

50376
1974
39
Numéro d'ordre : 441

50376
1974
39

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M É M O I R E

présenté à l'Université de Lille I

pour l'obtention du titre de

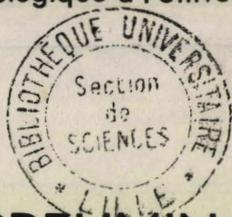
DOCTEUR DE 3^e CYCLE

SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

par

René CACAN

Assistant de chimie Biologique à l'Université de Lille I



**RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR
LES MEMBRANES PERICYTOPLASMIQUES
DE L'HEPATOCYTE DE RAT NORMAL :
ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES**

PRÉSENTÉ LE 14 FÉVRIER 1974, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J. MONTREUIL Président
G. BISERTE Examineur
M^{lle} G. SPIK Examineur



030 034507 1

Ce travail a été réalisé dans les Laboratoires de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules DRIESSENS) (Directeur : Professeur G. BISERTE), sous la Direction du Professeur J. MONTREUIL.

Il a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique (ERA n° 320 : Structure et métabolisme des glycoprotéines), du Commissariat à l'Energie Atomique et de la Caisse Régionale d'Assurance Maladie auxquels nous exprimons notre gratitude.

Nous adressons nos vifs remerciements à Madame M. BENAÏSSA pour sa précieuse collaboration technique.

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPRez Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHÈUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean-Louis	Biologie
M. CCULON Jean	I.E.E.A.
Mlle DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
Mme EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. KROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Oâis
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNAL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
Mme MAILLET Monique	Sciences Economiques et Sociales
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie et Aménagement Spatial
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

R E S U M E

Cette étude sur les glycoprotéines de la membrane plasmique d'hépatocyte de Rat comprend deux parties qui se distinguent par la méthodologie employée. Dans la première partie, ce sont les glycoprotéines entières qui sont caractérisées après une solubilisation grâce à des solvants aqueux ou organiques. Cette technique permet de mettre en évidence trois types de glycoprotéines caractérisés par une association plus ou moins étroite avec les phospholipides membranaires. Les trois fractions sont étudiées du point de vue chimique et immunologique. Une méthode de marquage des acides sialiques "in vitro" a permis de repérer ces sialoglycoprotéines après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, dix de ces composés ont été ainsi caractérisés et leur masse moléculaire apparente a été mesurée.

Dans la deuxième partie de ce travail, ce sont les glycopeptides obtenus après hydrolyse de la membrane qui sont étudiés. La séparation de ces peptides par tamisage moléculaire nous a permis d'isoler une première famille de sialoglycopeptides dont la liaison entre le glycanne et la protéine est de type O-glycosidique. Les caractéristiques physicochimiques de ces molécules semblent montrer qu'elles sont de type "mucine". Un deuxième groupe de sialoglycopeptides dont le point d'attache entre le glycanne et la protéine semble être de type N-glycosidique a été caractérisé.

Des expériences de marquage par des molécules non perméantes semblent montrer qu'au moins une partie de ces peptides est dirigé vers le côté extracellulaire de la membrane.

Ces différents types de travaux nous permettent de donner un schéma de l'intégration des glycoprotéines dans la membrane plasmique qui cadre bien avec les conceptions les plus modernes de la structure moléculaire de ces membranes.

TABLE DES MATIERES

	Pages
- INTRODUCTION	1
- GENERALITES	3
STRUCTURE MOLECULAIRE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES	
I - NOTION DE MEMBRANE PLASMIQUE	3
II - COMPOSITION DES MEMBRANES PLASMIQUES	4
A - Composition globale	4
B - Nature des lipides	6
C - Nature des protéines	
1 - Propriétés générales et classification	7
2 - Protéines structurales	9
3 - Les enzymes	10
4 - Les protéines de transport	13
D - Les glycoconjugués	
1 - Les glycosaminoglycannes	13
2 - Les glycolipides	15
3 - Les glycoprotéines	15
E - Conclusions	17
III - EVOLUTION DES IDEES CONCERNANT LA STRUCTURE DES MEMBRANES	17
A - Concept de la double couche moléculaire	17
B - Concept de la membrane micellaire	20
C - Concept de la membrane mixte	22
D - Interactions polaires et non polaires	22
E - Concept de la double couche interrompue	24
F - Conclusions	26

IV - CONCEPTIONS ACTUELLES DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES	26
A - La myéline	26
B - Les membranes des cellules en bâtonnet de la rétine	28
C - La membrane des globules rouges	28
D - Conclusions	33
LES GLYCOPROTEINES DES MEMBRANES PLASMIQUES : PROCEDES D'ETUDE ET STRUCTURE	34
I - NOTION DE GLYCOLEMME	34
II - RELATION ENTRE LE GLYCOLEMME ET LES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	37
III - STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	38
A - Méthode d'étude	38
1 - Isolement de glycoprotéines	39
a - Solubilisation	39
b - Séparation	40
2 - Isolement de glycopeptides	42
a - Protéolyse	42
b - Séparation des glycopeptides	43
B - Structures moléculaires	44
1 - La glycoprotéine majeure du globule rouge	44
2 - Les glycoprotéines membranaires d'autres cellules	45
IV - METABOLISME DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	47
V - CONCLUSIONS : IMPORTANCE DES GLYCOPROTEINES DES MEMBRANES DE SURFACE	49
- TRAVAUX PERSONNELS	54
ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES MEMBRANES PLASMIQUES D'HEPATOCYTES DE RAT	54

I - CHOIX DU PROCEDE D'ISOLEMENT	54
II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL	55
A - Méthode de RAY	
1 - Principe	55
2 - Réactifs	57
3 - Mode opératoire	57
a - Préparation de la fraction nucléaire grossière	57
1 b - Préparation du gradient discontinu et centrifugation	59
4 - Conclusions	59
B - Adaptation de la méthode de RAY au rotor zonal	59
1 - Principe	59
2 - Mode opératoire	59
a - Préparation de la fraction nucléaire grossière	59
b - Remplissage du rotor zonal et centrifugation	61
c - Fractionnement du gradient	61
III - ETUDE DE LA PURETE DE LA FRACTION MEMBRANAJRE ISOLEE	63
A - Etude au microscope électronique	63
1 - Procédé de fixation	63
2 - Résultats	63
3 - Conclusions	65
B - Etude en gradient de densité	65
1 - Centrifugation en gradient continu de saccharose	
a - Choix de la composition du gradient	65
b - Résultats	68
c - Conclusions	68

2 - Centrifugation en gradient de chlorure de césium	69
a - Choix du gradient	69
b - Résultats	69
c - Conclusions	69
C - Etude de l'équipement enzymatique	72
1 - Etude des enzymes "marqueurs" des membranes plasmiques	72
a - 5'nucléotidase (5'-ribonucléotide phosphohydrolase EC 3. 1. 3. 5.)	72
a ₁ - Principe	72
a ₂ - Résultats	73
b - Nucléotide pyrophosphatase (di-nucléotide nucléotidohydrolase EC 3. 6. 1. 9.)	73
b ₁ - Principe	73
b ₂ - Résultats	73
c - p-nitrophénylphosphatase (orthophosphorique monoester phosphohydrolase EC 3. 1. 3. 1.)	75
c ₁ - Principe	75
c ₂ - Résultats	75
d - Leucyl-β-naphtylamidase (L-leucyl-peptide hydrolase EC 3. 4. 1. 1.)	76
d ₁ - Principe	76
d ₂ - Résultats	76
e - ATPases (Adénosine triphosphate phosphohydrolase EC 3. 6. 1. 3.)	
e ₁ - Principe	76
e ₂ - Résultats	77
f - Adényl-cyclase	78
f ₁ - Principe	
f ₂ - Choix du pH de l'électrophorèse	79
f ₃ - Mode opératoire	81
f ₄ - Résultats et Conclusions	81

2 - Etude des enzymes "marqueurs" d'autres fractions cellulaires	83
a - Enzymes des microsomes	83
a ₁ - Glucose 6-phosphatase (D-glucose-6-phosphatase phosphohydrolase EC 3. 1. 3. 9.)	83
α - Principe	83
β - Résultats	84
a ₂ - NADPH ₂ -cytochrome C réductase (EC 1. 6. 2. 2.)	84
α - Principe	84
β - Résultats	85
b - Enzymes des lysosomes : la phosphatase acide (phosphomonoesterase acide EC 3. 1. 3. 2.)	85
a - Principe	85
b - Résultats	85
c - Enzymes des mitochondries	86
c ₁ - Monoamine oxydase (EC 1. 4. 1. 4.)	86
α - Principe	86
β - Résultats	
c ₂ - Succinodeshydrogénase (EC 1. 3. 99. 1.)	87
α - Principe	87
β - Résultats	87
3 - Conclusions	87
D - Etude biochimique	89
1 - Dosage des protéines	
a - Principe	89
b - Résultats	91

2 - Dosage du phosphore	
a - Principe	91
b - Résultats	91
3 - Dosage du cholestérol	
a - Principe	93
b - Résultats	93
4 - Conclusions	93

ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	94
---	----

I - ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES TOTALES	94
--	----

A - Caractérisation chimique des glycoprotéines membranaires	94
--	----

1 - Principe	94
2 - Solubilisation	94
3 - Incorporation de précurseurs radioactifs dans les membranes	96
a - Glucosamine (14-C)	96
b - Phosphate (32-P)	97
4 - Chromatographie	97
5 - Résultats	99
a - Composition chimique des fractions	99
b - Etude chromatographique	102
6 - Conclusions	104

B - Séparation des glycoprotéines membranaires	105
--	-----

1 - Solubilisation de la fraction membranaire	105
2 - Séparation des protéines en gel de polyacrylamide	105
a - Principe	105
b - Résultats	107

3 - Mise en évidence des glycoprotéines	107
a - Principe général	107
b - Marquage des sialoglycoprotéines membranaires	109
b ₁ - Principe	109
b ₂ - Mode opératoire	109
b ₃ - Résultats	111
α - Activité spécifique	111
β - Mise en évidence du NANA ₇	111
β ₁ - Synthèse du NANA ₇ témoin	111
β ₂ - Mise en évidence du NANA ₇ radioactif dans les sialoglycoprotéines membranaires	113
c - Séparation des sialoglycoprotéines marquées et comptage des gels	116
d - Résultats	116
4 - Conclusions	118
 II - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES	 121
A - Choix de l'agent protéolytique	121
1 - Principe	121
2 - Mode opératoire	122
3 - Résultats	122
B - Séparation des glycopeptides	125
1 - Principe	125
2 - Mode opératoire	125
3 - Résultats	125

C - Etude de la taille des glycopeptides isolés	127
1 - Principe	127
2 - Résultats	127
3 - Conclusions	127
D - Etude de la structure des glycopeptides	131
1 - Etude de la partie peptidique	131
a - Principe	131
b - Mode opératoire	132
c - Résultats	132
2 - Etude de la partie glycanique	132
a - Principe	132
b - Mode opératoire	134
c - Résultats	134
3 - Etude de la liaison glycanne-protéine	136
a - Principe	136
b - Sensibilité aux agents alcalins	136
b ₁ - Etude de l'absorbance à 241 nm	136
α - Principe	136
β - Mode opératoire	138
γ - Résultats	138
b ₂ - Expérience de β-élimination	138
α - Principe	138
β - Mode opératoire	140
γ - Mise en évidence de l'ose140 réduit	140
δ - Mise en évidence des aci-144 des aminés marqués	144

4 - Etude électrophorétique du pic T ₁	144
a - Principe	144
b - Mode opératoire	146
c - Résultats	146
E - Conclusions	146
III - ORIENTATION DES GLYCOPROTEINES DANS LA MEMBRANE PLASMIQUE D'HEPATOCYTE DE RAT	148
A - Principe	148
B - Réactifs	149
C - Mode opératoire	150
D - Résultats	150
E - Conclusions	152
CONCLUSIONS GENERALES	153
APPENDICE TECHNIQUE	158
I - METHODE DE DOSAGE DES ENZYMES "MARQUEURS"	158
A - Dosage du phosphate libre	158
1 - Principe	158
2 - Réactifs	158
3 - Mode opératoire	158
4 - Résultats	159
B - 5'-nucléotidase (EC 3. 1. 3. 5.)	159
1 - Principe	159
2 - Réactifs	159
3 - Mode opératoire	159
C - Nucléotide pyrophosphatase (EC 3. 6. 1. 9.)	161
1 - Principe	161
2 - Réactifs	161
3 - Mode opératoire	162

D - p-nitrophénylphosphatase (EC 3. 1. 3. 1.)	162
1 - Principe	162
2 - Réactifs	163
3 - Mode opératoire	163
E - L-leucyl- β -naphtylamidase (EC 3. 4. 1. 1.)	165
1 - Principe	165
2 - Réactifs	165
3 - Mode opératoire	166
F - ATPases (EC 3. 6. 1. 3.)	166
1 - Principe	166
2 - Réactifs	168
3 - Mode opératoire	168
G - Glucose-6-phosphatase (EC 3. 1. 3. 9.)	169
1 - Principe	169
2 - Réactifs	169
3 - Mode opératoire	169
H - NADPH ₂ cytochrome-c réductase (EC 1. 6. 2. 2.)	169
1 - Principe	169
2 - Réactifs	170
3 - Mode opératoire	170
I - Phosphatase acide (EC 3. 1. 3. 2.)	170
1 - Principe	170
2 - Réactifs	171
3 - Mode opératoire	171
J - Monoamine -oxydase (EC 1. 4. 1. 4.)	172
1 - Principe	172
2 - Réactifs	172
3 - Mode opératoire	172

K - Succinodeshydrogénase(EC 1. 3. 99. 1)	174	
1 - Principe	174	
2 - Réactifs	174	
3 - Mode opératoire	174	
II - METHODE DE "DISC ELECTROPHORESE"	176	
1 - Principe	176	
2 - Réactifs	176	
3 - Mode opératoire	177	
4 - Etalonnage du gel	178	
<table border="1"><tr><td>BIBLIOGRAPHIE</td></tr></table>	BIBLIOGRAPHIE	181
BIBLIOGRAPHIE		
I - REVUES GENERALES CONSACREES AUX MEMBRANES	181	
A - Ouvrages consacrés aux membranes biologiques	181	
B - Articles généraux sur les glycoconjugués membranaires	184	
II - PERIODIQUES CONSACRES AUX MEMBRANES	184	
III - REFERENCES SE RAPPORTANT AU TEXTE	185	

INTRODUCTION

L'anatomie et la morphologie cellulaires ont conduit très tôt à la notion de membrane biologique. Lorsque les développements de la microscopie électronique permirent de prouver la réalité matérielle de telles structures, non seulement autour de la cellule elle-même, mais aussi autour de ses organites (enveloppes nucléaires, crêtes et membranes mitochondriales) et à l'intérieur de son cytoplasme (réticulum endoplasmique et ergastoplasme), les physiologistes avaient déjà attribué aux membranes un rôle biologique fondamental.

Longtemps, la chimie physique s'est bornée à étudier l'aspect statique des structures membranaires. Il apparaît aujourd'hui que leur rôle physiologique tient davantage aux processus dynamiques de leurs constituants qu'à leur seule architecture. Les travaux sur les membranes ont depuis une dizaine d'années éclaté dans toutes les directions. En effet, les biologistes, les physiologistes, les biochimistes, les biophysiciens, les pathologistes poursuivent des recherches approfondies ayant pour but la connaissance de ces structures qui interviennent dans un grand nombre de processus vitaux.

D'abord considérée comme une frontière passive entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, les premiers travaux mettent l'accent sur la composition physico-chimique des membranes biologiques, ainsi leur nature lipoprotéique est rapidement définie. Rapidement la nature dynamique des membranes s'impose aux chercheurs, la découverte d'enzymes membranaires, la notion de transport actif, de diffusion facilitée, les études du métabolisme des différents composants biochimiques, substituent à l'image d'une membrane inerte une membrane toujours en mouvement dont les protéines actives baignent dans une matrice de lipides dans un état de fluidité qui varie en permanence.

C'est dans cette "mosaïque fluide" de nature hydrophile que viennent s'intégrer des composés hydrophiles longtemps considérés comme mineurs dans les membranes : les glucides. Qu'ils soient sous forme de glycolipides ou de glycoprotéines, les glucides jouent en effet un rôle capital à la surface des cellules. Très tôt on découvre leur rôle antigénique (antigènes de groupes sanguins et de transplantation) ainsi que leurs rôles de récepteurs des virus et des phytoagglutinines, on rend responsable l'acide sialique de la charge négative de la surface cellulaire, enfin un rôle capital leur est attribué dans le mécanisme de la cancérisation cellulaire.

Nos travaux sont une contribution à l'étude de ces glycoprotéines membranaires. Un tel problème ne saurait se résoudre sans une mise au point technique importante, c'est pourquoi nous ferons précéder nos résultats par la description des procédés employés, qui sont en général une miniaturisation de techniques biochimiques classiques. L'étude des glycoprotéines de la membrane plasmique d'hépatocyte de Rat nous permet de donner un schéma général de l'intégration de ces glycoconjugués dans les membranes qui cadre bien avec les modèles les plus récents.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une courte revue générale consacrée à la structure moléculaire des membranes biologiques et aux glycoprotéines membranaires.

GENERALITES

STRUCTURE MOLECULAIRE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

I - NOTION DE MEMBRANE PLASMIQUE

L'idée d'une frontière matérielle existant à la surface des cellules vivantes a été établie à la fin du 19ème siècle et au début du 20ème siècle à la suite d'un grand nombre d'expériences sur les cellules végétales et les micro-organismes. Carl NAGELI, 1855 (1) arrive un des premiers à cette conclusion après avoir étudié la pénétration de pigments dans des cellules intactes et endommagées. Il avait également suggéré que la membrane plasmique est responsable des propriétés osmotiques de la cellule. Le rôle de cette membrane plasmique invisible dans les phénomènes osmotiques a été repris par PFEFFER, 1897 (2) puis par OVERTON, 1899 (3) qui à partir des études de perméabilité aux non-électrolytes ont déduit la nature chimique de cette barrière. Dans son article sur l'origine probable et la signification des propriétés osmotiques de la cellule, il conclut que le cholestérol et d'autres lipides sont impliqués dans le contrôle de la pénétration de substances dans le protoplasme.

Le développement des techniques de micro-manipulation permet à CHAMBERS, 1924 (4) de retirer le "protoplasmic surface film" de l'oeuf d'étoile de mer ne laissant aucun doute sur sa réalité. Janet PLOWE, 1931 (5) se référant aux mêmes expériences prouve que la couche de surface des cellules végétales est une structure élastique et fluide.

Ces premières membranes décrites par les biologistes sont uniquement des membranes plasmiques, c'est-à-dire les membranes péricytoplasmiques. Les auteurs distinguaient mal la membrane cellulaire de la paroi, cette dernière est particulièrement visible chez les bactéries et chez les végétaux. La paroi, plus

extérieure que la membrane plasmique est de composition chimique très variée : lipopolysaccharides bactériens, matières pectocellulosiques des cellules végétales, elle est en outre d'épaisseur variée suivant les types cellulaires. Les membranes plasmiques ont, par contre du moins en première analyse, une composition chimique homogène : lipoprotéïque et une épaisseur constante : 90 Å.

Cette unité morphologique se ressent plus encore après le développement des techniques de microscopie électronique. ROBERTSON, 1950 (6) pose le principe de la "unit membrane" c'est-à-dire que toutes les membranes cellulaires donnent au microscope électronique une seule image en coupe transversale : la structure trila-minée, deux feuillets sombres entourant un feuillet clair, comme le montre la figure 1 (p. 5).

II - COMPOSITION DES MEMBRANES PLASMIQUES

Le développement des idées sur l'organisation moléculaire de la membrane plasmique commence avec l'idée d'OVERTON sur la participation du cholestérol et de molécules lipidiques dans la structure membranaire.

A - COMPOSITION GLOBALE

Les membranes plasmiques contiennent environ 30 p. 100 d'eau (PETHICA et CAMBRAI, 1970 (7)). La répartition de leurs grandes classes de constituants est difficile à préciser, car elle varie avec le procédé d'isolement, l'espèce et le tissu. En général, elle est comprise dans les limites suivantes (en poids sec) : 60 à 80 p. 100 de protéines, 20 à 40 p. 100 de lipides et 1 à 10 p. 100 de glucides (HERTZENBERG et HERTZENBERG, 1961 (8)); EMMELOT et al., 1964 (9); SKIPSKI et al., 1965 (10); MADDY, 1966 (11); BAKERMAN et WASEMILLER, 1967 (12); WEINSTEIN, 1968 (13); BOSMAN et al., 1968 (14); CHANDRASEKHARA et ANANTH NARAYAN, 1970 (15); ALLAN et CRUMPTON, 1970 (16); PERDUE et SNEIDER, 1970 (17); BARBER et JAMIESON, 1970 (18); ZENTGRAF et al., 1971 (19); PRICE et al., 1972 (20); FERBER et al., 1972 (21); ALLAN et CRUMPTON, 1972 (22); BLOEMENDAL et al., 1972 (23);

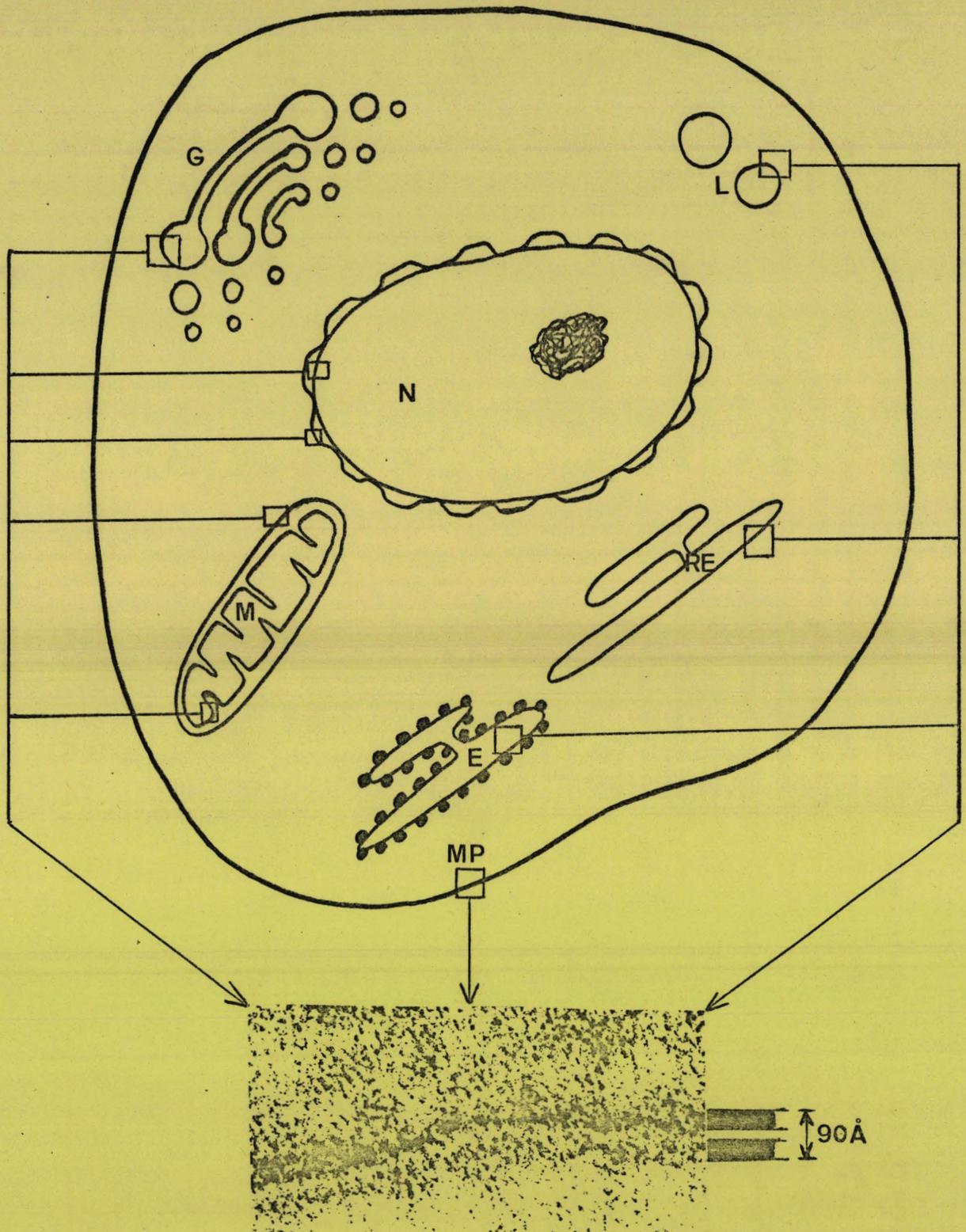


Figure 1

La "unit-membrane"



E : Ergastoplasme, G : Golgi, L : Lysosomes, M : Mitochondrie , N : Noyau

RE : Réticulum endoplasmique.

DOUGLAS et al., 1972 (24) ; VANBLITTERSWIJK et al., 1973 (25) ; MADEIRA et ANTUNES-MADEIRA, 1973 (26)).

Un certain nombre de cellules semblent posséder également une petite quantité de RNA au niveau de leurs membranes plasmiques, il s'agit de cellules L (WEISS, 1969 (27), des hépatocytes de Rat (EMMELOT et BENEDETTI, 1967 (28) ; TOUSTER et al., 1970 (29) ; EMMELOT et BOS, 1972 (30) ; des cellules du muscle lisse du Rat (KIDWAI et al., 1971 (31), des lymphocytes de Porc (ALLAN et CRUMPTON, 1970 (32) ; FERBER et al., 1972 (33)), des thymocytes humains (ALLAN et CRUMPTON, 1972 (34)); ou de thymocytes de Veau (VAN BLITTERSWIJK et al., 1973 (35), de cristallin de Veau (BLOEMENDAL et al., 1972 (36), de muscle de Lapin (MADEIRA et ANTUNES-MADEIRA, 1973 (37). Cependant, ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de prudence, car les valeurs trouvées sont très faibles (elles représentent généralement 0,5 à 2 p. 100 du poids des protéines de la membrane). Certains auteurs prétendent que la membrane de surface des hépatocytes de Rat détenait aussi une très petite quantité de DNA (TOUSTER et al., 1970 (38), mais récemment EMMELOT et BOS, 1972 (39) montrent qu'il s'agit probablement d'un artefact. Enfin les membranes contiennent des ions minéraux, en particulier du calcium et du magnésium (FORSTNER et MANNERY, 1971 (40) ; OSCHMAN et WALL, 1972, (41) ; SHLATZ et MARINETTI, 1972 (42).

B - NATURE DES LIPIDES

La membrane plasmique des cellules animales contient des phospholipides, des lipides neutres et des glycolipides, bien que la quantité relative des trois catégories de composés varie avec l'espèce et le tissu, elle respecte en général l'ordre suivant : phospholipides > lipides neutres > glycolipides. Pour les membranes plasmiques des hépatocytes du Rat, des érythrocytes de différentes espèces (Chat, Vache, Chien, Chèvre, Cobaye, Cheval, Porc, Lapin, Rat, Mouton, Homme) et des fibroblastes de BHK 21-C-13 du Hamster par exemple, certains auteurs trouvent respectivement les trois séries de valeurs suivantes : 39 p. 100 de phospholipides, 35 p. 100 de lipides neutres, 26 p. 100 de glycolipides (SKIPSKI et al., 1965 (43) ; 50 à 65 p. 100 de phospholipides, 21 à 29 p. 100 de lipides neutres 5 à 25 p. 100 de glycolipides (VAN DEENEN et DE GIER, 1964 (44) ; (ROUSER et al.,

1968 (45) ; 62 p. 100 de phospholipides, 31 p. 100 de lipides neutres, 7 p. 100 de glycolipides (RENKONEN et al., 1972 (46)). En outre, le rapport molaire cholestérol/phospholipides de cette zone a été déterminé chez un grand nombre de tissus et de types cellulaires, ses valeurs les plus significatives sont les suivantes : érythrocytes voisin de 1 (VAN DEENEN et DE GIER, 1964 (47) ; ROUSER et al., 1968 (48) ; hépatocytes du Rat : 0,4 à 0,39 (BENEDETTI et EMMELOT, 1968 (49) ; muscle lisse du Rat : 0,82 (KIDWAI et al., 1971 (50) ; foie et épithélium intestinal du Cobaye : 0,5 à 1 (COLEMAN et FINEAM, 1966 (51) ; pancréas du Cobaye : 0,51 (MELDOLESI et al., 1971 (52) ; membrane synaptosomale du Rat adulte : 0,436 (BRECKERIDGE et al., 1972 (53)).

Bien qu'il y ait une grande variabilité de la composition en lipides des membranes plasmiques, quelques lois générales peuvent cependant être formulées :

- les phospholipides à choline sont, sans contestation possible, les phospholipides majeurs de la plupart des membranes plasmiques. Dans les cellules animales ou végétales, la phosphatidyl-choline (PC) est le constituant lipidique principal de ces membranes, la seule exception dans le règne animal, sont les membranes des globules rouges des ruminants qui ne renferment que très peu de lécithine, elles possèdent un autre composé comme constituant majeur : la sphingomyéline (DAWSON et al., 1960 (54)).

- dans la plupart des membranes, la phosphatidyl-éthanolamine est un deuxième phospholipide très important.

- il apparaît ainsi que dans les membranes en général, l'ensemble des phospholipides azotés représentent plus de 70 p. 100 des phospholipides totaux.

- si l'on s'attache enfin à la composition en acides gras des lipides polaires des membranes, la variabilité devient très grande d'une espèce à l'autre. D'une façon générale, on a souvent noté que les phospholipides membranaires étaient riches en acides gras poly-insaturés (ROUSER et al., 1968 (55), SKIPSKI et al., 1965 (56)).

C - NATURE DES PROTEINES

1 - Propriétés générales et classification

L'étude des protéines membranaires se heurte à une difficulté majeure : l'insolubilité dans les solvants aqueux classiques. Les poids moléculaires

trouvés par des différents auteurs différent selon la technique d'extraction et l'origine des membranes. Les polypeptides isolés de la membrane de globule rouge humain ont des poids moléculaires variant des auteurs entre : 100 000 et 200 000 (BERG, 1969 (57) ; 150 000 et 200 000 (GWYNNE et TANFORD, 1970 (58) ; 26 000- 65 000 (DEMUS et MEHL, 1970 (59) ; 6 000 (LAICO et al., 1970 (60) ; 27 000 et 220 000 (TRAYER et al., 1971 (61)), ceux de l'hépatocyte, de la bordure en brosse rénale et de l'érythrocyte du Rat sont compris entre 310 000 et 10 000 (NEVILLE et GLOSSMANN, 1971 (62), ceux de lymphocyte du Porc entre 40 000 et 100 000 (ALLAN et CRUMPTON, 1971 (63), ceux des membranes des cellules neuronales et gliales entre 44 000 et 95 000 (KARLSSON et al., 1973 (64), ceux isolés des membranes de cellules de BHK21 entre 200 000 et 24 000 (GAHMBERG, 1971 (65)).

Que ces protéines soient conjuguées ou non à des glucides, leur composition en acides aminés respecte les tendances suivantes : elles ne renferment pas de tryptophane, détiennent une quantité d'acides aminés soufrés souvent inférieure à 1 p. 100, et contiennent 8 à 15 p. 100 d'acides aminés basiques, 15 à 20 p. 100 d'acides aminés acides et 50 à 60 p. 100 de restes hydrophobes (KONO et COLOWICK, 1961 (66) ; COOK, 1962 (67) ; TAKEUCHI et TERAYAMA, 1965 (68) ; OHKUMA et IKEMOTO, 1966 (69) ; PASSOW, 1969 (70) ; WEIS et NARAHARA, 1969 (71) ; MIYAJIMA et al., 1970 (72) ; WINZLER, 1970 (73) ; GAHMBERG, 1971 (74) ; MARCHESI et al., 1972 (75) ; TANNER et BOXER, 1972 (76)).

Deux types de protéines peuvent être distinguées dans des membranes : des protéines qui entrent en relation avec des lipides par des liaisons apolaires, ce sont des protéines "intrinsèques" VANDERKOOI, 1972 (77) ou "intégrales" SINGER et NICOLSON, 1972 (78), elles possèdent un fort pourcentage d'acides aminés hydrophobes et sont peu polaires (CAPALDI et VANDERKOOI, 1972 (79) ; et des protéines qui n'entrent pas en relation avec les lipides : ce sont les protéines "extrinsèques" VANDERKOOI, 1972, (80) ou "périphériques" SINGER et NICOLSON, 1972 (81).

Ces dernières sont facilement dissociables des lipides et solubles dans une solution physiologique de NaCl 0,15 M. EMMELOT et al., 1964 (82) montrent qu'elles représentent 25 p. 100 des protéines de la membrane plasmique des hépatocytes du Rat.

Quand les membranes érythrocytaires sont traitées avec des solutions aqueuses de basse force ionique, une proportion importante des protéines peut être solubilisée MAZIA et RUBY, 1968 (83) désignent ces protéines solubles par le terme de "tektines". Une de ces protéines, la "Spectrine" a été purifiée et étudiée par MARCHESI et al., 1970 (84), et CLARKE, 1971 (85) a étudié la "tektine A" dont la relation avec la spectrine n'est pas encore précisée. On peut distinguer parmi les protéines "intrinsèques" : des protéines structurales, les enzymes, les protéines de transport.

2 - Les protéines structurales

Le concept de "protéine structurale" dérive des observations de GREEN et al., 1961 (86) et CRIDDLE et al., 1962 (87) qui montrent qu'une protéine incolore, enzymatiquement inactive, intimement associée avec la chaîne de transporteurs d'électrons, est présente dans les membranes mitochondriales. Ce type de protéine a été extraite d'un grand nombre de matériels biologiques : mitochondries et microsomes de foie de Boeuf, erythrocytes de Boeuf (RICHARDSON et al., 1963 (88), chloroplastes de feuilles d'Epinard (RICHARDSON et al., 1963 (89) ; CRIDDLE et PARK, 1964 (90), et mitochondries de Neurospora (WOODWARD et MUNKRES, 1966 (91), de membranes de globules rouges humains (SCHNEIDERMAN et JUNGA, 1968 (92).

Ces protéines structurales possèdent des caractéristiques physiques, chimiques biologiques particulières : elles polymérisent facilement, se lient aux phospholipides, sont dépourvues d'activité enzymatique, sont insolubles en milieu aqueux à pH physiologique, leur solubilisation nécessite des pH extrêmes ou des détergents, elles semblent avoir la même configuration et les mêmes caractéristiques quelle que soit leur origine biologique.

Une autre protéine structurale est la protéine basique A₁ de la myéline humaine et bovine, EYLAR et al., 1969 (93). L'injection produit chez l'animal une encéphalomyélite allergique expérimentale. La séquence des amino-acides a été établie par EYLAR, 1970 (94), la structure de cette séquence d' amino-acides semble être stabilisée par l'interaction avec les lipides.

3 - Les enzymes

Un grand nombre d'enzymes sont associés aux membranes. Les enzymes de la membrane plasmique ont été particulièrement bien étudiés chez l'hépatocyte du Rat et de la Souris ainsi que le montre le tableau I p. 11. Parmi ceux-ci, seuls l'ATPase ($Mg^{++} Na^+ K^+$) l'ATPase ($Na^+ - K^+$), la (K^+) p-nitrophénylphosphatase alcaline, la (K^+) acétyl phosphatase, la 5' nucléotidase, la NAD-pyrophosphatase, la glycerophosphatase alcaline, la phosphodiesterase alcaline, l'IDPase et la leucyl- β -naphtylamidase sont considérés comme étant caractéristiques de ce type de membrane. Ces marqueurs enzymatiques sauf la leucyl- β -naphtylamidase sont localisés dans la fraction insoluble dans la NaCl 0,15 M et peuvent être ainsi considérés comme des protéines "intrinsèques" des membranes. Les autres activités enzymatiques sont mises en évidence à la fois dans les fractions insoluble et soluble, sauf celle de la triose-3-P-deshydrogénase qui est exclusivement trouvée dans cette dernière.

Un certain nombre d'autres enzymes de la membrane plasmique ont été également caractérisés sur d'autres types cellulaires : à la surface du globule rouge l'aldolase et la glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase qui sont fermement liées à la membrane ; la 3-phosphoglycerate kinase a une liaison intermédiaire ; la glutathion-peroxydase et reductase, lactate deshydrogénase, pyruvate kinase, triose phosphate isomérase sont faiblement liées à la membrane DUCHON et COLLIER, 1971 (105) ; la N-acétyl-D-galactosaminyl transférase dans les membranes érythrocytaires (KIM et al., 1971 (106), ainsi que l'ATPase dépendant du Ca^{++} , ROSENTHAL et al., 1970 (107) ; SCHATZMANN et ROSSI, 1971 (108) ; WOLF, 1972 (109), l'acétylcholinestérase BELLHORN et al., 1970 (110) et la 2',3'nucléotide-phosphate 3'-phosphohydrolyase SUDO et al., 1972 (111).

Il faut noter que l'équipement enzymatique varie avec chaque type de membrane plasmique selon la spécialisation de celle-ci. Notons par exemple : la phosphatase alcaline dans les bordures en brosse des cellules rénales (KINNE et al., 1969 (112) avec la tréhalase et la maltase (BERGER et SACKTOR, 1970 (113), tandis que les membranes de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales du Rat possèdent la leucyl-glycine hydrolase, la phosphatase alcaline et l'invertase FUJITA et al., 1972 (114).

Tableau I

ENZYMES DES MEMBRANES PLASMIQUES D'HEPATOCYTES DE RAT

Enzymes	Activité donnée en μ moles de substrat modifié par mg de pro- téines membranaires et par heure	Références
<u>ATP^{ase}</u> (Mg^{++}) - ATP ^{ase}	44,2 \pm 7,8	EMMELOT <u>et al.</u> , 1964 (95)
Na^+ - K^+ - Mg^{++} - ATP ^{ase}	11,6 \pm 2,3	"
<u>5'nucléotidase</u>	51,0 \pm 6,7	"
<u>Glycérophosphatase</u>		
alcaline	0	"
acide	0,4 \pm 0,1	"
<u>p-nitrophenylphosphatase</u>		
alcaline	1,5 \pm 0,5	"
alcaline activée par le K^+	1,5 \pm 0,5	"
acide	5,8 \pm 1	"
<u>Acétylphosphatase</u>	11,4 \pm 2,2	"
<u>Acétylphosphatase activée par le K^+</u>	10,8 \pm 1,9	"
<u>Phosphodiesterase</u>		
alcaline	3,6 \pm 0,4	"
acide	0,7 \pm 0,1	"
<u>Ribonucléase</u>		
alcaline	1,1 \pm 0,25	"
acide	0,27 \pm 0,12	"
<u>Glucose-6-phosphatase</u>	1,4 \pm 0,2	"
<u>Esterase</u>		
α -naphtyl laurate	0,75 \pm 0,02	"
α -naphtyl caprylate	34,0 \pm 1,6	"



Tableau I (suite)

Enzymes	Activité donnée en μ moles de substrat modifié par mg de pro- téines membranaires et par heure	Références
<u>Triose-3-P déshydrogénase</u>	2,04	"
<u>NADH₂-cyt. C. réductase</u>	7,68 \pm 0,5	EMMELOT <u>et al.</u> , 1964 (95)
<u>ADP^{ase}</u>	0,4	"
<u>IDP^{ase}</u>	30 \pm 3	"
<u>NAD-pyrophosphatase</u>	5,72 \pm 0,2	"
<u>NAD-nucléosidase</u>	0,5 \pm 0,1	"
<u>Amino-peptidase</u>		
Leucyl- β -naphtylamide	3,91	EMMELOT et VISSER, 1971 (96)
Leucinamide	4,19	"
Leucylglycine	1,23	"
Leucyl-glycyl-glycine	11,4	"
Triglycine	7,51	"
<u>Mono-Amine Oxydase</u>	0,66 \pm 0,1	GORKIN, 1971 (97)
<u>Phospholipase A₁</u>	0,52	NEWKIRK et WAITE, 1971 (98)
<u>Phospholipase A₂</u>	0,20	NEWKIRK et WAITE, 1973 (99)
<u>Pyrophosphatase</u>	4,3	EMMELOT et BOS, 1970 (100)
<u>PPi - glucose-phosphotrans- férase</u>	0,17	"
<u>Glycéryl-phosphoryl-choline</u>		
<u>Phosphodiesterase</u>	0,18	LLOYD-DAVIES <u>et al.</u> , 1972 (101)
<u>Neuraminidase</u>	-	SCHENGRUND <u>et al.</u> , 1972 (102)
<u>N-acétyl-β-glucosaminidase</u>	-	ROBINSON et STIRLING 1969 (103)
<u>Adényl-cyclase</u>	2,3 $10^{-3} \pm 10^{-3}$	EMMELOT et BOS, 1971 (104)

4 - Les protéines de transport

Un grand nombre de substances (electrolytes ou non) peuvent être transportées au travers des membranes même contre un gradient électrique ou chimique. Un grand nombre de mécanismes ont été décrits, mais ils nécessitent tous la présence d'une protéine particulière appelée protéine de transport ; ce sont généralement de petites protéines ($MM \approx 3 \cdot 10^{-4}$) dont la particularité essentielle est de présenter une haute spécificité pour un substrat: PARDEE, 1968 (115).

D - LES GLYCOCONJUGUES

Les glucides de la surface cellulaire représentent seulement une fraction mineure - souvent inférieure à 10 p. 100 - de la membrane mais ils jouent un rôle important dans la croissance cellulaire, l'antigénicité, la reconnaissance des cellules.

Tous les glucides sont conjugués soit à des lipides, soit à des protéines et c'est sous la forme de glycolipides ou de glycoprotéines qu'ils acquièrent cette importance capitale.

Les membranes plasmiques contiennent quatre monosaccharides neutres : galactose, mannose, fucose, glucose ; deux osamines N-acétylées : glucosamine et galactosamine, de l'acide sialique habituellement de l'acide N-acétyl et N-glycolylneuraminique. On a parfois trouvé des oses O-sulfurylés - généralement du galactose - et de l'acide glucuronique. Le tableau II (p. 14) résume la composition en saccharides neutres, en hexosamine, et en acide sialique de quelques membranes isolées de cellules animales.

Ces glucides sont répartis dans les trois catégories de composés suivants : les glycosamino-glycannes, les glycolipides, les glycoprotéines.

1 - Les glycosamino-glycannes

Leur présence a été détectée au niveau de la membrane de quelques types cellulaires SUKURI et al., 1970 (128) ; KRAEMER, 1971 (129) ; YAMASHINA et al., 1973 (130). Un phosphoglycanne a été récemment isolé des membranes plasmiques d'amibe par KORN et al., 1973 (131). Ce phosphoglycanne forme un tiers du poids de

Tableau II

COMPOSITION EN GLUCIDES DE QUELQUES MEMBRANES PLASMIQUES DE DIFFERENTES ORIGINES D'APRES WINZLER,

1972 (116)



Origine de la membrane	Oses neutres (g/100 g)	Osamines (g/100 g)	Acides Sialiques (g/100 g)	Références
Erythrocytes humains	6,0	3,1	1,5	BAKERMAN et WASEMILLER, 1967 (117)
Erythrocytes humains et d'autres espèces	0,8 - 2,3	0,6 - 1,9		RELANDER, 1968 (118)
Foie de Rat	0,7	0,8 - 1,0	0,1 - 0,2	EMMELOT <u>et al.</u> , 1964 (119) TAKEUCHI et TERAYAMA, 1965 (120)
Foie de Souris		0,6	0,2	HERZENBERG et HERZENBERG, 1961 (121)
Muscle.squelettique de Rat	2,8			KONO et COLOWICK, 1961 (122)
Muscle lisse utérin de Rate			0,5	CARROLL et SEREDA, 1968 (123)
Plaquettes sanguines de Boeuf	3,2	1,3	0,6	BEZKOROVAINY et DOHERTY, 1962 (124)
Leucocytes polynucléaires humains			0,3	WOODIN et WIENECKE, 1966 (125)
Cellules HeLa		1,3	0,3	BOSMAN <u>et al.</u> , 1968 (126)
Cellules lymphoïdes de Souris	5,0			ARTZT <u>et al.</u> , 1968 (127)
Plaquettes sanguines humaines	2,0	1,0	0,5	JAMIESON et PEPPER (non publiés)

la membrane.

2 - Les glycolipides

Tous les glycolipides de la membrane plasmique appartiennent à la classe des sphingosidolipides, aucun ne possède de mannose, et la plupart contiennent du galactose comme composant majeur. Le tableau III p.16 donne leur identité et leur structure, et indique leur distribution. En outre il faut remarquer que certains fuco-glycolipides détiennent les structures glycaniques des antigènes A. B. H et Lewis de groupes sanguins (WATKINS, 1970 (133) et un tétrahexosyl ceramide est identifiable à l'antigène de FORSSMAN (YOSIZAWA et al., 1966 (134)). Il est possible également que certains gangliosides soient responsables de l'activité antigénique Rh (D) mais ceci n'a pas encore été prouvé (WINZLER, 1970 (135)).

3 - Les glycoprotéines

Les glycoprotéines membranaires contiennent du galactose, du mannose et du fucose, de la N-acétyl-glucosamine ou de la N-acétyl-galactosamine (parfois les deux), toutes semblent détenir de l'acide N-acétyl-neuraminique MIYAJIMA et al., 1970 (136).

On trouve des glycoprotéines dans les membranes plasmiques de toutes les cellules. La plus connue est la glycoprotéine majeure de l'érythrocyte humain ou glycophorine. La glycoprotéine isolée est soluble dans l'eau, son poids moléculaire de 55 000 a été déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SEGREST et al., 1971 (137)), elle contient 60 p. 100 de glucides : 25 p. 100 d'acide sialique, 10-12 p. 100 de galactose, 6 p. 100 de N-acétyl-glucosamine, 12 p. 100 de N-acétyl-galactosamine ainsi que des traces de mannose et de fucose, MARCHESI et al., 1972 (138). SEGREST et al., 1973 (139) firent la démonstration de son asymétrie. Cette glycoprotéine majeure a été retrouvée dans la membrane d'érythrocyte d'un grand nombre d'espèces : Veau, Cheval, Porc, Mouton quoique avec des poids moléculaires différents (HAMAGUCHI et CLEVE, 1972 (140)).

Tableau III

GLYCOPHINGOLIPIDES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE D'APRES KLENK ET CHOPPIN, 1970 (132)

Structure*	Source	Nom
Gal → Cer	Cerveau de Veau	Cérébroside
Gal → Glu → Cer	Rate de Veau	
Gal → Gal → Glu → Cer	Cerveau (Maladie de TAY-SACHS)	
GalNAc → Gal → Gal → Glu → Cer	Erythrocytes humains	Globoside
Gal → GalNAc → Gal → Glu → Cer	Produit d'hydrolyse des gangliosides	
SO ₃ ⁻ → Gal → Cer	Cerveau de Veau	Sulfatide
ANAN → Gal → Glu → Cer	Erythrocytes de Chien	N-acétyl-neuraminosyl-lactose ganglioside (hématoside).
ANGN → Gal → Glu → Cer	Erythrocytes de Cheval	N-glycolyl neuraminosyl-lactose ganglioside (hématoside)
Gal → GalNAc → Gal → Glu → Cer ↑ ANAN	Cerveau humain	N-acétyl-neuraminosyl-N-tétraose ganglioside
Gal → GalNAc → Gal → Glu → Cer ↑ ANAN ↑ ANAN	Cerveau humain	di (N-acétyl-neuraminosyl) - N-tétraose ganglioside
Gal → GalNAc → Gal → Glu → Cer ↑ ↑ ANAN ANAN ↑ ANAN	Cerveau humain	tri (N-acétyl-neuraminosyl)- N-tétraose ganglioside

* Cer = céramide

Certains auteurs ont également mis en évidence des glycopeptides dans les membranes érythrocytaires en particulier un décapeptide contenant une triglucosylcystéine WEISS et al., 1971 (141). Ces glycopeptides à liaisons S-glycosidiques seraient impliqués dans le transport de petites molécules - peut être le glucose -.

Des glycoprotéines ont également été mises en évidence dans les membranes plasmiques du foie de Souris (EVANS, 1970 (142), du foie de Rat (GURD et al., 1972 (143), dans la myéline de cerveau du Rat (QUARLES et al., 1972 (144), dans les membranes synaptosomales WAEHNELDT et al., 1971 (145). Six glycoprotéines dont une majeure de poids moléculaire de 66 000 a été également mise en évidence dans des membranes des globules du lait (KOBYLEA et CARRAWAY, 1972 (146)) qui dérivent de la membrane plasmique des cellules de la glande mammaire.

E - CONCLUSIONS

On peut se rendre compte de la diversité des constituants chimiques des membranes plasmiques : en fait la composition varie suivant le type de membrane, le type cellulaire, l'espèce. Mais si on note des variations de détails, la composition globale reste la même : la membrane est une association entre des lipides et des protéines avec une quantité très faible de glucides. C'est la manière de disposer les uns par rapport aux autres ces constituants pour former un ensemble moléculaire stable que nous envisagerons dans le chapitre suivant.

III - EVOLUTION DES IDEES CONCERNANT LA STRUCTURE

DES MEMBRANES

A - CONCEPT DE LA DOUBLE COUCHE MOLECULAIRE

L'étude de la structure moléculaire des membranes biologiques commence en 1925. Après avoir extrait les lipides des érythrocytes GORTER et GRENDL (147), les étalent en monocouche sur une surface aqueuse, en comparant la surface occupée par les lipides, par rapport à la surface des globules rouges ils s'aperçoivent que ceux-ci doivent se disposer en double couche autour de la cellule. Bien que l'extrac-

tion lipidique fut incomplète et que les mesures de surface soient imprécises, les récentes expériences de BAR et al., 1966 (148) montrent que les erreurs se compensant, la conclusion à laquelle ils aboutissaient était correcte.

Dans le même temps FRICKE, 1925 (149) trouve que la capacitance d'une membrane érythrocytaire est de $0,81 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, ce qui donne une épaisseur lipidique de 33 \AA .

Les études de HARVEY, 1931 (150) et HARVEY et DANIELLI, 1938 (151) sur la tension de surface des oeufs d'échinodermes, indiquent des valeurs plus basses que celles d'un film lipidique pur. De plus des expériences prouvent que des protéines solubles peuvent s'associer spontanément avec une monocouche de lipides. Ceci conduit DANIELLI et HARVEY, 1935 (152) à envisager une structure composée de protéines globulaires associées par des forces ioniques aux lipides de la membrane des oeufs d'échinodermes. DANIELLI et DAVSON, 1935 (153) généralisent cette idée à toutes les membranes. La figure 2 p.19 représente leur modèle : les chaînes paraffiniques des lipides dirigées vers l'intérieur, les protéines globulaires liées par des forces ioniques aux groupes polaires des lipides disposés de part et d'autre des membranes. Bien que l'on essaye de mesurer l'épaisseur de la membrane par des méthodes optiques (SCHMITT et al., 1936 (154) et 1938 (155), celle-ci et celle des différentes couches restent incertaines

Pour expliquer la perméabilité des membranes biologiques aux électrolytes et aux substances dissoutes STEIN et DANIELLI, 1956 (156) modifient le schéma précédent en introduisant la notion de pores bordés de protéines comme le montre la figure 3 p.19. Ceux-ci facilitent le passage de telles substances au travers des membranes.

Presque simultanément avec la publication de ce premier modèle, SCHMIDT, 1936 (157) dresse un schéma remarquable pour la structure de la gaine myélinique, fondé sur des études en lumière polarisée de l'orientation des protéines et des lipides. Ce modèle fut précisé par des études de diffraction des rayons X (SCHMITT et al., 1935 (158) et 1941 (159) et plus tard FINEAM, 1956 (160). Le lien entre les études au microscope électronique GEREN, 1954 (161) et l'interprétation des profils de densité électronique obtenu par diffraction des rayons X : FINEAM, 1962 (162) ; FINEAM et BURGE 1963 (163) ; MOODY, 1963 (164) ; BLAUROCK et

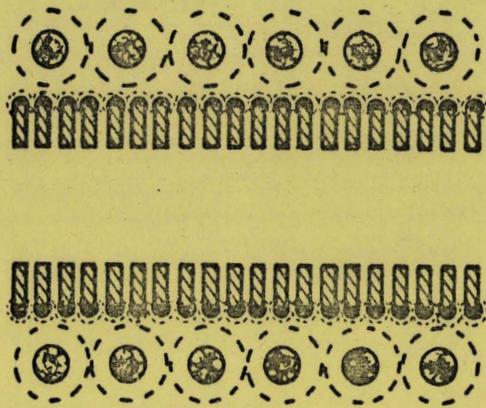


Figure 2

Structure de la membrane d'après DANIELLI et DAVSON (1935)

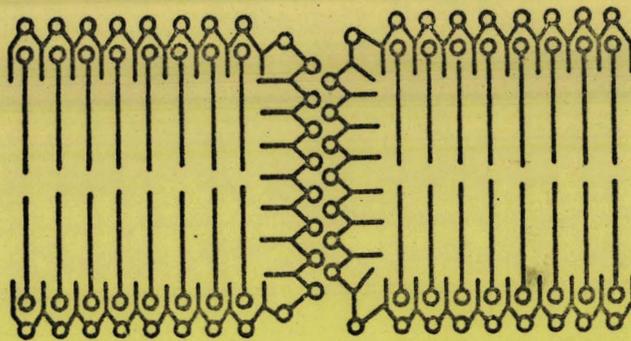


Figure 3

Structure de la membrane d'après STEIN et DANIELLI (1956)

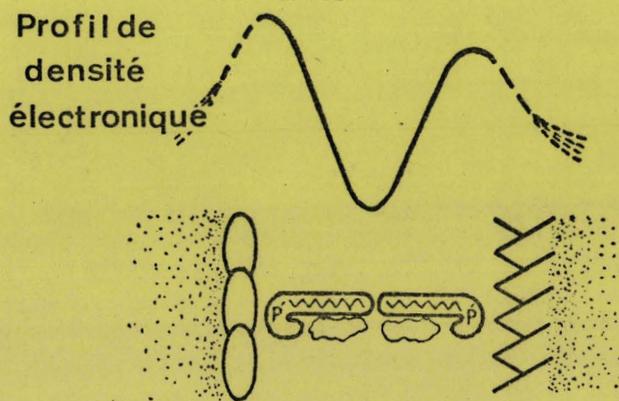


Figure 4

Structure de la myéline d'après FINEAM (1962)

WORTHINGTON, 1966 (165) ; BLAUROCK, 1971 (166) ; CASPAR et KIRSCENER, 1971 (167), a permis de préciser la structure exacte de cet empêchement membranaire (voir figure 4 p. 19).

L'empilement des disques des bâtonnets rétiniens, les grana des chloroplastes ont permis, en leur appliquant les techniques de la cristallographie, de donner des informations complémentaires sur ces systèmes lipoprotéiques à organisation lamellaire (GRAS et WORTHINGTON, 1969 (168) ; BLAUROCK et WILKINS, 1969 (169) ; KREUTZ, 1963 (170)).

Cette conception de la structure bimoléculaire des membranes biologiques a été renforcée avec le développement des techniques de microscopie électronique. En 1959, ROBERTSON (171) propose le concept de la "unit membrane" c'est-à-dire que toutes les membranes d'une cellule, montrent au microscope électronique un même aspect : la structure trilamellaire d'une épaisseur de 100 Å (voir figure 5 p. 21) ROBERTSON, 1964 (172).

B - CONCEPT DE LA MEMBRANE MICELIAIRE

Les idées sur la structure moléculaire des membranes évoluèrent parallèlement aux techniques de microscopie électronique. L'augmentation du pouvoir séparateur a permis de déceler des discontinuités dans la "unit membrane" spécialement dans le cas des cyto-membranes. De telles observations indiquent la présence dans ces membranes d'unités structurales globulaires SJÖSTRAND, 1965 (173) et 1968 (174), comme le montre la figure 6 (p. 21).

En même temps l'introduction des techniques de coloration négative, en particulier pour l'étude des membranes mitochondriales (FERNANDEZ-MORAN, 1962 (175)) révèle que cette membrane est formée de sous unités. De telles données appuyaient les travaux de LUCY, 1964 (176), de GLAUERT et LUCY, 1968 (177) concernant la structure micellaire des membranes biologiques (voir figure 7 (p. 21)).

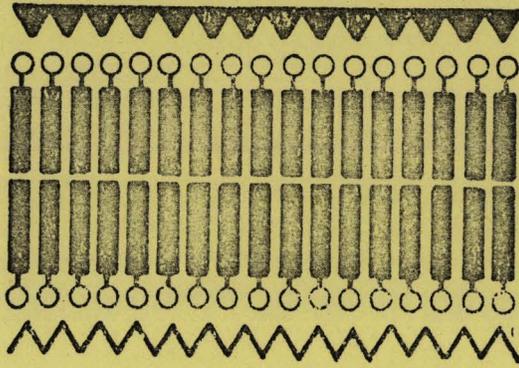


Figure 5

Structure de la membrane d'après ROBERTSON (1964)

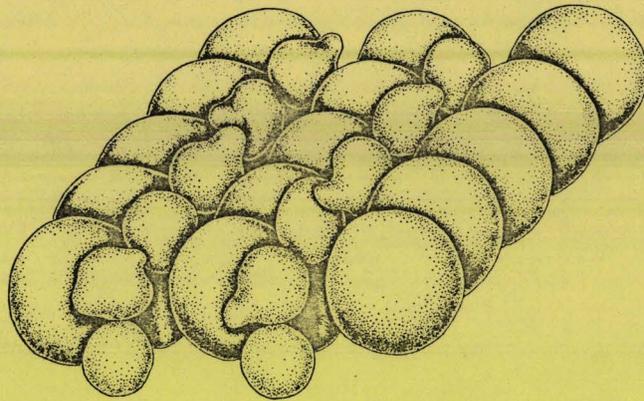
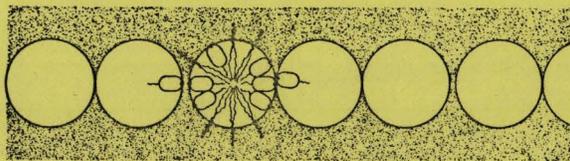


Figure 6

Structure de la membrane mitochondriale d'après SJÖSTRAND (1965)



A cross-sectional view of a model for a biological membrane in which the lipids are in small globular micelles. The micelles are arranged in a plane, and a layer of protein and/or glycoprotein is shown on each side of this plane of micelles. The organization of lipid molecules (phospholipid and cholesterol) within the micelles is illustrated diagrammatically, but not stoichiometrically, for one of the micelles in the row.

Figure 7

Structure micellaire des membranes biologiques d'après LUCY (1968)



En fait, l'interprétation en termes de structure en sandwich était soutenue par des études de diffraction des rayons X sur des structures lamellaires (chloroplastes, myéline, bâtonnets rétinien), tandis que l'interprétation en terme de structure particulaire était expliquée par des données biochimiques. En 1966 GREEN et PERDUE (178) écrivaient : "The whole of biochemical experience has led to the thesis that macromolecular system are built up from repeating units". Les expériences biochimiques étaient des expériences de désagrégation des membranes mitochondriales par les détergents, les ultrasons qui leur a permis de concevoir le modèle représenté par la figure 8 (p. 23).

C - LES MODELES MEMBRANAIRES MIXTES

L'ensemble des travaux conduisent alors à l'idée de transition dans les structures membranaires. En particulier, LUZZATI et HUSSON, 1962 (179) et LUZZATI, 1968 (180) remarquent qu'il existe un très grand polymorphisme du système lipide-eau. Sous l'effet de certains paramètres : concentration en ions, température nature des lipides ; les chaînes hydrocarbonées peuvent passer reversiblement de l'état "mésomorphe" (ou cristal-liquide) à l'état "cristallisé". KAVANAU en 1963 (181) propose que les membranes biologiques peuvent passer reversiblement d'une configuration fermée : couche bimoléculaire de lipides de 50 à 60 Å d'épaisseur, à une configuration ouverte, arrangement hexagonal de micelles cylindriques de 80 x 180 Å entre lesquelles se situent des pores hydrophiles permettant le passage de l'eau et des substances dissoutes (voir figure 9.p. 23). LUZZATI et ses collaborateurs étendent actuellement leurs recherches cristallographiques à des mélanges plus complexes protéines-lipides-eau (voir GULIK-KRZYWICKI et al., 1969 (182)).

D - INTERACTIONS POLAIRES ET NON POLAIRES

Il faut remarquer que tous les schémas précédents ne font intervenir que des liaisons ioniques entre protéines et lipides. L'introduction récente de méthodes optiques et spectroscopiques plus fines, a permis de mettre en évidence des interactions non polaires entre protéines et lipides, en particulier par la résonance magnétique nucléaire (CHAPMAN et al., 1966 (183) par la dispersion optique rotatoire et le dichroïsme circulaire (LENARD et SINGER, 1966 (184) sur la membrane érythrocytaire. Ces études prouvent qu'une partie au moins des protéines est dans un

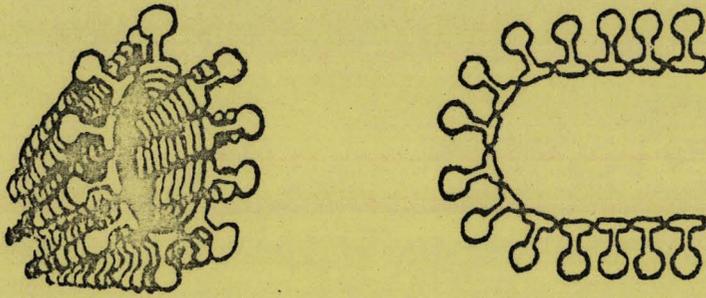


Figure 8

Structure de la membrane mitochondriale d'après GREEN et PERDUE (1966)

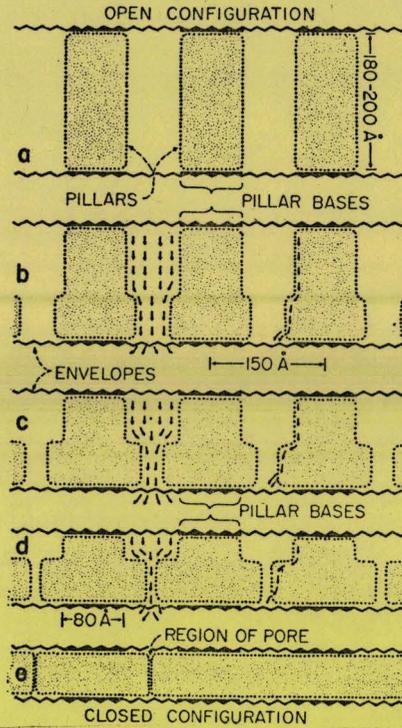


Figure 9

Le modèle de KAVANAU (1963)

montrant le passage d'une structure membranaire "ouverte" à une structure membranaire "fermée" (a, b, c, d, e)

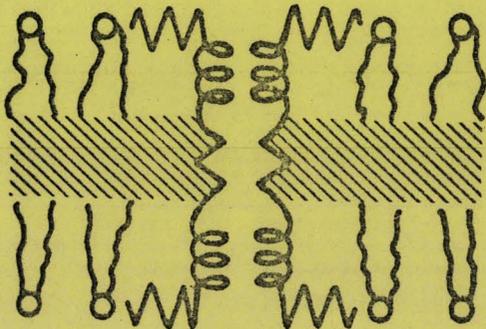
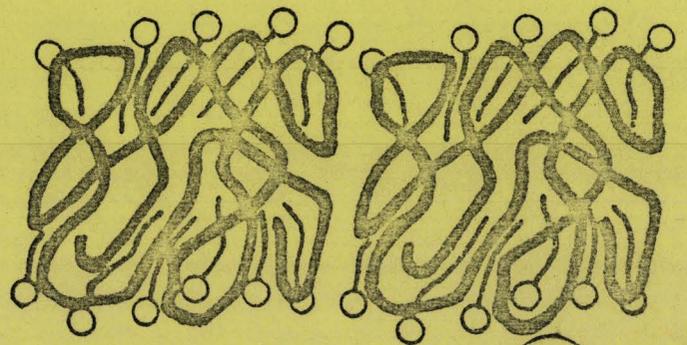


Figure 10

Structure de la membrane d'après LENARD et SINGER (1966)



BUS LILLE

Figure 11

Structure de la membrane d'après BENSON (1968)

environnement non polaire, c'est-à-dire au contact des lipides. Ceci permit à BENSON, 1968 (185) et à LENARD et SINGER, 1966 (186) de publier les modèles représentés par les figures 10 et 11 (p. 23).

E - LE CONCEPT DE LA DOUBLE COUCHE INTERROMPUE

Les données de diffraction des rayons X sur un grand nombre de membranes continuent à montrer un arrangement des lipides en feuillets bilamellaires, d'autre part, l'apparition des techniques de cryo-décapage montre après cassure de la membrane des molécules globulaires qui semblent être des protéines: BRANTON, 1969 (187).

L'idée d'une double couche de lipides interrompue par des protéines globulaires a été également suggérée par les études de diffraction des rayons X (WILKINS et al., 1971 (188) et également par l'étude des changements des paramètres membranaires après modifications expérimentales de la composition lipidique membranaire (COLEMAN et al., 1970 (189) ; FINEAM et al., 1971 (190). De telles études indiquent que 30 p. 100 de la couche lipidique existant à la surface de l'érythrocyte sont interrompus par du matériel non lipidique comme les protéines.

Les modèles récents de VANDERKOOI et GREEN, 1970 (191) et de ZAHLER, 1969 (192) tiennent compte de ces observations (voir les figures 12 et 13 (p. 25)).

L'importance sans cesse accrue des glycoconjugués membranaires et l'utilisation des phytohémagglutinines comme la concanavaline A permet à NICOLSON et SINGER, 1971 (193) de localiser les glycoprotéines à la surface de l'érythrocyte humain. De telles données permettent à ces mêmes auteurs d'établir en 1972 une structure de la membrane en "mosaïque fluide" SINGER et NICOLSON, 1972 (194). Ces auteurs admettent l'existence d'une structure "fluide" fondée sur une organisation mosaïque, dans laquelle des sous-unités ou des agrégats de sous-unités protéiniques globulaires, conjugués ou non à des glycannes, se répartissent d'une façon non ordonnée dans une couche bimoléculaire de lipides à l'état de cristal-liquide (état mésomorphe), et sont animés d'un mouvement translationnel dans les deux directions du plan de la membrane (figure 14 p. 25).

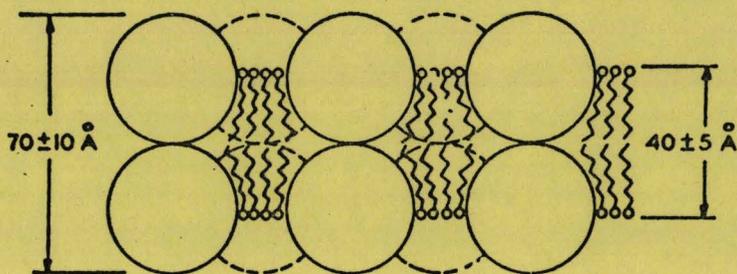


Figure 12

Structure de la membrane d'après VANDERKOOI et GREEN (1970)

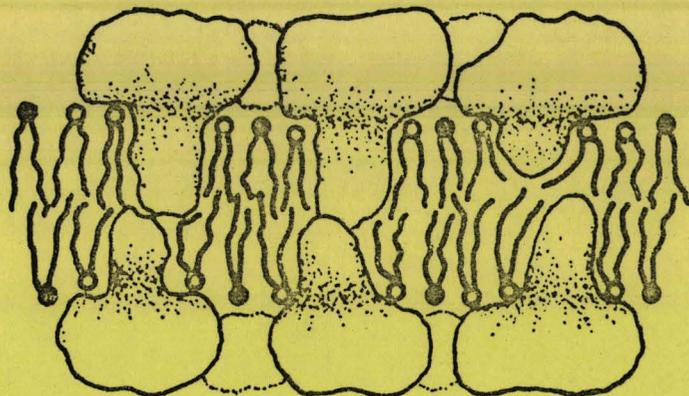


Figure 13

Structure de la membrane d'après ZAHLER (1969)

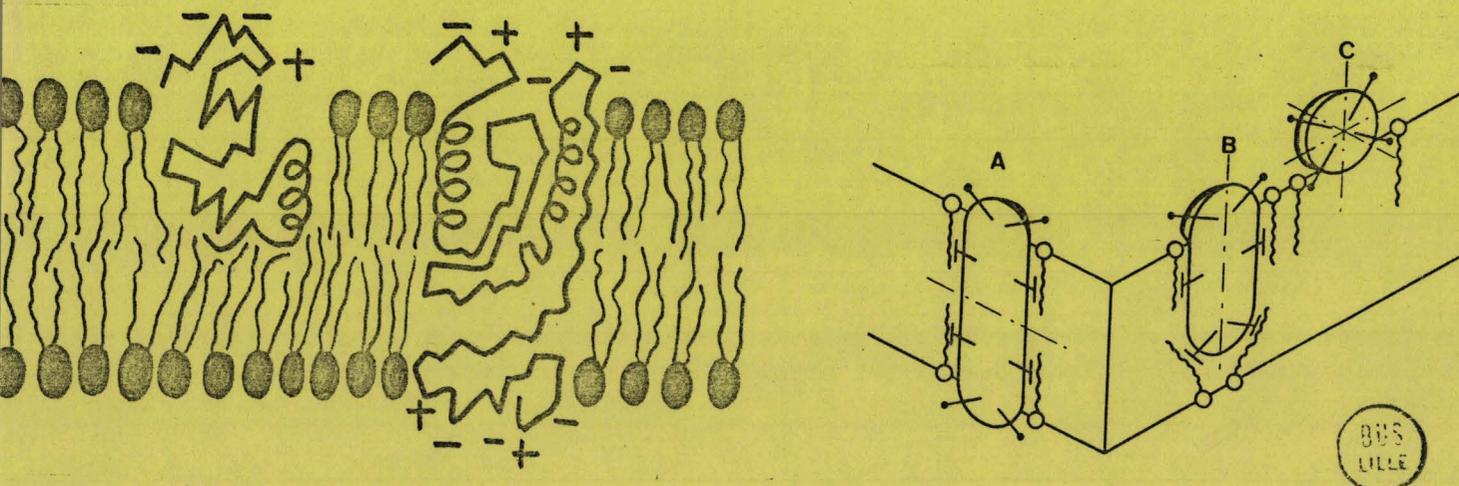


Figure 14

Structure de la membrane d'après NICOLSON et SINGER (1972)

- : Proteines intégrales possédant un axe de symétrie parallèle à la surface cellulaire ,
- : Proteines intégrales possédant un axe de symétrie perpendiculaire à la surface cellulaire,
- : Proteines périphériques possédant une symétrie sphérique

Dans ce schéma, les unités protéiniques et protéidiques ont leurs groupements hydrophiles disposés selon une symétrie pratiquement sphérique dans le cas des protéines extrinsèques, ou quasi symétrique par rapport à un axe parallèle (cas des protéines intrinsèques qui traversent la couche lipidique de part en part) ou perpendiculaire (cas des protéines intrinsèques amphipatiques) au plan tangent à la surface cellulaire. Elles contractent ainsi avec les lipides le maximum de liaisons hydrophobes et hydrophiles, et forment avec eux une organisation dont l'énergie libre est minimale.

F - CONCLUSIONS

Comme le montre FINEAM, 1972 (195) les recherches sur la structure moléculaire des membranes biologiques sont passées par un certain nombre d'étapes (voir figure 15 p. 27). Ceci ne signifie pas que le dernier modèle en date permet d'expliquer toutes les propriétés des membranes biologiques. En fait, la structure bimoléculaire rend compte de la structure de la myéline, la structure micellaire est proche de la structure mitochondriale, la structure en double couche interrompue explique parfaitement l'organisation des membranes des bâtonnets de la rétine, et la mosaïque fluide décrit celle de la membrane érythrocytaire. Dans le chapitre suivant, nous verrons rapidement quelles sont les conceptions actuelles de la structure moléculaire de quelques membranes biologiques.

IV - CONCEPTIONS ACTUELLES DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE

DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

A - LA MYELINE

La myéline est un enroulement autour d'un axe (représenté par l'axone) de la membrane plasmique de la cellule de SCHWANN. Cette structure "cristalline" permet de lui appliquer des techniques de diffraction des rayons X. Depuis 30 ans, la structure en feuillets bimoléculaires a été établie avec certitude.

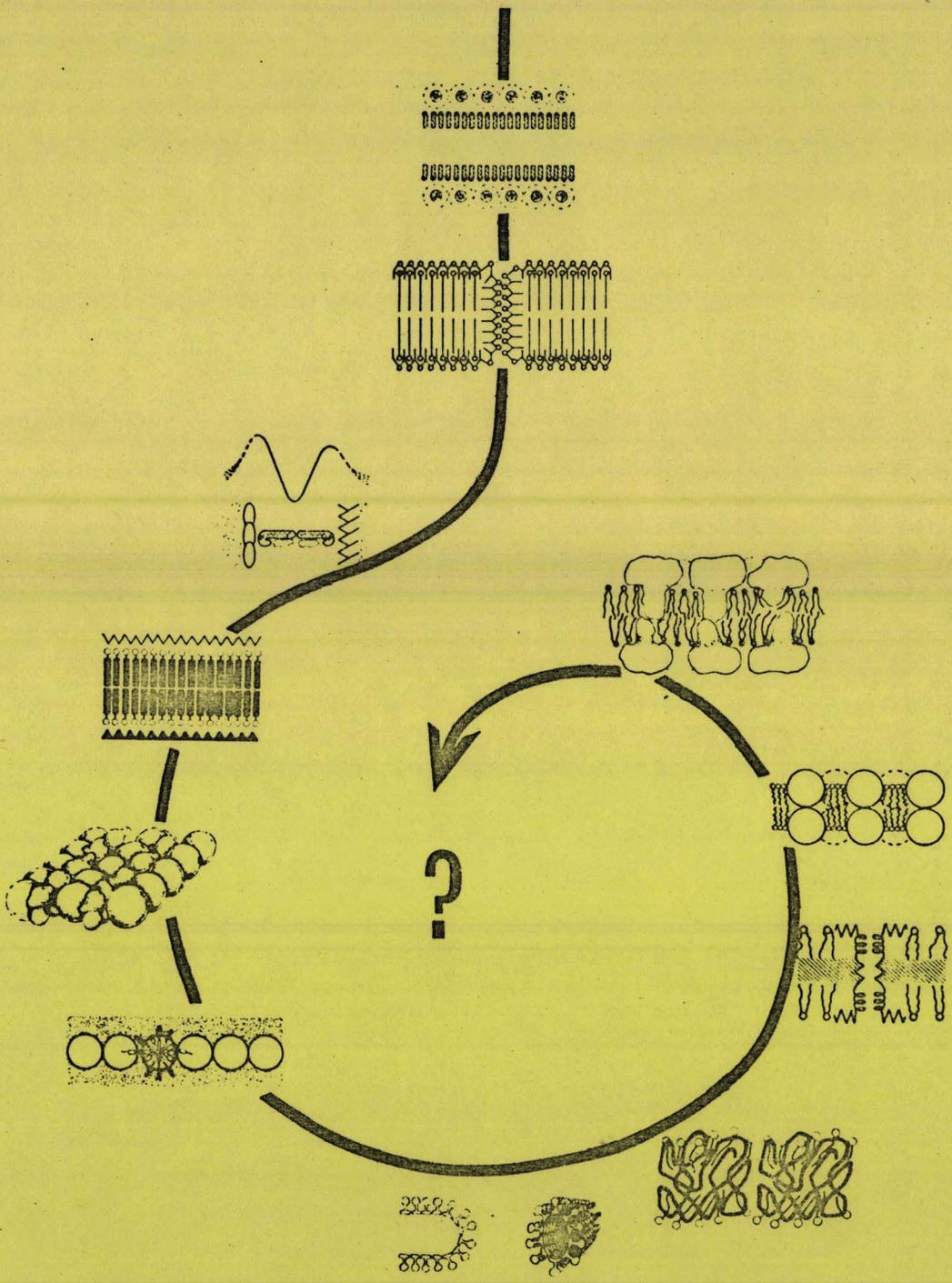


Figure 15

Diagramme montrant l'évolution des différents concepts concernant la structure des membranes biologiques d'après FINEAM

(1972)



Récemment, CASPAR et KIRSCHNER, 1971 (196) ont approfondi cette étude avec une résolution de 10 Å. Leur schéma représenté par la figure 16 (p. 29) confirme cette structure en feuillets, mais ils y ajoutent une asymétrie, en effet, le cholestérol est concentré uniquement sur le côté externe de la double couche. Cette structure en feuillets est retrouvée par MATEU et al., 1973 (197) en mélangeant la protéine basique (A₁) et des lipides extraits de la myéline. Le schéma de DANIELLI et DAVSON semble toujours valable pour ce type de membrane. Une structure plus fine sera sans doute donnée grâce à l'introduction de la diffraction des neutrons (PARSONS et AKERS, 1969 (198)).

B - LES MEMBRANES DES CELLULES EN BATONNETS DE LA RETINE

Le pigment visuel, la rhodopsine est localisé dans des disques membranaires empilés dans le bâtonnet rétinien. Cette structure quasi cristalline a permis d'appliquer également des techniques biophysiques, diffraction des rayons X (VANDERKOOI et SUNDARALINGAM, 1970 (199) ; WORTHINGTON, 1971 (200) ; BLAUROCK et WILKINS, 1969 (201). Ces expériences de fluorescence avec l'isothiocyanate de fluoresceïne : DRATZ et al., 1972 (202), les résultats représentés par la figure 17 (p. 29) montrent que dans tous les cas, il s'agit d'une double couche lipidique interrompue par les molécules de rhodopsine. Des modèles rhodopsine-lipide-eau étudiés en microscopie électronique et grâce à la diffraction des rayons X CHABRE et al., 1972 (203) permettent également l'élaboration de tels schémas.

C - LA MEMBRANE DES GLOBULES ROUGES

La membrane érythrocytaire a toujours été, à cause de la facilité de sa préparation et de sa relative simplicité, le matériel favori des biochimistes et des biophysiciens. Contrairement aux deux types de membranes étudiées précédemment, ce sont surtout des méthodes biochimiques qui ont permis d'étudier sa structure moléculaire.

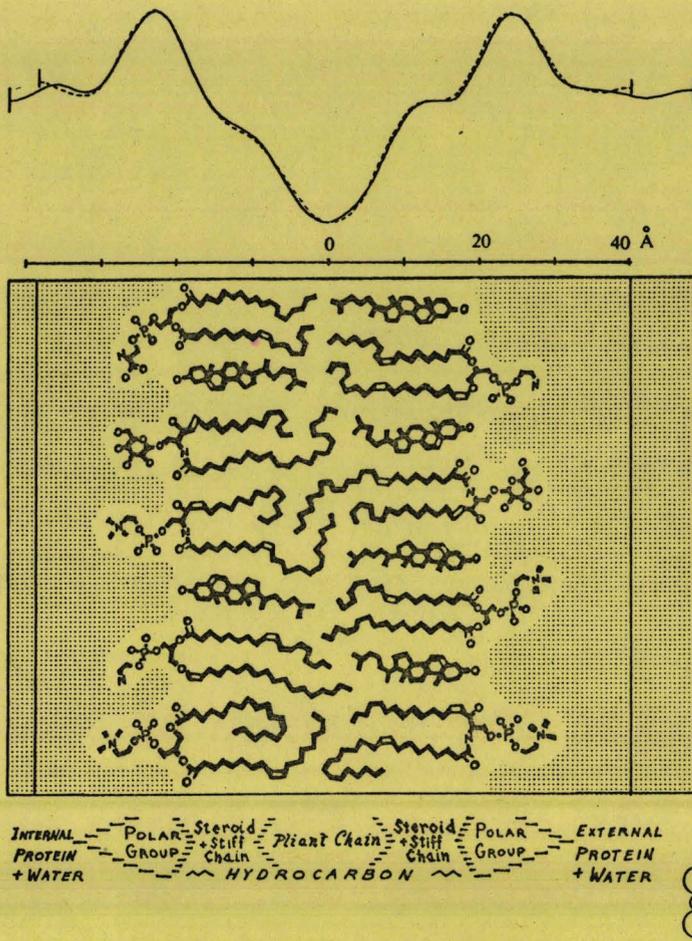


Figure 16

La membrane myélique d'après CASPAR et KIRSCHNER

La figure supérieure représente les profils de densité électronique de la myéline du nerf optique (pointillé) et sciatique (trait plein) de Lapin. Une portion de la membrane myélinique est schématisée dans la figure inférieure. La composition (6 cholestérols, 5 glycérophospholipides, 4 sphingolipides) correspond au rapport molaire trouvé pour la myéline des nerfs de mammifères. Un cristal de chlorure de sodium est représenté en bas à droite à la même échelle.

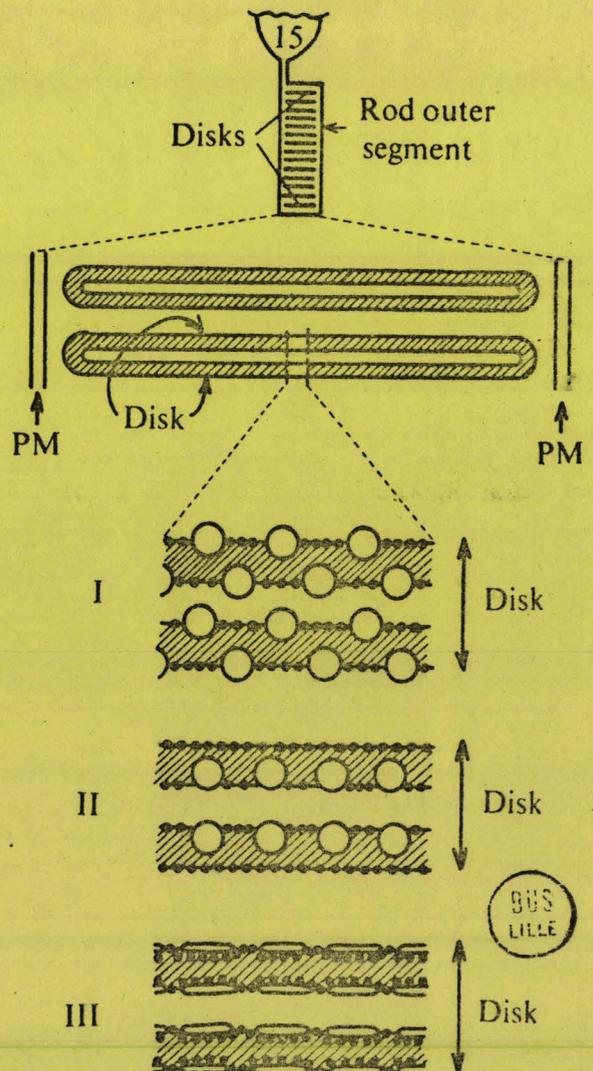
Figure 17

Les différentes structures possibles des membranes des bâtonnets rétiniens

I : Modèle de VANDERKOOI et SUNDARALINGAM (1970)

II : Modèle de WORTHINGTON (1971)

III : Modèle de DRATZ, GAW, SCHWARTZ et CHING (1972)



En particulier :

- l'introduction du SDS comme agent de solubilisation. Ce qui permet la séparation des protéines sur des gels de SDS-polyacrylamide SHAPIRO et al., 1967 (204) et après étalonnage du gel, le calcul des poids moléculaires WEBER et OSBORN, 1969 (205). On peut ainsi mettre en évidence entre autre : une protéine : le composant-a de poids moléculaire 100 000, la glycoprotéine majeure de poids moléculaire 55 000, la "tektine A" autre protéine ayant deux sous-unités α et α' ayant respectivement 220 000 et 240 000 de masse moléculaire.

- l'introduction de méthodes permettant de savoir si ces protéines sont localisées à l'extérieur ou à l'intérieur de la membrane. Ces méthodes sont de deux types enzymatiques, BENDER et al., 1971 (206) utilisent la pronase ne pénétrant pas à l'intérieur de la cellule, FAIRBANKS et al., 1971 (207) ; STECK et al., 1971 (208) font agir la trypsine, la chymotrypsine ou la pronase sur des vésicules membranaires normales (RO) ou inversées (IO) (STECK et al., 1970 (209) ; ou chimiques en utilisant des molécules non perméantes qui se fixent par liaisons covalentes aux protéines, il s'agit d'un composé fluorescent (stilbène-4-acétamido-4'-thiocyanodisulfonate ou SITS) MADDY, 1964 (210) ou de composés radioactifs : le diazobenzène sulfonate marqué au ^{35}S (BERG, 1969 (211), la formyl-méthionine-sulfone-méthyl-phosphate marquée au ^{35}S (FMMP) (BRETSCHER, 1971 (212) et plus récemment le phosphate de pyridoxal (RIFKIN et al., 1972 (213).

Ces techniques de protéolyse ou de marquage chimique, couplées avec le repérage sur gel de polyacrylamide de SDS ont permis de localiser dans les membranes des composés majeurs :

- le composant a de masse moléculaire 100 000 qui, après action de la pronase sur le globule rouge entier donne le composant c de masse moléculaire 70 000. Il est marqué par les composés radioactifs non perméants dans la cellule entière. Si on procède au marquage sur la membrane, un peptide supplémentaire est marqué, BRETSCHER, 1971 (214). Ceci permet de penser que le composant-a est une protéine largement pliée sur elle-même qui traverse entièrement la couche lipidique. (voir figure 18 p. 31).

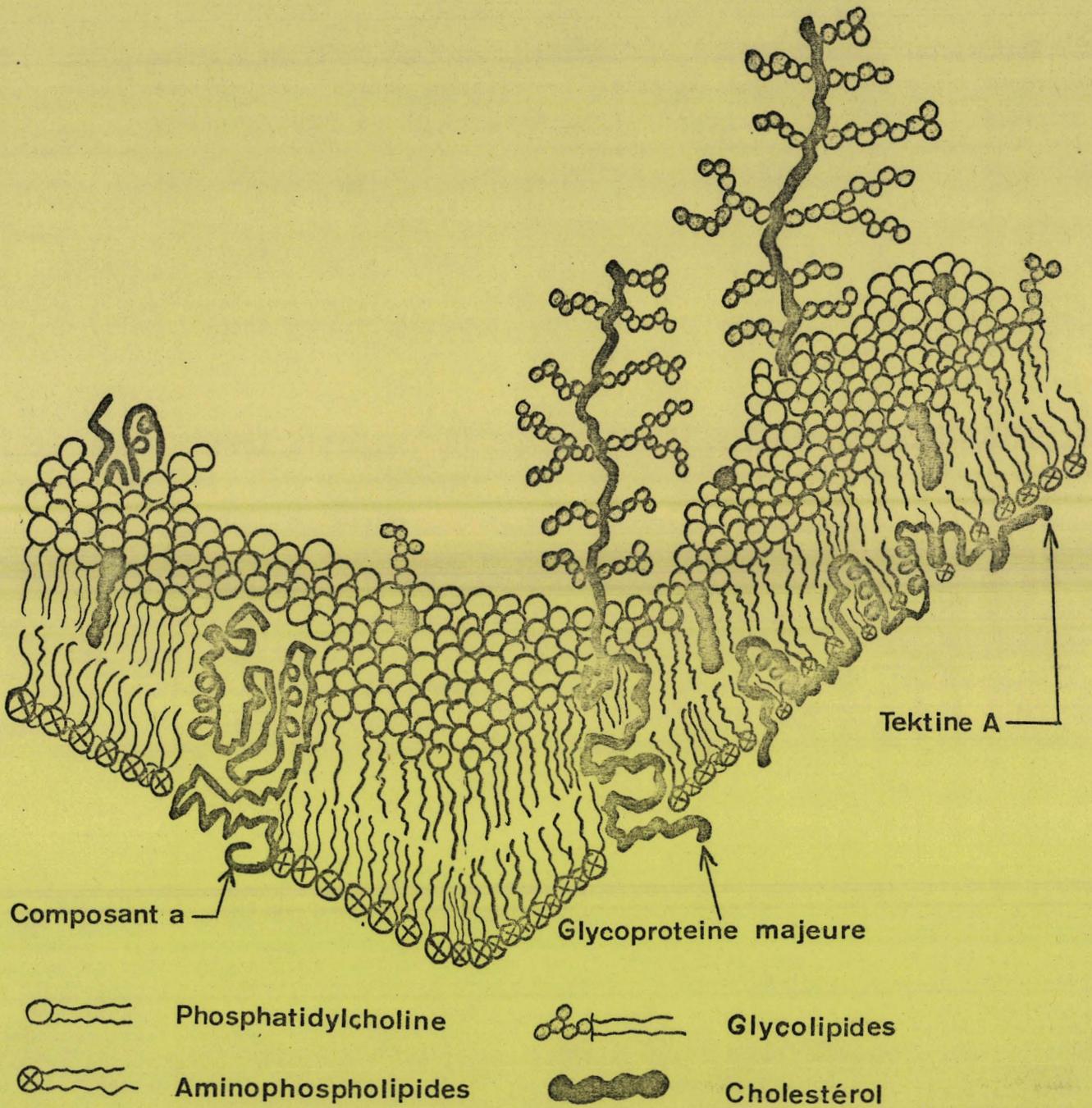


Figure 18

Conception actuelle de la structure de la membrane du globule rouge
d'après les données de BRETSCHER (1973)

- la glycoprotéine majeure ou glycophorine dont le caractère amphipathique a été mis en évidence par SEGREST et al., 1973 (215) contient 80 résidus d'acides aminés et 100 résidus de monosaccharides KATHAN et WINZLER, 1963 (216), et chaque cellule contient 7×10^5 copies de cette molécule BRETSCHER, 1971 (217) 80 p. 100 des glucides et 90 p. 100 des acides sialiques de la cellule sont détenus par cette glycoprotéine, WINZLER, 1969 (218). Les glycannes sont concentrés dans la région N-terminale riche en sérine et en thréonine. Cette région pouvant être attaquée par la trypsine, la région C-terminale riche en acides aminés hydrophobes (23 résidus) est touchée par des marqueurs radioactifs seulement si on utilise des membranes et non des cellules entières BRETSCHER, 1971 (219). Ceci prouve (voir figure 17 p.) que cette protéine également traverse la barrière lipidique mais que la partie glycanique est dirigée vers l'extérieur de la cellule. Ceci est également montré par des études de cryo-décapage MEYER et WINKELMANN, 1972 (220).

- la "tektine A" qui se présente sous la forme d'une molécule cylindrique de rapport axial de 45, ayant une longueur de 2 000 Å et une largeur de 30 Å CLARKE, 1971 (221). C'est une protéine soluble dans l'alcool à 80 p. 100 donc de caractère hydrophobe. Elle est insensible aux protéases sur la cellule entière, elle doit donc se présenter sur le côté interne de la membrane (voir figure 17 p.). Il y a $2,2 \times 10^5$ molécules de "tektine A" par cellule. Le marquage obtenu après l'action du FMMP ^{35}S sur les membranes érythrocytaires ressemble à celui obtenu avec la myosine du muscle squelettique de Lapin. Cette protéine serait une des protéines "myosine like" comme celle isolée de la membrane hépatocytaire du Rat par NEIFAKH et VASILETS, 1965 (222).

Du point de vue de l'organisation lipidique le schéma de la double couche interrompue est encore valable, mais le modèle est plus fluide. Les phospholipides sont animés de mouvements de diffusion latérale très rapide (10^{-6} sec) (KORNBERG et Mc CONNEL, 1971 (223)) et de mouvements d'inversion (flip-flop) très lents (6 heures) (KORNBERG et Mc CONNEL, 1971 (224)). Les phospholipides sont disposés de façon asymétrique, BRETSCHER, 1972 (225), la phosphatidyl-choline formant la moitié extérieure, et les amino-phospholipides la moitié intérieure de la double couche

Trois types d'expériences effectuées sur des globules rouges entiers tendent à prouver ce fait :

- les agents chimiques qui se fixent aux groupes aminés, comme le SITS ne se fixent pas aux phospholipides (KNAUF et ROHSTEIN, 1971 (226)).

- la migration électrophorétique des érythrocytes en fonction du pH est constante entre pH 4,5 et pH 11, ce qui ne montre aucun groupes aminés détectables (titrables à pH 10) BANGHAM et al., 1958 (227).

- la phospholipase A₂ qui hydrolyse la liaison ester de l'acide gras en 2 est efficace sur tous les érythrocytes sauf les érythrocytes d'herbivores ou la phosphatidyl choline est remplacée par la sphingomyéline TURNER et al., 1958 (228).

La structure de cette membrane de globule rouge sous forme de mosaïque fluide où les lipides disposés de manière asymétrique sont animés d'un mouvement de diffusion latérale et où les protéines traversent la double couche lipidique et peuvent être animées également de ce mouvement de diffusion latérale, est bien résumée dans la revue générale de BRETSCHER, 1973 (229).

D - CONCLUSIONS

Il semble que l'on puisse retirer quels faits généraux concernant la structure des membranes biologiques.

1) L'élément base de la membrane est une double couche lipidique avec de la phosphatidyl choline et des glycolipides sur la moitié externe et des phospholipides aminés sur la moitié interne. Il n'y a effectivement aucun mouvement d'échange au travers de la double couche, le mouvement de "flip-flop" étant très lent.

2) Quelques protéines traversent la double couche, quand il en est ainsi, elles possèdent des glycannes sur la partie dirigée à l'extérieur de la cellule.

3) Tout comme les lipides ne présentent pas de phénomène de flip-flop les protéines ne peuvent pas avoir de mouvements de rotation dans la membrane, mais, les mouvements latéraux ou de rotation dans le plan de la double couche sont possibles.

4) Les protéines membranaires sont généralement associées avec la moitié interne (cytoplasmique) de la membrane.

5) Il faut modifier ce schéma général en fonction de la membrane à laquelle on s'adresse : dans la myéline, l'asymétrie lipidique est due aux molécules de cholestérol, dans les membranes rétiniennes, les molécules de rhodopsine semblent se disposer régulièrement sur la double couche lipidique.

6) Pour compléter cette structure, il faut introduire la notion glycolemme et comprendre ses relations avec les glycoprotéines membranaires.

LES GLYCOPROTEINES DES MEMBRANES PLASMIQUES

I - NOTION DU GLYCOLEMME

La membrane qui délimite la cellule est appelée indifféremment par les auteurs : membrane de surface, surface cellulaire, zone périphérique ou membrane plasmique. On distingue généralement chez elle deux régions essentielles, d'ailleurs délimitées de façon quelque peu arbitraire : une zone externe hydrophile qui porte les noms de glycolemme, glycocalyx, "cell coat", "surface coat", "extraneous coat", "surface mucous coat", "mucilaginous coat", "filamentous ou fluffy coat", "fuzzy coat" ; et une zone interne plus hydrophobe nommée plasmolemme ou plasmalemme ou encore membrane plasmique. Nous avons rassemblé ces appellations dans la figure 19 (p. 35) d'après BLANQUET, 1973 (230).

La découverte des glucides au niveau d'une zone localisée sur la plasmolemme se confond avec celle de cette région. La présence d'osides à tout d'abord été détectée à la surface d'un certain nombre d'unicellulaires, notamment l'Amibe (BAIRATTI et LEHMAN, 1953 (231)). Plusieurs auteurs réunirent également des informations sur la nature de la surface des cellules de vertébrés, EASTY et al., 1960

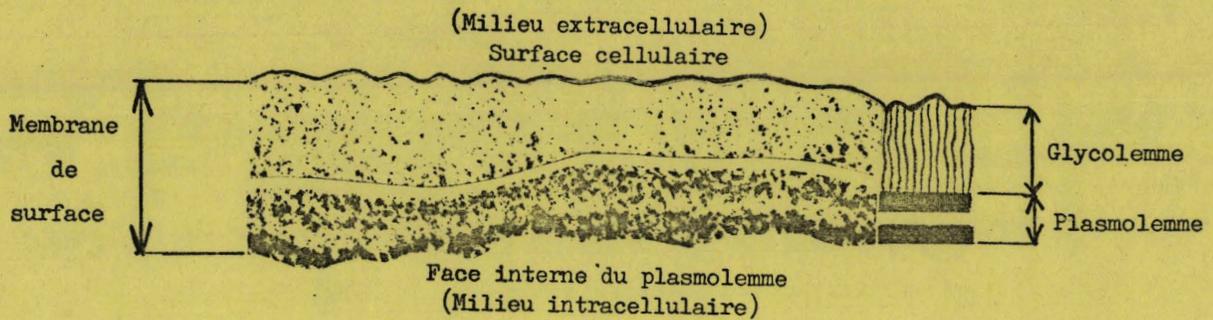
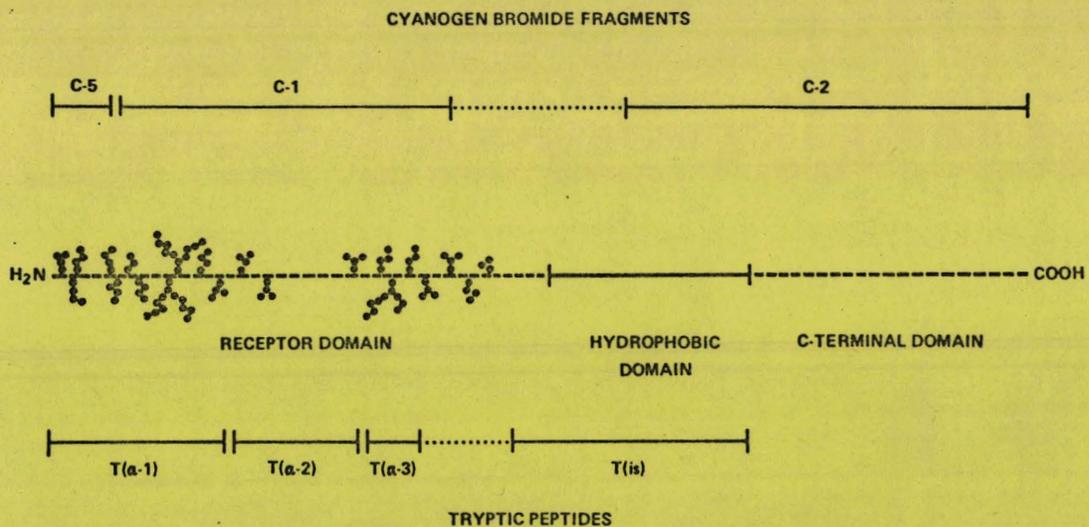


Figure 19

Structure de la membrane de surface

Relation ultrastructurale entre le glycolemme et le plasmolemme



Molecular topography of human erythrocyte glycophorin. The glycoprotein is represented as a single polypeptide chain. The general locations of carbohydrate side chains are schematically illustrated. Hydrophilic regions of the polypeptide backbone are represented by dashes and the hydrophobic domain by a solid line. The linear positions of peptide fragments (CNBr and tryptic) which have been determined are denoted by solid lines above and below the polypeptide chain. Dotted lines indicate alignment uncertainty.

Figure 20

Structure de la glycophorine d'après SEGREST, KAHANE, JACKSON

et MARCHESI (1973)



(232) par exemple montrèrent que la dissociation trypsique des cellules embryonnaires ou en culture éliminait une substance présentant les propriétés d'une mucine, d'autre part, LANGLEY et AMBROSE, 1964 (233) isolèrent un mucopeptide de la surface des cellules ascitiques de la tumeur d'Ehrlich.

Mais les preuves directes de l'existence d'un matériel polysaccharidique à la surface des cellules d'animaux supérieurs furent essentiellement obtenues par GASIC et BAYDAK, 1962 (234) ; SWIFT et ADAMS, 1962 (235) et GASIC et BEWICK, 1963 (236). Ces résultats incitèrent BENNETT, 1963 (237) à accorder une existence générale au "glycocalyx". Cette présomption était définitivement vérifiée par ROBERTSON, 1964 (238) et RAMBOURG et al., 1966 (239), quand le premier observe au microscope électronique une fine couche de matériel amorphe sur la plupart des cellules, et surtout quand les seconds colorèrent la périphérie d'une cinquantaine de cellules de Rat de types différents par la réaction de HOTCHKISS MAC-MANUS.

Les études sur le glycolemme se sont ensuite poursuivies avec l'utilisation de techniques plus fines : la microscopie à balayage qui montre la surface rugueuse des lymphocytes comparée à l'aspect lisse des cellules sanguines, CLARKE et SALSURY, 1967 (240), l'aspect des macrophages, CARR et al., 1968 (241), la surface des globules rouges, Mc DONALD et HAYES, 1969 (242) et celle des fibroblastes, BOYDE 1969 (243) et les aspects de la surface des éléments figurés du sang, SALSURY et CLARKE, 1969 (244), les techniques d'ombrage métallique, HILLIER et HOFFMAN, 1953 (245), la cytochimie adaptée au microscope électronique en particulier le rouge de ruthénium, LUFT, 1964 (246), l'hydroxyde de fer colloïdal, BLANQUET et al., 1970 (247), la ferritine directement conjuguée à un anticorps, SINGER et SCHICK, 1961 (248) ou le marquage par un anticorps hybride dont une valence est dirigée vers l'antigène du glycolemme, l'autre vers la ferritine, HÄMMERLING et al., 1968 (249) ou le virus de la mosaïque du tabac AOKI et al., 1971 (250) ou encore des anticorps anti-glycolemme conjugués à un haptène qui permet un système de double marquage LAMM et al., 1972 (251), ou des techniques de cryo-décapage surtout employées dans l'étude de la bordure en brosse de l'intestin de Souris, MUKHERJEE et STAEHELIN, 1971 (252).

II - RELATION ENTRE LE GLYCOLEMME ET LES GLYCOPROTEINES

MEMBRANAIRES

Les notions sur la structure moléculaire des membranes biologiques, en particulier l'intégration dans ces membranes des glycoprotéines, ont permis de faire l'analogie entre le glycolemme et la partie de la glycoprotéine qui se trouve à l'extérieur du plasmolemme, (PARSONS et SUBJECK, 1972 (253)) comme le montre la figure 19 (p. 35).

D'après WINZLER, le glycolemme ou "carbohydrate coat" est essentiellement constitué de sphingoglycolipides et de glycoprotéines.

Les glycolipides ont leur partie hydrophobe (le sphingolipide avec ses deux chaînes d'acides gras) enfoncée dans la double couche lipidique, tandis que la partie glycanique projette ses sucres à une distance de 25 Å environ de la surface.

On peut se représenter les glycoprotéines membranaires munies d'un axe formé par la partie protéique dont la zone hydrophobe plonge dans la matrice lipidique, tandis que les glycannes attachés de part et d'autre de cet axe forment le glycolemme (COOK, 1968 (254), WINZLER, 1970 (255)).

Ces protéines portent un grand nombre de molécules d'acides sialiques qui, en se repoussant, confèrent à la glycoprotéine une structure à rapport axial élevé, qui selon WINZLER, 1970 (256), formerait une couche de 125 Å d'épaisseur à la surface du globule rouge. En effet, récemment UHLENBRUCK et WINTZER, 1970 (257) ont comparé la mobilité électrophorétique de trois types d'érythrocytes traités par la pronase et par la neuraminidase avec le taux de glycolipides et de glycoprotéines de la membrane de surface et montrèrent : 1) qu'il existe des acides sialiques à plusieurs niveaux de profondeur dans le glycolemme ; 2) que les acides sialiques les plus superficiels appartiennent dans leur majorité à des glycoprotéines ; 3) et que les plus profonds sont détenus à la fois par des glycoprotéines et des glycolipides.

Cette technique permet également de déceler et de localiser certains glycosaminoglycannes chez plusieurs types cellulaires ; c'est ainsi que SUKUZU et al., 1970 (258) prouvèrent l'existence de chondroïtine sulfate A et C et de dermatane sulfate à la surface électrocinétique des fibroblastes L-929.

Le potentiel négatif de la surface électrocinétique avait été mis en évidence en étudiant la mobilité électrophorétique de cellules normales et cancéreuses. AMBROSE et al., 1956 (259), PURDOM et al., 1958 (260), FORRESTER et al., 1964 (261) et cette charge négative fut attribuée aux acides sialiques du plasmolème. Ces études ont été reprises avec des méthodes différentes : les systèmes aqueux biphasiques (dextran-polyéthylène glycol) qui séparent les particules suivant leur potentiel électrocinétique, (BROOKS et al., 1971 (262)). On peut ainsi séparer trois classes d'érythrocytes de Boeuf de coefficient de répartition différents et cédant des quantités différentes d'acide sialique quand on les traite à la neuraminidase ou à la trypsine (WALTER et al., 1972 (263)) ; l'électrofocalisation permet également de déterminer les groupes ionogéniques de surface, SHERBET et al., 1972 (264). On met ainsi en évidence des groupements phosphorylés, des acides sialiques et des groupements aminés.

Mais la charge électrique principale du glycolème est due aux groupements carboxyliques de l'acide sialique. Cette teneur du glycolème en acide sialique permet d'ailleurs de séparer des cellules très semblables comme des lymphocytes thymus-dépendent des lymphocytes thymus-indépendant. NORDLING et al., 1972 (265) alors que ces deux lignées cellulaires ont la même mobilité électrophorétique après action de la neuraminidase.

III - STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

A - METHODES D'ETUDES

L'étude des glycoprotéines de la membrane de surface a été abordée de deux façons : directement en réalisant une extraction en général suivie d'une filtration sur gel ; ou indirectement en traitant des cellules isolées ou des membranes par certains enzymes protéolytiques de manière à obtenir des fragments glycopeptidiques

de faible poids moléculaire facilement isolables. Nous envisagerons tour à tour ces deux solutions.

1 - Isolement des glycoprotéines

a - Solubilisation

Un grand nombre de méthodes ont été employées pour solubiliser les protéines membranaires : des solvants hydrophiles : le K_2CO_3 0,05 M pour les membranes plasmiques d'hépatocyte du Rat (NEVILLE, 1967 (266)), le chlorhydrate de guanidine 6 M GWINNE et TANFORD, 1970 (267), le chlorhydrate de guanidine 6 M après réduction et alkylation des ponts disulfures STECK, 1972 (268), l'Hcl dilué SCHIECHL, 1973 (269) pour les membranes érythrocytaires ; des solvants à caractère plus ou moins hydrophobes : le 2-chloroéthanol pour les membranes des cellules ascitiques d'Ehrlich (ZÄHLER et WALLACH, 1967 (270)), les solutions aqueuses de pyridine pour les stroma érythrocytaires (BLUMENFELD, 1968 (271)) et BLUMENFELD et al., 1970 (272) ou pour les membranes d'hépatocytes du Rat, GURD et al., 1972 (273), l'extraction par le n-butanol, MADDY, 1964 (274) et 1966 (275) ainsi que par le n-pentanol, ZWAAL et VAN DEE--NEN, 1968 (276) sont également employées. Les détergents ont été très utilisés, qu'ils soient anioniques comme le SDS souvent associé au 2-mercapto-éthanol (GLOSSMAN et NEVILLE, 1971 (277)), le déoxycholate de sodium, PHILIPPOT, 1971 (278) ; ALLAN et CRUMPTON, 1971 (279) ou neutres comme le triton X 100 (MILLER, 1970 (280)) ; HELENIUS et SÖDERLUND, 1973 (281) ; WAEHNELDT et al., 1971 (282), le NP-40 (DAUTIGNY et al., 1973 (283) ou le Tween 20 (HJERTEN et JOHANSSON, 1972 (284)). Des mélanges comme le système phénol-acide acétique-urée (TAKAYAMA et al., 1966 (285) sont aussi efficaces. Des solubilisations peuvent s'effectuer par modification chimique : la succinylation MOLDOW et al., 1972 (286), par action de l'anhydride citraconique BUSTIN et al., 1972 (287). Une solubilisation des glycoprotéines de l'érythrocyte peut se faire par le diiodosalicylate de lithium 0,3 M MARCHESEI et al., 1971 (288). Les agents physiques comme le sonnage ont été employés dans certains cas BARCLAY et al., 1972 (289) mais il ne s'agit pas dans ce cas d'une solubilisation à proprement parler, en effet, il n'y a pas de séparation des composants lipidiques et protéiques, les auteurs obtiennent dans ce cas des lipoprotéines de densité élevée.

b - Séparation

Quand les protéines et les glycoprotéines membranaires sont solubilisées, il se pose le problème de leur séparation. Cette séparation peut se faire par électrophorèse en gel de polyacrylamide, par chromatographie de tamisage moléculaire ou d'échange d'ions, mais aussi par chromatographie d'affinité.

Le problème de la séparation de ces protéines est leur tendance à l'agrégation dès que la concentration en agent dissolvant diminue, en effet, la reconstitution de structure, "membrane like" par réagrégation des composés solubilisés par des détergents après une dialyse qui enlève l'excès de SDS a très tôt attirer l'attention (KUSHNER, 1969 (290)) ou KAHANE et RAZIN, 1971 (291) sur les membranes d'Acholeplasma laidlawii. Le même phénomène peut se produire pour les membranes de Bacillus subtilis (JOYEUX et JOUIN, 1970 (292)) pour les membranes excitables CHANGEUX et al., 1972 (293) et pour toutes les biomembranes (voir à ce sujet la revue générale de RAZIN, 1972 (294)). Il faut donc pratiquement toujours travailler au dessus de cette concentration critique en agent dissolvant.

Le premier système de séparation électrophorétique acrylamide-SDS utilisé pour séparer les protéines membranaires est dû à SHAPIRO et al., 1967 (295) cette technique s'est développée par suite grâce à de nombreux auteurs : WEBER et OSBORN, 1969 (296) ; GLOSSMAN et LUTZ, 1970 (297) ; GRULA et SAVOY, 1971 (298) ; NEVILLE, 1971 (299). Ce système possède un pouvoir séparateur très élevé, pouvoir séparateur qui d'ailleurs peut encore être augmenté en travaillant en électrofocalisation sur gel de polyacrylamide après dissolution des membranes dans un mélange d'urée 8 M, EDTA 0,02 M, 2-mercapto-éthanol à 0,2 p. 100 (MERZ et al., 1972 (300)). Mais cette méthode est purement analytique et ne permet que la préparation de quantité réduite de protéine. Pour une préparation en quantité plus importante permettant une étude structurale plus poussée, les auteurs emploient généralement la chromatographie de tamisage moléculaire.

Un des premiers gels employés a été le Sephadex LH 20 avec comme solvant le mélange 2-chloro-éthanol-eau. ZAHLER et WALLACH, 1967 (301). La séparation lipides-protéines est excellente, mais il n'y a aucune séparation des protéines entre elles. Actuellement, l'emploi de gels comme le Sephadex G 200 en présence de désoxycholate à 1 p 100, le Sepharose 6 B en présence de SDS, le Sepharose 4 B élué avec une solution de SDS à 1 p. 100, permettent un fractionnement plus ou moins grossier des protéines et des glycoprotéines membranaires. En fait, cette méthode a permis à EVANS et GURD, 1973 (302) d'isoler la 5' nucléotidase des membranes plasmiques d'hépatocytes de Souris. La préparation de cette glycoprotéine s'est effectuée grâce à l'emploi du Sephadex G 100 équilibré avec le détergent qui a servi à dissoudre les membranes : le N-dodécyl-sarcosinate 0,25 p. 100.

L'emploi de la chromatographie d'échange d'ions permet une séparation qui est généralement meilleure, bien que cette méthode soit peu répandue. Un des premiers essais est la chromatographie sur résine anionique lipophile obtenue en fixant sur une résine polyacrylique acide des amines aliphatiques (butyl, capryl, lauryl, palmityl-amine), ce type de résine a permis à WEISS et BUCHER, 1970 (303) de séparer les protéines mitochondriales (solubilisées dans du cholate et du désoxycholate de sodium). La purification de la glycophorine s'effectue grâce à une chromatographie sur phosphocellulose, MARCHESI et ANDREWS, 1971 (304). Plus récemment la DEAE cellulose é été employée pour séparer les protéines du réticulum sarcoplasmique HASSELBACH et MIGALA, 1972 (305). La chromatographie s'effectue en présence de Triton X-100 0,2 p. 100.

La chromatographie d'affinité bien que récente dans ses applications a donné des résultats beaucoup plus importants. Cette technique dérive de l'observation de CUATRECASAS, 1969 (306) sur le récepteur de l'insuline des membranes des cellules adipeuses : la fixation hormone-récepteur n'est pas modifiée quand celle-ci est fixée de façon covalente sur des grains d'agarose. En fixant ainsi un effecteur de la protéine à isoler sur des supports insolubles, plusieurs protéines ont pu être isolées; la protéine liant la pénicilline dans des membranes de Bacillus subtilis

(séparation effectuée en présence d'un détergent : le Nonidet P-40) (BLUMBERG et STROMINGER, 1972 (307) ; le récepteur de l'acétylcholine dans l'électroplaque de poissons électriques (KARLSSON et al., 1972 (308) ; OLSEN et al., 1972 (309) ; SCHMIDT et RAFTERY, 1972 (310) ; SCHMIDT et RAFTERY, 1973 (311) ; RAFTERY, 1972 (312) en présence de Triton X-100 ; l'acétylcholinestérase des membranes de l'organe électrique de Gymnote DUDAI et al., 1972 (313) ; le récepteur adrénérgique bêta du myocarde de Chien LEFKOWITZ et al., 1972 (314). L'utilisation des lectines dans l'étude des glycoprotéines membranaires en particulier de concanavoline A, permet après fixation de celle-ci sur la Sepharose 4 B d'isoler les glycoprotéines des membranes plasmiques de lymphocytes de Porc, la chromatographie s'effectuant en présence de désoxycholate de sodium. ALLAN et al., 1971 (315), ALLAN et al., 1972 (316). Des glycoprotéines de membrane virale sont isolées après fixation sur Sepharose 4 B de la phytohemagglutinine de Lens culinaris, HAYMANN et al., 1973 (317).

2 - Isolement de glycopeptides

a - Protéolyse

De nombreux agents protéolytiques ont été employés dans le but de détacher des glycopeptides de la surface cellulaire.

La trypsine fut d'abord employée sur les cellules ascitiques d'Ehrlich (LANGLEY et AMBROSE, 1964 (318) et par OHKUMA et IKEMOTO, 1966 (319)) on libère ainsi un sialoglycopeptide de la surface du globule rouge, le traitement des érythrocytes humains à la trypsine libère en effet des sialoglycopeptides possédant des spécificité M ou N de la cellule d'origine WINZLER et al., 1967 (320) ; THOMAS et WINZLER, 1969 (321). La trypsine fut également employée par BARBER et JAMIESON, 1971 (322) pour isoler des glycopeptides de la surface des plaquettes sanguines, et par CODINGTON et al., 1972 (323) pour isoler les peptides du glycoleme des cellules TA₃. La trypsine donne également de bons résultats sur les membranes isolées de foie de Rat, EMMELOT et BOS, 1972 (324). L'action de la trypsine peut être suivie d'une hydrolyse par la pronase comme, par exemple, pour étudier les glycopeptides de surface des cellules BHK₂₁/C 13 (BUCK et al., 1970 (325), BUCK et al., 1971 (326), WARREN et al., 1972 (327), WARREN et al., 1973 (328).

La pronase est utilisée pour libérer des glycopeptides de fractions membranaires de fibroblastes de Souris 3T3, MEEZAN et al., 1969 (329) ou de foie de Rat, MIYAJIMA et al., 1970 (330), ou de cerveau de Rat, GOMBOS et al., 1972 (331). Ces auteurs font d'ailleurs suivre son action par celle d'une carboxypeptidase et d'une leucine aminopeptidase.

La papaïne est utilisée par la libération des alloantigènes d'histocompatibilité-2 (H - 2) chez la Souris par MURAMATSU et NATHENSON, 1970 (332), et 1971 (333), ou par SMITH et WALBORG, 1972 (334) pour libérer des sialoglycopeptides de l'hépatome ascitique AS - 30 D.

La ficine a été employée par EBERT et al., 1971 (335) pour les glycoprotéines érythrocytaire et la chymotrypsine par BARBER et JAMIESSON 1971 (336) pour libérer un macroglycopeptide des membranes de plaquettes sanguines.

b - Séparation des glycopeptides

Les glycopeptides étant des composés solubles, leur isolement pose beaucoup moins de problèmes que celui des glycoprotéines. La séparation peut s'effectuer de différentes manières, par électrophorèse, chromatographie de tamisage moléculaire ou d'échange d'ions ou enfin par chromatographie d'affinité.

L'électrophorèse sur papier a été employée par MIYAJIMA et al., 1970 (337) et les méthodes de disc-électrophorèse en gel de polyacrylamide peuvent être employées comme critère de pureté.

La filtration sur gel est toujours employée dans un premier temps que ce soit les Sephadex, les Biogels, les gels d'agarose. On est revenu avec ces techniques au fractionnement classique des glycopeptides, comme d'ailleurs avec la chromatographie d'échange d'ions, qui s'effectue en général sur une colonne de DEAE cellulose.

La méthode de chromatographie d'affinité est, pour résoudre ces problèmes, une méthode de choix car les lectines ou phytohemagglutinines agissent sur les unités saccharidiques des glycoprotéines de surface de nombre de cellules. Comme dans ce cas le problème de solubilité et de concentration en détergent ne se pose plus, la chromatographie s'avère beaucoup plus facile. La plupart des glycopeptides isolés de membranes possèdent en effet une forte activité de récepteur de ces lectines. Un des glycopeptides tryptiques d'érythrocytes humaine est un puissant inhibiteur hapténique de la phytohemagglutinine de Phaseolus vulgaris (KORNFELD et KORNFELD, 1970 (338) et de Lens culinaris KORNFELD et al., 1971 (339) et de Robinia pseudoaccacia LESENEY et al., 1972 (340), tandis qu'un autre glycopeptide tryptique est le récepteur de la lectine de Agaricus bisporus. Les cellules leucémiques de Souris possèdent une glycoprotéine ayant une activité de récepteur de l'agglutinine du germe de blé (WGA) (JANSONS et BURGER, 1973 (341). Des glycopeptides de la surface de cellules hépatomateuses de Rat obtenus par digestion à la papaïne possèdent les deux activités de récepteur pour la concanavoline A et l'agglutinine du germe de blé (WRAY et WALBORG, 1971 (342) ; SMITH et al., 1973 (343) ; NERI et al., 1973 (344). L'utilisation de ces produits a permis à GOMBOS et al., 1972 (345) d'isoler les glycopeptides fixant la concanavoline des membranes de cerveau de Rat ceci en éluant ceux-ci par l' α -méthyl-mannoside.

B - STRUCTURES MOLECULAIRES

1 - La glycoprotéine majeure du globule rouge

L'étude de la structure a été faite après isolement de cette glycoprotéine par MARCHESI et al., 1971 (346). Les coupures aubromure de cyanogène ont permis de séparer 5 fragments. SEGREST et al., 1973 (347). On peut diviser la molécule en trois parties du point de vue de leur composition en acides aminés et en glucides, ce sont : le segment N-terminal riche en sucres (tous les glycanes sont portés par cette région), la région centrale avec 30 résidus hydrophobes (qui entre en relation avec la double couche lipidique). La région N-terminale hydrophile et riche en proline. Ces données sont résumées dans la figure 20 (p. 35). La partie N-terminale a permis d'étudier la structure de la partie glucidique.

Une partie des glucides (30 à 40 p. 100) associée au sialoglycopeptide est détachée par traitement au borohydrure alcalin KATHAN et ADAMANY, 1967 (348) et WINZLER et al., 1967 (349). Toute la galactosamine est détruite durant ce traitement et une quantité équimoléculaire de sérine et de thréonine disparaît également. Un tétrasacharride a été isolé, et sa structure déterminée (THOMAS et WINZLER, 1969 (340)^{*} ; ADAMANY et KATHAN, 1969 (341)^{*}), elle est représentée par la figure 21 (p. 46 glycopeptide A). L'étude de la structure des glycannes attachés par des liaisons alcali-stables à la protéine a été plus longue. L'étude d'un de ces glycopeptides effectuée grâce à des glycosidases a permis d'établir la structure représentée par la figure 21 (p. 46 : glycopeptide B) (KORNFELD et KORNFELD, 1970 (342)^{*}. WINZLER, 1972 (343)^{*} propose un autre schéma : voir figure 21 (p. 46) : glycopeptide C)

Donc la glycophorine présente cette double particularité, elle a une structure amphipathique (asymétrie du point de vue de l'hydrophilie) et possède des glycannes ayant des liaisons O-glycosidiques, et des glycannes ayant des liaisons N-glycosidiques sur la même chaîne protéique.

2 - Les glycoprotéines membranaires d'autres cellules

Aucune structure de glycoprotéine n'est connue aussi bien que celle de la glycophorine. CODINGTON et al., 1972 (344)^{*} ont isolé récemment par action du mélange trypsine-TPCK sur les cellules TA₃ des glycopeptides de masse moléculaire élevée (88 000 et 180 000) dont 65 p. 100 des résidus d'acides aminés sont de la sérine et de la thréonine. Ce glycopeptide est composé de 70 p. 100 de glucides et 30 p. 100 de protéines et les quatre mono-saccharides : galactose, N-acétyl galactosamine, N-acétyl-glucosamine et acide sialique, sont dans les rapports molaires suivants : 4 : 2 : 1 : 1. Ce fragment de glycoprotéine formant le glycoleme des cellules TA₃ semble de type mucine et JEANLOZ, 1972 (résultats non publiés) donne pour la partie glycanne la structure hypothétique illustrée par la figure 22 (p. 46). La glycoprotéine totale aurait une taille de 2 000 Å et une configuration avec un rapport axial élevé à cause de la répulsion des acides sialiques. Des glycoprotéines de type mucine ont aussi été trouvées à la surface de cellule hépatome ascitique AH 66 par YAMASHINA et al., 1973 (345)^{*}.

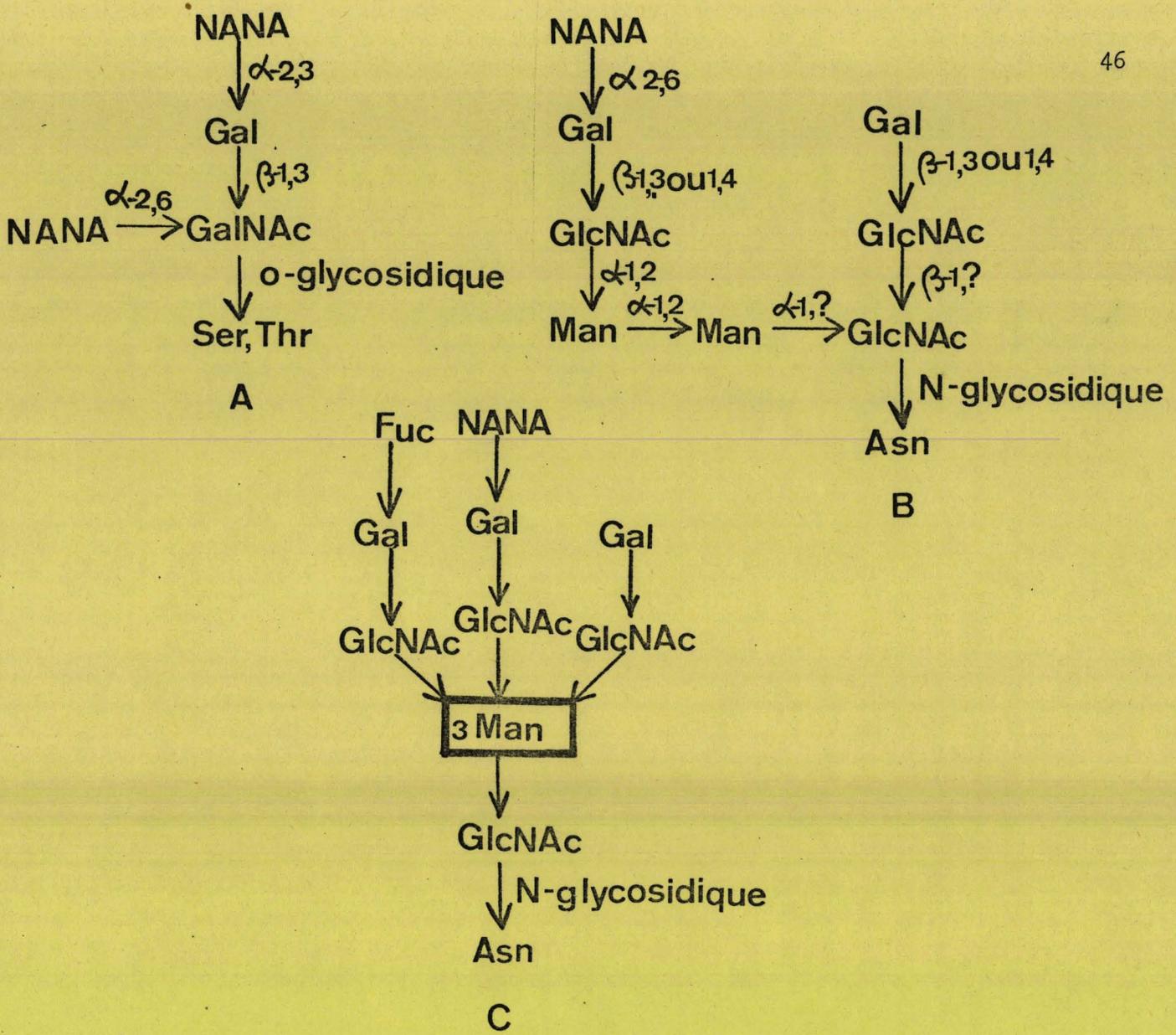


Figure 21

Structure des glycanes des glycopeptides tryptiques de la glycoprotéine majeure des membranes érythrocytaires

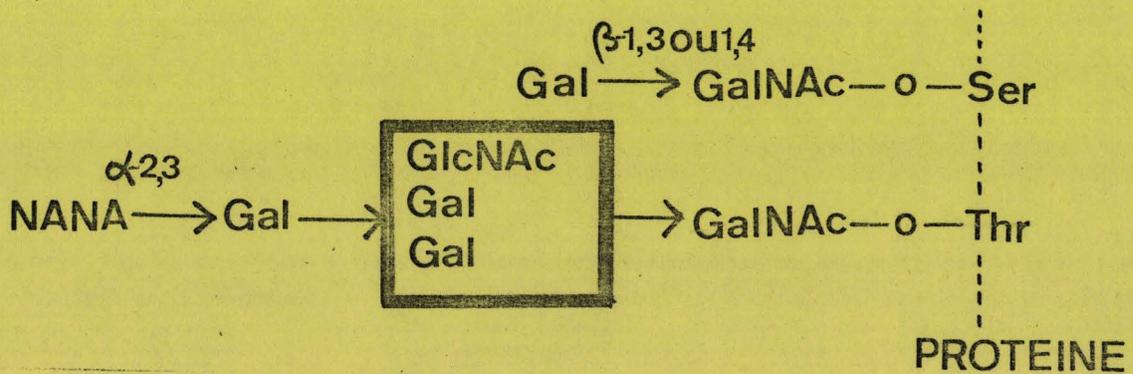


Figure 22

Structure hypothétique des glycanes isolés de la glycoprotéine de surface des cellules TA₃ d'après JEANLOZ (1972)



IV - METABOLISME DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

Les glycoprotéines membranaires sont des composés à métabolisme très actif. Ceci a été démontré par GASIC et GASIC, 1962 (346)* qui, en enlevant les glucides de la surface des cellules tumorales TA₃ avec la trypsine, notent que la régénération (mesurée par la réapparition de la coloration de HALE) s'effectue en 1 à 2 heures. Le remplacement de l'acide sialique de la membrane après un traitement à la neuraminidase a une demi-vie de 4 h et s'effectue complètement en 12 à 20 h (MARCUS et SCHWARTZ, 1968 (347)*). La densité de surface des groupements sialosyls des cellules de Hamster chinois est fortement réduite après traitement à la neuraminidase, et récupère son taux primitif en 12 à 16 heures même quand la division cellulaire est inhibée par la thymidine ou l'actinomycine D. Une perte continue de matériel membranaire s'effectuant corrélativement à une incorporation importante de glucosamine ¹⁴C dans les glycoprotéines a été observée par KRAEMER, 1966 (348)* et MOLNAR et al., 1965 (349)*. Ces observations indiquent que les membranes plasmiques des cellules sont métaboliquement actives avec un "turn-over" rapide.

WARREN et GLICK, 1968 (350) ont abordé le problème du "turn-over" de membranes plasmiques en incubant des cellules L avec de la glucosamine marquée. Quand les cellules en croissance sont soumises à des expériences de chasse isotopique, l'activité spécifique de la membrane diminue au taux théorique dû à la croissance et à la multiplication cellulaires - il n'y a pas de turn-over au sens de perte isotopique à partir de la membrane -. Cependant des cellules en phase stationnaire soumises aux mêmes expériences ont leur activité spécifique qui diminue à la même vitesse que celle des cellules en pleine croissance. Ceci revient à dire que des cellules : qu'elles soient en phase de croissance ou non, synthétisent la même quantité de glycoprotéines membranaires. Cette interprétation rejoint celle de KRAEMER, 1967 (351) et MOLNAR, et al., 1965 (352) qui trouvent que des cellules ascitiques qui ne sont pas en phase de croissance rejettent continuellement dans le milieu des macro-molécules nouvellement synthétisées, contenant des glucides et dont la composition ressemble aux glycoprotéines de la surface érythrocytaire. Ces résultats ont été retrouvés par HUGHES et al., 1972 (353) pour la régénération des glycoprotéines de surface des cellules d'une tumeur transplantable de Souris.

L'étude du métabolisme des membranes plasmiques d'hépatocytes du Rat a également abouti au même résultat. KAWASAKI et YAMASHINA, 1971 (354) montrent qu'après injection de glucosamine ^{14}C les membranes plasmiques atteignent une radioactivité spécifique maximale en 3 heures, la période de demi-vie étant de 37 heures, résultat confirmé par EVANS et GURD, 1971 (355). Ces mêmes auteurs ont montré récemment que chez la Souris les glycoprotéines de haut poids moléculaire de la membrane hépatocytaire étaient plus rapidement marquées que des protéines de poids moléculaire plus faible (GURD et EVANS, 1973 (356)).

Le problème de la biosynthèse des glycoprotéines est encore loin d'être résolu. On pense généralement que les glycoprotéines membranaires sont une classe spéciale de glycoprotéines sécrétées, c'est-à-dire qu'elles sont synthétisées par des polysomes liés aux membranes ergastoplasmiques, puis glycosylées dans le réticulum endoplasmique et le Golgi. En effet, les cinétiques de marquage par la glucosamine ^{14}C montrent que les microsomes sont marqués de façon maximale au bout de 1,5 heure, alors que les membranes plasmiques ont une radioactivité maximale au bout de 3 heures KAWASAKI et YAMASHINA, 1971 (357). D'après BRETSCHER, 1973 (358), il n'en est rien, les protéines membranaires seraient une classe spéciale de protéines cytoplasmiques, synthétisées par des polysomes libres. Ces protéines traverseraient la membrane par diffusion à partir du cytoplasme, la protéine serait maintenue dans cette situation par glycosylation du côté N-terminal de la molécule. Cet auteur se fonde sur deux exemples : la lactose perméase synthétisée par l'opéron lactose de *Escherichia Coli* avec des ribosomes cytoplasmiques, et les anticorps 7 S à la surface des lymphocytes B qui présentent également la même situation dans la membrane.

Les facteurs contrôlant la vitesse de la biosynthèse et le turn-over des glycoprotéines membranaires ne sont pas encore connus.

V - CONCLUSIONS : IMPORTANCE DES GLYCOPROTEINES DES MEMBRANES DE SURFACE

Les glycoprotéines ont une importance capitale à la surface de la cellule: un grand nombre de fonctions leur sont attribuées ; antigènes de la surface cellulaire, récepteurs de virus, rôle dans la transformation cellulaire, rôle dans la reconnaissance cellulaire, rôle dans la liaison des glycoprotéines plasmatiques récepteur d'hormone, rôle catalytique.

On a très tôt trouvé l'activité M et N de la glycoprotéine majeure du globule rouge. La distribution des antigènes érythrocytaires entre les régions hydrophile et hydrophobe de la membrane a été bien résumée par PARDOE, 1971 (359) (voir le tableau IV p. 50).

Les déterminants antigéniques de la région hydrophile des membranes érythrocytaires humaines dépendent de la structure des glycoprotéines de la membrane érythrocytaire comme le montre la figure 23 (p. 51) d'après PARDOE, 1971 (361). Récemment, GARDAS et KOSCIELAK, 1973 (362) ont trouvé des substances de groupes sanguins ABH portés par des glycoprotéines membranaires d'érythrocytes humains. D'autres antigènes sont également importants, en particulier les antigènes de transplantation, antigène H₂ chez la Souris solubilisé par autolyse de cellule de rate ou de lymphome de Souris et qui contiennent 10 à 15 p. 100 de sucres NATHENSON et DAVIES, 1966 (363), antigène HLA chez l'homme préparé à partir de membrane de plaquettes sanguines (DAUTIGNY et al., 1973 (364)).

L'activité de récepteur de virus est également très importante. En 1942 HIRST (365) montre que des érythrocytes de poulet sont agglutinés par le virus de l'influenza, Le virus semble se fixer aux acides sialiques des récepteurs de deux cellules adjacentes produisant ainsi une hemagglutination. Cette activité de récepteur de virus est portée par les glycoprotéines du globule rouge, en particulier, le peptide α -1 de 34 amino-acides détaché par hydrolyse trypsique de la glycophorine (JACKSON et al., 1973 (366)).

DISTRIBUTION DES ANTIGENES ERYTHROCYTAIRES ENTRE LES REGIONS HYDROPHILE ET HYDROPHOBE DE LA MEMBRANE
 D'APRES PARDOE, 1971 (360)

	Région hydrophile (Protéine)	Région hydrophobe		
		Protéines	Non défini	Lipides
Déterminants de groupes sanguins	M, N S, s ; U, u Duffy Tn ; T En ^{a+}		P I, i	A, B, H Lewis P
Récepteurs de Surface	Myxovirus <u>Ricinus communis</u> <u>Phaseolus vulgaris</u> Endotoxine Pr ; Sp ; M ^{duc}	Myxovirus <u>Ricinus communis</u> <u>Phaseolus vulgaris</u>		<u>Ricinus</u> <u>communis</u>



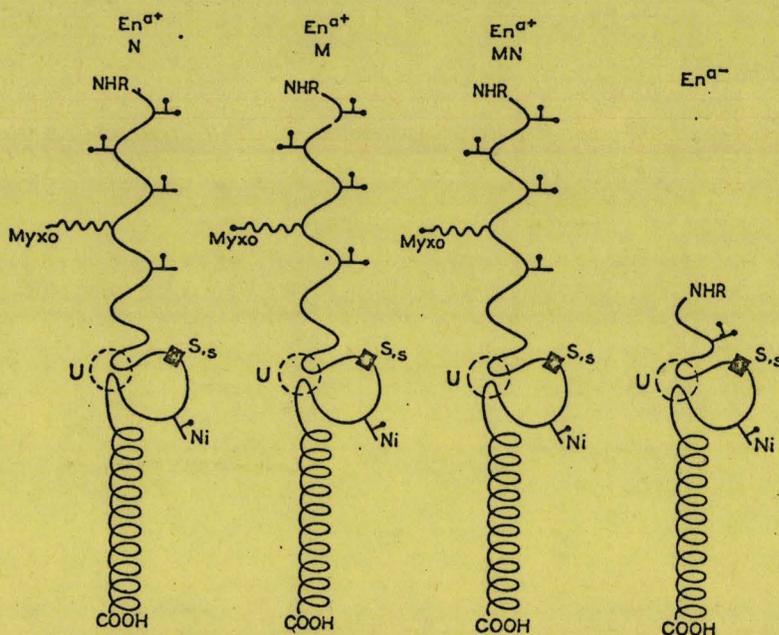
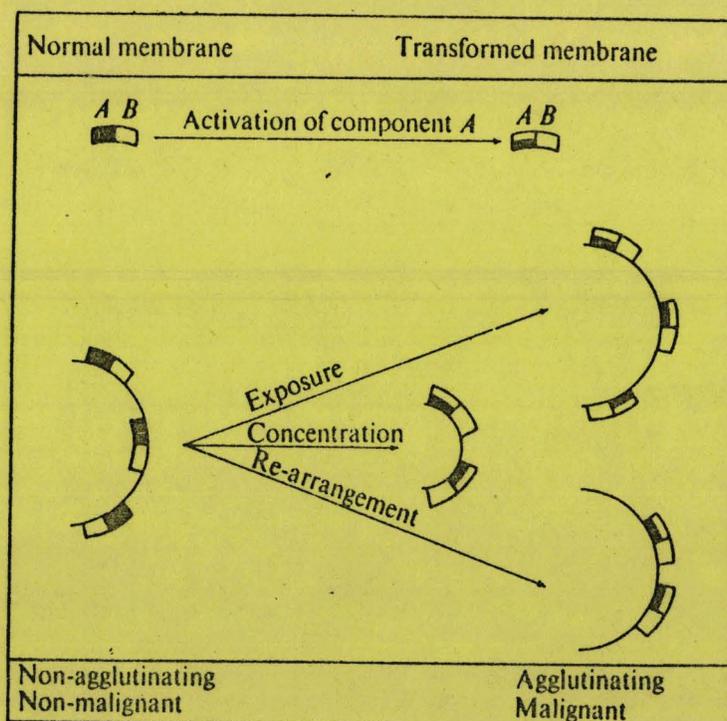


Figure 23

Les déterminants antigéniques des glycoprotéines de la membrane érythrocytaire d'après PARDOE (1971)



Model of the structural and metabolic changes of concanavalin A sites resulting in agglutinability and malignancy.
 ■, ■, Component A; □, component B; white, active; ■■■, inactive.



Figure 24

Réorganisation hypothétique des sites glycaniques du glycoleme provoquée par la transformation cellulaire d'après INBAR, BEN-BASSAT et SACHS (1972)

L'organisation structurale et l'activité métabolique de la membrane de surface sont largement modifiées au cours de la transformation cellulaire par des virus oncogènes. Le fait le plus frappant a été la découverte de l'agglutination de cellules transformées par la concanavoline A. INBAR et SACHS, 1969 (367) montrent en effet que celle-ci, à une concentration de 250 μg par ml de milieu de culture agglutine des cellules leucémiques et des cellules en culture transformées par le virus du polyome, le SV₄₀, des carcinogènes chimiques et l'irradiation par les rayons X. Dans les mêmes conditions, la concanavoline A n'agglutine pas les cellules normales sauf après action de la trypsine. L'agglutination réversible sous l'action de l' α -méthyl-glucoopyranoside montre une réorganisation des glycoprotéines de la membrane de surface (BURGER, 1969 (368) INBAR et al., 1972 (369). La figure 24 (p.51) montre les possibilités de réorganisation structurale de la membrane. Cette découverte a été suivie par toute une série de travaux sur la comparaison des glycoprotéines des cellules normales et transformées par des virus, cellules de Hamster (BHK₂₁) avant et après transformation par le virus de ROUS : (BUCK et al., 1970 (370) : fibroblastes de poulet normaux et infectés par des virus oncogènes à RNA : PERDUE et al., 1971 (371), PERDUE et al., 1971 (372) ; cellules 3T3 transformées par le virus SV₄₀ : SHEININ et al., 1972 (373), fibroblastes de poulet résistants et non résistants au virus de la leucose sarcomateuse aviaire (virus L - S) : SMITH et CRITTENDEN, 1973 (374). Toutes ces études ont permis de mettre en évidence des différences dans la taille des glycoprotéines et des glycopeptides membranaires, associés à des variations des glycosyl-transférases (sialyl-transférase : WARREN et al., 1972 (375), sur des cellules BHK₂₁ où l'activité augmente après transformation par le virus de ROUS et GRIMES et ROBBINS, 1972 (376) sur des cellules BALB/c où celle-ci diminue après transformation par le SV₄₀) ou à des taux anormaux de glycosidases (BOSMAN, 1972 (377

La reconnaissance des cellules les unes par les autres implique la reconnaissance de sites membranaires, les bases chimiques de ce processus de reconnaissance restent à élucider, mais il semble que ce sont les glycoprotéines qui sont impliquées dans ce genre de phénomène. En 1963, MOSCONA (378) montre que le facteur soluble rejeté par les cellules d'éponges et qui stimule leur réagrégation est une glycoprotéine. COX et GESNER, 1968 (379) montrent que la morphologie et la croissance de cellules de mammifères en culture sont modifiées en présence de certains sucres.

Le L-fucose affecte la morphologie et inhibe la croissance de cellules de Souris normales et transformées, tandis que le D-mannose affecte de la même façon les cellules de rein de Singe en culture. Récemment ROTH et al., 1971 (380) font intervenir un complexe glycosyl-transférase-accepteur glycoprotéidique pour expliquer l'agrégation des cellules de rétine d'embryon de poulet.

Il semble que les glycoprotéines des membranes plasmiques soient le lieu de fixation majeur des glycoprotéines plasmatiques PRICER et ASHWELL, 1971 (381) et VAN LENTEN et ASHWELL, 1972 (382), ce phénomène implique un double rôle de l'acide sialique : celui-ci doit être présent sur le site membranaires, mais absent de la glycoprotéine.

D'autres rôles sont également attribués aux glycoprotéines membranaires EVANS et GURD, 1973 (383) ont réussi à isoler la 5'-nucléotidase, cet enzyme isolé des membranes plasmiques d'hépatocyte de Souris est formé de deux sous-unités glycoprotéiniques ayant chacune une masse moléculaire de 70 000. Un rôle de récepteur hormonal a également été attribué aux glycoprotéines membranaires, en effet, après action de la trypsine sur les adipocytes, ceux-ci perdent toute sensibilité à l'insuline. Ils récupèrent cependant cette sensibilité une heure après l'action de l'enzyme: EL-ALLAWY et GLIEMANN, 1972 (384).

T R A V A U X P E R S O N N E L S

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES HEPATOCYTES DE RAT

I - CHOIX DU PROCEDE D'ISOLEMENT

La première méthode d'isolement des membranes plasmiques d'hépatocytes de Rat a été publiée en 1960 par NEVILLE (385). Ce procédé fut repris et amélioré dès 1964 par EMMELOT et al., 1964 (386). Depuis 1964, un grand nombre de procédés originaux furent décrits, en particulier par TAKEUCHI et TERAYAMA, 1965 (387) ; COLEMAN et al., 1967 (388) ; BERMAN et al., 1969 (389) ; SONG et al., 1969 (390) ; RAY, 1970 (391) et par NIGAM et al., 1971 (392).

D'autre part, depuis 1968 un grand nombre de procédés utilisant le rotor zonal ont été décrits (ANDERSON et al., 1968 (393) ; WEAVER et BOYLE, 1969 (394) ; HINTON et al., 1970 (395) ; EVANS, 1970 (396). Ces procédés utilisent tous la centrifugation en gradient de saccharose, récemment, une méthode utilisant les systèmes de polymères biphasiques, a été publiée LESKO et al., 1973 (397).

Deux critères ont guidé notre choix de la méthode : il fallait que le rendement en fraction membranaire soit élevé et que les membranes soient pures tant du point de vue des critères morphologiques que du point de vue des critères enzymatiques.

Les trois méthodes généralement utilisées pour la préparation sont :

- la méthode de NEVILLE dans laquelle une solution hypotonique de NaHCO_3 est utilisée pour l'homogénéisation des membranes.
- la méthode de RAY caractérisée par l'incorporation de CaCl_2 0,5 mM dans la solution de bicarbonate et par l'utilisation de grands volumes pour l'homogénéisation.
- la méthode utilisant une solution de saccharose 250 mM, CaCl_2 0,5 mM et Tris 5 mM pour l'homogénéisation.

Les résultats résumés dans le tableau V (p. 56) d'après HAWKINS et JACQUEZ, 1972 (398) montrent que toutes les méthodes donnent une activité semblable de l'enzyme "marqueur" : la 5'-nucléotidase, mais la méthode de RAY fournit le rendement le plus élevé. C'est cette méthode que nous avons choisie pour préparer la fraction membranaire.

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A - METHODE DE RAY

1 - Principe

La méthode d'isolement des membranes plasmiques est semblable à celle utilisée par NEVILLE, mises à part deux modifications introduites pour augmenter le rendement. La préparation comprend deux parties : d'abord la préparation de la fraction nucléaire grossière, puis le passage de cette fraction sur un gradient discontinu de saccharose. L'originalité de la méthode réside dans la composition du milieu d'homogénéisation qui contient du calcium : le rôle du calcium est de maintenir la structure et l'intégrité fonctionnelle de la membrane . D'autre part, après homogénéisation, l'homogénat est dilué 100 fois par rapport au volume de foie de départ, l'intérêt de cette dilution est d'abaisser la viscosité de la suspension par conséquent, les membranes sédimentent plus facilement aux basses forces centrifuges utilisées pendant la première partie de leur isolement.

Tableau V

COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTES METHODES DE PREPARATION DES MEMBRANES PLASMIQUES DE FOIE DE RAT*

D'APRES HAWKINS ET JACQUEZ, 1972 (399)

Méthode de préparation	(Mg ⁺⁺ /AMPase)	(Na ⁺ - K ⁺) Mg ⁺⁺ /AMPase	ADPase	5'nucléotidase	Succino deshydrogénase	Glucose 6-phosphatase	DNA µg/mg de protéines	Rendement mg/g
NEVILLE	51,2 45,4	8,8 3,9	26,2 15,6	24,8 21,6	8,9/0,2 -	2,1/1,70 1,5/0,7	7,9/3,3 -	0,8 0,3
RAY	18,0 22,9	1,2 0,8	6,3 11,8	19,8 23,7	11,7/0,7 12,6/0	2,6/1,4 2,1/1,4	5,9/2,0 -	1,4 1,1
Saccharose isotonique	27,8 23,8	4,2 0,7	8,7 12,7	20,5 14,1	11,7/1,8 -	2,3/1,8 -	7,2/2,3 -	0,6 0,3

(*) Toutes les activités enzymatiques sauf celle de la succinodeshydrogénase sont exprimées en µ moles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.

L'activité de la succino-deshydrogénase est exprimée en n moles par minute et par mg de protéines.

Les deux valeurs données pour la succino deshydrogénase, la glucose-6-phosphatase et le DNA représentent celles de l'homogénat et de la fraction membranaire.

2 - Réactifs

Le milieu d'homogénéisation ajusté à pH 7,5 est composé d'une solution de NaHCO_3 1 mM et de CaCl_2 0,5 mM.

On utilise pour le gradient quatre solutions de saccharose :

- solution à 70 p. 100 (poids-poids)
- solution à 45 p. 100 (poids-poids)
- solution à 41 p. 100 (poids-poids)
- solution à 37 p. 100 (poids-poids)

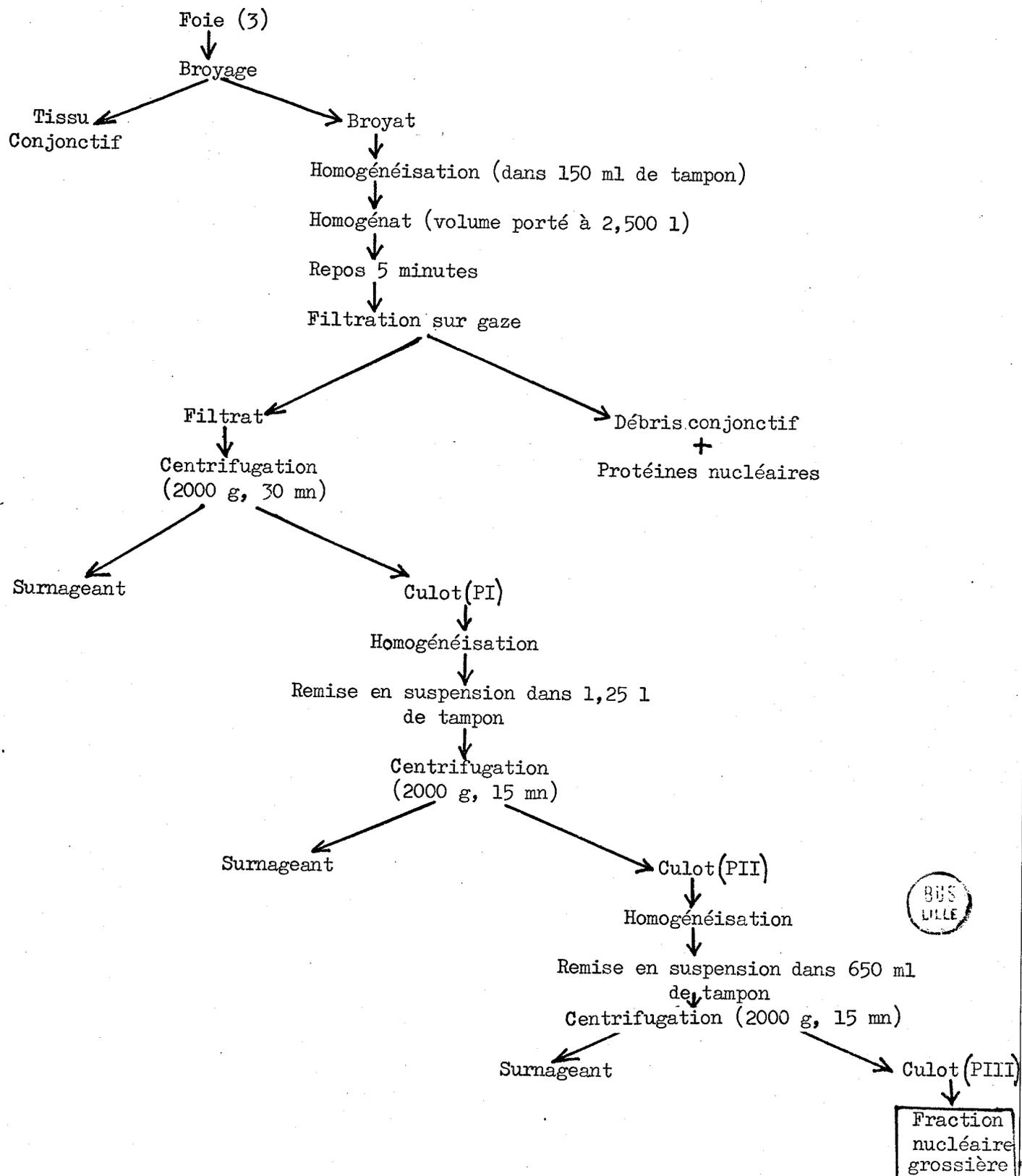
3 - Mode opératoire

a - Préparation de la fraction nucléaire grossière

On utilise des rats mâles Wistar âgés de trois mois qui sont sacrifiés après un jeûne de 12 heures. Les foies sont prélevés rapidement et placés dans le milieu d'homogénéisation maintenu à 0° C grâce à un bain de glace. Toutes les opérations ultérieures se font à + 4° C. Le détail des opérations est résumé dans le tableau VI (p. 58). Les foies (en général au nombre de 3) sont débarrassés du tissu conjonctif par passage dans l'appareil de Fischer. L'homogénéisation se fait dans 150 ml de tampon et par 20 allers et retours du piston de l'appareil de Potter-Elvehjem. L'homogénat est amené à 2,5 l avec le tampon et on laisse reposer pendant 5 minutes. La filtration s'effectue sur quatre couches de gaze et le filtrat réparti dans 4 pots en métal de la centrifugeuse Martin-Christ et centrifugé à 3.200 rpm. (2.200 g) pendant 30 minutes. L'augmentation de la vitesse permet une meilleure adhésivité des culots sur le fond des tubes à centrifuger et évite la remise en suspension du matériel au moment de l'évacuation du surnageant. Les culots (PI) sont repris par 50 ml de tampon, homogénéisés par 4 à 5 allers et retours du piston et amenés à 1,25 l. avec le tampon. Ce volume est réparti entre deux pots en métal de 650 ml et centrifugé à 2.800 rpm. (2.000 g) pendant 15 minutes. Les culots P II homogénéisés de la même façon que précédemment et amenés à un volume de 650 ml, sont centrifugés à 2.800 rpm (2.000 g) pendant 15 minutes pour donner le culot P III.

Tableau VI

SCHEMA DES DIFFERENTES OPERATIONS POUR L'OBTENTION DE LA FRACTION NUCLEAIRE GROSSIERE
PAR LA METHODE DE RAY



b - Préparation du gradient discontinu et centrifugation

Le culot P III est suspendu dans 1 ml de tampon et mélangé à 16 ml de saccharose 70 p. 100. La suspension est ensuite répartie dans les trois tubes du rotor SW-25-2 (Beckman). On place sur la suspension 16 ml de saccharose 45 p. 100, puis 20 ml de saccharose 41 p. 100, enfin 8 ml de saccharose 37 p. 100. Les tubes sont ensuite centrifugés deux heures à 25 000 rpm (90 000 g) dans la centrifugeuse L-2 65 B (Beckman). On prélève la fraction membranaire entre les couches de saccharose 41 p. 100 et 37 p. 100 (voir figure 25 p. 60).

4 - Conclusions

La méthode originale a été légèrement modifiée en augmentant les quantités de matériel traité. Le rendement est de 1 mg de membranes lyophilisées pour 1 g de foie de Rat frais. Ce rendement est supérieur à celui obtenu par EMMELOT et al. 1964 (400) qui obtiennent un rendement de 0,63 mg de membranes pour 1 g de foie, mais il est inférieur à celui de RAY, 1970 (401). Cet auteur indique des rendements de 2 mg de membranes pour 1 g de foie.

B - ADAPTATION DE LA METHODE DE RAY AU ROTOR ZONAL

1 - Principe

Dans le but d'augmenter les quantités traitées en une seule manipulation, nous avons adapté la méthode de RAY au rotor zonal. Nous avons utilisé dans ce but le rotor Ti XIV (Beckman) adapté sur une centrifugeuse L-50. Cette méthode permet d'isoler en une fois des quantités de membranes permettant une préparation des glycopeptides suffisante pour l'étude biochimique.

2 - Mode opératoire

a - Préparation de la fraction nucléaire grossière

On utilise dans ce but 12 foies de Rat (ce nombre peut-être porté à 18 en modifiant légèrement la méthode), la préparation s'effectue exactement de la même façon que précédemment jusqu'à l'obtention de la fraction P III.

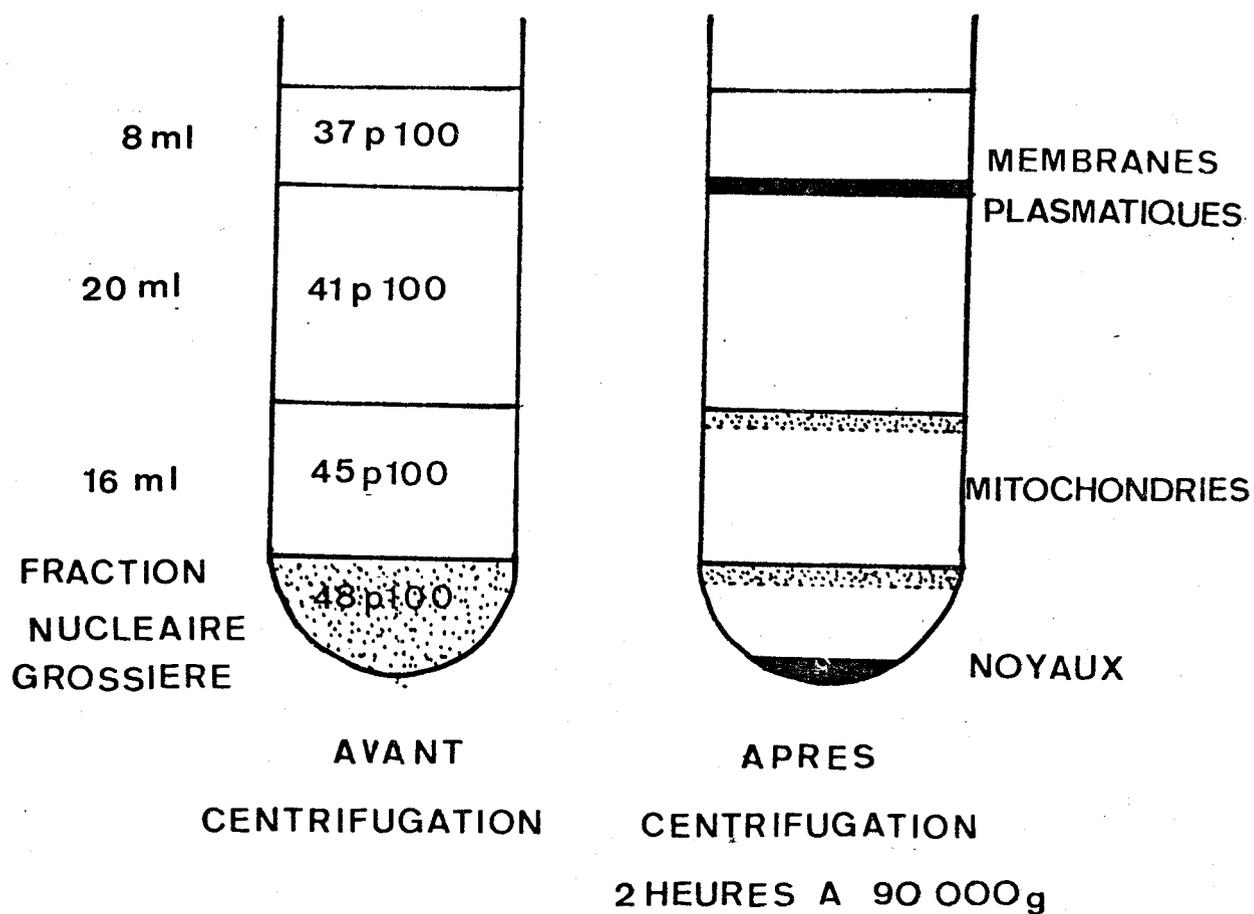


Figure 25



Schéma du fractionnement, par flottation, des membranes plasmiques sur gradient discontinu de saccharose. Les couches de saccharose sont exprimées en p. 100 (poids-poids).

Cette fraction P III, resuspendue dans le tampon est amenée à un volume de 125 ml avec du saccharose 70 p. 100, de manière à obtenir une solution de saccharose à 48 p. 100.

b - Remplissage du rotor zonal et centrifugation

Le remplissage s'effectue dans le rotor lancé à 5 000 rpm. Les solutions de saccharose sont maintenues à + 4° C durant tout le temps de charge et de décharge du rotor. Le remplissage s'effectue grâce à une pompe branchée à la périphérie du rotor jusqu'à ce que la première couche injectée ressorte par le centre.

On injecte d'abord 120 ml de la solution de saccharose à 37 p. 100, puis 155 ml de la solution à 41 p. 100, 175 ml de la solution à 45 p. 100, enfin les 125 ml de la fraction nucléaire grossière en suspension dans le saccharose à 48 p. 100 précédemment préparée. La charge du rotor est achevée en injectant 100 ml de saccharose 2,2 M qui forment un coussin ralentissant la sédimentation des noyaux. L'injection de saccharose 2,2 M s'effectue jusqu'à ce que la première couche ressorte au centre du rotor. Quand 20 à 30 ml de la solution de saccharose sont ressortis, la centrifugation s'effectue pendant deux heures à 40 000 rpm (90 000 g). Si on part de 18 foies de Rat, le volume de la fraction nucléaire grossière à déposer dans le rotor est 150 ml, dans ce cas, le volume du coussin n'est que de 75 ml.

c - Fractionnement du gradient

Après la centrifugation, on procède au fractionnement du gradient. Ce fractionnement s'effectue en poussant le gradient vers le centre avec du saccharose 2,2 M. Pour ceci, on ralentit le rotor à une vitesse de 5 000 rpm, et on injecte le saccharose 2,2 M à la périphérie. Le centre du rotor est branché à un collecteur de fractions. La suspension membranaire se trouvant près de l'axe du rotor va sortir en tête du gradient (130 ml), puis sortent les deux couches mitochondriales (270 ml et 480 ml), les noyaux adhérents au rotor ne sont pas entraînés par le saccharose 2,2 M (voir figure 26 p. 62). La fraction membranaire se trouve en général dans un volume de 50 ml. Les membranes sont lavées trois fois avec du tampon.

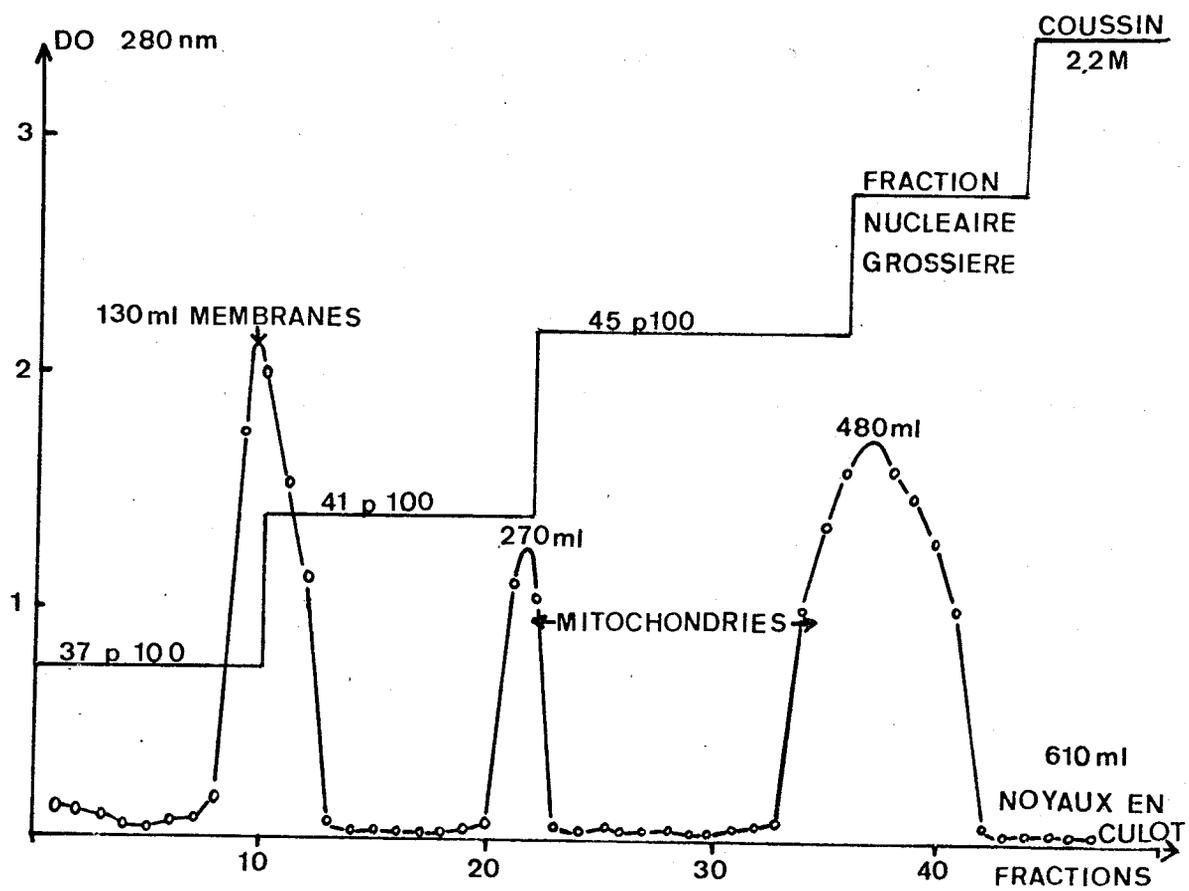


Figure 26

Fractionnement des membranes plasmiqes en rotor zonal Ti XIV.

III - ETUDE DE LA PURETE DE LA FRACTION MEMBRANAIRE ISOLEE

Pour l'étude biochimique des glycoprotéines membranaires, il est capital de partir d'un matériel aussi pur que possible. Il est bien entendu que toute fraction membranaire obtenue au cours d'une préparation est toujours souillée par d'autres organites cellulaires et que la préparation est simplement enrichie en membranes plasmiques. Cet enrichissement varie suivant la technique employée, et suivant les préparations, il est donc indispensable de procéder avant d'utiliser la préparation à des contrôles préalables. Ces critères de pureté sont de divers ordres : étude en microscopie électronique, étude du gradient de densité, étude de l'équipement enzymatique. Nous envisagerons tour à tour ces différents contrôles.

A - ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE*

1 - Procédé de fixation

La suspension de membranes est fixée avec une solution de glutaraldéhyde à 6,25 p. 100 dans du tampon phosphate de sodium 0,4 M de pH 7,25 pendant 1 à 2 heures. Cette fixation est suivie par un lavage dans le même tampon. On effectue une post-fixation à l'acide osmique. Les échantillons sont ensuite inclus dans de l'épon et les coupes sont effectuées juste avant l'observation.

2 - Résultats

Une vue générale de la fraction membranaire (voir figure 27 p. 64) montre les membranes cellulaires qui adhèrent encore les unes aux autres par des desmosomes, des barres terminales et par des canalicules biliaires possédant encore leurs microvillosités (EMMELOT et al., 1964 (402)). On trouve également des vésicules lisses près des grands fragments membranaires. L'origine de ces structures peut-être

* Nous remercions Monsieur E. PUVION de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, pour les observations en microscopie électronique qu'il a bien voulu effectuer sur nos préparations.

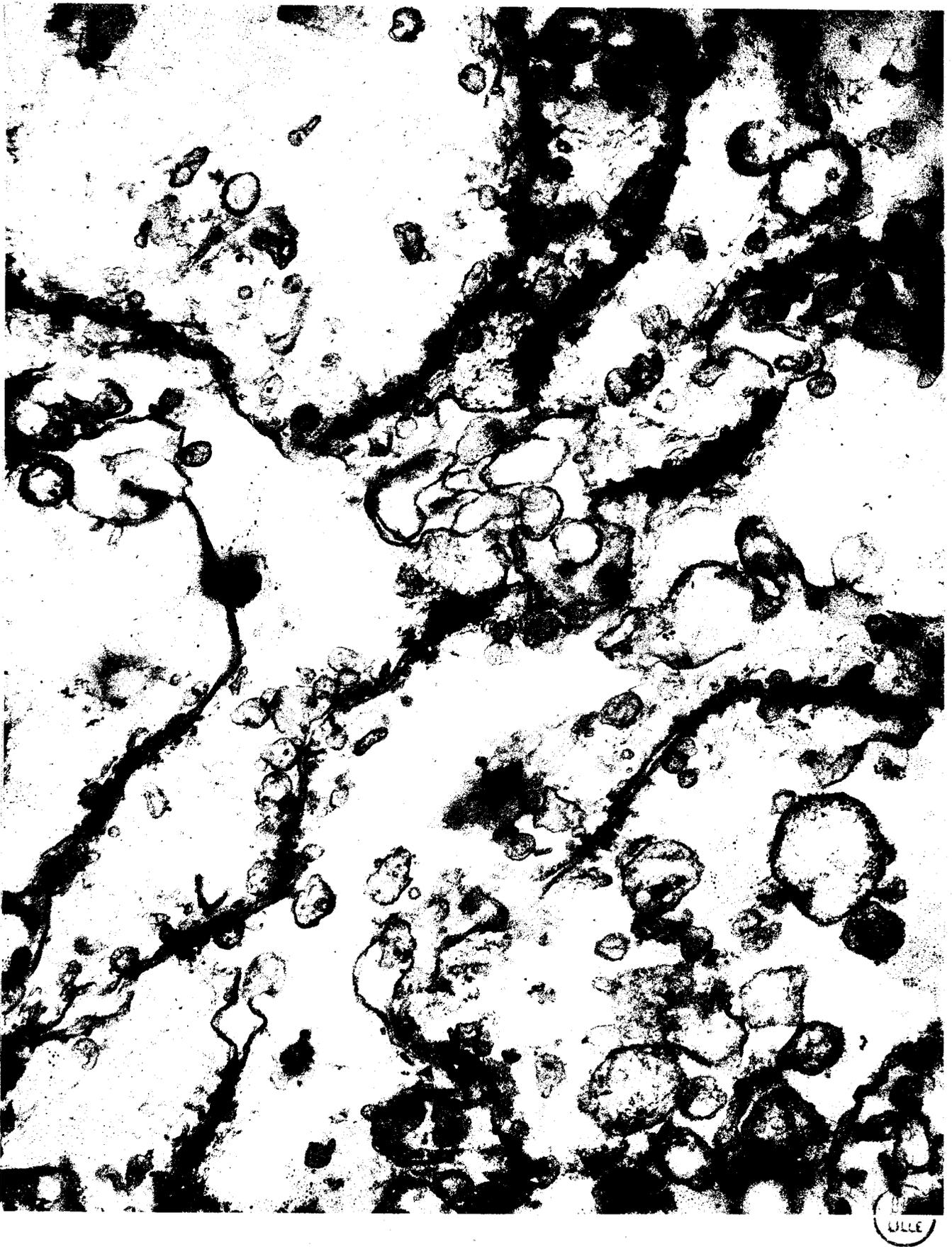


Figure 27

Membranes plasmiques isolées du foie de Rat. Observation au microscope électronique (X 45 000).

très variée : microvillosités vues en coupe transversale, invaginations de la membrane plasmique, vésicules résultant de la cassure puis de la reconstitution de la membrane plasmique, vésicules du réticulum endoplasmique.

La présence de noyaux, de mitochondries, d'appareils de Golgi, de fibres de collagène n'a pas été décelée. Une préparation a montré des traces d'ergastoplasme.

La barre terminale "tight junction" se présente en coupe transversale comme une structure à cinq couches (BENEDETTI et EMMELOT, 1968 (403)), cette structure caractéristique de la membrane plasmique, est signalée par tous les auteurs comme faisant partie de la fraction membranaire. La figure 28 (p.66) montre une telle jonction que l'on trouve fréquemment dans nos préparations.

Le desmosome se présente comme un épaississement des membranes. A l'endroit de l'accolement, cette zone est riche du côté intracellulaire en tonofilaments dont on ne peut pas éviter la présence dans les préparations membranaires (voir figure 29 (p. 67)).

3 - Conclusions

Le microscope électronique a donc un double rôle : il permet d'observer la présence de contaminants éventuels, dans ce cas, aucun organe cellulaire n'a pu être décelé. Il permet également de comparer les structures isolées avec celles obtenues par divers auteurs. Cette comparaison ne nous a pas permis de déceler de différences morphologiques entre les différentes fractions membranaires.

B - ETUDE EN GRADIENT DE DENSITE

1 - Centrifugation en gradient continu de saccharose

a - Choix de la composition du gradient

La centrifugation en gradient continu de saccharose peut-être envisagée comme critère de pureté, en effet, la présence de contaminants ayant une densité



Figure 28

Membrane plasmique isolée du foie de Rat. Détail d'une barre terminale (X 240 000).

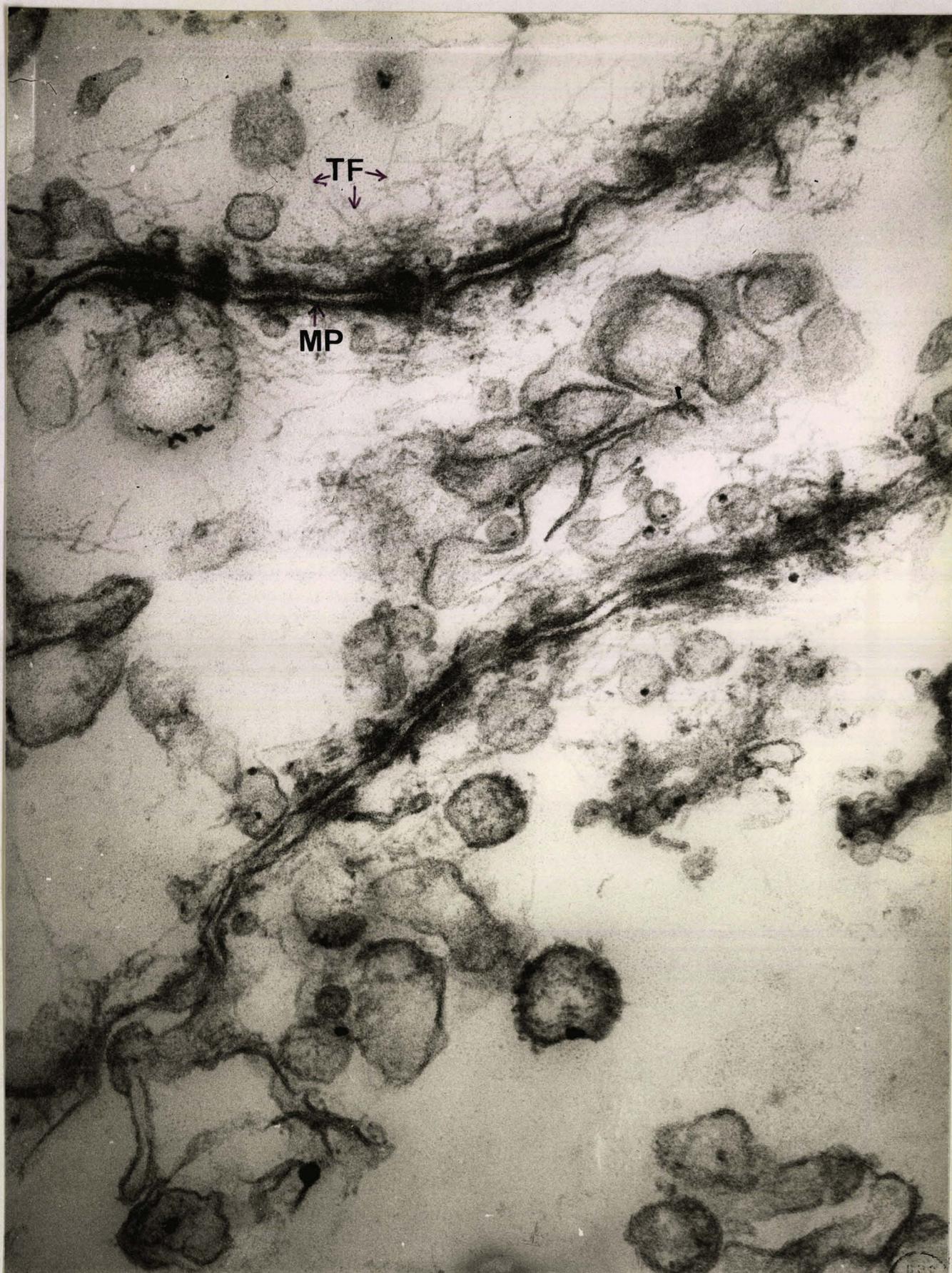


Figure 29

Membranes plasmiques isolées du foie de Rat. Zone riche en desmosomes
(X 114 000). TF : Tonofibrilles, MP : Membrane plasmique trilaminée.

HRS
LILLE

té ou un coefficient de sédimentation différent de celui des membranes, sera détecté sur gradient par l'apparition d'un ou de plusieurs pics supplémentaires. La position du pic fournira des indications sur la densité des membranes.

Nous avons donc établi un gradient suffisamment étalé pour que des contaminants très différents : mitochondries, microsomes, lysosomes, soient détectables. Le gradient est établi dans un appareil à deux chambres de type classique. La solution la plus dense a une densité de 1,26, la solution la plus légère a une densité de 1,10.

Pour éviter les dégradations, toutes les opérations sont effectuées à + 4° C. On place au dessus du gradient 1 ml d'une suspension de membranes homogénéisée par une dizaines d'allers et retours du piston de l'appareil de Potter. La centrifugation s'effectue dans le rotor SW-25-1 (Beckman) à 25 000 rpm pendant 16 heures.

b - Résultats

Après le fractionnement du tube, la lecture s'effectue à une longueur d'onde de 280 nm. Le diagramme (voir figure 30 (p. 69) ne montre qu'un seul pic de forme symétrique. La légère traînée vers des faibles densités est vraisemblablement due à une déformation lors du fractionnement. Le fait que la densité optique remonte légèrement au fond et au début du tube, montre la présence de dégradations inévitables durant un temps aussi long. Les membranes sont à l'équilibre dans la zone de densité 1,18.

c - Conclusions

Comme l'ont signalé différents auteurs, la densité calculée après avoir atteint l'équilibre de densité ne représente pas une valeur absolue, car les valeurs dépendent des milieux utilisés (ficoll, glycérol, saccharose). La densité moyenne est plus basse dans les gradients ficoll-eau que dans les gradients glycérol-eau. Elle est augmentée en remplaçant l'eau par de l'eau lourde (BENEDETTI et EMMELOT, 1968 (404)). Mais la valeur de 1,18 est proche de celle trouvée par HINTON

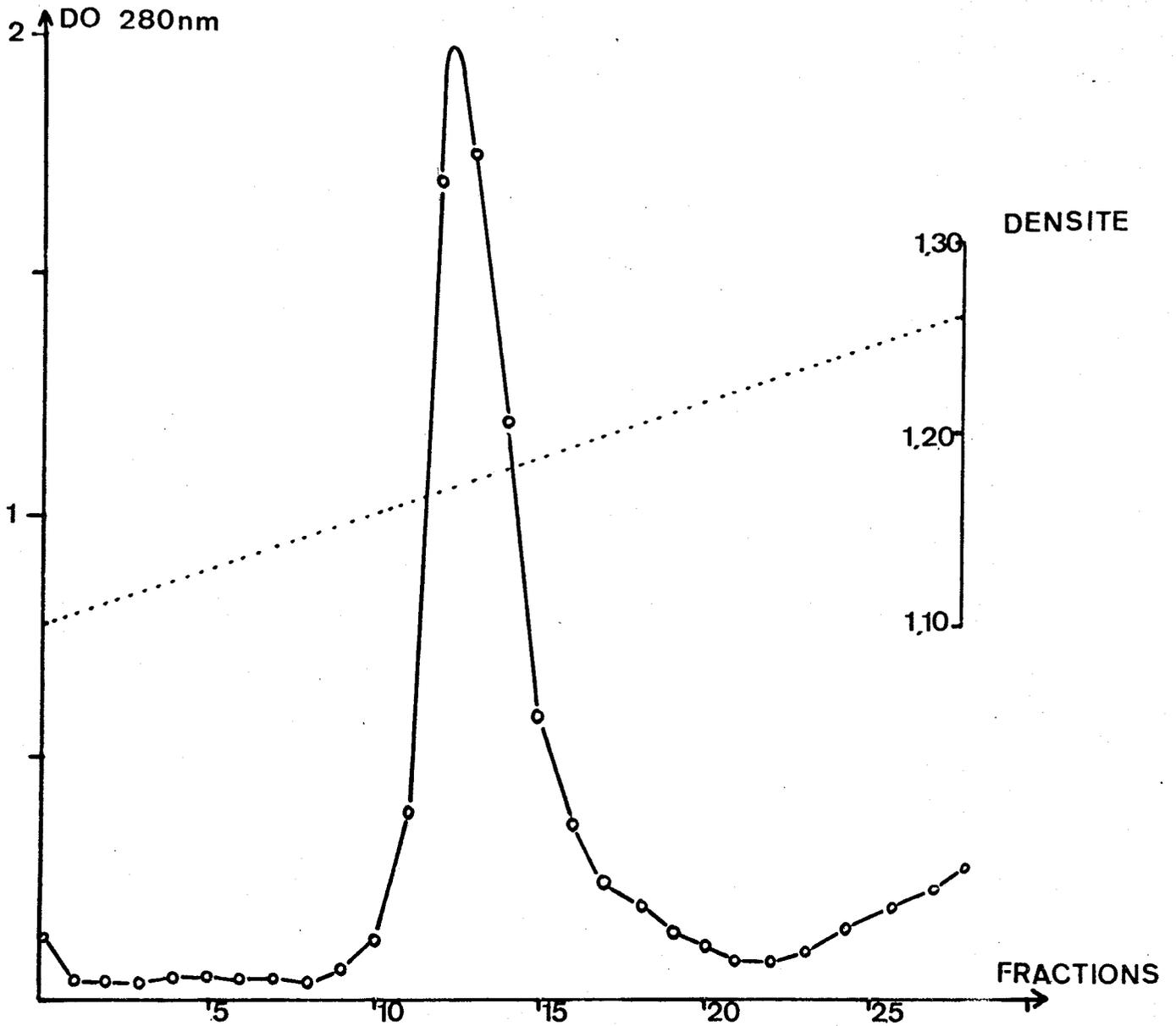


Figure 30

Centrifugation de la fraction membranaire en gradient linéaire de saccharose
de $d = 1,10$ à $d = 1,26$.



et al., 1970 (405) qui est comprise entre 1,177 et 1,172.

D'autre part, la présence d'un pic unique, ne présentant pas d'épaulement, est un argument de plus en faveur de la pureté de notre fraction membranaire.

2 - Centrifugation en gradient de chlorure de césium

a - Choix du gradient

De manière à éliminer la viscosité qui pourrait empêcher la séparation des membranes et des contaminants, nous avons effectué une centrifugation isopycnique en utilisant le chlorure de césium. L'ultracentrifugation en gradient de saccharose nous ayant donné une densité de 1,18 pour nos membranes, nous avons utilisé une solution de CsCl de densité 1,18. Le calcul nous permet de prévoir que le gradient s'étalera de la densité 1,246 à la densité 1,114. La suspension de membranes est homogénéisée dans la solution de chlorure de césium, le gradient se formant durant la centrifugation. Celle-ci s'effectue dans le rotor SW-39 (Beckman) pendant 62 heures à 33 000 rpm et à 20° C.

b - Résultats

Le dépouillement du tube s'effectue comme précédemment, les membranes se concentrent à peu près au centre du tube, et se présentent sous l'aspect d'une bande très ramassée. Le diagramme (voir figure 31 (p. 71) montre cette bande sous l'aspect d'un pic très aigu, qui est à l'équilibre dans la zone de densité $d = 1,175$

c - Conclusions

L'extrême concentration des membranes dans le gradient de chlorure de césium confirme l'homogénéité de la fraction. Mais les contaminations peuvent se présenter sous forme de membranes détachées des organites cellulaires, se trouvant absorbées sur les membranes plasmiqques, les gradients de densité ne peuvent pas dans ce cas séparer les deux types de membranes car les contaminants sont entraînés par la fraction membranaire principale. Pour une étude plus approfondie, il convient donc

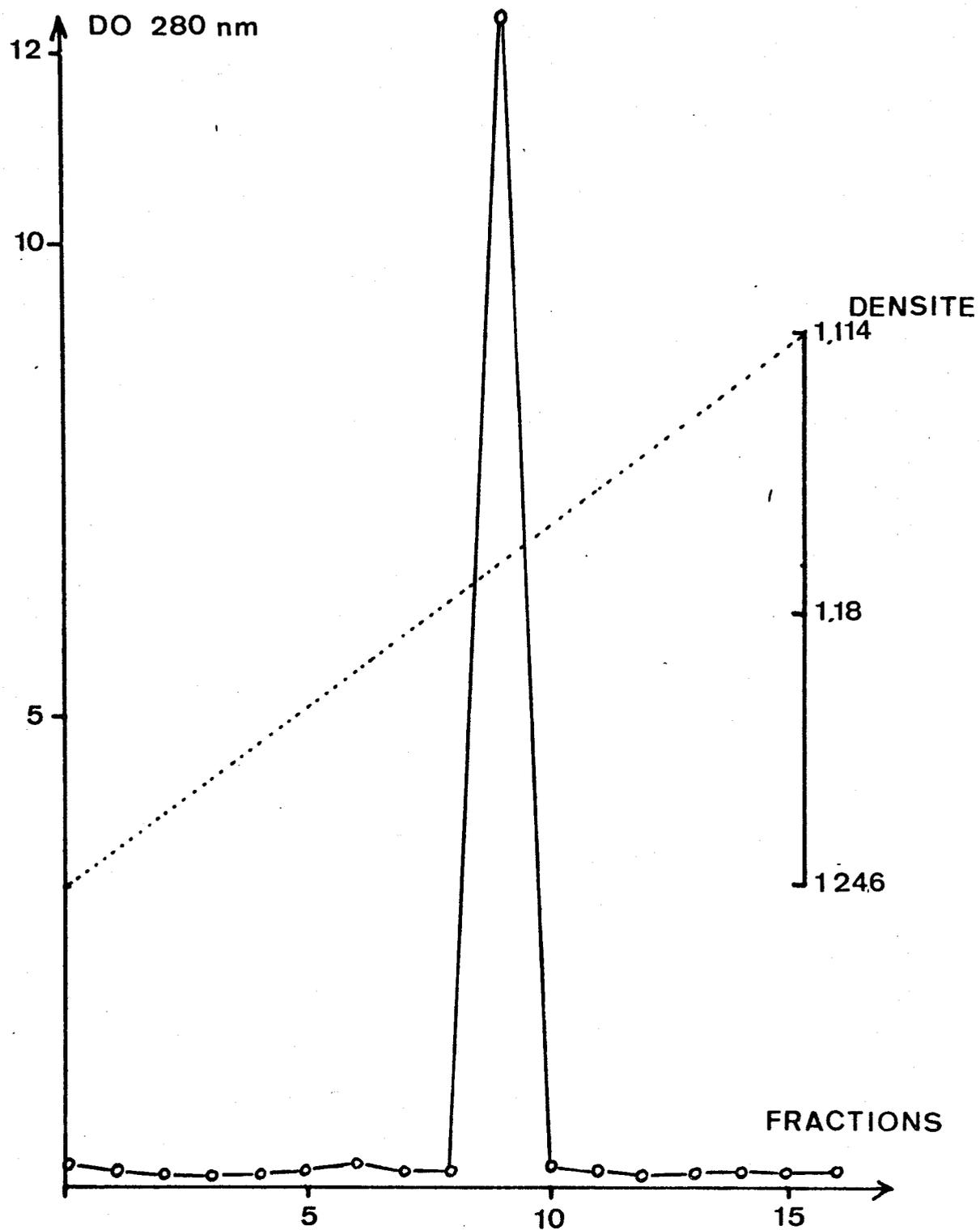


Figure 31

Centrifugation de la fraction membranaire en gradient de Cscl.

d'étudier l'activité enzymatique de la fraction obtenue.

C - ETUDE DE L'EQUIPEMENT ENZYMATIQUE

Les membranes plasmiques isolées des tissus de mammifères sont caractérisées habituellement par leur morphologie et par les analyses biochimiques. La composition lipidique est en général caractéristique, mais habituellement on s'adresse aux enzymes pour la caractérisation des préparations. On distingue habituellement des enzymes "marqueurs" caractéristiques de la membrane plasmique qui ont une répartition cellulaire très localisée (LAUTER et al., 1972 (406); COLBEAU et al., 1971 (407)) et des enzymes "marqueurs" des autres organites cellulaires qui pourraient contaminer la fraction étudiée. Nous étudierons successivement ces deux types d'enzymes. Ces dosages enzymatiques étant du domaine de l'analyse de routine, les protocoles expérimentaux seront décrits dans l'annexe technique (p. 158). Seul le procédé de dosage de l'activité adényl-cyclasique sera décrit dans ce chapitre.

1 - Etude des enzymes "marqueurs" des membranes plasmiques

a - 5'-nucléotidase (5'-ribonucléotide phospho-hydrolase,

EC 3. 1. 3. 5.)

a₁ - Principe

La 5'-nucléotidase a très tôt été considérée comme l'enzyme caractéristique des membranes plasmiques d'hépatocytes (EMMELOT et al., 1964 (408)). Elle a une répartition cellulaire très étroite, et semble même localisée dans la sous-fraction légère et vésiculaire des membranes plasmiques isolée par EVANS, 1969 (409) et 1970 (410) qui correspond aux microvillosités de la membrane. Le substrat de l'enzyme est l'AMP qui, après hydrolyse, donne de l'adénosine et du phosphate. C'est celui-ci qui est dosé, après avoir incubé à 37° C la fraction membranaire en présence du substrat. L'activité spécifique est exprimée en μ moles de substrat transformé par heure et par mg de protéines membranaires. Le dosage des protéines s'effectue par la méthode de LOWRY et al., 1951 (411) avec le sérum albumine bovine comme témoin.

a₂ - Résultats

Le dosage donne une activité spécifique de 37,4 μ moles d'AMP hydrolysées par mg de protéine et par heure, alors que pour l'homogénat, elle n'est que de 1,9 μ moles. Ce résultat est comparable à celui obtenu par d'autres auteurs utilisant des méthodes de préparation différentes comme le montre le tableau VII (p. 74).

L'enrichissement par rapport à l'homogénat est de 20. Cet enrichissement varie légèrement d'une préparation à une autre (10 p. 100) mais il est supérieur à l'enrichissement ou taux de purification de 14 à 16, trouvé par LAUTER *et al.*, 1972 (418).

b - Nucléotide pyrophosphatase (di-nucléotide nucléotidohydrolyase, EC 3. 6. 1. 9.)

b₁ - Principe

La distribution identique de la 5'-nucléotidase et de la nucléotide pyrophosphatase lors du fractionnement cellulaire a fait considérer celle-ci comme un véritable enzyme "marqueur" des membranes plasmiques (SKIDMORE *et TRAMS*, 1970 (419) *et TOUSTER et al.*, 1970 (420)). Le substrat est le NADH₂ ou le NAD. L'enzyme hydrolyse la liaison phosphodiester. Les deux nucléotides monophosphates libérés, sont à leur tour déphosphorylés par la 5'-nucléotidase, on mesure donc la quantité de phosphate libéré. Il est également possible de suivre la disparition du NAD au spectrophotomètre mais la méthode est moins précise car on dose en même temps l'activité NAD nucléosidasique (cette activité est 9 p. 100 de celle de la NAD-pyrophosphatase). L'activité spécifique s'établit comme précédemment en μ moles de substrat hydrolysées par heure et par mg de protéines membranaires.

b₂ - Résultats

Notre fraction possède une activité nucléotide pyrophosphatasique de 4,02 μ moles par heure et par mg de protéines. Cette activité est identique à celle trouvée par d'autres chercheurs comme le montre le tableau VII (p. 74). L'homogénat n'a qu'une activité de 0,4 μ moles par heure et par mg de protéines, ce qui donne un enrichissement de 10, celui-ci est supérieur aux résultats

COMPARAISON DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES MEMBRANES PLASMIQUES D'HEPATOCYTES DE RAT ISOLEES PAR DIFFERENTES METHODES

(VALEURS EXPRIMEES EN μ MOLES DE SUBSTRAT TRANSFORME PAR MG DE PROTEINES ET PAR HEURE)

Références	5'nucléotidase	Nucléotide pyrophosphatase	p-nitrophényl (K ⁺) phosphatase	p-nitrophényl phosphatase	Leucyl β naphthylaminidase	ATP ^{ase} (Mg ⁺⁺)	ATP ^{ase} Mg ⁺⁺ (Na ⁺ , K ⁺)
EMMELOT <u>et al.</u> , 1964 (412)	32,2	5,72	0,92	-	3,91	44,2	11,6
COLEMAN <u>et al.</u> , 1967 (413)	58,6	-	-	-	-	-	-
HINTON <u>et al.</u> , 1970 (414)	1 40,1	-	-	-	-	-	-
	2 58,6	-	-	-	-	-	-
	3 98,5	-	-	-	-	-	-
	4 124,1	-	-	-	-	-	-
EVANS, 1970 (415)	Fr Lourde	11,8	-	-	-	59,0	42,0
	Fr Légère	46,0	-	-	-	270,0	0
HAWKINS et JACQUEZ 1972 (416)	Méthode de NEVILLE	24,8	-	-	-	45,4	8,8
	Méthode de RAY	23,7	-	-	-	22,9	1,2
	Méthode en saccharose isotonique	20,5	-	-	-	23,8	4,2
LAUTER <u>et al.</u> , 1972 (417)	NEVILLE	37,2	3,62	6,03	-	4,6	-
	RAY	44,1	4,80	3,99	-	-	-
Résultats personnels	37,4	4,02	1,003	0,115	4,1	36	3,5

de LAUTER et al., 1970 (421) qui pour les membranes préparées par la méthode de RAY trouve un enrichissement de 5 pour cet enzyme.

c - p-nitrophénylphosphatase (orthophosphorique monoester phosphohydrolase, EC 3. 1. 3. 1.)

c₁ - Principe

EMMELOT et al., 1964 (422) ont signalé la présence dans les membranes plasmiques d'hépatocytes de Rat d'une phosphomonoestérase qui hydrolyse à pH alcalin (9,4) le glycérophosphate. Cette activité a d'ailleurs été mise en évidence au niveau des canalicules biliaires avec des méthodes histochimiques par NOVIKOFF, 1960 (423). L'enzyme peut utiliser comme substrat le β -glycérophosphate à pH 9,5 ou le p-nitrophénylphosphate à pH 8,6. La première activité dépend d'ailleurs du sexe de l'animal: elle est plus élevée chez les mâles que chez les femelles (EMMELOT et BOS, 1971 (424)). On peut distinguer également pour l'activité p-nitrophénylphosphatase une activité phosphatasique totale et une activité phosphatasique dépendant du K^+ sensible à l'ouabaïne (inhibée par l'ouabaïne $10^{-4}M$). Nous avons pris comme substrat le p-nitrophénylphosphate sans ouabaïne pour mesurer l'activité totale, et le p-nitrophénylphosphate en présence d'ouabaïne $10^{-4}M$ pour obtenir l'activité insensible à l'ouabaïne. La différence entre les deux, nous a donné l'activité p-nitrophénylphosphatase dépendant du K^+ . (HELLER et HANAHAN, 1972 (425)). L'activité est mesurée en dosant la quantité de p-nitrophénol libéré.

c₂ - Résultats

L'activité de 1,003 μ moles par heure et par mg de protéines trouvée pour la p-nitrophénylphosphatase avec un enrichissement de 9 par rapport à l'homogénat est plus basse que celles données par le tableau VII (p. 74). Elle est uniquement comparable à celle obtenue par EMMELOT et al., 1964 (426), qui de 0,92 μ moles par heure et par mg de protéines. L'activité dépendante du potassium 0,115 μ moles par heure et par mg de protéines et également très faible ainsi que son taux d'enrichissement de 4,6. EMMELOT et BOS, 1971 (427) en travaillant sur des rats mâles de la souche R-Amsterdam

obtiennent des activités de $3,31 \mu$ moles et $1,6 \mu$ moles par heure et par mg de protéines pour les deux activités. Le taux de purification généralement trouvé est de 16 (LAUTER et al., 1972 (428)).

d - Leucyl- β -naphtylamidase (L-leucyl-peptide-hydrolase, EC 3. 4. 1. 1.)

d₁ - Principe

La présence d'une activité d'hydrolyse de la leucyl β -naphtylamide a été mise en évidence par EMMELOT et al., 1968 (429). Cette activité est associée à de petits granules de 50 à 60 Å - globular knobs - qui sont détachés de la membrane par la papaïne et qui ont été caractérisés de manière histochimique le long des canalicules biliaires. Cette activité peptidasique est active sur plusieurs substrats : la leucine- β -naphtylamide, la leucinamide, la leucyl-glycine, la leucyl-glycylglycine et la glycylglycylglycine (EMMELOT et VISSER, 1971 (430)). Le substrat utilisé ici est la leucine β naphtylamide, l'hydrolyse libère la leucine et la β -naphtylamide dosée par la méthode de GOLDBARG et RUTENBURG, 1958 (431).

d₂ - Résultats

L'activité spécifique de 4, 1μ moles de leucine β -naphtylamide hydrolysées par mg de protéine et par heure est proche de celle donnée par tous les auteurs comme le montre le tableau VII (p. 74). Mais l'enrichissement par rapport à l'homogénat est de 4,6. LAUTER et al., 1972 (432) bien que trouvant une valeur identique pour l'activité spécifique, indique un taux de purification de 14.

e - ATPases (Adénosine triphosphate phospho-hydrolase, EC 3. 6. 1. 3.)

e₁ - Principe

On a très tôt établi que dans le foie la membrane limitant des canalicules biliaires présentent une forte activité ATPasique (WACHSTEIN et MEISEL, 1957 (433)), et la cytochimie électronique a montré que cette activité dépend de la membrane plasmique de la cellule hépatique qui

limite les canalicules biliaires (ESSNER *et al.*, 1958 (434)). EMMELOT *et al.*, 1964, (435) ont montré également une activité ATPasique dans les membranes isolées d'hépatocytes de Rat. Cette activité est fortement dépendante des ions. On distingue une activité ATPasique totale mesurée en présence de Mg^{++} , Na^+ et K^+ , cette activité ATPasique dépendante du Mg^+ , Na^+ K^+ peut-être divisée en deux. Une ATPase stimulée par les ions Na^+ et K^+ et inhibée par l'ouabaïne appelée encore ATPase de transport ou pompe à sodium-potassium, SKOU, 1957 (436) dont l'activité disparaît dès que l'on touche à l'intégrité des phospholipides des membranes par des phospholipases, SCHATZMAN, 1962 (437) ou par extraction lipidique, JARNEFELT, 1972 (438), et une activité ATPasique insensible à l'ouabaïne et activée par le Mg^{++} . Le transport actif dépend de deux étapes : une phosphorylation dépendante du Na^+ du côté interne de la membrane, puis une déphosphorylation dépendant du K^+ à l'extérieur. BLAT et HAREL, 1969 (439) et 1970 (440) mettent en évidence dans les membranes plasmiques isolées du foie de Rat des phosphoprotéines à liaison acylphosphate dont la phosphorylation dépend du Na^+ et du K^+ et est inhibée par l'ouabaïne. Il semble donc bien que l'activité ATPasique soit intégrée à la membrane, bien que l'enzyme ne soit pas considéré comme enzyme marqueur par certains auteurs. Récemment, EVANS, 1970 (441) montre que l'ATPase (Na^+ , K^+) est associée à la sous-fraction lourde des membranes plasmiques qui représentent les zones riches en jonctions membranaires.

L'activité ATPase (Mg^{++} , Na^+ , K^+) sera mesurée en prenant comme substrat l'ATP (forme Tris) en présence de Mg^{++} , Na^+ , K^+ . L'activité ATPase (Mg^{++}) sera mesurée en prenant le même substrat en présence de Mg^{++} , et d'ouabaïne $10^{-4}M$. La différence entre les deux valeurs donnera l'activité due à l'ATPase (Na^+ , K^+).

e₂ - Résultats

L'activité de 36 μ moles par mg de protéines et par heure pour l'ATPase (Mg^{++} , Na^+ , K^+) est comparable à celle obtenue par de nombreux auteurs, voir tableau VII (p. 74). Elle se distingue nettement de celle trouvée par EVANS, 1970 (442) pour la fraction légère. En fait, le sous-fractionnement des membranes représente dans ce cas un enrichissement supplémentaire. Il se passe la même chose avec l'ATPase (Na^+ , K^+), où notre valeur de 3,5 μ moles par mg de protéines et par heure cadre avec tous les résultats sauf avec celui trouvé dans la fraction lourde d'EVANS, mais ici encore, il s'agit d'un enrichissement supplémen-

taire, cette fraction contenant un grand nombre de jonctions membranaires.

Le taux de purification de 4,8 et 4,1 trouvé pour les deux enzymes est semblable au taux trouvé précédemment pour la leucyl- β -naphthyl-amidase. Il semble que ceci soit dû au fait que ces enzymes ont une répartition cellulaire plus large que la 5'-nucléotidase ou la nucléotidopyrophosphatase.

f - Adényl-cyclase (Procédé original)*

f₁ - Principe

Dès 1957, SUTHERLAND et RALL (443) puis en 1962, SUTHERLAND et al., (444) ont découvert une activité adénylcyclasique localisée dans une fraction particulière, insoluble du foie de Rat. Une activité adénylcyclasique stimulée par le glucagon a été localisée dans les membranes plasmiques de foie de Rat par POHL et al., 1969 (445). Cette notion de localisation et de stimulation hormonale de l'adényl-cyclase dans les membranes plasmiques d'hépatocytes de Rat a été confirmé par de nombreux auteurs : MARINETTI et al., 1969 (446) ; RAY et al., 1970 (447) ; EMMELOT et BOS, 1971 (448) ; CHRISTOFFERSEN et al., 1972 (449). Les propriétés de l'enzyme ont ensuite été étudiées en détail en particulier par POHL et al., 1971 (450) ; BIRNBAUMER et al., 1971 (451) ; RODBELL et al., 1971 (452) ; RODBELL et al., 1971 (453) ; RODBELL et al., 1971 (454) ; POHL et al., 1971 (455) ; BIRNBAUMER et al., 1972 (456) ; BIRNBAUMER et POHL, 1973 (457). L'activité adénylcyclasique est stimulée par le glucagon et d'une façon moindre par l'adrénaline. Elle est augmentée par les fluorures. La stimulation par le glucagon nécessite d'abord la fixation de l'hormone sur un récepteur, et la présence de nucléotides à guanine (GTP, GDM ou GMP). L'activité de base ainsi que la réponse aux hormones et aux fluorures nécessitent l'intégrité des lipides : le phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine semblent jouer des rôles importants (RETHY et al., 1971 (458)) et RETHY et al., 1972 (459). On pense actuellement que l'adényl-cyclase des membranes plasmiques

* VERBERT A., CACAN R., Biochimie, 1972, 54, 1491-1492.

est formée d'une unité catalytique lipoprotéique nécessitant la présence de phosphatidylinositol pour son fonctionnement, La sous unité de régulation nécessite pour son fonctionnement la présence de phosphatidyl-éthanoline. Le GTP semble avoir un rôle d'intermédiaire entre le récepteur hormonal ou "discrimination" et l'unité catalytique, Il forme donc le lien entre le récepteur hormonal et l'unité de régulation de l'adényl-cyclase. La mise en jeu de ce phénomène de stimulation hormonale est donc un phénomène complexe qui nécessite une intégrité totale de la membrane plasmique.

La détermination de l'activité de l'adényl-cyclase nécessite une séparation très nette de l'AMPcyclique (AMPc) des autres dérivés du métabolisme de l'ATP. Les procédés les plus utilisés jusqu'à présent font appel soit à la chromatographie de partage bi-dimensionnelle (MARINETTI et al., 1969 (460)) complétée parfois par une migration supplémentaire d'un système-solvant dans une troisième direction (DOUSA et RYCHLIK, 1970 (461)), soit à la chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'ions (KRISHNA et al., 1968 (462)). Récemment, ROSSELIN et FREYCHET, 1973 (463) ont mis au point une méthode de dosage de l'adényl-cyclase dans les membranes plasmiques par radioimmunologie. Des méthodes plus simples utilisant la chromatographie monodimensionnelle ont été proposées par RAO et al., 1972 (464) et OSNES et al., 1972 (465), mais elles ne résolvent pas le problème de la séparation de tous les dérivés de l'ATP. Nous nous sommes attachés à mettre au point un procédé d'électrophorèse sur papier qui présente l'avantage d'être simple et rapide et de séparer parfaitement les composés suivants : ATP, ADP, AMP, AMPc, adénosine, adénine.

f₂ - Choix du pH de l'électrophorèse

La figure 32 (p.80) montre que l'AMPc ne peut pas former de complexes boratés contrairement à l'adénosine et aux dérivés phosphorylés de celle-ci. Il devient alors possible en ajustant le pH à une valeur correcte de réduire l'ionisation des groupements boratés (pK = 9) de l'adénosine tout en maintenant celle du groupement phosphorylé de l'AMPc (pK = 1) et d'obtenir ainsi la séparation électrophorétique des deux composés. Quant aux nucléosides 5'-phosphates, la formation de complexes boratés ne gêne en rien leur résolution puisque l'influence de l'ionisation des groupements phosphorylés reste prédominante. En étudiant la

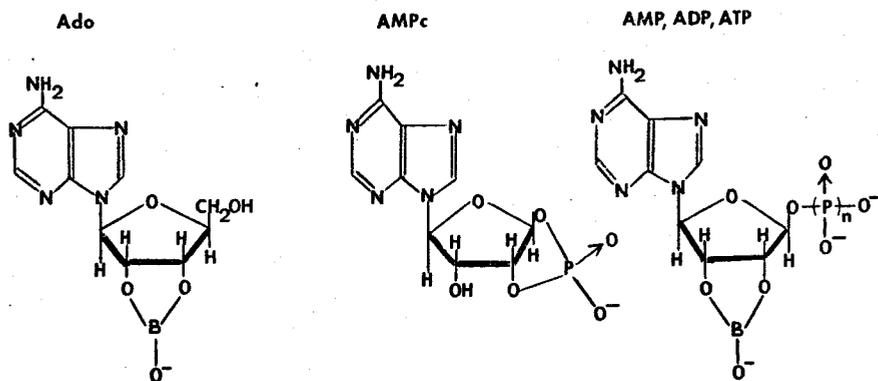


Figure 32

Structure des complexes boratés formés avec l'adénosine et ses composés phosphorylés.

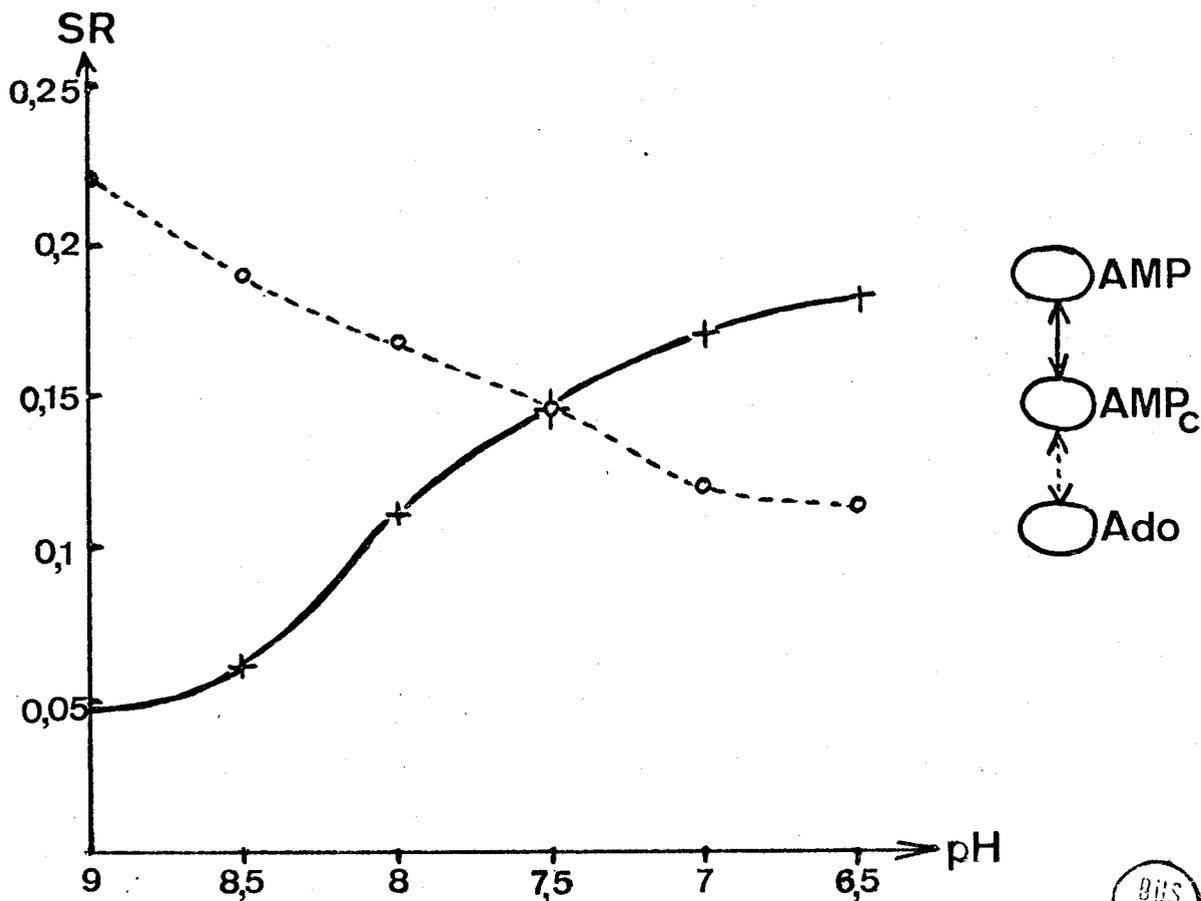


Figure 33

Séparation entre l'AMPc, l'adénosine et l'AMP en fonction du pH de l'électrophorèse. La séparation relative (S.R.) est égale pour la séparation de l'AMPc et de l'AMP au rapport $\frac{\text{Migration de l'AMP}}{\text{Migration de l'AMPc}}$ (x—x) et pour la séparation de l'AMPc et de l'adénosine au rapport $\frac{\text{Migration de l'AMPc}}{\text{Migration de l'adénosine}}$ (o----o)



migration relative de l'AMP, de l'AMPC et de l'adénosine à différents pH (entre 9 et 6,5) on s'aperçoit que la meilleure séparation s'effectue à pH 7,5 comme le montre le figure 33 (p. 80). Le pH est réalisé par un tampon borate de sodium à 1 p. 100 ajusté à pH 7,5 par addition d'acide citrique 1M. La figure 34 (p. 82) montre la qualité des séparations obtenues avec les dérivés métaboliques de l'ATP dans les conditions suivantes : papier d'Arches 304 (56 x 17 cm ; dépôt à 18 cm du bord cathodique de la feuille) ; appareil d'électrophorèse à haut voltage Technik avec réfrigération à 4° C ; 90 V/cm pendant 1 h avec tampon décrit précédemment.

f₃ - Mode Opérateur

Les membranes sont incubées à 37° C pendant 15 minutes sous agitation à raison de 20 µg de protéines pour 100 µl du milieu suivant : solution ajustée à pH 7,5 de Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 4 mM, ATP 10 mM (dont 20 µCi d'ATP [³H₂] contenant du phospho-énol-pyruvate 50 mM et de la pyruvate kinase (Sigma) (20 µg pour 100 µl) comme générateur d'énergie, de la caféine 6,7 mM et de l'AMPC 5 mM pour atténuer l'action de la phosphodistérase cyclique, RAY, 1970 (466). La réaction est arrêtée en ajoutant pour 100 µl de milieu d'incubation 20 µg de chacun des métabolites de l'ATP. Les membranes sont ensuite éliminées par centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes et le surnageant est soumis directement à l'analyse électrophorétique dans les conditions décrites précédemment. L'électrophorégramme est découpé en bandes de 1 x 8 cm et la radioactivité déterminée par comptage en scintillation liquide.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons vérifié la valeur de notre méthode et l'intégrité de nos membranes en déterminant les variations de la concentration en AMPC du milieu sous l'action d'activateurs classiques de l'adénylcyclase, l'adrénaline 10⁻⁴ M, le glucagon 10⁻⁶ M et le fluorure de sodium 20 mM.

f₄ - Résultats et Conclusions

L'activité de base de l'adényl-cyclase que nous avons déterminée est de 2,6 nM par heure et par mg de protéines membranaires (voir figure 35 A (p. 82) est proche de celle obtenue par EMMELOT et BOS, 1971 (467) qui est de 2,3 nM par mg et par heure. L'enrichissement par rapport à l'homogénat est de 13 et est plus élevé que celui trouvé par POHL et al., 1971 (468) avec des membranes

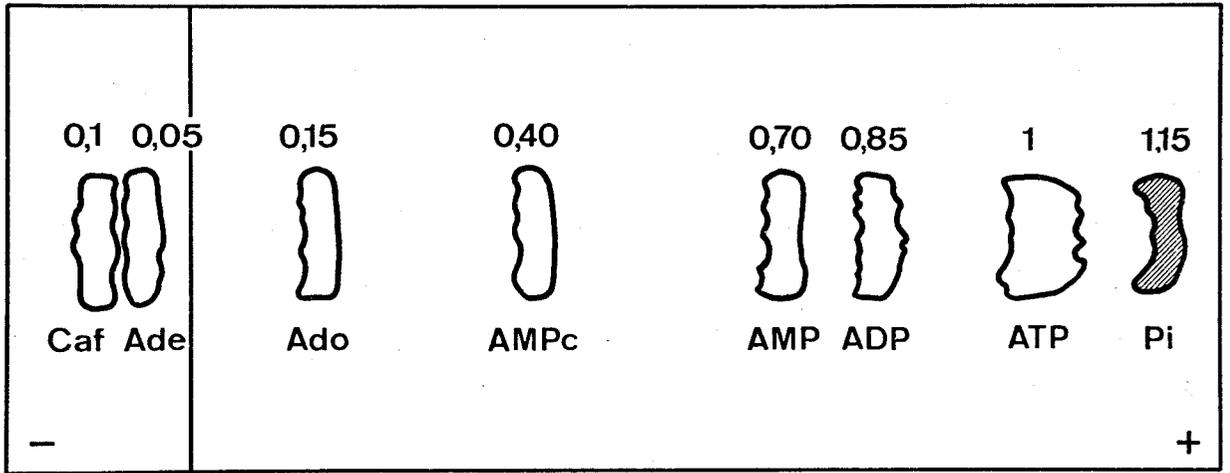


Figure 34

Séparation des dérivés métaboliques de l'ATP par électrophorèse à haut voltage dans le tampon borate de sodium à 1 p. 100 ajusté à pH 7,5 avec de l'acide citrique.

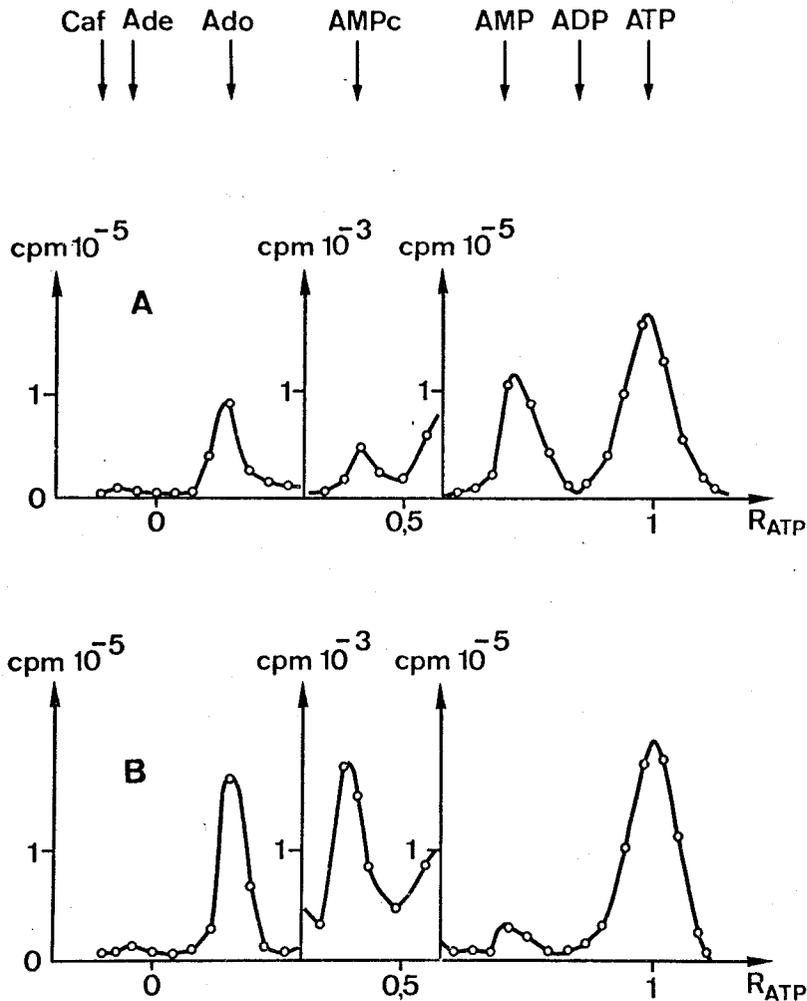


Figure 35

Séparation de la radioactivité liée à chaque métabolite de l'ATP après une incubation des membranes plasmiques avec l'ATP tritié en l'absence (A) d'effecteurs exogènes et en présence (B) d'un activateur de l'adénylcyclase (NaF 20 mM).



isolées par la méthode de NEVILLE.

L'activité de base de l'adényl-cyclase est stimulée environ 25 fois par le glucagon 10^{-6} M, 8 fois par l'adrénaline 10^{-4} M et 11 fois par le fluorure de sodium 20 mM (voir figure 35 B (p. 82)). Ces valeurs sont en bon accord avec les résultats d'EMMELOT et BOS, 1971 (469). En effet, selon ces auteurs, l'enzyme est activé 20,5, et 10 fois respectivement par ces trois effecteurs. Ceci montre également que l'intégrité des membranes est respectée durant la préparation car les propriétés de l'enzyme sont conservées après isolement des membranes.

2 - Etude des enzymes "marqueurs" d'autres fractions cellulaires

Notre fraction membranaire peut être contaminée par d'autres membranes provenant de divers organites cellulaires. Les diverses membranes peuvent être mises en évidence par l'activité des enzymes "marqueurs". Nous étudierons successivement les enzymes "marqueurs" de microsomes, des lysosomes, des mitochondries. Les membranes de ces trois groupes d'organites cellulaires peuvent en effet être absorbées et entraînées par les membranes plasmiques lors du fractionnement.

a - Enzymes des microsomes

a₁ - Glucose-6-phosphatase (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3. 1. 3. 9.)

α - Principe

Les membranes plasmiques isolées de l'hépatocyte du Rat présentent une légère activité glucose-6-phosphatasique : EMMELOT et al., 1964 (470). La plupart des auteurs considèrent cet enzyme comme un enzyme "marqueur" des microsomes (membranes du réticulum endoplasmique), ce qui semble prouver que les préparations de membranes plasmiques sont légèrement contaminées par des membranes microsomales. Mais EMMELOT et BOS, 1970 (471) en comparant les propriétés des activités glucose-6-phosphatasiques des microsomes et des membranes plasmiques montrent que les deux enzymes sont différents.

Le substrat est le glucose-6-phosphate et l'activité est déterminée par la méthode de SWANSON, 1955 (472) après incubation à 37° C des membranes et du substrat et dosage du phosphate libéré. L'activité spécifique exprimée comme dans les cas précédents est mesurée pour l'homogénat de départ et la fraction membranaire.

β - Résultats

L'activité de 0,465 μ moles par heure et par mg de protéines membranaires est proche de celle trouvée par EMMELOT et BOS, 1970 (473) qui est de 1 μ moles par heure et par mg de protéines. L'homogénat a une activité 20 fois plus forte, il contient en effet l'activité enzymatique due aux microsomes en plus de celle des membranes plasmiques.

a₂ - NADPH₂ cytochrome c réductase, (EC 1. 6. 2.

2.)

α - Principe

La NADH₂ - cytochrome-c-réductase semble plus spécifique des microsomes que la glucose-6-phosphatase, OMURA et al., 1967 (474). Mais la présence de cet enzyme a été signalée dans les membranes plasmiques COLBEAU et al., 1971 (475). Ces auteurs concluent d'ailleurs que les données fournies par la mesure de l'activité de la NADPH₂-cytochrome-c-réductase, la glucose 6-phosphatase et le cytochrome P₄₅₀ dans une fraction cellulaire aboutissent exactement au même pourcentage de contaminants par les microsomes.

La mesure de cette activité est effectuée par la méthode de MAHLER 1955 (476), consistant à mesurer la réduction du cytochrome oxydé par la NADPH₂ par lecture au spectrophotomètre à 550 nm. L'activité spécifique est calculée comme précédemment sur l'homogénat et la fraction membranaire.

β - Résultats

La valeur obtenue de 0,114 μ moles de cytochrome-c réduit par mg de protéines et par heure est inférieure à celle obtenue par COLBEAU et al., 1971 (477) qui obtient une valeur de 0,48 pour des membranes non purifiées et 0,60 pour des membranes purifiées par passage sur gradient de saccharose. L'homogénat a dans ce cas, une activité environ 6 fois plus forte.

b - Enzyme des lysosomes : la phosphatase acide (phosphomono-estérase acide EC 3. 1. 3. 2.)

a - Principe

La phosphatase acide fut très tôt considérée comme enzyme caractéristique des lysosomes (APPELMANS et al., 1955 (478) mais la présence de cet enzyme dans les membranes plasmiques a été observée par EMMELOT et al., 1964 (479) qui trouvent d'ailleurs une activité différente avec le substrat : β -glycérophosphate ou p-nitrophényl-phosphate. Une activité phosphatase acide a été aussi trouvée par COLBEAU et al., 1971 (480) en utilisant le p-nitrophényl-phosphate. Nous avons utilisé ces deux substrats pour étudier l'activité phosphatasique acide de notre fraction membranaire. L'incubation a été effectuée dans les deux cas à pH 5 et l'activité est déterminée par dosage du phosphate ou du p-nitrophénol libéré

b - Résultats

L'activité β -glycéro-phosphatasique est de 0,223 μ moles par mg de protéines membranaires et par heure, elle est 3 fois plus réduite que dans l'homogénat. EMMELOT et al., 1964 (481) trouvent dans les mêmes conditions, une activité de 0,4 μ moles. L'activité p-nitrophényl-phosphatasique est plus forte 2,36 μ moles de p-nitrophénol libéré par mg de protéines et par heure, cette valeur est proche de celle trouvée par COLBEAU et al., 1971 (482) qui est de 3 μ moles. Cette activité est plus forte dans notre fraction membranaire que dans l'homogénat. Il semble, en fait, que ce soit l'activité β -glycérophosphatasique acide qui reflète la contamination par les lysosomes. Les membranes plasmiques doivent posséder par

elles mêmes une activité phosphatasique acide dont l'importance dépend du substrat utilisé.

c - Enzymes des mitochondries

Le microscope électronique ne nous a jamais montré la présence de mitochondries, mais les membranes mitochondriales isolées peuvent contaminer notre préparation, nous étudierons successivement un enzyme marqueur de la membrane mitochondriale externe : la mono-amine oxydase, un enzyme marqueur de la membrane mitochondriale interne : la succinodeshydrogénase.

c₁ - Mono-amine oxydase (EC 1. 4. 1. 4.)

α - Principe

La mono-amine-oxydase (MAO) a longtemps été considérée comme l'enzyme "marqueur" des membranes mitochondriales externes; SCHNAITZ et al., 1967 (483). Récemment, GORKIN, 1971 (484) a montré que dans l'hépatocyte du Rat, cette activité était très forte dans les membranes plasmiques (environ 10 fois plus forte que dans l'homogénat) est encore plus forte dans les membranes de l'enveloppe nucléaire.

Le dosage est effectué par la méthode de TABOR et al., 1955 (485) en mesurant en 250 nm la différence de densité optique due à la transformation de la benzylamine en benzaldéhyde.

β - Résultats

Nos résultats confirment les travaux de GORKIN 1971 (486), l'activité de 0,795 μ moles de benzaldéhyde formée par mg de protéines et par heure est proche de celle trouvée par cet auteur (0,66 μ moles) ainsi que le taux d'enrichissement qui est de 10. Il semble donc que cet enzyme ne puisse pas être considéré comme un enzyme marqueur des membranes mitochondriales externes, mais il est au contraire présent dans un grand type de membranes, membranes plasmique, nucléaires et mitochondriales.

c₂ - Succinodeshydrogénase (EC 1. 3. 99. 1)

α - Principe

La succinodeshydrogénase est avec la cytochrome oxydase un des principaux enzymes marqueurs des membranes mitochondriales internes (voir par exemple ALLMANN et al., 1968 (487)). Cet enzyme est intégré dans les chaînes d'oxydation cellulaires des crêtes mitochondriales internes.

Le dosage est effectué par la méthode de BONNER, 1955 (488) en suivant au spectrophotomètre à 400 nm la réduction du ferricyanure en ferrocyanure de potassium.

β - Résultats

L'activité trouvée pour notre fraction est de 2,3 μ moles de succinate consommé par mg de protéines et par heure. Cette activité est assez élevée, mais pour les mêmes membranes, COLBEAU et al., 1971 (489) trouvent une activité cytochrome oxydasique de 9 μ moles de cytochrome-c oxydé par mg de protéines et par heure. En fait, il semble que c'est la membrane mitochondriale interne qui soit le contaminant principal de notre fraction membranaire.

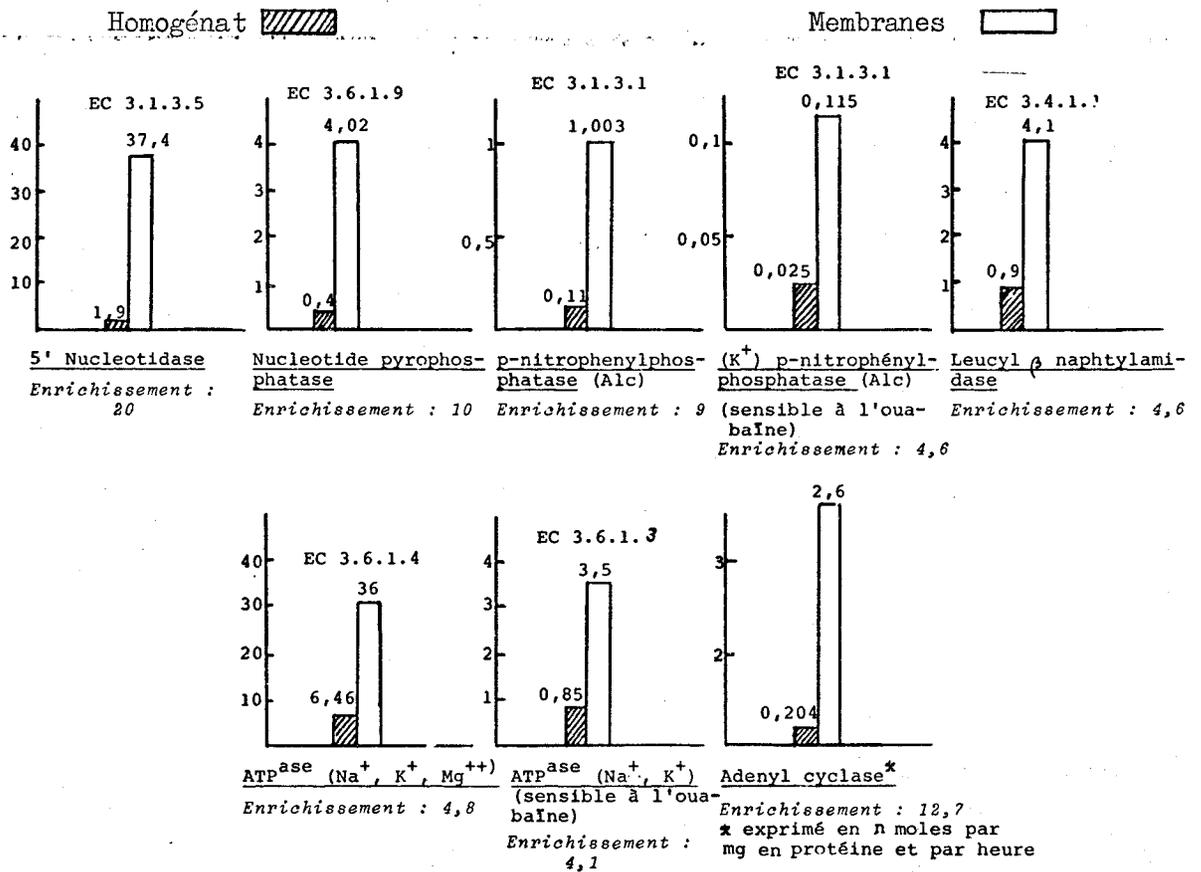
3 - Conclusions

L'étude de l'activité enzymatique de notre fraction membranaire confirme dans l'ensemble les résultats obtenus par microscopie électronique et par gradient de densité.

L'étude des enzymes "marqueurs" classiques des membranes plasmiques, résumée dans le tableau VIII (p. 88) montre que l'enzyme qui a le taux d'enrichissement le plus élevé est la 5'-nucléotidase, cet enzyme est considéré comme étant strictement localisé sur les membranes plasmiques. Les autres enzymes ayant des enrichissements de l'ordre de 10 ou de 4,5 sont des enzymes qui doivent avoir une répartition topographique plus large dans la cellule, en particulier les ATPases qui sont également présentes dans les cyto-membranes du réticulum endoplasmique. Les enzymes dont l'activité ou les modifications d'activité dépendent de la structure moléculaire

Tableau VIII

CARACTERISATION ENZYMATIQUE DE LA FRACTION MEMBRANAIRE (*)



(*) Valeurs exprimées en μ moles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.

de la membrane comme les ATPases ou l'adényl-cyclase, ont une activité normale. La structure moléculaire ne semble donc pas détruite durant l'isolement. La membrane conserve son activité de récepteur d'hormone et la fixation de celle-ci conduit à une stimulation de l'adényl-cyclase, c'est-à-dire que les relations protéines-protéines ou protéines-lipides sont conservées. Il peut évidemment se produire des remaniements moléculaires de la membrane n'altérant pas l'activité enzymatique.

La distribution d'enzymes caractéristiques des contaminants cellulaires est résumée dans le tableau IX (p. 90). Cette distribution est en faveur d'une contamination assez faible des membranes plasmiques par les cyto-membranes, mais les enzymes "marqueurs" présentent une distribution plus large que celle décrite en général pour ce type de contrôle. Par exemple, la mono-amine oxydase semble en fait plus abondante dans la membrane plasmique que dans les membranes mitochondriales externes, d'autre part, ces membranes ont également une activité glucose-6-phosphatase, phosphatase acide, l'interprétation est donc délicate. Il semble quand même que le contaminant principal soit les membranes mitochondriales internes.

Pour compléter la caractérisation de notre fraction, une étude biochimique sommaire sera décrite, cette étude nous permettra de comparer la composition globale des membranes avec celle décrite par les auteurs et de compléter ainsi notre étude sur les critères de pureté.

D - ETUDE BIOCHIMIQUE

L'étude de la composition chimique des membranes permet de rapprocher les valeurs obtenues de celles publiées par les différents auteurs. Envisagée sous cet aspect, l'étude de la composition chimique peut être considérée comme un critère de pureté.

1 - Dosage des protéines

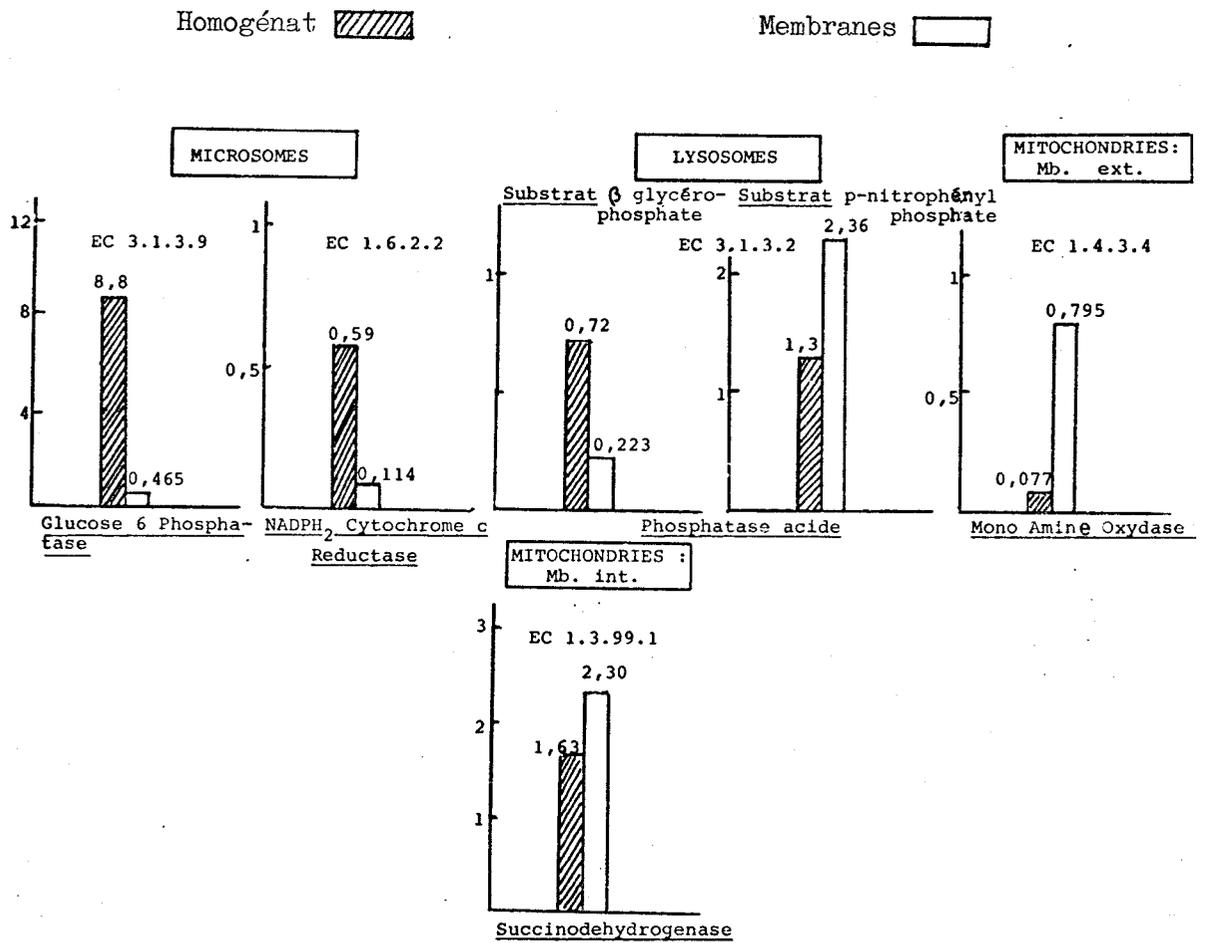
a - Principe

Les protéines peuvent être dosées par deux méthodes, soit par la méthode de LOWRY et al., 1951 (490). Il faut employer pour cela la méthode modifiée pour les protéines insolubles. Les membranes lyophilisées sont

Tableau IX

DISTRIBUTION D'ENZYMES CARACTERISTIQUES DES CONTAMINANTS

CELLULAIRES DANS LA FRACTION MEMBRANAIRE (*)



(*) Valeurs exprimées en μ moles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.



dissoutes dans une solution de soude 1 N. On peut également effectuer un dosage d'azote par la micro-méthode de KJEHLDAL. Les deux dosages sont effectués par rapport à la sérum-albumine bovine qui contient 15 p. 100 d'azote.

b - Résultats

La méthode de LOWRY nous donne un taux de protéines de 65 p. 100. Les membranes totales possèdent 8,8 p. 100 d'azote, le pourcentage de la fraction protéique mesurée après extraction des lipides avec le mélange chloroforme-méthanol 2 : 1 (v : v) est de 13,8 p. 100. Si on admet que la partie lipidique ne possède pratiquement pas d'azote (les ammoniums quaternaires de la phosphatidyl-choline ne sont pas transformés en sulfate d'ammonium par le mélange destructeur) on peut conclure que la fraction protéique représente 65 p. 100 du poids des membranes. Ce pourcentage confirmé par les deux méthodes, est proche de celui donné par différents auteurs en particulier EMMELOT et al., 1964 (491) (voir tableau X (p. 92)).

2 - Dosage du phosphore

a - Principe

Le dosage du phosphore a été effectué en mesurant la quantité de phosphore libéré après destruction par l'acide perchlorique des fractions lipidique, protéinique et des membranes totales par la méthode de FISKE-SUBBAROW.

b - Résultats

Les membranes totales présentent un pourcentage de phosphore de 0,7. Dans ce cas, le rapport $\frac{\text{Protéine (mg)}}{\text{Phosphore (\mu g)}} = 2,9$. Ce rapport correspond à 10 μ g de phosphore par mg de protéine.

La fraction lipidique renferme une quantité de phosphore de 6,7 μ g par mg de membranes. Si on considère que la masse moléculaire moyenne d'un phospholipide est de 770, on a 16 mg de phospholipides pour 100 mg de membranes ce qui correspond à 25 mg de phospholipides pour 100 mg de protéines membranaires. Le tableau X (p. 92) permet de vérifier ces différentes valeurs ainsi que le rapport

Tableau X

COMPOSITION CHIMIQUE COMPAREE DES MEMBRANES PLASMIQUES DE FOIEDE RAT

	EMMELOT et al., 1964 (492)	RAY, 1970 (493)	Résultats personnels
p. 100 de protéines	65	-	65
<u>mg de protéine</u> <u>μM de phosphore</u>	2,2 à 2,9	1,2	2,9
mg de phospholipides pour 100 mg de protéines mem- branaires	27	60	25
<u>μM de phosphore phospholi- pide</u> <u>μM de phosphore membranai- re total</u>	0,9	0,93	0,95
<u>μM de cholesterol</u> <u>μM de phosphore phospho- lipidique</u>	0,38	-	0,39



molaire du phosphore phospholipidique sur le phosphore total lié aux membranes est proche des valeurs trouvées par EMMELOT et al., 1964 (494).

La fraction protéinique renferme 0,155 p. 100 de phosphore, ce phosphore provient d'une part des phosphoprotéines qui sont présentes dans les membranes (BLAT et HAREL, 1969 (495)), et d'autre-part, vraisemblablement aux RNA associés aux protéines comme semblent le démontrer DAVIDOVA et SHAPOT, 1970 (496).

3 - Dosage du cholestérol

a - Principe

Le dosage du cholestérol total a été effectué par la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD d'après la méthode de STADTMAN, 1955 (497).

b - Résultats

Le dosage donne 3,7 mg de cholestérol pour 100 mg de membranes. Le rapport molaire : cholestérol/phosphore phospholipidique est de 0,39. Dans les mêmes conditions, EMMELOT et al., 1964 (498) trouvent des valeurs de 0,4 à 0,39.

4 - Conclusions

Notre préparation membranaire a des caractéristiques proches de celle isolée par EMMELOT et al., 1964 (499) mais elle semble plus pauvre en phospholipides que celle isolée par RAY, 1970 (500). La similitude de la composition chimique de notre fraction avec celle isolée par d'autres auteurs sont un argument de plus en faveur de la pureté des membranes, en particulier, la richesse en cholestérol. En effet, les cyto-membranes sont en général plus pauvres en cholestérol que les membranes plasmiques, et le rapport $\frac{\text{mole de cholestérol}}{\text{mole de phospholipides}}$ pour les membranes d'hépatocyte du Rat est de 0,11 à 0,27 pour les microsomes, 0,11 à 0,18 pour la membrane mitochondriale externe et 0,02 pour la membrane mitochondriale interne. Le rapport de 0,39 que nous obtenons prouve que le type de membrane obtenu est une membrane plasmique et que le taux de contamination par d'autres membranes est faible.

ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

Les membranes plasmiques isolées dans un état de pureté suffisant nous permettent donc d'aborder l'étude des glycoprotéines membranaires avec un matériel suffisamment pur. Ceci nous permet d'employer des méthodes d'analyse très fines en général fondées sur l'utilisation des molécules radioactives.

Notre étude se divisera en deux parties : une étude sur les glycoprotéines totales solubilisées grâce à l'emploi des détergents, une étude sur les glycopeptides isolés après action d'un agent protéolytique.

I - ETUDE SUR LES GLYCOPROTEINES TOTALES

A - CARACTERISATION CHIMIQUE DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

1 - Principe

Nous appliquerons pour caractériser chimiquement les glycoprotéines membranaires la méthode employée par GURD *et al.*, 1972 (501) qui consiste en un fractionnement des membranes par un agent alcalin, puis par une solution aqueuse de pyridine. Les trois fractions obtenues : alcali-soluble, pyridine-soluble, pyridine-insoluble sont ensuite caractérisées par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sepharose 6 B. Cette méthode permet d'avoir une idée de la répartition et du poids moléculaires des glycoprotéines dans les trois fractions. La caractérisation chimique s'effectue par dosage des protéines, glucides et phospholipides dans chaque fraction.

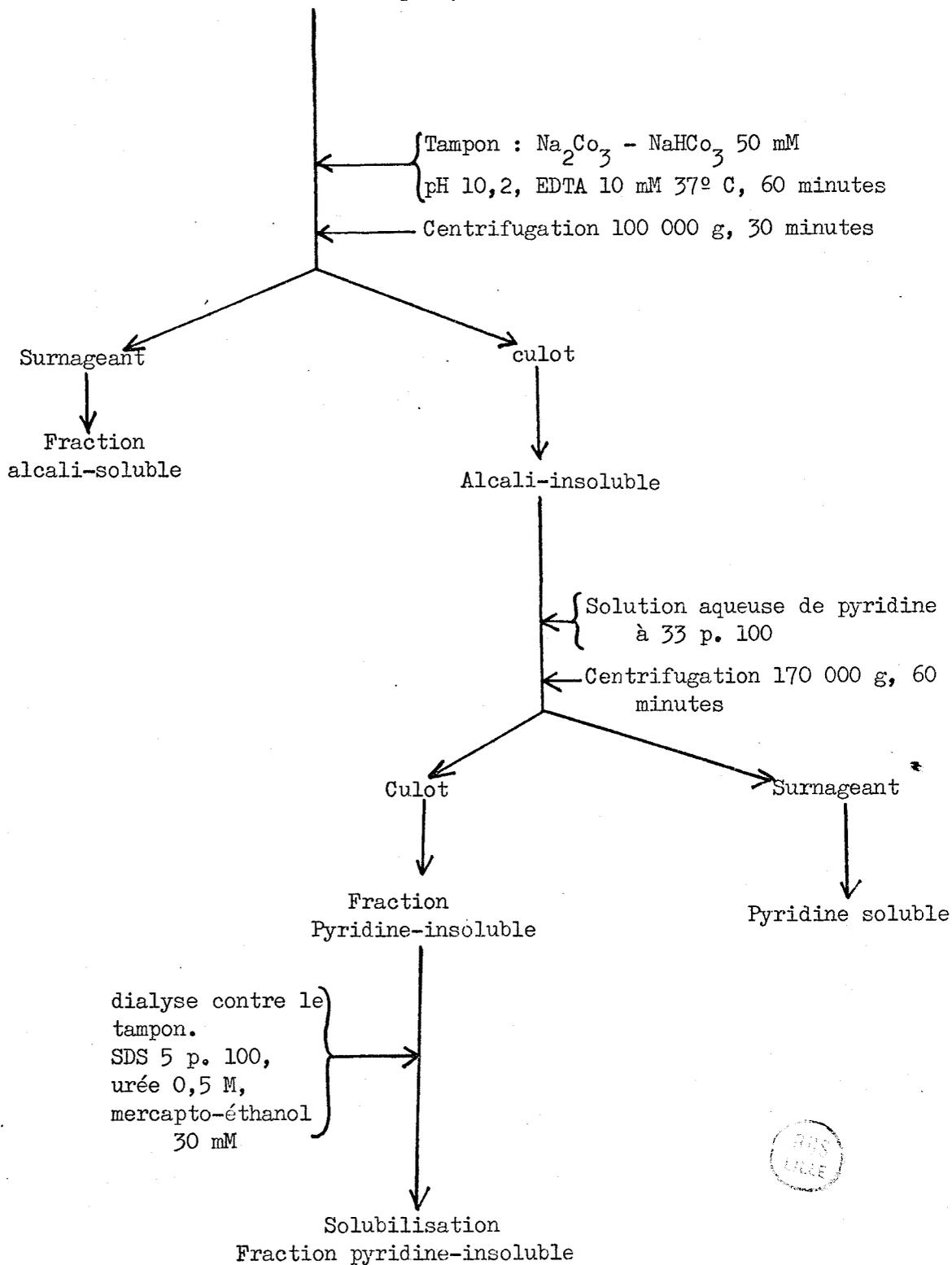
2 - Solubilisation

Les étapes de la solubilisation sont schématisées dans le tableau XI (p. 95). 50 mg de membranes sont lavées avec une solution de NaCl 0,9 p. 100 dans du tampon Tris-HCl 5 mM pH 7,6. La fraction alcali-soluble est obtenue par action du tampon Na_2CO_3 - NaHCO_3 50 mM pH 10,2 - EDTA 10 mM à 37° C pendant 60 minutes.

Tableau XI

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DES MEMBRANES PLASMIQUES D'HEPATOCYTES DE RAT (*)

Membranes lavées avec une solution de NaCl 0,9 p. 100
Tris-HCl 5 mM pH 7,6



(*) Méthode de GURD et al., 1972 (502).

Après centrifugation à 100 000 g pendant 30 minutes dans le rotor 40 (Beckman), on obtient un surnageant appelé fraction alcali-soluble, - qui, après dialyse contre de l'eau distillée, est lyophilisée -, et un culot ou fraction alcali-insoluble. Cette dernière est resuspendue dans 10 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 33 p. 100 (v : v) à 0° C et homogénéisée par 20 allers et retours du piston de l'appareil de Potter et Elvehjem. Après centrifugation à 100 000 g pendant 1 heure dans le rotor 40 (Beckman) on obtient un surnageant ou fraction pyridine soluble, qui, dialysé de la même manière que précédemment, est lyophilisé. Le culot ou fraction pyridine insoluble est dialysé 18 heures à 20° C contre 500 ml de tampon suivant : SDS 8 p. 100, urée 0,5 M, mercapto-éthanol 30 mM, ce qui permet sa solubilisation et sa chromatographie ultérieures.

3 - Incorporation de précurseurs radioactifs dans les membranes

En vue du repérage des glycoprotéines et phospholipides dans l'effluent de la colonne de chromatographie, il est intéressant d'obtenir des glycoprotéines et des glycolipides marqués. En effet, cette chromatographie s'effectuant en présence de détergent, les dosages classiques des glucides et des phospholipides sont imprécis et délicats. Un simple comptage des fractions de la chromatographie permettra un repérage immédiat des glycoprotéines et des phospholipides. Le marquage des glycoprotéines s'effectuera grâce à la glucosamine ^{14}C , et celui des phospholipides grâce à l'injection de phosphate (^{32}P).

a - Glucosamine (14-C)

Pour obtenir un marquage maximum, il est nécessaire d'étudier l'incorporation du précurseur en fonction du temps. Cette expérience a été menée en injectant à des rats 10 μCi de D-glucosamine 14-C₁ (activité spécifique 51 mCi par mM), après sacrifice des rats au temps 30', 1 h, 2 h, 3 h et 6 h, les membranes sont préparées de façon classique et la radioactivité des membranes totale des protéines membranaires après extraction des lipides avec le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1) (v : v) est mesurée ainsi que celle de la fraction lipidique. La radioactivité spécifique par mg de protéines est calculée après dosage des protéines par la méthode de LOWRY avec la serum albumine bovine comme témoin.

La cinétique d'incorporation donne la courbe représentée par la figure 36 (p.). La radioactivité maximum est obtenue pour la membrane totale et les protéines membranaires après un temps de contact de 2,5 heures, ce qui est proche de la valeur trouvée par MIYAJIMA et al., 1970 (503) qui est de 3 heures, et de celle de EVANS et GURD, 1971 (504) qui est de 2 heures. L'incorporation au niveau des glycolipides est maximum au bout de 2 heures. Nous choisirons donc pour le reste de l'expérimentation un temps d'incorporation de 2,5 heures. La radioactivité spécifique avec comptage dans le BRAY* (10 ml de BRAY + 1 ml de la suspension membranaire) est de 4 000 cpm par mg de protéines membranaires. Cette radioactivité faible, est suffisante pour un repérage des glycoprotéines après chromatographie.

b - Phosphate (^{32}P)

Le repérage des phospholipides se fait par injection intrapéritonéale de 50 μCi de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ par 100 g de poids (activité spécifique 0,66 Ci par mM). L'injection se fait 18 heures avant la sacrifice et les membranes sont préparées par la méthode classique. Le comptage de la radioactivité liée au phosphore-32 s'effectue grâce à la scintillation liquide dans les mêmes conditions que précédemment.

4 - Chromatographie

La chromatographie s'effectue suivant la méthode de GURD et al., 1972 (505) sur une colonne de Sépharose 6 B équilibrée avec le tampon suivant : SDS 0,5 p. 100, urée 0,5 M dans un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8. La colonne est de 1 x 100 cm et le débit de 6 ml/heure. Des fractions de 3,5 ml sont recueillies. La densité optique à 280 nm est mesurée pour connaître la répartition des protéines

* Composition du BRAY utilisée pour les comptages en scintillation liquide : 60 g de naphthalène, 4 g de PPO, 0,2 g de POPOP, 20 ml d'éthyléneglycol , 100 ml de méthanol, qsp. 1 l avec du dioxanne.

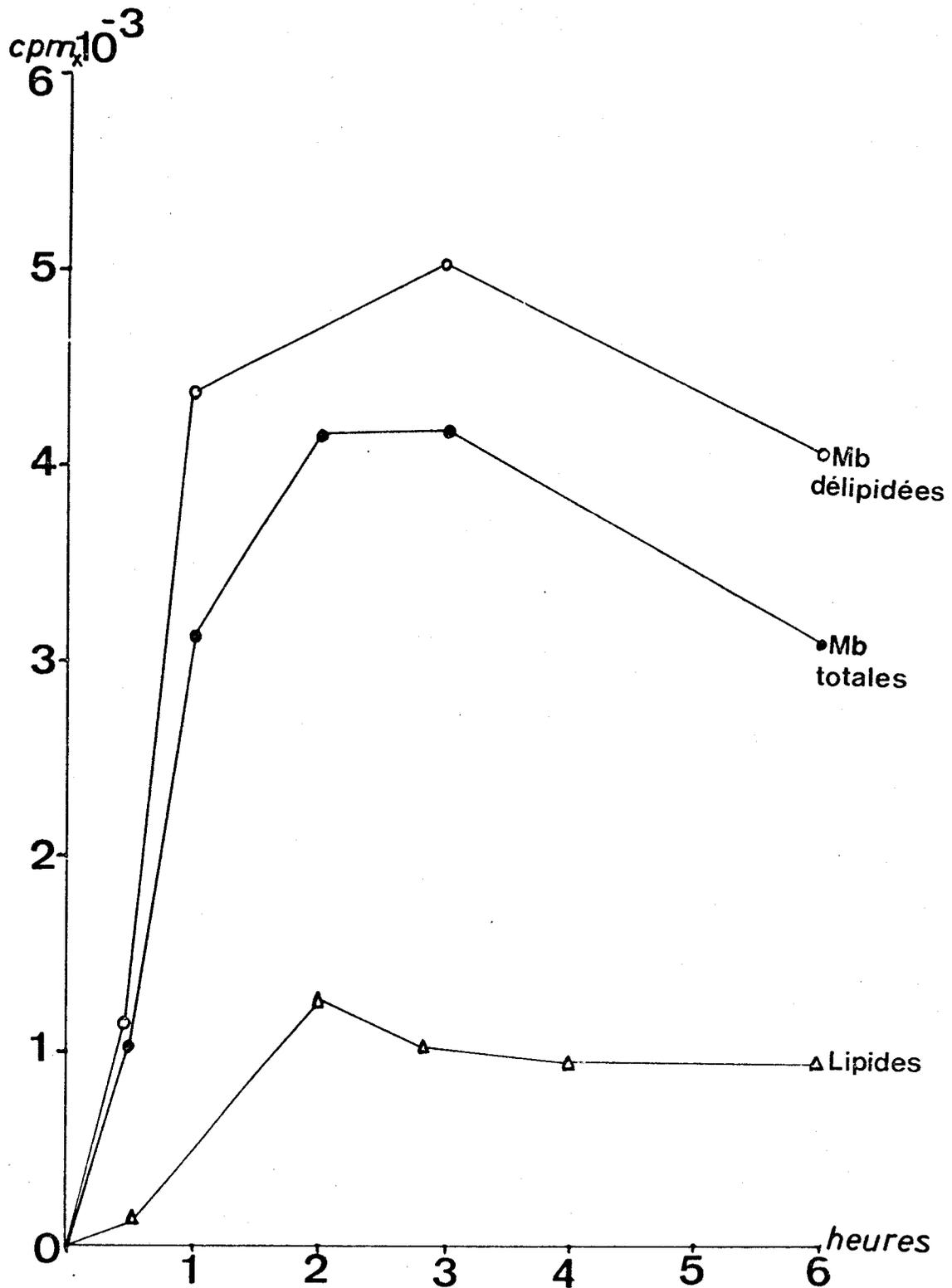


Figure 36

Cinétique d'incorporation de la Glucosamine ^{14}C dans les membranes plasmiques d'hépatocyte de Rat.



et les comptages pour la glucosamine ^{14}C ou le ^{32}P sont effectués sur des aliquots de chaque fraction.

Le marquage des glycoprotéines et des phospholipides est réalisé sur des préparations différentes, mais, analysés dans les mêmes conditions chromatographiques. En effet, les méthodes de double marquage sont impossibles avec ces deux isotopes.

5 - Résultats

a - Composition des fractions

La composition de chaque fraction est étudiée en dosant la quantité de protéines, d'oses neutres, d'acides sialiques et d'osamines. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de LOWRY avec la sérum albumine bovine comme témoin. Les oses sont dosées après précipitation à l'ATCA à 10 p. 100 des protéines, centrifugation et dosage à l'orcinol sur 0,1 ml (micro-méthode) par la méthode de TILLMANS et PHILIPPI, 1929 (506) modifiée par RIMINGTON, 1940 (507). Les acides sialiques sont dosés également après précipitation à l'ATCA à 10 p. 100, centrifugation, hydrolyse par l'ATCA à 5 p. 100, 1 h à 80° par la méthode de WARREN, 1959 (508) modifiée par SAIFER et GERSTENFELD, 1962 (509). Les osamines sont dosées après hydrolyse par l'Hcl 4 N, 4 heures à 100° C par la méthode d'ELSON MORGAN, 1933 (510) modifiée par BLIX, 1948 (511). Le dosage du phosphore a été effectué après destruction par l'acide perchlorique des différentes fractions par la méthode de FISKE et SUBBAROW.

La répartition de ces différents composés est résumée dans le tableau XII (p.100). La fraction alcali-soluble représente 35 p. 100 des protéines totales, elle est pauvre en acide sialique et en osamines et comprend très peu de phospholipides. L'immunoélectrophorèse de cette fraction a été effectuée avec du sérum de Lapin immunisé avec des membranes totales. La fraction est dialysée contre un tampon Tris-Hcl 0,1 M pH 8,7, urée 2 M, Triton X 100 2 p. 100 et l'immunoélectrophorèse est réalisée suivant la méthode de DEMUS et MEHL, 1970 (512). La figure 37 (p. 101) montre l'immunoélectrophorèse obtenue avec la fraction membranaire totale et la fraction alcali soluble. On voit nettement que cette fraction est hautement antigénique, qu'elle réagit avec un immusérum membranaire, et que l'on retrouve l'arc de précipitation dans la fraction membranaire totale. Ces résultats suggèrent que

COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS DES MEMBRANES PLASMIQUES

D'HEPATOCYTES DE RAT (*)



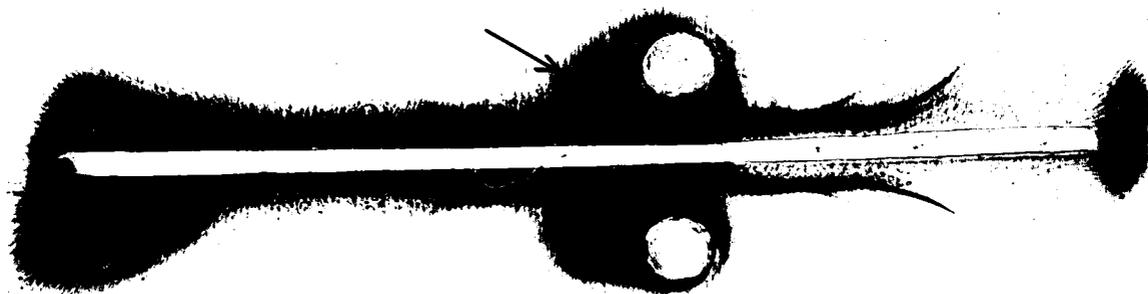
	Protéines		Osés neutres			Acides sialiques			Hexosamines			P-lipidique		
	mg	p.100	µg	p.100	$\frac{\mu M}{g \text{ Prot}}^*$	µg	p.100	$\frac{\mu M}{g \text{ Prot}}^*$	µg	p.100	$\frac{\mu M}{g \text{ Prot}}^*$	µg	p.100	$\frac{mg \text{ PL}}{g \text{ Prot}}^{\circ}$
Membranes totales	22,5	100	1015,5	100	250	279,3	100	40,2	210,6	100	52	6100	100	270
Alcali-soluble	7,84	34,84	230	22,65	163	38	13,6	15,7	50,3	23,9	35,8	595	9,8	761
Pyridine soluble	8,21	36,48	350,5	34,51	237	159	56,9	62,7	51,38	24,4	39,2	2500	41	320
Pyridine insoluble	5,93	26,35	423	41,65	396	54,7	19,6	29,8	106,35	50,5	99,5	3000	49,1	505
Total	21,98	97,67	1003,5	98,81	-	251,7	90,1	-	208,06	98,8	-	6095	99,9	-

(*) à partir de 25 g de foie frais.

* $\frac{\mu M}{g \text{ Prot}}$: $\frac{\mu \text{ moles}}{g \text{ de Protéines}}$

° $\frac{mg \text{ PL}}{g \text{ Prot}}$: $\frac{mg \text{ de Phospholipides}}{g \text{ de Protéines}}$

A



B

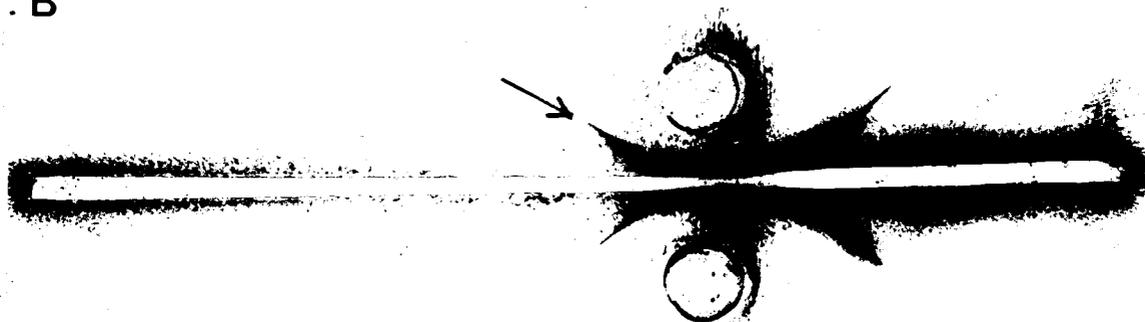


Figure 37

Immunoélectrophorèse des membranes plasmiques totales et de la fraction alcali-soluble.

A : Membranes totales ; B : Fraction alcali-soluble.

cette fraction doit contenir l'antigène de membrane organo-spécifique du foie de Rat isolé par NEVILLE, 1968 (513) par extraction dans un tampon K_2CO_3 50 mM ou l'EDTA 1 mM. Ceci confirme également les résultats de GURD et al., 1972 (514) chez la Souris.

La fraction pyridine soluble représente également 30 p. 100 des protéines totales, elle est très riche en acides sialiques. Cette fraction sialoglycoprotéique reste d'ailleurs associée à des phospholipides même après extraction à la pyridine. Cette fraction ne donne aucun arc après immunoélectrophorèse dans les conditions décrites précédemment. Ce manque de réactivité peut-être dû à un manque d'antigène, ou à une dénaturisation de ceux-ci après solubilisation par la pyridine. En effet, d'après SHEFFIELD et EMMELOT, 1971 (515) les antigènes membranaires sont de nature protéique et dépendent donc de la conformation de ces molécules à la surface de la membrane.

La fraction pyridine insoluble est la plus riche en phospholipides elle contient beaucoup d'osamines et d'oses neutres mais relativement peu d'acides sialiques. Cette fraction non plus ne donne aucun arc en immunoélectrophorèse avec un immunosérum contre les membranes.

Ce fractionnement paraît donc solubiliser trois types de complexes lipoglycoprotéiques différents. Un premier complexe pauvre en phospholipides mais fortement antigénique, un second plus riche en phospholipides que le précédent et très riche en acides sialiques, le troisième très riche en phospholipides contient essentiellement des osamines et des oses neutres mais peu d'acides sialiques. L'étude se poursuit par la chromatographie de chacune de ces fractions sur Sépharose 6 B.

b - Etude chromatographique

Chaque fraction marquée soit à la glucosamine ^{14}C soit au ^{32}P est chromatographiée sur Sépharose 6 B. La figure 38 (p.103) montre le résultat des trois chromatographies.

La fraction alcali-soluble présente une répartition très large des glycoconjugués, de faible masse moléculaire. Les phospholipides sont élevés en deux pics, un pic est associé à des protéines, l'autre correspond à des micelles SDS-phospholipides.

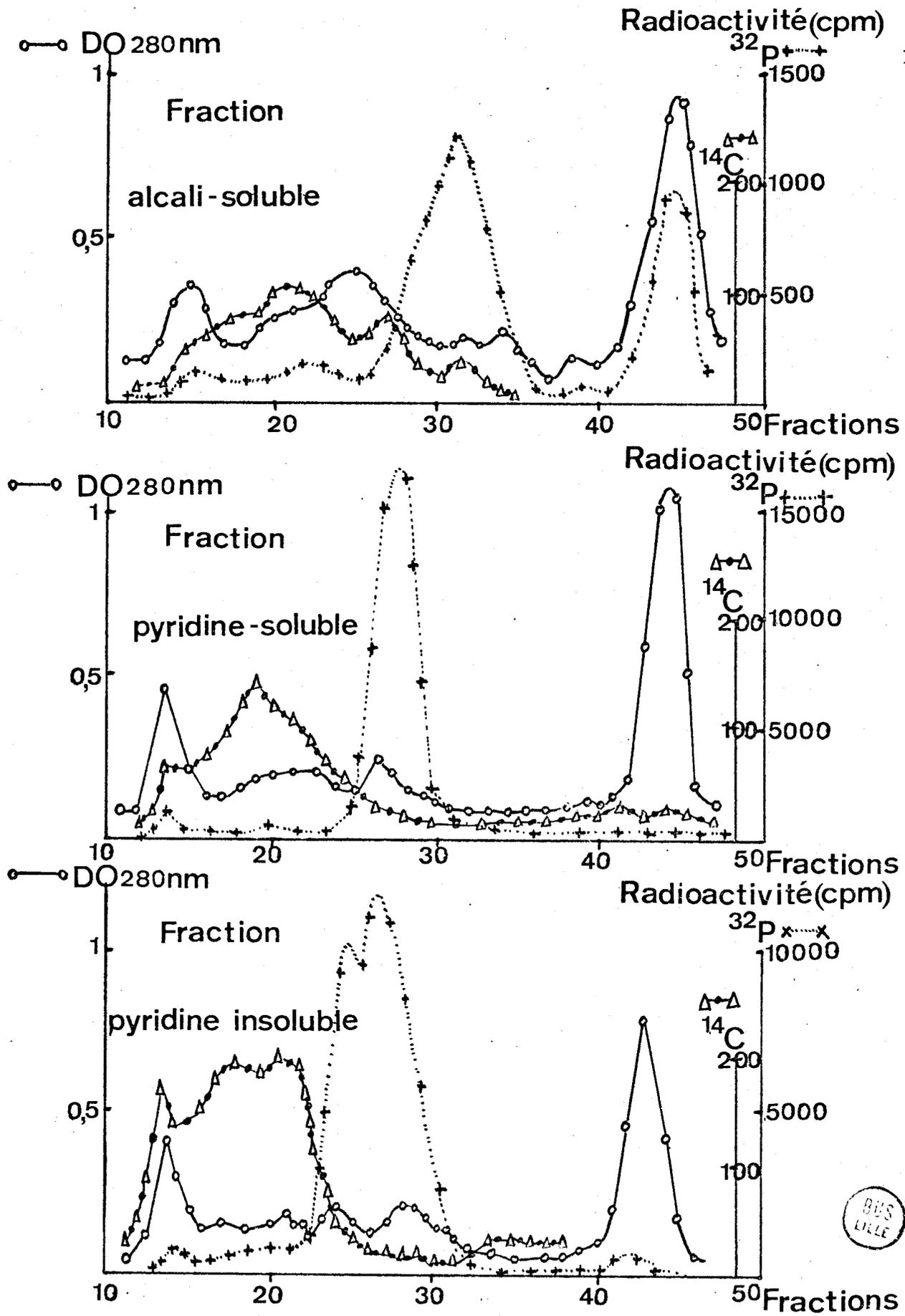


Figure 38

Chromatographie sur sépharose 6 B des trois fractions : alcali-soluble, pyridine soluble, pyridine insoluble, des membranes plasmiques. Les protéines sont localisées par lecture de la densité optique à 280 nm, la position des phospholipides et des glycoprotéines est déterminée par la mesure de la radioactivité du ³²P et du ¹⁴C après injection de phosphate et de glucosamine radioactifs.



La fraction pyridine soluble a une répartition moins large et on observe un déplacement vers les hauts poids moléculaires. Dans cette fraction, tous les phospholipides sont associés à des protéines.

Dans la fraction pyridine insoluble, les glycoprotéines sont encore déplacées vers l'exclusion de la colonne, c'est-à-dire vers les hauts poids moléculaires, et comme dans l'autre fraction, tous les phospholipides sont associés à des protéines.

6 - Conclusions

Les glycoprotéines membranaires sont en étroite relation avec les phospholipides. En effet, l'action d'un agent alcalin léger (tampon $\text{CO}_3\text{Na}_2 - \text{CO}_3\text{HNa}$ pH 9,7) solubilise seulement peu de glycoprotéines. Ces protéines sont antigéniques et ne possèdent que peu de relation avec les phospholipides en effet, elles n'entraînent dans leur solubilisation que peu de phospholipides (10 p. 100). Ceux-ci sont d'ailleurs pour moitié libérés par action des détergents. Ces glycoprotéines doivent être vraisemblablement externes à la membrane car elles réagissent avec un immunosérum contre les membranes totales, et doivent avoir un poids moléculaire relativement faible car elles sont retenues sur la colonne de sépharose 6 B.

L'action d'une solution de pyridine à 33 p. 100, solubilise des glycoprotéines en relation plus étroite avec les phospholipides. Ces glycoprotéines entraînent lors de leur solubilisation une grande quantité de phospholipides (40 p. 100), elles sont de masse moléculaire plus élevée que précédemment et riches en acides sialiques, ceci est en accord avec les résultats de BLUMENFELD, 1968 (516) qui solubilise ainsi sélectivement les sialoglycoprotéines de la membrane erythrocytaire.

La fraction la plus importante des glycoprotéines reste associée aux lipides membranaires, leur solubilisation nécessite l'emploi de détergent comme le SDS. Ces lipoglycoprotéines sont de poids moléculaire élevé, riches en oses neutres et osamines, plus pauvres que les précédentes en acides sialiques.

La figure 39 (p.106) résume ces données et montre comment à partir de ces résultats, on peut représenter l'intégration de ces trois types de glycoprotéines dans la membrane. Comme il y a une association étroite lipides-protéines qui n'est détruite qu'en présence de détergents, une étude plus approfondie de ces glycoprotéines nécessite une solubilisation totale de ces molécules, c'est-à-dire une séparation des glycoprotéines et des lipides associés. Ceci a été réalisé grâce à l'emploi de SDS plus concentré et de mercapto-éthanol qui en plus de son action réductrice sur les ponts disulfures empêche la réaggrégation des protéines membranaires entre elles, GURD et al., 1972 (517).

B - SEPARATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

Cette étude s'effectuera par électrophorèse en gel de polyacrylamide des glycoprotéines solubilisées grâce à un détergent.

1 - Solubilisation de la fraction membranaire

Nous avons choisi comme agent de solubilisation le SDS, le milieu de solubilisation est celui utilisé par GLOSSMANN et NEVILLE, 1971 (518), il contient du Na_2CO_3 0,05 M, du SDS 5 p. 100 et du β -mercapto-éthanol à 10 p. 100 (v : v). La dissolution s'effectue à la température de la pièce en ajoutant 5 mg de protéines membranaires pour 1 ml de solution.

Avant l'électrophorèse, les membranes peuvent être dialysées pendant 15 heures à 4° C contre un tampon contenant de l'urée 2 M, du dithiothreitol 0,05 p. 100 et du SDS 0,1 p. 100, de manière à équilibrer les compositions ioniques de l'échantillon et du gel supérieur.

2 - Séparation des protéines en gel de polyacrylamide

a - Principe

Le choix du SDS (détergent anionique) connu comme agent de solubilisation ne permet pas de séparer les protéines suivant leurs charges comme dans une électrophorèse classique. En effet, les complexes SDS protéines migrent tous comme des anions, et la presque totalité de la charge négative de tels com-

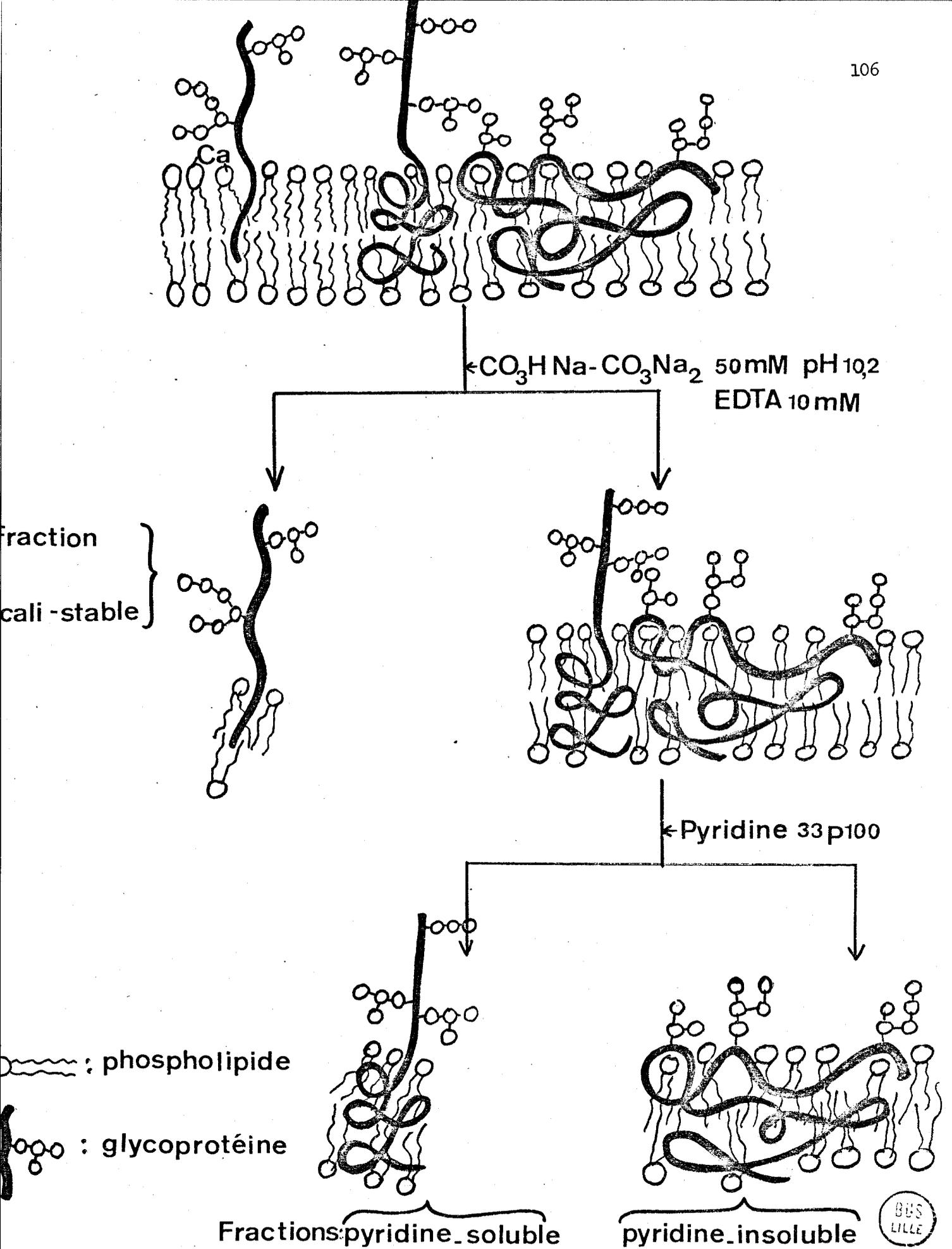


Figure 39

Intégration des glycoprotéines dans la membrane plasmique d'après les résultats obtenus par solubilisation séquentielle des glycoprotéines membranaires.

plexes provient du groupement anionique du détergent. Il ne s'agit donc plus d'une électrophorèse mais d'un tamisage moléculaire entre les mailles du gel de polyacrylamide.

La méthode que nous avons choisie est celle de NEVILLE, 1971 (519) en employant le gel standard : T = 11,1 et C = 0,9 suivant la numérotation de HJERTEN, 1962 (520). Les détails techniques de la préparation du gel, de sa calibration et de l'électrophorèse proprement dite, sont décrits dans l'annexe technique (p.176).

b - Résultats

La figure 40 (p.108) montre le résultat d'une telle électrophorèse obtenue avec des dépôts de 25, 50, 75, 100, 125 µg de protéines membranaires et une coloration au bleu de Coomassie brillant par la méthode de WEBER et OSBORN, 1969 (521). Ces électrophorèses montrent une quarantaine de bandes correspondantes à des protéines de poids moléculaires très différents s'étalant de 4 000 daltons à 1 000 000 daltons, c'est-à-dire toute la gamme des poids moléculaires susceptible d'être déterminée par cette méthode. C'est cette technique que nous avons donc choisie à cause de son pouvoir séparateur pour mettre en évidence les glycoprotéines membranaires.

3 - Mise en évidence des glycoprotéines membranaires

a - Principe général

Le repérage des glycoprotéines sur gel de polyacrylamide est délicat lorsqu'il s'agit de complexe glycoprotéines-SDS, en effet, le détergent interfère avec les glucides lors de la coloration de Schiff. L'emploi d'un marquage spécifique des sialoglycoprotéines membranaires en utilisant des molécules marquées nous a semblé une méthode plus précise et mieux adaptée à notre étude.

Nous avons employé pour cela une dégradation de Smith modifiée suivant la méthode de VAN LENTEN et ASHWELL, 1971 (522) qui consiste en une courte oxydation périodique des résidus d'acide sialique, suivie par une réduction au borohydrure de sodium tritié des groupements aldéhydiques obtenus après action de

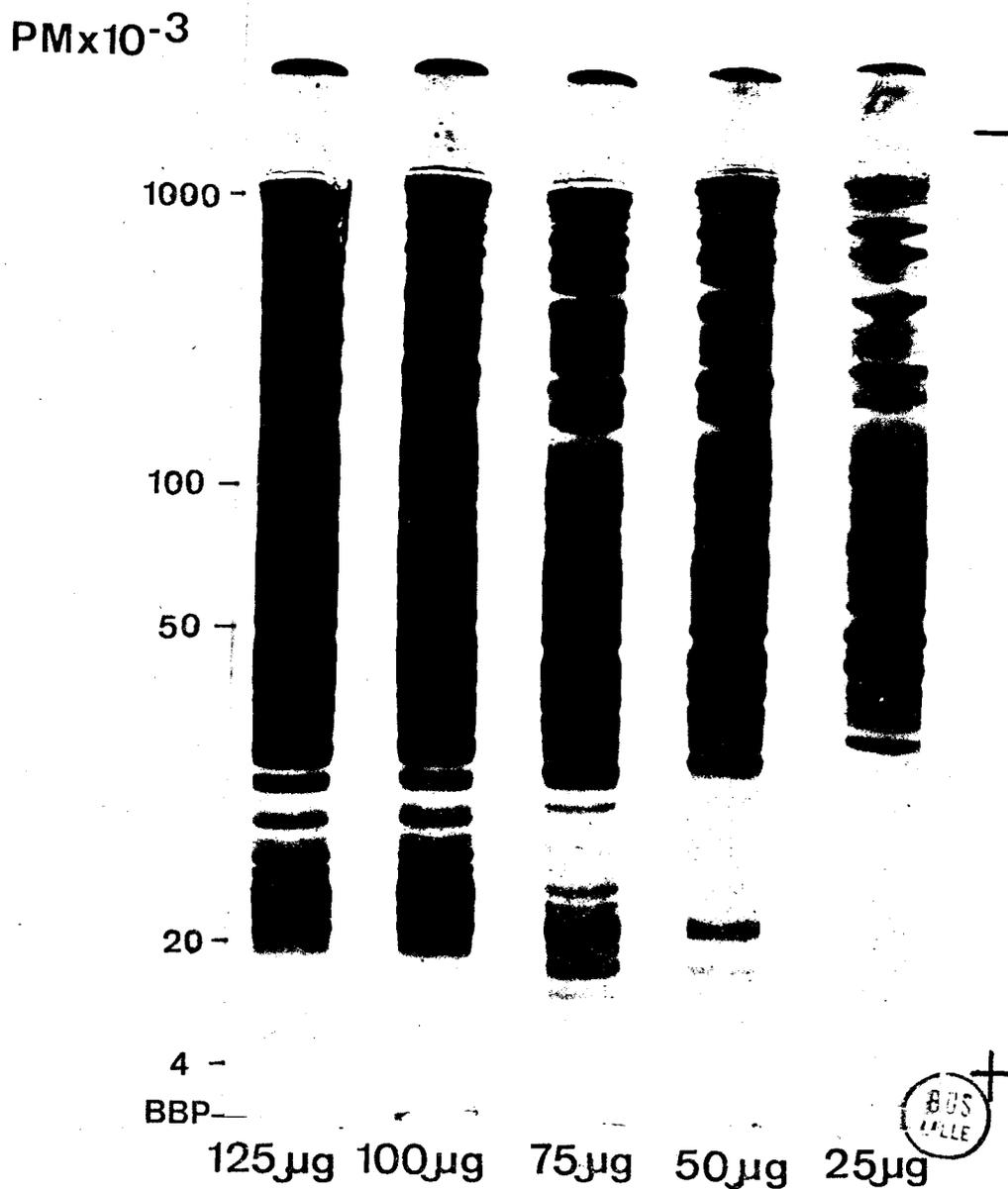


Figure 40

Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines membranaires

Gel 11,1 x 0,9

Dépôts de 25, 50, 75, 100, 125 µg de Proteines

Coloration : Bleu de Coomassie Brillant.

BBP : Bleu de Bromo-Phénol.

l'acide périodique. Cette méthode a été employée par BLUMENFELD et al., 1972 (523) pour l'étude des sialoglycoprotéines de la membrane de l'hématie. La suite des opérations est schématisée dans la figure 41 (p.110), on obtient finalement le dérivé de l'acide N-acétyl-neuraminique qui possède 7 carbones (NANA_7) marqué grâce au tritium sur la fonction alcool primaire du carbone 7.

b - Marquage des sialoglycoprotéines membranaires

b₁ - Principe

Le marquage des sialoglycoprotéines est réalisé sur les membranes totales après isolement, ceci présente l'avantage de marquer toutes les glycoprotéines de manière identique, ce qui permet de mesurer l'importance relative de chaque glycoprotéine, d'autre part, les membranes étant insolubles ceci simplifie les problèmes de lavage et de récupération des membranes marquées par rapport à une glycoprotéine soluble. La fraction membranaire marquée est alors solubilisée et les glycoprotéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide comme précédemment.

b₂ - Mode opératoire

Le marquage s'effectue en tube de centrifugation conique (centrifugeuse Jouan) sur 5 mg de protéines membranaires. L'oxydation est réalisée en ajoutant 1 ml d'une solution de NaIO_4 (métapériodate de sodium) 2 mM dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4. L'oxydation très courte (10 minutes à la température de la pièce) est arrêtée par sédimentation des membranes à 5 000 g pendant 15 minutes. L'excès de NaIO_4 et les produits de dégradation sont éliminés par deux lavages des membranes avec 20 ml du même tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Les groupements aldéhydiques membranaires sont alors réduits pendant 20 minutes à la température de la pièce avec 1,25 mC de borohydrure de sodium (3-H) (activité spécifique : 15 Ci par mM), cette réduction est achevée en ajoutant 10 mg de borohydrure de sodium froid et en laissant agir 20 minutes. L'excès de borohydrure est éliminé ensuite par trois lavages avec 20 ml du tampon phosphate et un lavage à l'eau distillée.

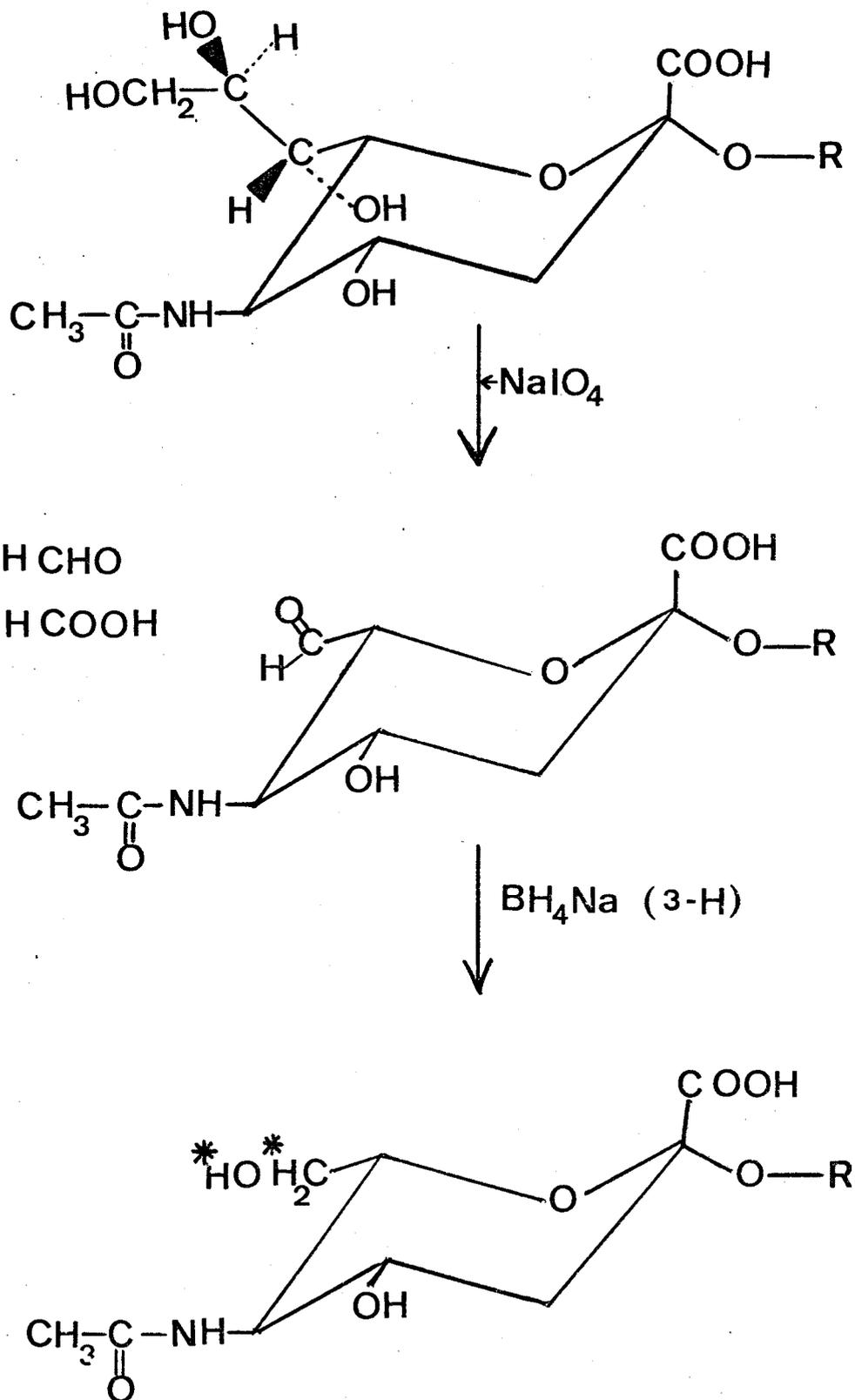


Figure 41

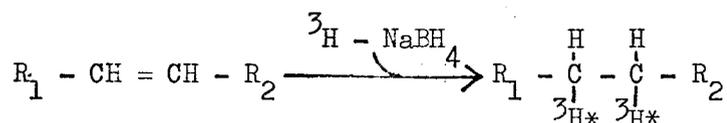
Principe du marquage des sialoglycoprotéines membranaires par oxydation périodique courte suivie par une réduction avec le borohydrure de sodium tritié.

Un témoin est réalisé en omettant l'oxydation par l'acide périodique. La réduction est réalisée directement en mélangeant les 5 mg de protéines membranaires et le borohydrure de sodium tritié (^3H) dans les mêmes conditions que précédemment. On lave de la même façon trois fois avec 20 ml de tampon phosphate puis avec 20 ml d'eau distillée.

b_3 - Résultats

α - Activité spécifique

Cette méthode donne une radioactivité spécifique des sialo-glycoconjuguées très élevée. Le tableau XIII (p.112) montre que le traitement par le borohydrure seul donne une activité spécifique de 115 000 cpm par mg de protéine (comptage dans la solution de BRAY), cette radioactivité est principalement due à la réduction des doubles liaisons des acides gras des lipides membranaires suivant la réaction :



La radioactivité spécifique des membranes réduites après oxydation par l'acide périodique est de 2 750 000 cpm par mg de protéine (dans les mêmes conditions de comptage), la différence de 1 600 000 cpm par mg de protéine est due au marquage des acides sialiques, qui contribue pour 58 p. 100 au marquage total. Ce marquage spécifique sur l'acide N-acétyl-neuraminique est d'ailleurs prouvé par les expériences de mise en évidence du NANA_7 .

β - Mise en évidence du NANA_7

La mise en évidence du NANA_7 radioactif nécessite la synthèse de ce dérivé à partir de l'acide N-acétyl-neuraminique.

β_1 - Synthèse du NANA_7 témoin

La synthèse est effectuée par la méthode de YU et LEDEEN, 1969 (524), elle est effectuée en quatre étapes : synthèse du méthyl oside de l'acide N-acétyl-neuraminique, oxydation du méthyl oside par l'acide périodique, réduction de l'aldéhyde formé par le borohydrure de sodium, hydrolyse de la liaison méthylosidique.

Tableau XIII

RADIOACTIVITE SPECIFIQUE LIEE AUX MEMBRANES PLASMIQUES APRES REDUCTION
PAR LE BOROHYDRURE TRITIE, AVEC OU SANS OXYDATION PREALABLE PAR L'ACIDE PERIODIQUE

	cpm par mg de protéines membranaires (*)	Pourcentage
HIO ₄ (10 minutes) puis BH ₄ Na (3 - H) 1,5 mC	27 50 000	100
BH ₄ Na (3 - H) 1,5 mC	11 50 000	42
Radioactivité liée à l'acide sialique des sialoglycocon- jugués.	16 00 000	58

(*) Comptage en scintillation liquide dans 10 ml de BRAY.



Le méthyl-oside de l'acide N-acétyl-neuraminique est préparé en faisant agir sur 50 mg de ce composé 8 ml de méthanol absolu préparé en présence de 0,1 g de Dowex 50 (H^+), à reflux pendant 48 heures. Le filtrat et les lavages de la résine sont évaporés et donnent un sirop jaune dissous dans 0,5 ml du mélange éther éthylique-méthanol 3 : 1, (v : v). A 4° C il y a cristallisation du β cétoside du N-acétyl-neuraminique-méthyl ester. La fonction ester méthylique est saponifiée par action de la soude 0,06 N 2,5 heures à la température de la pièce. Après déionisation par passage sur colonne de Dowex 50 x 2 (H^+) et lyophilisation, on obtient une poudre blanche d'acide N-acétyl-neuraminique méthyl osidé.

L'oxydation s'effectue en ajoutant à 17 mg du méthyl oside obtenu 0,5 ml d'eau et 1,25 ml de métapériodate de sodium 0,2 M pendant 1 heure à l'obscurité. On précipite ensuite le périodate en excès en ajoutant 1,5 ml d'acétate de baryum 0,1 M, après filtration la solution est saturée en CO_2 pour éliminer l'excès de baryum, après précipitation du carbonate de baryum, le filtrat est réduit à l'évaporateur rotatif à 1,25 ml.

La réduction s'opère en ajoutant 10 mg de borohydrure de sodium à la température de la pièce. Après 1 heure de réduction la solution est déionisée sur Dowex 50 x 2 (H^+), l'éluat de 300 ml est évaporé à sec et le résidu jaune est repris 5 fois par 5 ml de méthanol, le dernier résidu est repris par 0,5 ml du mélange éther éthylique-méthanol (4 : 1 (v : v), on obtient ainsi des cristaux blancs de $NANA_7$ méthyl osidé.

Après hydrolyse, 1 h à 80° C par 1 ml d' H_2SO_4 0,1 N de manière à hydrolyser la liaison méthyl osidique, on élimine l'excès d'acide sulfurique par de l'acétate de baryum 0,1 M, puis on élimine l'excès de baryum par le CO_2 , le dernier filtrat contient le $NANA_7$ que l'on prendra comme témoin pour le repérage du $NANA_7$ radioactif obtenu par hydrolyse des sialo-glycoprotéines membranaires.

β_2 - Mise en évidence du $NANA_7$
dans les sialoglycoprotéines membranaires

La mise en évidence s'est effectuée par co-chromatographie du $NANA_7$ témoin et du $NANA_7$ libéré par hydrolyse sulfurique à partir des membranes marquées.

L'hydrolyse s'effectue sur 1 mg de protéines membranaires marquée par 0,5 ml d' H_2SO_4 0,1 N, 80° C, 1 heure. Les ions sulfates sont éliminés en ajoutant 0,5 ml d'acétate de baryum 0,1 M, après centrifugation le surnageant est saturé en CO_2 pour éliminer l'excès de baryum. Après une deuxième centrifugation, le surnageant est déposé sur une feuille de chromatographie Whatman n° 3 en présence de $NANA_7$ comme entraîneur. Des témoins latéraux acide N-acétyl-neuraminique, glycérol, érythritol sont également ajoutés.

La chromatographie a lieu dans le système-solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) (FISCHER et NEBEL, 1955 (525) pendant 10 heures. Après chromatographie, le chromatogramme est découpé en bandes de 1 x 5 cm de part et d'autre du trait de départ et la radioactivité de chaque fraction est mesurée par comptage en scintillation liquide dans 10 ml du mélange toluène-POPOP-PPO*. Les témoins latéraux sont révélés par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et al., 1950 (526).

La figure 42 (p.115) montre la migration des témoins latéraux et le diagramme obtenu en mesurant la radioactivité. On obtient un pic de radioactivité élevée au niveau du $NANA_7$, aucun pic n'est décelé au niveau du glycérol et de l'érythritol, ceci indique qu'il n'y a eu aucune dégradation importante des glycanes par l'acide périodique. En effet une oxydation trop importante des glycanes aurait conduit à des coupures dans la chaîne polysaccharidique et à la formation après réduction d'érythritol et de glycérol marqué. Le pic de radioactivité n'est pas symétrique, la légère traînée correspond au $NANA_8$, produit intermédiaire dans l'oxydation qui se forme toujours en petite quantité en même temps que le $NANA_7$.

* Composition du liquide scintillant : POPOP 1 g, PPO 10 g, qsp 2 l avec du toluène.

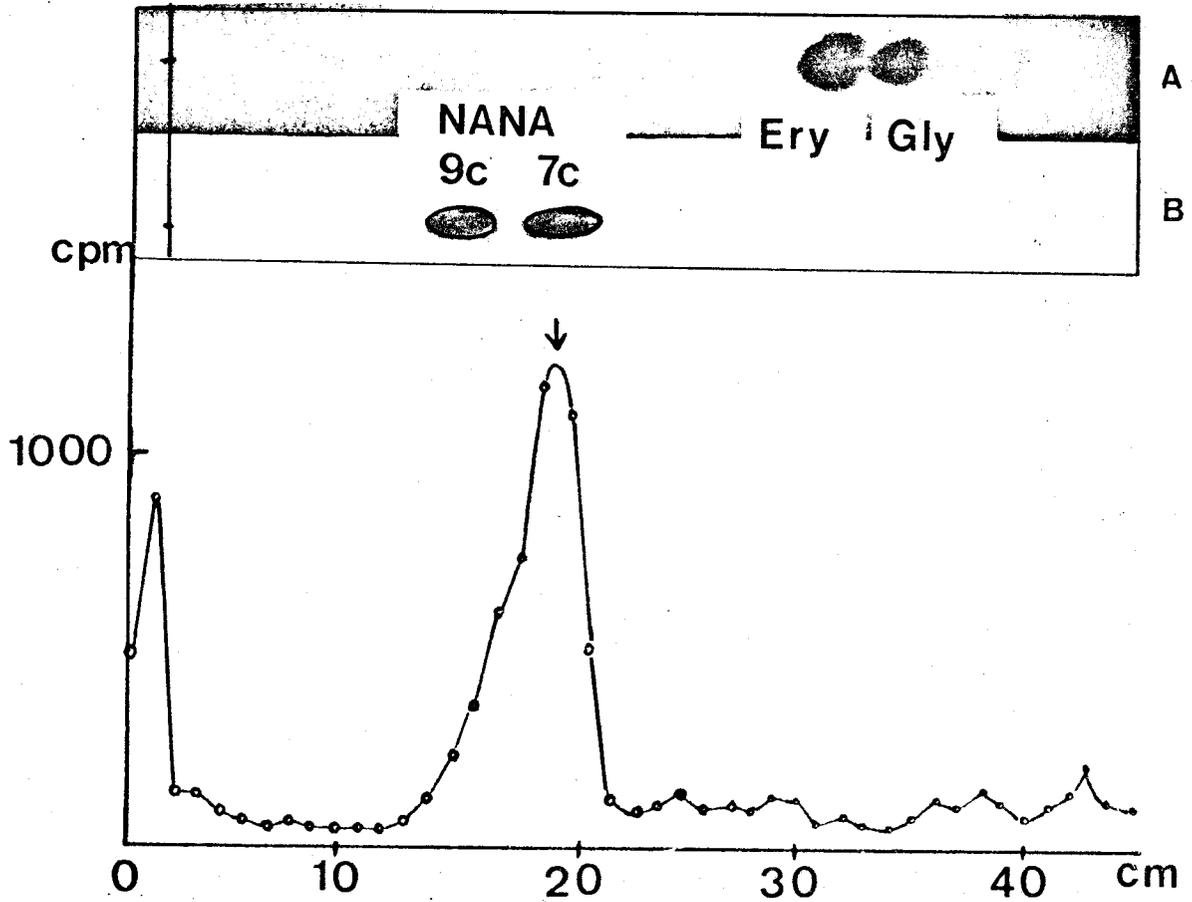


Figure 42



Mise en évidence du NANA₇ radioactif dans les glycoprotéines membranaires marquées par oxydation de l'acide sialique et réduction avec le borohydrure tritié.

A : Témoins latéraux ; Ery : Erythritol ; Gly : Glycérol révélés au nitrate d'argent
 B : Témoins latéraux NANA 9c et 7c : Acide N-acétyl-neuraminique à 9 et 7 atomes de carbones révélés à l'orcinol-ATCA.

La présence du NANA₇ radioactif et l'absence de produits de dégradation des glycannes semblent indiquer que cette méthode de marquage des sialoglycoprotéines est sélective et respecte la partie glycanique des glycoconjugués .

c - Séparation des sialo-glycoprotéines marquées et comptage des gels

La séparation s'effectue par la méthode classique. Les membranes marquées sont solubilisées dans le mélange Na₂CO₃ 0,05 M, SDS 5 p. 100, β mercapto-éthanol 10 p. 100 (v : v). Après dissolution, l'électrophorèse s'effectue par la méthode de NEVILLE comme précédemment. Immédiatement après les avoir retirés des tubes à électrophorèse, les gels sont congelés à - 70° C pour éviter une diffusion des bandes de protéines.

Les gels congelés sont alors découpés en tranches régulières de 1 mm d'épaisseur. Chaque tranche de gel est placée dans des piluliers de comptage en verre et dissoute dans 1 ml d'H₂O₂ à 30 p. 100 (v : v) à 90° C pendant 1 heure. Le comptage s'effectue en scintillation liquide en ajoutant 10 ml de BRAY. On effectue en général 3 comptages de 10 minutes.

d - Résultats

La figure 43 (p. 117) représente le diagramme obtenu avec cette méthode. Dans le témoin, les membranes réduites au borohydrure tritié sans être préalablement oxydées montrent uniquement de la radioactivité juste avant le front de bleu de bromo-phénol (BBP). Cette radioactivité correspond à la réduction des doubles liaisons lipidiques. Les membranes oxydées puis réduites montrent en plus de ce pic, des composés marqués de haut poids moléculaire. Ces composés correspondent aux glycoprotéines. On observe une dizaine de ces glycoprotéines d'importance et de poids moléculaire variables.

Pour prouver que les pics de radioactivité observés correspondent à des glycoprotéines, nous avons voulu les comparer avec ceux obtenus grâce à un marquage "in vivo". Le marquage est réalisé grâce à l'injection de 1 mCi de glucosamine ³H à un rat qui est sacrifié au bout de 2,5 heures. Les membranes sont préparées, dissoutes et l'électrophorèse est réalisée de la même manière. La figure

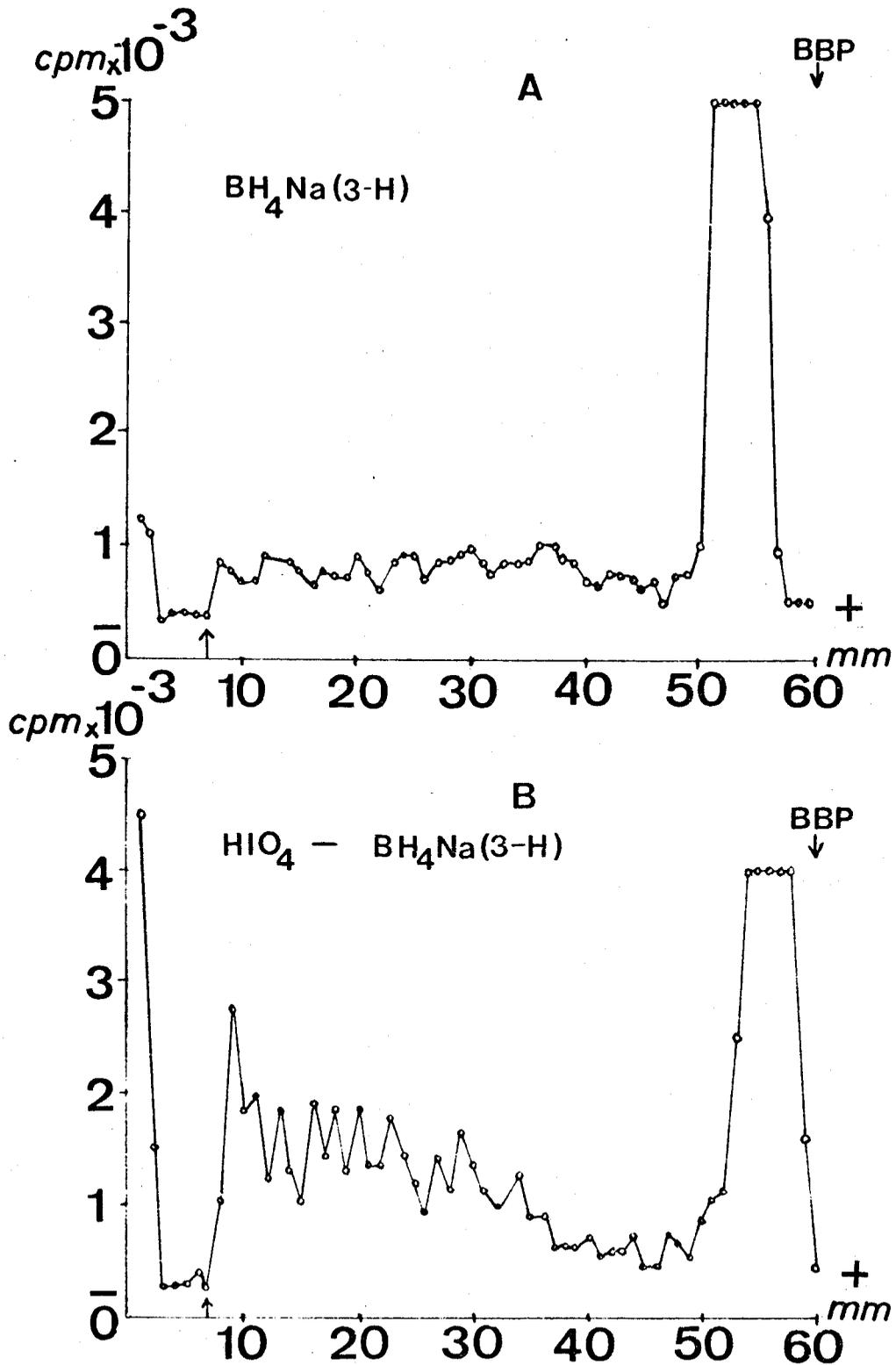


Figure 43

Marquage "in vitro" des glycoprotéines membranaires



A : Membranes témoins réduites au borchydrure tritié sans être préalablement oxydées par l'acide périodique.

B : Membranes réduites après avoir été oxydées par le métapériodate

BBP : Bleu de Bromo phénol, ↑ fin du gel de concentration.

44 (p.119) montre la comparaison du marquage "in vitro" et du marquage "in vivo". Le marquage "in vivo" a une radioactivité spécifique très faible (environ 200 fois plus faible que la radioactivité spécifique obtenue "in vitro"). On remarque que les lipides ne sont pas marqués, les pics obtenus correspondent exactement aux pics obtenus par marquage "in vitro" mais l'amplitude de ces pics varie. En effet, le marquage "in vivo" dépend du métabolisme membranaire, or toutes les glycoprotéines membranaires peuvent ne pas avoir toutes le même "turn over", plus celui-ci sera élevé, plus le marquage obtenu sera important. Le marquage obtenu "in vitro" ne dépend lui uniquement que du taux d'acides sialiques qui se trouve sur la glycoprotéine.

4 - Conclusions

Le marquage des glycoprotéines membranaires "in vitro" nous a permis de mettre en évidence 10 glycoprotéines séparées suivant leur masse moléculaire. Ce marquage correspond exactement à celui obtenu par marquage "in vivo" à l'aide de la glucosamine (3-H).

Le calcul des masses moléculaires est effectué en étalonnant le gel de polyacrylamide avec des protéines et des glycoprotéines de masse moléculaire connue (voir annexe technique). Ceci permet de connaître les masses moléculaires apparentes des glycoprotéines en reportant sur le graphique obtenu la mobilité relative (ou R_F) des bandes radioactives. Il faut remarquer d'après la forme de la courbe que l'incertitude est grande pour les très hauts poids moléculaires (200 000 daltons) la courbe étant hyperbolique, et également pour les petits poids moléculaires (100 000 daltons) où les points sont dans cette zone très dispersés. Les masses moléculaires trouvées sont reportées dans le tableau XIV (p.120). Elles sont en bon accord avec celles trouvées par GLOSSMANN et NEVILLE, 1971 (528), mais la méthode de marquage "in vitro" permet de déceler quatre glycoprotéines supplémentaires. Ceci peut-être dû au manque de sensibilité de la révélation au réactif de Schiff. Il faut remarquer que les poids moléculaires calculés par cette méthode sont exacts seulement si la molécule possède moins de 5 p. 100 de glucides, la déviation par rapport à la courbe d'étalonnage est d'autant plus importante que le taux de glucides liés augmente (GLOSSMAN et NEVILLE, 1971 (529)). La masse moléculaire est donc obtenue

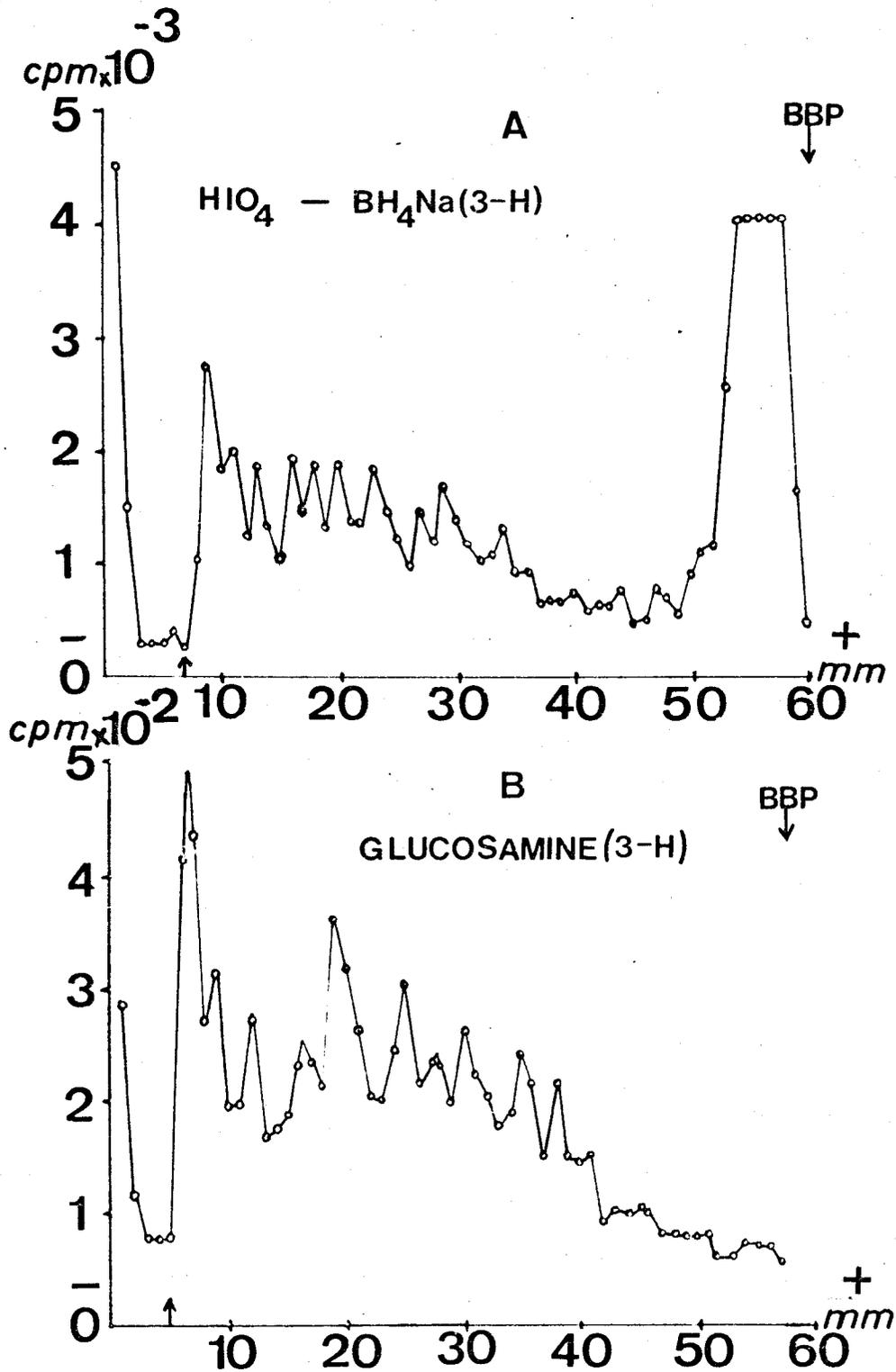


Figure 44

Comparaison du marquage des glycoprotéines membranaires réalisé "in vitro" (A) et "in vivo" (B).

BBP : Bleu de Bromo-phénol, \uparrow fin du gel de concentration.



MASSES MOLECULAIRES APPARENTES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

OBTENUES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS

R _F	Masses Moléculaires (en daltons) (Résultats personnels) (a)	Masses Moléculaires (en daltons) obtenues par GLOSSMANN et NEVILLE, 1971 (527) (b)
0,035	> 500 000	> 250 000
0,1	450 000	> 250 000
0,167	240 000	250 000
0,200	180 000	195 000
0,250	130 000	130 000
0,30	94 000	96 000
0,325	80 000	-
0,425	52 000	-
0,487	45 000	-
0,56	38 000	-

(a) Résultats obtenus par marquage "in vitro" et "in vivo"

(b) Résultats obtenus par révélation avec la méthode au PAS.



avec une erreur plus ou moins grande suivant la richesse en glucides de la glycoprotéine.

Les dix glycoprotéines mises ainsi en évidence sont des sous-unités, en effet, en présence d'un excès de détergent (SDS à 5. p. 100) et de β -mercapto-éthanol, les glycoprotéines qui seraient formées de sous-unités, comme par exemple la 5'-nucléotidase qui possède deux sous unités glycoprotéiniques de 90 000 daltons chacune (EVANS et GURD, 1973 (530)), sont dissociées, et les sous-unités peuvent, si elles ont une masse moléculaire différente, migrer différemment dans le gel.

II -- ETUDE DES GLYCOPEPTIDES

L'étude des glycoprotéines totales nous a permis de mettre en évidence leur liaison avec les phospholipides membranaires, et de calculer leur poids moléculaire apparent. La caractérisation chimique, le type de glycanne, le mode de liaison entre le glycanne et la protéine ne peuvent être entrepris par cette méthode. En effet, les méthodes de détermination de structure nécessitent un matériel de départ soluble. Cette étude va donc être entreprise sur les glycopeptides obtenus par hydrolyse grâce à un agent protéolytique des glycoprotéines totales intégrées dans les membranes.

A - CHOIX DE L'AGENT PROTEOLYTIQUE

1 - Principe

Deux types d'agents protéolytiques peuvent être choisis : des enzymes comme la papaïne, la pronase qui dégradent fortement les glycoprotéines et donnent des glycannes liés à quelques amino-acides, parfois à un seul, et des enzymes qui hydrolysent sélectivement un seul type de liaison et produisent ainsi des glycopeptides plus longs qui ont partiellement conservé la structure de la glycoprotéine originale, et qui permettent par leur étude d'avoir une idée sur la structure de la molécule entière. Nous avons choisi ce deuxième type d'enzyme en particulier

la trypsine (EC 3. 4. 4. 4.) qui coupe sélectivement les liaisons arginyl-CO-NH₂ et lysyl-CO-NH₂.

2 - Mode opératoire

Nous avons employé cette méthode sur les membranes isolées avec le protocole expérimental décrit par EMMELOT et BOS, 1972 (531). L'hydrolyse est conduite à 37° C pendant 2 heures dans un tampon de Krebs-Ringer phosphaté* pH 7,4 contenant 250 µg de trypsine (trypsine CHOAY 2 fois cristallisée) par ml. On effectue l'hydrolyse sur 4 mg de protéines par ml de milieu. Après l'hydrolyse, on sépare les membranes du surnageant contenant les glycoprotéines par centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes. Cette étude peut se faire soit sur des membranes préalablement marquées "in vitro" par la méthode décrite préalablement, soit de manière préparative sur des membranes préparées en rotor zonal.

3 - Résultats

Après avoir effectué une hydrolyse sur des membranes marquées "in vitro", celles-ci sont étudiées après l'action de la trypsine par la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide précédente. La figure 45 (p.123) présente la comparaison entre un électrophorégramme de membranes entières et celui obtenu avec des membranes hydrolysées avec la trypsine (culot de centrifugation), c'est-à-dire montrant la partie des glycoprotéines membranaires encore intégrées dans la membrane. On s'aperçoit qu'il ne reste plus de glycoprotéines de haut poids moléculaire (il ne reste qu'un peu de radioactivité juste après le gel de concentration) par contre il y a apparition de glycoprotéines de masse moléculaire plus faible qui représentent la partie de la molécule encore en relation avec la membrane. La figure 46 (p.124) montre comment on peut concevoir le mécanisme de l'hydrolyse. Donc la trypsine a libéré, à partir des membranes, des glycopeptides solubles, laissant en place sur la matrice lipidique une faible partie de la molécule.

* Composition du tampon de Krebs-Ringer phosphaté : Solutions Stock : 1 : NaCl 9 p. 100 ; 2 : KCl 1,15 p. 100 ; 3 : Mg SO₄ 7H₂O 3,82 p. 100 ; 4 : tampon phosphaté de sodium 0,1 M pH 7,4

Le tampon est constitué en mélangeant : 100 volumes de 1, 4 volumes de 2, 1 volume de 3, 20 volumes de 4.

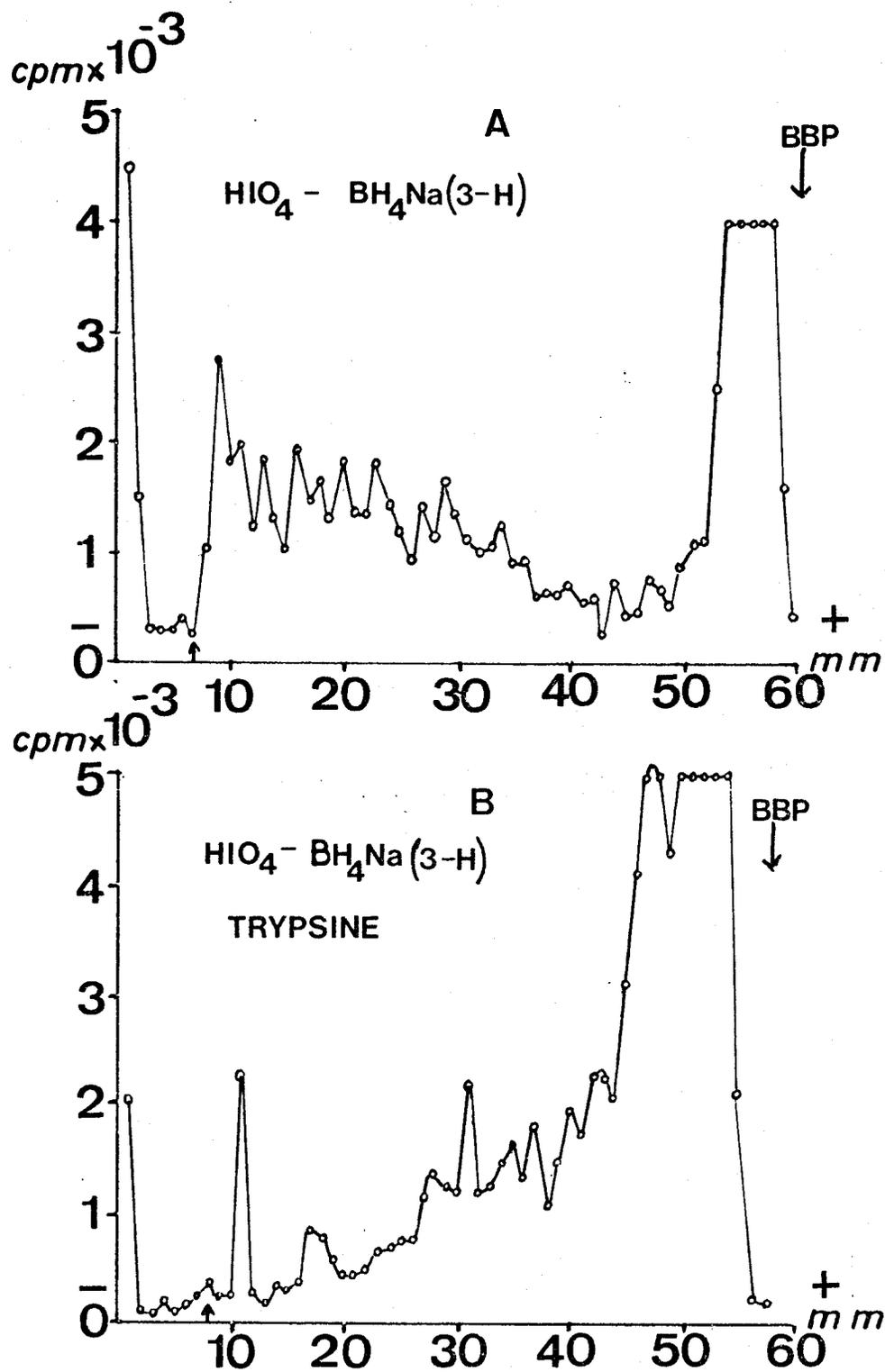


Figure 45

Comparaison entre les glycoprotéines membranaires avant (A), et après (B) l'hydrolyse trypsique.

BBP : Bleu de Bromo-phénol ↑ : gel de concentration.



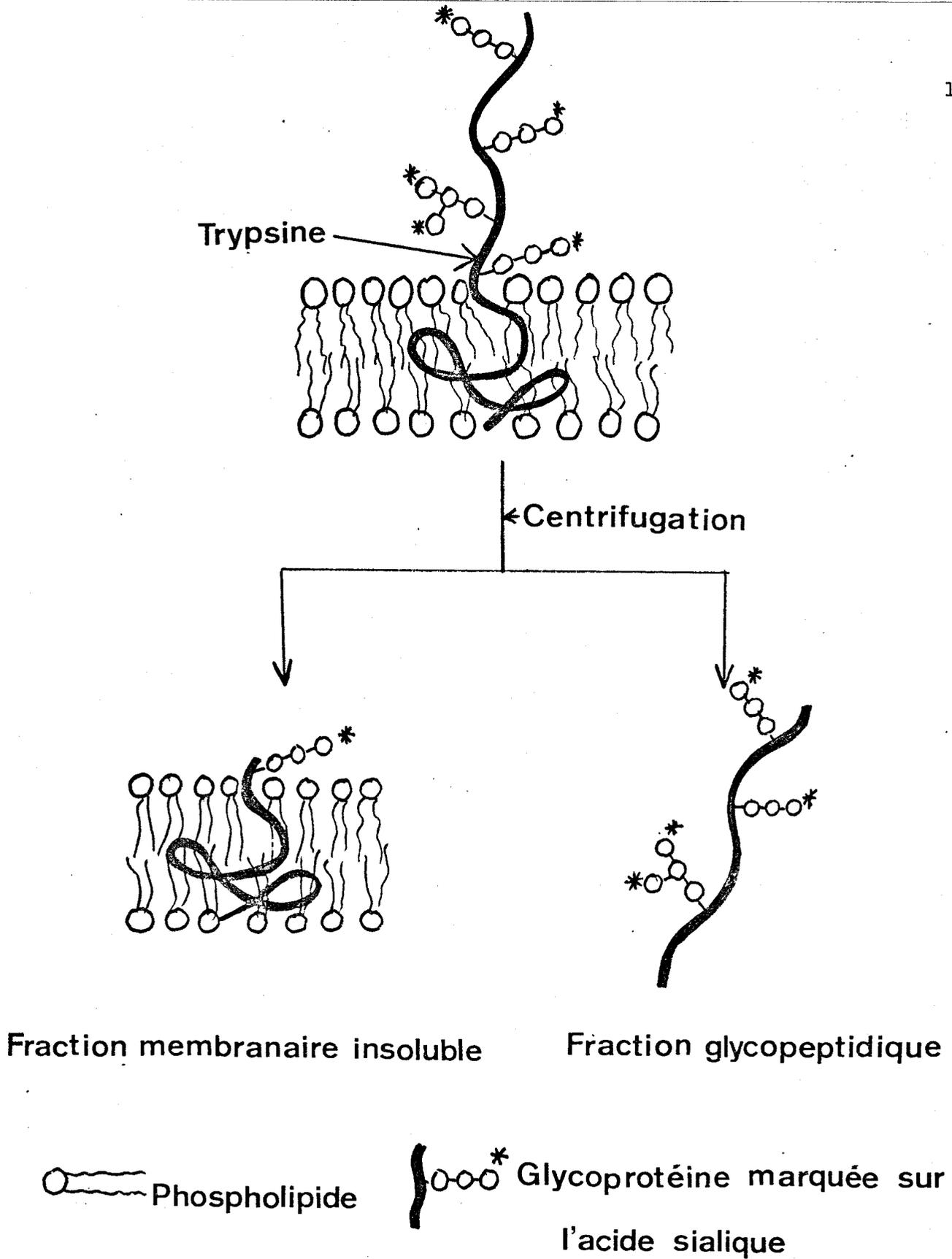


Figure 46

Mécanisme de l'hydrolyse trypsique des glycoprotéines membranaires.



B - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1 - Principe

Les glycopeptides ainsi obtenus doivent être séparés pour être étudiés. Plusieurs types de séparations peuvent être envisagés : échange d'ions, électrophorèse, chromatographie de tamisage moléculaire. Nous avons employé cette dernière méthode en utilisant une colonne de séphadex G 75 (EMMELOT et BOS, 1972 (532)).

2 - Mode opératoire

Après la centrifugation, le surnageant est concentré à 1 ml et déposé sur la colonne de séphadex G 75. Deux types de colonnes sont utilisés, pour les membranes marquées (micro-méthode) une petite colonne de 1 x 30 cm et pour la préparation des glycopeptides une colonne de 2 x 70 cm. L'éluant utilisé est l'eau distillée et des fractions de 2 ml sont collectées. On mesure l'absorbance à 280 nm de chaque fraction ou on en mesure la radioactivité en scintillation liquide en mélangeant une aliquot à 10 ml de BRAY.

3 - Résultats

La figure 47 (p.126) représente le résultat obtenu en micro méthode avec les membranes marquées sur l'acide sialique. On obtient deux pics de radioactivité, l'un passant à l'exclusion avec le Bleu Dextran, l'autre étant retardé. Pour vérifier qu'il s'agit bien de sialoglycopeptides, nous avons fait agir la neuraminidase sur chaque pic afin de mettre en évidence le NANA₇. L'hydrolyse par la neuraminidase a été conduite suivant la méthode de WARREN et al. 1972 (533) : l'incubation s'effectue à 2 h à 37° C dans un tampon acétate de sodium-acide acétique 100 mM pH 5,2 CaCl₂ 20 mM, l'hydrolyse s'effectue dans 1 ml avec 20 unités de neuraminidase de Vibrio cholerae (neuraminidase Koch-Light à 500 unités par ml). Après arrêt de l'incubation par chauffage à 100° C pendant 5', l'hydrolysate est purifié sur Dowex 50 x 8 (H⁺) et l'effluent est déposé après réduction de volume sur une feuille de chromatographie Whatman n° 3. Après chromatographie dans les conditions décrites précédemment, la radioactivité est repérée et les témoins

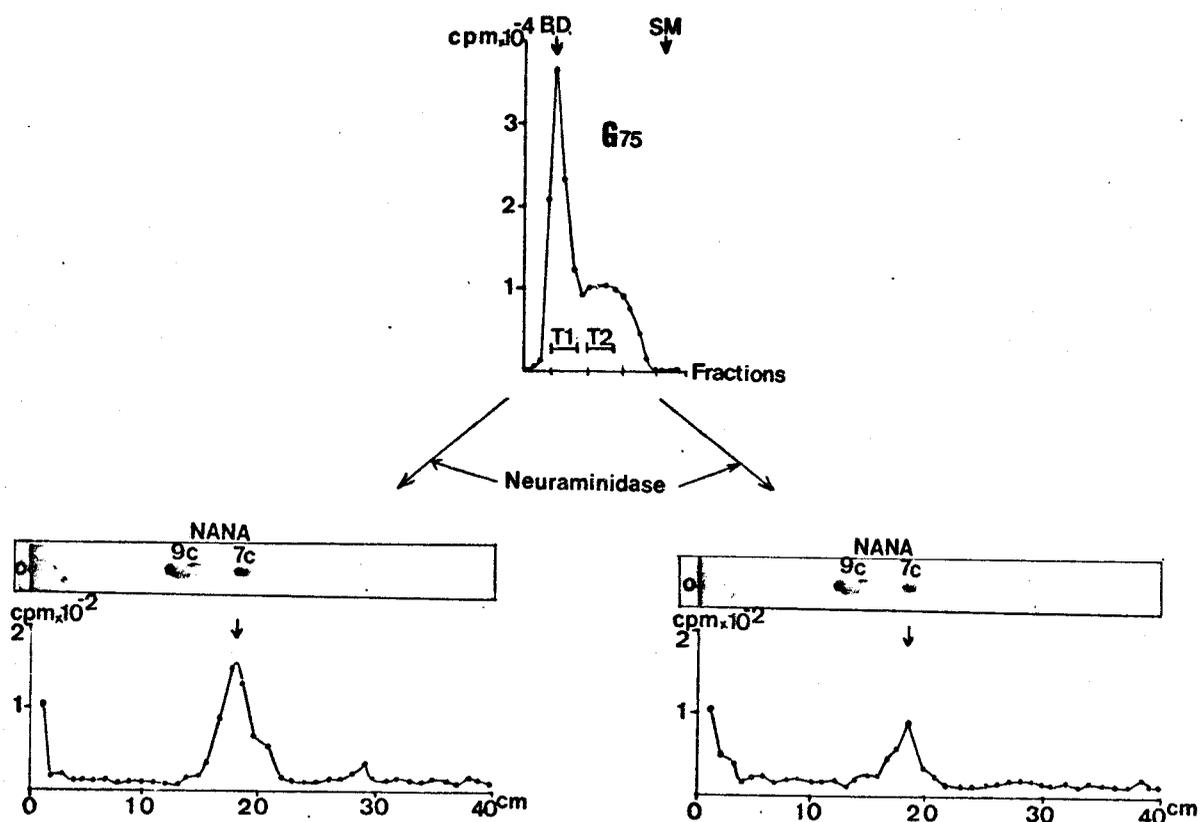


Figure 47

Mise en évidence de l'acide sialique marqué dans les glycopeptides tryptiques obtenus par hydrolyse des membranes.

Les témoins latéraux NANA₇ et NANA₉ correspondent à l'acide sialique à 7 et à 9 carbones ont été révélés à l'orcinol-ATCA.

B.D. : Bleu dextran, SM : Sels Minéraux.

latéraux révélés. On s'aperçoit:(figure 47 (p.126), que les deux pics contiennent du NANA₇. Le pic T₂ contient 100 fois moins d'acide sialique que le pic T₁. Il s'agit donc de deux groupes de sialoglycopeptides différents.

La figure 48 (p.128) montre le résultat obtenu en méthode préparative. La préparation contenait 78 mg de protéines membranaires totales, on retrouve les deux pics T₁ et T₂ maintenant visibles en densité optique à 280 nm. Le tableau XV (p.129) montre que le pic T₁ représente 4,5 p. 100 des protéines de départ alors que le pic T₂ en représente 43 p. 100.

C - ETUDE DE LA TAILLE DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS

1 - Principe

Les deux groupes de glycopeptides obtenus sont séparés par tamisage moléculaire, ils doivent donc différer par leur poids moléculaire. Pour étudier la répartition de ces sialoglycopeptides en fonction de leur taille, nous avons étudié leur migration dans le système d'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS employé pour les glycoprotéines totales. Les deux pics T₁ et T₂ sont dissous dans le milieu NaCO₃ 0,05 M, SDS 5 p. 100, β-mercapto-éthanol 10 p. 100. L'électrophorèse et le comptage s'effectuent de la même manière que précédemment.

2 - Résultats

La figure 49 (p.130) montre la répartition obtenue avec les deux groupes de glycopeptides. Les deux familles de glycopeptides ont une large répartition, elles contiennent toutes deux des sialoglycopeptides dont le poids moléculaire apparent est compris entre 50 000 daltons et 10 000 daltons.

3 - Conclusions

Il apparaît donc une contradiction : les deux familles des glycopeptides T₁ et T₂ isolés par tamisage moléculaire sur séphadex G 75 ont la même masse moléculaire apparente en milieu dénaturant. En fait, la chromatographie sur séphadex est conduite dans l'eau pure et la conformation des glycopeptides peut varier par rapport au milieu dénaturant dans lequel ces composés se trouvent alors

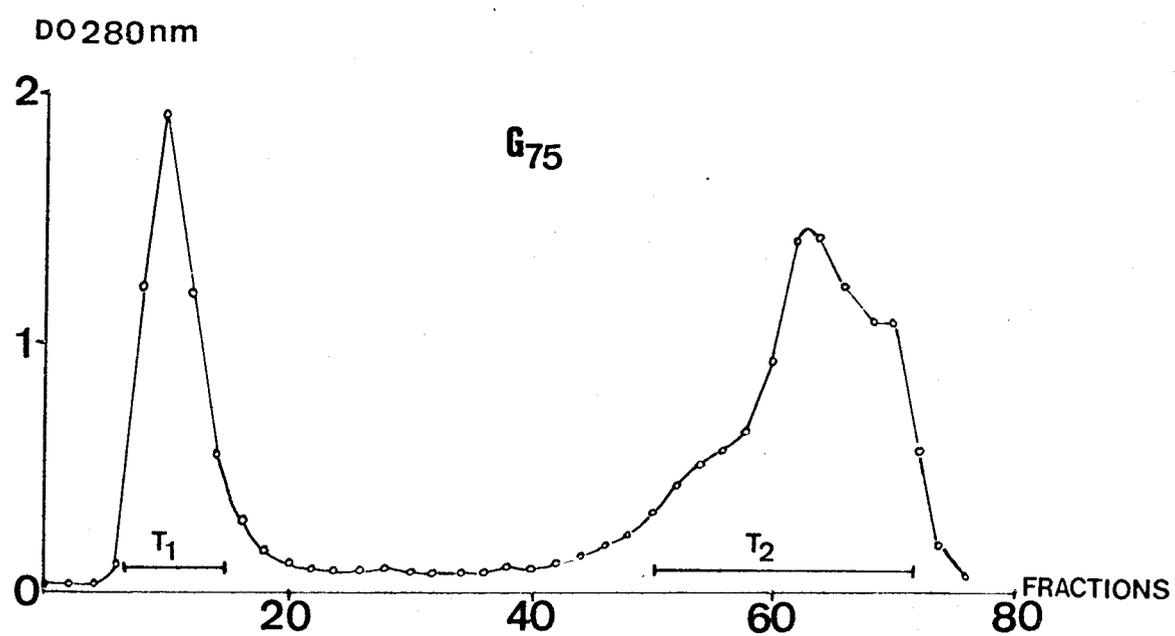


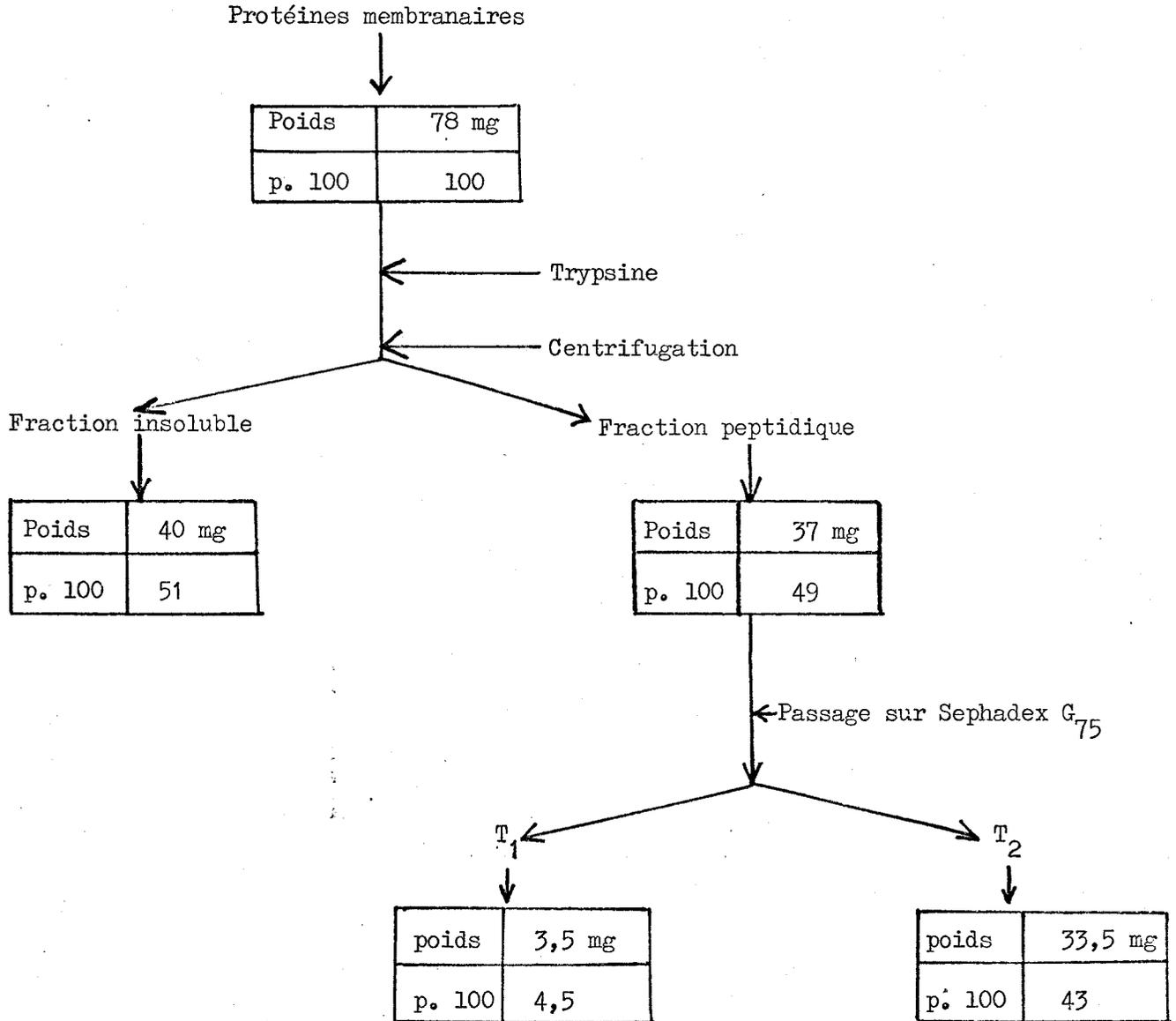
Figure 48

Préparation des sialoglycopeptides T₁ et T₂ à partir de 78 mg de protéines membranaires.



PREPARATION DES SIALOGLYCOPEPTIDES MEMBRANAIRES ET RENDEMENT PAR RAPPORT

AUX PROTEINES DE DEPART



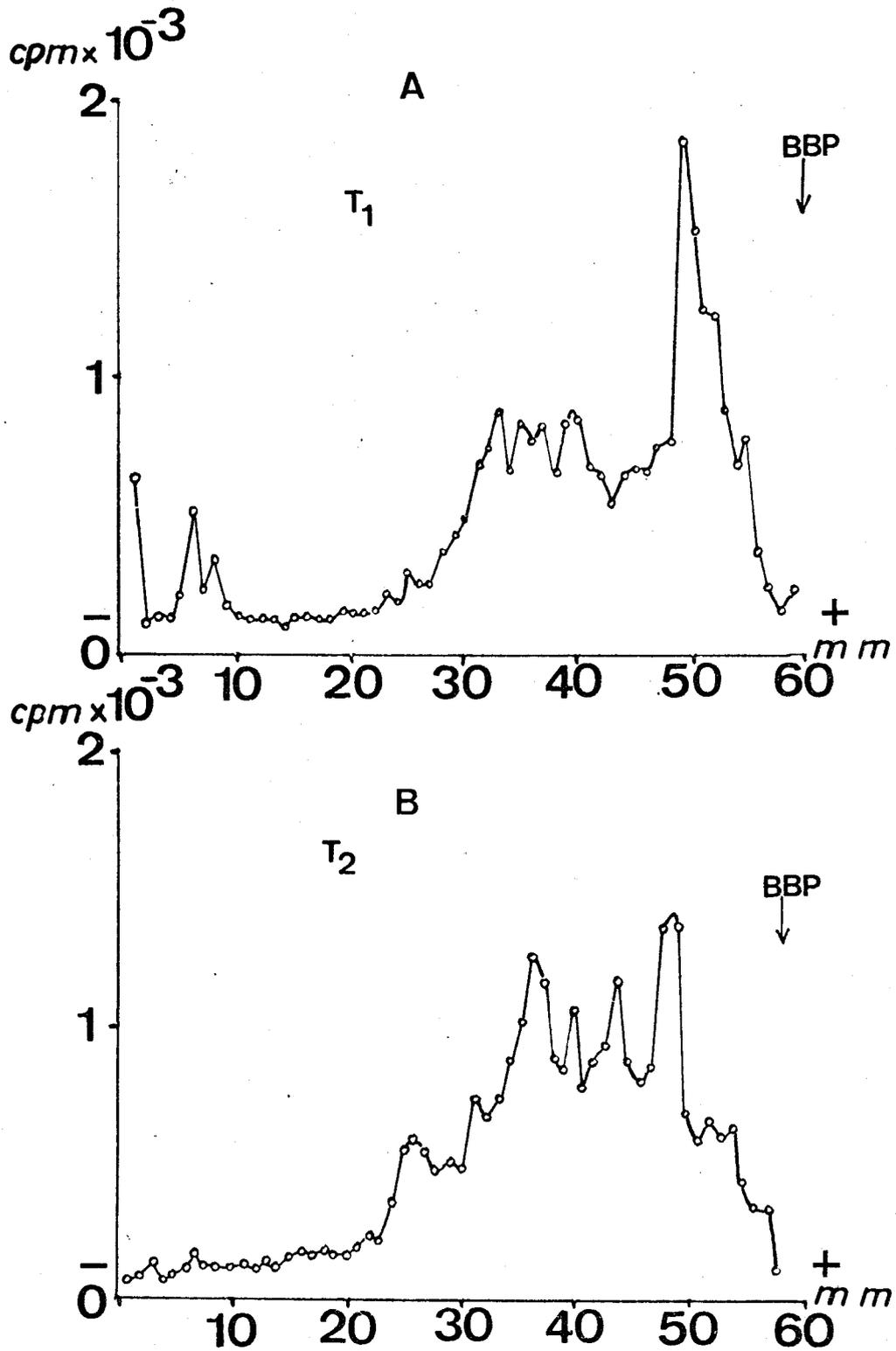


Figure 49

Etude de la taille des deux familles de glycopeptides T₁ et T₂ obtenues par hydrolyse trypsique des membranes.

A : pic T₁ ;

B : pic T₂

BBP : Bleu de Bromo-phénol.



toujours sous forme de "chaîne statistique". Il semble que les sialoglycopeptides du premier pic T_1 aient dans l'eau, une configuration telle qu'ils ne peuvent pas entrer dans les grains de séphadex (par exemple à cause d'un rapport axial élevé), alors que ceux du pic T_2 ont déjà une configuration moins rigide qui leur permet d'être retenus sur la colonne de chromatographie bien qu'ils aient la même taille.

Cette différence de conformation est confirmée par l'aspect des deux pics en solution, le premier T_1 est opalescent, une solution de 200 μg par ml atteint une densité optique de 1 à 280 nm, alors que pour le pic T_2 à la même concentration, elle est de 0,25. C'est cette différence dans la structure moléculaire des deux familles de glycopeptides que nous nous sommes efforcés de mettre en évidence par des méthodes chimiques.

D - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides du pic T_1 sont riches en acides sialiques et semblent posséder un rapport axial important. Il nous a semblé que ces sialoglycopeptides dérivait de glycoprotéine de type "mucine" qui seraient présentes dans les membranes. Nous avons donc conçu l'expérimentation ultérieure de manière à essayer d'apporter des arguments en faveur de cette hypothèse. Nous étudierons successivement la partie peptidique, la partie glycanne et enfin la liaison entre le glycanne et la protéine.

1 - Etude de la partie peptidique

a - Principe

Les glycoprotéines de type "mucine" sont riches en amino-acides hydroxylés (sérine et thréonine) sur lesquels se fixent les glycannes. Une étude de la composition molaire en amino-acides des deux pics T_1 et T_2 permet de connaître la quantité en amino-acides hydroxylés des glycopeptides. D'autre part, le calcul de l'indice de polarité (défini comme la somme des pourcentages molaires des acides aminés polaires : Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, d'après CAPALDI et VANDERKOOI, 1972 (534)) permettra d'avoir une idée de la posi-

tion de ces peptides par rapport à la matrice lipidique. En effet, plus l'indice de polarité est bas, plus l'association avec les lipides est facile.

b - Mode opératoire

La composition des glycopeptides est comparée aux protéines membranaires totales, celles-ci sont obtenues après extraction des lipides avec le mélange chloroforme-méthanol 2 : 1 (v : v). L'hydrolyse est effectuée en tube scellé, par HCl 5,6 N à 105° C. On effectue une cinétique de libération des amino-acides après des temps d'hydrolyse de 24, 48, 72 et 96 heures. L'analyse est effectuée sur l'auto-analyseur Multichrom (Beckman). Après correction des rapports molaires pour tenir compte de la destruction, les valeurs sont exprimées en nombre de résidus pour 1000.

c - Résultats

Le tableau XVI (p.133) indique les rapports molaires comparés des protéines membranaires totales et des glycopeptides T₁ et T₂. On voit que les rapports molaires des peptides T₁ et T₂ sont très semblables en particulier en ce qui concerne la richesse en sérine et en thréonine. La composition est également très semblable à celle des protéines membranaires totales, sauf en ce qui concerne la cystéine qui n'est pas présente dans les deux groupes de glycopeptides.

Les indices de polarité sont également très proches en particulier celui des protéines membranaires (45,2) et celui du pic T₁ (45,4). Le pic T₂ a un indice plus bas (44,6) ce qui permet de penser que ce type de glycopeptides est plus étroitement en relation avec les lipides membranaires.

2 - Etude de la partie glycanique

a - Principe

Comme aucune différence marquante n'a pu être déterminée au niveau des amino-acides, l'étude de la composition en glucides fournira peut-être des renseignements plus importants. En effet, les glycoprotéines de type "mucine" possèdent la plupart du temps de la N-acétyl-galactosamine qui se trouve au point d'attache. La N-acétyl-galactosamine est rare dans les autres types de

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES (EN RESIDUS POUR 100 RESIDUS) DES PROTEINES

MEMBRANAIRES TOTALES ET DES GLYCOPEPTIDES T₁ et T₂ OBTENUS APRES ACTION DE LA TRYPSINE

	Protéines Membranaires Totales	Pic T ₁	Pic T ₂
Asp	8,8	10	10,2
Thr	5,3	6,1	6
Ser	6,6	8,5	7,1
Glu	10,8	10	9,1
Pro	5,1	7,2	9,3
Gly	8,7	11,3	9,9
Ala	7,6	6,2	8,2
Cys	1,3	0	0
Val	6,5	7,3	8,4
Met	2,3	1,6	1,8
Ileu	5,5	5,4	5,4
Leu	10,6	7,5	8,5
Tyr	3	3,0	1,9
Phe	4,2	5,1	2
Lys	6,3	5,4	7,8
His	2,3	1,9	1,7
Arg	5,1	3,5	2,7
Indice de Polarité	45,2	45,4	44,6

glycoprotéines.

b - Mode opératoire

Nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour déterminer les rapports molaires des mono-saccharides libérés après méthanolyse d'après la technique de CLAMP et al. 1972 (535). Le poids de glycopeptide de départ est de 1 mg desséché une nuit sous exiccateur en présence de P_2O_5 . La méthanolyse s'effectue en tube scellé 20 h à 80° C en présence de 1 ml d'HCl 1,5 N dans du méthanol anhydre; Après évaporation sous courant d'azote on effectue la triméthylsilylation des méthylglycosides formés. Au résidu obtenu après méthanolyse, on ajoute 200 μ l de pyridine anhydre, 40 μ l de triméthylchlorosilane et 80 μ l d'hexaméthyl-disilazane (HMDS). Après une agitation de 1 minute et un contact de 15 minutes, on centrifuge à 2 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est séché sous courant d'azote et repris par 100 μ l d'heptane. On soumet à l'analyse chromatographique des quantités variant entre 0,5 et 2 μ l. Le témoin employé est l'érythritol. La colonne utilisée est de type OV₁₇ à 3 p. 100 de silicone. Le chromatographe Perkin Elmer modèle F₁₁ est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et la température du détecteur est de 225° C. La chromatographie s'effectue en programmation de température de 110° C à 220° C avec une augmentation de 1° C par minute. Le courant d'azote est de 15 ml/minute.

c - Résultats

Le tableau XVII (p.135) montre les résultats obtenus avec cette méthode. On voit nettement que les deux pics diffèrent par leur composition en mono-saccharides. Le pic T₁ contient de la N-acétyl-galactosamine alors que le pic T₂ n'en possède pas, ce qui est en faveur de l'hypothèse de départ. Le pic T₂ contient un peu de fucose alors que le pic T₁ n'en possède pas, il contient également beaucoup moins d'acides sialiques (quantité non détectable en chromatographie en phase gazeuse). Il semble donc que les deux types de glycannes soient différents.

Tableau XVII

COMPOSITION (a) EN MONOSACCHARIDES DES FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUESMEMBRANAIRES T₁ ET T₂ (POUR 10 RESIDUS DE GALACTOSE) (a)

	Pic T ₁	Pic T ₂
GlcNac	40	400
GalNac	27	0
Man	8	14
Gal	10	10
Fuc	0	4
Acides Uroniques	10	40
Acides Sialiques	27	(b)

(a) Déterminée par chromatographie en phase gazeuse

(b) Mis en évidence uniquement par marquage au borohydrure tritié après oxydation avec l'acide periodique et non dosé.



Il faut également remarquer que les deux pics contiennent des aides uroniques. Ces résultats confirment ceux de YAMASHINA et al. 1973 (536) qui détectent au niveau de la membrane plasmique de la cellule hépatique de petites quantités de glycosamino-glycannes.

3. - Etude de la liaison glycanne-protéine

a - Principe

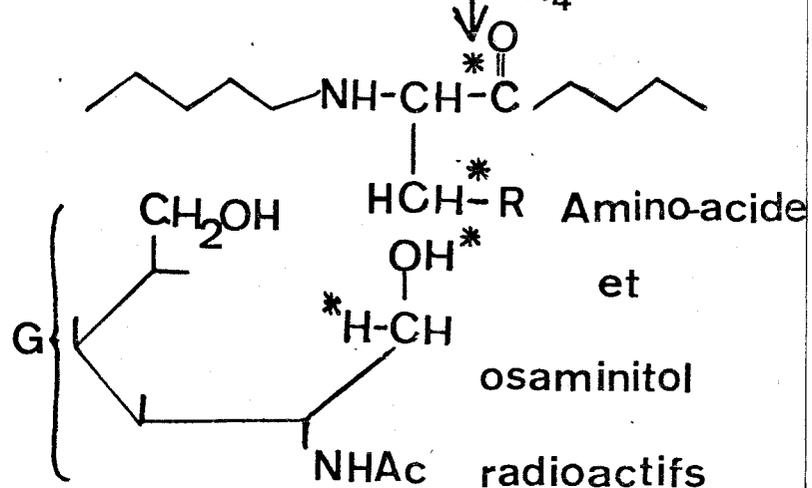
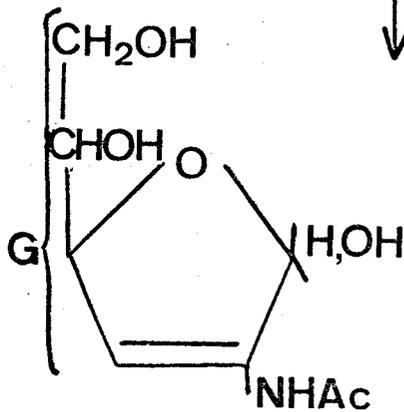
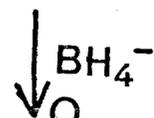
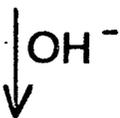
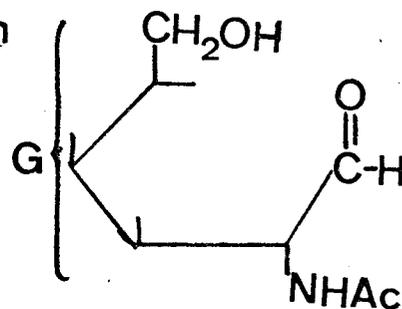
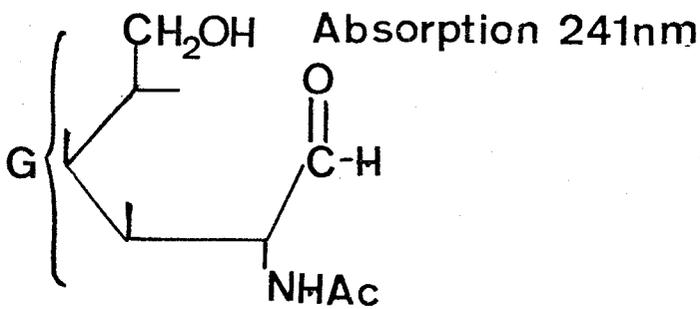
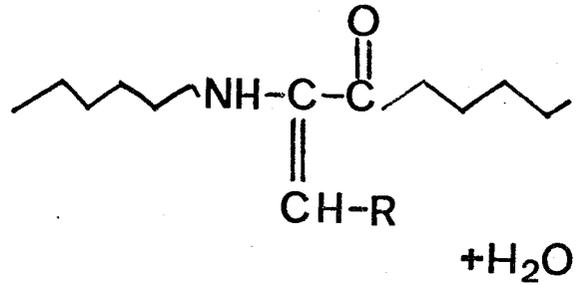
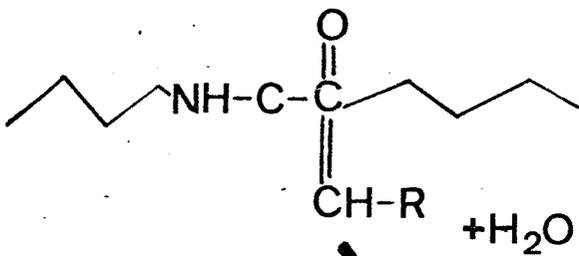
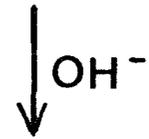
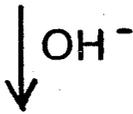
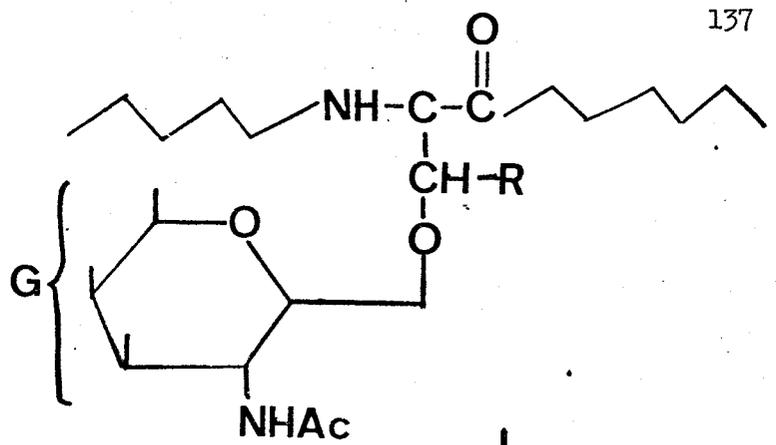
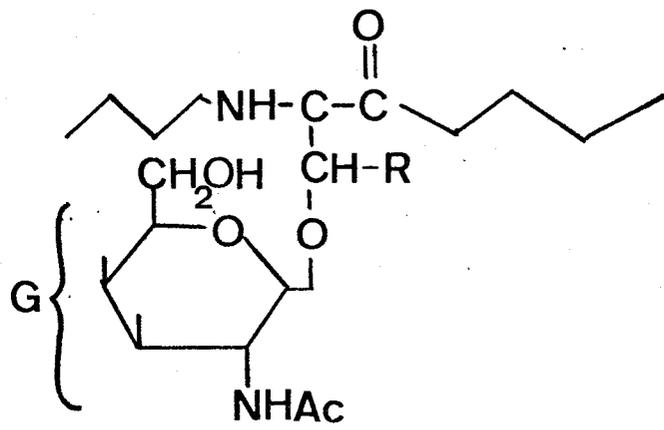
On sait qu'il peut exister différents types de point d'attache entre le glycanne et la protéine dans les glycoprotéines. En particulier les glycoprotéines de type "mucine" possèdent des liaisons O-glycosidiques où la fonction réductrice de l'ose terminal (souvent la N-acétyl-galactosamine) est conjuguée avec la fonction alcoolique d'un hydroxy-amino-acide de la chaîne peptidique (sérine, thréonine). Les liaisons glycosylaminiques formées par la conjugaison du groupement réducteur de la N-acétyl-glucosamine avec la fonction amide de l'asparagine sont présentes dans un grand nombre d'autres glycoprotéines. Ces deux types de liaisons se caractérisent par leur sensibilité aux agents alcalins : les liaisons O-glycosidiques sont très sensibles aux agents alcalins qui provoquent une β -élimination, tandis que les liaisons glycosylaminiques sont stables en milieu alcalin. L'étude comparée de la stabilité des deux formules de glycopeptides T_1 et T_2 permettra de confirmer notre hypothèse de départ et de montrer que ces deux groupes sialoglycopeptides ont une structure différente.

b - Sensibilité aux agents alcalins

b_1 - Etude de l'absorbance à 241 nm

α - Principe

Un fait caractéristique des glycoprotéines ayant des glycannes liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique est la facilité de réaliser une β -élimination dans les conditions alcalines. La figure 50 (p.137) montre le mécanisme d'une telle réaction. Quand elle est réalisée en milieu non réducteur, elle donne naissance aux dérivés de l'acide 2-amino-acrylique dans la chaîne peptidique. Ces résidus peuvent être détectés par absorption dans l'ultra-violet à 241 nm.



+G (si la liaison est 1→3)

Figure 50

Mécanisme de la β élimination en milieu alcalin avec ou sans borohydrure de sodium tritié
 G : reste du glycanne ; R : H pour la sérine ; CH₃ pour la thréonine.



β - Mode opératoire

La mesure de l'absorbance à 241 nm s'effectue en fonction du temps. La réaction est suivie au spectrophotomètre pendant 30 minutes, 100 μ g du pic T_1 ou T_2 sont dissous dans 0,5 ml d'eau distillée, puis 100 μ g de soude 3 M sont ajoutés au temps 0 de manière à ce que la réaction se déroule dans NaOH 0,5 N (NEUBERGER, GOTTSCHALK et MARSHALL, 1966 (537)). L'absorbance est mesurée toutes les 5 minutes.

γ - Résultats

La figure 51 (p.139) représente la graphique obtenu dans ces conditions pour le pic T_1 . L'augmentation d'absorbance se poursuit jusqu'à 20 minutes, elle est linéaire seulement dans les premières minutes de la réaction. Ceci est donc un argument en faveur de la formation de dérivés de l'acide acrylique dans le pic T_1 . La densité optique à 241 nm mesurée dans les mêmes conditions pour le pic T_2 reste constante.

b_2 - Expérience de β -élimination en milieu réducteur

α - Principe

Quand les expériences de β -élimination sont réalisées en milieu réducteur (en présence de borohydrure de sodium), le groupement aldéhyde de la N-acétyl-galactosamine est transformé en alcool primaire, l'osaminitol formé est alors stable en milieu alcalin, d'autre part, les dérivés de l'acide acrylique sont réduits et transformés en alanine et en acide α -amino-butyrrique (CARLSON, 1966 (538)) ; CARLSON, 1968 (539) ; CARLSON, 1973 (540)). Si la réduction s'effectue en présence de borohydrure tritié, on obtiendra finalement le glycanne marqué sur le N-acétyl-galactosaminol qui après hydrolyse acide donnera le galactosaminitol. La chaîne peptidique sera marquée sur l'alanine et l'acide α -amino-butyrrique qui seront libérés lors de l'hydrolyse de la chaîne peptidique. Ceci est schématisé dans la figure 50 (p.137).

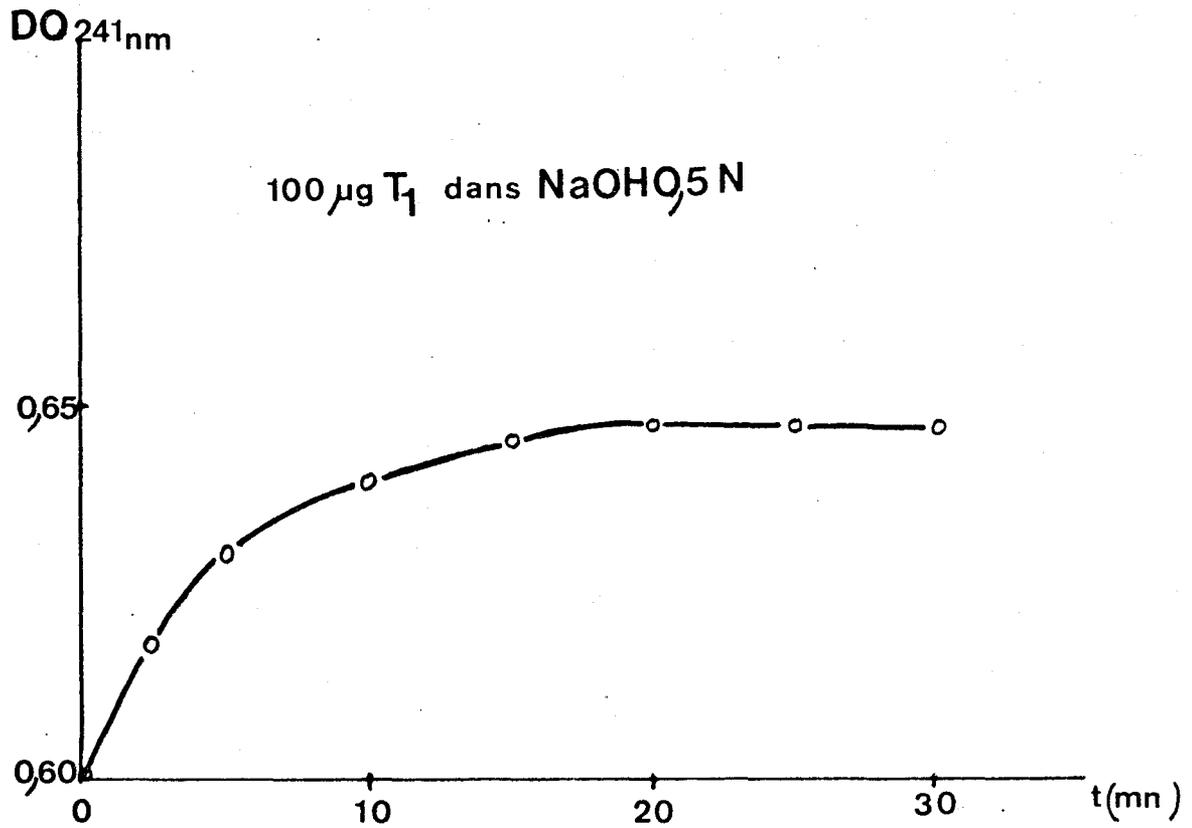


Figure 51

Etude de la densité optique à 241 nm lors d'une expérience de β élimination sur les glycopeptides du pic T₁.

β - Mode opératoire

Nous avons employé les conditions de CARLSON et al., 1970 (541). La β -élimination s'effectue sur 500 μg de glycopeptide T_1 dissout dans 100 μl de KOH 0,05 N, BH_4Na 1 M en présence de 5 mCi de borohydrure de sodium ($\beta\text{-H}$) (activité spécifique 10 Ci par mM). La réaction est réalisée en tube scellé à 45° C pendant 15 heures. L'arrêt de la réaction s'effectue en acidifiant légèrement le milieu (pH 5) avec de l'acide acétique.

L'excès de borohydrure peut être éliminé de différentes manières : en traitant par 3 fois le résidu sec par le mélange méthanol-acide acétique 5 : 1 (v : v) puis par le méthanol pur et en éliminant à chaque étape le méthyl-borate formé sous vide, ou en purifiant le mélange réactionnel par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de G 15 (80 cm x 2 cm) en éluant par de l'eau. Le meilleur résultat est donné en couplant les deux méthodes d'abord élimination sous forme de méthyl borate, puis passage sur séphadex G 15. La figure 52 (p.141) montre le résultat d'une telle chromatographie. Deux pics β_1 et β_2 passent en tête de la chromatographie, tandis que le borohydrure résiduel est nettement séparé et passe en fin de chromatographie.

γ - Mise en évidence de l'ose réduit

Le pic β_2 , chromatographié sur une colonne de G 15 préalablement étalonnée avec des oligosaccharides de divers poids moléculaires donne un Kd de 0,2, ce qui correspond à un poids moléculaire apparent de 650 daltons (voir figure 53 (p. 142)). Le pic hydrolysé par Hcl 1,5 N à 100° C pendant 1,5 heure, est déposé après purification sur du papier Whatman n° 3 et soumis à une chromatographie dans les conditions séparant les principaux oses réduits : pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau 5 : 5 : 1 : 3 (v : v : v : v) pendant 16 heures. La figure 54 (p.143) montre le résultat obtenu : les témoins latéraux (déposés également comme entraîneur avec l'hydrolysate radioactif) sont révélés au nitrate d'argent. La radioactivité est déterminée par scintillation liquide après avoir découpé des bandes de papier de 1 x 5 cm de part et d'autre du trait de départ. On observe un maximum de radioactivité au niveau du galactosaminol. Le pic β_1 traité dans les mêmes conditions ne donne aucune radioactivité.

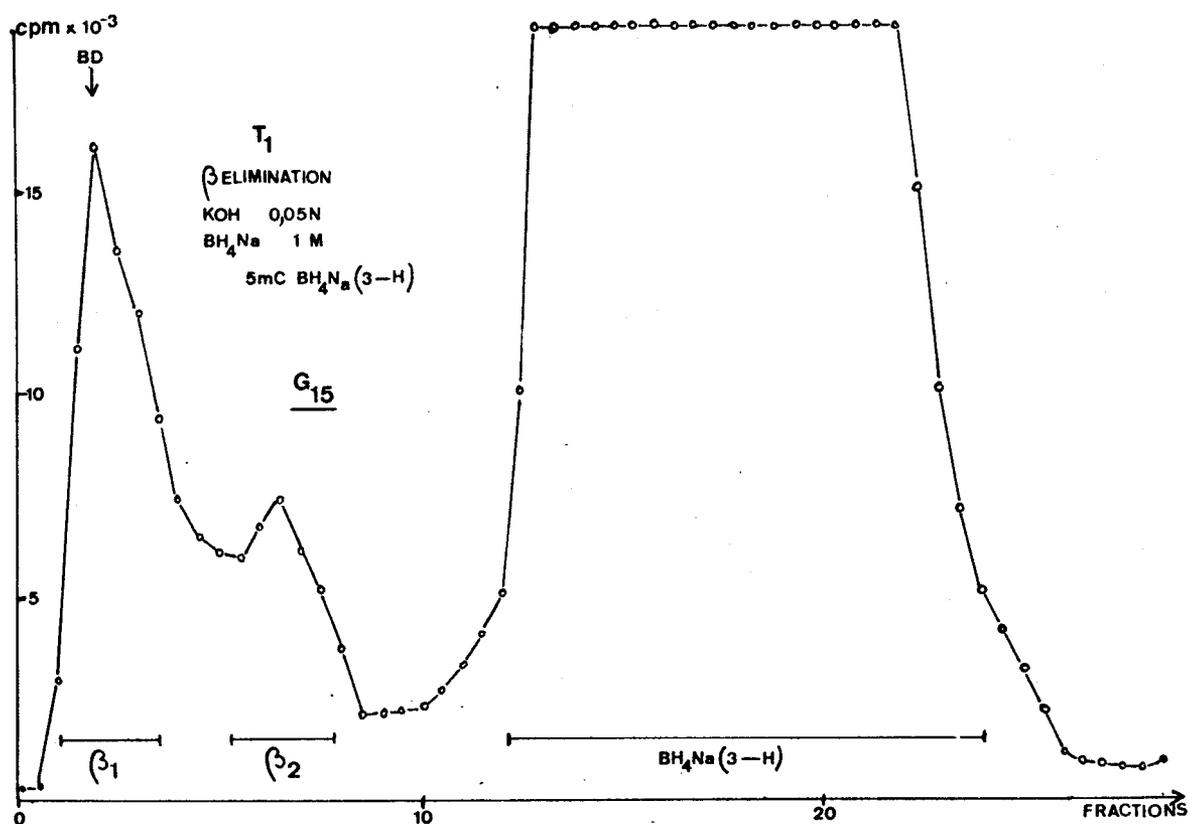


Figure 52

Chromatographie sur Séphadex G 15 des produits formés au cours d'une expérience β élimination des glycopeptides du pic T_1 .

B.D. : Bleu dextran.



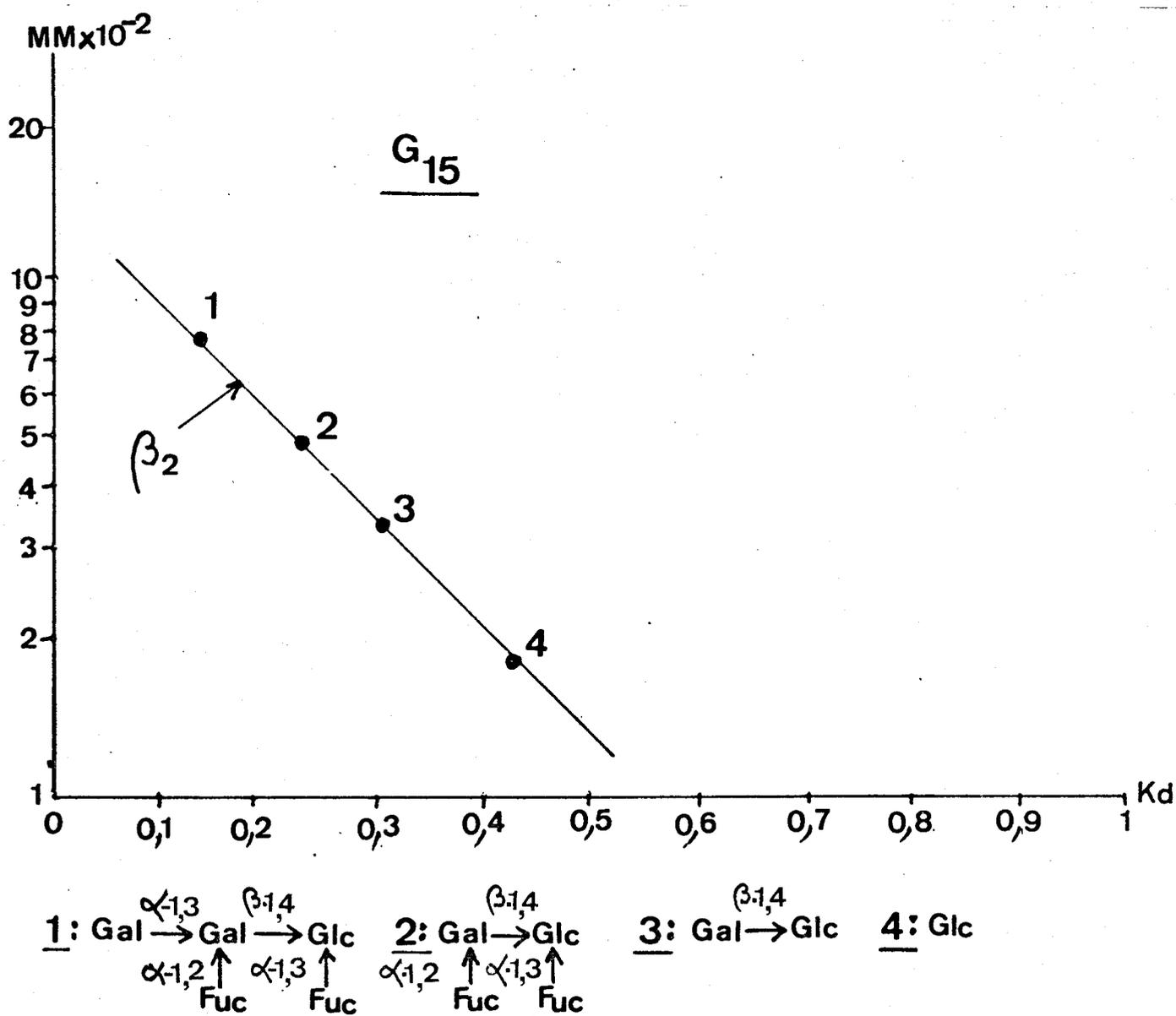


Figure 53

Calcul du poids moléculaire apparent du pic β_2 par chromatographie de tamisage moléculaire sur Séphadex G 15.

Kd : coefficient de distribution.



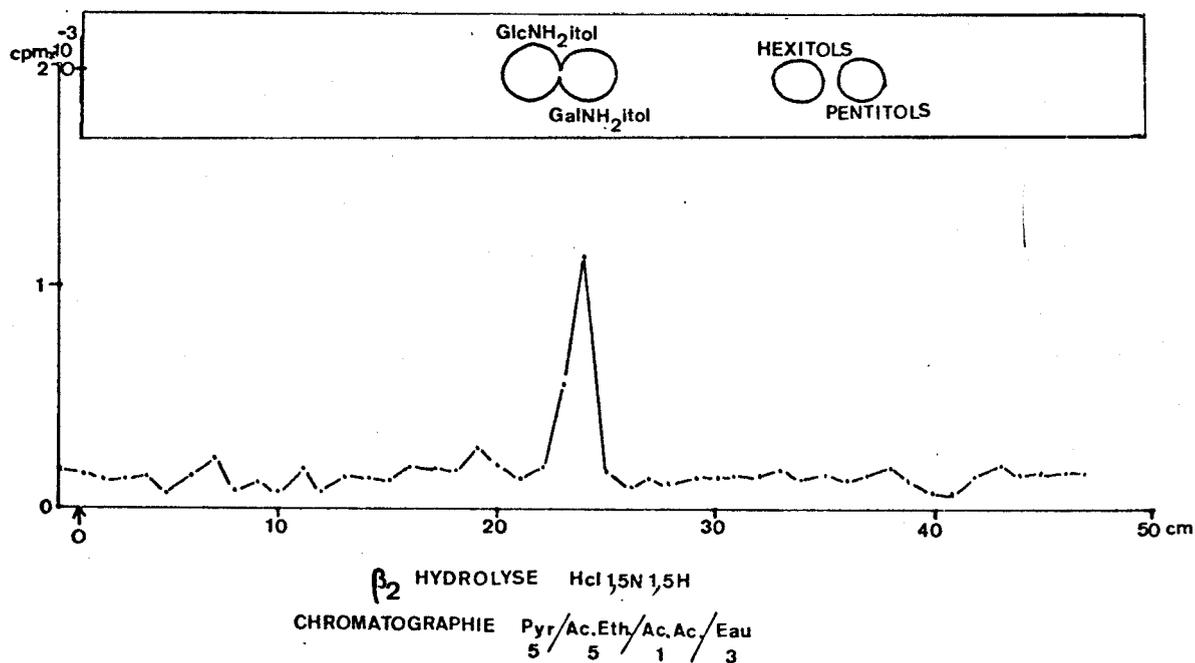


Figure 54

Mise en évidence de l'osaminitol sur le pic β_2 .

Les témoins latéraux : glucosaminitol ($\text{GlcNH}_2\text{itol}$), galactosaminitol ($\text{GalNH}_2\text{itol}$)

Hexitols et Pentitols ont été révélés au nitrate d'argent.



Il semble donc que le pic β_2 représente un glycanne de faible poids moléculaire, lié à la chaîne peptidique par l'intermédiaire de la N-acétyl-galactosamine, et détaché au cours de la β -élimination.

§ - Mise en évidence des amino-acides marqués

Le pic β_1 passant à l'exclusion sur la colonne de G_{15} est hydrolysé dans les conditions de libération des amino acides : Hcl 5,6 N, à 110° C pendant 48 heures en tube scellé. Après purification de l'hydrolysat, celui-ci est déposé sur une feuille de papier Whatman n° 3 et chromatographié dans le solvant de PARTRIDGE, 1948 (542) : butanol - acide acétique - eau 4 : 1 : 5 (v : v : v) pendant 20 heures. Les témoins de tous les amino-acides sont déposés comme témoins latéraux et comme entraîneurs et révélés au réactif à la ninhydrine. La radioactivité est déterminée comme précédemment. La figure 55 (p.145) montre un maximum de radioactivité au niveau de l'alanine, la radioactivité au niveau de l'acide α -amino-butyrique est beaucoup plus faible.

Il semble donc que le pic β_1 représente la chaîne peptidique sur laquelle sont attachés les glycannes et dont la sérine (et la thréonine) ont été transformées en dérivés de l'acide acrylique qui ont été réduits en alanine et acide α -amino-butyrique par le borohydrure de sodium tritié.

4 - Etude électrophorétique du pic T_1

a - Principe

Il semble donc que les sialoglycopeptides du pic T_1 contiennent des structures moléculaires de type "mucine". Ces composés doivent donc être acides et leur migration électrophorétique doit être dépendante de la quantité d'acidessialiques présents dans la molécule. Nous avons étudié les propriétés électrophorétiques de ces sialoglycopeptides avant et après action de la neuraminidase sur acétate de cellulose.

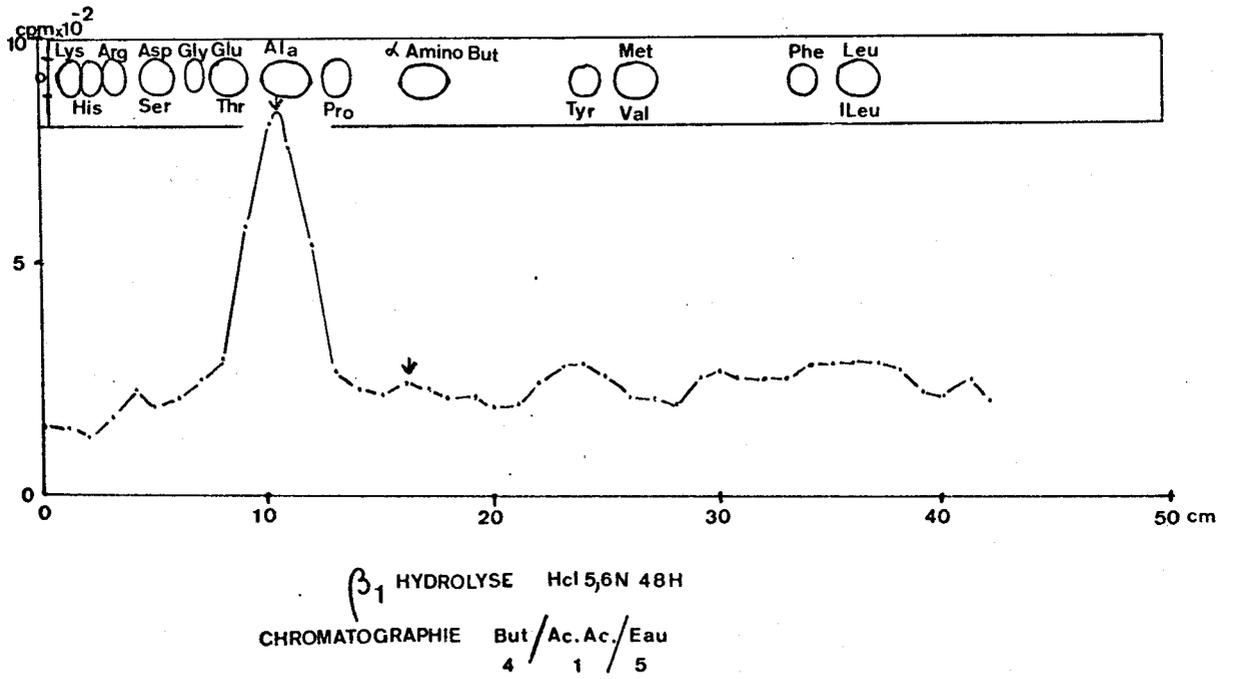


Figure 55

Mise en évidence des amino-acides radioactifs dans le pic β_1 .
 Les témoins latéraux d'acides aminés ont été révélés à la ninhydrine.



b - Mode opératoire

L'électrophorèse en acétate de cellulose a été conduite avec la technique de YAMASHINA et al., 1973 (543). Le tampon pyridine 1 M - acide acétique est à pH 3,5. L'électrophorèse est effectuée pendant 30 minutes avec un courant de 6 mA (0,5 mA par cm). Les bandes sont colorées par une solution de bleu Alcian dans l'acide acétique à 3 p. 100 pendant 10 minutes.

c - Résultats

Le dépôt de 10 μ l contient 10 μ g du pic T₁. La figure 56 (p.147) montre une telle électrophorèse. La mobilité prouve que les glycopeptides sont encore chargés négativement à ce pH. Après avoir ajouté 5 unités de neuraminidase de Vibrio cholerae (Neuraminidase Koch-Light à 500 unités par ml) et une hydrolyse de 30 minutes à 37° C, la bande glycopeptidique reste pratiquement à l'origine. Ce sont donc les acides sialiques qui sont responsables de la charge du glycopeptide.

E - CONCLUSIONS

L'étude de la structure des glycopeptides obtenus par hydrolyse trypsique des membranes plasmiques d'hépatocyte du Rat a permis de mettre en évidence une famille de sialoglycopeptides riches en acides sialiques, comportant de la N-acétyl-galactosamine, et dont la liaison entre le glycanne et la partie peptique est sensible aux agents alcalins. Cette liaison semble être de type o-glycosidique entre la N-acétyl-galactosamine et la sérine ou la thréonine. (Le fait que l'on ne retrouve pas un rapport molaire élevé pour la sérine et la thréonine comme pour toutes les glycoprotéines de type "mucine" semble indiquer que la purification soit insuffisante sur séphadex G-75, d'autres peptides peuvent être absorbés sur ce type de molécule. Ceci est en partie prouvé par le comportement de la trypsine qui a servi à hydrolyser les membranes qui reste absorbée à ce niveau alors qu'elle devrait être retenue sur la colonne. Une purification ultérieure avec une force ionique plus élevée doit être envisagée). Ce type de sialoglycopeptides semble donc être de type "mucine".

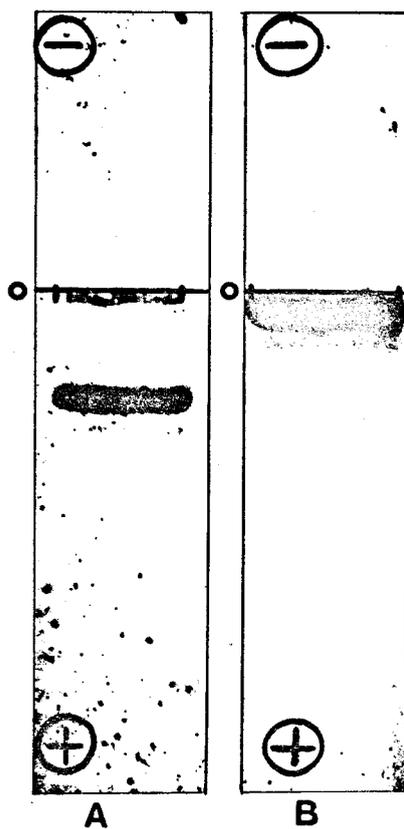


Figure 56

Electrophorèse sur acétate de cellulose du pic T_1 . pH 3,5

A : Pic T_1 natif

B : Pic T_2 après action de la neuraminidase de V. cholerae.

Coloration au Bleu Alcian



L'autre famille desialoglycopeptides beaucoup moins riche que la première en acides sialiques ne contient pas de N-acétyl-galactosamine, mais contient du fucose. Son indice de polarité plus bas indiquerait une position proche du plasmolème. La liaison est alcali-insensible, elle pourrait être de type glycosylaminique. Il faut remarquer également la présence dans les fractions peptidiques d'acides uroniques qui proviendraient de mono-polysaccharides acides dont la présence a déjà été signalée dans ces membranes. Le fait que ces glycopeptides soient détachés de la membrane par hydrolyse trypsique indique qu'ils sont accessibles à l'enzyme. En réalité, puisque l'on s'adresse à des membranes isolées, ils peuvent être détachés aussi bien de la face externe (extra-cellulaire) que de la face interne (intra-cellulaire) de la membrane. Nous nous sommes donc attachés à démontrer que ces glycopeptides formaient le glycolème de la cellule hépatique et étaient donc dirigés vers l'extérieur, Ceci étant d'ailleurs en accord avec les conceptions actuelles de la structure de la membrane.

IV - ORIENTATION DES GLYCOPROTEINES DANS LA MEMBRANE PLASMIQUE

D'HEPATOCYTES DE RAT

A - PRINCIPE

On connaît un grand nombre de techniques à l'heure actuelle pour orienter les protéines dans les membranes plasmiques des cellules animales (WALLACH, 1972 (544)). Ces techniques sont fondées soit sur l'hydrolyse des protéines membranaires sur la cellule vivante, soit sur le marquage des protéines grâce à des molécules non perméantes en général radioactives qui se fixent par liaison covalente sur les protéines membranaires "in situ". BERG, 1969 (545) a le premier employé ces molécules non perméantes dont la répartition est ensuite étudiée en électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS. Il a utilisé pour cela le sel de diazonium de l'acide sulfanilique marqué au soufre 35 : 35 S-DABS (BENDER et al.,

1971 (546)), le fait que cette molécule soit non perméante est attesté par son manque de réactivité vis à vis de l'hémoglobine intra-cellulaire qui est 10^{-5} fois plus faible vis à vis de l'hémoglobine libre à même concentration. Nous avons essayé d'adapter cette méthode mise au point pour le globule rouge par BERG, 1969 (547), pour les membranes chloroplastiques : DILLEY et al., 1972 (548). En perfusant un foie de Rat avec cette molécule réactive vis à vis des protéines et non perméante, puis après lavage pour éliminer l'excès de produit, de manière à ce qu'il ne réagisse pas avec les protéines intra-cellulaires, le marquage doit s'effectuer uniquement sur la partie externe des membranes. La préparation des membranes et des glycopeptides de la manière habituelle doit nous permettre de localiser le marqueur des sialoglycopeptides qui sont à l'extérieur, c'est-à-dire formant le glycoleme.

B - REACTIFS

La diazotation de l'acide p-amino-benzènesulfonique (35-S) (acide sulfanilique) est effectuée selon la méthode de HOYER et TREBOLD, 1970 (549). On emploie de l'acide sulfanilique 35-S ayant une radioactivité spécifique de 61,4 mCi par mM que l'on ajoute à 162 mg d'acide sulfanilique froid de manière à avoir une radioactivité spécifique de 2,7 mCi par mM. L'acide sulfanilique est dissous dans 4 ml de KCl 0,37 M et refroidi à 0° C, on y ajoute 4 ml d'HCl 1 N froid et 79 mg de NaNO_2 dans 2 ml d'eau distillée. Après agitation, on laisse reposer 20 minutes à 0° C. On ajoute alors 5 mg d'acide sulfamique ($\text{NH}_2\text{SO}_2\text{OH}$) pour neutraliser l'excès de NaNO_2 , puis 6,7 ml de K_2HPO_4 0,15 M et l'on ajuste à pH 7,5. On complète alors à 50 ml pour avoir une concentration de 0,02 M en DABS.

Comme le sel de diazonium réagit fortement avec les groupements ammoniums des tampons (comme le Tris) on travaille en tampon phosphate 0,05 M à pH 7,8 dans NaCl 0,3 M.

Le réactif est essayé sur 1 ml d'une solution de sérum albumine à 300 μg par ml, à laquelle on ajoute 100 μl du réactif, la sérum albumine est précipitée par l'ATCA à 10 p. 100 et comptée sur filtre millipore dans un mélange scintillant. On obtient une radioactivité spécifique de 4 000 cpm par mg de sérum albumine (comptage dans du BRAY).

C - MODE OPERATOIRE

Le foie est perfusé par la veine porte* à l'aide d'une pompe péristaltique. Le foie est d'abord lavé par la solution physiologique suivante : tampon phosphate 0,05 M pH 7,8 NaCl 0,3 M. Quand celui-ci est débarrassé du sang, la perfusion est poursuivie avec 20 ml de la solution de DABS (35 -S), enfin l'excès de réactif est évacué avec 200 ml du premier tampon jusqu'à ce que la radioactivité de l'effluent soit nulle.

Les membranes sont ensuite préparées de la manière habituelle et l'action de la trypsine permet d'obtenir la fraction glycopeptidique. Celle-ci est chromatographiée sur une colonne de Séphadex G-75 et la radioactivité est comptée en scintillation liquide dans du BRAY (fractions de 1 ml comptées avec 10 ml de BRAY).

D - RESULTATS

La radioactivité obtenue est de 400 cpm par mg de protéines membranaires (comptées dans le BRAY) soit 10 fois plus faible que celle obtenue avec la serum albumine en solution, en effet, ici seulement une faible partie des protéines - celles qui sont en contact avec le milieu extra cellulaire - a été marquée. La radioactivité spécifique des organites intra cellulaires : noyaux, mitochondries, microsomes, mesurée lors du fractionnement est négligeable, ceci montre que le marqueur n'a pas pénétré à l'intérieur de la cellule.

La figure 57 (p.151) montre le résultat de la chromatographie de glycopeptides, on s'aperçoit que les deux pics T_1 et T_2 sont marqués, le pic T_2 l'est d'ailleurs beaucoup moins que le pic T_1 ce qui montrerait sa position un peu plus interne dans le glycoleme.

(*) Nous remercions Monsieur Henri DEBRAY d'avoir effectué pour nous les opérations de perfusion sur nos préparations.

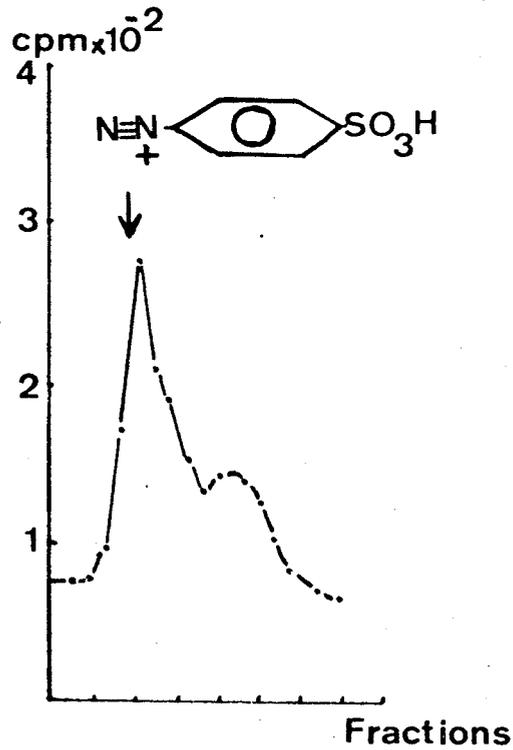
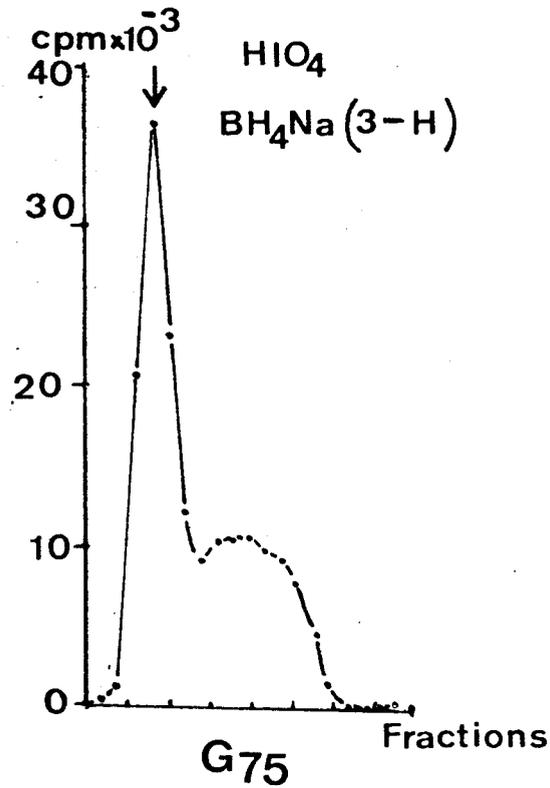


Figure 57

Chromatographie des glycopeptides obtenus par hydrolyse trypsique
des membranes.

A : Après marquage "in vitro" des acides sialiques

B : Après marquage "in vivo" par le DABS (³⁵S).



C - CONCLUSIONS

Il semble donc que les deux familles de sialoglycopeptides obtenues par hydrolyse trypsique de la membrane soient disposées à l'extérieur de celle-ci. Celle du type "mucine" de rapport axial élevé s'étend très loin du plasmolemme et est marquée fortement. Celle pauvre en acides sialiques doit être plus proche de la matrice lipidique comme le montre son indice de polarité et son marquage plus faibles. C'est l'ensemble du matériel détaché par la trypsine qui doit former le glycoleme de la cellule hépatique.

CONCLUSIONS GENERALES

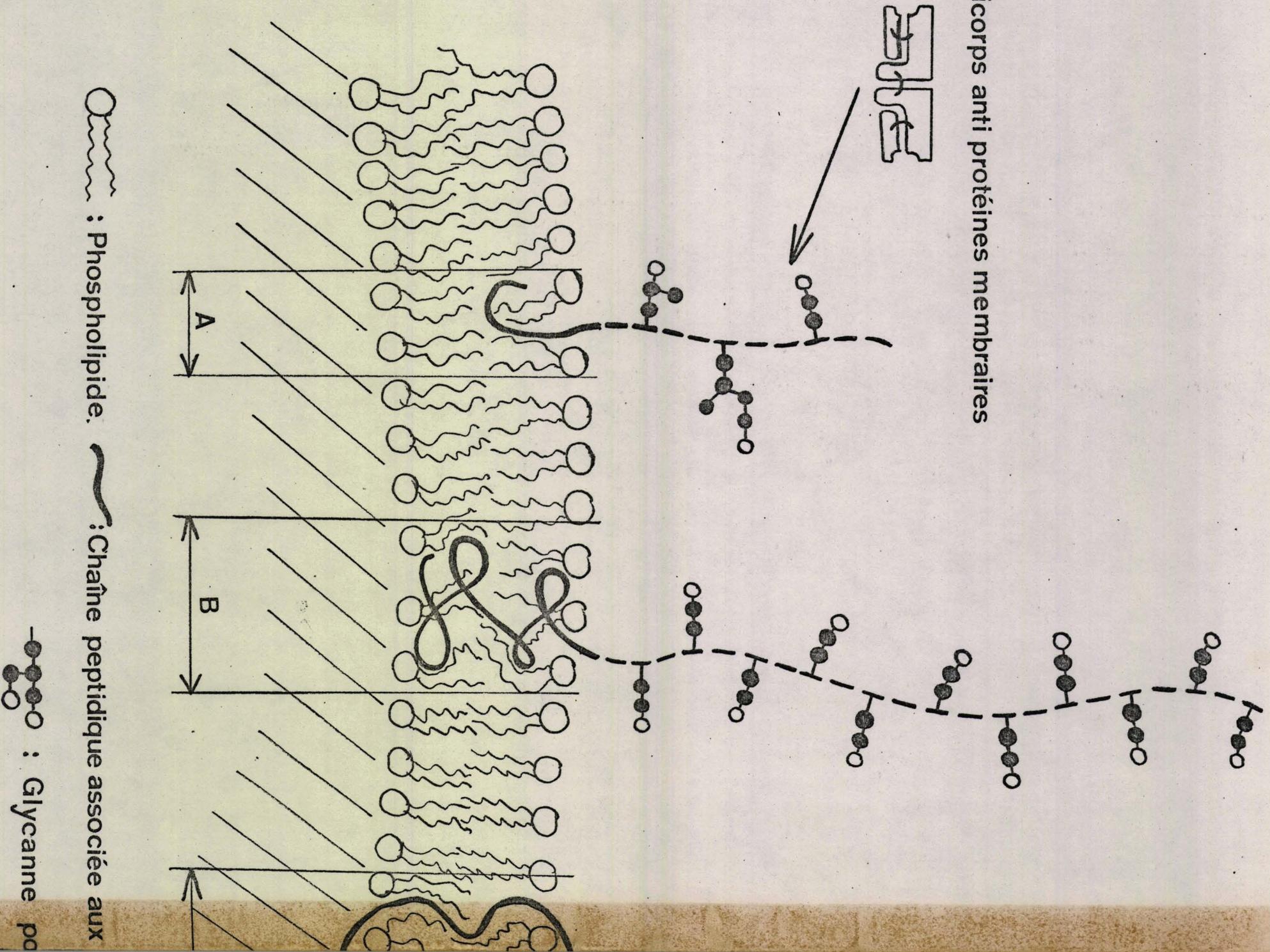
Notre travail sur les glycoprotéines de la membrane plasmique comprend deux parties qui se distinguent par la méthodologie employée. Dans la première partie ce sont les glycoprotéines totales qui sont caractérisées après une solubilisation grâce à des solvants aqueux ou organiques. La deuxième partie correspond à une étude des glycopeptides obtenus après hydrolyse trypsique de la membrane totale. Ces deux types d'expérimentation ont été pour la première fois employés conjointement et nous ont permis d'établir un schéma de l'intégration de ces molécules dans la membrane plasmique. Ce schéma représenté dans la figure 58 (p.154) est en bon accord avec les conceptions les plus modernes de la structure moléculaire des membranes plasmiques en particulier avec le concept de la double couche interrompue. Nous pouvons comparer les points suivants avec les résultats obtenus par divers auteurs :

1° - Les glycoprotéines sont en relation avec les phospholipides membranaires, mais à des degrés variables. On peut distinguer des glycoprotéines alcali-solubles qui entraînent lors de leur solubilisation un peu de phospholipides (10 p. 100) (la présence d'EDTA nécessaire à la solubilisation semble indiquer le rôle du Ca^{++} dans la stabilisation de la membrane). Ces glycoprotéines "peu intégrées" sont relativement pauvres en acides sialiques mais sont antigéniques. Elles réagissent en effet avec un immunosérum dirigé contre la membrane totale (figure 58 (p.154) : A)

Les glycoprotéines pyridines-solubles sont, elles, beaucoup plus intégrées à la membrane, c'est-à-dire en relation plus étroite avec les phospholipides (figure 58 (p.154) : B)) lors de leur solubilisation. Elles entraînent 40 p. 100 de phospholipides, elles sont riches en acides sialiques et de masse moléculaire plus élevée que les précédentes.

Les glycoprotéines pyridines-insolubles de très haute masse moléculaire (figure 58 (p.154) : C) font partie de la matrice lipoprotéique du plasmolème, elles sont riches en oses neutres et en osamines mais relativement pauvres en acides sialiques, elles sont associées à 50 p. 100 des phospholipides membranaires.

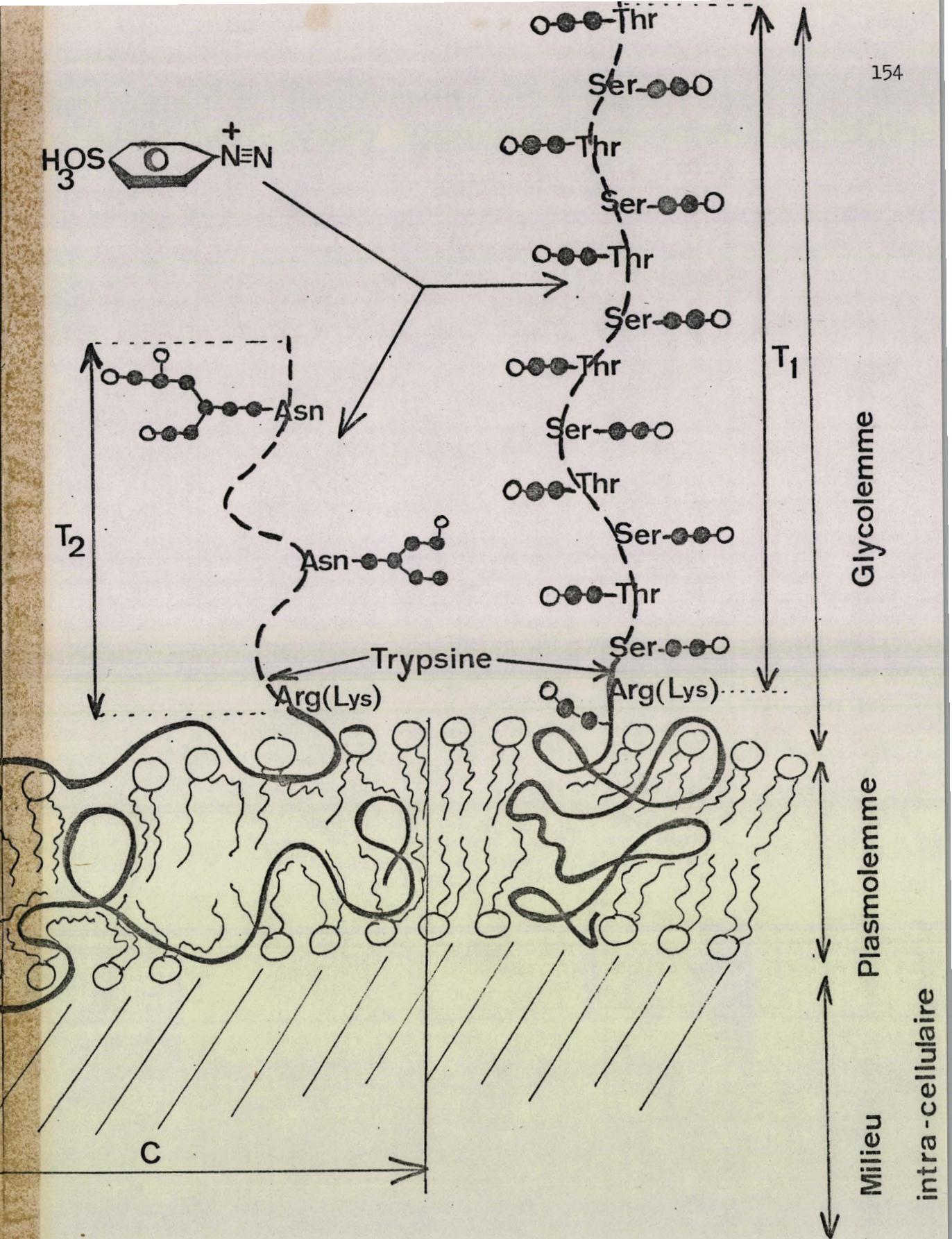
anticorps anti protéines membranaires



Intégration des glycopro

d'hépatoc

(voir conc



phospholipides. --- :Chaîne peptidique "libre."

possédant des acides sialiques (O).



58
ténines dans la membrane plasmique
cytes de Rat

lusions générales)

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de GURD et al., 1972 (550). Ces auteurs n'avaient d'ailleurs pas étudié en détail toutes les fractions. Nos expériences de marquage à la glucosamine ^{14}C et au phosphate ^{32}P ainsi que la chromatographie sur Sépharose 6 B des trois fractions indiquées nous ont permis d'étudier la répartition des glycoprotéines et des phospholipides dans ces fractions.

2° - Cette différence de taille déjà signalée a été mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et dix glycoprotéines dont la masse moléculaire varie entre 500 000 daltons et 38 000 daltons ont été caractérisées.

La méthode employée est celle de GLOSSMANN et NEVILLE, 1971 (551). Ces auteurs ne mettent en évidence que six glycoprotéines, l'augmentation de sensibilité semble être due à la méthode de révélation. En effet, la méthode que nous avons employée consistant en une oxydation courte des acides sialiques par l'acide périodique suivie d'une réduction au borohydrure de sodium tritié n'avait jamais été utilisée pour ce type de membrane.

3° - L'action de la trypsine sur les membranes totales a permis d'isoler deux types de sialoglycopeptides qui tous deux sont marqués avec des agents non perméants comme le sel de diazonium de l'acide sulfanilique (figure 58 (p.154) ils sont donc dirigés, du moins en partie, vers le côté extra-cellulaire de la membrane. Ce marqueur a été utilisé par de nombreux auteurs sur des cellules libres ou des organites (chloroplastes), mais jamais sur des cellules intégrées dans un tissu. Ce marquage des glycopeptides membranaires par un agent non perméant a donc été appliqué pour la première fois à ce matériel biologique.

4° - Le premier glycopeptide passant à l'exclusion sur G_{75} semble être de type "mucine". C'est une molécule riche en acides sialiques, fortement électro-négative, d'indice de polarité proche de celui de la membrane. La liaison glycanne-protéine alcali-sensible semble être du type O-glycosidique (entre la sérine ou la thréonine et la N-acétyl-galactosamine). Le faible poids moléculaire apparent des glycannes 650 serait en faveur d'un chaînon : $\text{Nacgal} - \text{ose neutre} - \text{acide sialique}$.

La présence de glycopeptides de type mucine a été démontrée uniquement, à l'heure actuelle, sur des cellules libres : CODINGTON et al., 1972 (552) sur des cellules TA₃ et par YAMASHINA et al., 1973 (553) sur les cellules de l'hépatome ascitique AH66 bien qu'aucun de ces deux auteurs n'ait mis en évidence la N-acétyl galactosamine liée à la sérine ou à la thréonine.

5° - Le deuxième glycopeptide retenu sur G₇₅ a une composition en mono-saccharides très différente caractérisée par l'absence de N-acétyl galactosamine et la présence de fucose. L'indice de polarité plus bas que celui des protéines membranaires totales et le plus faible marquage par le sel de diazonium de l'acide sulfanilique semblent indiquer que ce type de glycopeptide est plus proche de la matrice phospholipidique, c'est-à-dire du plasmolème.

Les deux types de liaison glycanne-protéine : N et O glycosidiques semblent donc exister dans les glycoprotéines membranaires. Notre étude ne permet pas de savoir si elles sont ou non portées par la même chaîne peptidique. Il semble que ceci soit le cas pour la glycophorine ou la même protéine porte des glycannes liés O-glycosidiquement et des glycannes liés N-glycosidiquement.

6° - La présence constante d'acides uroniques dans toutes les fractions peptidiques semble indiquer que des mucopolysaccharides acides se trouvent au niveau du glycolème.

Bien que ces mucopolysaccharides n'aient pas été mis en évidence directement, leur présence est confirmée par de nombreux auteurs en particulier par KRAEMER, 1971 (554) et YAMASHINA et al., 1973 (555)

7° - Cette étude tendrait à prouver que les conceptions actuelles sur la structure de la membrane plasmique appuyées en général par des travaux sur les cellules libres (érythrocytes, cellules en culture) sont également valables pour des cellules intégrées dans un tissu, du moins pour les portions membranaires non impliquées dans les jonctions inter-cellulaires.

8°- Toute l'expérimentation a été effectuée sur des membranes isolées, sur lesquelles ont été appliqués les critères de pureté classiques. Il est en effet nécessaire pour ce genre d'études d'avoir un matériel de départ non contaminé par des cyto-membranes. La microscopie électronique, les études en gradient de densité et l'étude des "marqueurs" enzymatiques systématiquement employées sur nos préparations nous ont permis de réaliser ce travail.

=0=0=0=0=0=0=0=0=0=0=

APPENDICE TECHNIQUE

I - METHODE DE DOSAGE DES ENZYMES MARQUEURS

Comme la plupart des enzymes marqueurs sont des phosphatases, nous décrirons d'abord le procédé utilisé pour le dosage du phosphate libéré après action enzymatique.

A - DOSAGE DU PHOSPHATE LIBRE (Pi)

1 - Principe

Le procédé est dérivé de celui de BONTING et al., 1961 (556) en remplaçant le sulfate ferreux par l'amidol de manière à augmenter la sensibilité.

2 - Réactifs

La solution est faite extemporanément et filtrée sur du papier Whatman n° 3 :

Amidol 1 p. 100) dans SO_4H_2 1,15 N
Sulfite de sodium 20 p. 100	
Molybdate d'ammonium 1 p. 100	

3 - Mode opératoire

A 1 ml de la solution à doser, on ajoute 2 ml de réactif (quantités pouvant être divisées par deux), la coloration est développée à l'obscurité pendant 1 heure et la densité optique est lue à 700 nm. La lecture est réalisée contre un témoin blanc dans lequel la solution à doser est remplacée par le milieu d'incubation (ne jamais effectuer les études enzymatiques des phosphatases dans un tampon phosphat

DO 700 nm

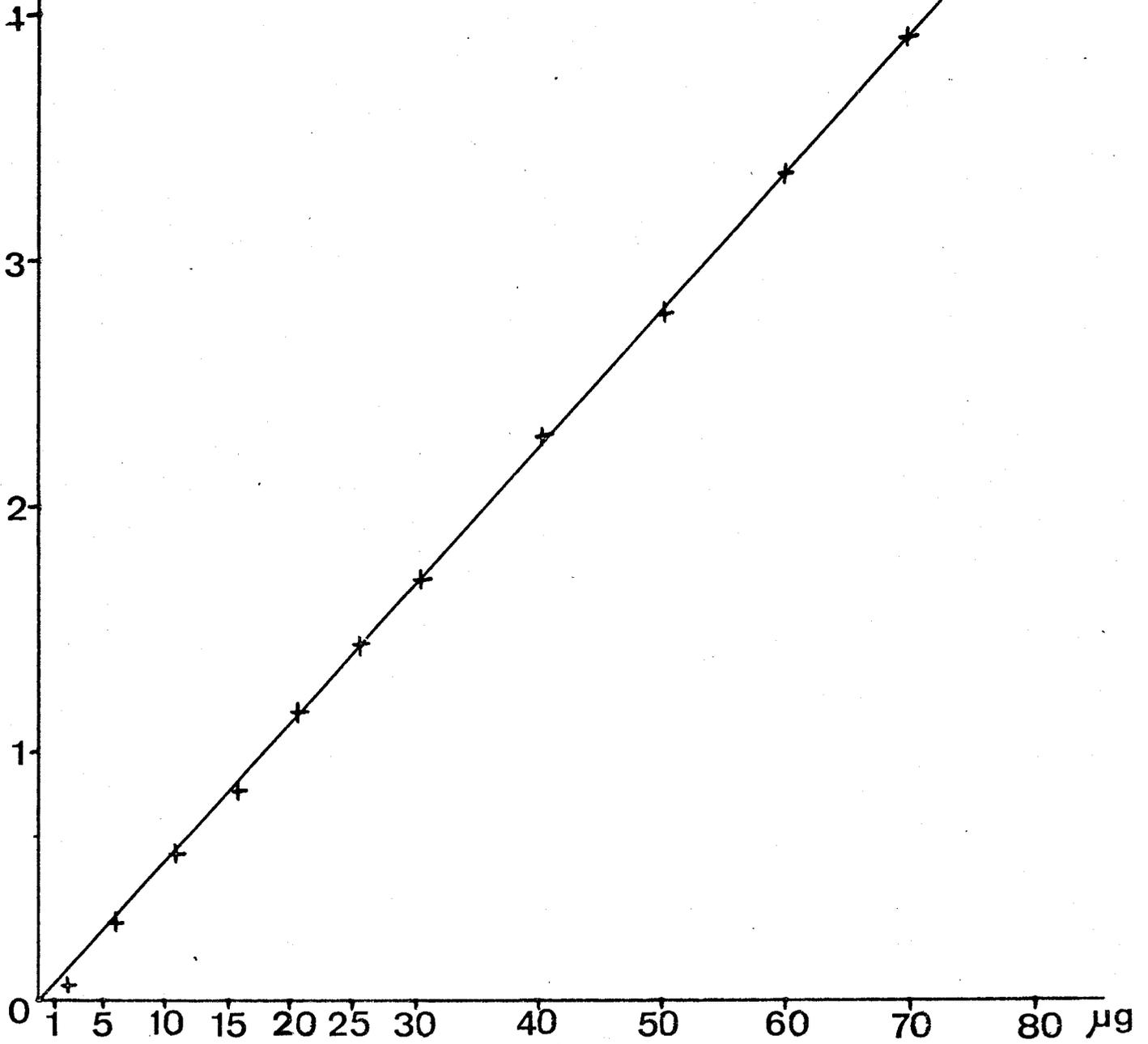


Figure 59

Courbe d'étalonnage du phosphate libre entre 1 et 80 µgr par ml

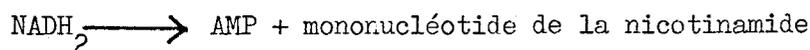


pyrex. A 0,5 ml de la suspension membranaire, on ajoute au temps $t = 0$ 0,5 ml du milieu A_2 (concentration finale en AMP 10 mM). Au bout de 10 minutes, on arrête la réaction par 1 ml d'ATCA à 20 p. 100. Après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, le phosphate libéré, est dosé sur 1 ml. Le dosage est fait en triple exemplaire par rapport à un témoin blanc dans lequel d'ATCA est ajouté avant le milieu A_2 . Après dosage des protéines par la méthode de LOWRY, l'activité spécifique est ramenée en μ moles de substrat transformé par mg de protéines et par heure.

C - NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE (EC 3. 6. 1. 9.)

1 - Principe

L'enzyme catalyse la réaction suivante :



Les deux produits de l'hydrolyse sont à leur tour hydrolysés par la 5' nucléotidase et l'on mesure le phosphate libéré.

2 - Réactifs

Le milieu d'incubation est celui décrit par LAUTER et al., 1972 (558) légèrement modifié :

Milieu A_1	Tris - Hcl	100 mM pH 9
	Kcl	10 mM
	CoCl ₂	0,05 mM
Milieu A_2	Tris - Hcl	100 mM pH 9
	Kcl	10 mM
	CoCl ₂	0,05 mM
	NADH ₂	5 mM

3 - Mode opératoire

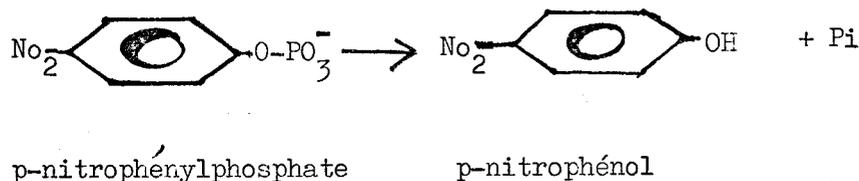
Les membranes sont resuspendues dans le milieu A₁ par une légère homogénéisation. A 0,3 ml de la suspension on ajoute au temps t = 0 0,2 ml de la solution A₂ (concentration finale en substrat 2 mM). La réaction est arrêtée par 0,5 ml d'HClO₄ 0,6 N après une incubation de 30 minutes à 37° C sous légère agitation. Un témoin blanc est soumis aux mêmes conditions d'incubation mais l'HClO₄ est ajouté avant le milieu A₂.

Après centrifugation à 5 000 g 10 minutes on dose le phosphate libéré sur 0,5 ml, on ramène le résultat en μ moles de NADH₂ hydrolysé par heure et par mg de protéines.

D - P-NITROPHENYLPHOSPHATASE (EC 3. 1. 3. 1.)

1 - Principe

La réaction catalysée par l'enzyme est la suivante :



L'activité est mesurée en dosant au spectrophotomètre le p-nitrophénol libéré à 420 nm.

Il existe une p-nitrophénylphosphatase activée par le K⁺ qui est inhibée par l'ouabaïne 10⁻⁴ M. On effectuera deux incubations en présence ou en l'absence d'ouabaïne, la différence donnera l'activité de la p-nitrophénylphosphatase (K⁺).

2 - Réactifs

Nous avons employé la méthode de LAUTER et al., 1972 (559) modifiée :

Milieu A ₁	Tris - Hcl	100 mM	pH 9
	Kcl	55 mM	
	Mgcl ₂	11 mM	

Milieu A ₂	Tris - Hcl	100 mM	pH 9
	Kcl	55 mM	
	Mgcl ₂	11 mM	
	p-nitrophénylphosphate	2,5 mM	

Milieu A'₂ (avec ouabaïne)

	Tris - Hcl	100 mM	pH 9
	Kcl	55 mM	
	Mgcl ₂	11 mM	
	p-nitrophénylphosphate	2,5 mM	
	ouabaïne	10 ⁻⁴ M	

3 - Mode opératoire

Les membranes sont resuspendues dans le milieu A₁ par une légère homogénéisation. La réaction s'effectue en mélangeant 0,5 ml de membranes resuspendues 0,4 ml du milieu A₂ ou A'₂. Après incubation 10' à 37° C la réaction est arrêtée par 0,1 ml de NaOH 1,8 M puis centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes.

Le p-nitrophénol absorbe en milieu alcalin à 420 nm, la densité optique du surnageant est déterminée, et la quantité de p-nitrophénol calculée par rapport à une courbe d'étalonnage tracée grâce à une gamme de concentration de p-nitrophénol de 0,01 à 0,1 μM par ml dissous dans le même tampon (voir figure 60 (p.164)).

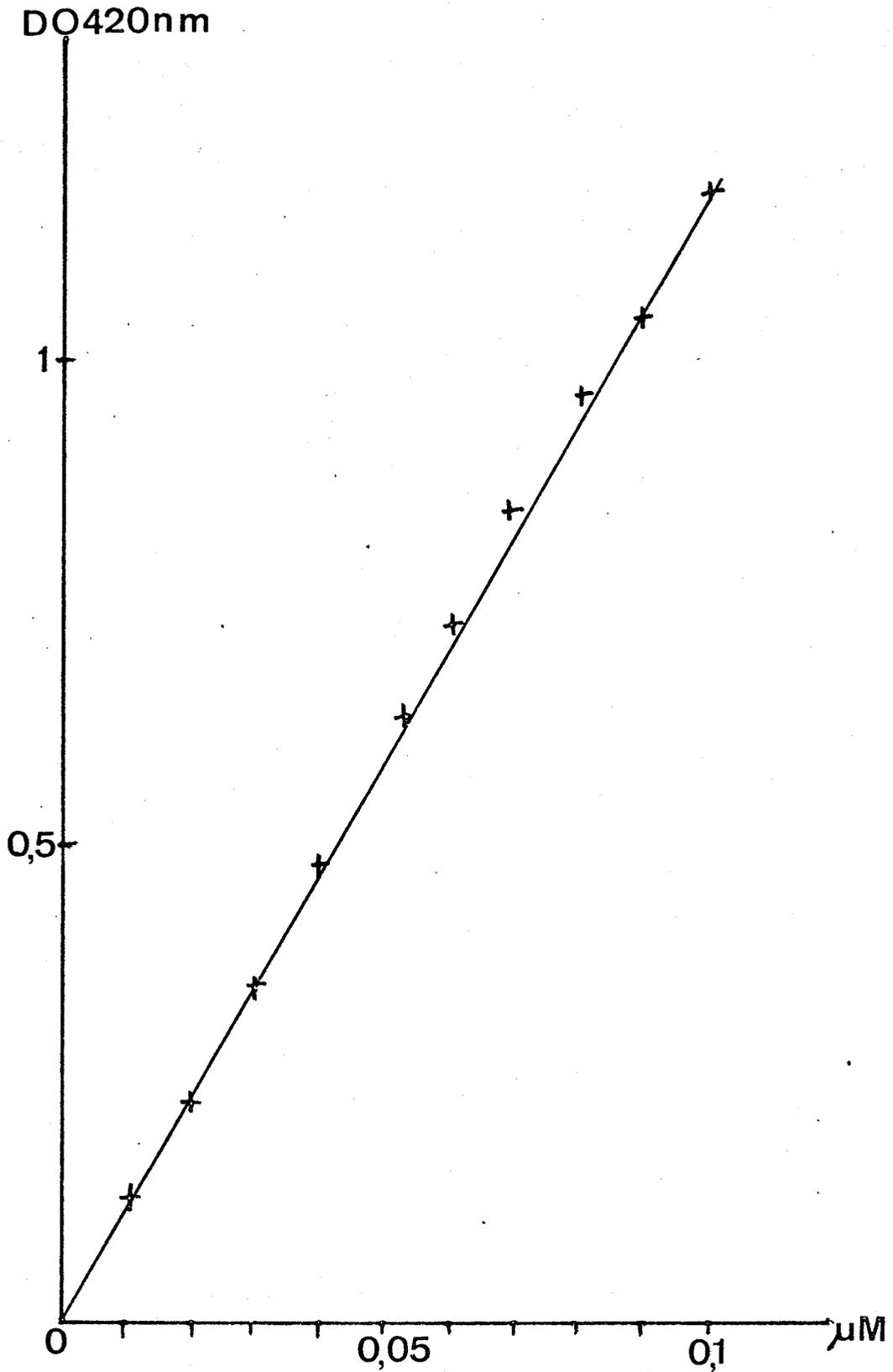


Figure 60

Courbe d'étalonnage du p-nitro-phénol entre 0,01 et 0,1 µM
dans le milieu d'incubation A₁



La valeur obtenue avec le milieu A₂ donne l'activité de la p-nitrophénylphostase alcaline totale.

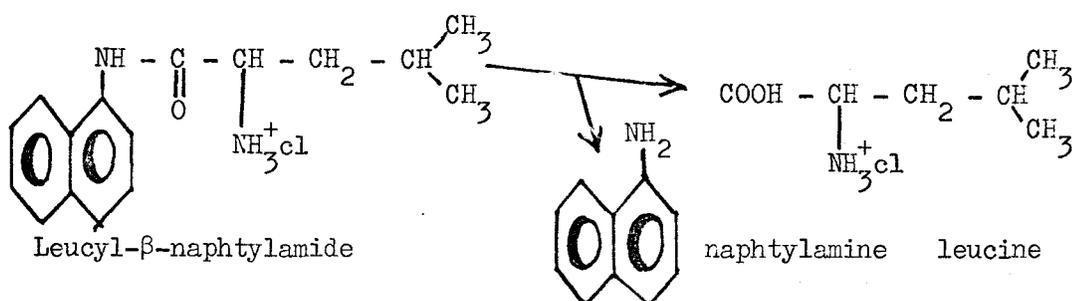
La différence entre les deux valeurs A₂ - A'₂ donne l'activité de la p-nitrophénylphostase activée par le K⁺.

Ces deux valeurs sont ramenées par dosage des protéines avec la méthode de LOWRY en μ moles de p-nitrophénylphosphate hydrolysé par mg de protéines et par heure.

E - LEUCYL- β -NAPHTHYLAMIDASE (EC 3. 4. 11)

1 - Principe

La réaction enzymatique est la suivante :



On dose ensuite la naphthylamine par la méthode de GOLDBARG et RUTENBERG, 1958 (560)

2 - Réactifs

Le milieu d'incubation est celui employé par LAUTER et al., 1972 (561) :

Milieu A₁ Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4

Milieu A₂ Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4
 L-leucyl- β -naphtylamide 0,2 mM

Les réactifs nécessaires au dosage sont les suivants :

ATCA : 40 p. 100

nitrite de sodium : 0,1 p. 100

sulfamate d'ammonium : 0,5 p. 100

N(1 naphtyl-éthylènediamine di chlorhydrate) 0,5 mg par ml (dans l'éthanol à 95 p.100)

3 - Mode opératoire

A 0,5 ml de membranes resuspendues dans le milieu A₁, on ajoute au temps t = 0 0,5 ml de milieu A₂. La réaction est arrêtée après une incubation de 10' à 37° C sous agitation par 1 ml d'ATCA 40 p. 100.

Le dosage de la naphtylamine s'effectue après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes sur 1 ml du surnageant auquel on ajoute successivement 1 ml de la solution de nitrite de sodium (temps de contact 3 minutes), 1 ml de sulfamate pour éliminer l'excès de nitrite (temps de contact 2 minutes), 2 ml de la solution de N (1 naphtyl éthylène diamine dichlorhydrate, temps de contact 10 minutes), la figure 61 (p.167) montre le mécanisme de la réaction. La lecture se fait à 560 nm par rapport à un témoin blanc dans lequel l'ATCA a été ajouté avant le milieu A₂.

La quantité de naphtylamine est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée en effectuant le dosage sur des concentrations allant de 0,05 à 0,5 μ moles par ml par naphtylamine dissoute dans le même tampon (voir figure 61 (p.167)).

L'activité est exprimée en μ moles de leucyl- β -naphtylamide hydrolysée par mg de protéines et par heure.

F - ATPases (EC 3. 6. 1. 3.)

1 - Principe

La réaction enzymatique est la suivante :



On dose l'activité de l'enzyme en dosant le phosphate libéré.

On distingue une activité ATPasique totale activée par le Mg⁺⁺ le Na⁺ et le K⁺ (ATPase (Mg⁺, Na⁺, K⁺), et une activité ATPasique activée par la Na⁺ et le K⁺ (ATPase, Na⁺, K⁺) qui est inhibée par l'ouabaïne. Deux essais seront effectués en présence et en l'absence d'ouabaïne, la différence donnera l'activité de l'ATPase (Na⁺, K⁺).

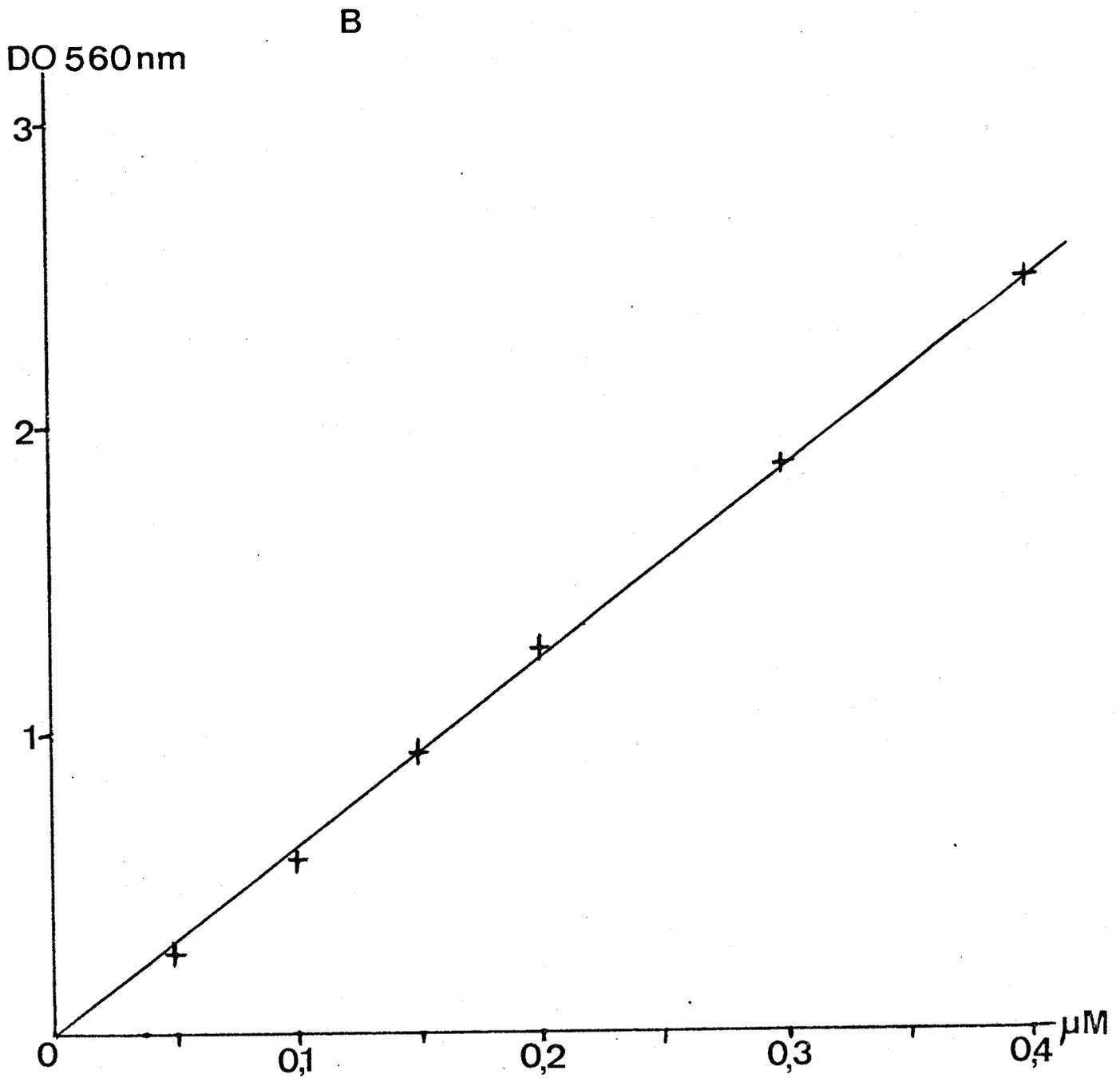
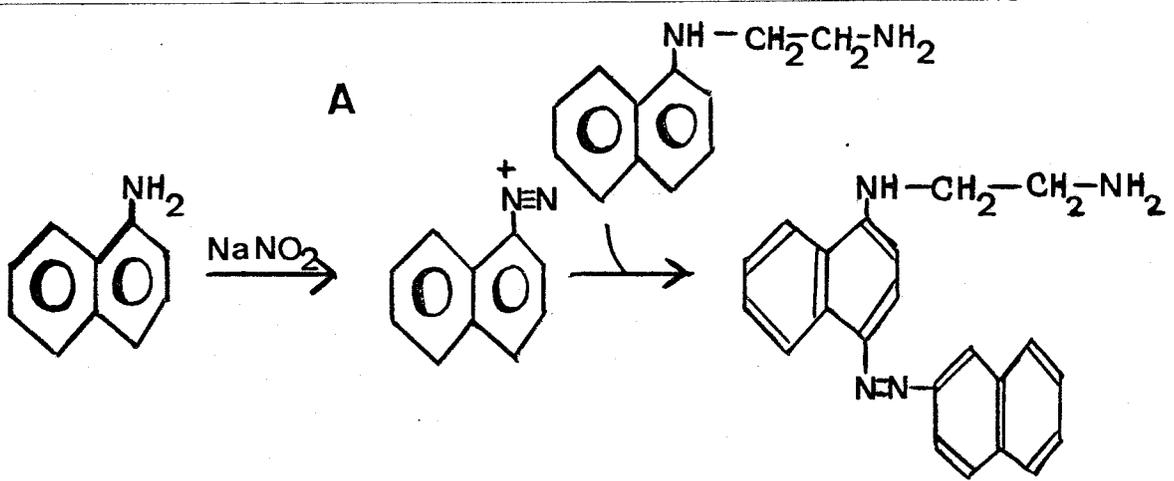


Figure 61

Dosage de l'activité leucyl- β -naphtylamidasique.

A : principe du dosage

B : courbe d'étalonnage de la β naphtylamide de 0,05 à 0,4 μM par ml.



2 - Réactifs

Nous avons utilisé la méthode décrite par EMMELOT et al., 1964 (562). Le tris employé est le sel de Tris, celui-ci est produit à partir de l'ATP sous sa forme sodique, on échange les ions sodium sur une colonne de Dowex 50 x 4 (H^+). L'effluent acide est neutralisé avec une solution de Tris.

Milieu A ₁	Tris - Hcl	40 mM	pH 7,4	Milieu A ₂	Tris - Hcl	40 mM	pH 7,4
	Mgcl ₂	2 mM			Mgcl ₂	2 mM	
	Kcl	5 mM			Kcl	5 mM	
	Nacl	100 mM			Nacl	100 mM	
Pour l'ATPase (Mg^{++} , Na^+ , K^+)					ATP (tris)	4 mM	
Milieu B ₁	Tris - Hcl	40 mM	pH 7,4	Milieu B ₂	Tris - Hcl	40 mM	pH 7,4
	Mgcl ₂	2 mM			Mgcl ₂	2 mM	
Pour l'ATPase (Mg^{++})					ouabaïne	$2 \cdot 10^{-4} M$	

3 - Mode opératoire

Les membranes sont resuspendues dans le milieu A₁ ou B₁.

A 0,5 ml de chacune de ces suspensions, on ajoute au temps $t = 0$ 0,5 ml de milieu A₂ (avec A₁) et B₂ (avec B₁). Les deux réactions sont arrêtées après 10 minutes d'incubation à 37° C sous agitation par 1 ml d'ATCA à 20 p. 100, après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, le phosphate est dosé sur 0,5 ml de surnageant.

Les résultats obtenus avec les milieux A donnent l'activité de l'ATPase (Mg^{++} , Na^+ , K^+).

Les résultats obtenus avec les milieux B donnent l'activité de l'ATPase (Mg^{++}).

La différence des activités A - B donne l'activité de l'ATPase (Na^+ , K^+).

Tous ces résultats sont exprimés en μ moles d'ATP hydrolysées par mg de protéines et par heure après dosage des protéines membranaires par la méthode de LOWRY.

G - GLUCOSE 6 PHOSPHATASE (EC 3. 1. 3. 9.)

1 - Principe

La réaction catalysée par l'enzyme est la suivante :



On dose après incubation de l'enzyme et du substrat le phosphate libéré.

2 - Réactifs

Nous avons employé la méthode de SWANSON, 1955 (563).

Milieu A₁ Acide maléique 100 mM ajusté à pH 6,5 avec de la soude

Milieu A₂ Glucose 6 phosphate 100 mM pH 6,5

3 - Mode opératoire

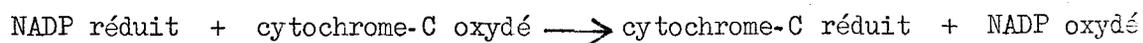
A 0,3 ml de tampon A₁ on ajoute 0,1 ml de la suspension de membrane dans l'eau, puis au temps t = 0 0,1 ml du milieu A₂, après une incubation de 30 minutes à 37° C sous agitation, on arrête la réaction par 1 ml d'ATCA à 10 p. 100. Après centrifugation à 5 000 g 10' on effectue le dosage du phosphate sur 1 ml du surnageant par rapport à un témoin blanc dans lequel l'ATCA a été ajouté avant le milieu A₂.

L'activité est ramenée en μ moles de glucose 6 phosphate hydrolysé par mg de protéines et par heure.

H - NADP H₂ CYTOCHROME-C-REDUCTASE (EC 1. 6. 2. 2.)

1 - Principe

La réaction est la suivante :



Le cytochrome C oxydé et réduit a une différence de coefficient d'extinction molaire à 510nm, ce qui permet de calculer après lecture au spectrophotomètre la quantité de substrat utilisé.

2 - Réactifs

Nous avons employé la méthode de MAHLER, 1955 (564).

Les milieux sont les suivants : tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7, 5, KCN 0,003 M ; cytochrome C : 1 p. 100 ; NADPH₂ : 10 mg pour 2 ml.

3 - Mode opératoire

La réaction s'effectue à la température du laboratoire en cuve de spectrophotomètre. On ajoute successivement dans la cuve de verre : 0,2 ml de tampon phosphate, 0,1 ml de cytochrome C, 0,1 ml de NADPH₂, 2,5 ml d'eau puis au temps t = 0 on ajoute 0,1 ml de la suspension membranaire dans l'eau. La lecture se fait à 510 nm toutes les 15 secondes contre un milieu identique où l'on a remplacé les 0,1 ml de la suspension membranaire par 0,1 ml d'eau.

Une cinétique est effectuée de 0 à 5 minutes et l'on prend la pente initiale de la courbe. La différence de coefficient d'extinction molaire entre le cytochrome C réduit et oxydé à 510 nm est de 18 500.

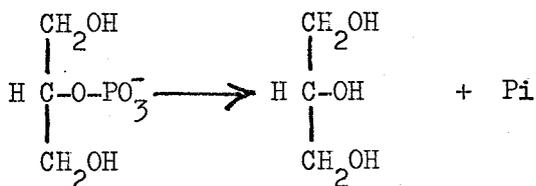
Le résultat est exprimé en μ moles de cytochrome C réduit par heure et par mg de protéines.

I - PHOSPHATASE ACIDE (EC 3. 1. 3. 2.)

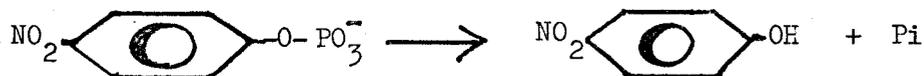
1 - Principe

L'activité phosphatasique acide peut être mesurée grâce à deux substrats :

1^o) Le β -glycérophosphate



On dose alors le phosphate libéré

2^e) Le p-nitrophénylphosphate

On dose alors le p-nitrophénol.

2 - Réactifs

Nous avons utilisé le milieu de EMMELOT et al., 1964 (565)

Milieu A₁ Tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5

Milieu A₂ β-glycérophosphate de sodium 25 mM

pour l'activité β-glycerophosphatasique acide

Milieu A₃ p-nitrophénylphosphate 25 mM

pour l'activité p-nitrophénylphosphatasique acide

3 - Mode opératoire

Les membranes sont resuspendues par homogénéisation dans le milieu A₁. A 0,9 ml de la suspension membranaire on ajoute au temps t = 0 soit 0,1 ml du milieu A₂ soit 0,1 ml du milieu A₃.

L'incubation se déroule à 37° C sous agitation, l'activité β-glycerophosphatasique est mesurée après arrêt de la réaction au bout de 20 minutes en ajoutant 1 ml d'ATCA à 10 p. 100, l'activité p-nitrophénylphosphatasique est mesurée après arrêt de la réaction au bout de 10 minutes en ajoutant 1 ml de NaOH 1,8 N. Après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, on mesure dans le surnageant soit la quantité de phosphate libéré sur 1 ml, ou à 400 nm la quantité de p-nitrophénol par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée dans le même temps.

Les deux activités sont ramenées en μ moles de substrat consommées par mg de protéines et par heure.

J - MONO-AMINE-OXYDASE (EC 1. 4. 3. 4.)

1 - Principe

L'enzyme catalyse la réaction suivante :



benzylamine

benzaldéhyde

On détermine à 250 nm la quantité de benzaldéhyde formée.

2 - Réactifs

Nous avons utilisé la méthode de TABOR et al., 1955 (566) :

Milieu A₁ phosphate de potassium 0,2 m pH 7,5

Milieu A₂ benzylamine sulfate 0,1 M

3 - Mode opératoire

A 1 ml de tampon A₁ on ajoute 0,1 ml de milieu A₂ puis au temps t = 0 0,9 ml de la suspension membranaire dans de l'eau. Après 30 minutes d'incubation à 37° C sous agitation, la réaction est arrêtée dans un bain de glace et le milieu centrifugé à 5 000 g pendant 10 minutes. La densité optique est lue à 250 nm sur le surnageant et la quantité de benzaldéhyde formée et calculée d'après une courbe témoin déterminée en mesurant à la même longueur d'onde la densité optique de solutions de benzaldéhyde de concentration allant de 0,02 à 0,2 μ moles pour 2 ml dans le même temps (voir figure 62 (p.173)).

Le résultat est ramené en μ moles de benzylamine hydrolysées par mg de protéines et par heure par rapport à un témoin blanc dans lequel la suspension membranaire a été remplacée par de l'eau.

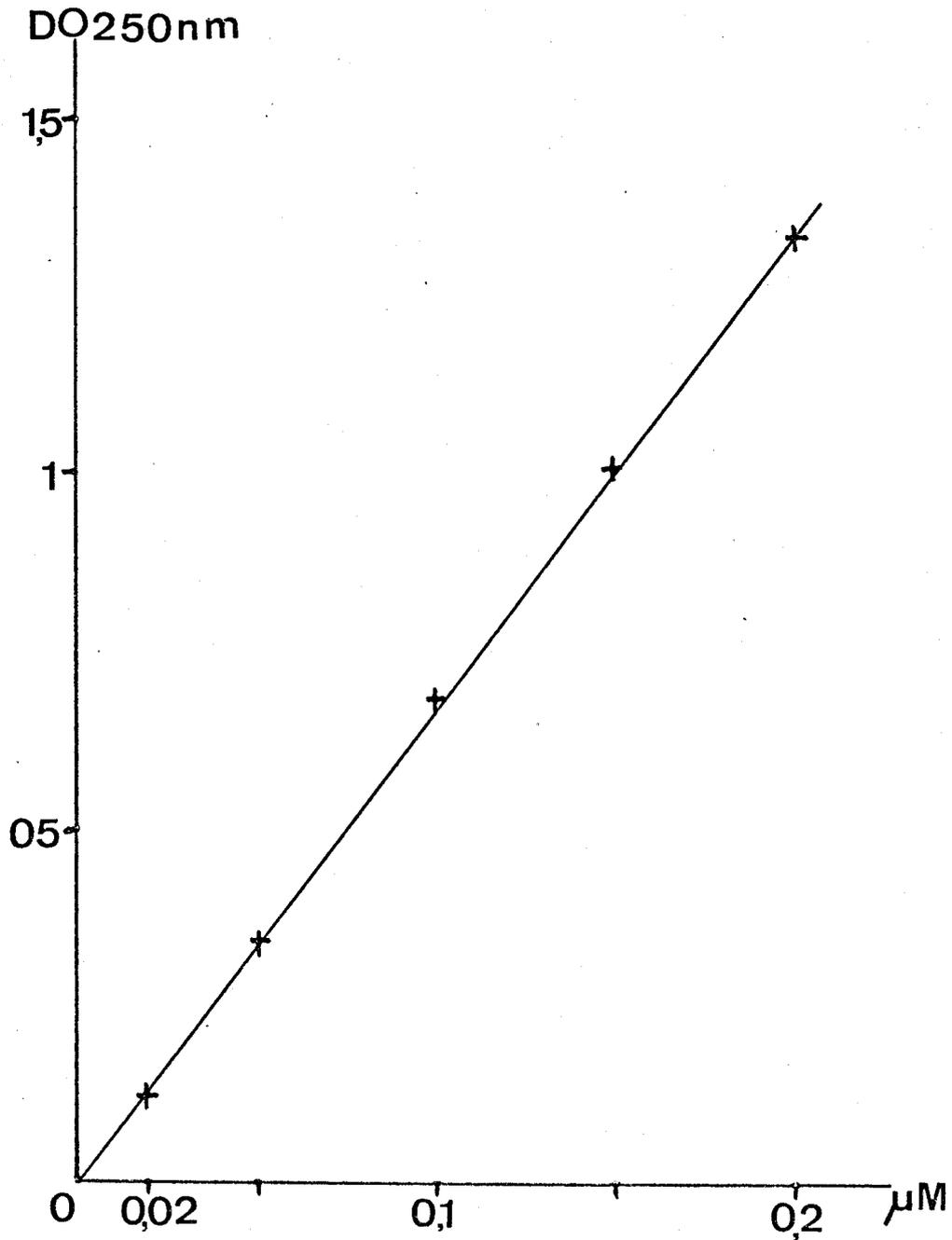


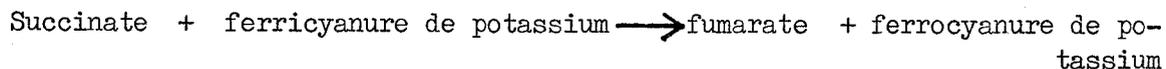
Figure 62

Courbe d'étalonnage de la benzaldéhyde de 0,02 à 0,2 μM pour 2 ml dans les conditions du dosage de la mono amine oxydase.



K - SUCCINO DESHYDROGENASE (EC 1. 3. 99. 1.)

1 - Principe



Ceci en bloquant la chaîne des oxydations cellulaires au niveau des cytochromes-a par le cyanure de potassium.

On mesure par méthode spectrophotométrique la quantité de ferrocyanure formé.

2 - Réactifs

Nous avons employé la méthode de BONNER, 1955 (567).

Les réactifs sont les suivants : Tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 ; KCN 0,1 M ; $K_3 Fe (CN)_6$ 0,01 M : succinate de sodium 0,2 M.

3 - Mode opératoire

La réaction est effectuée à la température de la pièce dans une cuve en verre de spectrophotomètre. On ajoute successivement 0,3 ml de la solution KCN, 0,3 ml de la solution de ferricyanure, 0,2 ml de la solution de succinate, 2 ml de tampon et au temps $t = 0$ 0,2 ml d'une suspension membranaire. La lecture est faite à 400 nm, toutes les minutes pendant 30 minutes contre un milieu identique ou l'on a remplacé le ferricyanure par l'eau. On prend pour la détermination de la quantité de ferricyanure réduit la pente initiale de la courbe. Cette détermination se fait par rapport à une courbe d'étalonnage donnant la quantité de ferricyanure en fonction de la densité optique (voir figure 63 (p. 175) réalisé dans le même tampon.

On ramène la valeur en μM de succinate oxydé par mg de protéines et par heure.

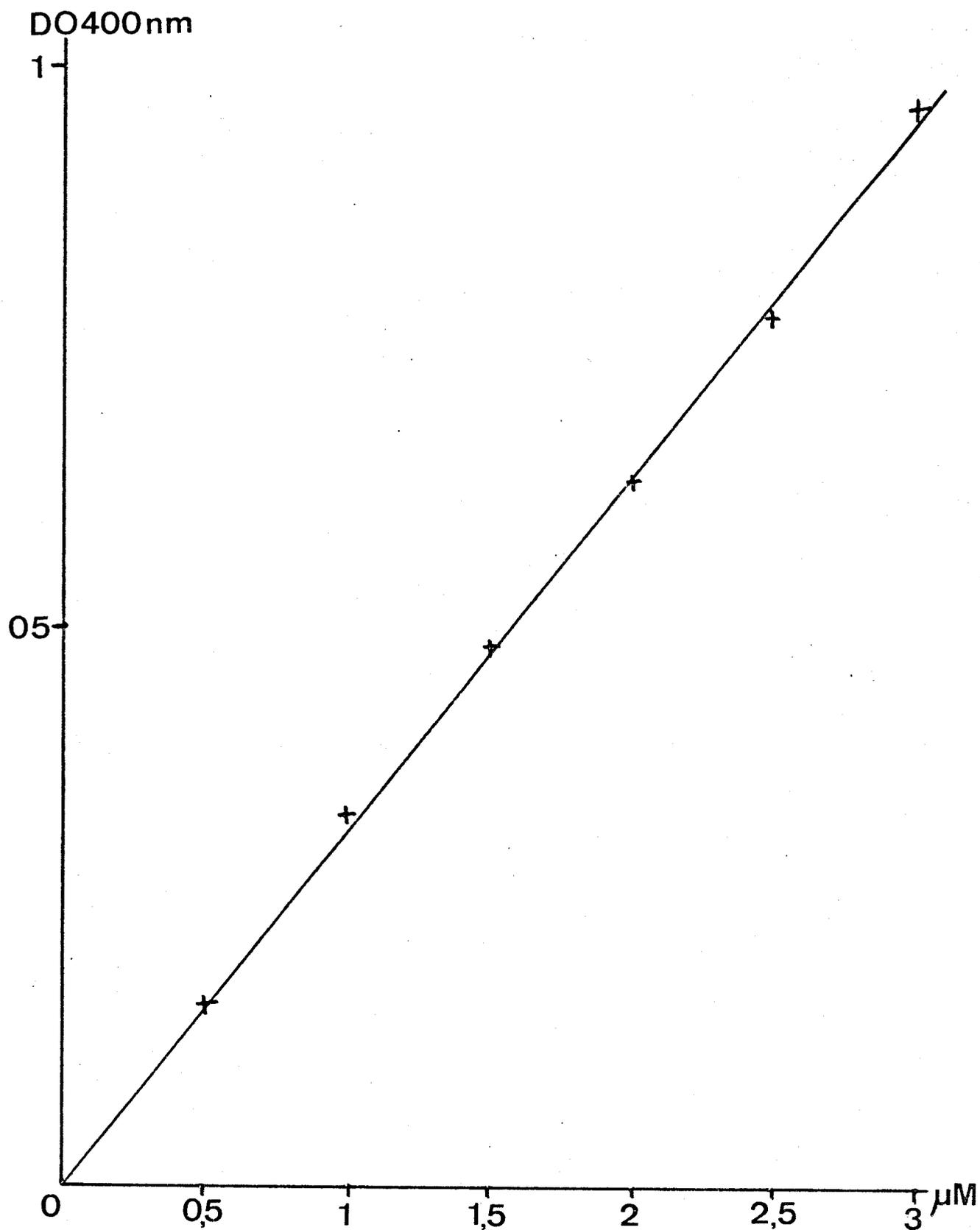


Figure 63

Courbe d'étalonnage du ferricyanure de potassium de 0,5 à 3 μM
pour la détermination de l'activité de la succino -deshydrogénase.



II - METHODE DE "DISC ELECTROPHORESE"

1 - Principe

Les complexes protéines-SDS ont une mobilité électrophorétique qui ne dépend pas de la charge de la protéine, cette charge est toujours anionique que est due aux fonctions sulfates du détergent. Nous avons employé pour séparer ces complexes la méthode en gel de polyacrylamide de NEVILLE, 1971 (568) qui possède un très haut pouvoir de résolution dans une gamme étendue de masses moléculaires entre 2 300 et 320 000 daltons. Cette méthode est caractérisée par un système de tampons discontinus (borate et sulfate).

2 - Réactifs

Nous donnerons la composition du gel standard 11,1 x 0,9

<u>Composition du gel inférieur</u> :		Acrylamide	11 p. 100	}	à dissoudre dans le
		Bisacrylamide	0,1 p. 100		
Ajouter au dernier moment	{	TEMED	0,15 p. 100	}	tampon du gel inférieur
		(Persulfate d'ammonium	0,05 p. 100		

Tampon du gel inférieur pH 9,18 (pH pendant l'électrophorèse 9,5)

Hcl 0,0308 N

Tris 0,4244 M

<u>Composition du gel supérieur</u> :		Acrylamide	3 p. 100	}	à dissoudre dans le
		Bisacrylamide	0,2 p. 100		
Ajouter au dernier moment	{	TEMED	0,15 p. 100	}	tampon du gel supérieur
		(Persulfate d'ammonium	0,05 p. 100		

Tampon du gel supérieur : pH 6,1 (pendant l'électrophorèse 8,64)

H₂SO₄ 0,027 M

Tris 0,0541 M

Tampon du réservoir supérieur : pH 8,64

Acide borique 0,04 M

Tris 0,041 M

SDS 0,1 p. 100

Tampon su réservoir inférieur : pH 9,18

Hcl 0,0308 N

Tris 0,4244 M

3 - Mode opératoire

Il est nécessaire d'avoir les ménisques des gels plans, Ceci est assuré en ajoutant sur le gel avant la polymérisation 30 μ l d'alcool isobutylique, qui est retiré grâce à une seringue après la polymérisation. Le dépôt s'effectue toujours avec un marqueur de front : le bleu de bromo-phénol (BBP). Les gels de 5 mm de diamètre sont soumis à l'électrophorèse à 1,5 mA par tube à 25° C. Avec de grands échantillons (100 μ l) le courant est réduit à 0,1 mA par tube jusqu'à ce que tout le marqueur soit entré dans le gel supérieur.

Le démoulage du gel s'opère en injectant de l'eau entre le verre et le gel.

La coloration s'effectue par la méthode de WEBER et OSBORN 1969 (569) au bleu de coomassie brillant.

Composition du milieu de coloration :

- bleu de coomassie brillant : 1,25 gr
- méthanol à 50 p. 100 : 454 ml
- acide acétique : 46 ml

Filtration sur papier Whatman n° 1

Le temps de coloration est de 2 heures.

La décoloration des gels s'effectue pendant 15 heures sous agitation magnétique dans le mélange suivant :

- acide acétique : 75 ml
- méthanol : 50 ml
- eau : 875 ml

4 - Etalonnage du gel

Dans le but de calculer les masses moléculaires apparentes des protéines membranaires, nous avons étalonné le gel avec des protéines et des glycoprotéines de masses moléculaires connues.

Les protéines sont solubilisées dans le mélange suivant :

Na_2CO_3 0,05 M

SDS 5 p. 100

β -mercapto-éthanol 10 p. 100 (v : v)

ce qui donne des sous-unités.

Pour obtenir des dimères de γ globulines, ou les γ M, la solution de dissolution est du SDS à 0,1 p. 100. On dépose 10 μg de protéines dans 10 μl de milieu.

Après électrophorèse, le gel est coupé au niveau du front de bleu de bromo phénol après la coloration et la décoloration qui s'opèrent de façon classique, on calcule la migration relative ou RF.

$$\text{RF} = \frac{\text{Migration du bleu de bromo phénol (mm)}}{\text{Migration de la protéine (mm)}}$$

Le tableau XVIII (p.179) donne la liste des protéines utilisés et le RF obtenu.

La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant chaque valeur du RF le logarithme du poids moléculaire. Cette relation introduite par SHAPIRO et al., 1967 (571) est valable pour un grand nombre de complexes protéines-SDS.

La figure 64 (p.180) montre la relation existant entre ces deux valeurs : la partie supérieure de la courbe est hyperbolique, la partie inférieure présente une dispersion maximale des points (20 p. 100). La détermination des masses moléculaires se fera donc avec le minimum d'erreurs dans la partie centrale de la courbe entre R_F 0,3 et 0,75.

PROTEINES UTILISEES POUR L'ETALONNAGE DES GELS DE POLYACRYLAMIDE

(*) VALEURS OBTENUES D'APRES WEBER et OSBORN, 1969 (570)

Nom	Origine	Masses Moléculaires(*)	RF Résultats personnels
γ_M	humaine	1 000 000	0,075
γ_G $\begin{cases} \swarrow & \text{dimère} \\ \searrow & \text{monomère} \end{cases}$	humaine	320 000	0,120
		160 000	0,210
Transferrine	humaine	78 000	0,324
Serum Albumine	bovine	68 000	0,353
Catalase	foie de Boeuf	60 000	0,370
Pyruvate Kinase	muscle de Lapin	57 000	0,4
γ_G (chaîne H)	humaine	50 000	0,468
Orosomucoïde	humaine	44 100	0,521
Ovalbumine	Poule	43 000	0,55
Carboxypeptidase A	pancréas de Boeuf	34 600	0,61
Ovomucoïde (variant 1 b)	Poule	27 000	0,72
γ_G (chaîne L)	humaine	23 500	0,75
Inhibiteur tryptique	Soja	21 600	0,795
β -Lactoglobuline	muscle de Lapin	18 400	0,840
Lactalbumine	Vache	15 000	0,830
α -chymotrypsique (chaîne C)	pancréas de Boeuf	13 000	0,865
RNase	pancréas de Boeuf	12 640	0,850
Cytochrome-C	coeur de Cheval	11 700	0,88
α -chymotrypsine (chaîne B)	pancréas de Boeuf	11 000	0,88
Glucagon	pancréas de Boeuf et de Porc	3 500	0,91

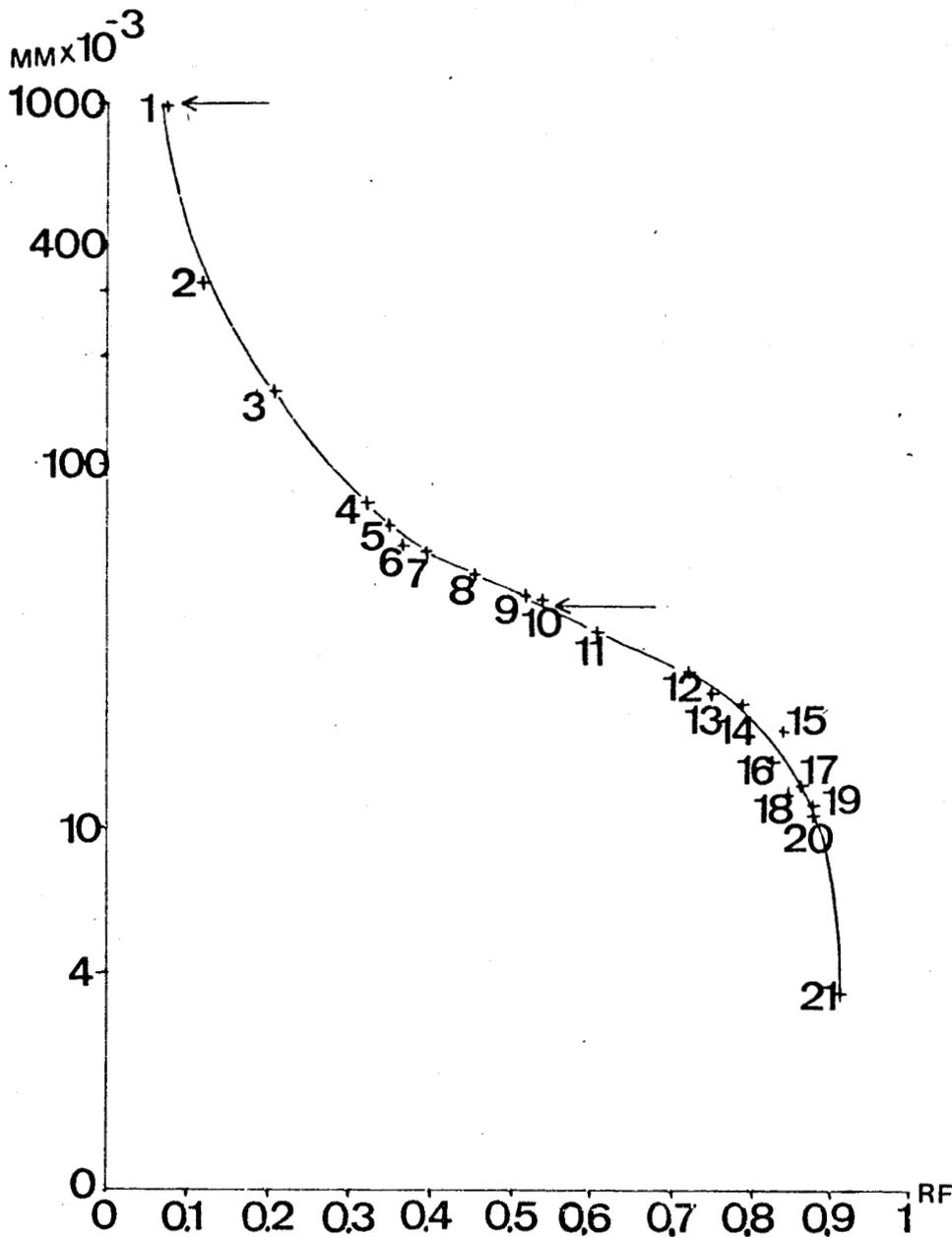


Figure 64

Courbe d'étalonnage des poids moléculaires en fonction de la migration relative (RF) des complexes protéines-SDS dans le gel de polyacrylamide.

BUS
LILLE

1 : γ M (pentamère), 2 : γ G (dimère), 3 : γ G, 4 : Transferrine humaine, 5 : Sérum albumine bovine, 6 : catalase, 7 : Pyruvate kinase, 8 : γ G (chaîne H), 9 : Orosomucoïde, 10 : Ovalbumine, 11 : Carboxypeptidase A, 12 : Ovomucoïde (variant 1 b), 13 : γ g (chaîne L), 14 : Inhibiteur trypsique, 15 : lactoglobuline, 16 : Lactalbumine, 17 : α chymotrypsine (chaîne C), 18 : RNase, 19 : cytochrome C, 20 : α chymotrypsine (chaîne B), 21 : glucagon.

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

I - REVUES GENERALES CONSACRES AUX MEMBRANES

A - OUVRAGES CONSACRES AUX MEMBRANES BIOLOGIQUES

- Membrane Transport and Metabolism (Proceeding of a Symposium held in Prague, August 22-27, 1960)
Eds : KLEINZELLER A., KOTYK A., 1960
Academic Press. London and New-York.
- Symposium on the plasma membrane
New York Heart association, INC. 1961
Ed.: FISHMAN A.P.
Supplement to circulation, vol. XXVI n° 5 part 2 November 1962.
- Cellular membranes in developement
(22 nd Symposium of the Society for the Study of Development and Growth)
Ed : LOCKE M. 1964
Academic Press. New-York, London.
- Structure and function in Biological Membranes, vol I, vol II
Ed : KAVANAU J.L. 1965
Holden-Day, Inc. San Francisco, London, Amsterdam
- Cellular Aspects of Membrane permeability
Ed : SCHOFFENIELS, 1967
Pergamon Press - Oxford, London, Edimburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig.
- The Cell Surface : Its molecular role in morphogenesis
Ed : CURTIS A.S.G. 1967
Logos Press, Academic Press.

- The Electrostatics of Biological Cell Membranes.
Ed : FRIEDENBERG R.M., 1967
North Holland Publishing Compagny, Amsterdam.
- The Movement of Molecules across Cell Membranes.
Ed : STEIN W.D., 1967
Academic Press, New-York and London.
- Biological Membranes vol. I et II.
Ed : CHAPMAN D., 1968
Academic Press, New-York and London.
- Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane
Eds : MANSON L.A.
The Wistar Institute Symposium Monograph n° 8
Wistar Institute Press. 1968.
- Membrane models and the formation of Biological Membranes.
Ed : BOLIS L., PETHICA B.A., 1968
North Holland Publishing Compagny, Amsterdam.
- Structure and Function of Membranes.
Ed : NORTHCOTE D.H.
British Medical Bulletin 24, n° 2, 1968.
- The Membranes
Ed : DALTON A.J. HAGUENAU F. 1968
Academic Press, New-York and London.
- Laboratory techniques in Membrane Biophysics.
Ed : PASSOW H., STAMPFLI R.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1969.
- Cell Membrane Transport : Principles and Techniques.
Ed : KOTYK A., JÁNACEK K. 1970
Plenum Press, New-York, London.
- Current topics in Membranes and Transport vol. I et II.
Ed : BRONNER F., KLEINZELLER A. 1970
Academic Press, New-York, London.

- Membranes and Ion Transport, vol. I et vol. II
Ed : BITTAR E.E. 1970
Wiley Inter-science, London, New-York, Sydney, Toronto.
- The Chemistry of Biosurfaces vol. I et vol. II
Ed : HAIR M.L. 1971
MARCEL DEKKER, INC New-York.
- Permeability and Function of Biological Membranes.
Ed : BOLIS L., KATCHALSKY A., KEYNES R.D., LOEWENSTEIN W.R. PETHICA B.A., 1970
North Holland publishing Company, Amsterdam, London.
- Biomembranes, vol. I et vol. II
Ed : MANSON L.A. 1971
Plenum Press, New-York, London.
- Chemistry of the Cell interface, Part A, Part B;
Ed : BROWN H.D. 1971
Academic Press, New-York, London
- Les Membranes Protoplasmiques.
Ed : MAZLIAK P. 1971
Doin, Paris.
- Membrane - Bound Enzymes.
Ed: PORCELLATI G., DI JESO F., 1971
Plenum Press, New-York, London.
- Structure and Function of Biological Membranes.
Ed : ROTHFIELD L.I. 1971
Academic Press, New-York, London.
- The Dynamic Structure of Cell Membranes
Ed : WALLACH D.F.H., FISCHER 1971
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- Membrane Research.
First ICN-UCLA Symposium on Molecular Biology
Ed : FOX C.F. 1972
Academic Press, New-York, London

- Membrane Structure

Ed : BRANTON D., DEAMER D.W. 1972
Springer-Verlag, Wien, New-York.

B - ARTICLES GENERAUX SUR LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES

- HAKAMORI S.I., JEANLOZ R.W.

Glycolipids as Membrane Antigens

In "Blood and Tissue Antigens" 1970

Ed : AMINOFF D. p. 149

Academic Press, New-York, London.

- HUGHES R.C.

Glycoproteins as Components of Cellular Membranes

In "Progress in Biophysics and Molecular Biology" vol. 26, 1973, p. 189

Ed : BUTLER J.A.V., NOBLE D.,

Pergamon Press. Oxford, New-York, Toronto, Sydney, Braunschweig.

- WINZLER R.J.

Glycoproteins of Plasma Membranes Chemistry and Function

In "Glycoproteins. Their Structure and Function" 1972, Part B, p. 1268

Ed : GOTTSCHALK A.

Elsevier Publishing Company (BBA Library vol. 5) Amsterdam, London,
New-York.

II - PERIODIQUES CONSACRES AUX MEMBRANES

- Biological Membrane Abstracts. Information Retrieval Limited, England.
- Biomembranes. Biochimica et Biophysica Acta (M). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Reviews on Biomembranes. Biochimica et Biophysica Acta (MR). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- The Journal of Membrane Biology. Springer-Verlag, New-York Inc.

III - REFERENCES SE RAPPORTANT AU TEXTE

- ADAMANY, A.M., & KATHAN, R.H. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37, 171. (341* p : 45)
- ALLAN, D., & CRUMPTON, M.J. (1970) *Biochem J.*, 120, 133-143. (16 p. 4, 32 p. 6).
- ALLAN, D., & CRUMPTON, M.J. (1971) *Biochem J.*, 123, 967. (63 p. 8, 279 p. 39).
- ALLAN, D., & CRUMPTON, M.J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 274, 22. (22 p. 4, 34 p. 6)
- ALLAN, D., AUGER J., & CRUMPTON, M.J., (1971) *Biochem J.*, 126, 6P (315 p. 42).
- ALLAN, D., AUGER, J., & CRUMPTON, M.J. (1972) *Nature New. Biology.*, 236, 23 (316 p.42)
- ALLMANN, D.W., BACHMANN, E., ORME-JOHNSON N., TAN, W.C., & GREEN, D.E., (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 981 (487 p. 87).
- AMBROSE, E.J., JAMES, A.M., & LOWICK, J.H.B., (1956) *Nature*, 177, 576 (259 p. 38).
- ANDERSON, N.G., LANSING, A.I., LIEBERMANN, I., RANKIN, C.T., & ELROD, H., (1968) In "The Wistar Institute Symposium Monograph n° 8 : Biological properties of the Mammalian Surface Membrane. Ed : MANSON L.A. The Wistar Institute, p. 23 (393 p. 54).
- AOKI, T., WOOD, H.A., OLD, L.J., BOYSE, E.A., DE HARVEN, .E., LARDIS, M.P., & STACK-POLE, C.W., (1971) *Virology*, 45, 858 (250 p. 36).
- APPELMANS, F., WATTIAUX, R., & DE DUVE, C., (1955) *Biochem. J.*, 59, 438 (478).
- ARTZT, K.J., SANFORD, B.H., & MARFEY, P.S., (1968) *J. Lab. Clin. Med.*, 72, 350 (127 p. 14).
- BAIRATTI, A., & LEHMAN, F.E., (1953) *Exptl. Cell. Res.*, 5, 220 (231 p. 34).
- BAKERMAN, S., & WASEMILLER, G., (1967) *Biochemistry.*, 6, 1100 (12 p. 4, 117 p. 14).
- BANGHAM, A.D., PETHICA, B.A. & SEAMAN, G.V.F., (1958) *Biochem. J.*, 69, 12 (227 p. 33)
- BAR, R.S., DEAMER, D.W., & CORNWELL, D.G., (1966) *Science.*, 153, 1010 (148 p. 17).
- BARBER, A.J., & JAMIESSON, G.A., (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 6357 (18 p. 4).
- BARBER, A.J. & JAMIESSON, G.A., (1971) *Biochemistry.*, 10, 4711 (322 p. 42, 336 p. 43)
- BARCLAY, M., BARCLAY, R.K., SKIPSKI, P., ESSNER, E.S., & TEREBUS-KEKISH, O., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 255, 931 (289 p. 39).
- BELLHORN, M.B., BLUMENFELD, O.O., & GALLOP, P.M., (1970) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 39, 267 (110 p. 10).
- BENDER, W.W., GARAN, H., & BERG, H.C., (1971) *J. Mol. Biol.*, 58, 783 (206 p. 30, 546 p. 148).
- BENEDETTI, E.L., & EMMELOT, P., (1968) In "The Membranes" Eds DATTON A.J. and HAGUENAU F. Acad. Press. London, New-York, p. 33 (49 p. 7, 403 p. 65, 404 p. 68).

- BENNETT, H.S., (1963) *J. Histochem. Cytochem.*, 11, 15 (237 p. 36).
- BENSON, A.A., (1968) In "Membrane Models and the Formation of Biological Membranes" Ed: by BOLIS L. and PETHICA B.A., Amsterdam, North Holland, (185 p. 24).
- BERG, H.C., (1969) *Biochim. Biophys. Acta.*, 183, 65 (57 p. 8, 221 p. 30, 545 p. 148 547 p. 149).
- BERGER, S., & SACKTOR, B., (1970) *J. Cell. Biol.*, 47, 637 (113 p. 10).
- BERMAN, H.M., GRAM W., & SPIRITES, M.A., (1969) *Biochim. Biophys. Acta.*, 183, 10 (389 p. 54).
- BEZKOROVAINY, A., & DOHERTY, D.G., (1962) *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 412 (124 p. 14).
- BIRNBAUMER, L., & POHL, S.L., (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2056 (457 p. 78).
- BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., & RODBELL, M., (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2038 (456 p. 78).
- BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., & RODBELL, M., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1857 (451 p. 78).
- BLANQUET, P., (1973) In "Etudes cytochimiques ultrastructurales de la membrane de surface de divers types de cellules normales et cancéreuses". Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de l'Université de Lille, n° d'ordre 269, p. 15 (230 p. 34).
- BLANQUET, P., PUVION, E., & DRIESSENS, J., (1970) *C.R. Acad. Sc.*, 271, 96 (247 p. 36).
- BLAT, C., & HAREL, L., (1969) *Biochim. Biophys. Acta.*, 173, 23 (439 p. 77, 495 p. 93).
- BLAT, C., & HAREL, L., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 203, 271 (440 p. 77).
- BLAUROCK, A.E., (1971) *J. Mol. Biol.*, 56, 35 (166 p. 20).
- BLAUROCK, A.E., & WILKINS, M.H.F. (1969) *Nature*, 223, 906 (169 p. 20, 201 p. 28).
- BLAUROCK, A.E., & WORTHINGTON, C.R., (1966) *Biophys. J.*, 6, 305 (165 p. 18).
- BLIX, G., (1948) *Acta. Chem. Scand.* 2, 467 (511 p. 99).
- BLOEMENDAL, H., ZWEERS, A., VERMORKEN, F., DUNIA, I., & BENEDETTI, E.L., (1972) *Cell Differentiation*, 1, 91 (23 p. 4, 36 p. 6).
- BLUMBERG, P.M., & STROMINGER, J.L., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 3751 (307 p. 42).
- BLUMENFELD, O.O., (1968) *Biochem. Biophys Res. Comm.*, 30, 200 (271 p. 39, 516 p. 104).
- BLUMENFELD, O.O., CALLOP, P.M., HOWE, C., & LEE, L.T., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 211, 109 (272 p. 39).

- BLUMENFELD, O.O., GALLOP, P.M., & LIAO, T.H., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 242 (523 p. 109).
- BONNER, W.D., (1955) In "Methods in Enzymology" Eds : COLOWICK S.P., KAPLAN, O. vol. I, Academic Press, London, New-York, p. 722 (488 p. 87, 567 p. 174).
- BONTING, S.L., SIMON, K.A., & HAWKINS, N.M. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 416 (556 p. 158).
- BOSMAN, H.B., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 264, 339 (377 p. 52).
- BOSMAN, H.B., HAGOPIAN, A., & EYLAR, E.H., (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 51 (14 p. 4 , 126 p. 14).
- BOYDE, A., (1969) *Z. Zellforsch.*, 94, 46 (243 p. 36).
- BRANTON, D., (1969) *A. Rev. Pl. Physiol.*, 20, 209 (187 p. 24).
- BRECKENRIDGE, W.C., GOMBOS, G., & MORGAN, I.G., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 266, 695 (53 p. 7).
- BRETSCHER, M.S., (1971) *J. Mol. Biol.*, 58, 775 (212 p. 30).
- BRETSCHER, M.S., (1971) *J. Mol. Biol.*, 59, 351 (214 p. 30).
- BRETSCHER, M.S., (1971) *Nature New. Biology.*, 231, 229 (217 p. 32, 219 p. 32).
- BRETSCHER, M.S., (1972) *Nature New. Biology.*, 236, 11 (225 p. 32).
- BRETSCHER, M.S., (1973) *Science*, 181, 622 (229 p. 33, 358 p. 48).
- BROOKS, D.E., SEAMAN, G.V.F. & WALTER, H., (1971) *Nature New. Biology.*, 234, 61 (262 p. 38).
- BUCK, C., GLICK, M.C., & WARREN, L., (1970) *Biochemistry.*, 9, 4567 (325 p. 42, 370 p. 52).
- BUCK, C., GLICK, M.C., & WARREN, L., (1971) *Science.*, 172, 169 (326 p. 42).
- BURGER, M.M., (1969) *Biochemistry.*, 62, 994 (368 p. 52).
- BUSTIN, M., ESHHAR, Z., & SELA, M., (1972) *Eur. J. Biochem.*, 31, 541 (287 p. 39).
- CAPALDI, R.A., & VANDERKOOI, G., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 930 (79 p. 8, 534 p. 131).
- CARLSON, D.M., (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 2984 (538 p. 138).
- CARLSON, D.M., (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 616 (539 p. 138).
- CARLSON, D.M., (1973) In "Colloque International sur les Glycoconjugués" C.N.R.S. Université des Sciences et Techniques de Lille I, (540 p. 138).
- CARLSON, D.M., TYLER, R.N., & MAYO, J., (1970) In "Blood and Tissue Antigens" AMINOF D., Ed : Academic Press, London, New-York, p. 232 (541 p. 140).
- CARR, I., CLARKE, J.A., & SALSBURY, A.J., (1968) *J. Microsc.* 89, 105 (241 p. 36).
- CARROLL, P.M., & SEREDA, D.D., (1968) *Nature*, 217, 666 (123 p. 14).
- CASPAR, D.L.D., & KIRSCHNER, D.A., (1971) *Nature*, 231, 46 (167 p. 20, 196 p. 28).

- CHABRE, M., CAVAGGIONI, A., OSBORNE, H.B., GULIK-KRZYWICKI, T., & OLIVE, J., (1972) *Febs Letters.*, 26, 197, (203 p. 28).
- CHAMBERS, R., (1924) In "Cowdry General Cytology", University of Chicago Press, (4 p. 3).
- CHANDRASEKHARA, N., & ANANTH NARAYAN, K., (1970) *Cancer Res.*, 30, 2876 (15 p. 4).
- CHANGEUX, J.P., HUCHET, M., & CARTAUD, J., (1972) *C.R. Acad. Sci.*, 274, 122 (293 p. 40).
- CHAPMAN, D., KAMAT, V.B., DE GIER, V.B., & PENKETT, S.A., (1966) *Nature*, 213, 74 (183 p. 22).
- CHRISTOFFERSEN, T., MØRLAND, J., OSNES, J.B., BERG, T., BOMAN, D., & SEGLEN, P.O., (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 150, 807 (449 p. 78).
- CLAMP, J.R., BHATTI, T., & CHAMBERS, R.E., (1974) In "Glycoproteins their Composition Structure and Function" Ed : GOTTSCHALK A. p. 300 (535 p. 134).
- CLARKE, M., (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 45, 1063 (85 p. 9, 221 p. 32)..
- CLARKE, J.A., & SALSURY, A.J., (1967) *Nature*, 215, 402 (240 p. 36).
- CODINGTON, J.F., SANFORD, B.H., & JEANLOZ, R.W., (1972) *Biochemistry*, 11, 2559 (323 p. 42, 344* p. 45, 552 p. 156).
- COLBEAU, A., NACHBAUR, J., & VIGNAIS, P.M., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249 462 (407 p. 72, 475 p. 84, 477 p. 85, 480 p. 85, 482 p. 85, 489 p. 87).
- COLEMAN, R., & FINEAM, J.B., (1966) *Biochim. Biophys. Acta.*, 125, 197 (51 p. 7).
- COLEMAN, R., FINEAM, J.B., KNUTTON, J.B., & LIMBRICK, A.R., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 219, 81 (189 p. 24).
- COLEMAN, R., MICHELL, R.H., FINEAM, J.B., & HAWTHORNE, J.N., (1967) *Biochim. Biophys. Acta.*, 135, 573 (388 p. 54, 413 p. 74).
- COOK, G.M.W., (1962) *Nature*, 195, 159 (67 p. 8).
- COOK, G.M.W., (1968) *Biol. Rev.*, 43, 363 (254 p. 37).
- COX, R.P., & GESNER, B.M., (1968) *Exptl. Cell. Res.*, 49, 682 (379 p. 52).
- CRIDDLE, R.S., BOCK, R.M., GREEN, D.E., & TISDALE, H., (1962) *Biochemistry*, 1, 827 (87 p. 9).
- CRIDDLE, R.S., & PARK, L., (1964) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 17, 94 (90 p. 9).
- CUATRECASAS, P., (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 63, 450 (306 p. 41).
- DANIELLI, J.F., & DAVSON, H., (1935) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495 (153 p. 18).
- DANIELLI, J.F., & HARVEY, E.N., (1935) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 483 (152 p. 18).

- DAUTIGNY, A., BERNIER, I., COLOMBANI, J., & JOLLES, P., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 783 (283 p. 39, 364 p. 49).
- DAVIDOVA, S.Y., & SHAPOT, V.S., (1970) *Febs Letters*, 6, 349 (495 p. 93).
- DAWSON, R.M.C., HEMINGTON, N., & LINDSAY, D.B., (1960) *Biochem. J.*, 77, 266 (54 p. 7).
- DEMUS, H., & MEHL, E., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 203, 291 (59 p. 8).
- DEMUS, H., & MEHL, E., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 211, 148 (512 p. 99).
- DILLEY, R.A., PETERS, G.A., & SHAW, E.R., (1972) *J. Membrane. Biol.*, 8, 163 (548 p. 149).
- DOUGLAS, A.P., KERLLEY, R., & ISSELBACHER, K.J., (1972) *Biochem. J.*, 128, 1329 (24 p. 6).
- DOUSA, T., & RYCHLIK, I., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 204, 1 (461 p. 79).
- DRATZ, E.A., GAW, J.E., SCHWARTZ, S., & CHING, W.M., (1972) *Nature, New. Biology.*, 237, 99 (202 p. 28).
- DUCHON, G., & COLLIER, B., (1971) *J. Membrane. Biol.*, 6, 138 (105 p. 10).
- DUDAI, Y., SILMAN, I., SHINITZKY, M., & BLUMBERG, S., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 2400 (313 p. 42).
- EASTY, G.C., EASTY, D.M., & AMBROSE, E.J., (1960) *Exptl. Cell. Res.*, 19, 539 (232 p. 34).
- EBERT, W., METZ, J., WEICKER, H., & ROELCKE, D., (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1309 (335 p. 43).
- EL-ALLAWY, R.M., & GLIEMAN, J., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 273, 97 (384 p. 53).
- ELSON, L.A., & MORGAN, W.T.J., (1933) *Biochem. J.*, 27, 1824 (510 p. 99).
- EMMELOT, P. & BENEDETTI, E.L., (1967) In "Carcinogenesis : A broad critique" M.D. ANDERSON Hosp. Turmor. Inst. Symp. Univ. of Texas, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, p. 471 (28 p. 6).
- EMMELOT, P., & BOS, C.J., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 211, 169 (100 p. 12, 471 p. 83, 473 p. 84).
- EMMELOT, P., & BOS, C.J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 285 (104 p. 12, 448 p. 78, 467 p. 81, 469 p. 84).
- EMMELOT, P., & BOS, C.J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 293 (424 p. 75, 427 p. 75).
- EMMELOT, P., & BOS, C.J., (1972) *J. Membrane. Biol.*, 9, 83 (30 p. 6, 39 p. 6, 324 p. 42, 531 p. 122, 532 p. 125).

- EMMELOT, P., BOS, G.J., BENEDETTI, E.L., & RUMKE, P.H., (1964) *Biochim. Biophys. Acta.*, 90, 126 (9 p. 4, 82 p. 8, 95 p. 11, 119 p. 14, 386 p. 54, 400 p. 59, 402 p. 63, 408 p. 72, 412 p. 74, 422 p. 75, 426 p. 75, 435 p. 77, 470 p. 83, 479 p. 85, 481 p. 85, 491 p. 91, 492 p. 92, 494 p. 93, 498 p. 93, 499 p. 93, 557 p. 159, 562 p. 168, 565 p. 171).
- EMMELOT, P., & VISSER, A., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 241, 273 (96 p. 12, 430 p. 76).
- EMMELOT, P., VISSER, A., & BENEDETTI, E.L., (1968) *Biochim. Biophys. Acta.*, 150 364 (429 p. 76).
- ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B. & MASEK, B., (1958) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 711 (434 p. 77).
- EVANS, W.H., (1969) *Febs Letters*, 3, 237 (409 p. 72).
- EVANS, W.H., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 211, 578 (142 p. 17).
- EVANS, W.H., (1970) *Biochem. J.*, 166, 833 (396 p. 54, 410 p. 72, 415 p. 74, 441 p. 77, 442 p. 77).
- EVANS, W.H., & GURD, J.W., (1971) *Biochem. J.*, 125, 615 (355 p. 48, 504 p. 97).
- EVANS, W.H., & GURD, J.W., (1973) *Biochem. J.*, 133, 189 (302 p. 41, 383 p. 53, 530 p. 121).
- EYLAR, E.H., (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67, 1425 (94 p. 9).
- EYLAR, E.H., SALK, J., BEVERIDGE, G., & BROWN, L., (1969) *Arch. Biochim. Biophys.* 132, 34 (93 p. 9).
- FAIRBANKS, G., STECK, T.L., & WALLACH, D.F.H., (1971) *Biochemistry*, 10, 2606 (207 p. 30).
- FERBER, E., RESCH, K., WALLACH, D.F.H., & IMM, W., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 266, 494 (21 p. 4, 33 p. 6).
- FERNANDEZ-MORAN, H., (1962) In "The Interpretation of Ultrastructure" Ed. by HARRIS R. New-York and London, Academic Press, p. 411 (175 p. 20).
- FINEAM, J.B., (1956) *Int. Rev. Cyt.*, 12, 303 (160 p. 18).
- FINEAM, J.B., (1962) *Circulation.*, 26, 1151 (162 p. 18).
- FINEAM, J.B., (1972) *Sub. Cell. Biochem.*, 1, 363 (195 p. 26).
- FINEAM, J.B., BRAMLEY, T.A., & COLEMAN, R., (1971) *Nature*, 229, 114 (190.p. 24)
- FINEAM, J.B., & BURGE, R.E., (1963) *J. Mol. Biol.*, 7, 672 (163 p. 18).
- FISCHER, F.G., & NEBEL, H.G., (1955) *Z. Physiol. Chem.*, 302, 10 (525 p. 114).
- FORRESTER, J.A., AMBROSE, E.J. & STOKER, M.G.P., (1964) *Nature*, 201, 945 (261 p. 38).
- FORSTNER, J. & MANERY, J.F., (1971) *Biochem. J.* 125, 343 (40 p. 6).

- FRICKE, H., (1925) *Physical Rev.*, 26, 682 (149 p. 17)
- FUJITA, M., OHTA, H., KAWAI, K., MATSUI, H., & NAKAO, M., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 274, 336 (114 p. 10).
- GAHMBERG, C.G., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 81 (65 p. 8, 74 p. 8).
- GARDAS, A., & KOSCIELAK, J., (1973) *Eur. J. Biochem.*, 32, 178 (362 p. 49).
- GASIC, G., & BAYDAK, T., (1962) In "Proceedings of the International Symposium on Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth 1961" Boston, Little, Brown and Co, p. 709 (234 p. 36).
- GASIC, G., & BERWICK, L., (1963) *J. Cell. Biol.*, 19, 223 (236 p. 36).
- GASIC, G., & GASIC, T., (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48, 1172 (346* p. 47)
- GEREN, B.B., (1954) *Exptl. Cell. Res.*, 7, 558 (161 p. 18).
- GLAUERT, A.M., & LUCY, J.A., (1968) In "The Membranes". Ed. by DALTON A.J. and HAGUENAU F. New-York and London, Academic Press, p. 1 (177 p. 20).
- GLOSSMAN, H., & LUTZ, F., (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 351, 1583 (297 p. 40).
- GLOSSMAN, H., & NEVILLE, D.M., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 6339 (277 p. 39, 518 p. 105, 527 p. 120, 528 p. 118, 529 p. 118, 551 p. 155).
- GOLDBARG, J.A., & RUTENBURG, A.M., (1958) *Cancer*, 11, 283 (431 p. 76, 560 p. 165)
- GOMBOS, G., HERMETET, J.C., REEBER, A., ZANETTA, J.P., & TRESKA-CIESIELSKI, J., (1972) *Febs Letters*, 24, 247 (331 p. 43, 345 p. 44).
- GORTER, E., & GREDEL, F., (1925) *J. Exp. Med.*, 41, 439 (147 p. 17).
- GORKIN, V.Z., (1971) *Experientia*, 27, 30 (97 p. 12, 484 p. 86, 486 p. 86)
- GRAS, W.J., & WORTHINGTON, C.R., (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63, 233 (168 p. 20)
- GREEN, D.E., & PERDUE, J.F., (1966) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 137, 667 (178 p. 22).
- GREEN, D.E., TISDALE, H.D., CRIDDLE, R.S., & BOCK, R.M., (1961) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 5, 81 (86 p. 9).
- GRIMES, W.J., & ROBBINS, P.W., (1972) In "Biochemistry of the Glycosidic Linkage" Eds : PIRAS R., PONTIS, H.G., The PAN AMERICAN ASSOCIATION of Biochemical Societies Symposium, vol. 2, Academic Press, New-York, London, p. 113 (376 p. 52).
- GRULA, E.A., & SAVOY, C.F., (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 43, 325 (298 p. 40).
- GULIK-KRZYWICKI, T., SHECHTER, E., & LUZZATI, V., (1969) *Nature*, 223, 1116 (182 p. 22).
- GURD, J.W., EVANS, W.H., & PERKINS, H.R., (1972) *Biochem. J.* 126, 459 (143 p. 17, 273 p. 39, 501 p. 94, 502 p. 95, 505 p. 97, 514 p. 102, 517 p. 105, 550 p. 155).

- GURD, J.W., & EVANS, W.H., (1973) *Eur. J. Biochem.*, 36, 273 (356 p. 48).
- GWYNNE, J.T., & TANFORD, C., (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3269 (58 p. 8, 267 p. 39)
- HAMAGUCHI, H., & CLEVE, H., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 459 (140 p.15)
- HAMMERLING, U., AOKI, T., DE HARVEN, E., BOYSE, E.A., & OLD, L.J., (1968) *J. Exp. Med.*, 128, 1461 (249 p. 36).
- HARVEY, E.N., (1931) *Biol. Bull.*, 61, 273 (150 p. 17).
- HARVEY, E.N., & DANIELLI, J.F., (1938) *Biol. Rev.*, 13, 319 (151 p. 18).
- HASSELBACH, W., & MIGALA, A., (1972) *Febs Letters*, 26, 20 (305 p. 41).
- HAWKINS, C.F., & JACQUEZ, J.A., (1972) *Anal. Biochem.*, 49, 290 (398 p. 55, 399 p. 56, 416 p. 74).
- HAYMAN, M.J., SKEHEL, J.J., & CRUMPTON, M.J., (1973) *Febs Letters*, 29, 185 (317 p. 42).
- HELENIUS, A., & SÖDERLUND, H., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 307, 287 (281 p. 39)
- HELLER, M., & HANAHAN, D.J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 255, 239 (425 p. 75).
- HERZENBERG, L.A., & HERZENBERG, L.A., (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47, 762 (8 p. 4, 121 p. 14).
- HILLIER, J., & HOFFMAN, J.F., (1953) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 42, 203 (245 p. 36).
- HINTON, R.H., DOBROTA, M., FRITZSIMONS, J.T.R, REID, E., (1970) *Eur. J. Biochem.*, 12, 349 (395 p. 54, 405 p. 68, 414 p. 74).
- HIRST, G.K., (1942) *J. Exptl. Med.*, 76, 195 (365 p. 49).
- HJERTEN, S., (1962) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, 1, 147 (520 p. 107).
- HJERTEN, S., & JOHANSSON, K.E., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 288, 312 (284 p.39)
- HOYER, L.W., & TREBOLD, N.C., (1970) *J. Clin. Invest.* 49, 87 (549 p. 149)
- HUGHES, R.C., SANFORD, B., & JEANLOZ, R.W., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 942 (353 p. 47).
- INBAR, M., & SACHS, L., (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63, 1418 (367 p. 52).
- INBAR, M., BEN-BASSAT, H., & SACHS, L., (1972) *Nature. New. Biology.* 236, 3, (369 p. 52).
- JACKSON, R.L., SEGREST, J.P., KAHANE, I., & MARCHESI, V.T., (1973) *Biochemistry*, 12, 3131 (366 p. 49).
- JANSONS, V.K., & BURGER, M.M., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.* 291, 126 (341 p. 44)
- JARNEFELT, J., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 266, 91 (438 p. 77).
- JOYEUX, Y., & JOUIN, H., (1970) *C.R. Acad. Sci.*, 271, 434 (292 p. 40).
- KAHANE, I., & RAZIN S., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 159 (291 p. 40).
- KARLSSON, J.O., HAMBERGER, A., & HENN, F.A., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 219 (64 p. 8).

- KARLSSON, E., HEILBRONN, E., & WIDLUND, L., (1972) *Febs Letters*, 28, 107 (308 p. 42).
- KATHAN, R.H., & ADAMANY, A., (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 1716 (348 p. 45).
- KATHAN, R.H., & WINZLER, R.J., (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 21 (216 p. 32).
- KAVANAU, J.L., (1963) *Nature*, 198, 5225 (181 p. 22).
- KAWASAKI, T., & YAMASHINA, I., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 225, 234 (354 p. 48, 357 p. 48).
- KIDWAI, A. M., RADCLIFFE, M.A. & DANIEL, E.E., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.* 233, 538 (31 p. 6, 50 p. 7).
- KIM, Y.S., PERDOMO, J., BELLA, A., & NORDBERG, J., (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1753 (106 p. 10).
- KINNE, R., & KINNE-SAFFRAN, E., (1969) *Pfluegers. Arch. Eur. J. Physiol.*, 308, 1 (112 p. 10).
- KLENK, H.D., & CHOPPIN, P.W., (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 66, 57 (132 p. 16).
- KNAUF, P.A., & ROTHSTEIN, A., (1971) *J. Gen. Physiol.*, 58, 190 (226 p. 33).
- KOBYLA, D., & CARRAWAY, K.L., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 288, 282 (146 p. 17).
- KONO, T., & COLOWICK, S.P., (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 520 (66 p. 8, 122 p. 14).
- KORN, E.D., DEARBORN, D.G., FALES, H.M., & SOKOLOSKI, E.A., (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2257 (131 p. 13)
- KORNBERG, R.D., & Mc CONNELL, H.M., (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68, 2564 (223 p. 32).
- KORNBERG, R.D., & Mc CONNELL, H.M., (1971) *Biochemistry*, 10, 1111 (224 p. 32).
- KORNFELD, R., & KORNFELD, S., (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 2536 (338 p. 44, 342* p. 45).
- KORNFELD, S., ROGER, S., & GREGORY, W., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 6581 (339 p. 44).
- KRAEMER, P.M., (1966) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 67, 23 (348* p. 47).
- KRAEMER, P.M., (1967) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 69, 199 (351 p. 47).
- KRAEMER, P., (1971) *Biochemistry*, 10, 1437 (129 p. 13, 554 p. 156).
- KREUTZ, W., (1963) *Z. Naturf.* 18 b, 1098 (170 p. 20).
- KRISHNA, G., WEISS, R., & BRODIE, B.B., (1968) *Pharm. Exptl. Therap.*, 163, 379 (462 p. 79).
- KUSHNER, D.J., (1969) *Bacteriol. Rev.* 33, 302 (290 p. 40).
- LAICO, M.J., RUOSLAHTI, E.I., PAPERMASTER, D.C., & DREYER, W.J. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67, 120 (60 p. 8).

- LANGLEY, O.K., & AMBROSE, E.J., (1964) *Nature*, 204, 53 (233 p. 36, 318 p. 42).
- LAMM, M.E., KOO, G.C., STACK POLE, C.W., & HAMMERLING, V., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 3732 (251 p. 36).
- LAUTER, C.J., SOLYOM, A., & TRAMS, E.G., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 266, 511 (406 p. 72, 417 p. 74, 418 p. 73, 421 p. 75, 428 p. 76, 432 p. 76, 558 p. 161, 559 p. 163, 561 p. 165).
- LEFKOWITZ, R.J., HABER, E., & O'HARA, D., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 2828 (314 p. 42).
- LENARD, J., & SINGER, S.J., (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 56, 1828 (184 p. 22, 186 p. 24).
- LESENEY, A.M., BOURRILLON, R., & KORNFELD, S., (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 153 831 (340 p. 44).
- LESKO, L., DONLON, M., MARINETTI, G.V., & HARE, J.D., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.* 311, 173 (397 p. 54).
- LLOYD-DAVIES, K.A., MICHELL, R.H., & COLEMAN, R., (1972) *Biochem.*, 127, 357 (101 p. 12).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., & RANDALL, R.J., (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265 (411 p. 72, 490 p. 89).
- LUCY, J.A., (1964) *J. Theor. Biol.*, 7, 360 (176 p. 20).
- LUFT, J.H., (1964) *J. Cell. Biol.*, 23, 54 A (246 p. 36).
- LUZZATI, V., (1968) In "Biological Membranes" Ed by CHAPMAN D., Academic Press, New York and London, p. 71 (180 p. 22).
- LUZZATI, V., & HUSSON, F., (1962) *J. Cell. Biol.*, 12, 207 (179 p. 22).
- MADDY, A.H., (1964) *Biochim. Biophys. Acta.*, 88, 390 (210 p. 30).
- MADDY, A.H., (1964) *Biochim. Biophys. Acta.*, 88, 448 (274 p. 39).
- MADDY, A.H., (1966) *Intern. Rev. Cytol.*, 20, 1 (11 p. 4).
- MADDY, A.H., (1966) *Biochim. Biophys. Acta.*, 117, 193 (275 p. 39).
- MADEIRA, V.M.C., & ANTUNES-MADEIRA, M.C., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 230 (26 p. 6, 37 p. 6).
- MAHLER, H.R., (1955) In "Methods in Enzymology" vol. II Eds : COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. p. 688 (476 p. 84, 564 p. 170).
- MARCHESI, V.T., & ANDREWS, E.P., (1971) *Science*, 174, 1247 (288 p. 39, 304 p. 41, 346 p. 44).
- MARCHESI, S.L., STEERS, E., MARCHESI, V.T., & TILLACK, T.W., (1970) *Biochemistry*, 9, 50 (84 p. 9).
- MARCHESI, V.T., TILLACK, T.W., JACKSON, R.L., SEGREST, J.P., & SCOTT, R.E., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 1445 (75 p. 8, 138 p. 15).

- MARCUS, P.I., & SCHWARTZ, V.G., (1968) In "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane". Ed by MANSON L.A. Wistar Institute Press, Philadelphia p. 143 (347* p. 47).
- MARINETTI, G.V., RAY, T.K., & TOMASI, V., (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 185 (446 p. 78, 460 p. 79).
- MATEU, L., LUZZATI, V., LONDON, Y., GOULD, R.M., VOSSEBERG, F.G.A., & OLIVE, J., (1973) J. Mol. Biol., 75, 697 (197 p. 28).
- MAZIA, D., & RUBY, A., (1968) Proc. Natl. Acad. Sci., 61, 1005 (83 p. 9).
- Mc DONALD, L.W. & HAYES, T.L., (1969) Exp. Mol. Pathol., 10, 186 (242 p. 36).
- MEEZAN, E., WU, H.C., BLACK, P.H., & ROBBINS, P.W., (1969) Biochemistry, 8, 2518 (329 p. 43).
- MELDOLESI, J., JAMIESON, J.D., PALADE, G.E., (1971) J. Cell. Biol., 49, 130 (52 p. 7).
- MERZ, D.C., GOOD, R.A., & LITMAN, G.W., (1972) Biochem. Biophys. Acta., 49, 84 (300 p. 40).
- MEYER, H.W., & WINKELMANN, H., (1972) Protoplasma, 75, 255 (220 p. 32).
- MILLER, D.M., (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 716 (280 p. 39).
- MIYAJIMA, N., KAWAKI, T., & YAMASHINA, I., (1970) Febs Letters, 11, 29 (72 p. 8, 136 p. 15, 330 p. 43, 337 p. 43, 503 p. 97).
- MOLDOW, Ch.F., ZUCKER-FRANKLIN, D., GORDON, A., HOSPELHORN, V., & SILBER, R., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 255, 133 (286 p. 39).
- MOLNAR, J., LUTES, R.A., & WINZLER, R.J., (1965) Cancer Res., 25, 1438 (349* p. 47, 352 p. 47).
- MOODY, M.F., (1963) Science, 142, 1173 (164 p. 18).
- MOSCONA, A.A., (1963) Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 742 (378 p. 52).
- MUKHERJEE, T.M., & STAEHLIN, L.A., (1971) J. Cell. Sci., 8, 573 (252 p. 36).
- MURAMATSU, T., & NATHENSON, S.G., (1970) Biochemistry, 9, 4875 (332 p. 43).
- MURAMATSU, T., & NATHENSON, S.G., (1971) Biochim. Biophys. Acta., 241, 195 (333 p. 43).
- NAGELI, C., & CRAMER, C., (1855) Pflanzenphysiologische Untersuchungen, 1 Helt. Zurich, F. Schultess (1 p. 3).
- NATHENSON, S.G. & DAVIES, D.A.L., (1966) Ann. N.Y. Acad. Sci., 129, 6 (363 p. 49).
- NEIFAKH, S.A. & VASILETS, I.M., (1965) Fed. Proc., 24, Part I, T 561 (222 p. 32).
- NERI, G., SMITH, D.F., & WALBORG, E.F. (1973) In "Colloque International sur les Glycoconjugués" CNRS. Université des Sciences et Techniques de Lille I (344 p. 44).

- NEUBERGER, A., GOTTSCHALK, A., & MARSHALL, R.D., (1966) In "Glycoproteins. Their composition, structure and function". Ed by GOTTSCHALK A. ELSEVIER PUBLISHING COMPANY, Amsterdam, London, New-York, p. 273 (537 p. 138).
- NEVILLE, D.M., (1960) J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 413 (385 p. 54).
- NEVILLE, D.M., (1967) Biochim. Biophys. Acta., 133, 168 (266 p. 39).
- NEVILLE, D.M., (1968) Biochim. Biophys. Acta., 154, 540 (513 p. 102).
- NEVILLE, D.M., (1971) J. Biol. Chem., 246, 6328 (299 p. 40, 519 p. 107, 568 p. 176)
- NEVILLE, D.M., & GLOSSMAN, H., (1971) J. Biol. Chem., 246, 6335 (62 p. 8).
- NEWKIRK, J.D., & WAITE, M., (1971) Biochim. Biophys. Acta., 225, 224 (98 p. 12).
- NEWKIRK, J.D., & WAITE, M., (1973) Biochim. Biophys. Acta., 298, 562 (99 p. 12).
- NICOLSON, G.L., & SINGER, S.J., (1971) Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 942 (193 p. 24)
- NIGAM, V.N., MORAIS, R., & KARASAKI, S., (1971) Biochim. Biophys. Acta., 249, 34 (392 p. 54).
- NORDLING, S., ANDERSSON, L.C., & HAYRY, P., (1972) Science, 178, 1001 (265 p. 38).
- NOVIKOFF, A.B., (1960) In "Cell Physiology of Neoplasia" University of Texas Press Austin, Texas, p. 219 (423 p. 75).
- OHKUMA, S., & IKEMOTO, S., (1966) Nature, 212, 198 (69 p. 8, 319 p. 42).
- OLSEN, R.W., MEUNIER, J.C., & CHANGEUX, J.P., (1972) Febs Letters, 28, 96 (309 p. 42).
- OMURA, T., SIEKEVITZ, P., & PALADE, G.E., (1967) J. Biol. Chem., 242, 2389 (474 p. 84).
- OSCHMAN, J.L., & WALL, B.J., (1972) J. Cell. Biol., 55, 58 (41 p. 6).
- OSNES, J.B., CHRISTOFFERSEN, T., MORLAND, J., & ØYE, I., (1972) J. Chromatog. 67 139 (465 p. 79).
- OVERTON, E., (1899) Vischr. naturf. Ges. Zurich, 44, 88 (3 p. 3).
- PARDEE, A.B., (1968) Science, 162, 632 (115 p. 10).
- PARDOE, G.I., (14 Mai 1971) Journées d'Etudes, p. 863 (359 p. 49, 360 p. 50, 361 p. 49).
- PARSONS, D.F., & AKERS, Ch.K., (1969) Science, 165, 1016 (198 p. 28).
- PARSONS, D.F., & SUBJECK, J.R., (1972) Biochim. Biophys. Acta. 265, 85 (253 p. 37)
- PARTRIDGE, S.M., (1948) Biochem. J. 42, 238 (542 p. 144).
- PASSOW, H., (1969) Progr. Biophys. Mol. Biol., 10, 425 (70 p. 8).
- PERDUE, J.F., KLETZIEN, R., & MILLER, K., (1971) Biochim. Biophys. Acta., 249 419 (371 p. 52).

- PERDUE, J.F., KLETZLIEN, R., & WRAY, V.L., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 266, 505 (372 p. 52).
- PERDUE, J.F. & SNEIDER, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 196, 125 (17 p. 4).
- PETHICA, B.A., & CAMBRAI, M., (1970) *La Recherche*, 1, 433 (7 p. 4).
- PFEFFER, W., (1897) *Osmotische Untersuchungen*, Leipzig : Engelmann (2 p. 3).
- PHILIPPOT, J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 225, 201 (278 p. 39).
- PLOWE, J.Q., (1931) *Protoplasma*, 12, 196 (5 p. 3).
- POHL, S.L., BIRNBAUMER, L., & RODBELL, M., (1969) *Science*, 164, 566 (445 p. 78).
- POHL, S.L., BIRNBAUMER, L., & RODBELL, M., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1849 (450 p. 78, 468 p. 81).
- POHL, S.L., KRANS, H.M.J., KOZYREFF, V., BIRNBAUMER, L., & RODBELL, M., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 4447 (455 p. 78).
- PRICE, R.G., TAYLOR, D.G., & ROBINSON, D., (1972) *Biochem. J.* 129, 919 (20 p. 4).
- PRICER, W.E., & ASHWELL, G., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 4825 (381 p. 53).
- PURDOM, L., AMBROSE, E.J., & KLEIN, G., (1958) *Nature*, 181, 1586 (260 p. 38).
- QUARLES, R.H., EVERLY, J.L., & BRADY, R.O., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 491 (144 p. 17).
- RAFTERY, M.A., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 270 (312 p. 42).
- RAMBOURG, A., NEUTRA, M., & LEBLOND, C.P., (1966) *Anat. Record.*, 154, 41 (239 p. 36).
- RAO, G.J.S., DEL MONTE, M., & NADLER, H.L., (1971) *Nature. New. Biology*, 232, 253 (464 p. 79).
- RAY, T.K., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 196, 1 (391 p. 54, 401 p. 59, 466 p. 81, 493 p. 92, 500 p. 93).
- RAY, T.K., TOMASI, V., & MARINETTI, G.V., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 211, 20 (447 p. 78).
- RAZIN, S., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 265, 241 (294 p. 40).
- RELANDER, A., (1968) *Scand. J. Haematol.*, 5, 313 (118 p. 14).
- RENKONEN, O., GAHMBERG, C.G., SIMONS, K., & KAARIAINEN, L., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 255, 66 (46 p. 7).
- RETHY, A., TOMASI, V., & TREVISANI, A., (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 36 (458 p. 78).
- RETHY, A., TOMASI, V., TREVISANI, A., & BARNABEI, O., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 290, 58 (459 p. 78).
- RICHARDSON, S.H., HULTIN, H.O., & GREEN, D.E., (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 821 (88 p. 9, 89 p. 9).

- RIFKIN, D.B., COMPANS, R.W., & REICHEL, E., (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6432 (213 p. 30)
- RIMINGTON, C., (1940) *Biochem. J.*, 34, 931 (507 p. 99).
- ROBERTSON, J.D., (1959) *Biochem Symp.*, 16, 3 (6 p. 4, 171 p. 20).
- ROBERTSON, J.D., (1964) In "Cellular Membranes in Development" Ed by LOCKE, M. Academic Press, New-York and London, p. 1 (172 p. 20, 238 p. 36).
- ROBINSON, D., & STIRLING, J.L., (1969) *Biochem. J.* 115, 39 P (103 p. 12).
- RODBELL, M., KRANS, H.M., POHL, S.L., & BIRNBAUMER, L., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1861 (452 p. 78).
- RODBELL, M., KRANS, H.M.J., POHL, S.L., & BIRNBAUMER, L., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1872 (453 p. 78).
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., & KRANS, H.M.J., (1971) 246, 1877 (454 p. 78).
- ROSENTHAL, A.S., KREGENOW, F.M., & MOSES, H.L., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 196, 254 (107 p. 10).
- ROSSELIN, G., & FREYCHET, P., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 304, 541 (463 p. 79)
- ROTH, S., Mc GUIRE, E.J., & ROSEMAN, S., (1971) *J. Cell. Biol.*, 51, 536 (380 p. 53)
- ROUSER, G., NELSON, G.J., FLEISCHER, S., & SIMON, G., (1968) In "Biological Membranes" Ed : CHAPMAN D. Academic Press, New-York and London p. 5 (45 p. 6, 48 p. 7, 55 p. 7).
- SAIFER, A., & GERSTENFELD, S., (1962) *Clin. Chim. Acta.*, 7, 467 (509 p. 99).
- SALSURY, A.J., & CLARKE, J.A., (1969) *Triangle*, IX, 11 (244 p. 36).
- SCHATZMANN, H.J., (1962) *Nature*, 196, 677 (437 p. 77).
- SCHATZMANN, H.J., & ROSSI, G.L., (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 241, 379 (108 p. 10).
- SCHENGRUND, C.L., JENSEN, D.S., & ROSENBERG, A., (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2742 (102 p. 12).
- SCHIECHL, H., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 307, 65 (269 p. 39).
- SCHMIDT, W.J., (1936) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 23, 657 (157 p. 18).
- SCHMIDT, J., & RAFTERY, M.A., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 572 (310 p. 42).
- SCHMIDT, J., & RAFTERY, M.A., (1973) *Biochemistry*, 12, 852 (311 p. 42).
- SCHMITT, F.O., BEAR, R.S., & CLRAK, G.L., (1935) *Radiobiology*, 25, 131 (158 p. 18)
- SCHMITT, F.O., BEAR, R.S., & PALMER, K., (1941) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 18, 31 (159 p. 18).

- SCHMITT, F.O., BEAR, R.S., & PONDER, E., (1936) J. Cell. Comp. Physiol., 9, 89 (154 p. 18).
- SCHMITT, F.O., BEAR, R.S., & PONDER, E., (1938) J. Cell. Comp. Physiol., 11, 309 (155 p. 18).
- SCHNAITMAN, C., ERWIN, V.G., & GREENAWALT, J.W., (1967) J. Cell. Biol., 32, 719 (483 p. 86).
- SCHNEIDERMAN L.J., & JUNGA, I.G., (1968) Biochemistry, 7, 2281 (92 p. 9).
- SEGREST, J.P., JACKSON, R.L., ANDREWS, E.P., & MARCHESI, V.T., (1971) Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 390 (137 p. 15).
- SEGREST, J.P., KAHANE, I., JACKSON, R.L., & MARCHESI, V.T., (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 167 (139 p. 15, 215 p. 32, 347 p. 44)
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. & MAIZEL, J.V., (1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 (204 p. 30, 295 p. 40, 571 p. 178)
- SHEFFIELD, J.B., & EMMELOT, P., (1972) Exp. Cell. Res., 71, 97 (515 p. 102).
- SHEININ, R. & ONODERA, K., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 274, 49 (372 p. 52).
- SHERBET, G.V., LAKSHMI, M.S., & RAO, K.V., (1972) Exptl. Cell. Res., 70, 113 (264 p. 38).
- SHLATZ, L., & MARINETTI, G.V., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 290, 70 (42 p. 6).
- SINGER, S.J., & NICOLSON, G.L., (1972) Science, 175, 720 (78 p. 8, 81 p. 8, 194 p. 24).
- SINGER, S.J., & SCHICK, A.F., (1961) J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 519 (248 p. 36)
- SJÖSTRAND, F.S., (1965) Symp. Japan. Soc. Cell. Biol., 14 Suppl. 103 (173 p. 20).
- SJÖSTRAND, F.S., (1968) In "The Membranes" Ed by DALTON A.J. and HAGUENAU, F. Academic Press, New-York and London, p. 151 (174 p. 20).
- SKIDMORE, J., & TRAMS, E.G., (1970) Biochim. Biophys. Acta. 219, 93 (419 p. 73).
- SKIPSKI, V.P., BARCLAY, M., ARCHIBALD, F.M., TEREBUS-KEKISH, O.; REICHMAN, E.S. & GOOD, J.J., (1965) Life Sci., 4, 1673 (10 p. 4, 43 p. 6, 56 p. 7).
- SKOU, J.C., (1957) Biochim. Biophys. Acta., 23, 394 (436 p. 77).
- SMITH, D.F., NERI, G., & WALBORG, E.F., (1973) Biochemistry, 12, 2111 (343 p. 44).
- SMITH, D.F., & WALBORG, E.F., (1972) Cancer. Res., 32, 543 (334 p. 43).
- SMITH, E.J., & CRITTENDEN, L.B., (1973) Biochim. Biophys. Acta., 298, 608 (374 p. 52)
- SONG, C.S., RUBIN, W., RIFKIND, A.B., & KAPPAS, A., (1969) J. Cell. Biol., 41, 124 (390 p. 54).

BUS
LILLE

- STADTMAN, J.C., (1955) In "Methods in Enzymology" Ed by COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. Vol. III, Academic Press, New-York and London, p. 450 (497 p. 93).
- STECK, T.L., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 255, 553 (268 p. 39).
- STECK, T.L., FAIRBANKS, G., & WALLACH, D.F.H., (1971) Biochemistry, 10, 2617 (208 p. 30).
- STECK, T.L., WEINSTEIN, R.S., STRAUS, J.H., & WALLACH, D.F.H., (1970) Science, 168 255 (209 p. 30).
- STEIN, W.D., & DANIELLI, J.F., (1956) Disc. Faraday. Soc., 21, 238 (156 p. 18).
- SUDO, T., KIKUNO, M., & KURIHARA, T., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 255, 640 (111 p. 10).
- SUKURI, S., KOJIMA, K., & UTSUMI, K.R., (1970) Biochim. Biophys. Acta., 222, 240 (128 p. 13, 258 p. 38).
- SUTHERLAND, E.W., & RALL, T.W., (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 3608 (443 p. 78).
- SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W., & MENON, T., (1962) J. Biol. Chem., 237, 1220 (444 p. 78).
- SWANSON, M.A., (1955) In "Methods in Enzymology" Ed by COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. Vol. II, Academic Press, New-York and London, p. 514 (472 p. 84, 563 p. 169).
- SWIFT, H., & ADAMS, B.J., (1962) In "Proceedings of Fifth International Conference on Electron Microscopy" Philadelphia, 2, 0-4 (235 p. 36).
- TABOR, C.W., TABOR, H., & ROSENTHAL, S.M., (1955) In "Methods in Enzymology" Ed by COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. Vol. II, Academic Press, New-York and London, p. 390 (485 p. 86, 566 p. 172).
- TAKAYAMA, K., Mac LENNAN, D.H., TZAGOLOFF, A., & STONER, C.D., (1966) Arch. Biochem. Biophys., 114, 223 (285 p. 39).
- TAKEUCHI, M., & TERAYAMA, H., (1965) Exptl. Cell. Res., 40, 32 (68 p. 8, 120 p. 14, 387 p. 54).
- TANNER, M.J.A., & BOXER, D.H., (1972) Biochem. J., 129, 333 (76 p. 8).
- THOMAS, D.B., & WINZLER, R.J., (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 811 (321 p. 42, 340* p. 45).
- TILLMANS, J., & PHILIPPI, K., (1929) Biochem. Z., 215, 36 (506 p. 99).
- TOUSTER, O., ARONSON, N.N., DULANEY, J.J., & HENDRICKSON, H., (1970) J. Cell. Biol. 47, 604 (29 p. 6, 38 p. 6, 420 p. 73).
- TRAYER, H.R., NOZAKI, J., REYNOLDS, J.A., & TANFORD, Ch., (1971) J. Biol. Chem., 246, 4485 (61 p. 8).

- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P., & HARRISON, J.S., (1950) *Nature*, 166, 444 (526 p. 114).
- TURNER, J.C., ANDERSON, H.M., & GANDAL, C.P., (1958) *Biochim. Biophys. Acta.*, 30, 130 (228 p. 33).
- UHLENBRUCK, G., & WINTZER, G., (1970) In "Blood and Tissue Antigens" Ed by AMINOFF D. Academic Press, New-York and London, p. 289 (257 p. 37).
- VAN BLITTERSWIJK, W.J., EMMELOT, P., & FELTKAMP, C.A., (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 577 (25 p. 6, 35 p. 6).
- VAN DEENEN, L.L.M., & DE GIER, J., (1964) In "The Red Blood Cell" Ed by BISHOP C. and SURGENOR D.M. Academic Press, New-York and London, p. 243 (44 p. 6, 47 p. 7).
- VANDERKOOI, G., (1972) "Conference on Membrane Structure and its Biological Implications" Ed by GREEN D.E. and DANIELLI, J.F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (77 p. 8, 80 p. 8).
- VANDERKOOI, G., & GREEN, D.E., (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 66, 615 (191 p. 24)
- VANDERKOOI, G., & SUNDARALINGAM, M., (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67, 233 (199 p. 28).
- VAN LENTEN, L. & ASHWELL, G., (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1889 (522 p. 107).
- VAN LENTEN, L., & ASHWELL, G., (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 4633 (382 p. 53).
- WACHSTEIN, M., & MEISEL, E., (1957) *Am. J. Clin. Pathol.*, 27, 13 (433 p. 76).
- WAEHNELDT, T.V., MORGAN, I.G., & GOMBOS, G., (1971) *Brain Research.*, 34, 403 (145 p. 17, 282 p. 39).
- WALLACH, D.F.H., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 265, 61 (544 p. 148).
- WALTER, H., TUNG, R., JACKSON, L.J., & SEAMAN, G.V.F., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 48, 565 (263 p. 38).
- WARREN, L., (1959) *Federation Proc.*, 18, 347 (508 p. 99).
- WARREN, L., FUHRER, J.P., & BUCK, C.A., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 1838 (327 p. 42, 375 p. 52, 533 p. 125).
- WARREN, L., FUHRER, J.P., & BUCK, C.A., (1973) *Fed. Proc.*, 32, 80 (328 p. 42).
- WARREN, L., & GLICK, M.C., (1968) *J. Cell. Biol.*, 37, 729 (350 p. 47).
- WATKINS, W.M., (1970) In "Blood and Tissue Antigens" Ed by AMINOFF D. Academic Press, New-York and London, p. 457 (133 p. 15).
- WEAVER, R.A., & BOYLE, W., (1969) *Biochim. Biophys. Acta.*, 173, 377 (394 p. 54).
- WEBER, K., & OSBORN, M., (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (205 p. 30, 296 p. 40, 521 p. 107, 569 p. 177, 570 p. 179).

- WEINSTEIN, D.B., (1968) In "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane" Ed by MANSON L.A. The Wistar Institute Press, p. 17 (13 p. 4).
- WEISS, L., (1969) Intern. Rev. Cytol., 26, 63 (27 p. 6).
- WEISS, H., & BUCHER, Th., (1970) Eur. J. Biochem., 17, 561 (303 p. 41).
- WEISS, J.B., LOTE, C.J., & BOBINSKI, H., (1971) Nature. New. Biology., 44, 25 (141 p. 17).
- WEISS, L.S., & NARAHARA, H.T., (1969) J. Biol. Chem., 244, 3084 (71 p. 8).
- WILKINS, M.H.F., BLAUROCK, A.E., & ENGLEMAN, D.M., (1971) Nature, 230, 71 (188 p. 24).
- WINZLER, R.J., (1969) In "Red Cell Membrane" Ed by JAMIESON G.A. and GREENWALT T.J. Lippincott, Philadelphia, p. 157 (218 p. 32)
- WINZLER, R.J., (1970) Int. Rev. Cytol., 29, 77 (255 p. 37, 256 p. 37).
- WINZLER, R.J., (1970) In "Blood and Tissue Antigens" Ed by AMINOFF D. Academic Press, New-York and London, p. 117-130 (73 p. 8, 135 p. 15).
- WINZLER, R.J., (1972) In "Glycoproteins, Their Composition Structure and Function" 2ème Ed. Ed by GOTTSCHALK. p. 1268 (116 p. 14, 343* p. 45).
- WINZLER, R.J., HARRIS, E.D., PEKAS, J.D., JOHNSON, C.A., & WEBER, P., (1967) Biochemistry, 6, 2195 (320 p. 42, 349 p. 45).
- WOLF, H.V., (1972) Biochim. Biophys. Acta., 266, 361 (109 p. 10).
- WOODIN, A.M., & WIENEKE, A.A., (1966) Biochem. J., 99, 493 (125 p. 14).
- WOODWARD, D.O., & MUNKRES, K.D., (1966) Proc. Natl. Acad. Sci., 55, 872 (91 p. 9).
- WORTHINGTON, C.R., (1971) Fed. Proc., 30, 57 (200 p. 28).
- WRAY, V.P., & WALBURG, E.F., (1971) Cancer. Res., 31, 2072 (342 p. 44).
- YAMASHINA, I., FUNAKOSHI, I., & NAKADA, H., (1973) In "Colloque International sur les Glycoconjugués" CNRS, Université des Sciences et Techniques de Villeneuve d'Ascq (France) (130 p. 13, 345* p. 45, 536 p. 136, 543 p. 146, 553 p. 156 555 p. 156).
- YOSIZAWA, Z., MAKITA, A., & SUZUKI, C., (1966) J. Biochem., 60, 502 bis (134 p. 15).
- YU, R.K., & LEDEEN, R., (1969) J. Biol. Chem., 244, 1306 (524 p. 111).
- ZAHLER, P., (1969) In "Modern Problems of Blood Preservation" Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, (192 p. 24).
- ZAHLER, P.H., & WALLACH, D.F.H., (1967) Biochim. Biophys. Acta., 135, 371 (270 p. 39, 301 p. 41).

- ZENTGRAF, H., DEUMLING, B., JARASCH, E.D., & FRANKE, W.W., (1971) J. Biol. Chem., 246, 2986 (19 p. 4).
- ZWAAL, R.F.A., & VAN DEENEN, L.L.M., (1968) Biochim. Biophys. Acta., 163, 44 (276 p. 39).

=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=O=

