

5376
1974
57

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1974
57

MEMOIRE

présenté à
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

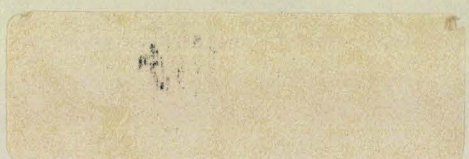
pour obtenir

Le Titre de DOCTEUR de 3^e CYCLE en BIOCHIMIE

par

Didier LEGER

ÉTUDE COMPARÉE DE LA STRUCTURE DE LA SÉROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES APPLICATIONS DE L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE ET DE LA MESURE DE LA VISCOSITÉ INTRINSÈQUE A LA DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE ET DE LA STRUCTURE MONOCATÉNAIRE DES PROTÉIDES



Soutenu le 8 Juillet 1974

devant la COMMISSION D'EXAMEN

- | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|------------|
| Membres du Jury : | M. J. | MONTREUIL | Président |
| | Mme M. H. | LOUCHEUX | Rapporteur |
| | Melle G. | SPIK | Examineur |
| | M. C. | LOUCHEUX | Examineur |

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS,
DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
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. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
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. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCO 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. COULON Jean	I.E.E.A.
M. CROSNIER Yves	E.U.D.I.L.
M. COUTURIER Daniel	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

Mle DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie
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. FROELICH 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. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNAL Gérard	Sciences Appliquées
Mle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
Mle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mle 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. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
Mme N'Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial
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
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislav	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés de Fonctions) suite

M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle 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

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université
des Sciences et Techniques de Lille et du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 :
Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués (Pro-
fesseur J. MONTREUIL), réalisé sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK,
Maître de Conférences et avec la collaboration de Madame Marie-Henriette LOUCHEUX,
Maître de Recherches au C.N.R.S.

Les expériences d'ultracentrifugation analytique ont été réalisées avec la collaboration technique de Christian DUPIRE sous la direction de André VERBERT.

Liste des abréviations et symboles utilisés

STF	: Sérotransferrine native
Fe-STF	: Sérotransferrine saturée en fer
ApoSTF	: Aposérotransferrine
LTF	: Lactotransferrine native
Fe-LTF	: Lactotransferrine saturée en fer
ApoLTF	: Apolactotransferrine
CM-STF	: Sérotransferrine S-carboxamidée ou S-carboxyméthylée
CM-LTF	: Sérotransferrine S-carboxamidée ou S-carboxyméthylée
Gu.HCl	: Chlorhydrate de guanidine
Tris-HCl	: Tris-(hydroxyméthyl)-amino méthane tamponné par HCl
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique (sel disodique)
$[\eta]$: Viscosité intrinsèque
$S^{\circ}_{20,w}$: Constante de sédimentation, mesurée à 20°C, extrapolée à concentration nulle et ramenée à l'eau
MM	: Masse moléculaire
Ci/Bi	: Tampon citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	4
1. - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	4
2. - <u>COMPOSITION ET STRUCTURE</u>	6
A - <u>FRACTION GLYCANNIQUE</u>	6
B - <u>FRACTION PROTEIQUE</u>	6
1 - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	6
2 - <u>ACIDES AMINES N ET C TERMINAUX</u>	10
3. - <u>CONCLUSIONS</u>	12
TRAVAUX PERSONNELS	13
MATERIEL ET METHODES	14
1. - <u>REACTIFS</u>	14
I - <u>PREPARATION ET PURIFICATION DU CHLORHYDRATE <u>DE GUANIDINE</u></u>	14
A - <u>RECRISTALLISATION DU CARBONATE DE GUANIDINE</u>	14
B - <u>PREPARATION DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE</u>	14
C - <u>PURIFICATION DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE</u>	14
II - <u>PURIFICATION DE L'UREE</u>	15
III - <u>RECRISTALLISATION DES AGENTS ALKYLANTS :</u> <u>ACIDE IODOACETIQUE, IODOACETAMIDE</u>	15
A - <u>IDOACETAMIDE</u>	15
B - <u>ACIDE IODOACETIQUE</u>	15

IV - <u>REACTIF AU NITROPRUSSIATE</u>	15
V - <u>AUTRES REACTIFS</u>	16
VI - <u>PREPARATION DES PROTEIDES</u>	16
A - <u>SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	16
1 - <u>SEROTRANSFERRINE NATIVE</u>	16
2 - <u>SEROTRANSFERRINE SATUREE EN FER</u>	16
3 - <u>AOSEROTRANSFERRINE</u>	16
B - <u>LACTOTRANSFERRINE HUMAINE</u>	16
1 - <u>LACTOTRANSFERRINE NATIVE</u>	16
2 - <u>LACTOTRANSFERRINE SATUREE EN FER</u>	17
3 - <u>APOLACTOTRANSFERRINE</u>	17
C - <u>PREPARATION DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES</u>	17
1 - <u>REDUCTION DES PONTS DISULFURES</u>	17
2 - <u>ALKYLATION</u>	18
2. - <u>METHODES</u>	19
I - <u>DETERMINATION DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE</u>	19
A - <u>PRINCIPE</u>	19
1 - <u>THEORIE ET METHODE DE CALCUL</u>	19
2 - <u>APPLICATIONS : DETERMINATION DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE A PARTIR DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE DES PROTEINES SOUS FORME DE PELOTE STATISTIQUE</u>	20
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	22
II - <u>DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTATION</u>	25
A - <u>PRINCIPE</u>	25
1 - <u>THEORIE</u>	25

2 - <u>METHODE DE CALCUL</u>	27
3 - <u>CONVERSION AUX CONDITIONS STANDARD</u>	30
4 - <u>EXTRAPOLATION A LA CONCENTRATION NULLE</u>	31
B - <u>APPLICATIONS</u>	31
1 - <u>DETERMINATION DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE A PARTIR DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION $S^{\circ}_{20, \text{sol}}$ DES PROTEINES SOUS FORME DE PELOTE STATISTIQUE</u>	31
2 - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR COMBINAISON DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION $S^{\circ}_{20, w}$ ET LA VISCOSITE INTRINSEQUE</u>	34
C - <u>MODE OPERATOIRE</u>	34
III - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION</u>	35
A - <u>PRINCIPE</u>	35
1 - <u>THEORIE</u>	36
2 - <u>METHODE DE CALCUL</u>	36
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	41
RESULTATS	43
1. - <u>DETERMINATION DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	44
I - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU NON DENATURANT</u>	44
A - <u>MATERIEL</u>	44
B - <u>RESULTATS</u>	44
C - <u>DISCUSSION</u>	45
II - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU DENATURANT</u>	50
A - <u>MATERIEL</u>	50

B - <u>RESULTATS</u>	50
1 - <u>MESURE DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE EN UREE 8 M</u>	50
2 - <u>MESURE DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE EN Gu.HCl 6 M et 8 M</u>	50
C - <u>DISCUSSION</u>	51
III - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS EN MILIEU DENATURANT</u>	55
A - <u>MATERIEL</u>	55
B - <u>RESULTATS</u>	55
1 - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS EN MILIEU UREE</u>	55
2 - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS EN MILIEU Gu.HCl</u>	56
IV - <u>VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES EN MILIEU Gu.HCl 6 M</u>	56
A - <u>MATERIEL</u>	56
B - <u>RESULTATS</u>	56
C - <u>APPLICATIONS</u>	56
D - <u>DISCUSSION</u>	62
V - <u>CONCLUSIONS</u>	63
2. - <u>DETERMINATION DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES</u>	64
I - <u>COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES NATIFS</u>	64
A - <u>CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES</u>	64
1 - <u>MATERIEL</u>	64
2 - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	64
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	64
B - <u>RESULTATS DEFINITIFS</u>	66
1 - <u>MATERIEL</u>	66
2 - <u>RESULTATS</u>	66
3 - <u>DISCUSSION</u>	67

	<u>II - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES</u>	
	<u>REDUITS ET ALKYLES DETERMINES EN MILIEU</u>	
	<u>Gü.HCl 6 M</u>	67
A -	<u>MATERIEL</u>	67
B -	<u>RESULTAT</u>	71
C -	<u>DISCUSSION</u>	71
	<u>III - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION : APPLICATIONS</u>	
	<u>A LA DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE</u>	71
A -	<u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR COMBINAISON DU</u>	
	<u>COEFFICIENT DE SEDIMENTATION $S^{\circ}_{20,w}$ ET DE LA VISCOSITE</u>	
	<u>INTRINSEQUE $[\eta]$</u>	71
1 -	<u>RESULTATS</u>	71
2 -	<u>DISCUSSION</u>	75
B -	<u>DETERMINATION DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE ET DE</u>	
	<u>LA MASSE MOLECULAIRE A PARTIR DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION</u>	
	<u>$S^{\circ}_{20,so1}$ DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES MESURE EN MILIEU</u>	
	<u>Gü.HCl 6 M</u>	76
1 -	<u>RESULTATS</u>	76
2 -	<u>DISCUSSION</u>	77
	<u>IV - CONCLUSIONS</u>	77
	<u>3. - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE</u>	
	<u>EN ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE</u>	
	<u>SEDIMENTATION</u>	78
	<u>I - EQUILIBRES DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES</u>	
	<u>NATIFS EN MILIEU NON DENATURANT</u>	78
A -	<u>MATERIEL</u>	78
B -	<u>RESULTATS</u>	79
1 -	<u>LACTOTRANSFERRINE HUMAINE</u>	79
2 -	<u>SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	82
C -	<u>DISCUSSION</u>	82

	II - <u>EQUILIBRES DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES</u>	
	<u>NATIFS EN MILIEU Gu.HCl 6 M</u>	83
A - <u>MATERIEL</u>		83
B - <u>RESULTATS</u>		83
C - <u>DISCUSSION</u>		85
	III - <u>EQUILIBRES DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES</u>	
	<u>REDUITS ET ALKYLES EN MILIEU Gu.HCl 6 M</u>	85
A - <u>MATERIEL</u>		85
B - <u>RESULTATS</u>		85
C - <u>DISCUSSION</u>		86
	IV - <u>CONCLUSIONS</u>	86
	<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	88
BIBLIOGRAPHIE		93

INTRODUCTION

Le travail qui nous a été confié, dans le cadre des recherches fondamentales entreprises au Laboratoire sur la structure des glycoprotéines, a consisté en une étude comparée de quelques unes des propriétés physico-chimiques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines.

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont deux glycoprotéines qui possèdent en commun la propriété de fixer réversiblement deux atomes de fer sur des sites spécifiques. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme du fer.

La sérotransferrine, présente dans le sérum, véhicule le fer à travers tout l'organisme. Elle intervient dans le métabolisme du fer (voir les revues générales de LAURELL (1), DREYFUS et SCHAPIRA (2), BLANC (3) et de DREYFUS (4). Elle est un intermédiaire : d'une part, entre le fer alimentaire et les formes de réserves transitoires ou durables de la ferritine et de l'hémosidérine et d'autre part, entre ces dernières et les formes "actives" de conjugués du fer : hémoglobine et myoglobines, cytochromes, catalases et peroxydases, métalloflavoprotéines.

La sérotransferrine possède en outre la propriété d'inhiber la croissance, par ferriprivation, de certaines bactéries pathogènes dont le fer est un élément indispensable (SCHADE et CAROLINE (5)) et une activité antitoxique vis-à-vis de composés renfermant du fer (HEILMEYER et coll. (6) et JANOFF et ZWEIFACH (7)).

La lactotransferrine possède une répartition très large dans l'organisme ce qui pose le problème de son rôle biologique. Rôle qui semble dépasser les limites du problème nutritionnel de l'absorption du fer chez le nourrisson (SPIK (8)). En effet, la lactotransferrine aurait deux types de fonctions :

1 - Comme la sérotransferrine, la lactotransferrine transporterait le fer. Elle céderait le fer à des chélateurs et représenterait alors l'un des facteurs de régulation de la pénétration du fer dans la cellule intestinale.

2 - Protégerait l'organisme contre les ions métalliques et les bactéries par un mécanisme analogue à celui de la sérotransferrine. Cette activité bactériostatique a été posée en hypothèse par MONTREUIL et al. (9) puis BLANC et ISLIKER (10) et mise en évidence par BLANC (11), MASSON et HEREMANS (12) et ORAM et REITER (13).

L'activité antitoxique de la lactotransferrine posée en hypothèse par MONTREUIL n'a pas encore été démontrée.

La protection de l'intestin du nourrisson se ferait de la manière suivante : "récupération" du fer minéral soluble dans l'intestin par la lactotransferrine et, grâce au système en équilibre $Fe^{+++} \rightleftharpoons Fe-LTF \rightleftharpoons Fe\text{-chelates}$, protection de l'intestin vis-à-vis des germes qui ne peuvent se multiplier ni survivre en milieu ferriprivé. Cette hypothèse est confirmée par la présence, dans les selles de nouveau-né alimenté au lait maternel, de lactotransferrine encore capable de fixer le fer (MAZURIER-DEHAINE (14)).

Il est de plus troublant de constater que dans de nombreux milieux d'excrétions la lactotransferrine accompagne des immunoglobulines IgA et on peut postuler comme CHERON (15) dans le cas de la lactotransferrine bovine, que cette association est destinée à protéger les épithéliums.

De plus, la grande stabilité de la liaison fer-lactotransferrine par rapport à celle de la sérotransferrine (MONTREUIL et al. (16), BLANC et ISLIKER (17) et AISEN et LEIBMAN (18)), et une constante d'équilibre de fixation du fer 260 fois plus élevée (AISEN et LEIBMAN (19)) permettent de penser que celle-ci serait capable de prélever du fer à la sérotransferrine humaine. Cette affinité plus grande de la lactotransferrine pour le fer a conduit MASSON et HEREMANS (20) à poser en hypothèse sa présence éventuelle à l'intérieur des cellules glandulaires où elle pourrait jouer un rôle d'intermédiaire dans le transport du fer de la sérotransferrine à la ferritine.

Le rôle biologique important et encore mal défini joué par ces deux glycoprotéines a motivé les études structurales comparées entreprises au Laboratoire depuis longtemps.

Le problème de la masse moléculaire et de la structure sous-unitaire de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines n'était pas entièrement résolu au moment où nous avons entrepris notre travail. Nous avons donc étudié quelques paramètres physiques des deux glycoprotéines qui sont en relation avec leur taille et leur forme, à savoir, la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) et le coefficient de sédimentation $S^{\circ}_{20,w}$ des protéines natives et des protéines réduites et alkylées.

Pour confirmer les résultats obtenus par la mesure de la viscosité intrinsèque et du coefficient de sédimentation, nous avons déterminé la masse moléculaire à l'équilibre de sédimentation des deux protéides natifs et des protéides

modifiés.

Dans la première partie consacrée aux généralités, nous présenterons exclusivement l'état actuel de nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques étudiées.

Dans la deuxième partie réservée à nos travaux personnels, nous décrirons les différentes techniques utilisées, à savoir, la viscosimétrie, l'ultracentrifugation analytique ainsi que les résultats obtenus. Enfin, nous tirerons les conclusions concernant le nombre de chaînes de la partie protéique et la masse moléculaire des deux glycoprotéides.

GENERALITES

La sérotransferrine, isolée par SCHADE et CAROLINE (21) en 1946 du sérum humain où elle se trouve à la concentration de 2 g/l environ, a été relativement bien étudiée du point de vue de ses propriétés physico-chimiques. Par contre, la lactotransferrine est de découverte beaucoup plus récente. Elle a été isolée simultanément en 1960 par MONTREUIL et MULLET (22) et par JOHANSSON (23) du lait de femme où elle se trouve à la concentration de 1,5 g/l. Nos connaissances concernant les propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine sont donc très fragmentaires.

Ses propriétés physico-chimiques ont été décrites par MONTREUIL et MULLET (24), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (25) puis par BLANC et ISLIKER (26), (27). La composition détaillée en oses et en acides aminés de la lactotransferrine ainsi que la nature de l'acide aminé N-terminal, ont été précisées pour la première fois par MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (28).

Une première étude comparée des principales propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines a été effectuée par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (29), puis poursuivie par MONTREUIL, SPIK, MONSIGNY, DESCAMPS, BISERTE et DAUTREVAUX (30), SPIK et MONTREUIL (31), (32), (33) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (34) et reprise par SPIK (35) et (36)

1. - PROPRIETES PHYSIQUES

Les valeurs des coefficients de sédimentation, de diffusion et les valeurs du volume spécifique partiel de la lactotransferrine et de la sérotransferrine sont rassemblées dans le tableau I . p. 5

Les valeurs des coefficients de sédimentation varient de 4,9 à 5,4 S pour la STF et de 4,9 à 5,55 S pour la LTF. Certains auteurs ont trouvé des valeurs plus élevées jusqu'à 6,1 S. Nous pouvons dire cependant que des valeurs supérieures à 5,4 S sont probablement dues à une aggrégation provoquée par la nature du tampon (MANN et al. (37)).

Les valeurs des coefficients de diffusion de la STF varient de 5,3 à 5,75, tandis que les deux seules valeurs données pour la LTF sont de 4,6 à 5,6.

De nombreux auteurs sont d'accord pour attribuer un volume spécifique partiel de 0,725 ml/g à la STF, tandis que les valeurs de volume spécifique

TABLEAU I - Propriétés physiques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines

	STF						LTF				
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)
Constante de sédimentation											
S° ₂₀	5,35	-	-	5-5,3	4,8	-	-	4,8	-	-	-
S° _{20w}	5,3-5,4 5,35	5,1 5,9-5,16	4,92	-	-	5,32	5,25	-	5,55	5,25	4,93
Constante de diffusion	5,3-5,4-5,54-5,75	-	-	-	5,54	-	-	4,6	-	-	5,6
Volume spécifique partiel											
- calculé	0,722	-	-	-	0,723	0,725	0,725	-	0,735	-	-
- mesuré	-	-	-	-	0,725	-	-	-	0,732	-	0,716

- (a) BEZKOROVAINY, RAFELSON et LIKHTE (37) ; BEZKOROVAINY et RAFELSON (38) ; BEZKOROVAINY (39) ; BEZKOROVAINY et GROHLICH (40) ; BEZKOROVAINY, GROHLICH et GERBECK (41).
- (b) CHARLWOOD (42, 43, 44)
- (c) ROBERTS, MAKEY et SEAL (45).
- (d) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (46).
- (e) SPIK (47, 48), SPIK et MONTREUIL (49).
- (f) PALMOUR et SUTTON (50).
- (g) MANN, FISH, COX et TANFORD (51).
- (h) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (52).
- (i) SPIK (53, 54).
- (j) JOHANSSON (55).
- (k) QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (56).



partiel de la LTF sont moins nettes et varient de 0,716 à 0,735 ml/g.

La viscosité intrinsèque de l'apo-STF et de Fe-STF (tableau II p 7) sont de 4,0 à 4,1 ml/g en présence de solvants non dénaturants. Ces valeurs sont caractéristiques des protéines globulaires. Ces valeurs augmentent considérablement en milieu dénaturant : 14,7 ml/g pour la STF en tampon Gu.HCl 5,4 M (BEZKOROVAINY et GROHLICH (57)) et 17 ml/g en tampon Gu.HCl 6 M (MANN et al. (58)), ce qui prouve une dénaturation de la structure secondaire et tertiaire. Les valeurs maximales sont obtenues lorsque les protéines sont réduites par le mercapto-éthanol 0,1 M en présence de Gu.HCl 6 M. BERZKOROVAINY et GROHLICH (59) proposent une valeur de viscosité intrinsèque de 59,4 ml/g pour la STF, alors que la valeur donnée par MANN et al (60) est sensiblement plus faible 50,8 ml/g. Ces valeurs sont caractéristiques de protéines sous forme de pelote statistique (TANFORD (61)).

Aucune valeur n'a été donnée jusqu'à ce jour pour la lactotransferrine.

Les résultats concernant les valeurs de la masse moléculaire des deux glycoprotéines sont très nombreux. Ils sont rassemblés dans le tableau III page 8. On constate un grand désaccord entre les auteurs, en effet, les valeurs sont comprises entre 68 000 et 114 000 pour la sérotransferrine et entre 76 000 et 100 000 pour la lactotransferrine. Cependant, les valeurs les plus probables se situent autour de 75 000 et 80 000 pour les deux glycoprotéines.

2. - COMPOSITION ET STRUCTURE

Les renseignements concernant la structure primaire secondaire et tertiaire des deux glycoprotéines sont peu nombreux. Les seuls renseignements que nous possédons actuellement concernent la composition en acides aminés et en oses, la nature des acides aminés N et C terminaux et les modalités de l'attache glycanne-protéine.

A - FRACTION GLYCANNIQUE

D'après les travaux de SPIK (62,63) la lactotransferrine et la sérotransferrine humaines possèdent des compositions centésimales et molaires en monosaccharides différentes (tableau IV, p. 9).

B - FRACTION PROTEIQUE

1 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La lactotransferrine et la sérotransferrine humaines possèdent

TABLEAU II : Valeurs de la viscosité intrinsèque de la sérotransferrine humaine dans différents milieux.

Sérotransferrine	en ml/g		
	(a)	(b)	(c)
Native			
Apo protéide	4,2 (pH 7)	4,6 (pH 5) 4,4 (pH 7) 4,1 (pH 7)	4,0 (pH 6)
Ferri protéide	-	4,0	4,0
Native			
Urée 8 M	-	20,2	-
Gu.HCl 6 M	-	14,7	17
Réduite			
Urée 6 M (CM-STF)	-	57,1	-
Urée 8 M (CM-STF)	-	64,7	-
Gu.HCl 6 M + mercapto- éthanol 0,1 M	-	59,4	50,8

(a) SCHULTZE, GÖLLNER et coll (64)

(b) BEZKOROVAINY et RAFELSON (65) ; BEZKOROVAINY (66) ; BEZKOROVAINY et GROHLICH (67) ; BEZKOROVAINY, GROHLICH et GERBECK (68)

(c) MANN, FISH, COX et TANFORD (69).



TABLEAU III - Valeurs de la masse moléculaire de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines.

	STF						LTF				
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)
Constantes de sédimentation et de diffusion	91 000 82 000	-	73 800	90 000	77 600	-	-	95 000	-	-	-
Diffusion de la lumière	-	-	-	-	-	-	-	89 000	-	-	-
Equilibre de sédimentation	114 000	68 000	73 400	-	72 900	76 600	76 200	-	-	-	-
Chromatographie sur gel filtration	-	-	-	-	76 000	-	78 000	-	76 000	-	-
Electrophorèse en gel de polyacrylamide	-	-	-	-	-	-	81 000	-	-	76 800	-
Titration du fer	93 000	-	74 100	-	75 980	-	-	-	75 980	80 000	81 000
Viscosité intrinsèque et constante de sédimentation	-	-	-	-	-	79 300	-	-	-	-	-
Viscosité intrinsèque	96 000	-	-	-	-	78 300	-	-	-	-	-
Sédimentation en gradient de densité											

(a) BEZKOROVAINY, RAFELSON et LIKHITE (70) ; BEZKOROVAINY et RAFELSON (71) ; REZKOROVAINY (72) ; BEZKOROVAINY et GROHLICH (73).

(b) CHARLWOOD (74).

(c) ROBERTS, MAKEY et SEAL (75).

(d) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (76).

(e) SPIK (77) ; SPIK et MONTREUIL (78) ; SPIK (79).

(f) MANN, FISH, COX et TANFORD (80).

(g) PALMOUR et SUTTON (81).

(h) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (82).

(i) SPIK (83, 84).

(j) MASSON et HEREMANS (85) ; QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (86).



TABLEAU IV : Composition centésimale et molaire en mono-saccharides de la LTF et de la STF humaines

	LTF		STF	
	(a)	(b)	(c)	(d)
Composition centésimale				
Oses neutres	3,11		2,37	
Osamines	2,43		1,99	
Acides sialiques	1,22		1,40	
Composition molaire				
D-galactose	5	5	5	5
D-mannose	5	6	5	6
D-fucose	4	4	0	0
N-acétyl-D-glucosamine	10	8	8	8
Acide N-acétyl-D-neuraminique	3	3		

(a) SPIK (87 , 88)

(b) SPIK et MONTREUIL (89)

(c) SPIK (90 , 91)

(d) SPIK et MONTREUIL (92)



des compositions en acides aminés très voisines (MONTREUIL et al. (93), (94), SPIK (95) et QUERINJEAN et al. (96)). D'après le tableau V p.11 les principales différences portent sur la répartition en acides aminés basiques.

Le nombre de résidus d'acides aminés dans la partie protéique est variable suivant les auteurs : 795 résidus dans la sérotransferrine déterminés par BEZKOROVAINY et GROHLICH (97) d'après la viscosité intrinsèque en milieu Gu. HCl 6 M, mercaptoéthanol 0,1 M, et 674 d'après MANN et al. (98) dans les mêmes conditions. D'après la composition en acides aminés pour une masse de 76 000 daltons, les résultats de SPIK (99) nous donnent un nombre de résidus égal à 634, ceux de MANN et al. (100) 657 résidus pour une masse moléculaire de 76 600 et ceux de BEZKOROVAINY et al. (101) 700 résidus pour une masse moléculaire de 82 000. Ce dernier résultat tombe à 636 résidus si on ramène la masse moléculaire à 74 500.

En ce qui concerne la lactotransferrine et uniquement d'après la composition en acides aminés pour une masse de 76 700 daltons, MAZURIER et SPIK (102) trouvent un nombre de résidus d'acides aminés égal à 641 et QUERINJEAN et al. (103) 641 résidus d'acides aminés pour une masse de 76 400.

Donc, mis à part les résultats de BEZKOROVAINY et GROHLICH, la sérotransferrine et la lactotransferrine humaines semblent avoir une fraction protéique de dimensions similaires composée de 630 à 640 résidus d'acides aminés.

2 - ACIDES AMINES N ET C TERMINAUX

La nature et le nombre des acides aminés N- et C-terminaux sont très différents dans les deux protéines. Jusqu'à présent, un seul résidu de valine a été caractérisé en position N-terminale dans la transferrine sérique humaine, tandis que la lactotransferrine humaine ne possède pas d'acide aminé en position N-terminale.

Par hydrazinolyse, SPIK (104), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (105) CHARET (106) et CHARET, MONSIGNY, SPIK et MONTREUIL (107) ont identifié du glyco-colle, de la proline, de la cystéine et de la sérine en position C-terminale dans la transferrine sérique humaine et du glyco-colle et de la sérine dans la lactotransferrine humaine.

Ces résultats sont en faveur de l'existence de plusieurs chaînes polypeptidiques dans la transferrine sérique et la lactotransferrine humaines et rejoignent ainsi les conclusions de JEPPSON (108) qui dissocie la transferrine réduite et alkylée en urée 8 M en 2 sous unités de 39 000 et 42 000 de masse moléculaire.

Tableau - Composition molaire en acides aminés
de la STF et de la LTF humaines selon différents auteurs

Nature des acides aminés	LTF		STF		
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Asp	71	65	77	81	84
Thr	30	33	30	30	30
Ser	54	46	42	40	40
Glu	61	69	62	58	63
Pro	26	33	33	30	32
Gly	53	49	48	54	52
Ala	60	56	55	59	59
CysSH	26	26	30	32	36
Val	37	43	41	43	39
Met	6	5	5	4	9
Ile	14	16	15	14	15
Leu	54	54	58	57	64
Tyr	21	20	26	24	26
Phe	31	28	29	28	30
Try	8*	11	7	9	8
Lys	41	39	54	51	66
His	8	10	17	19	18
Arg	40	38	20	24	29
Total	641	641	634	657	700
Masse moléculaire	76 700	76 400	76 000	76 600	82 000

(a) MAZURIER et SPIK (résultats non publiés)

(b) QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (109)

(c) SPIK (110) ; MONTREUIL et al. (111) ; MONTREUIL et al. (112)

(d) MANN, FISH, COX et TANFORD (113)

(e) BEZKOROVAINY et al. (114)

*Le nombre de tryptophanes a été déterminé spectrophométriquement



laire et de GOT, GOUSSAULT et FONT (115) qui, eux aussi, en travaillant en milieu Urée 8 M dissocient par ultracentrifugation la lactotransferrine en deux constituants de 3,6 S et 1,7 S. de constante de sédimentation.

Cependant, ces conclusions sont très controversées et les adeptes de la monocaténarité de la chaîne peptidique sont nombreux : GREENE et FEENEY (116), BEZKOROVAINY et GROHLICH (117), MANN et coll (118), PALMOUR et SUTTON (119) pour la sérotransferrine humaine et QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (120) pour la lactotransferrine.

3. - CONCLUSIONS

Le bref historique de la lactotransferrine et de la sérotransferrine que nous venons de tracer montre que le problème de leur masse moléculaire et de leur structure sous-unitaire n'était pas du tout résolu au moment où nous avons entrepris notre travail.

De plus, de nombreux auteurs, QUERINJEAN et coll (121), FEENEY et ALLISON (122) et AISEN et LEIBMAN (123), supposant pour les deux glycoprotéines une masse moléculaire identique, un même nombre de glycannes et un même nombre d'atomes de fer fixés sur des sites identiques et bien qu'elles soient immunologiquement distinctes (MONTREUIL et al. (124) et BLANC et ISLIKER (125)), posent en hypothèse que la sérotransferrine et la lactotransferrine appartiennent à une même classe de protéine, et, dérivent d'une même protéine ancestrale.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

1. - REACTIFS

I - PREPARATION ET PURIFICATION DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE
(Gu.HCl)

Le chlorhydrate de guanidine utilisé (MM = 95,5) est préparé et purifié selon le procédé de TANFORD et NOSAKI (126) à partir du carbonate de guanidine (Gu_2CO_3 , MM = 182) commercial (EASTMAN ou BDH).

A - RECRISTALLISATION DU CARBONATE DE GUANIDINE

Le carbonate de guanidine est dissous dans un minimum d'eau distillée, stabilisé à + 4°C, puis recristallisé par addition d'éthanol absolu (stabilisé à + 4°C) jusqu'à une concentration d'environ 60 p 100 en éthanol.

Après un repos de 2 h à + 4°C les cristaux sont filtrés sur BUCHNER puis séchés à l'exsiccateur sous vide contre de l'anhydride phosphorique (P_2O_5).

B - PREPARATION DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

Les cristaux de carbonate de guanidine sont ensuite transformés en chlorhydrate par addition d'une solution d'HCl à 20 p 100 jusqu'à pH 4. La réaction se fait avec production de chaleur, accompagnée d'un fort dégagement de CO_2 . La solution s'éclaircit à partir de pH 7.

La solution est alors filtrée sur préfiltre de fibre de verre mil lipore pour éliminer les impuretés surnageantes, puis évaporée à l'évaporateur rotatif à 40°C jusqu'à ce que les cristaux commencent à se former. Après un repos à + 4°C pendant 2 h, les cristaux sont filtrés.

Les eaux-mères sont recristallisées plusieurs fois. La cristallisation arrêtée lors de l'apparition d'une coloration jaunâtre dans les eaux-mères.

Les cristaux sont rassemblés et séchés à l'exsiccateur sous vide contre P_2O_5 pendant 24 à 48 h.

C - PURIFICATION DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

Les cristaux sont recristallisés dans le méthanol ou l'éthanol absolu par dissolution des cristaux secs dans le méthanol à 60°C jusqu'à saturation, puis recristallisation fractionnée par évaporation à l'évaporateur rotatif.

Les cristaux ainsi obtenus sont séchés sous vide et sont prêts à l'utilisation.

Le rendement en chlorhydrate de guanidine à partir du carbonate est de l'ordre de 70 p 100.

II - PURIFICATION DE L'UREE

L'urée utilisée est un produit MERCK. Elle est recristallisée dans le méthanol et séchée sous vide.

III - RECRISTALLISATION DES AGENTS ALKYLANTS : ACIDE IODO-ACETIQUE, IODOACETAMIDE

Les agents alkylants sont recristallisés pour éliminer l'iode qui pourrait se fixer sur les noyaux aromatiques de certains acides aminés.

A - IODOACETAMIDE (MERCK)

Dans un bécher de 50 ml, 5 g d'iodoacétamide sont dissous à chaud dans 10 ml d'eau distillée. Le bécher est ensuite placé à + 4°C pendant 1 h. Le surnageant jaunâtre est alors éliminé et l'iodoacétamide est redissoute dans 10 ml d'eau distillée tiède, puis laissée à + 4°C pendant une nuit. Les cristaux blancs sont débarassés de l'eau surnageante et placés en exsiccateur sous vide contre P_2O_5 .

B - ACIDE IODOACETIQUE

30 g d'acide iodoacétique sont dissous dans 50 ml de benzène à 40°C. L'azéotrope benzène-iode est éliminé sous vide à l'évaporateur rotatif à 40°C.

L'opération est répétée jusqu'à ce que les cristaux obtenus soient blancs ; puis, les cristaux sont séchés sous vide jusqu'à élimination du benzène.

IV - REACTIF AU NITROPRUSSIATE

Le réactif spécifique des groupements SH libres, est constitué d'une solution à 1 p 100 de nitroprussiate dans l'ammoniaque 2 N.

La solution est préparée extemporanément en mélangeant volume à volume une solution de nitroprussiate à 2 p 100 dans l'eau et une solution d'ammoniaque 4 N.

V - AUTRES REACTIFS

Tous les autres réactifs sont des produits commerciaux purs pour analyses.

VI - PREPARATIONS DES PROTEIDES

A - SEROTRANSFERRINE HUMAINE

1 - SEROTRANSFERRINE NATIVE (STF)

La STF est préparée à partir de la fraction IV de COHN* selon le procédé de ROOP et PUTNAM (127). Elle renferme entre 0,2 et 0,5 µg de fer par mg de protéide.

2 - SEROTRANSFERRINE SATUREE EN FER (Fe-STF)

La Fe-STF contient 2 atomes de fer par molécule, soit 1,47 µg de fer par mg de protéide ; elle est préparée par addition d'une solution de FeCl₃ dans un tampon citrate de sodium-bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,6 à de la sérotransferrine native en solution dans le même tampon (SURGENOR et coll (128)).

3 - SEROTRANSFERRINE DESATUREE EN FER OU APOSEROTRANSFERRINE (Apo-STF)

L'apo-STF est préparée par abaissement du pH de la solution à 4, puis par dialyse contre une solution aqueuse d'EDTA à 1 p 100, ou fournie par la firme BEHRINGWERKE.

Dans les 2 cas, elle renferme moins de 0,02 µg de fer par mg de protéide.

B - LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

1 - LACTOTRANSFERRINE NATIVE (LTF)

La LTF, isolée par précipitation du lactosérum humain par le sulfate d'ammonium selon la méthode décrite par MONTREUIL et MULLET (129), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (130), modifiée par DESCAMPS (131), est purifiée sur colonne de carboxyméthyl-cellulose selon le procédé de DESCAMPS (132).

Le taux de fer de cette préparation varie de 0,25 à 0,50 µg de fer par mg de protéide.

*La fraction IV de COHN nous est aimablement fournie par le Centre de Transfusion Sanguine de Lille.

2 - LACTOTRANSFERRINE SATUREE EN FER (Fe-LTF)

La Fe-LTF contient 2 atomes de fer par molécule, soit 1,47 μ g de fer par mg de protéide, elle est préparée :

- soit, par saturation en fer de la lactotransferrine native, selon un procédé identique à celui de la sérotransferrine (SPIK (133)),

- soit, par passage du lactosérum saturé en fer sur colonne de SP-Séphadex suivant le protocole utilisé par CHERON (134) pour préparer la lactotransferrine bovine.

3 - LACTOTRANSFERRINE DESATUREE EN FER OU APOLACTOTRANSFERRINE (Apo-LTF)

Le procédé de désaturation de la lactotransferrine est différent de celui de la sérotransferrine, en effet, il faut abaisser le pH à 1,5 pour obtenir la lactotransferrine totalement désaturée en fer (MONTREUIL et al (135)). La solution est ensuite mise en dialyse une nuit contre de l'EDTA à 1 p 100 et trois jours contre de l'eau distillée.

Un autre procédé de désaturation en fer a également été utilisé : la lactotransferrine saturée ou native est mise pendant une heure en présence d'une solution de Gu.HCl 7 M, tamponnée par du Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5 et renfermant de l'EDTA 0,03 M. L'élimination des sels et des molécules de protéide dénaturé est réalisé par passage sur une colonne de Séphadex G₁₅₀ (LEGER (136)).

C - PREPARATION DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES

1 - REDUCTION DES PONTS DISULFURES

La réduction est effectuée à partir du procédé de CRESTFIELD, MOORE et STEIN (137) selon le protocole suivant :

1 g de protéide est dissout dans 50 ml de tampon Gu.HCl 6 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,03 M ajusté à pH 8,2 par HCl. La solution est filtrée et dégazée en même temps par passage sur filtre millipore dont les pores ont un diamètre de 0,45 μ .

Dans cette solution, de l'azote, préalablement débarrassé de son oxygène par passage dans une solution à 1 p 100 de pyrogallol, est mis à barboter et 2,3 ml de β -mercaptoéthanol correspondant à 32,5 μ moles sont ajoutés (100 fois en excès par rapport à la quantité de cystéine).

La réduction réalisée en atmosphère d'azote se poursuit pendant 3 h sous agitation et à l'abri de la lumière.

2 - ALKYLATION

Les groupements thiols ainsi formés sont stabilisés par alkylation avec un dérivé de l'acide acétique : l'iodoacétamide ou l'acide iodoacétique.

A la solution de lactotransferrine ou de sérotransferrine réduite en présence de mercaptoéthanol, on ajoute une quantité d'agent alkylant, iodoacétamide ou acide iodoacétique, 1,5 fois en excès par rapport à la quantité nécessaire pour neutraliser le mercaptoéthanol en excès, le mercaptoéthanol oxydé et les ponts disulfures réduits, soit 50 m moles d'agent alkylant (9,25 g).

L'addition est effectuée en une demi-heure environ. Le pH de la solution est maintenu constant à 8,2 par addition de NaOH 2 N quand l'agent alkylant est l'iodoacétamide et à 8,6 quand d'agent alkylant est l'acide iodoacétique.

La fin de l'alkylation est contrôlée par le test au nitroprussiate (réactif qui vire au rouge violacé en présence de groupements thiols libres).

Les transferrines S-carboxamidées ou S-carboxyméthylées sont dialysées 4 jours contre de l'eau distillée et lyophilisées.

Le pourcentage de modification des acides aminés et notamment la réduction de la cystine est déterminé à l'autoanalyseur d'acides aminés BECKMAN après une hydrolyse de 24 h par HCl 5,6 N redistillé.

2. - METHODES

I - DETERMINATION DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE

A - PRINCIPE

1 - Théorie et méthode de calcul

La viscosité des solutions de macromolécules dépend de la forme et des dimensions des molécules en solution.

En 1906, EINSTEIN a établi que dans le cas des particules sphériques impénétrables au solvant, on pouvait écrire :

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5 \phi)$$

η = viscosité de la solution

η_0 = viscosité du solvant

ϕ = fraction de volume occupée par la molécule.

SIMHA (138) a étendu la loi d'EINSTEIN aux particules ellipsoïdes de révolution

$$\eta = \eta_0 (1 + \nu \phi)$$

ν étant fonction du rapport $J = \frac{a}{b}$ des axes de l'ellipsoïde.

Les protéines globulaires étant assimilables à des ellipsoïdes de révolution.

Ne pouvant mesurer directement ϕ , on s'intéresse à la viscosité réduite dans laquelle intervient la concentration C (en mg/ml) de la macromolécule.

$$\text{viscosité réduite} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} = \eta_{sp}/C$$

η_{sp} = viscosité spécifique

L'extrapolation de la viscosité réduite à une concentration nulle fournit la viscosité intrinsèque $[\eta]$, indépendante de la concentration

$$\boxed{[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \quad (a)}$$

Expérimentalement, pour déterminer la viscosité intrinsèque d'une macromolécule en solution, on mesure une grandeur physique directement proportionnelle à la viscosité.

Dans un viscosimètre en U du type UBBELOHDE, le temps d'écoulement t d'un volume déterminé de solution est directement proportionnel à la viscosité de la solution, si la pression appliquée à l'une des extrémités est constante.

$$\eta = kt$$

La relation (a) devient :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{(t - t_0)}{(t_0 c)}$$

C = concentration en mg/ml

t = temps d'écoulement de la solution en secondes

t₀ = temps d'écoulement du solvant en secondes.

On trace $\frac{t-t_0}{t_0 c}$ en fonction de C et on extrapole à concentration nulle pour obtenir $[\eta]$ (voir fig. 1).

La viscosité intrinsèque est exprimée en ml/g.

2 - Applications : Détermination de la longueur de la chaîne polypeptidique à partir de la viscosité intrinsèque des protéines sous forme de pelote statistique

TANFORD et coll (139) ont montré que les protéines réduites en milieu Gu.HCl 6 M présentaient un comportement de polymères sous forme de pelote statistique.

Pour une pelote statistique dans un solvant thermodynamiquement idéal, on peut établir la relation

$$[\eta] = K n^{1/2}$$

n étant le nombre d'unités monomériques et K une constante qui dépend de la masse moléculaire M₀ de l'unité monomérique, de la longueur et des angles des liaisons de la chaîne, mais qui est indépendante, pour de longues chaînes, de la longueur de la chaîne.

Le paramètre K est une véritable constante pour toute une série d'homopolymères, mais il est uniquement approché pour des protéines sous forme de pelote statistique, dont la composition en acides aminés varie. La relation précédente devient alors :

$$[\eta] = K' n^\alpha$$

α étant généralement compris entre 0,5 et 0,8

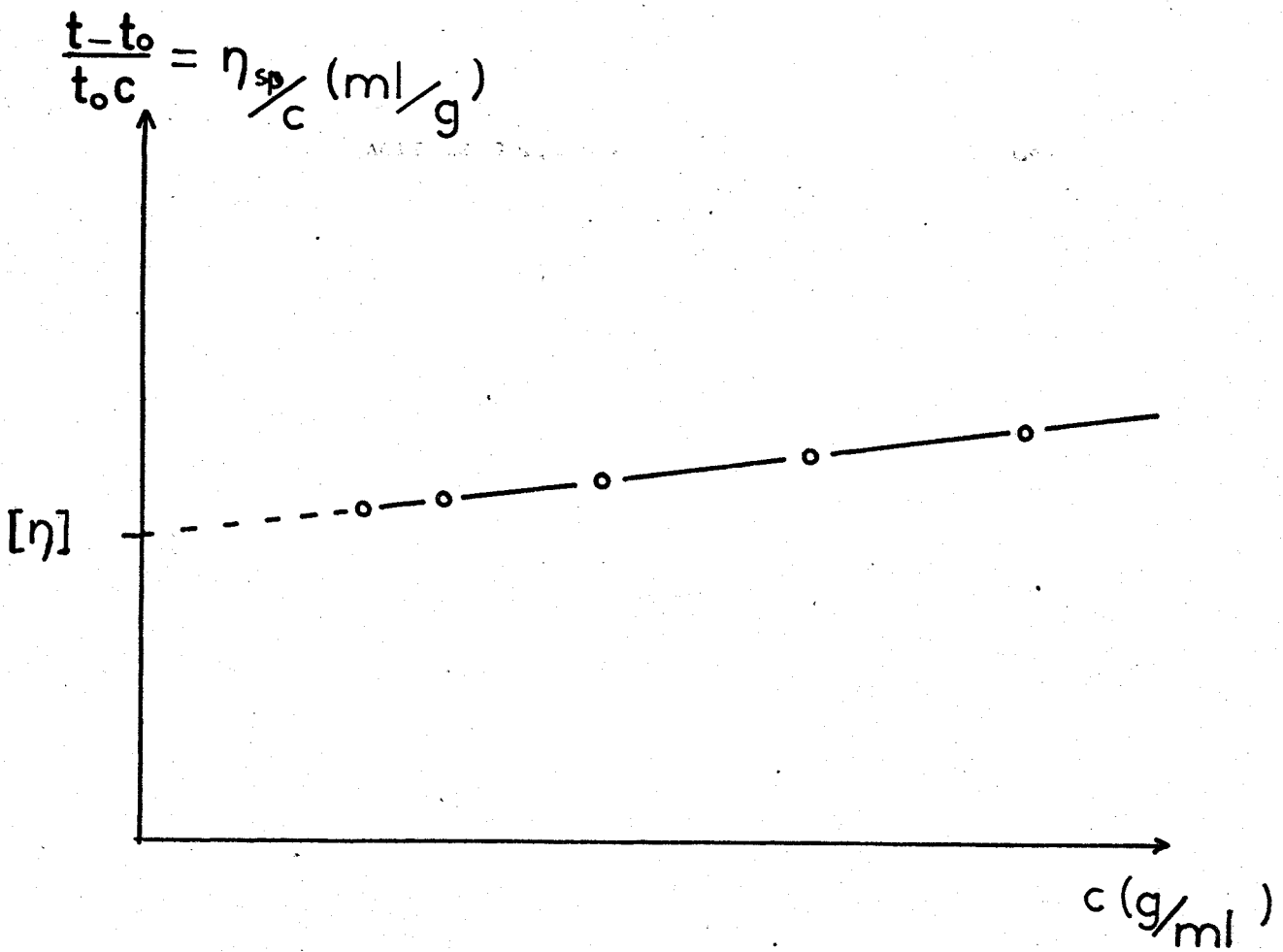


Figure 1 : Détermination de la viscosité intrinsèque selon la relation :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{t-t_0}{t_0 c} \right)$$

$$c \rightarrow 0$$



Expérimentalement, TANFORD et coll (140) ont mesuré la viscosité intrinsèque d'un certain nombre de protéines réduites, dans un solvant Gu.HCl 6 M, dont on connaît le nombre de résidus d'acides aminés. Ils ont tracé la courbe $\log [\eta]$ en fonction de $\log n$ (voir fig.2 p.23) et en ont déduit la relation suivante :

$$[\eta] = 0,716 n^{0,66}$$

Dans ces conditions, la mesure de viscosité intrinsèque d'une protéine, dont les ponts disulfures sont réduits, dans un tampon Gu.HCl 6 M, permet de déterminer le nombre de résidus d'acides aminés de la partie protéique si celle-ci est constituée d'une seule chaîne polypeptidique.

B - MODE OPERATOIRE

Les mesures de viscosité sont effectuées dans un viscosimètre du type UBBELOHDE (section du capillaire : 0,4 mm, longueur du capillaire : 10 cm, capacité du viscosimètre : 10 ml environ) à température constante dans un bain thermostaté à 25°C avec une précision de 0,02°C. La pression est maintenue constante pendant toute la durée de la manipulation.

Pour déterminer la viscosité intrinsèque de chaque protéide, une gamme de concentration a été effectuée à partir d'une solution mère préparée de la manière suivante :

Une quantité déterminée avec précision du protéide à étudier est dissoute dans 30 à 35 ml du solvant de référence, puis complétée à 50 ml dans une fiole jaugée, de manière à connaître la concentration exacte C_0 de cette solution mère. La teneur en eau de l'échantillon de protéide lyophilisé est déterminée par extrait sec dans une étuve sous vide, à 50°C, contre de l'anhydride phosphorique, pendant 48 h.

Les dilutions sont ensuite réalisées comme il est indiqué dans le tableau VI p. 24 .

Le solvant et la solution sont préalablement dépoussiérés par passage sur des filtres Millipore dont le diamètre des pores est de 0,45 μ .

La pression et la température sont stabilisées 1 à 2 h avant la manipulation.

Le viscosimètre est rempli successivement par le solvant de référence, puis, par les solutions de concentration croissante (après avoir été

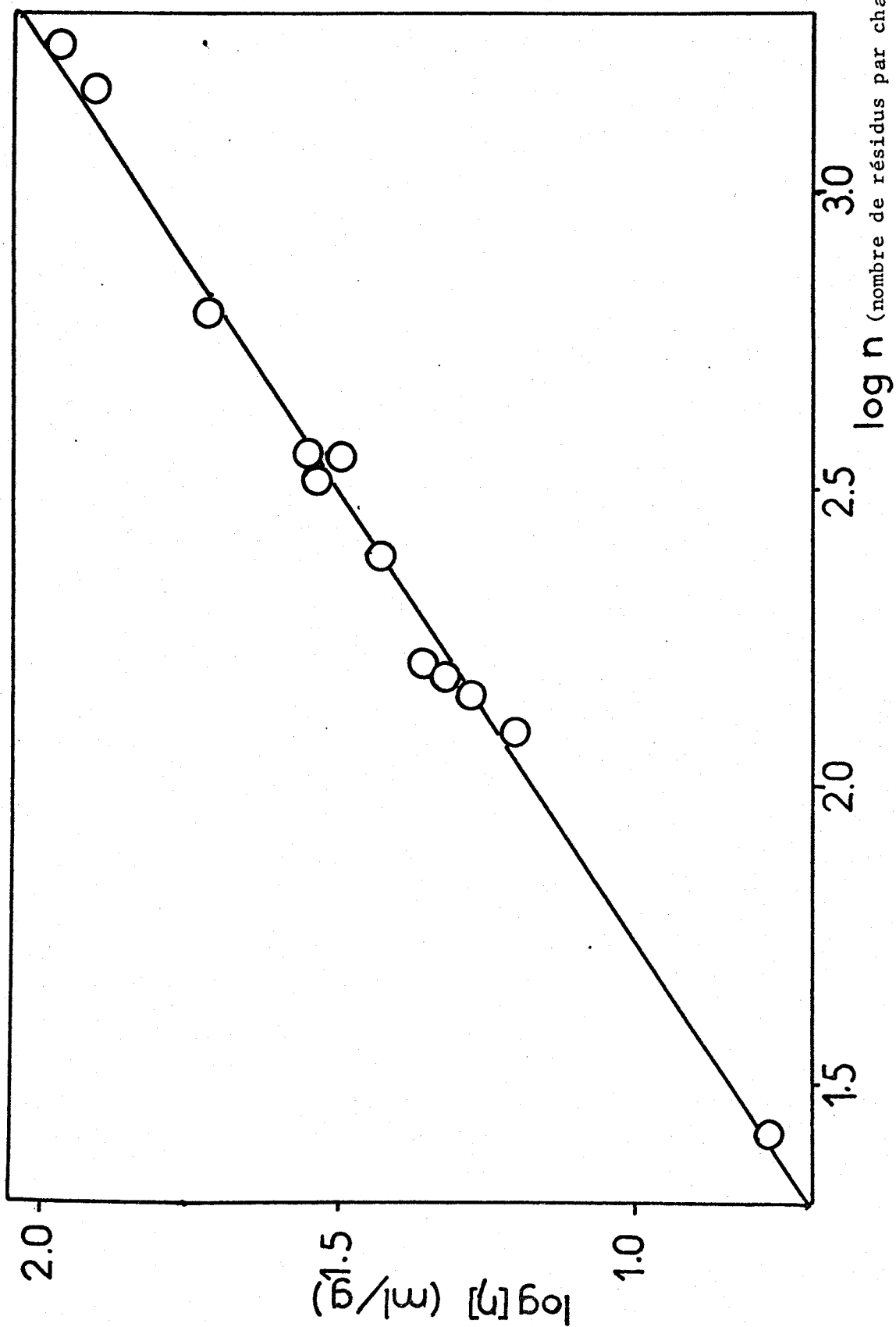


Figure 2 : Viscosité intrinsèque en fonction de la longueur de la chaîne. Valeurs en Gu.HCl 6 M, mercaptoéthanol 0,1 M d'après TANFORD et coll (140).

La droite représente l'équation $[\eta] = 0,716 n^{0,66}$

TABLEAU VI: Constitution de la gamme de concentrations pour l'étude de la viscosité intrinsèque.

	C/4	C/3	C/2	3C/4	C _o
Solvant	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml	0 ml
C _o	0 ml	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
3C/4	5 ml	0 ml	0 ml	-5 ml	0 ml
Volume total	15 ml	15 ml	20 ml	15 ml	20 ml



rincé préalablement à chaque fois par la solution à étudier) et le temps d'écoulement de chaque solution est déterminé de manière statistique, chaque mesure étant reproduite au moins six fois (les variations de temps ne devant pas dépasser 0,1 seconde pour chaque mesure).

II - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTATION

A - PRINCIPE

Lorsqu'une molécule se trouve en suspension dans une phase liquide, la force de gravité qui a tendance à la faire sédimenter se trouve contrecarrée par les forces d'agitation thermique correspondant au mouvement Brownien. La sédimentation spontanée n'est donc pas une valeur mesurable.

L'ultracentrifugation introduit une accélération artificielle linéaire γ (liée à la vitesse angulaire ω et à la distance r de la particule à l'axe de rotation selon la relation

$$\gamma = \omega^2 r$$

Si γ est suffisamment élevé, la particule sédimente selon une vitesse liée à sa forme et à sa masse moléculaire.

1 - Théorie

Soit m_a = masse apparente de la molécule

m_o = masse de la particule sèche

$$m_a = m_o - m_o \bar{v} \rho$$

ou \bar{v} = volume spécifique partiel de la molécule

ρ = densité du solvant

$m_o \bar{v} \rho$ est la masse de solvant déplacé due à la poussée d'Archimède.

$$m_a = m_o (1 - \bar{v} \rho)$$

Quand le rotor tourne, la particule est soumise à une force centrifuge F

$$F = m \omega^2 r = m_o (1 - \bar{v} \rho) \omega^2 r \quad (1)$$

r étant la distance de la molécule à l'axe de rotation.

Cette force F tend à déplacer la molécule vers l'extérieur, celle-ci va être freinée par les molécules de solvant, et à cette force F va s'opposer une force de frottement F'

$$F' = f \frac{dr}{dt}$$

où f est le coefficient de friction
et $\frac{dr}{dt}$ la vitesse de déplacement de la molécule.

Lorsque l'état d'équilibre est atteint, on obtient :

$$m_0 (1 - \bar{v}\rho) \omega^2 r = f \frac{dr}{dt} \quad (2)$$

SVEDBERG (142) a défini un coefficient de sédimentation qui est la vitesse de la molécule dans le champ unité :

$$S = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega r} \quad (3)$$

on a pris pour unité le SVEDBERG

$$1S = 10^{-13} \text{ sec.}$$

L'équation (2) devient alors :

$$S = \frac{m_0 (1 - \bar{v}\rho)}{f} \quad (4)$$

Le coefficient de friction f peut s'exprimer en fonction du coefficient de diffusion D .

$$f = \frac{kT}{D} \quad k \text{ étant la constante de Boltzmann}$$

R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

En multipliant en haut et en bas (4) par le nombre d'Avogadro N , il vient

$$S = \frac{M (1 - \bar{v}\rho)}{Nf}$$

$$\text{or, } Nf = \frac{NkT}{D} = \frac{RT}{D}$$

$$\text{car } Nk = R$$

d'où on obtient l'équation de SVEDBERG

$$M = \frac{RT}{1 - \bar{v}\rho} \cdot \frac{S}{D} \quad (5)$$

2 - Méthode de calcul

Lorsque des macromolécules en solution sédimentent, elles laissent au-dessus d'elles du solvant pur créant une frontière entre le solvant pur et la solution. La méthode optique "Schlieren" traduit cette différence de concentration par un pic et permet de suivre la sédimentation des macromolécules en fonction du temps.

Le calcul de la constante de sédimentation est habituellement fondé sur la vitesse du déplacement du maximum de la courbe du gradient de concentration. Lorsqu'une telle courbe est symétrique, la position de ce maximum (ou "sommet") est celle du point de la cellule où la concentration du soluté est égale à la moitié de la concentration qui existe alors dans la zone du plateau à l'instant considéré (voir fig. 3 p. 28).

Un système optique approprié permet d'obtenir sur une plaque photo la courbe $\frac{dn}{dr} = f(r)$ (n étant l'indice de refraction)

Or, $\frac{dn}{dr}$ est proportionnel à $\frac{dc}{dr}$ pour les faibles concentrations.

La définition de la constante de sédimentation apparente à la concentration C est :

$$(Sc)_{app} = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$$

w est obtenu à partir de la vitesse de centrifugation en tours par minute (t.p.m)

$$w = \frac{2\pi \cdot (tpm)}{60}$$

$$\frac{dr}{r} = (Sc)_{app} \cdot \omega^2 \cdot dt$$

$$\text{Log } |r| = (Sc)_{app} \cdot \omega^2 \cdot t + \text{Cste}$$

$$\text{Log } \bar{r} - \text{Log } r_0 = (Sc)_{app} \cdot \omega^2 t - (Sc)_{app} \cdot \omega^2 t_0$$

$$2,303 (\log \bar{r} - \log r_0) = \omega^2 (Sc)_{app} (t - t_0)$$

La valeur de la constante de sédimentation est obtenue à partir de la pente α de la courbe $\log r$ en fonction du temps t (voir fig. 4 p. 29)

$$\text{tg} \alpha = \frac{\Delta \log r}{\Delta t}$$

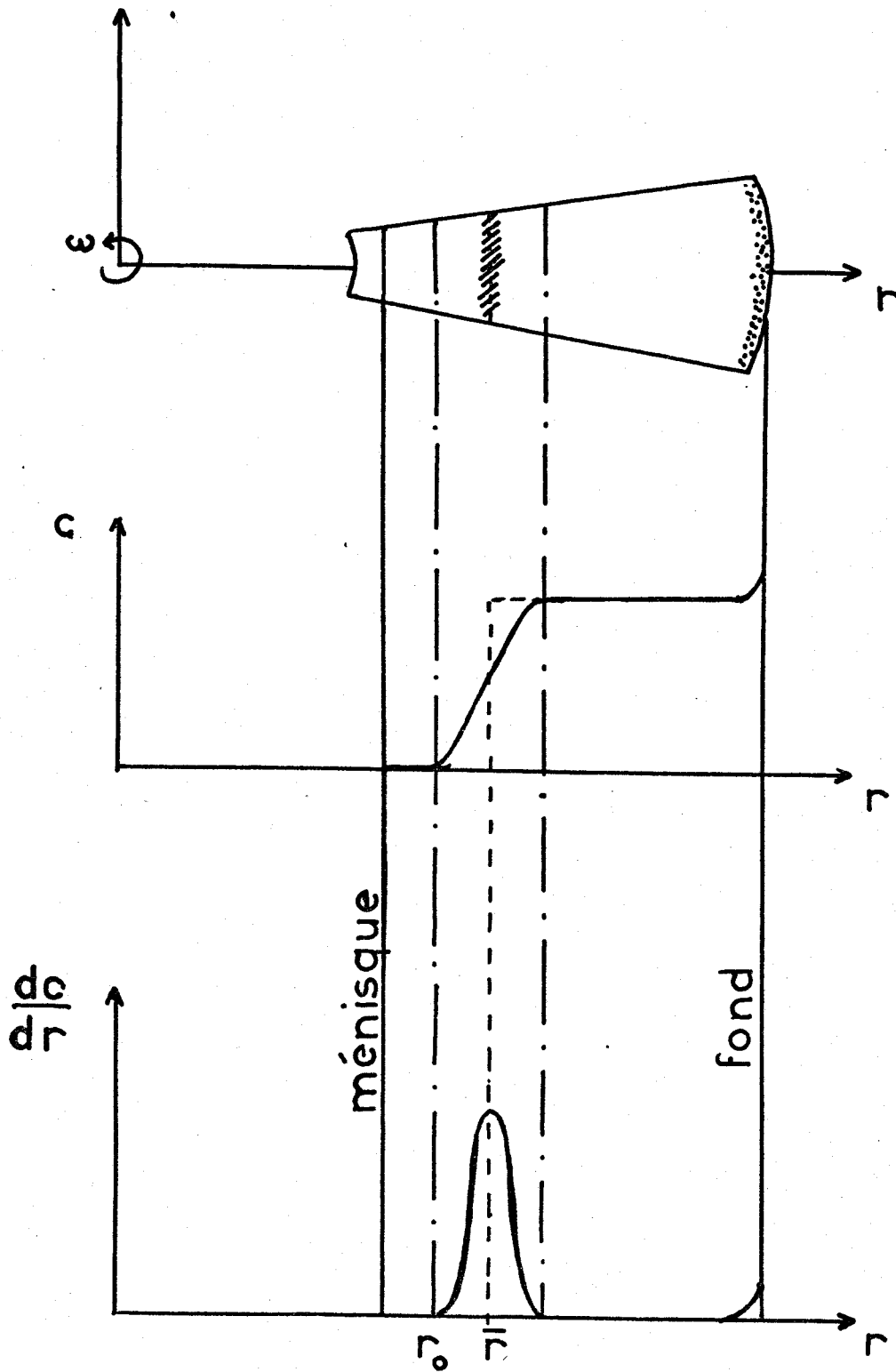


Figure 3 : Distribution de la masse pendant la sédimentation dans une cellule à simple secteur (d'après TRAUTMAN et SCHUMAKER (143)).

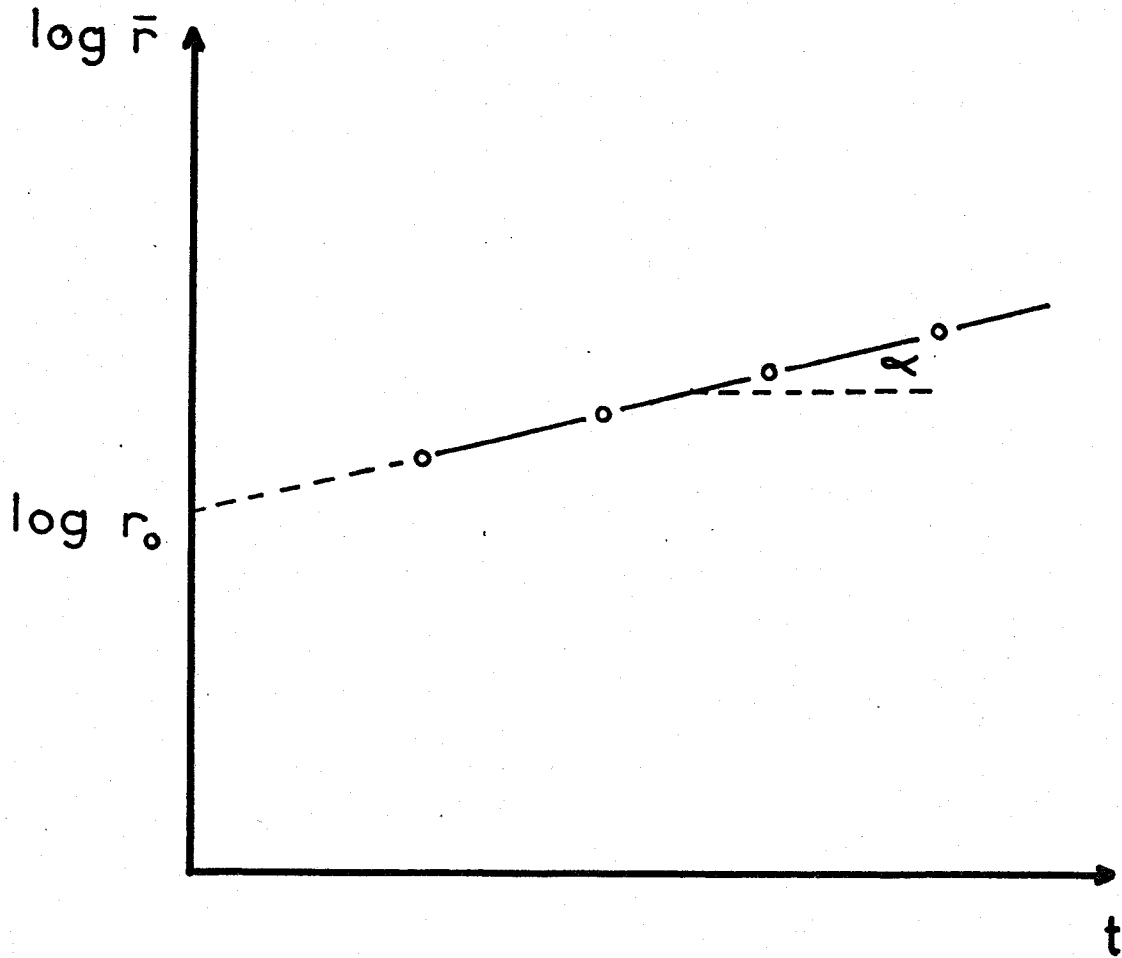


Figure 4 : Variation de la frontière solvant-solution en fonction du temps au cours de la sédimentation.



$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{(\operatorname{Sc})_{\text{app.}} \omega^2}{2,303}$$

$$(\operatorname{Sc})_{\text{app.}} = \frac{2,303 \cdot \operatorname{tg} \alpha}{\omega^2}$$

3 - Conversion aux conditions standard

La vitesse de sédimentation d'une macromolécule dépend non seulement de sa taille mais aussi de la viscosité et de la densité du milieu solvant.

Pour obtenir des valeurs comparables, il faut convenir de conditions standard qui sont habituellement : une centrifugation effectuée à 20°C dans de l'eau. La valeur de S ainsi déterminée est appelée $S_{20,w}$.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer la sédimentation dans ces conditions mais on peut rapporter une valeur de S_T, Sol à la valeur de $S_{20,w}$ par l'équation : (GEHATIA et KATCHALSKI (144))

$$(S_{20,w})_c = (S_T, \text{Sol})_c \cdot \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{T,\text{Sol}}}{\eta_{T,w}} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_p)_{20,w}}{(1 - \bar{v}_p)_{T,\text{Sol}}}$$

où $(S_{20,w})_c$ = Coefficient de sédimentation aux conditions standard (20°C et dans l'eau) et à la concentration C.

$(S_T, \text{Sol})_c$ = Coefficient de sédimentation dans les conditions de l'expérience (température T°C, solvant Sol, concentration C).

$\eta_{T,w}$ = Viscosité de l'eau à la température T°C.

$\eta_{20,w}$ = Viscosité de l'eau à 20°C.

$\eta_{T,\text{Sol}}$ = Viscosité du solvant à la température T°C.

$\bar{v}_{20,w}$ = Volume spécifique partiel de la solution à 20°C et dans l'eau.

$\bar{v}_{T,\text{sv}}$ = Volume spécifique partiel du soluté à la température T°C et dans le solvant.

$\rho_{20,w}$ = Densité de l'eau à 20°C.

$\rho_{T,\text{Sol}}$ = Densité du solvant à la température T°C

Le premier terme $\frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}}$ corrige la variation de la viscosité de l'eau en fonction de la température.

Le second terme $\frac{\eta_{T, \text{Sol}}}{\eta_{T, w}}$ corrige la variation de la viscosité du solvant en fonction de la viscosité de l'eau à la même température.

Le terme $\frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20, w}}{(1 - \bar{v}\rho)_{T, \text{Sol}}}$ apporte une correction due à la poussée d'Archimède.

Les valeurs de viscosité et de densité du tampon nécessaires pour la correction aux conditions standard $(S_{20, w})_c$ ont été calculées à partir des valeurs données dans les tables : méthodes de l'ultracentrifugation analytique HANS-GEORG ELIAS --Edition diffusée par BECKMAN.

Toutes les mesures ayant été effectuées à 20°C, l'équation précédente devient :

$$(S_{20, w})_c = (S_{T, \text{Sol}})_c \cdot \frac{\eta_{20, \text{Sol}}}{\eta_{20, w}} \cdot \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20, w}}{(1 - \bar{v}\rho)_{20, \text{Sol}}}$$

et $\frac{\eta_{20, \text{Sol}}}{\eta_{20, w}}$ représente la viscosité relative du solvant par rapport à l'eau à 20°C.

4 - Extrapolation à la concentration nulle

De manière générale, les coefficients de sédimentation varient avec la concentration du soluté ; il convient donc de toujours les extrapoler vers la concentration nulle.

Le coefficient de sédimentation à concentration nulle (S_0) est déterminé en mesurant le coefficient de sédimentation à plusieurs concentrations (S_c) et conformément à l'équation suivante :

$$\frac{1}{S_c} = \frac{1}{S_0} (1 + k_s c)$$

(où c est la concentration de la macromolécule en g/ml et k_s est une constante qui dépend de la masse moléculaire du soluté). On trace la courbe $\frac{1}{S_{20, w}}$ en fonction de la concentration et on extrapole à $c = 0$.

B - APPLICATIONS

1 - Détermination de la longueur de la chaîne polypeptidique à partir du coefficient de sédimentation $S^{\circ}_{20, \text{Sol}}$ des protéines sous forme de pelote statistique

TANFORD et coll (145) ont montré que les protéines réduites et alkylées, en milieu Gu.HCl 6 M, se trouvaient sous forme de pelote statistique. Cependant, les valeurs des S° , contrairement aux valeurs de viscosité intrinsèque, ne varient pas d'une manière aussi systématique avec la longueur de la chaîne peptidique. Ceci est dû au fait que la vitesse de sédimentation dépend autant du volume spécifique partiel de la protéine et d'une interaction préférentielle avec les composés du solvant, que de la longueur de la chaîne peptidique, dans un système à plusieurs composants

$$S^\circ = \frac{M (1 - \phi' \rho)}{Nf}$$

où M est la masse moléculaire de la protéine sèche

f le coefficient de friction de la particule solvatée

ρ la densité du solvant

N le nombre d'Avogadro

et ϕ' le volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le solvant

La quantité qui va varier systématiquement avec la masse moléculaire ou la longueur de la chaîne est le terme $\frac{S^\circ}{(1 - \phi' \rho)}$

Pour les pelotes statistiques, la dépendance prévue théoriquement, du coefficient de friction f au nombre n de résidus d'acides aminés varie comme le terme $n^{1/2}$

On obtient donc $S^\circ / (1 - \phi' \rho)$ proportionnel à $n^{(0,50 - x)}$ pour les pelotes statistiques. D'après la valeur expérimentale du coefficient a ($a = 0,66$) dans l'équation $[\eta] = K'n^a$, la valeur appropriée de x est 0,05 ; le terme $S^\circ / (1 - \phi' \rho)$ variera donc en fonction de $n^{0,45}$.

TANFORD et coll (146) ont tracé la courbe $\log S^\circ / (1 - \phi' \rho)$ en fonction de $\log n$ (fig 5 p. 33) pour un certain nombre de protéines sous forme de pelote statistique ; ils en ont déduit la relation suivante :

$$\frac{S^\circ}{(1 - \phi' \rho)} = 0,286 n^{0,473}$$

Dans ces conditions, l'extrapolation à concentration nulle des coefficients de sédimentation des protéines réduites et alkylées, mesurés en milieu Gu.HCl 6 M, permet de déterminer le nombre de résidus d'acides aminés si la protéine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique.

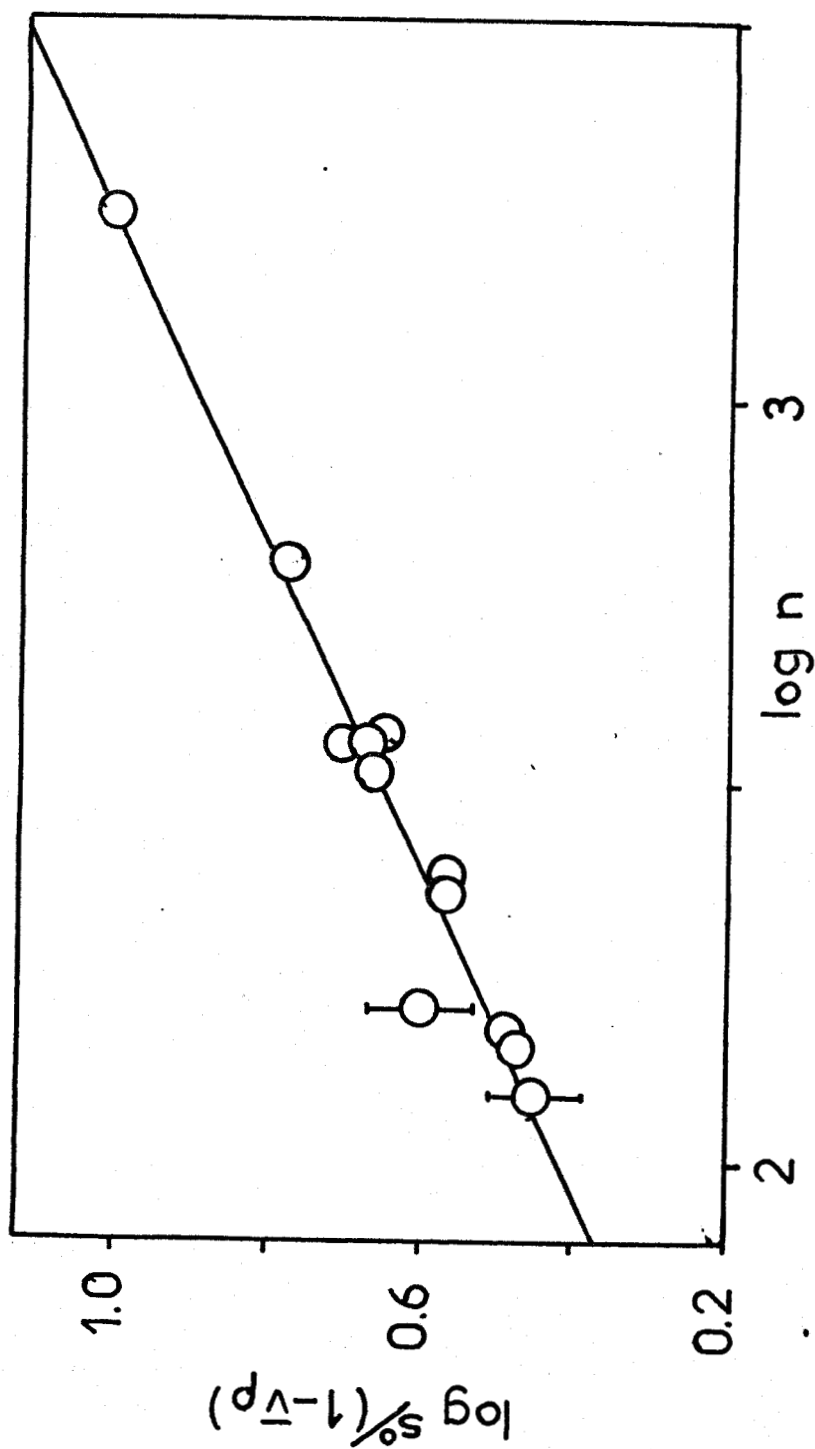


Figure 5 : Coefficients de sédimentation mesurés en Gu.HCl 6 M, mercapto-éthanol 0,1 M en fonction de la longueur de la chaîne polypeptidique d'après TANFORD et coll (147) .

La droite représente l'équation $S^{\circ} / (1 - \bar{v}^{\circ} \rho) = 0,286 n^{0,473}$



2 - Détermination de la masse moléculaire par combinaison du coefficient de sédimentation $S^{\circ}_{20,w}$ et de la viscosité intrinsèque $[\eta]$

Cette méthode exige que la forme des macromolécules réponde à certains modèles très particuliers. La masse moléculaire de protéines de forme d'ellipsoïde de révolution aplati, est donnée par l'équation de SCHERAGA et MANDELKERN (148)

$$M^{2/3} = \frac{N \cdot S^{\circ} \cdot [\eta]^{1/3} \cdot \eta_0}{\beta(1 - \bar{v}\rho)}$$

$$N = 6,023 \cdot 10^{23}$$

S° est le coefficient de sédimentation extrapolé à concentration nulle et ramené aux conditions standard (20°C, eau), exprimé en sec.

$[\eta]$ est la viscosité intrinsèque exprimée en dl/g

η_0 est la viscosité du solvant exprimée en poises

β est un coefficient qui dépend de la forme et du rapport des axes de l'ellipsoïde ; la valeur la plus couramment utilisée pour les protéines globulaires compactes est $2,12 \cdot 10^6$

\bar{v} est le volume spécifique partiel de la protéine exprimé en ml/g

ρ la densité du solvant exprimée en g/ml.

C - MODE OPERATOIRE

L'ultracentrifugation a été réalisée dans une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN modèle E équipée du système optique "Schlieren".

Les sédimentations ont été effectuées à 20°C après stabilisation du rotor à 20°C. Le contrôle de la température, tout au long des expériences, a été effectué par le moyen du R.T.I.C. (rotor-temperature-indicating and control unit) préalablement étalonné.

Les coefficients de sédimentation ont été mesurés dans des cellules de 12 mm d'épaisseur, en aluminium à simple secteur ou en épon à simple ou à double secteur, à fenêtres en saphir.

La vitesse de centrifugation est de 56 000 t.p.m (tours par minute). Lorsque la vitesse de régime est atteinte, les photographies sont prises toutes les 8 ou 16 mn.

L'angle d'inclinaison de l'analyseur schlieren est choisi de

manière à obtenir un pic avec des contours nets et fins et une hauteur maximale. Pour une concentration de 10 à 6 mg/ml, l'angle est de 70°, de 6 à 4 mg/ml, 65 à 60° et de 4 à 1 mg/ml, 50 à 40°.

Après développement des plaques photographiques "KODAK", les mesures sont effectuées avec un lecteur de profil bidimensionnel "NIKON" permettant une précision de 0,001 mm.

III - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION

A - PRINCIPE

La méthode de centrifugation à l'équilibre de sédimentation étudie la distribution de la concentration des molécules à leur position d'équilibre. A l'équilibre de sédimentation le flux des molécules dû à la sédimentation est égal au flux des molécules dû à la diffusion.

1 - Théorie

La sédimentation provoque le déplacement du soluté dans une direction donnée (J_{sed}), à ce déplacement s'oppose la diffusion (J_{diff}) qui tend à rétablir une distribution uniforme des particules. Ainsi, le flux total J_i par unité de temps est composé de deux termes, soit :

$$J_i = J_{sed} + J_{diff}$$

or, $J_{sed} = C\gamma$

La vitesse moléculaire γ , est proportionnelle à l'intensité du champ de force $\omega^2 r$.

Le coefficient de sédimentation S est un facteur de proportionnalité.

d'où, finalement $J_{sed} = S C \omega^2 r$

ω est la vitesse angulaire et est donnée par

$$\omega = \frac{2 \pi (t.p.m)}{60} \text{ radian/sec.}$$

Le flux J_{diff} , dû à la diffusion est donné par la relation suivante :

$$J_{diff} = -D \frac{dc}{dr}$$

D étant le coefficient de diffusion.

A l'équilibre $J_i = 0$ d'où $J_{sed} = -J_{diff}$

$$d'où S \omega^2 r = D \frac{dc}{dr}$$

$$et \frac{S}{D} = \frac{1}{\omega^2 r} \cdot \frac{dc/dr}{cr}$$

or, d'après SVEDBERG, $S = \frac{MD(1 - \bar{v}\rho)}{RT}$ (voir p. 26).

On peut en déduire la relation suivante :

$$M = \frac{RT}{1 - \bar{v}\rho} \cdot \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{dc/dr}{cr}$$

2 - Méthode de calcul

Lorsqu'on emploie le système optique interférentiel de Rayleigh, on utilise la relation

$$M = \frac{2 RT}{(1 - \phi'\rho)} \cdot \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{d \text{Log } c}{dr^2}$$

où M est la masse moléculaire de la protéine

$R = 8,313 \cdot 10^7$, est la constante des gaz parfaits

$T = 273 + \theta$

θ = température de l'expérience en °C

ϕ' = volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le solvant

ρ = densité du solvant

c = concentration de la solution

r = distance à l'axe de rotation.

Pour mesurer M, on est alors amené à tracer le logarithme népérien de la concentration Log C, en fonction du carré r^2 des distances à l'axe de rotation. La masse moléculaire apparente, M_{app} , est alors donnée par la pente de la courbe.

On mesure par cette méthode la différence de concentration entre le fond de la cellule et le ménisque, ainsi que les distances à l'axe de rotation de ces deux points.

Pour le dépouillement des clichés interférentiels, on utilise un microcomparateur (projecteur de profil). La plaque photographique (fig. 6 p. 38) est alignée de manière à ce que la ligne de référence de la cellule contre-poids (bord centripète) soit parallèle au fil vertical du réticule. On mesure

alors les distances d , de 0,01 cm en 0,01 cm, à partir de la ligne de référence du ménisque jusqu'au fond de la cellule et on mesure pour chaque distance, h , la hauteur du déplacement de la frange, exprimée en μ .

On trace la courbe h en fonction de d (fig. 7 p. 39). Cette courbe tracée, on détermine la ligne de base "0", correspondant au solvant seul, en relevant de 0,01 en 0,01 cm les mesures correspondantes de la ligne de base. On fait ensuite la différence $h - 0$ qui représente Δh

$$\log \Delta h = 2,3 \log \Delta h$$

Ensuite, il faut calculer la valeur réelle de r

$$r = 5,62 + d$$

5,62 représentant la distance de l'axe du rotor à la ligne de référence du réticule et d , la distance mesurée sur le projecteur de profil "NIKON" ; or, d , au "NIKON" subit un facteur grossissant f . La valeur de f est donnée par le constructeur.

$$\text{Donc, dans la cellule on a } d' = \frac{d}{f} \text{ et } r = d' + 5,62$$

Une fois r déterminé, on calcule chacune des valeurs :

$$r_1 = (d' + 0,01 + 5,62) \text{ et } r_2 = (d' + 0,02 + 5,62)$$

que l'on élève au carré : r_1^2 , r_2^2 , etc.

Enfin, on trace la courbe $\log \Delta h$ en fonction de r^2 (fig. 8 p. 40) : $\log \Delta h$ représentant $\log C$, la pente de la droite correspond à

$$\text{tg} \alpha = \frac{d \log C}{dr^2}$$

La masse moléculaire apparente est alors calculée de la manière suivante :

$$M_{\text{app.}} = \frac{2 RT}{(1 - \phi' \rho) \omega^2} \cdot 2,3 \text{ tg} \alpha$$

La valeur obtenue est une masse moléculaire moyenne en poids

M_w .

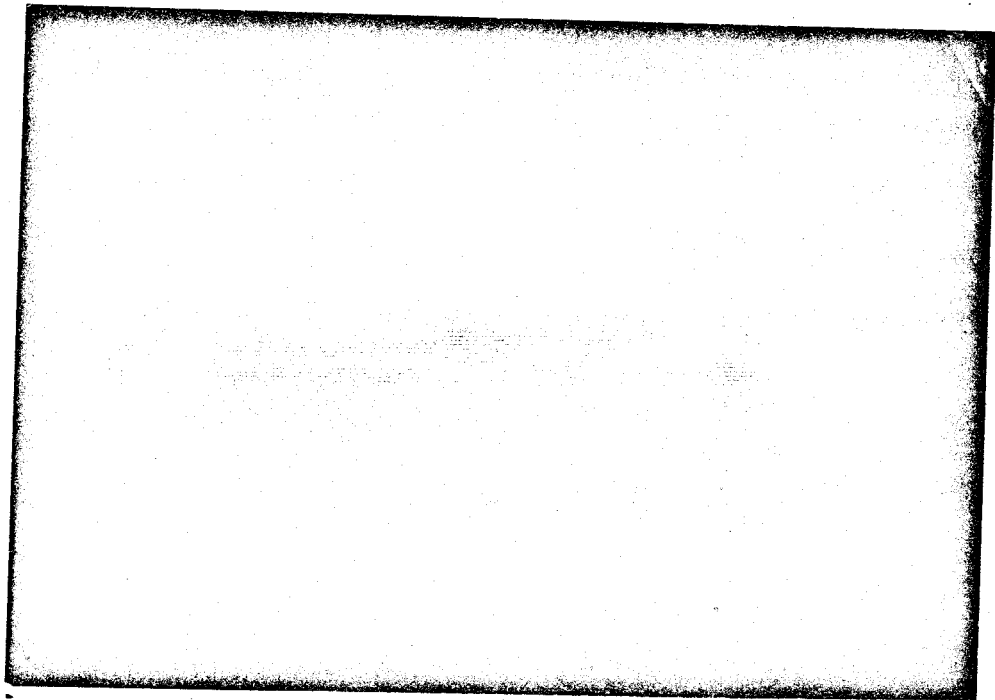


Figure 6 : Equilibre de sédimentation de la STF native en Tris-HCl 0,1M
pH 7,5, à 20° et à 17 000 t.p.m. ; concentration : 0,33 mg/ml (système
interférentiel, cliché pris 20 h après le début de la centrifugation).



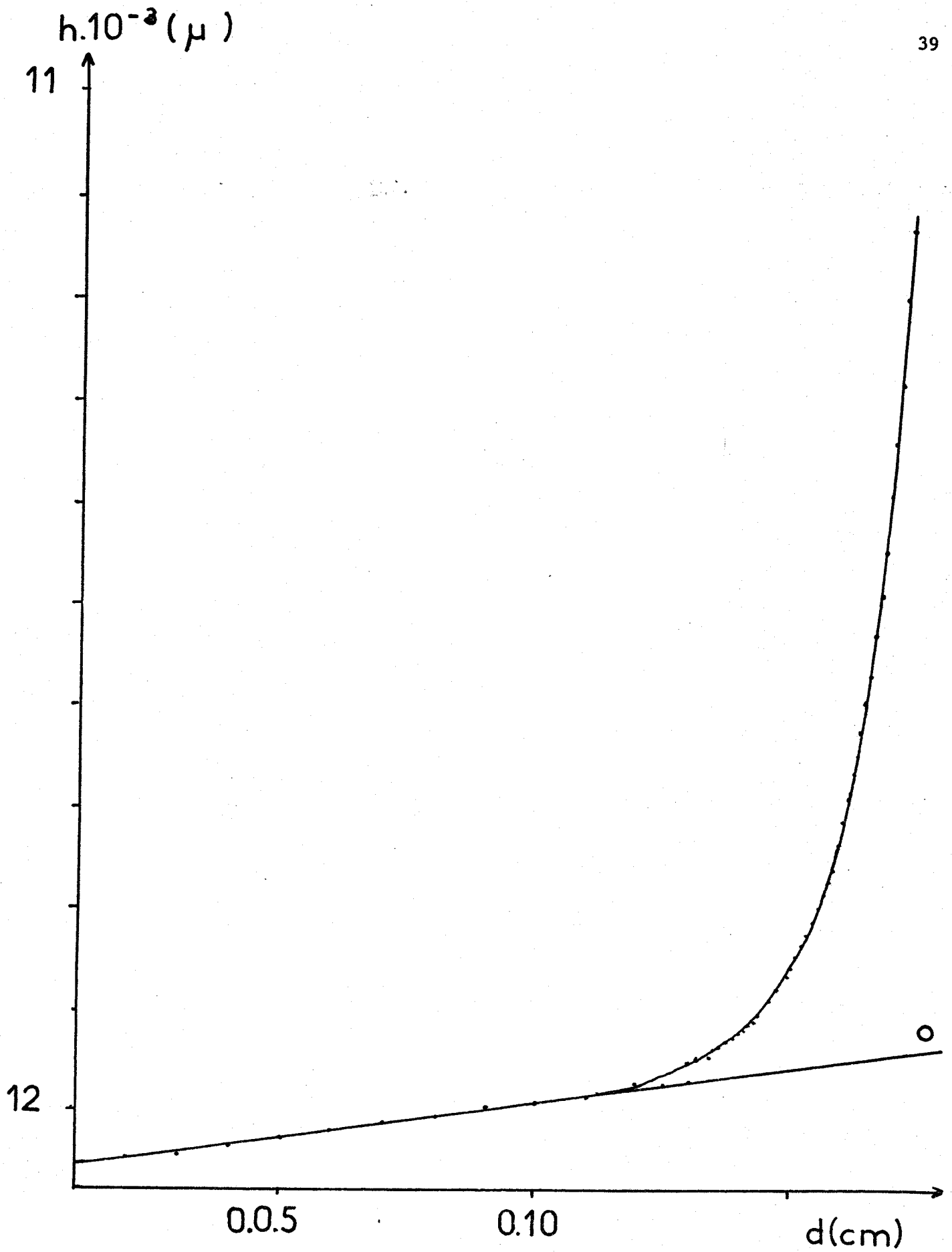


Figure 7 : Variation de la hauteur du déplacement de la frange h , en fonction de la distance au ménisque d (équilibre de sédimentation de la STF, en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à 17 000 t.p.m., à la concentration de 0,33 mg/ml).



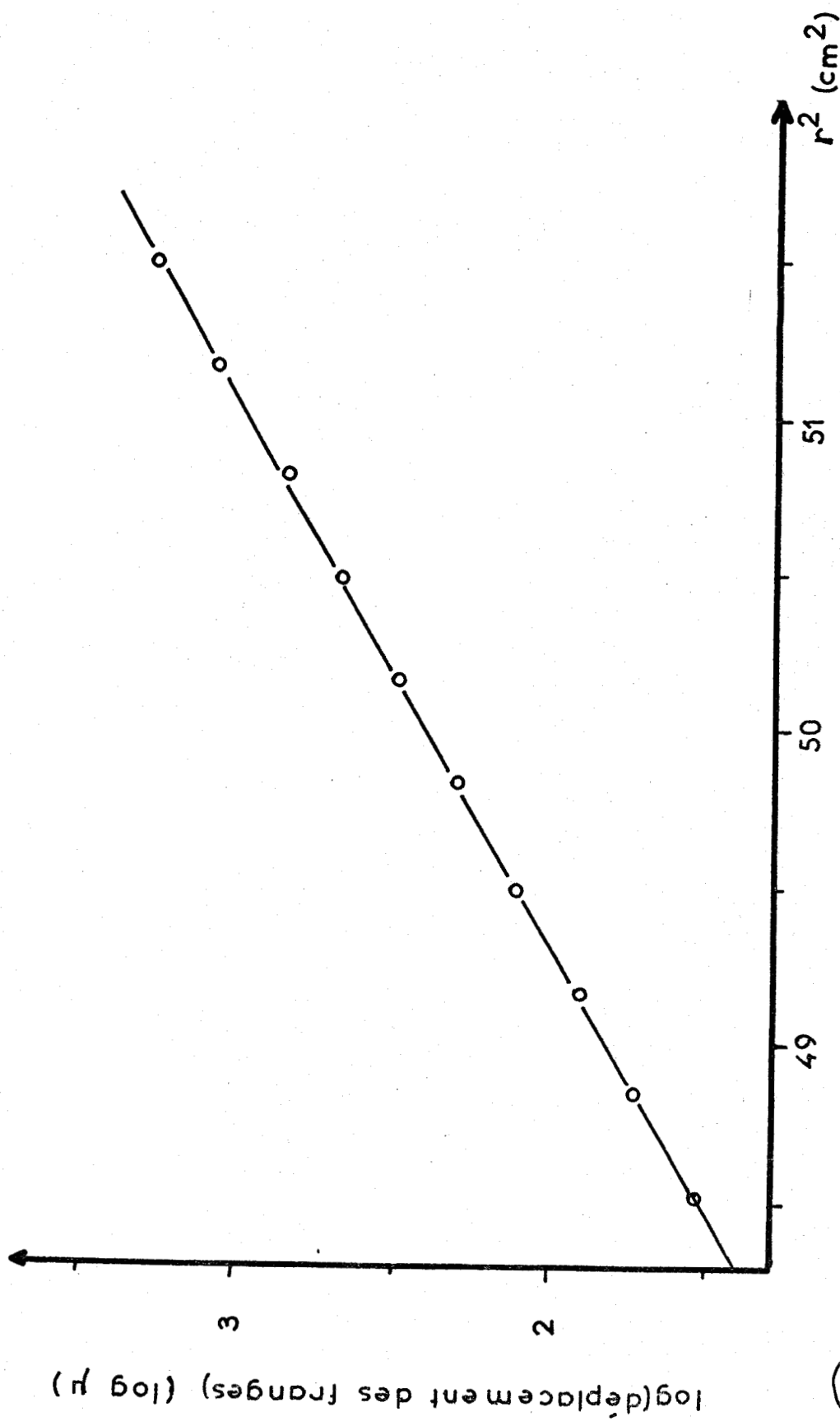


Figure 8 : Equilibre de sédimentation de la sérotransferrine native en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à 20° et à 1700 t.p.m. ; concentration 0,33 mg/ml, $\text{tg}\alpha = 0,58$, $M = 75\,500$



B - MODE OPERATOIRE

Les équilibres de sédimentation ont été réalisés dans une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN, modèle E équipée du système optique interférentiel de Rayleigh en utilisant la méthode d'YPHANTIS (149) modifiée par CHERVENKA (150).

Les expériences ont été effectuées à 20°C, la température du rotor étant réglée par le système "R.T.I.C." (voir p. 34).

Le rotor utilisé est en titane, référence An-H.

Les cellules utilisées sont à double secteur, dont la paroi commune, striée d'un sillon capillaire, permet le dépôt du solvant sur la solution dès l'accélération du rotor. Elles ont une épaisseur de 12 mm et sont en épon, les fenêtres sont en saphir.

Le système optique utilisé pour évaluer la variation de concentration le long de la colonne de liquide est le système interférentiel de Rayleigh, qui comporte un système de fentes parallèles asymétriques.

Les vitesses de centrifugations sont de l'ordre de 16 000 à 22 000 t.p.m et sont calculées selon l'équation suivante (CHERVENKA (151)) :

$$\text{t.p.m} = 1,4 \cdot 10^5 (T/M (1 - \bar{v}\rho))^{1/2}$$

où T est la température absolue et M la masse de la protéine.

L'application de la méthode d'YPHANTIS implique la certitude que la concentration au ménisque soit nulle, cette condition est réalisée par la méthode de CHERVENKA, qui utilise des cellules à double secteur à capillaire pour déposer sur la solution une colonne de solvant. Cette méthode a été choisie en raison des équilibres à effectuer en présence de Gu.HCl. En effet, pour obtenir de bons résultats, il est indispensable que les niveaux dans les secteurs "solvant" et "solution" soient rigoureusement égaux ; cette condition, difficilement réalisable par simple mesure des volumes, est plus facilement obtenue dans ces conditions par équilibre des pressions hydrostatiques. De plus, cette méthode permet de réduire notablement les temps pour atteindre l'équilibre qui sont ainsi deux fois plus courts que ceux qui sont nécessaires dans la méthode originale, ainsi que les vitesses du rotor qui sont les 2/3 de celles utilisées dans la méthode d'YPHANTIS.

Le rotor est tout d'abord accéléré jusqu'à la vitesse de 4000 t.p.m et l'on attend que les niveaux soient les mêmes dans les deux secteurs, avant de poursuivre l'accélération. Ceci a pour but d'éviter une redistribution différente du tampon dans les deux secteurs. Un cliché est pris dès la vitesse de régime atteinte, puis une série de photos sont prises une fois l'équilibre atteint. Le temps nécessaire à l'équilibre a été vérifié supérieur à 12 h, et c'est toujours un temps supérieur à celui-ci qui a été choisi pour toutes les opérations.

RESULTATS

1. - DETERMINATION DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE DE LA
SEROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les différentes mesures de viscosité ont été effectuées de manière à déterminer le rôle du fer et l'influence de la composition du tampon sur la conformation des deux protéides.

Elles ont été effectuées, en outre, de manière à préciser :

- la stabilité relative des deux protéides vis-à-vis de deux agents dénaturants (Urée, Gu.HCl)
- et un certain nombre de paramètres tels que :
 - . le nombre de résidus d'acides aminés de la partie protéique ;
 - . le nombre de chaînes polypeptidiques et la masse moléculaire de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines.

I - VISCOSITE DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU NON DENATURANT

A - MATERIEL

L'apo-STF utilisée est fournie par la firme BERHINGWERKE.

La Fe-LTF utilisée est préparée selon le protocole décrit par CHERON pour préparer la lactotransferrine bovine (p.17).

Les mesures sont effectuées dans les tampons suivants :

- Citrate de sodium 0,1 M , bicarbonate de sodium 0,1 M, ajusté à pH 8,6 (Ci/Bi 0,1 M, pH 8,6)
- Tris-(Hydroxyméthyl)-aminométhane 0,1 M, ajusté à pH 7,5 par HCl (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5).

La concentration en protéides est de l'ordre de 1,5 à 2 p. 100.

Les temps d'écoulement pour le solvant sont de l'ordre de 100 à 120 secondes.

Chaque expérience a été répétée au moins deux fois et les résultats sont donnés avec une précision de ± 4 %.

B - RESULTATS

Les résultats obtenus dans ces conditions sont rassemblés dans le tableau VIIp. 46, et sont illustrés par les figures 9, 10, 11 p.47,48,49.

La viscosité intrinsèque de l'apo-STF ainsi déterminée est de 4,1 ml/g, celle de la Fe-STF est de 4,0 ml/g et celle de la STF native est de 4,05 ml/g. Compte-tenu de la précision des résultats $\pm 0,15$ ml/g, on peut considérer que le fer n'induit pas de changement de conformation dans la métalloglycoprotéine décelable par mesure de la viscosité.

Les valeurs mesurées avec la lactotransferrine sont du même ordre de grandeur que celles de la sérotransferrine : 4,0 ml/g pour la Fe-LTF.

Ces valeurs sont caractéristiques des protéines globulaires. Cependant, les valeurs obtenues avec l'apo-LTF sont beaucoup plus élevées. Dans ce cas, l'augmentation relativement importante de la viscosité intrinsèque passant de 4,0 à 4,65 ml/g, pourrait être due à une dénaturation de la structure tertiaire provoquée par les conditions de la désaturation en fer plutôt que la conséquence d'un remaniement de cette structure tertiaire dû au départ du fer.

En effet, il faut abaisser le pH de la solution à 1,5 pour "décrocher" totalement le fer lié à la glycoprotéine et il semble bien que dans ces conditions la dénaturation soit irréversible.

Un résultat confirme cette hypothèse, la viscosité intrinsèque d'une apo-LTF désaturée en milieu chlorhydrate de guanidine est de 4,3 ml/g ; cette valeur est beaucoup plus proche de la valeur de la Fe-LTF, cependant, la renaturation de la structure tertiaire du protéide par élimination de Gu.CH1 n'est pas totale.

C - DISCUSSION

Nos résultats concernant la sérotransferrine humaine confirment les valeurs citées dans la littérature : 4,0 à 4,1 ml/g (Tableau II p. 7). Les auteurs ne trouvent pas non plus de différence de viscosité entre l'apo et le ferriprotéide.

Aucune valeur n'a été citée dans la littérature à propos de la viscosité intrinsèque de la lactotransferrine humaine.

Des valeurs beaucoup plus élevées : 4,55 à 4,75 ml/g ont été signalées dans notre D.E.A. (152) pour la LTF et la Fe-LTF. Ces valeurs élevées pour un protéide globulaire semblent dues à une dénaturation, due au fait que la préparation du protéide s'étalait sur un temps assez long. Les valeurs déterminées ici, l'ont été sur une nouvelle préparation rapide de lactotransferrine (cf. § 2 p. 17).

TABLEAU VII Viscosité intrinsèque de la sérotransferrine
et de la lactotransferrine en milieu non dé-
naturent.

Protéides	Tampons	ml/g
Apo-STF	Ci/Bi 0,1 M pH 8,6	4,1 \pm 0,15
STF	Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	4,05 \pm 0,15
Fe-STF	Ci/Bi 0,1 M pH 8,6	4,0 \pm 0,15
Fe-LTF	Ci/Bi 0,1 M pH 8,6	4,0 \pm 0,15
Fe-LTF	Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	4,0 \pm 0,15
Apo-LTF (a)	Ci/Bi 0,1 M pH 8,6	4,65 \pm 0,2
Apo-LTF (b)	Ci/Bi 0,1 M pH 8,6	4,3 \pm 0,2

(a) Le fer a été éliminé à pH 1,5 (cf. § 3 p. 17).

(b) Le fer a été éliminé en présence d'EDTA et Gu.HCl 7 M
(cf. § 3 p. 17)



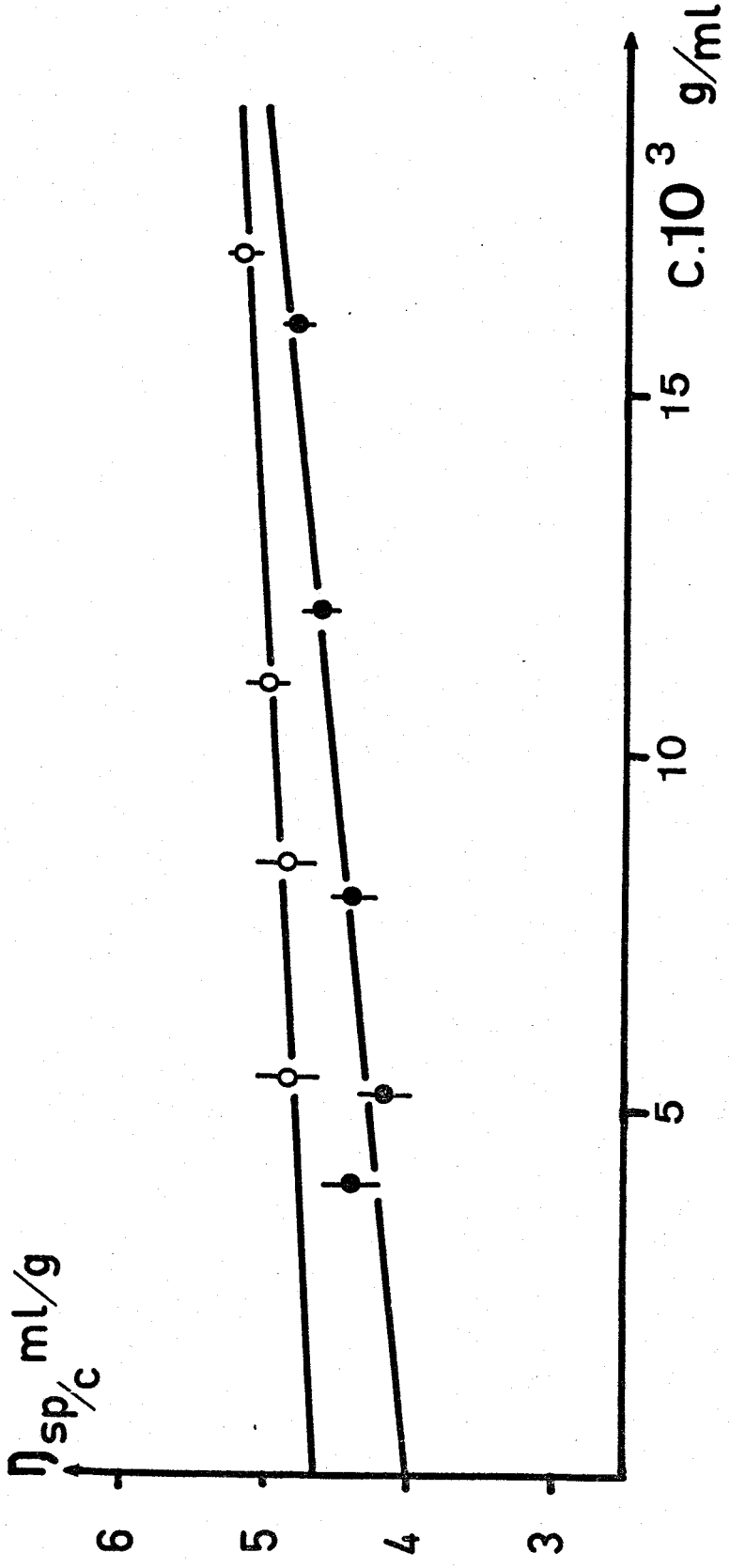


Figure 9 : Mesures de viscosité de la lactotransferrine saturée.

(O) Fe-LTF (ancienne preparation), Cl/BI, 0,1 M, pH 8,6

(●) Fe-LTF (nouvelle preparation), Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5



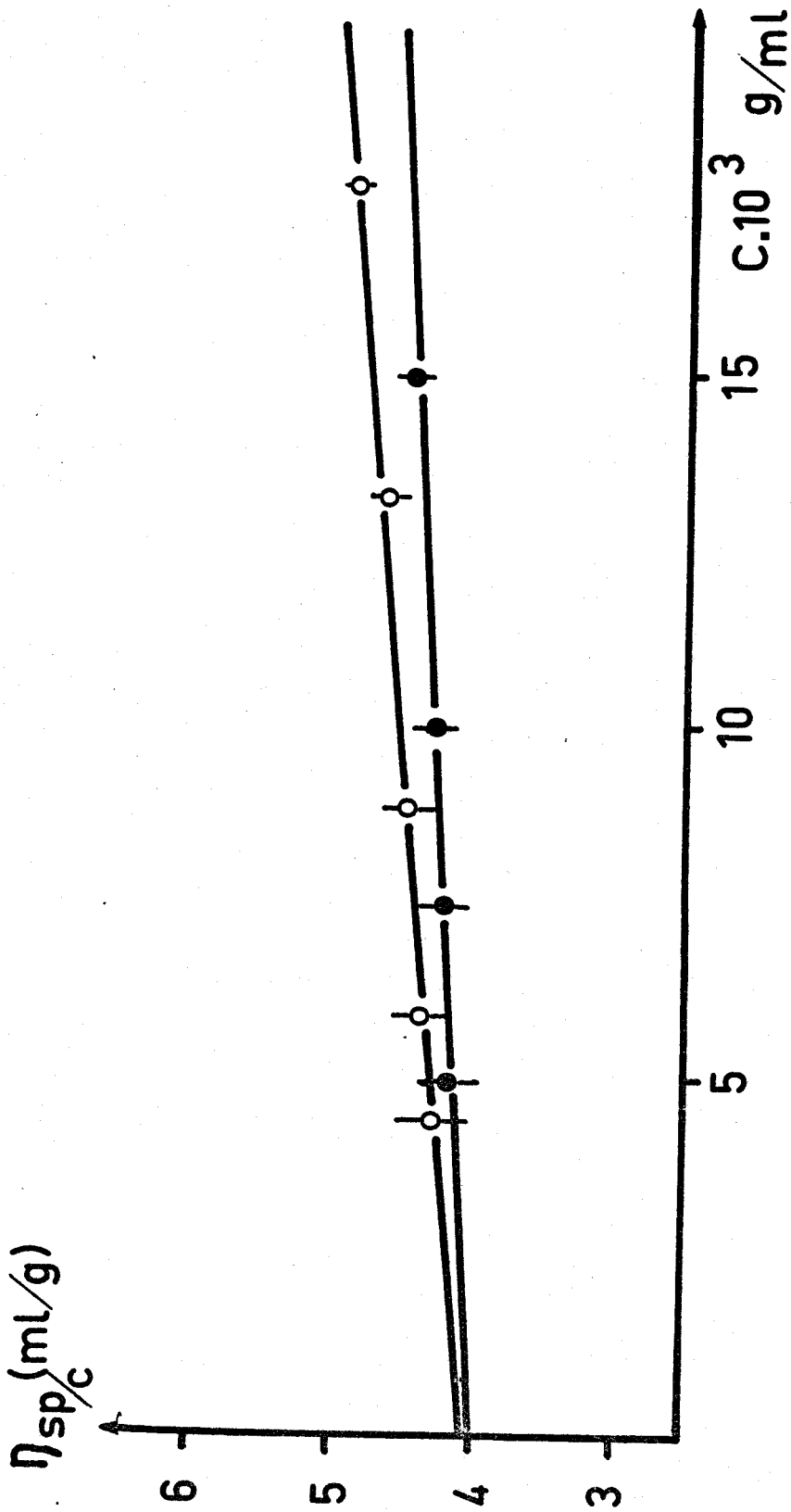


Figure 10 : Mesures de viscosité de la sérotransferrine

(●) Fe-STF, Ci/Bi, 0,1 M, pH 8,6

(○) STF native, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5



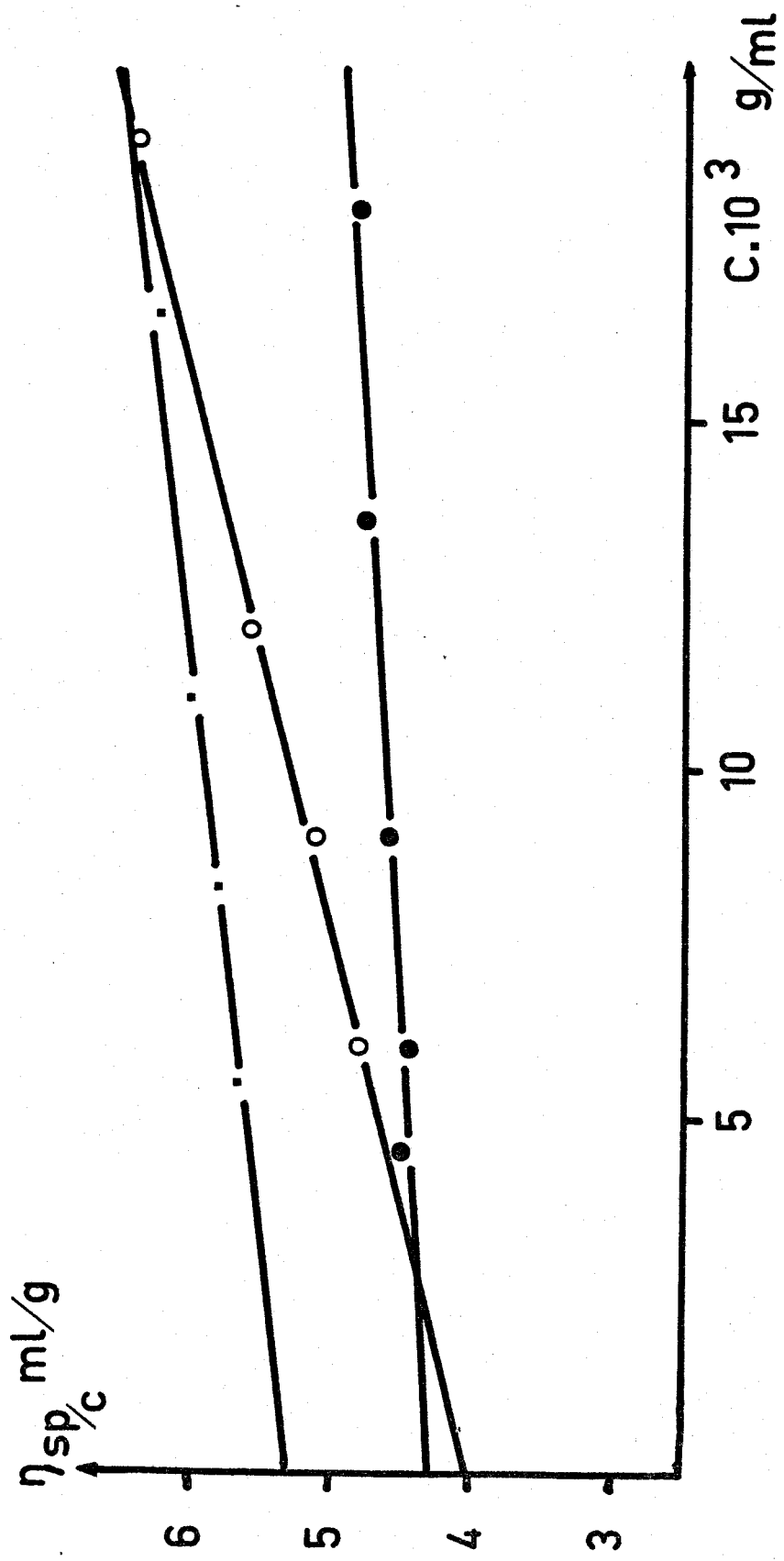


Figure 11 : Mesures de viscosité des apotransferrines

- (○) Apo-STF, Ci/Bi 0,1 M, pH 8,6
- (●) Apo-LTF (Gu.HCl), Ci/Bi 0,1 M, pH 8,6
- (- -) Apo-LTF (pH 1,5), Ci/Bi 0,1 M, pH 8,6



II - VISCOSITE DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU DENATURANT

A - MATERIEL

De manière à préciser la stabilité relative de la sérotransferrine et de la lactotransferrine vis-à-vis des agents dénaturants, ainsi que la stabilité des complexes fer-protéides par rapport à la forme native (ou peu saturée), nous avons effectué les mesures de viscosité dans les solvants suivants :

- Urée 8 M dans le tampon Tris-HCl 0,1 M ajusté à pH 8,0
- Chlorhydrate de guanidine 6 M et 8 M dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0.

La concentration en protéides de chaque solution-mère est de l'ordre de 0,8 à 1 p. 100.

Les solutions de protéides sont préparées 4 h avant la manipulation.

Les temps d'écoulement pour le solvant sont de 180 secondes environ.

Les résultats sont donnés avec une précision de ± 4 %.

B - RESULTATS

1 - Mesure de la viscosité intrinsèque en urée 8 M

Les résultats obtenus (fig. 12 p. 53) sont rassemblés dans le tableau VIII, p. 52.

Les complexes fer-protéides semblent plus stables en présence d'urée 8 M que les apo-protéides. Une viscosité intrinsèque égale à 19 ml/g a été déterminée pour la lactotransferrine native et 10 ml/g pour la lactotransferrine saturée ; dans le cas de la sérotransferrine, la différence est moins marquée, $[\eta] = 12$ ml/g pour la sérotransferrine native et $[\eta] = 10$ ml/g pour la sérotransferrine native.

2 - Mesure de la viscosité intrinsèque en Gu.HCl 6 M et 8 M

Les résultats obtenus (fig. 13 p. 54) sont rassemblés dans le tableau VIII, p. 52.

D'après ces résultats :

- La lactotransferrine ($[\eta] = 26 \text{ ml/g}$) est dénaturée plus rapidement que la sérotransferrine ($[\eta] = 15,3 \text{ ml/g}$) en milieu $\text{Gu.HCl } 6 \text{ M}$; il semble y avoir peu de différences, compte-tenu de l'erreur expérimentale $\pm 0,7 \text{ ml/g}$ entre les concentrations 6 M et 8 M en Gu.HCl , la viscosité intrinsèque de la lactotransferrine passe de 26 à 28 ml/g .

- L'action de $\text{Gu.HCl } 6 \text{ M}$ semble ne pas être totale sur la sérotransferrine native, en effet, la valeur de la viscosité intrinsèque augmente notablement en milieu $\text{Gu.HCl } 8 \text{ M}$ et passe de $15,3$ à 22 ml/g .

- A partir d'une concentration 6 M en Gu.HCl , la présence du fer n'influe plus sur la dénaturation ; en effet, les valeurs sont sensiblement identiques pour la sérotransferrine native $15,3 \text{ ml/g}$ et saturée, $16,2 \text{ ml/g}$ (compte-tenu de l'erreur de $\pm 0,5 \text{ ml/g}$).

C - DISCUSSION

La viscosité intrinsèque est proportionnelle à la fraction de volume occupée par le protéide ; en présence d'agents dénaturants comme l'urée ou le Gu.HCl à fortes concentrations, toutes les liaisons sont rompues à l'exception des liaisons covalentes telles que les ponts disulfures ; la fraction de volume occupée par la molécule va donc augmenter en fonction de la dénaturation de celle-ci et sa viscosité intrinsèque.

Il apparaît donc d'après les résultats précédents que l'urée 8 M est beaucoup moins dénaturante que le $\text{Gu.HCl } 6 \text{ M}$ ou mieux 8 M .

Il sera donc préférable d'utiliser le Gu.HCl pour dénaturer et dérouler plus complètement la partie peptidique des deux glycoprotéines.

De plus, selon HAGEL, GERDING, FIEGGEN et BLOEMENDAL (153), la présence d'ions cyanates dans l'urée peut être gênante pour des études ultérieures en électrophorèse portant sur l'existence de sous-unités. En effet, les ions cyanates se fixant sur certaines molécules protéiques en modifient la charge nette et donnent ainsi naissance à plusieurs bandes en électrophorèse en gel de polyacrylamide qui pourraient amener à des conclusions erronées sur l'existence de plusieurs sous-unités.

Cependant, pour obtenir un déroulement total de la partie peptidique sous forme de pelote statistique, il faut rompre toutes les liaisons covalentes reliant les différentes fractions de la partie protéique. Aussi, avons-nous couplé l'action des agents dénaturants à la rupture des ponts disulfures.

TABLEAU VIII Viscosités intrinsèques exprimées en ml/g, de la LTF et de la STF en présence d'agents dénaturants à forte concentration.

Protéides	Solvants	Urée 8 M	Gu.HCl	
			6 M	8 M
LTF		19 \pm 0,6	26 \pm 0,7	28 \pm 0,7
Fe-LTF		10 \pm 0,3	-	-
STF		12 \pm 0,4	16,2 \pm 0,5	22 \pm 0,6
Fe-STF		10 \pm 0,3	15,3 \pm 0,5	-

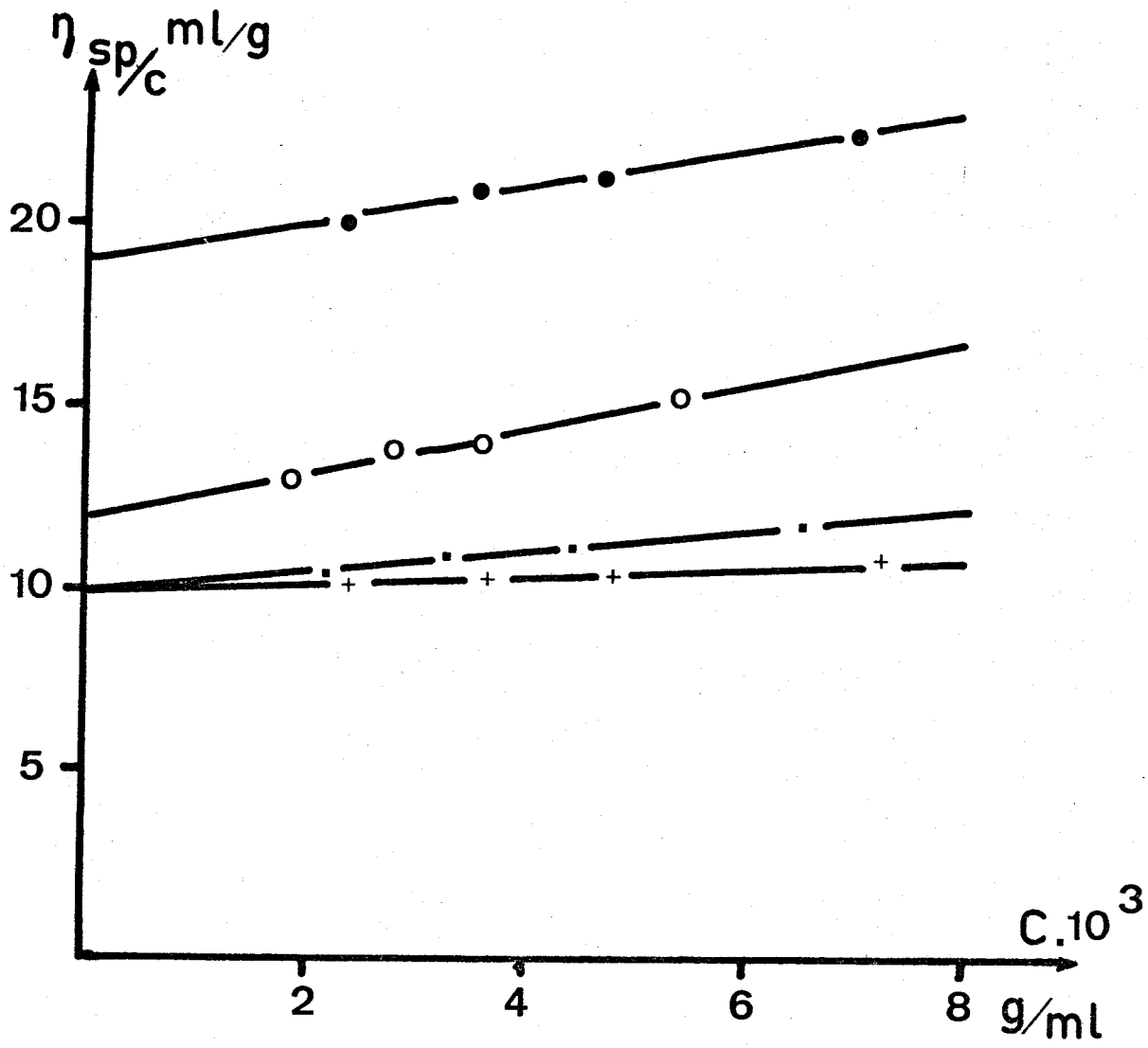


Figure 12 : Détermination de la viscosité intrinsèque de la sérotransferrine et de la lactotransferrine en milieu Urée 8 M

(●) LTF (○) TF
 (■) Fe-TF (+) Fe-LTF



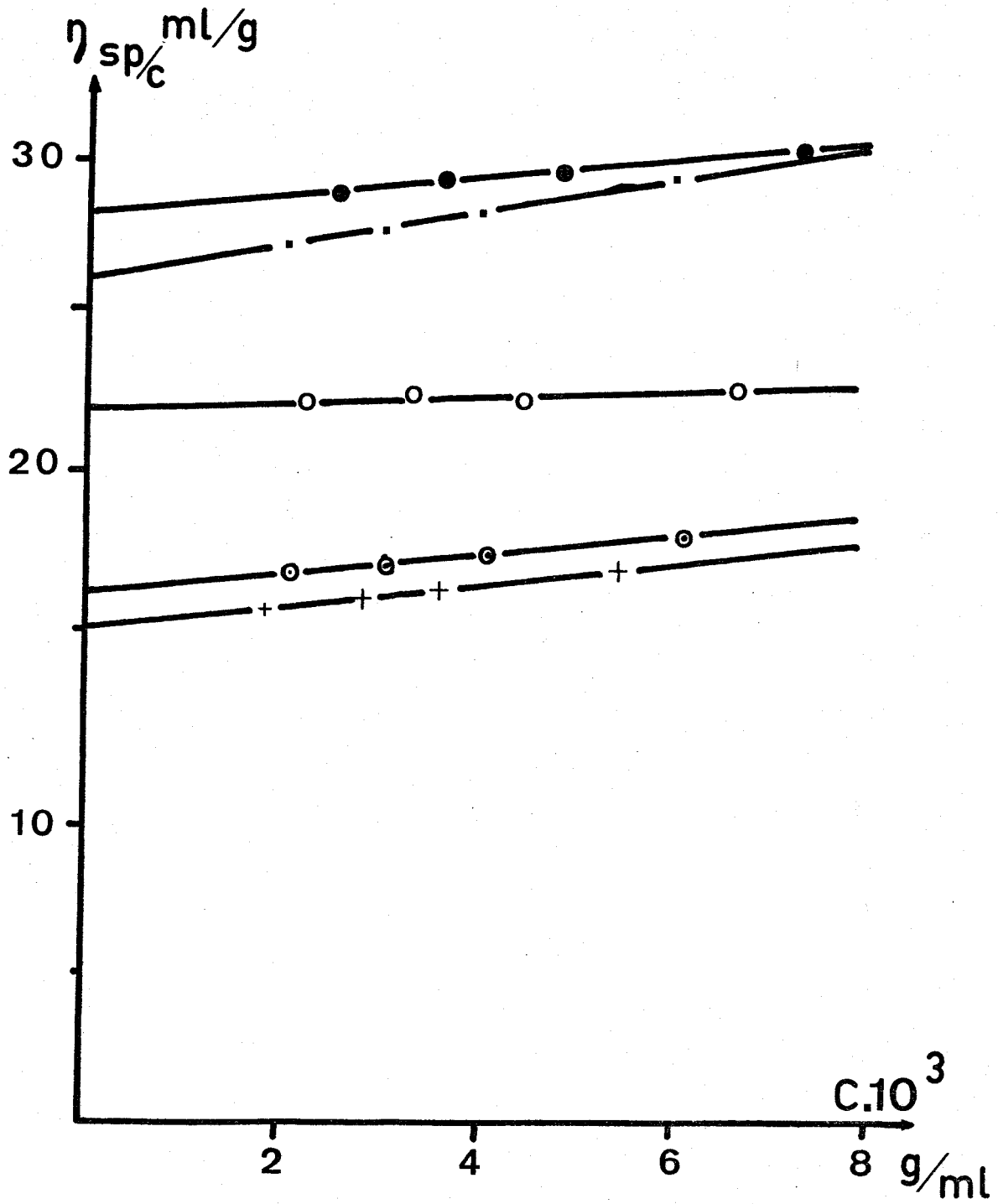


Figure 13: Viscosités en milieu Gu.HCl

- (○) LTF Gu.HCl 8 M (◻) LTF Gu.HCl 6 M
 (○) TF Gu.HCl 8 M. (◉) TF Gu.HCl 6 M
 (+) Fe-TF Gu.HCl 6 M

III - VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS EN MILIEU DENATURANT

A - MATERIEL

La réduction des ponts disulfures est effectuée selon le protocole décrit p. 17 . La seule modification est que le β -mercaptoéthanol est ajouté dans le solvant avant dissolution du protéide. La suite des opérations reste identique.

Les mesures de viscosité ont été effectuées dans les solvants suivants :

- Urée 8 M dans le tampon Tris-HCl 0,1 M ajusté à pH 8,2 et contenant, en outre, de l'EDTA 0,03 M et du β -mercaptoéthanol 0,1 à 0,15 M.
- Gu.HCl 6 M à 8 M, tamponné par le Tris-HCl 0,1 M à pH 8,2 et renfermant de l'EDTA 0,03 M et du β -mercaptoéthanol 0,1 à 0,15 M.

La concentration en protéides de la solution-mère est de l'ordre de 0,7 à 0,8 p. 100.

Les temps d'écoulement du solvant sont de l'ordre de 180 secondes.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Viscosité des protéides réduits en milieu urée

Les résultats obtenus (figure 14 p. 58) sont rassemblés dans le tableau IX p. 57 .

Nous constatons une augmentation importante de la viscosité intrinsèque quand on ajoute un agent réducteur tel que le mercaptoéthanol au milieu dénaturant ce qui tend à prouver que la molécule protéique a pris une conformation plus étirée qu'en milieu urée 8 M dépourvu de mercaptoéthanol, donc que certaines liaisons covalentes telles que les ponts disulfures ont été rompues.

Cependant, la sérotransferrine saturée ($[\eta] = 34$ ml/g) semble ne pas avoir été totalement réduite en milieu urée 8 M, mercaptoéthanol 0,1 M elle conserve une conformation moins étirée que la sérotransferrine native ($[\eta] = 42,5$ ml/g) dans les mêmes conditions. En effet, en milieu urée 8 M, mercaptoéthanol 0,1 M, 24 h, la sérotransferrine saturée n'est pas totalement décolorée, ce qui est en bon accord avec le fait qu'elle conserve une partie de sa structure tertiaire.

La lactotransferrine native ($[\eta] = 29,5$ ml/g) semble encore

plus résistante que les deux formes de la sérotransferrine à la réduction des ponts disulfures en milieu urée 8 M.

2 - Viscosité des protéides réduits en milieu Gu.HCl

Les résultats obtenus (figure 15 p. 59) sont rassemblés dans le tableau X p. 57.

Nous constatons que la réduction en milieu Gu.HCl 6 M, mercaptoéthanol 0,1 M pendant 16 h n'est totale ni pour la lactotransferrine ($[\eta] = 46$ ml/g) ni pour la sérotransferrine ($[\eta] = 48$ ml/g). Tandis que pour la même concentration en Gu.HCl, mais en présence de mercaptoéthanol 0,15 M, pendant 4 h, la viscosité intrinsèque de la lactotransferrine est de 51 ml/g et cette valeur reste stable même si la concentration en Gu.HCl atteint 8 M.

La viscosité intrinsèque n'augmentant plus pour une concentration en Gu.HCl supérieure à 6 M en présence de mercaptoéthanol 0,15 M, nous pouvons considérer que le protéide possède une conformation totalement étirée et se trouve sous forme de pelote statistique.

Il en est de même pour la sérotransferrine dont la viscosité intrinsèque dans ces conditions est de 50,0 ml/g.

Cependant, pour être certain que les 2 protéides sont totalement réduits et se trouvent bien sous forme de pelote statistique et pour éviter une réassociation partielle de certains de ces ponts disulfures, nous avons effectué les mesures de viscosité intrinsèque sur les protéides réduits et alkylés dissous dans un solvant Gu.HCl 6 M.

IV - VISCOSITE DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES EN MILIEU Gu.HCl 6 M

A - MATERIEL

La réduction et l'alkylation de la lactotransferrine et de la sérotransferrine est effectuée selon le protocole décrit précédemment (p. 18) :

- 400 mg de protéide réduit et alkylé sont dissous dans 35 ml de solvant Gu.HCl 6 M tamponné à pH 7,5 par du Tris-HCl 0,1 M.

- La solution est ensuite filtrée sur filtre Millipore et complétée à 50 ml par le solvant filtré. Les dilutions sont effectuées de la

TABLEAU IX : Viscosité intrinsèque de
la STF et de la LTF en
urée 8 M

Protéines \ Solvants	Urée 8 M	Urée 8 M
	4 h	RSH* 0,15 M 4 h
LTF	19	29,5 \pm 0,7
STF	12	42,5 \pm 1
Fe-STF	10	34 \pm 0,8

TABLEAU X : Viscosité intrinsèque de la STF et de la LTF en milieu Gu.HCl

Protéines \ Solvants	Gu.HCl 6 M	Gu.HCl 6 M	Gu.HCl 6 M	Gu.HCl 7 M	Gu.HCl 8 M
	4 h	RSH* 0,1 M 16 h	RSH* 0,15 M 4 h	RSH* 0,15 M 4 h	RSH* 0,15 M 4 h
LTF	26	46 \pm 1,2	51 \pm 1,5	52 \pm 1,5	51 \pm 1,5
STF	15,3	48 \pm 1,2	50,0 \pm 1,5	-	-

* RSH = β -mercaptoéthanol



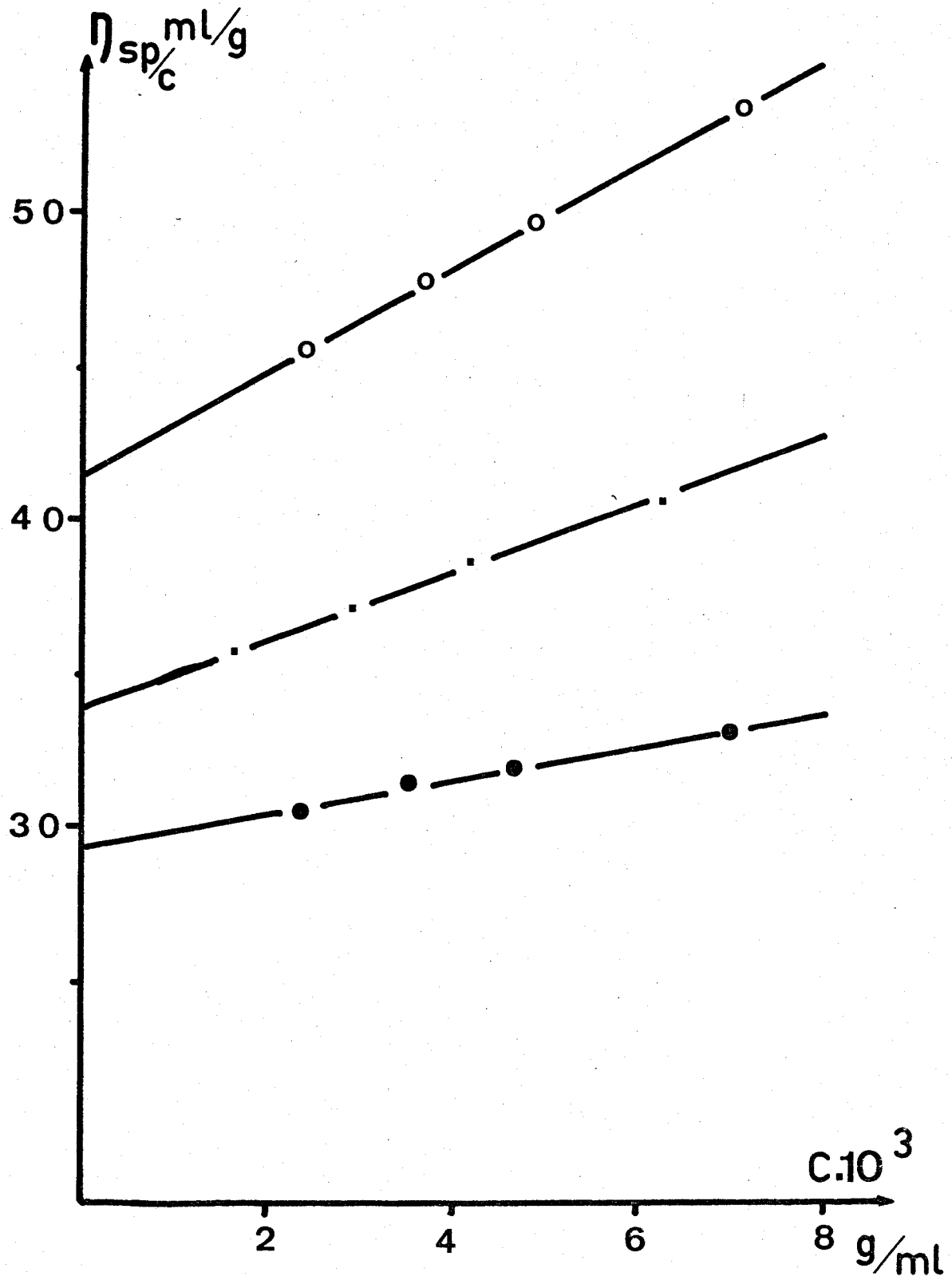


Figure 14 : Viscosité intrinsèque de la transferrine et de la lactotransferrine en milieu Urée 8 M, mercaptoéthanol 0,1 M

(○) TF (Urée 8 M, RSH 0,1 M, 4 h)

(◻) Fe-TF (Urée 8 M, RSH 0,1 M, 4 h)

(●) LTF (Urée 8 M, RSH 0,1 M, 4 h)



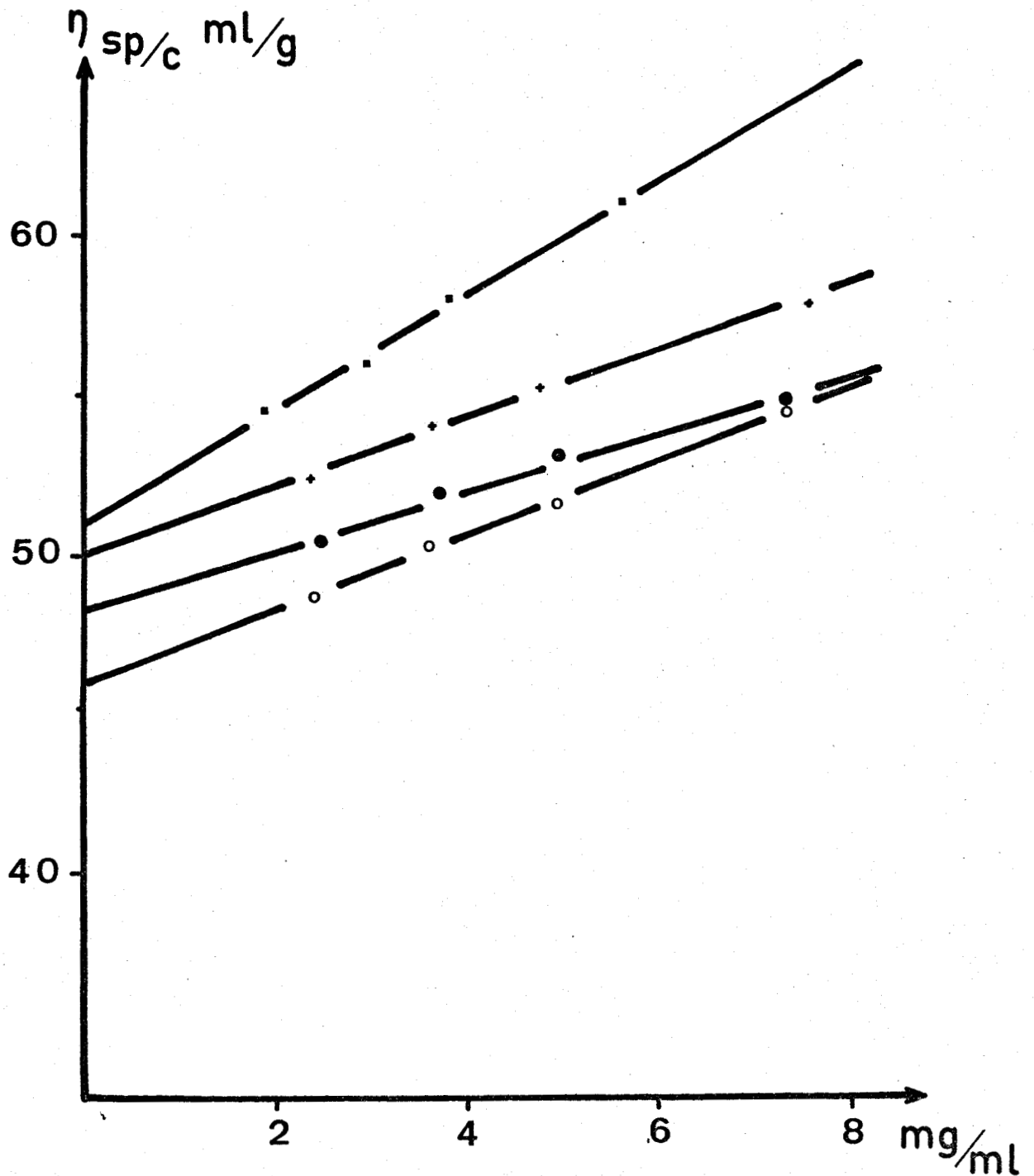


Figure 15 : Viscosité intrinsèque de la STF et de la LTF réduites en milieu Gu.HCl

- (o) LTF (Gu.HCl 6 M, RSH 0,1 M, 16 h)
- (+) STF (Gu.HCl 6 M, RSH 0,1 M, 16 h)
- (■) LTF (Gu.HCl 6 M, RSH 0,15 M, 4 h)
- (●) STF (Gu.HCl 6 M, RSH 0,15 M, 4 h)



manière décrite précédemment (p. 24).

- Les temps d'écoulement du solvant sont de l'ordre de 180 à 200 secondes.

B - RESULTATS

Un examen à l'autoanalyseur d'acides aminés de la lactotransferrine et de la sérotransferrine réduites et alkylées nous montre une absence totale de cystine, ce qui nous permet de conclure que tous les ponts disulfures sont coupés.

Les résultats obtenus dans ces conditions (figure 16 p. 61) sont : $[\eta] = 50,5 \text{ ml/g} \pm 1,5$ pour la sérotransferrine réduite et alkylée et $[\eta] = 51 \text{ ml/g} \pm 1,5$ pour la lactotransferrine.

Ces valeurs étant identiques à celles trouvées en milieu $\text{Gu.HCl } 6 \text{ M}$, mercaptoéthanol $0,15 \text{ M}$, nous pouvons considérer que les protéides possèdent une conformation étirée et se trouvent sous forme de pelote statistique.

C - APPLICATIONS

Dans ces conditions, on peut appliquer la relation proposée par TANFORD et coll (154) :

$$[\eta] = 0,716 n^{0,66}$$

Dans le cas de la lactotransferrine, pour une viscosité intrinsèque de 51 ml/g , on trouve un nombre de résidus d'acides aminés égal à 641 ± 15 et dans le cas de la sérotransferrine, pour une viscosité intrinsèque de $50,5 \text{ ml/g}$, on détermine un nombre de résidus d'acides aminés égal à 632 ± 15 .

Connaissant n le nombre de résidus d'acides aminés de la partie protéique, on peut déterminer la masse moléculaire du protéide en appliquant l'équation suivante :

$$M = n M_0$$

M_0 représente la masse moléculaire moyenne apparente d'un résidu d'acide aminé, calculé d'après les compositions molaires en acides aminés et en glucides de la glycoprotéine pour une masse moléculaire de 10.000 daltons.

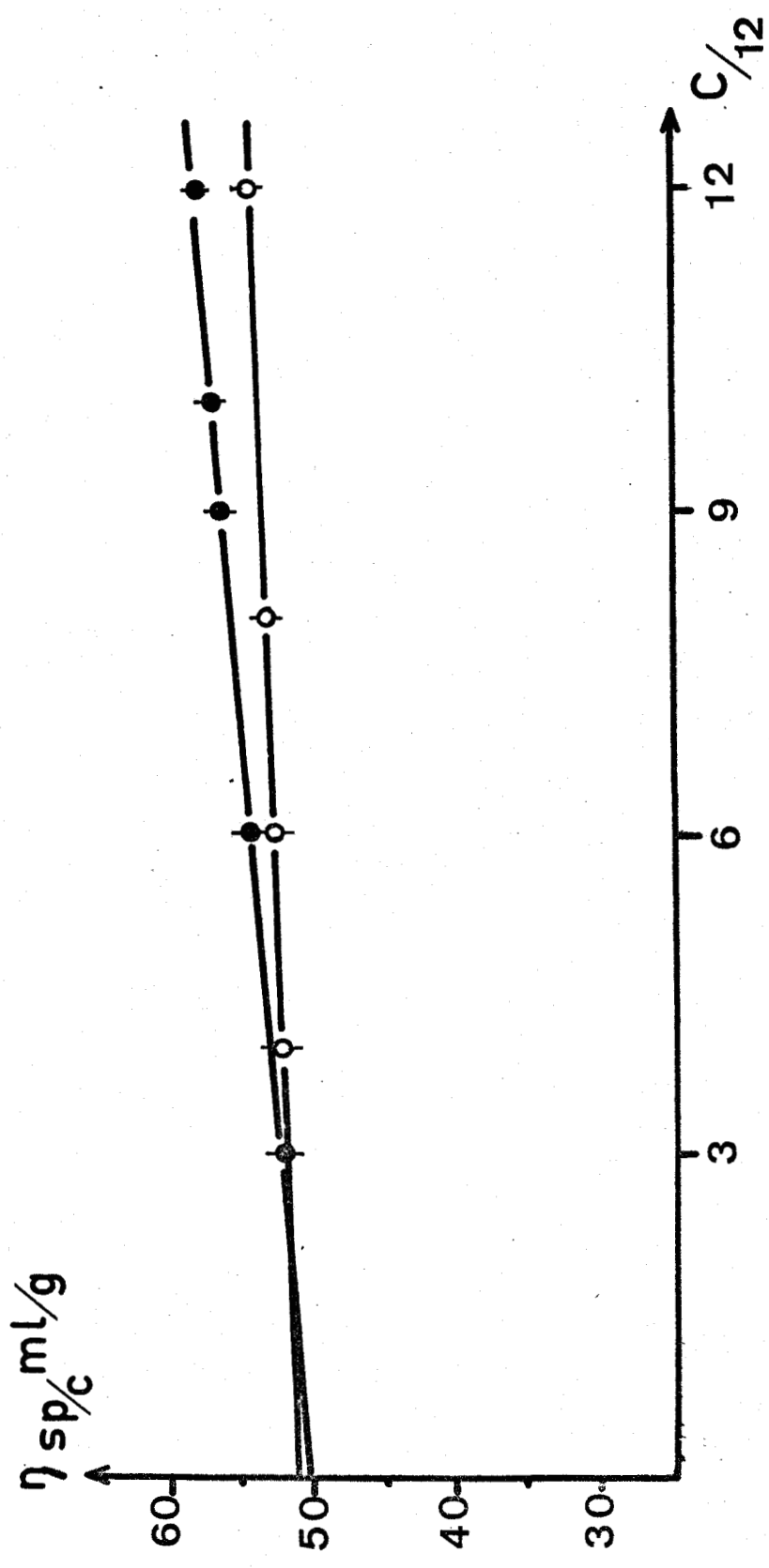


Figure 16 : Viscosité intrinsèque des transferrines réduites et alkylées déterminées en Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5

● CM-STF ; ○ CM-LTF



Pour une valeur calculée de M_0 égale à 121 dans le cas de la lactotransferrine et de 118 dans le cas de la sérotransferrine, les valeurs de masse moléculaire trouvées sont de $77\ 500 \pm 2000$ dans le cas de la lactotransferrine et $74\ 700 \pm 2000$ dans le cas de la sérotransferrine.

Le nombre de résidus d'acides aminés obtenu dans les 2 cas est très voisin, compte-tenu de la précision des résultats (± 15 résidus) des valeurs calculées d'après la composition en acides aminés, soit 641 pour la LTF selon MAZURIER et SPIK (155) pour une masse moléculaire de 76 700 et 641 selon QUERINJEAN et al. (156) pour une masse moléculaire de 76 400 et 634 pour la STF d'après SPIK (157) et MONTREUIL et al. (158) pour une masse moléculaire de 76 000.

Etant donné que la viscosité intrinsèque mesurée en milieu Gu.HCl 6 M sur les protéides réduits et alkylés est une grandeur proportionnelle à la longueur de la chaîne polypeptidique, si l'un des deux protéides avait été constitué de 2 ou de plusieurs chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 1 ou plusieurs pont disulfures, les valeurs de viscosité intrinsèque et du nombre de résidus d'acides aminés auraient été nettement inférieures à celles que nous avons trouvées.

Il apparaît donc clairement que la sérotransferrine comme la lactotransferrine sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique.

D - DISCUSSION

La valeur de la viscosité intrinsèque de la sérotransferrine réduite et alkylée, mesurée en milieu Gu.HCl 6 M, ($[\eta] = 50,5$ ml/g) est très voisine de la valeur fournie par MANN et coll (159) qui est de 50,8 ml/g. La légère différence dans la valeur de viscosité intrinsèque et surtout la différence de M_0 (115 par rapport à la valeur de 118 que nous proposons) explique le nombre plus élevé d'acides aminés, 674 selon ces auteurs, par rapport à celui que nous proposons qui est de 632.

Ceci rend compte de la différence entre les valeurs de masse moléculaire, 78 300 proposée par ces auteurs et 74 700 que nous avons obtenu.

Par contre, nos résultats concernant la sérotransferrine s'éloignent de ceux obtenus par BEZKOROVAINY et GROHLICH (160) obtenus dans les mêmes conditions, ceux-ci proposent une viscosité intrinsèque de 59,4 ml/g et par conséquent, une masse moléculaire beaucoup plus élevée 96 000 pour un nombre d'acides aminés de 795.

Nos conclusions sont cependant identiques à celles de MANN

et coll (161) et BEZKOROVAINY et GROHLICH (162) en ce qui concerne la nature monocaténaire de la sérotransferrine.

La mesure de la viscosité intrinsèque réalisée dans les mêmes conditions sur la lactotransferrine réduite et alkylée est en faveur d'un nombre d'acides aminés ainsi que d'une masse moléculaire légèrement supérieurs à ceux obtenus pour la sérotransferrine et démontre de la même manière sa nature monocaténaire.

V - CONCLUSIONS

Les mesures de viscosité intrinsèque de la LTF et de la STF ont abouti aux résultats suivants :

- 1 - La LTF et la STF ont une viscosité intrinsèque identique en milieu salin 4,0 ml/g et il n'y a pas de différence de conformation décelable par mesure de la viscosité entre l'apo et le métalloprotéide, sauf dans le cas de la LTF mais il semble que l'augmentation de la valeur soit due, dans ce cas, aux conditions de préparation de l'apoprotéide.
- 2 - Les ferriprotéides sont plus résistants à la dénaturation par l'urée que les apoprotéides et la LTF non saturée en fer est plus facilement dénaturée par l'urée 8 M ou le Gu.HCl 6 M que l'apoSTF, ce phénomène étant dû au plus grand nombre de ponts disulfures 16, dans la STF par rapport à 13, dans la LTF.
- 3 - La mesure de la viscosité intrinsèque des deux protéides réduits et alkylés en milieu Gu.HCl 6 M permet de déterminer la longueur de la chaîne polypeptidique qui est respectivement de 632 résidus d'acides aminés dans la STF et de 641 résidus d'acides aminés dans la LTF et ainsi d'affirmer que la partie protéique des deux protéides est bien constituée d'une seule chaîne peptidique. Ces résultats permettent aussi d'attribuer une masse moléculaire de 74 700 à la STF et une masse légèrement supérieure de 77 500 à la LTF.

2. - DETERMINATION DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES

I - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES NATIFS

A - CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES

1 - Matériel

Une étude de la variation du coefficient de sédimentation de la STF et de la LTF en fonction de la nature et du pH du tampon a été effectuée au laboratoire par BRAZIER (163). Les mesures ont été réalisées sur des solutions de LTF native et saturée à des concentrations de 1 à 10 mg/ml dans les tampons suivants :

- phosphate de sodium 0,1 M, pH 7
- phosphate de sodium-chlorure de sodium 0,1 M, pH 7
- citrate de sodium-bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,5

2 - Résultats et discussion

Les résultats obtenus par BRAZIER sont rassemblés dans le tableau XI p. 65 .

Les premières études entreprises au laboratoire sur les différentes valeurs du coefficient de sédimentation obtenues dans différentes solutions tampons ont permis :

a - de mettre en évidence une certaine disparité des résultats de la LTF, 5,20 à 6,05 S, ce phénomène étant moins marqué pour la STF, 5,50 à 5,60 S. Cette disparité des résultats entraîne une certaine difficulté d'interprétation des valeurs obtenues, la variation se faisant moins en fonction de la teneur en fer qu'en fonction de la nature des anions du tampon. Cette disparité de résultat se retrouve chez certains auteurs en ce qui concerne la STF et notamment BEZKOROVAINY (164), CHARLWOOD (165) et ROBERTS et coll (166).

b - de soupçonner des phénomènes d'aggrégation du protéide, influencés par la nature des anions du solvant, phénomène déjà cité par BEZKOROVAINY (167).

c - de montrer l'influence néfaste de la lyophilisation.

3 - Conclusions

Ces études préliminaires ont montré la nécessité de travailler avec un protéide le plus homogène possible. Nous avons établi un protocole rigou-

TABLEAU XI : Etude des variations des coefficients de la LTF et de la STF en fonction de la nature du tampon et de la teneur en fer selon BRAZIER

Tampon	Protéide	S° _{20,w} en S
Phosphate de sodium 0,1 M pH 7,5	LTF	5,55
	Fe-LTF	5,30
	Apo-STF	5,50
Phosphate de sodium - chlorure de sodium 0,1 M, pH 7,3	LTF	5,20
Citrate de sodium - bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,5	LTF	6,05
	Fe-LTF	5,60
	Fe-STF	5,60



reux quant à la préparation des solutions, à savoir, éviter la lyophilisation, purifier par tamisage moléculaire et dialyser contre le tampon d'éluion.

En outre, le choix du tampon s'est porté sur le Tris 0,1 M déjà utilisé par de nombreux auteurs. Le choix du pH a été fait selon les conclusions de AISEN et LEIBMAN (168) indiquant que la STF ne forme pas ordinairement de polymères à des pH voisins de la neutralité.

B - RESULTATS DEFINITIFS

1 - Matériel

Pour éliminer l'influence de la dénaturation provoquée par la lyophilisation, les mesures ont été faites sur des éluions de colonnes obtenues au cours de la chromatographie des échantillons de STF et LTF sur une colonne de Sephadex G₁₅₀ (2 x 120 cm) équilibrée dans le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

La concentration en protéides de ces solutions d'éluion est déterminée par la mesure de leur absorbance à 280 nm, en utilisant comme valeur $\frac{1}{E_{1cm}} \cdot P \cdot 100 = 11$ pour la STF et 11,2 pour la LTF.

Les dilutions sont ensuite réalisées dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 de manière à obtenir des concentrations en protéides variant de 10 à 2 mg/ml.

Chaque sédimentation dure 1 h et les photos sont prises toutes les 8 mn.

Les valeurs de volume spécifique partiel utilisées sont respectivement 0,732 ml/g pour la LTF et 0,725 pour la STF. (cf. tableau I, p. 5).

La viscosité relative du tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 par rapport à l'eau, mesurée à 20°C est :

$$\frac{\eta_{20, \text{sol}}}{\eta_{20, w}} = 1,01$$

La densité de l'eau à 20°C est $\rho_{20, w} = 0,9982$ et la densité du tampon Tris-HCl 0,1 M à 20°C est $\rho_{20, \text{sol}} = 1,0052$.

2 - Résultats

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII p. 68 et sont illustrés par la figure 17, p. 69.

L'extrapolation à concentration nulle des S_{20w} (figure 18 p.70)

permet d'attribuer les valeurs de $S^{\circ}_{20,w} = 5,35 \pm 0,1$ S à la LTF et de $S^{\circ}_{20,w} = 5,30 \pm 0,1$ S à la STF.

3 - Discussion

L'utilisation des éluats de colonne après chromatographie de la STF et de la LTF sur colonne de Sephadex G-150 élimine les agrégats de protéides et permet d'obtenir un alignement convenable des différentes valeurs du coefficient de sédimentation en fonction de la concentration en protéides. La valeur du coefficient de sédimentation de la STF native ainsi déterminée, $S^{\circ}_{20,w} = 5,30$ S, est voisine des valeurs citées dans la littérature (voir tableau I p. 5) par les différents auteurs (BEZKOROVAINY et coll (169), CHARLWOOD (170), PALMOUR et SUTTON, MANN et al (171,172)), mais elle s'éloigne de la valeur fournie par ROBERTS et coll (173) qui est de 4,92 S.

La mesure du coefficient de sédimentation $S^{\circ}_{20,w} = 5,35$ S de la LTF native, réalisée dans les mêmes conditions se situe entre la valeur fournie par JOHANSSON (174) 5,25 et par SPIK (175) 5,55 ; elle est relativement plus élevée que la valeur fournie par QUERINJEAN et al. (176) $S^{\circ}_{20,w} = 4,93$.

Compte tenu de la précision des résultats $\pm 0,1$ S, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de $S^{\circ}_{20,w}$ de la STF et de la LTF natives, mesurées en tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5.

II - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES DETERMINES EN MILIEU Gu.HCl 6 M

A - MATERIEL

La réduction et l'alkylation de la LTF et de la STF est effectuée selon le protocole décrit précédemment (p. 17).

Les solutions de sérotransferrine et de lactotransferrine S-carboxyméthylées (CM-STF et CM-LTF) sont des solutions obtenues après dissolution et filtration sur filtre millipore des échantillons de protéides réduits et alkylés dans une solution de Gu.HCl 6 M, tamponnée par le Tris 0,1 M ajusté à pH 7,5 par HCl.

Les dilutions sont ensuite réalisées dans le solvant Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 de manière à obtenir des concentrations en protéides variant de 2 à 10 mg/ml.

TABLEAU XII: Variation en fonction de la concentration et extrapolation à concentration nulle des coefficients de sédimentation de la STF et de la LTF natives, mesurés en tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5

C en mg/ml	STF		LTF	
	$S_{20, \text{sol}}$	$S_{20,}$	$S_{20, \text{sol}}$	$S_{20,}$
10	4,78	4,96	5,06	5,20
8	4,90	5,03	5,06	5,20
6	4,92	5,06	5,09	5,23
5	5,00	5,13	5,12	5,26
4	5,00	5,13	5,16	5,30
3	5,05	5,19	5,16	5,30
2	5,10	5,24	5,17	5,31
0	$S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 5,17$	$S^{\circ}_{20,} = 5,30$	$S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 5,20$	$S^{\circ}_{20} = 5,35$



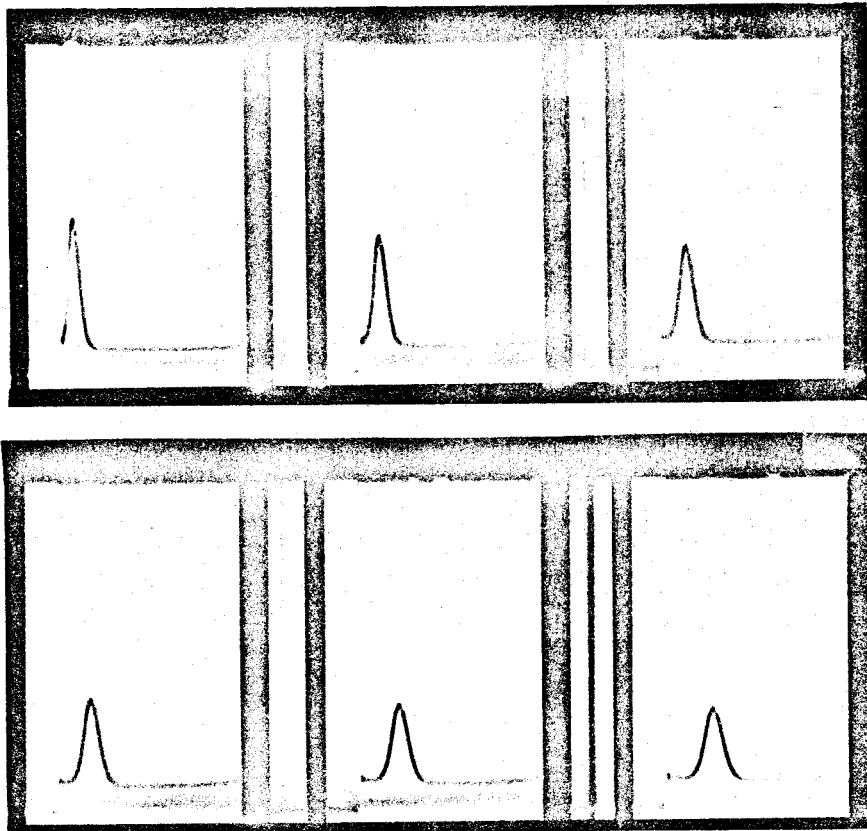


Figure 17 : Sédimentation de la STF native effectuée en tampon Tris-HCl à pH 7,5. (c = 5 mg/ml)



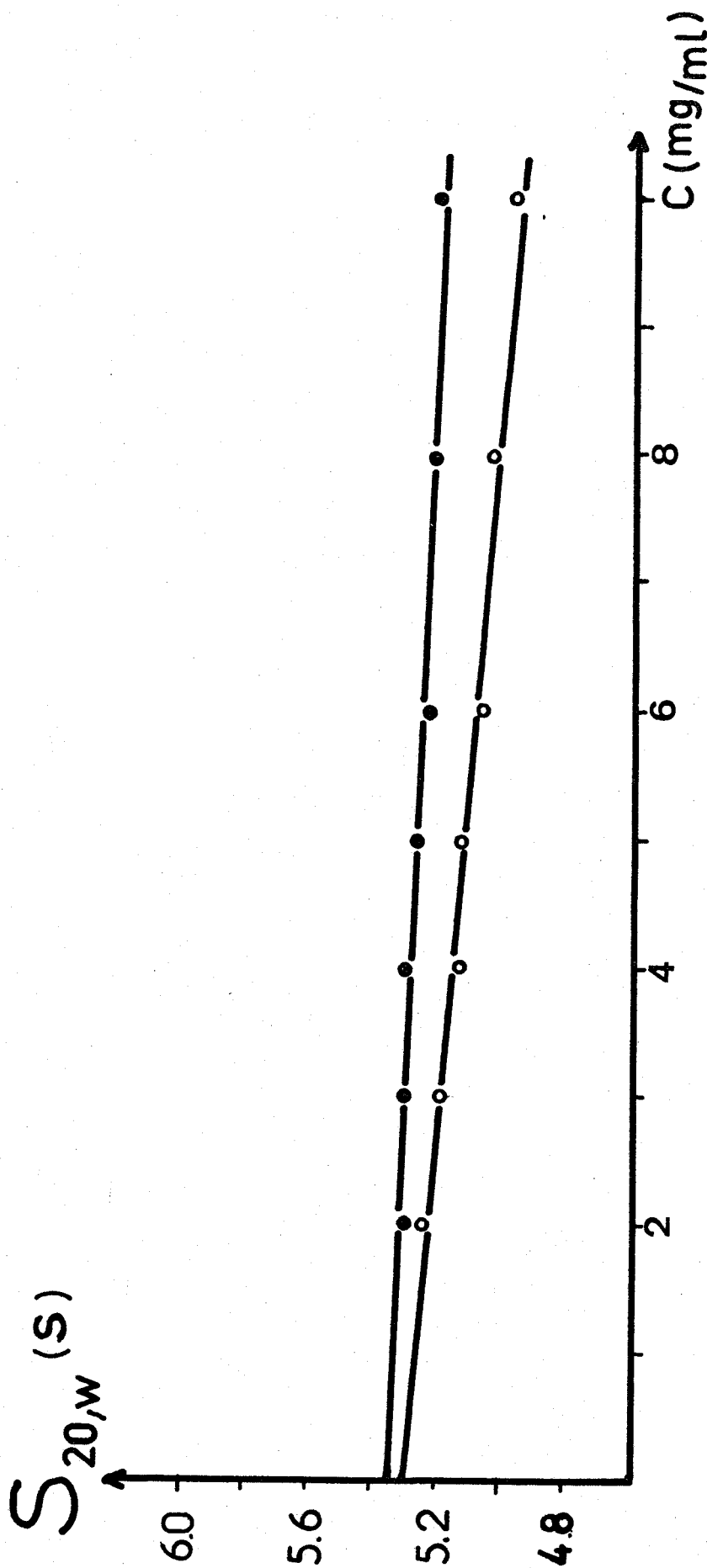


Figure 18 : Extrapolation à concentration nulle des coefficients de sédimentation $S_{20,w}$ de la sérotransferrine et de la lactotransferrine natives, mesurés en tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 et ramenés aux conditions standard



○ STF ; ● LTF

La cellule de mesure est ensuite remplie successivement par 700 μ l de chaque solution. Chaque sédimentation dure 90 mn environ, les photos sont prises toutes les 16 mn.

On ne mesure que les coefficients $S^{\circ}_{20, \text{sol}}$, non ramenés à l'eau, il n'est donc pas nécessaire de connaître la viscosité relative ni la densité à 20°C du solvant.

B - RESULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIII p. 72 et sont illustrés par la figure 19, p. 73.

L'extrapolation à concentration nulle des $S^{\circ}_{20, \text{sol}}$ (figure 20 p. 74) permet d'attribuer une valeur de $S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 0,98 \pm 0,02$ unités Svedberg à la lactotransferrine réduite et alkylée en milieu Gu.HCl 6 M et une valeur légèrement supérieure $S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 1,01 \pm 0,02$ S à la sérotransferrine.

C - DISCUSSION

En milieu Gu.HCl 6 M, la sérotransferrine réduite et alkylée possède un $S^{\circ}_{20, \text{Gu.HCl}}$ de 1,01 S, valeur qui est supérieure aux valeurs de 0,87 donnée par GREENE et FEENEY (177) et de 0,75 donnée par PALMOUR et SUTTON (178). Cependant, la valeur de ces derniers est déterminée dans l'urée 8 M et ceci semble bien confirmer que dans de telles conditions la sérotransferrine ne se trouve pas sous forme de pelote statistique.

Aucun résultat de $S^{\circ}_{20, \text{Gu.HCl}}$ n'a été donné dans la littérature en ce qui concerne la lactotransferrine.

III - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION : APPLICATIONS A LA DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

A - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR COMBINAISON DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION $S^{\circ}_{20, w}$ ET DE LA VISCOSITE INTRINSEQUE $[\eta]$.

1 - Résultats

La masse moléculaire du protéide supposé sous forme d'ellipsoïde de révolution aplatie, comme la plupart des protéines globulaires est donnée par l'équation de SCHERAGA et MANDELKERN (179)

TABLEAU XIII : Variation en fonction de la concentration des coefficients de sédimentation de la STF et de la LTF réduites et alkylées, mesurés en tampon Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5

C en mg/ml	CM-STF $S_{20, \text{sol}}$ (en S)	CM-LTF $S_{20, \text{sol}}$ (enS)
10	0,82	0,676
8	0,84	0,752
7	0,89	-
6	0,89	0,780
5	0,94	0,832
4	0,93	0,849
3	0,955	0,905
2	0,975	0,920
0	$S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 1,01$	$S^{\circ}_{20, \text{sol}} = 0,98$



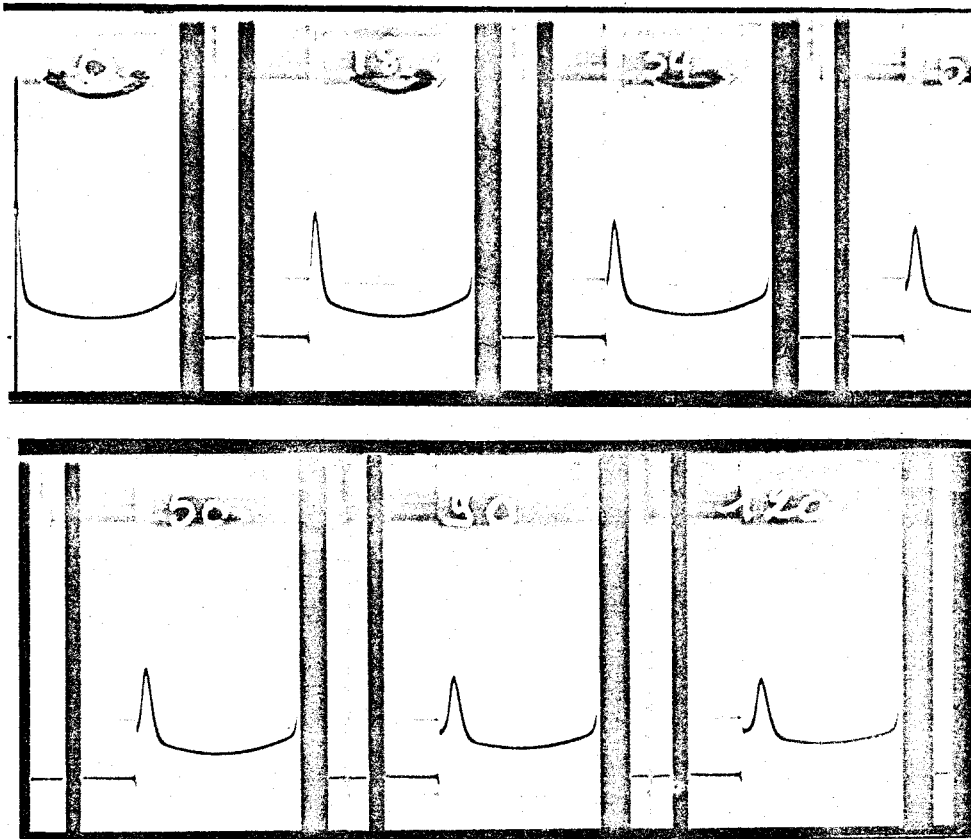


Figure 19 : Sédimentation de la CM-LTF effectuée en milieu Gu.HCl 6 M
pH 7,5 (c = 10 mg/ml)



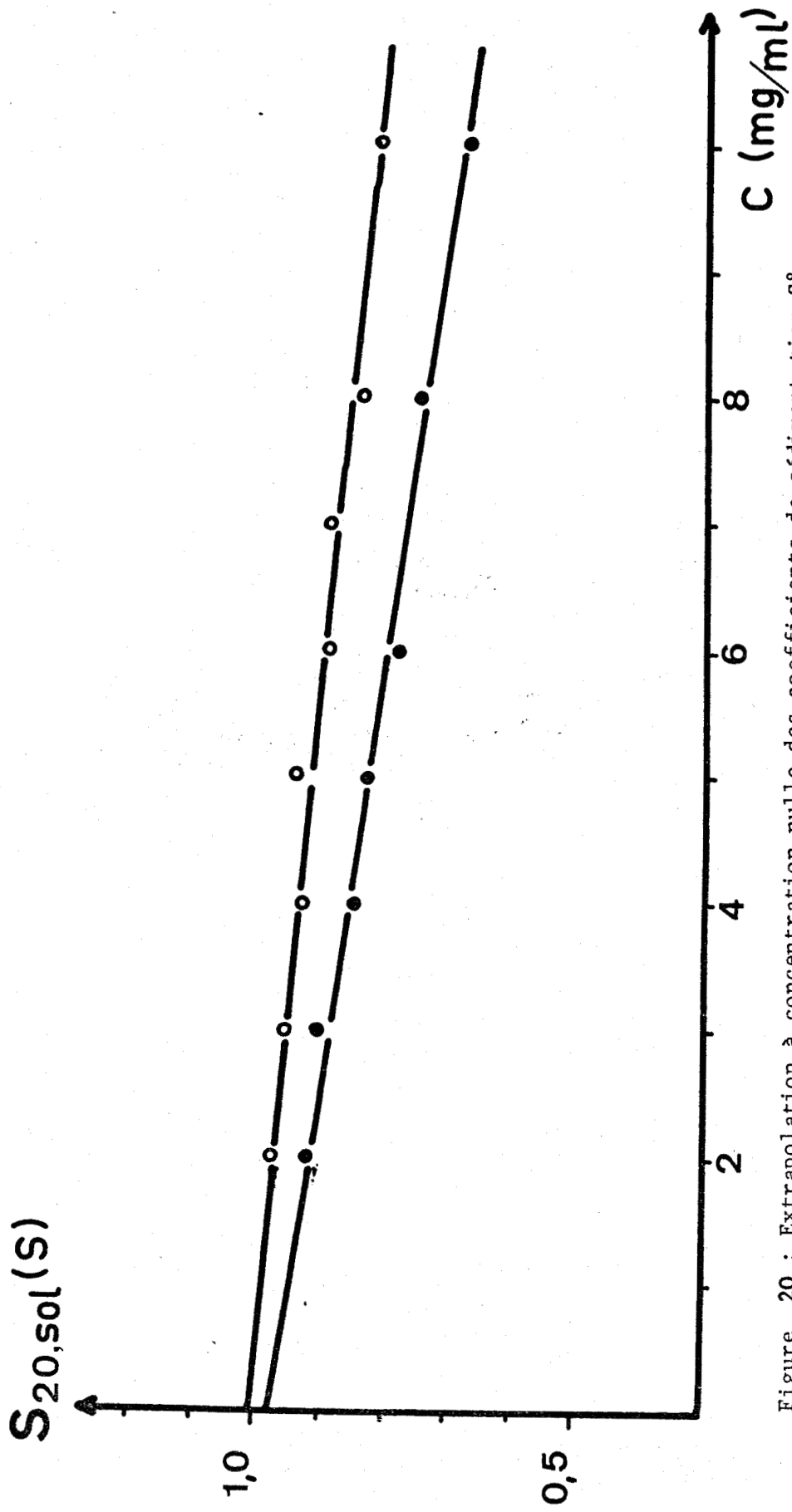


Figure 20 : Extrapolation à concentration nulle des coefficients de sédimentation $S_{20, \text{sol}}$ de la sérotransferrine et de la lactotransferrine réduites et alkylées, mesurés en tampon Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5

CM-STF
CM-LTF

○ CM-STF ● CM-LTF

$$M^{2/3} = \frac{N s_{20,w}^{\circ} [\eta]^{1/3} \eta_0}{\beta (1 - \bar{v} \rho)}$$

Pour la LTF en solution dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5, les résultats sont les suivants :

$$s_{20,w}^{\circ} = 5,35 \cdot 10^{-13} \text{ cm/sec.}$$

$$[\eta] = 0,04 \text{ dl/g}$$

$$\eta_0 = 9,24 \cdot 10^{-3} \text{ poises}$$

$$\beta = 2,12 \cdot 10^6$$

$$\bar{v} = 0,732 \text{ ml/g}$$

$$\rho = 1,0052$$

ce qui donne une masse moléculaire égale à $77\,500 \pm 3\,000$

Dans le cas de la STF en solution dans le même tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5, les valeurs sont les suivantes :

$$s_{20,w}^{\circ} = 5,30 \cdot 10^{-13} \text{ cm/sec}$$

$$[\eta] = 4,05 \text{ ml/g}$$

$$\eta_0 = 9,24 \cdot 10^{-3} \text{ poises}$$

$$\beta = 2,12 \cdot 10^6$$

$$\bar{v} = 0,725 \text{ ml/g}$$

$$\rho = 1,0052$$

La masse moléculaire déterminée dans ces conditions est égale à $74\,000 \pm 3\,000$.

2 - Discussion

Par cette méthode, MANN, FISH, COX et TANFORD (180) ont déterminé une masse moléculaire égale à 79 300 pour la STF en solution dans NaCl 0,1 M à pH 6 pour une valeur de $\beta = 2,12 \cdot 10^6$.

Les valeurs de masse moléculaire ainsi déterminées sont sensiblement identiques à celles déterminées par mesure de la viscosité intrinsèque des protéides réduits et alkylés en milieu Gu.HCl 6 M et montrent ainsi que les modèles théoriques choisis pour représenter la forme des macromolécules sont acceptables, à savoir que les protéides sont globulaires et sous forme d'ellipsoïde

de révolution aplati dont le rapport des axes est peu différent de 1.

De plus, ces résultats montrent que les valeurs de $[\eta]$ et $S^{\circ}_{20,w}$ déterminées pour les 2 protéides sont relativement conformes à la réalité.

B - DETERMINATION DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE ET DE LA MASSE MOLECULAIRE A PARTIR DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION $S^{\circ}_{20,sol}$ DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES MESURE EN MILIEU Gu.HCl 6 M

1 - Résultats

Comme nous l'avons vu précédemment (p.32), les protéides réduits et alkylés en solution dans un milieu Gu.HCl 6 M sont sous forme de pelote statistique. Dans ces conditions, on peut appliquer l'équation de TANFORD et coll (181)

$$S^{\circ}/(1 - \phi' \rho) = 0,286 n^{0,473}$$

Les volumes spécifiques partiels \bar{v} de la STF et de la LTF sont respectivement de 0,725 et 0,732 ml/g. Dans les solutions salines diluées, les interactions préférentielles entre les composants du solvant et le protéide sont minimales et \bar{v} peut être utilisé à la place de ϕ' (ϕ' étant le volume spécifique partiel effectif).

Cependant, le choix de ϕ' pour un protéide en solution dans Gu.HCl 6 M est relativement incertain. HADE et TANFORD (182) et CASTELLINO et BARKER (183) ont montré que ϕ' pouvait décroître, pour plusieurs protéines, de 0,01 ml/g, ceci étant dû aux interactions préférentielles entre le Gu.HCl et le protéide.

Cependant, pour la plupart des protéides déjà étudiés, le ϕ' en Gu.HCl peut être remplacé par \bar{v} sans erreur importante (HUDSON et coll (184) et c'est ce que nous avons fait.

La densité du solvant, Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M, est mesurée à chaque expérience et varie de 1,1428 g/ml à 1,1454 suivant les manipulations.

Dans le cas de la CM-STF, le $S^{\circ}_{20,Gu.HCl}$ est de 1,01 unités Swedberg, le nombre n de résidus d'acides aminés calculé est égal à 639 ± 20 .

Dans le cas de la CM-LTF, le $S^{\circ}_{20,Gu.HCl}$ déterminé est égal à 0,98 S et n est calculé égal à 646 ± 20

Connaissant le nombre de résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique, si celle-ci est unique, on doit retrouver la masse moléculaire de la glycoprotéine en appliquant la relation suivante :

$$M = nM_0$$

M_0 représente la masse moléculaire moyenne apparente d'un résidu d'acide aminé, calculé d'après les compositions molaires en acides aminés et en oses pour une masse de 10.000 daltons.

Si M_0 est de 118 pour la sérotransferrine et 121 pour la lactotransferrine, la masse moléculaire de la STF est de $75\ 400 \pm 3000$ et de $78\ 100 \pm 3000$ dans le cas de la LTF.

2 - Discussion

Ces masses moléculaires sont très peu différentes des masses données dans la littérature, on peut donc en conclure que la séro et la lactotransferrine humaines sont constituées d'une seule et unique chaîne polypeptidique.

Les nombres de résidus d'acides aminés de la partie peptidique des 2 protéides ainsi déterminés, 639 pour la STF et 646 pour la LTF, sont sensiblement identiques à ceux déterminés par mesure de la viscosité intrinsèque des protéides réduits et alkylés, soit 632 pour la STF et 641 pour la LTF.

Compte tenu de la précision des résultats ± 20 , le nombre de résidus d'acides aminés est sensiblement identique dans les 2 protéides.

Ils confirment aussi la nature monocaténaire de la partie protéique de la séro et de la lactotransferrine humaines.

Bien que l'imprécision des résultats soit assez grande ± 3000 , on trouve toujours une masse légèrement supérieure de la lactotransferrine $78\ 100$ par rapport à celle de la sérotransferrine $75\ 400$.

IV - CONCLUSIONS

Les expérimentations effectuées en ultracentrifugation pour déterminer les coefficients de sédimentation de la LTF et de la STF dans différentes conditions ont abouti aux résultats suivants :

1 - Les coefficients de sédimentation des 2 protéides natifs mesurés en milieu Tris-0,1 M à pH 7,5 sont très voisins, 5,35 S pour la LTF et 5,30 S pour la STF.

2 - La combinaison de ces coefficients avec les valeurs de viscosité intrinsèque, déterminées dans le même solvant, dans l'équation de Scheraga et Mandelkern a permis de déterminer une valeur de masse moléculaire de 77 400 pour la LTF et de 74 000 pour la STF. Ces résultats confirment en même temps que les deux protéides sont globulaires et sous forme d'ellipsoïde de révolution aplatie.

3 - De même, la détermination des coefficients de sédimentations des deux protéides réduits et alkylés, en milieu dénaturant a permis de déterminer la longueur de la chaîne polypeptidique qui est de 639 résidus d'acides aminés pour la STF et de 646 pour la LTF, ainsi que leur masse moléculaire qui est respectivement égale à 75 400 et 78 100

Ces résultats confirment ceux obtenus par mesure de la viscosité intrinsèque dans les mêmes conditions et permettent de conclure que les deux protéides sont monocaténaires.

3. - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE EN ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION

I - EQUILIBRE DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU NON DENATURANT

A - MATERIEL

Les déterminations de masses moléculaires de la lactotransferrine et la sérotransferrine natives ont été effectuées à l'équilibre de sédimentation dans le même tampon que celui qui a été utilisé pour les déterminations des coefficients de sédimentation, à savoir, le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

Les solutions de protéides natifs ont été préparées suivant un protocole identique à la préparation des solutions pour l'étude des coefficients de sédimentation (p. 66)

La solution est purifiée par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-150 (2 x 120 cm) l'élution est réalisée par le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

La concentration est déterminée par mesure des absorbances à 280 nm, puis la solution est ajustée à la concentration désirée, de 0,2 à 1 mg/ml suivant les expériences et mise en dialyse contre le tampon d'élution pendant 24 h.

Avant la centrifugation, une partie aliquote de la solution est réservée pour la détermination de la concentration par mesure de l'absorbance à 280 nm. Le dialysat sert de solvant de référence lors de la centrifugation.

Le secteur de droite de la cellule est rempli par 50 μ l de la solution à étudier et le secteur de gauche par 450 μ l du solvant de référence.

La vitesse du rotor est de 17 000 t.p.m., et les photographies sont prises après un temps d'équilibre supérieur à 12 h.

B - RESULTATS

Les équilibres de sédimentation ont été réalisés à plusieurs concentrations, variant de 0,1 à 1 mg/ml.

Les masses moléculaires apparentes ont été calculées pour chaque concentration. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIV (p. 80) et sont donnés avec une précision de ± 2000 .

Les valeurs de masse moléculaire obtenues par équilibre de sédimentation et calculées par la méthode d'Yphantis, modifiée par CHERVENKA sont des masses moléculaires moyennes en poids M_w .

1 - Lactotransferrine humaine

Nous constatons que dans le cas de la lactotransferrine humaine, ces valeurs de M_w augmentent avec la concentration initiale en protéides. Ce phénomène peut être dû à un phénomène d'auto-association de type indéfini.

Si M_1 est la masse moléculaire du monomère, déterminée par les équilibres de sédimentation en milieu Gu.HCl 6 M (voir p. 84) où les associations dimériques sont rompues, ($M_1 = 76\ 700$) et M_w la masse moléculaire moyenne en poids déterminée expérimentalement, on peut tracer la courbe $\frac{M_w}{M_1}$ en fonction de la concentration (fig. 21 p. 81).

On obtient une droite qui montre que $\frac{M_w}{M_1} \rightarrow 1$ quand $C \rightarrow 0$.

Si C_1 est la concentration en monomères et K_2 la constante de dimérisation, la concentration en protéides de la solution est donnée par l'équation

$$C = C_1 + K_2 C_1^2 + K_3 C_1^3 + K_4 C_1^4 + \dots$$

TABLEAU XIV : Valeurs de la masse moléculaire de la STF et de la LTF déterminées par équilibre de sédimentation en Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 à différentes concentrations.

Concentration en mg/ml	M M LTF	Concentration en mg/ml	M M STF
0,1	78 000		
0,2	78 000	0,35	75 500
0,3	79 500	0,5	75-76 000
0,375	79 000	0,55	76 000
0,4	79 000		
0,5	79-82 000		
0,55	82 000		
0,6	81 000		
0,85	83 000		



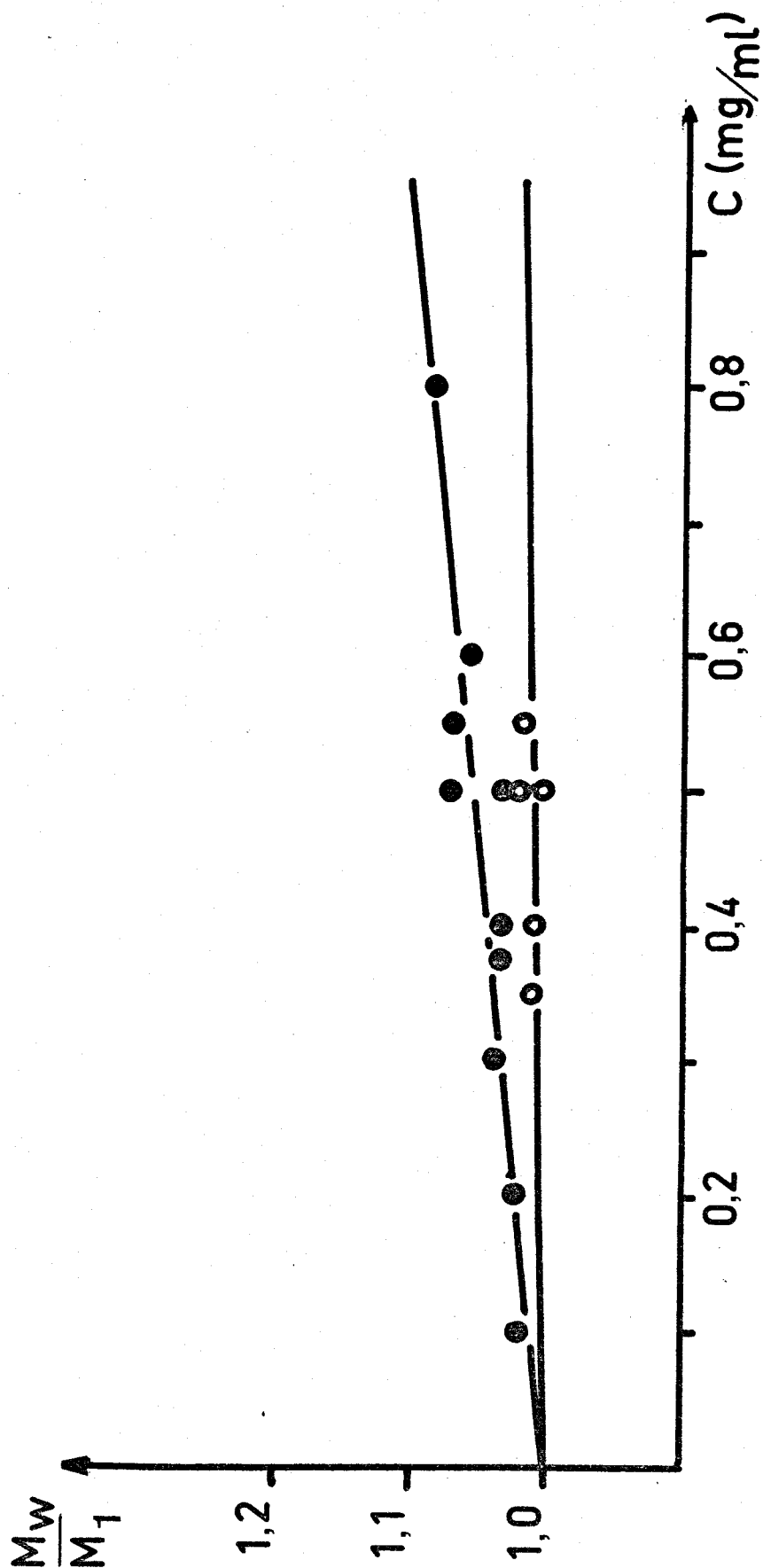


Figure 21: Variation en fonction de la concentration de la masse moléculaire des transferrines humaines déterminée à l'équilibre de sédimentation en tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5

(●) LTF ; (○) STF



Selon TELLER (185) de telles courbes sont caractéristiques d'un système monomère-dimère possédant une constante de dimérisation K_2 faible, de l'ordre de 0,01 ; cependant, il semble plus probable que ce phénomène soit dû à une auto-aggrégation de type indéfini des molécules de lactotransferrine, cette aggrégation augmentant avec la concentration.

A concentration nulle, le rapport $\frac{M_w}{M_1}$ est égal à 1 pour la LTF, ce qui correspond à une valeur de 76 700 pour la masse moléculaire du monomère.

2 - Sérotransferrine humaine

Ce phénomène est presque inexistant dans le cas de la STF humaine (fig. 21 p. 81) ; la masse M_1 du monomère déterminée à l'équilibre de sédimentation en milieu Gu.HCl 6 M est de 75 000 (voir p. 84) et nous constatons comme pour la LTF que le rapport $\frac{M_w}{M_1}$ tend vers 1 quand la concentration tend vers 0, mais la pente de la droite est beaucoup plus faible et pour ainsi dire nulle, dans ce cas, la valeur déterminée à l'équilibre de sédimentation en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 est la moyenne des valeurs déterminées à chaque concentration : soit $75\,500 \pm 1000$.

C - DISCUSSION

La valeur de la masse moléculaire ainsi déterminée pour le monomère de la sérotransferrine humaine est de $75\,600 \pm 1000$.

Cette valeur est en accord avec les valeurs citées dans la littérature et déterminées à l'équilibre de sédimentation en milieu non dénaturant par ROBERTS, MAKEY et SEAL (186), 73 400.

Les résultats de MANN et al. (187) et de PALMOUR et SUTTON (188) donnent des valeurs légèrement plus élevées, respectivement 76 600 et 76 200.

Les valeurs données par CHARLWOOD (189) 68 000 et par BEZKOROVAINY et coll (190) 114 000 sont, par contre, beaucoup plus éloignées de nos résultats.

La valeur que nous donnons pour la masse moléculaire du monomère de la lactotransferrine humaine est $76\,700 \pm 2000$. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de valeurs de masse moléculaire déterminées à l'équilibre de sédimentation.

II - EQUILIBRES DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES NATIFS EN MILIEU Gu.HCl 6 M

Pour déterminer la masse moléculaire du monomère des deux protéides et pour définir leur structure quaternaire, nous avons réalisé les équilibres de sédimentation sur les protéides natifs en milieu dénaturant, Gu.HCl 6 M.

A - MATERIEL

Le solvant qui a servi à réaliser les équilibres de sédimentation en milieu dénaturant est le suivant : Gu.HCl 6 M, Tris 0,1 M ajusté à pH 7,5 par HCl.

La préparation des solutions est la même que pour les équilibres en milieu non dénaturant. La solution de protéine obtenue après passage sur colonne de Sephadex G-150 est mise en dialyse contre le solvant de référence guanidine 6 M, pendant 24 h. Après ajustement de la concentration, une seconde dialyse est renouvelée contre le même tampon Gu.HCl.

Le secteur solution est rempli par 50 μ l de l'adialysable et le secteur solvant par 450 μ l du dialysat.

Les expériences sont effectuées à trois concentrations différentes 0,3, 0,5 et 0,7 mg/ml.

La vitesse du rotor est de 22 000 t.p.m. et les photographies sont prises après 20 h de centrifugation.

B - RESULTATS

Les résultats obtenus en milieu Gu.HCl 6 M sont rassemblés dans le tableau XV (p. 84).

Les valeurs sont exprimées à \pm 2000 daltons près et elles ne varient pas en fonction de la concentration.

On détermine ainsi une masse moléculaire de 76 700 pour la lactotransferrine et de 75 000 pour la sérotransferrine.

TABLEAU XV : Valeurs de la masse moléculaire de la STF et de la LTF déterminées à l'équilibre de sédimentation en milieu Gu.HCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5

LTF		STF	
C en mg/ml	Masse moléculaire	C en mg/ml	Masse moléculaire
0,3	76 700	0,3	74 500
0,5	76 700	0,5	75 000
0,7	76 000	0,7	75 000
Moyenne	76 700	Moyenne	75 000



C - DISCUSSION

Dans le cas présent, la masse moléculaire moyenne en poids M_w est indépendante de la concentration. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse énoncée précédemment d'un phénomène d'auto-association indéfini, l'aggrégation augmentant avec la concentration.

En effet, la solution guanidine aux fortes concentrations possède un pouvoir très dissociant et les associations de type polymérique sont détruites.

Ces valeurs confirment que la masse du monomère est voisine de 76 700 pour la lactotransferrine et de 75 500 pour la sérotransferrine et que ces protéides se trouvent essentiellement à l'état de monomères à des concentrations inférieures à 1 mg/ml.

III - EQUILIBRES DE SEDIMENTATION DES PROTEIDES REDUITS ET ALKYLES EN MILIEU Gu.HCl 6 M

Ces expériences ont été réalisées de manière à déterminer si la masse moléculaire des deux protéides décroît après réduction des ponts disulfures et alkylation dans des conditions dénaturantes et ainsi préciser le nombre de chaînes peptidiques.

A - MATERIEL

Les équilibres de sédimentation ont été réalisés pour cette étude sur la lactotransferrine et la sérotransferrine réduites et alkylées selon le protocole décrit p. . La composition du solvant utilisé est la suivante :

Gu.HCl 6 M, Tris 0,1 M ajusté à pH 7,5 par HCl.

Après dissolution des protéides réduits et alkylés dans le tampon Gu.HCl 6 M, les solutions sont mises en dialyse 24 h contre ce même tampon. La suite des opérations est identique à celle décrite précédemment (p. 79).

B - RESULTATS

Les valeurs de masse moléculaire ainsi obtenues sont les moyennes des résultats obtenus à trois concentrations différentes 0,3, 0,5 et 0,7 mg/ml. En effet, la masse moléculaire, déterminée en milieu dissociant Gu.HCl 6 M, ne varie plus avec la concentration.

La valeur ainsi déterminée pour la lactotransferrine réduite et alkylée est de $77\ 400 \pm 2000$ et de $76\ 000 \pm 2000$ pour la sérotransferrine ré-

duite et alkylée.

Cependant, pour obtenir la masse moléculaire réelle des protéides réduits, il convient de retrancher la valeur de la masse du résidu carboxy-méthyl fixé sur le groupement thiol de la cystéine, ce qui fait pour le nombre total de résidus de 1/2 cystéine des protéides, une masse de 1400 environ.

Les masses moléculaires réelles seraient ainsi 76 000 pour la lactotransferrine réduite et 74 600 pour la sérotransferrine réduite.

C - DISCUSSION

Après rupture totale des ponts disulfures et blocage de ceux-ci, les masses moléculaires des deux protéides, déterminées en milieu Gu.HCl 6 M, sont très voisines des masses moléculaires des protéides non réduits déterminées dans le même milieu.

Il apparaît donc certain que les parties protéiques des deux protéides sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique. En effet, si les protéides avaient été constituées de deux chaînes polypeptidiques reliées par un ou plusieurs ponts disulfures, la masse moléculaire moyenne en poids M_w , déterminée après rupture de ceux-ci, aurait sensiblement diminuée par rapport à celle déterminée pour les protéides non réduits.

La valeur de masse moléculaire ainsi déterminée pour la CM-STF, 74 600, est peu différente de la valeur citée par MANN et al. (191) 75 500, déterminée dans les mêmes conditions. Cette valeur est inférieure à celle déterminée par GREENE et FEENEY (192) 77 900, mais, dans cette valeur est incluse la masse des groupes carboxy-méthylés.

Aucune étude de masse moléculaire n'a été effectuée sur la lactotransferrine par équilibre de sédimentation, nous n'avons donc pas de valeur comparative.

IV - CONCLUSIONS

Les expérimentations effectuées en ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation pour déterminer la masse moléculaire respective des deux protéides amènent les conclusions suivantes :

a - La moyenne statistique obtenue est de 76 500 pour la lactotransferrine et 75 100 pour la sérotransferrine.

b - Dans tous les cas, la valeur obtenue pour la lactotransferrine est supérieure de 1500 à 2000 daltons à celle de la sérotransferrine.

c - Ces résultats confirment les résultats obtenus par mesure de la viscosité intrinsèque et des constantes de sédimentation en milieu Gu.HCl 6 M, à savoir, que les 2 protéides sont monocaténaires.

d - Il semble qu'on soit en présence d'un phénomène d'auto-association de type indéfini dans le cas de la lactotransferrine ; l'aggrégation augmenterait avec la concentration. Ce phénomène est presque inexistant dans le cas de la sérotransferrine.

CONCLUSIONS GENERALES

A l'issue de ces études entreprises sur la LTF et la STF humaines, on peut tirer les conclusions suivantes :

1 - Ce sont toutes deux des glycoprotéides globulaires de conformation voisine car ils possèdent une viscosité intrinsèque identique en milieu salin, 4,0 ml/g et un coefficient de sédimentation très voisin 5,30 S pour la STF et 5,35 S pour la LTF.

L'intégration de ces deux paramètres dans l'équation de Scheraga et Mandelkern montre que le modèle choisi pour représenter les deux protéides sont valables, à savoir que leur forme se rapproche d'un ellipsoïde de révolution aplati dont le rapport des axes est peu différent de 1.

2 - Le fer ne semble pas apporter de modification notable de conformation décelable par mesure de la viscosité intrinsèque. Cependant, on constate que les ferriprotéides sont beaucoup plus résistants à la dénaturation par l'urée 8 M que les apoprotéides. De même, on constate que l'apo-LTF est plus facilement dénaturée par les agents dénaturants (urée 8 M, Gu.HCl 6 M) que l'apo-STF, ce phénomène est dû au plus grand nombre de ponts disulfures de la STF (16) par rapport à la LTF (13)

3 - Les mesures de viscosité intrinsèque du coefficient de sédimentation effectuées en milieu Gu.HCl 6 M sur les protéides réduits et alkylés ont montré que leur partie protéique est monocaténaire. La chaîne polypeptidique de la LTF est légèrement plus longue, 641 à 646 résidus d'acides aminés, que celle de la STF, 632 à 639 résidus ; mais cette différence est très faible, compte tenu de la précision des résultats.

Les mesures de masse moléculaire effectuées à l'équilibre de sédimentation en milieu Gu.HCl 6 M avant et après réduction des ponts disulfures confirment la nature monocaténaire de la chaîne polypeptidique.

4 - Les deux glycoprotéines ont une masse moléculaire voisine. D'après le tableau XVI, en effectuant la moyenne des différentes valeurs obtenues au laboratoire, nous attribuons une masse moléculaire de $75\ 200 \pm 1000$ à la STF et de $76\ 700 \pm 1000$ à la LTF. Cette différence de 1500 daltons peut paraître peu significative en fonction de la précision des résultats, mais nous retrouvons cette différence par toutes les méthodes que nous avons employées. Cette différence pourrait être

TABLEAU XVI : Valeurs des masses moléculaires de la STF et de la LTF humaines déterminées par différentes méthodes

Méthodes	STF	LTF
Equilibre de sédimentation		
1 - Protéides natifs		
- en tampon Tris-HCl 0,1 M	75 600	76 700
- en Gu.HCl 6 M	75 000	76 700
2 - Protéides réduits et alkylés en Gu.HCl 6 M	74 600	76 000
Tamissage moléculaire		
1 - Chromatographie		
- Sephadex G-100	74-78 000	76 000
- Sephadex G-200	76 000	76 000
2 - "Disc-electrophoresis"	75 000	77 000
Viscosité intrinsèque en milieu Gu.HCl 6 M (protéides réduits et alkylés)	74 700	77 500
S [°] _{20,Gu.HCl} (protéides réduits et alkylés)	75 400	78 100
Combinaison de et de S [°] _{20,w}	74 000	77 500
Dosage du fer	75 980	75 980
Moyenne	75 200	76 700

due, d'une part, à une chaîne polypeptidique légèrement plus longue de 7 ou 8 acides aminés dans la LTF, ce qui représente une masse d'environ 800 daltons, et d'autre part, à la partie glycanique, la LTF possédant 4 résidus de fucose, la STF n'en possédant pas, ce qui représente une masse de 700 daltons environ, le total faisant 1500 daltons.

Cette différence de masse moléculaire est visible en électrophorèse en gel de polyacrylamide en SDS (fig. 22 p. 92).

5 - La tendance marquée de la LTF à former des agrégats aux concentrations élevées explique la diversité des valeurs de masse moléculaire citées dans la littérature.

En conclusion, on peut dire que la lactotransferrine et la sérotransferrine humaines sont deux protéides très voisins du point de vue structural et on peut postuler avec QUERINJEAN et al. (193), FEENEY et ALLISON (194) et AISEN et LEIBMAN (195) qu'il est probable qu'ils dérivent d'une même protéine ancestrale et se seraient différenciés par la suite en fonction de rôles biologiques différents.

Nous poursuivons actuellement nos travaux sur la lactotransferrine pour apporter la preuve chimique de sa monocaténarité par identification des acides aminés N et C terminaux. De plus, la détermination de la séquence peptidique de la partie N terminale, la fonction αNH_2 de l'acide aminé N terminal de la LTF étant masquée par un résidu N-acetyl (*) permettra par comparaison avec celle de la STF, de préciser si la chaîne peptidique de la LTF résulte d'un allongement de la chaîne de la STF.

(*) résultats non publiés.

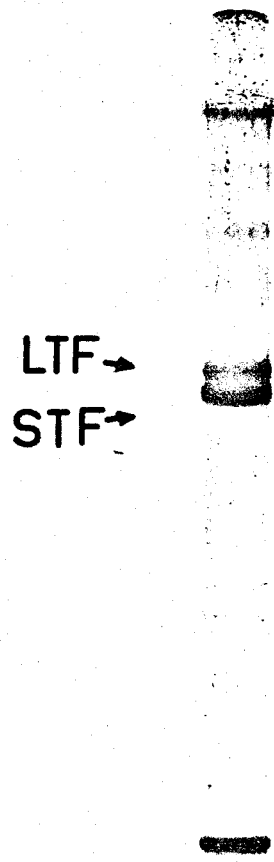


Figure 22 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la LTF et de la STF en S.D.S. selon la méthode de NEVILLE.

BIBLIOGRAPHIE

- AISEN P. et LEIBMAN A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 257, 314 (18-19-123-168-195)
- BEZKOROVAINY A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 127, 535 (39-66-74-164-167)
- BEZKOROVAINY A. et GROHLICH D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 147, 497 (40-57-59-67-73-97-101-117-160-162-169)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D. et GERBECK C.M., *Biochem. J.*, 1968, 110, 765 (41-68-114)
- BEZKOROVAINY A. et RAFELSON M.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, 107, 302 (38-65-71)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M.E. et LIKHITE V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 103, 371 (37-70-190)
- BLANC B., Thèse Doct. ès Sci., 1964, Ed. Médecine et Hygiène, Genève (3-11)
- BLANC B. et ISLIKER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 929 (10-27-125)
- BLANC B. et ISLIKER H., *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1961, 19, C₁₃ (26)
- BLANC B. et ISLIKER H., *Helv. Chim. Acta*, 1963, 46, 2905 (17)
- BRAZIER J., résultats non publiés
- CASTELLINO F.J. et BARKER R., *Biochemistry*, 1968, 7, 2207 (183)
- CHARET P., Thèse Doct. 3e Cycle, 1970, Lille (106)
- CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G. et MONTREULL J., *C.R. Acad. Sci.*, 1969, 269, 1019 (107)
- CHARLWOOD P.A., *Biochem. J.*, 1963, 88, 394 (42-74-165-170-189)
- CHARLWOOD P.A., *Biochem. J.*, 1971, 125, 1019 (43)
- CHARLWOOD P.A., *Biochem. J.*, 1973, 133, 749 (44)
- CHERON A., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25 (15)
- CHERON A., Résultats non publiés (134)
- CHERVENKA C.H., *Annal. Biochem.*, 1970, 34, 24 (150-151)
- CRESTFIELD A.M., MOORE S. et STEIN W.H., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 522 (137)
- DESCAMPS G., Thèse Doct. ès Sci., 1974, Lille (131-132)
- DREYFUS J.C., *Traité de Biochimie Générale*, 1967, Tome III, fasc. 1, 545 (4)
- DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G., "Le Fer", l'Expansion Scientifique Française ed., 1958 (2)

- FEENEY R.E. et ALLISON R.G., *Evolutionary Biochemistry of Proteins*, Wiley-Interscience, New-York, 1969, 171 (122-194)
- GEHATIA M. et KATCHALSKI E., *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, 1334 (144)
- GOT R., GOUSSAULT Y. et FONT J., *Carbohydrate Res.*, 1966, 3, 157 (115)
- GREENE F.C. et FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1968, 7, 1366, (116-177-192)
- HADE E.D.K. et TANFORD C., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, 89, 5034, (182)
- HAGEL P., GERDING J.J.T., FIEGGEN W. et BLOEMENDAL H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 243, 366 (153)
- HEILMEYER L., KEIDERLING W. et WOHLER F., *Klin. Wschr.*, 1957, 35, 690 (6)
- HUDSON B.G., OHNO M., BROCKWAY W.J. et CASTELLINO F.J., *Biochemistry*, 1973, 12, 1047 (184)
- JANOFF A. et SWEIFACH B.W., *J. Exp. Med.*, 1960, 112, 23 (7)
- JEPPSON J., *Acta Chem. Scand.*, 1967, 21, 1686 (108)
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1960, 14, 510 (23)
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1969, 23, 683 (55-174)
- LAURELL C.B., *Pharmacol. Revs.*, 1952, 4, 371 (1)
- LEGER D., *D.E.A. Biochimie*, 1972, Lille (136-152)
- MANN K.G., FISH W.W., COX A.C. et TANFORD C., *Biochemistry*, 1970, 9, 1348 (37-51-58-60-69-80-98-100-113-118-159-161-172-180-191-187)
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., in PEETERS J., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier ed., Amsterdam, 1966, 14, 133 (12)
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1968, 6, 579 (20-85)
- MAZURIER-DEHAINE C., *Thèse Doct. 3e Cycle*, 1973, Lille (14)
- MAZURIER J. et SPIK G., *Résultats non publiés* (102-155)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BISERTE G. et DAUTREVAUX M., *Experientia*, 1965, 21, 254 (30-94-112-158)
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G. et LEROY N., *C.R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 4065 (28-93-111)
- MONTREUIL J. et MULLET S., *C.R. Soc. Biol.*, 1959, 153, 1364 (22-24-129)
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 45, 413 (9-16-25-29-46-52-76-82-124-130-135)
- ORAM J.D. et REITER B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 170, 351 (13)
- PALMOUR R.M. et SUTTON H.E., *Biochemistry*, 1971, 10, 4027 (50-81-119-171-178-188)

- QUERINJEAN P., MASSON P.L. et HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1971, 20, 420 (56-86-96-103-109-120-121-156-176-193)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G. et SEAL U.S., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 4907 (45-75-166-173-186)
- ROOP W.E. et PUTMAN F.W., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 2502 (127)
- SCHADE A.L. et CAROLINE L., *Science*, 1946, 104, 340 (5-21)
- SCHERAGA H.A. et MANDELKERN L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, 75, 179 (148-179)
- SCHULTZE H.E., GOLLNER I., HEIDE K., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G., *Z. Naturf.*, 1955, 106, 463 (64)
- SIHMA R., *J. Phys. Chem.*, 1940, 44, 25 (138)
- SPIK G., Thèse Doct. ès Sci., 1968, Lille (35-47-53-62-77-83-87-90-99-104-110-113-157)
- SPIK G., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, A81 (8-36-48-54-63-79-84-88-91-175)
- SPIK G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 2186 (34-105)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *C.R. Séances Soc. Biol.*, 1966, 160, 94 (32)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *International Symposium IV. Chromatographie-Electrophorese, Bruxelles*, 1968, 386 (31)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Résultats non publiés (49-89-92)
- SURGENOR D.M., KOEHLIN B.A. et STRONG L.E., *J. Clin. Investig.*, 1949, 28, 73 (128)
- SVEDBERG T. et PEDERSEN K.O., *The Ultracentrifuge*, London, 1940, Oxford University Press, p. 51 (142)
- TANFORD C., *Advan. Protein. Chem.*, 1968, 23, 121 (61)
- TANFORD C., KAWAHARA K. et LAPANJE S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 729 (139-140-141-145-146-147-154-181)
- TANFORD C. et NOSAKI Y., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 736 (126)
- TELLER D.C., *Meth. in Enzymology*, 1973, 27, part D, 437 (185)
- TRAUTMAN R. et SCHUMAKER V.N., *J. Chem. Phys.*, 1954, 22, 551 (143)
- YPHANTIS D.A., *Biochemistry*, 1964, 3, 297 (149)