (34) CASTALDI, P.A., CAEN, J. : Platelet fibrinogen, J.Clin.Path., 1965, 18, p.579.

- (34a) CASTALDI, P.A., LARRIEU, M.J., CAEN, J. : Availability of platelet factor 3 and activation of factor XII in thrombasthenia. *Nature*, 1965, 207, p.422.
- (35) CESSI, C., PIALEGO, F. : The determination of aminosugars in the presence of amino acids and glucose. *Biochem.J.*, 1960, 77, p.508.
- (36) CHAMBERS, D.A., SALZMAN, E.W., NERI, I.L. : Characterization of an "ecto"-ATPase of human blood platelets. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1967, 119, p.173.
- (37) CLARKE, J.A., HAWKEY, C., SALSBURY, S.A. : XI. Surface ultrastructure of platelets and thrombocytes. *Nature*, 1969, 223, p.401.
- (38) COHEN, P., DERKSEN, A. and VAN DER BOSCH, H. : Pathways of fatty acid metabolism in human platelet. *J.Clin.Invest.*, 1970, 49, p.128.
- (39) COOK, G.M.W., HEARD, D.H., SEAMAN, G.V.F. : Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature*, 1961, 191, p.44.
- (40) CRONBERG, S., CAEN, J.P. : Platelet aggregation in washed suspension. *Scand.J.Haemat.*, 1971, 8, p.161.
- (41) DAVID-FERREIRA, J.F. : The blood platelet : Electron microscopic studies. *Intern.Rev.Cytol.*, 1964, 17, p.99.
- (42) DAVID, J.L. : New platelet diseases. *Acte Med.Scand.*, 1971, Suppl., p.185.
- (43) DAVIE, E.W., RATNOFF, O.D. : The proteins of blood coagulation. In the Proteins, edited by Neurath, 1965, vol.III, p.359.
- (44) DAVEY, M.G., LÜCHER, E.F. : Release reactions of human platelet induced by thrombine and other agents. *Biochem.Biophys.*, 1968, 165, p.490.
- (45) DAVEY, M.G., LÜCHER, E.F. : Platelet proteins. In : Biochem. of blood platelets. Edit. : Kowalski E. and Niewiarowski S., London, New-York, Acad.Press., 1967, p.9.

- (46) DANIELLI, J.F., DAWSON, H. : The permeability of thin films. *J.Cellular.Comp.Physiol.*, 1935, 5, p.483.
- (47) DA-PRADA, M., PLETSCHER, A., TRANZER, J.P. : Lipid composition of membranes of amine-storage organelles. *Biochem.J.*, 1972, 127, p.681.
- (48) DA-PRADA, M., TRANZER, J.P., PLETSCHER, A. : Storage of 5-HT in human blood platelets. *Asperimentia*, 1972, 28, p.1328.
- (49) DEUTSCH, E., and LECHNER, K. : Platelet clotting factors. In *Biochem. of Blood Platelets*. Edited by : Kowalski, E. and Niewiarowskiss, London, New-York, Acad.Press., 1967, p.23.
- (50) DISCHE, Z., SHETLES, L.B. : A specific color reaction of méthylpentoses. *J.Biol.Chem.*, 1948, 175, p.595.
- (51) DONNE, A. : De l'origine des globulines du sang, de leur déformation et de leur fin. *C.R.Acad.Sci. (Paris)*, 1842, 14, p.366.
- (51a) DUCHESNE, M.J. : Action des plaquettes sur la prophospholipase plasmatique. *Biochimie*, 1972, 54, p.257.
- (52) EYLAR, E.H., MADOFF, M.A., BRODY, O.V., ONCLEY, J.L. : The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocytes. *J.Biol.Chem.*, 1962, 273, p.1992.
- (52a) ERICHSON, R.B., CINTRON, J.R. : Ultrastructural observations on platelet adhesion reactions. III. Platelet interaction with collagen and platelets. *Thromb.Diath.haemorrh.*, 1967, 18, p.80.
- (53) FINEAN, J.B., The molecular organisation of cell membranes. *Progr.Biophys.Mol.Biol.*, 1966, 16, p.143.
- (54) FOLCH, J., LESS, M., SLON-STANLEY, G.H. : Simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, 1957, 266, p.497.
- (55) GANGULY, P. : Isolation and properties of a thrombine-sensitive protein from human blood platelets. *J.Biol.Chem.*, 1971, 246, p.4286.

- (56) GANGULY, P. : Isolation and some properties of fibrinogen from human blood platelets. *J.Biol.Chem.*, 1972, 247, p.1809.
- (57) GOKCEN, M., YUNIS, E. : Fibrinogen as a part of platelet structure. *Nature*, 1963, 200, p.590.
- (58) GRETTE, K. : The mechanism of thrombin-catalysed hemostatic reactions in blood platelets. *Acta Physiol.Scand.*, 1962, Suppl. 56.
- (59) GROTTUM, K.A. : Electrophoretic investigations of blood platelets. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1968, p.199.
- (60) GROTTUM, K.A., SOLUM, N.O. : Congenital thrombocytopenia with giant platelets a defect in the platelet membrane. *Brit.J.Haemat.*, 1969, 16, p.277.
- (60a) GAARDER, A., JONSEN, J., LALAND, S., HELLEM, A., OWREN, P.A. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human platelets. *Nature*, 1961, 192, p.531.
- (61) HARDYSTY, R., STACEY, R.S. : 5-HT in normal human platelets. *J.Physiol.*, 1955, 130, p.711.
- (62) HARDISTY, R., HUTTON, R.A., MONTGOMERY, D., RICKARD, S. and TRIBILCOCK, H. : Secondary platelet aggregation : Quantitative study. *Brit.J.Haemat.*, 1970,
- (63) HASLAM, R.J. : Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood platelets by thrombin and by fatty acids. *Nature*, 1964, 202, p.765.
- (64) HASLAM, R.J., MILLS, B. : The adenilate-kinase of human plasma erythrocytes and platelets in relation to the degradation of adenosine diphosphate. *Biochem.J.*, 1967, 103, p.773.
- (65) HAYEM , G. : Sur le mécanisme de l'arrêt des hémorragies. *C.R.Acad.Sci. (Paris)*, 1882, 95, p.18.
- (66) HEATH, E.C. : Complex polisaccharides. *Amer.Rev.Biochem.*, 1971, 40, p.29.
- (66a) HELLEM, A.J. : The adhesiveness of human blood plateles in vitro. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 1960, 12 (Suppl.51) p.117.

- (67) HOLMSEN, H., DAY, H.J. and STORM, E. : Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. *Biochim.Biophys.Acta*, 1969, 186, p.254.
- (68) HOLMSEN, H., DAY, H.J. : The selectivity of the thrombin - induced platelet release reaction. *J.Lab.Clin.Med.*, 1970, 75, p.840.
- (69) HOLMSEN, H., DAY, H.J. : The platelet release reaction and its role in platelet aggregation. *Acta Med.Scand.*, 1971, Suppl. question 4, p.75.
- (70) HOLMSEN, H., DAY, H.J., SETKOWSKY, C.A. : Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline. *Biochem.J.*, 1972, 129, p.67.
- (71) HOVIG, T. : The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states. *Ser.Haemat.*, 1968, 2, p.3.
- (72) HUGUES, J. : Accolement des plaquettes au collagène . *C.R. Soc.Biol. (Paris)*, 1960, 154, p.866.
- (73) HUDGIN, R.L., SCHACHTER, H. : Porcine sugar nucleotide : Glycoprotein glycosyltransferases. I.Blood serum and liver sialyltransferase. *Canad.J. Biochem.*, 1971, 49, p.829.
- (74) HUMPHREY, J.H. and TOH, C.C. : Absorption of serotonin (5-hydroxy-tryptamine) and histamine by dog platelets. *J.Physiol.*, 1954, 124, p.300-304.
- (75) HULTSCH, E., REUTTER, W., DECKER, K. : Conversion of N-acetylglucosamine to CMP-N-acetylnuraminic acid in a cell-free system of rat liver. *Biochim.Biophys.A.*, 1972, 237, p.132.
- (76) JALLET, P., LAGET, P., GUERIN, H., PIERI, J. : Activité ATP-asique des membranes des érythrocytes humains . *Biochimie*, 1971, 53, p.615.
- (77) JAMIESON, G.A., FULLER, N.A., BARBER, A.J., LOMBART, C. : Membrane glycoproteins of human blood platelets. *Scand. Haemat.*, 1971, IV. p.125.
- (77a) JENKINS, C.S.P., CAEN, J.P., VAINER, H., POKUTECKY, J. : Inhibition of adenosine uptake by platelets. *Nature New Biol.*, 239, 94, p.210.

- (78) JOHNSON, S.A. : The circulating platelet. Academic Press. New-York, London, 1971.
- (79) KARPATKIN, S., STRICK, N. : Heterogeneity of human platelets. J.Clin.Invest., 1972, 51, p.1235.
- (80) KEAN, E.L., ROSEMAN, S. : The sialic acids. X.J.Biol.Chem., 1966, 241, p.5613.
- (81) KIM, J.S., PERMODO, J., BELLA, A., NORDBERG, J. : Properties of a CMP-NANA glycoproteinsialyltransferase in human serum and erythrocyte membranes. Biochim.Biophys.Acta, 1971, 244, p.505.
- (82) KOPPER, P.H. : Role of calcium in fibrin formation. Nature, 1964, 198, p.793.
- (83) LAKI, K. : Fibrinogen, 1968, M.Decker, New-York.
- (84) LAWFORD, G.R., SCHACHTER, H. : Biosynthesis of glycoproteines by live. J.Biol.Chem., 1966, 241, p.5408.
- (85) LEEDEN, R. : New developments in the study of gangliosides structures. Chem.Phys.Lip., 1970, 5, p.205.
- (86) LEHNINGER, A.L. : The neuronal membrane. Proc.Natl.Acad. Sci. U.S., 1968, 60, p.1060.
- (87) LELOIR, L.F., CARDINI, C.E. : Biosynthesis of glycogene from uridine diphosphate glucose. J.Amer.Chim.C. 1957, 79, p.6340.
- (88) LELOIR, L.F. : Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. Science, 1971, 172, p.1299.
- (89) LELOIR, L.F. : Enzymic isomerisation and related processes. Advances in Enzym., 1953, 14, p.193.
- (90) LEVY-TOLEDANO, S. : Thèse de doctorat d'Etat : Contribution à l'étude de la thrombasthenine : Protéine contractile plaquettaire, 1970.
- (91) LOEWY, A.G., MATACIC, S., DARNE, J.H. : Transamidase activity of the enzyme responsable of insoluble fibrin formation. Arch.Biochem.Biophys., 1966, 26.3, p.670.

- (92) LOUISOT, P., FROT-COUTAZ, J., GOT, R. : Etude des sites cytoplasmiques de biosynthèse des glycoprotéines dans les cellules cancéreuses in vitro. Bull.Soc.Chim.Biol., 1968, 50, p.2533.
- (93) LOUISOT, P., GOT, R. : Sites cellulaires de biosynthèse des glycoprotéines. Bull.Soc.Chim.Biol., 1970, 52, p.452.
- (94) LOWRY, O.H., ROSEN BROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. : Protein measurement. J.Biol.Chem., 1951, 193, p.265.
- (95) LUSCHER, E.F. : Un facteur plaquettaire stabilisateur de la fibrine. Schweiz , Med.Wschr., 1957, 87, p.1220.
- (96) MACKEE, P.A., ROGERS, L.A., ARLER, E. : The subunit polypeptides of human fibrinogen. Arch.Biochem.Biophys., 1966, 116, p.271.
- (97) MACFARLANE, R.G. : A clotting scheme. Thromb.Diath.Hoemorrh. 1965, V.17, p.45.
- (98) MADOFF, M.A., EBBE, S. and BALDINI, M. : Sialic acid of human blood platelets. J.Clin.Invest., 1964, 43, p.870.
- (99) MARCHESI, S.L., SCHULMAN, N.R., GRALNICK, H.R. : Studies on the purification and characterisation of human factor VIII. J.Clin.Invest., 1972, 51, p.2151.
- (100) MARCUS, A.J. and ZUCKER, M.B. : The physiology of blood platelets. Edited by Grune and Stratton, New-York. 1965.
- (101) MARCUS, A.J., ZUCKER-FRANKLIN, D., SAFIER, L.B., and ULLMAN, H.L. : Studies on human platelet granules and membranes. J.Clin.Invest., 1966, 45, p.14.
- (102) MARCUS, A.J., ULLMAN, H.L., SAFIER, L.B. : Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. J. of Lipid Res., 1969, 10, p.108.
- (103) MARCUS, A.J., ULLMAN, L., SAFIER, L.B. : Studies on human platelet gangliosides. J.Clin.Invest., 1972, 51, p.2602.
- (103a) MEYER, K.H., BERNFELD, P. : Helv.Chim.Acta., 1940, 23, p.875

- (104) MESTER, L., MOCZAR, E., VASS, G. et SZABADOS, L. : Identité des fibrinoglycopeptides isolés à partir du fibrinogène et de la fibrine, par dégradation avec la "pronase". C.R.Acad.Sc.Paris, 1965, 260, p.2342.
- (105) MESTER, L., SZABADOS, L., GOLLWITZER, R. : Sur la prétenue libération d'hexoses au cours de la transformation du fibrinogène en fibrine. C.R.Acad.Sc.Paris, 1967, 262, p.1382.
- (106) MESTER, L., MOCZAR, E., SZABADOS, L. : Séquence des glucides et des acides aminés dans les glycopeptides isolés du fibrinogène. C.R.Acad.Sc.Paris, 1967, 265, p.877.
- (107) MESTER, L., SZABADOS, L. : Différences constitutionnelles et fonctionnelles entre les fragments glucidiques du fibrinogène humain normal et d'un fibrinogène humain anormal. Bull.Soc.Chim.Biol., 1968, 50, p.2561.
- (108) MESTER, L., SZABADOS, L. : Structure défectueuse et biosynthèse des fractions glucidiques dans les variantes pathologiques du fibrinogène. Nouvelle Revue Franç.d'Hémat. 1970, t.10, N° 5, p.679.
- (109) MESTER, L., SZABADOS, L., SORIA, J. : Les modifications de la composition glucidique du fibrinogène dans le cas des dysfibrinogénémie acquise. C.R.Acad.Sc.Paris, 1970, 271, p.1813.
- (110) MESTER, L. : The Role of Sialoglycoproteins Platelet Aggregation. Proc.Table Ronde Roussel, Ed.Masson and Cie, Paris, 1971, p.131.
- (111) MESTER, L., SZABADOS, L., GUINEBAULT, P.R., CAEN, J., LEVY-TOLEDANO, S. : Variation de l'acide sialique plaquettaire dans les thrombopathies constitutionnelles et acquises. C.R.Acad.Sci.Paris, 1971, 273, p.2157.
- (112) MESTER, L. : Structure et rôle dans la coagulation du sang des glucides liés aux protéines. Pure et Appl.Chem., 1971, 27, p.575.
- (112a) MESTER, L., GOLLWITZER, R., SZABADOS, L. : Résultats non publiés. 1968.
- (112b) MESTER, L., SZABADOS, L., HALMOS, T., MESTER, M., GUINEBAULT, P-R., PLATEL, A.. The role of sialic acid in the mechanism of platelet aggregation. Internat.Symposium on Metabolisme and membrane perm.of erthr.Thromb.and leukocytes. Vienna, 1972.

- (113) MESTER, L., SZABADOS, L., BORN, G.V.R., MICHAL, F. : Changes in the aggregation of platelets enriched in sialic acid. *Nature New.Biol.*, 1972, 236, p.213.
- (114) MOLNAR, J., ROBINSON, G.B., WINZLER, R.J. : *J.Biol.Chem.*, 1965, 240, p.1882. Biosynthesis of glycoproteins.
- (115) MICHAL, F. : D-receptor for serotonin on blood platelets. *Nature*, 1969, 221, p.1253.
- (116) MICHAL, F., BORN, G.V.R., MESTER, L., SZABADOS, L. : Effect on 5-HT on the potassium non exchange of human platelets enriched in acid sialic. *Biochem.J.*, 1972, 129, p.977.
- (117) MICHAL, F., BORN, G.V.R. : Effect of the rapid shape change of platelet on the transmission and scattering of light through plasma. *Nature. New Biol.*, 1972, 231, p.220.
- (118) MILLER, L.L., HANAVAN, H.R., HASIRI, N.T., CHOWDHURY, A. : Dominant role of the liver in biosynthese of the plasma proteins with special reference to the plasma mucoproteins. *ADV. in Biochem. Series*, 1964, p.17.
- (119) MONTREUIL, J., SPIK, G., DUMAISNIL, J., MONSIGNY, M. : Procédés de détermination de la composition en oses des osides libres et combinés. *Bull.Soc.Chim. France*, 1965, 47, p.239.
- (120) MONTREUIL, J., ADAM-CHOSSON, A., SPIK, G. : Etude sur les glycoprotéides. *Bull.Soc.Chim.Biol.*, 1965, 47, p.1867.
- (120a) MONTREUIL, J., SPIK, G., KONAVSKA, A. : Microdosage des glucides. Fascicule 3, 1967, Faculté de Sciences, Lille.
- (121) MONTREUIL, J., MONSIGNY, M., BUCHET, M.T. : Etudes sur les glycoprotéides. Action des alkalis sur les O-seryl et O-threonyl-béta-N-acétyl-D-glucosaminides. Mécanisme de la bêta élimination. *C.R.A.Sc.Paris*, 1967, 264, p.2068.
- (122) MONTREUIL, J. : Procédés chimiques et enzymatiques d'exploration de la structure des isoglycans. *Pure and Appl. Chem.*, 1971, 27, p.549.

- (123) MOLNAR, J., SY, D. : Attachment of glucosamine to protein. *Biochemistry*, 1967, 6, p.1941.
- (124) MULLIKEN, R.S. : Molecular compounds and their spectra. *J.Amer.Chem.*, 1952, 74, p.811.
- (125) MULLINGER, R.N. and MANLEY, G. : The preparation and properties of a glycoprotein from pig's blood platelets. *Biochem.Biophys.Acta*, 1968, 170, p.282.
- (126) MUSTARD, J.F., HEGARD, B., ROWSEL, H.C. et MACMILLAN, R.L.: Effect of adenosine nucleotides on platelet aggregation and clotting time. *J.Lab.Clin.Med.*, 1964, 64, p.584.
- (127) NACHMAN, R., MARCUS, A., SAFIER, L. : Platelet thrombos-thanine : subcellular localisation and function. *J.Clin.Invest.*, 1967, 46, p.18.
- (128) NACHMAN, R.L., FERRIS, B. : Human platelet membrane protein. *Biochemistry*, 1970, 9, p.200.
- (129) NACHMAN, R.L., FERRIS, B. : Studies on the proteins of human platelet membranes. *J.Biol.Chem.*, 1972, 247, p.4468.
- (130) NAKAO, K., ANGRIST, A.A. : Membrane surface specialisation of blood platelet and megakaryocyte. *Nature*, 1968, 217, p. 960.
- (131) OLSSON, I. and GARDELL, S. : Isolation and characterization of glycosaminylglycans from human leukocytes and platelets. *Biochem.Biophys.Acta*, 1967, 141, p.384.
- (132) O'NEILL, B.J., and FIRKIN, B.G., Platelet survival studies in coagulation disorders thrombocythemia, and conditions associated with lerosis. *J.Lab.Clin.Med.*, 1964, 64, p.188-
- (133) O'BRIEN, J.R. : Some effects of adrenaline and antiadrenaline compounds on platelets in vitro and in vivo. *Nature*, 1963, 200, p.763.
- (134) PARSON, D.S., SUBJECK, J.R. : Models of surface carbohydrate structure. *B.B.A.*, 1972, 265, p.85.
- (135) PERCHERON F. : Emploie de l'acide thiobarbiturique dans la chromatographie des glucides. *Bull.Soc.Chim.F.*, 1965, 47, p.255.

- (136) PEPPER, D.S. and JAMIESON, G.A. : Studies on glycoproteins. III. Biochemistry, 1969, 8, p.3362.
- (137) PEPPER, D.S. and JAMIESON, G.A. : Isolation of a macroglycopeptide from human platelets. Biochemistry, 1970, 9, p.3706.
- (138) POPLAWSKI, A., NIEWIAROWSKI, S., : Dissociation of platelet antiheparin factor (factor 4) from lipoprotein - lipase inhibitor. Biochim.Biophys. A, 1964, 90, p.403.
- (139) PRICER, W.E., ASCHWELL, G.A. : The binding of desialytated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. J.Biol. Chem., 1971, 246, p.1825.
- (140) PROST, R.J., DOUMENC, J. : Numération des plaquettes par méthodes microscopiques. Hématologie, 1969, X, p.33.
- (141) PROST, R.J., DOUMENC, J. : Agrégation plaquettaire induite par l'adénosine 5'-diphosphate. Hématologie, 1969, X, p.43.
- (142) PROST, R.J., BENLAKHAL, H.B. : Mesure électronique de la répartition des volumes plaquettaires. Path.Biol., 1972, sous presse.
- (143) ROSEMAN, S., CARLSON, D.M., JOURDIAN, G.W., McGUIRE, E.J., KAUFMAN, B., BASU, S., BARTHOLOMEO, B. : Animal sialic transferases. Proc.Natl.Acad.Sci., 1962, 48, p.437.
- (144) ROSEMAN, S. : The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. Chem.Phys.Lipids, 1970, 5, p.270.
- (145) ROSKAM, J. : Contribution à l'étude de physiologie normale et pathologique du globulin. Arch.Intern.Physiол., 1922, 10, p.241.
- (146) RYMAN, B.E., WHELAN, W.J. : New aspects of glycogen metabolism. Advances in Enzym., 1971, 34, p.285.
- (147) SABA, S.R., RODMAN, N.F., MASON, R.G. : Platelet ATP-ase activities. J.Amer.Pathol., 1969, 55, p.222.

- (148) SALZMAN, E.W., CHAMBERS, D.A. and NERI, L.L. : Possible mechanism of aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *Nature (London)*, 1966, 210, p.167.
- (149) SALZMAN, E.W. and NERI, L.L. : Cyclic 3'5'-a denosine monophosphate in human blood platelets. *Nature*, 1969, 224, p.609.
- (150) SCHACHTER, H., JABBAL, J., HUDGIN, R., PINTERIC, L., McGUIRE, E.J.M., ROSEMAN, S. : Intercellular localisation of liver sugar nucleotide glycoprotein glycosyltransferases in a Golgi-rich fraction. *J.Biol.Chem.*, 1970, 245, p.1090.
- (151) SCHACHTER, H., MICHAELS, M.A., CROOHSTON, M.C., TILLEY, C.T. : A quantitative difference in the activity of blood group A - specific N-acetylgalactosaminyltransferase in serum from  $A_1$  and  $A_2$  human subjects. *Biochem.Biophys. Comm.*, 1971, 45, p.1011.
- (152) SEAMAN, G.V.F., VASSAR, P.S. : Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation. *Arch. Biochem.Biophys.*, 1966, 117, p.10.
- (153) SEAMAN, G.V.F., VASSAR, P.S. : Electrophoresis a cylindrical chamber. In "Cel Electrophoresis" ed. by Ambrose, E.J., 1965, p.4. (Churchill London).
- (154) SCHMER, G., KIRBY, E.P., TELLER, D.C., PAVIE, E.W. : The Isolation and Characterization of Bovine Factor VIII (Antihemophilic Factor). *J.Biol.Chem.*, 1972, 247, p.2512.
- (155) SCHOENMAKERS, J.G.G., MATRE, R., HAANEN, C., ZILLIKEN, F. : Hageman Factor a novel sialoglycoprotein with esterase activity. *Biochem.Biophys.*, 1965, 101, p.166.
- (156) SKOU, J.C. : Further investigations on a  $Mg^{++} + Na^+$  - activated ATP possibly related to the active, linked transport of  $Na^+$  and  $K^+$  across the nerve membrane. *Biochem.Biophys.Acta*, 1960, 42, p.6.

- (156a) SNYDER, P.D., ROBERT, M.S.Jr., DESNICK, J., KRIVIT, W. :  
The glycosphingolipides and glycosylhydrolases of human  
blood platelets. Biochem.Biophys.Acta, 1972, 46, p.1857.
- (157) SOLUM, N.O. : Platelet aggregation during fibrin polymerisation. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1966, 18, p.577.
- (158) SOLUM, N.O. and LOPACIUK, S. : Bovine platelet proteins.  
II. Purification of platelet fibrinogen. Thromb.Diath.  
Haemorrh., 1969, 21, p.419.
- (159) SOLUM, N.O. and LOPACIUK, S. : Bovine platelet proteins.  
III. Some properties of platelet fibrinogen. Thromb.Diath.  
Haemorrh., 1969, 21, p.429.
- (160) SORIA, J. : Thèse de Doctorat d'Etat en pharmacie : Contribution à l'étude de la physiopathologie de la fibrinofor-  
mation, 1968.
- (161) SORIA, J., GIRARD, M.L., SAMAMA, M., SORIA, C., SZABADOS,  
L., GUINEBAULT, P.R., MESTER, L. : Dysfibrinogénémies  
acquises dans les atteintes hépatiques sévères (en prépa-  
ration).
- (162) SPAET, T.H. and ZUCKER, M.B. : Mechanism of platelet plug  
formation and role of adenosine diphosphate. Amer.J.Phy-  
siol., 1964, 206, p.1267.
- (163) SPIRO, M.J. : Glycoproteins. Ann.Rev.Biochem., 1970, p.601.
- (164) STOLTZ, J.F. : Les phénomènes électrocinétiques aux inter-  
faces solide-liquide. Application à la suspension san-  
guine. Thèse de doctorat (3ème cycle), 1969, Université  
de Nancy.
- (165) STOLTZ, J.F., STOLTZ, M., GINESTE, J., MAUPIN, B. :  
Action de l'ADP et de l'ATP sur les propriétés électroci-  
nétiques des plaquettes humaines. Rev.Et.Clin.Biol., 1968,  
13, p.525.
- (166) SZABADOS, L., VASS, G., MESTER, L. : Dosage rapide des  
acides sialiques et des glucides dans les hydrolysats des  
glycopeptides par des sels tétrazoliques. C.R.Acad.Sc.  
Paris, 1968, 266, p.192.
- (166a) SZABADOS, L., PLATEL, A. : Résultats non publiés.

- (167) STOFFEL, W. : Sphingolipids. Ann.Rev.Biochem., 1971, 4, p.57.
- (167a) SZENTGYÖRGYI, A. : Bioelectronics. Science, 1968, 161, p.988.
- (167b) SCHWARTZ, M.L., PIZZO, S.V., HILL, R.L., McKEE, P.A. : The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII. J.Biol.Chem., 1971, 246, p.5851.
- (168) TANGEN, O., BERMAN, H.J., MARLEY, P. : Gel filtration. New technic for separation of blood platelets from plasma. Thromb.Diath.Haemorrh., 1971, 25, p.268.
- (169) TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETCHER, A. : Ultrastructural localisation of 5-HT in blood platelets. Nature, 1966, 212, p.1574.
- (170) TREVELYAN, W.E., PROCTOR, D.P., HARRISON, J.S. : "Detection of sugars on paper chromatograms". Nature, 1950, 166 p.444.
- (170a) UDENFRIEND, S., WEISSBACH, H., CLARK, C.T. : The estimation of 5-HT in biological tissues. J.Biol., 1954, 215, p.337.
- (171) VAINER, H., WATTIAUX, R. : Glycogen synthetase activity in blood platelets. Nature, 1968, 217, p.951.
- (172) VAINER, H. : Thèse de Doctorat es Sciences, 1971.
- (173) WALLENFELS : Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. Naturwissen, 1950, 37, p.491.
- (174) WARREN, L. : Thiobarbituric assay of sialic acids. J.Biol. Chem., 1959, 234, p.1971.
- (175) WARREN, L. : "Glycoproteins" : A.Gottschalk, B.B.A., Library, vol.5, 1966, Elsevier Publ.Comp.Amst., p.570.
- (176) WEISS, J. : Formation and structure of some organic molecular compounds. J.Chem.Soc., 1942, 245, p.18.
- (177) WEISSBACH, H., BOGDANSKI, D.F., SIDNEY, : Binding of serotonin and other amine by blood platelets. Arch.Biochem. Biophys., 1958, 73, p.492.
- (177a) WAISH, P.N. : Platelet coagulant activities in thrombasthenie. Brit.J.Haemat., 1972, 23, p.553.

- (178) WHITE, J.G., KRIVIT, W. : An ultrastructural basis for the shape changes in platelet by chilling. Blood, 1967, 30, p.625.
- (179) WHITE, J.G. : The dense bodies of human platelets : Inherent electron opacity of the serotonin storage particles. Blood, 1969, 33, p.598.
- (180) WHITE, J.G. : Platelet morphology , The circulating Platelet. Ed. by Johnson, A.S., New-York, Acad.Press.Inc., 1971.
- (181) WHITE, J.G. : Interaction of membrane systems in blood platelets. Amer.J.Path., 1972, 66, p.295.
- (182) WOOD, J.G. : Electron microscopic localisation of 5-HT. Texas Biol.Med., 1965, 23, p.828.
- (183) WOODSIDE, E.E., KOCHOLATY, W. : Carbohydrates of human and bovine platelets. Blood, 1960, 16, p.1173.
- (184) WOOLEY, D.W., GOMMI, B.W. : Serotonin receptors : V. Selective destruction by neuraminidase plus EDTA and reactivation with tissue lipids. Nature, 1964, 202, p.1074.
- (185) YEMM, E.W., WILLIS, A.J. : The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem.J., 1954, 57, p.508.
- (186) YEMM, E.W., COCKING, E.C. : Estimation of amino acids by ninhydrin. Analyst., 1955, 80, p.209.

