

50376
1975
123

50376
1975
123

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

PAR

Monsieur Pierre CHARET

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DE LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE :

1° STRUCTURE DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE
ENZYMATIQUE.

2° ISOLEMENT ET ÉTUDE DES 9 PEPTIDES LIBÉRÉS PAR ACTION
DU BROMURE DE CYANOGENE



PRÉSENTÉ LE 3 JUILLET 1975, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J. MONTREUIL President

P. JOLLES

G. BISERTE

M. MONSIGNY

G. SPIK

} Rapporteurs

Examineur

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie
Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I
(Laboratoire Associé au C.N.R.S., n° 217 : Biologie physico-chimique
et moléculaire des glucides libres et conjugués) sous la direction
du Professeur Jean MONTREUIL.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I

Vos qualités scientifiques, la clarté de votre enseignement ont toujours provoqué mon admiration.

Je vous suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accordé votre confiance en me donnant le soin de réaliser ce travail.

Soyez remercié et croyez en ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur P. JOLLES

Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Votre autorité scientifique, votre personnalité, me font réclamer votre indulgence.

Je tiens à vous assurer de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur G. BISERTE

Professeur à l'Université du Droit et de la Santé de Lille

Vous avez toujours suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance.

Soyez remercié et croyez en mon profond respect.

A Monsieur M. MONSIGNY

Maître de Conférences à l'Université des Sciences d'Orléans

Tu m'as initié à la chimie des protéines, et m'as permis de mener à bonne fin une partie de ce travail.

Crois en ma sincère reconnaissance.

A Mademoiselle G. SPIK

Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I

Tu as guidé mes premiers pas dans le laboratoire, et m'as permis de continuer un travail que tu avais largement entamé.

Je te remercie et t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes conseils précieux.

J'adresse mes plus vifs remerciements :

A Madame P. JOLLES, qui m'avez toujours accueilli avec gentillesse, et
avez largement contribué à l'aboutissement de certaines recherches.

A Messieurs K.K. HAN et D. TETAERT, qui m'ont fait bénéficier de leur
grande compétence.

A Monsieur le Professeur M. GOUEMAND, Directeur du Centre Régional de
Transfusion Sanguine, qui nous a généreusement fourni la fraction IV
de COHN.

A tous les membres du Laboratoire et plus particulièrement à A. CHERON
et B. FOURNET dont la collaboration m'a été très précieuse.

A Messieurs P. TIMMERMAN, Y. LEROY et J.P. DECOTTIGNIES pour leur colla-
boration technique.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS,
DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOUGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique

M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
M ^{lle} DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M ^{me} EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M ^{lle} KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
M ^{lle} LEGRAND Denise	Algèbre
M ^{lle} LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique

M. SOMME Jean
Mlle SPIK Geneviève
M. STANKIEWICZ François
M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WATERLOT Michel
M. WERNIER Georges
M. YVON Jean-Pierre
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Géographie
Biochimie
Sciences Economiques
Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Géologie Générale
Informatique
Analyse Numérique
Algèbre

INTRODUCTION 1

--oo 0 oo--

GENERALITES 5

--oo 0 oo--

I - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 6

A - Fixation du fer sur la transferrine 7

B - Détermination de la masse moléculaire 9

C - Composition en glucides 9

D - Composition en acides aminés 13

E - Polymorphisme de la transferrine 13

II - ROLE BIOLOGIQUE DE LA TRANSFERRINE 16

A - Répartition et métabolisme de la transferrine 16

B - La transferrine et le métabolisme du fer 17

C - Activité bactériostatique 17

D - Transport de l'acide folique 19

E - Stimulation de la synthèse de l'ADN et de la mitose 19

F - Rôle de la sérotransferrine dans la reconnaissance des
cellules cibles et mécanisme de transfert du fer 20

III - STRUCTURE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE 23

A - Structure de la protéine 23

B - Modalités de l'attache glycanne-protide 27

C - Structure de la fraction glycanne 29

TRAVAUX PERSONNELS

38

--oo 0 oo--

CHAPITRE I

--oo 0 oo--

PREPARATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

DE LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE

39

--oo 0 oo--

I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	39
A - Matériel	39
B - Préparation de la sérotransferrine	39
C - Purification sur DEAE-Séphadex	42
D - Chromatographie sur gel de Séphadex G-75	42
E - Contrôle de pureté	42
F - Désaturation de la transferrine	43
G - Composition chimique	43
H - Détermination de la nature des extrémités terminales	45
II - <u>RESULTATS</u>	48
A - Isolement de la sérotransferrine	48
B - Présence de substances micromoléculaires dans les préparations de transferrine	49
C - Composition chimique	52
D - Recherche des extrémités N et C terminales	56
E - Conclusions	58

CHAPITRE II

==00 0 00==

ISOLEMENT ET SEQUENCES PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA TRANSFERRINE

59

==00 0 00==

HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE

60

==00 0 00==

I - MATERIEL ET METHODES

61

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

61

A - Hydrolyse trypsique

61

B - Fractionnement de l'hydrolysate trypsique

64

C - Détermination de la composition chimique des glycopeptides

66

PROCEDES DE DETERMINATION

DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

66

A - Détermination de la masse moléculaire par dosage des groupements NH_2 libres

66

B - Rupture des ponts disulfures

67

C - Identification des amino-acides N-terminaux

68

D - Identification et dosage des amino-acides C-terminaux

70

E - Méthode de rupture spécifique des chaînes peptidiques

72

II - <u>RESULTATS</u>	73
<u>ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	73
A - Isolement des glycopeptides à partir des hydrolysats trypsiques de l'apotransferrine	73
B - Propriétés électrophorétiques et composition des glycopeptides	74
C - Purification du glycopeptide B	80
D - Conclusions	82
<u>DETERMINATION DES SEQUENCES</u>	
<u>PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES</u>	84
A - Séquence peptidique du glycopeptide A	84
B - Séquence peptidique du glycopeptide BOb	90
C - Conclusion	91
 --oo 0 oo--	
HYDROLYSE PAR LA CHYMOTRYPSINE	93
 --oo 0 oo--	
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	93
A - Isolement des glycopeptides	93
B - Procédés de détermination des séquences peptidiques	95
II - <u>RESULTATS</u>	97
A - Isolement des glycopeptides	97
B - Propriétés électrophorétiques et composition des glycopeptides	99

C - Détermination des séquences peptidiques des glycopeptides	101
D - Conclusions	103

==00 0 00==

HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE	105
-------------------------------	-----

==00 0 00==

I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	105
---------------------------------	-----

A - Hydrolyse par la thermolysine	105
-----------------------------------	-----

B - Action de la neuraminidase	105
--------------------------------	-----

C - Electrophorèse sur papier à haute tension	105
---	-----

D - Détermination des séquences peptidiques	106
---	-----

II - <u>RESULTATS</u>	106
-----------------------	-----

A - Isolement des glycopeptides	106
---------------------------------	-----

B - Séquences peptidiques	109
---------------------------	-----

C - Conclusions	109
-----------------	-----

==00 0 00==

CONCLUSIONS GENERALES	113
-----------------------	-----

==00 0 00==

CHAPITRE III

==00 0 00==

ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR

LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE

115

==00 0 00==

ISOLEMENT ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES 9

PEPTIDES LIBERES PAR ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

116

--oo 0 oo--

I - MATERIEL ET METHODES

116

A - Matériel

116

B - Coupure par le bromure de cyanogène

116

C - Fractionnement des peptides libérés

119

D - Propriétés physico-chimiques des peptides et glycopeptides

120

II - RESULTATS

121

A - Chromatographie sur Séphadex G-75

124

B - Etude de la fraction CN-A

124

C - Etude de la fraction CN-B

129

D - Etude de la fraction CN-C

131

E - Etude de la fraction CN-D

132

F - Conclusions générales

134

--oo 0 oo--

ETUDE DES DEUX GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR

ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

SEQUENCE PEPTIDIQUE COMPLETE DES PEPTIDES

CN-7, CN-8 ET CN-9

135

--oo 0 oo--

I - MATERIEL ET METHODES

135

A - Etude des glycopeptides	135
B - Détermination des séquences peptidiques	136
C - Hydrolyse enzymatique du peptide CN-7	137
II - <u>RESULTATS</u>	138
A - Etude du glycopeptide CN-1	138
B - Etude du glycopeptide CN-2	139
C - Séquence peptidique du peptide CN-7	140
D - Séquence peptidique des peptides CN-8 et CN-9	144
E - Conclusions	144

--oo 0 oo--

CONCLUSIONS GENERALES	146
-----------------------	-----

--oo 0 oo--

BIBLIOGRAPHIE	151
---------------	-----

--oo 0 oo--

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

--oo 0 oo--

Dès notre entrée, en 1967, dans son Laboratoire, le Professeur MONTREUIL nous a confié la tâche de poursuivre les travaux commencés par Mademoiselle G. SPIK concernant la structure de la transferrine sérique humaine.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de deux grands thèmes de recherche développés au Laboratoire :

1°) étude des transferrines et des problèmes liés au fer dans l'organisme ;

2°) étude des glycoprotéines : structure et métabolisme.

Dans une première série de travaux, nous nous sommes limité à l'étude de la structure de la fraction glucidique et aux séquences peptidiques au voisinage du point d'attache des groupements glycaniques sur la protéine. A cet égard, nous avons entrepris de fractionner les hydrolysats protéinasiques de la transferrine dans le but :

1°) d'obtenir les deux groupements glycaniques qui existent dans la molécule, JAMIESON (1) et SPIK et al. (2) (3) (4), en tirant parti d'éventuelles différences dans la composition des chaînes peptidiques qui leur sont associées ;

2°) de déterminer les séquences d'acides-amino au voisinage du point d'attache glucide-protide.

En effet, à l'époque, les connaissances concernant le second problème se limitaient à la mise en évidence des séquences Ser-Asn et Asn-Lys de deux glycopeptides isolés d'hydrolysats pronasiques (SPIK et al.) (5) (6). Afin d'obtenir des séquences peptidiques plus longues et des coupures plus spécifiques, nous avons substitué la trypsine, la chymotrypsine et la thermolysine à la pronase.

Parallèlement, le groupe responsable de l'étude des structures glycaniques (G. SPIK, B. BAYARD, B. FOURNET, G. STRECKER, S. BOUQUELET) (7) déterminait la structure complète des glycannes de la transferrine.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de localiser chacun des glycannes sur la molécule de transferrine et de préciser sa séquence primaire.

Dans ce but, nous avons entrepris de séparer et d'étudier les peptides et glycopeptides libérés par l'action du bromure de cyanogène sur la transferrine sérique humaine.

Ce procédé est un des moyens les plus efficaces dans la détermination d'une structure peptidique complète dont il constitue généralement la première étape.

Les résultats que nous avons obtenus ont été rassemblés dans les mémoires suivants :

- 1 - M. MONSIGNY, P. CHARET, G. SPIK et J. MONTREUIL - Recherche sur la structure de la transferrine humaine - Etude des peptides et glycopeptides obtenus par hydrolyse tryptique, Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1969, 77, 750.

- 2 - P. CHARET, M. MONSIGNY, G. SPIK et J. MONTREUIL - Etude des séquences peptidiques de deux glycopeptides isolés d'hydrolysats tryptiques de la transferrine humaine, C.R. Acad. Sci. Paris, 1969, 269 D, 1019.

- 3 - P. CHARET, G. SPIK et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéines XLV - Séquences peptidiques complètes des glycopeptides A et B isolés d'hydrolysats tryptiques de la transferrine humaine, C.R. Acad. Sci., 1971, 273 D, 422.

- 4 - P. CHARET et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéines XLVI - Etude des séquences peptidiques de deux glycopeptides isolés des hydrolysats chymotrypsiques de la transferrine humaine, C.R. Acad. Sci., 1971, 273 D, 533.

- 5 - P. CHARET, D. TETAERT, Kia-Ki HAN et J. MONTREUIL - Etudes sur les glycoprotéines - LI - Détermination de la séquence peptidique du glycopeptide B isolé des hydrolysats chymotrypsiques de la transferrine sérique (sérotransferrine) humaine, C.R. Acad. Sci., 1973, 276 D, 1629-1630.

- 6 - G. SPIK, R. VANDERSYPPE, B. FOURNET, B. BAYARD, P. CHARET, S. BOUQUELET, G. STRECKER and J. MONTREUIL - Structure of glycopeptides isolated from human serotransferrin and lactotransferrin - Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Ed. CNRS, Paris, 1974, 483-500.

- 7 - G. SPIK, B. FOURNET, B. BAYARD, R. VANDERSYPPE, G. STRECKER, S. BOUQUELET, P. CHARET et J. MONTREUIL - Structure des groupements glycaniques de la séro et de la lactotransferrine humaine, Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1974, 82, 29.

- 8 - J. JOLLES, P. CHARET, P. JOLLES et J. MONTREUIL - Séquence studies concerning human serum transferrin : the primary structure of two cyanogen bromide fragments, Febs letters, 1974, 46, 276-280.

- 9 - P. CHARET - Etudes sur les glycoprotéines - Isolement et propriétés physico-chimiques des 9 peptides libérés par action du bromure de cyanogène sur la transferrine sérique humaine, C.R. Acad. Sci., 1975, (sous presse).

Ces deux dernières publications sont postérieures à un mémoire de SUTTON et BREW (8) qui décrit l'isolement et les propriétés physico-chimiques de 7 peptides libérés par action du bromure de cyanogène. Or, d'après le nombre de résidus de méthionine présents dans la transferrine, le bromure de cyanogène doit libérer 9 peptides. Dans nos deux derniers mémoires, nous décrivons l'isolement de ces 9 peptides ainsi que la séquence peptidique de deux d'entre eux.

Le but de cette introduction était de bien définir les objectifs de nos recherches et de préciser le plan de notre mémoire.

Nous présenterons, à présent, après un bref historique concernant la transferrine :

- 1°) la préparation et les propriétés chimiques de ce composé ;
- 2°) l'isolement et la structure de glycopeptides obtenus à partir d'hydrolysats protéinasiqes ;
- 3°) l'isolement et les propriétés physico-chimiques des 9 peptides libérés par le bromure de cyanogène ainsi que la séquence peptidique de trois d'entre eux.

GENERALITES

—oo 0 oo—

Il n'entre pas dans notre intention de faire une revue générale complète et détaillée des travaux qui ont été effectués sur la transferrine sérique ou sérotransferrine (STF), mais d'apporter les informations nécessaires :

1°) à l'interprétation de nos résultats ;

2°) à la justification de nos recherches.

Chez l'homme, comme chez de nombreux animaux, la sérotransferrine est une glycoprotéine dont le principal rôle est de transporter le fer au travers de tout l'organisme. On la trouve à la concentration d'environ 2 g par litre dans le sang humain. Mais elle existe aussi dans de nombreux liquides biologiques, comme les urines, le liquide céphalo-rachidien, le lait, la bile, les sécrétions nasales, la salive, la lymphe, ainsi que dans de nombreux tissus, notamment le foie et le rein. D'autre part, des glycoprotéines analogues, mais non identiques, possèdent cette propriété de transporter le fer, en particulier, la lactotransferrine du lait et la conalbumine ou ovotransferrine du blanc d'oeuf.

I - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La STF humaine est obtenue avec les meilleurs rendements à partir de préparations enrichies provenant de fractionnement du plasma par le procédé à l'éthanol de COHN et coll. (9) ou par le procédé au rivanol de HOREJSI et SMETANA (10).

Dans les laboratoires de la firme BÉHRINGWERKE, SCHULTZE et coll. ont mis au point plusieurs procédés généraux de fractionnement du sérum qui associent le relargage par les sels neutres et par l'éthanol, la

précipitation au rivanol, la chromatographie préparative d'absorption et d'échanges d'ions, l'électrophorèse préparative de convection ou sur gels divers. Ils obtiennent ainsi, à l'échelle industrielle, de la STF à 99 p. 100 de pureté.

A - FIXATION DU FER PAR LA TRANSFERRINE

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

1 - FIXATION DU FER ET DE DIVERS METAUX

La propriété que possède la STF de fixer le fer a été mise en évidence pour la première fois par SCHADE et CAROLINE (11).

Un peu plus tard, HOLMBERG et LAURELL (12) démontrent que, dans le plasma, la STF fixait uniquement le fer. Mais d'autres auteurs et notamment JONES et PERKINS (13) ont montré que la STF pouvait, in vitro, fixer les ions comme le calcium, le cuivre, le zinc, le cobalt.

2 - CAPACITE DE FIXATION DU FER

Actuellement, tous les auteurs s'accordent pour affirmer que la STF fixe 2 ions ferriques par molécule de glycoprotéine. Les ions ferreux ne sont pas apparemment fixés, bien que récemment BATES, WORKMAN et SCHLABACH (14) affirment que la transferrine possède une activité ferroxidasique et que ce sont les ions ferreux qui sont d'abord fixés, puis oxydés en ions ferriques.

3 - CONDITIONS DE FIXATION DU FER

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

a) le complexe fer-STF se dissocie réversiblement en milieu acide ;

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

c) la présence d'ions bicarbonates favorise et stabilise cette dernière. L'intervention d'une molécule de bicarbonate pour la formation du complexe coloré est commune à toutes les transferrines, SCHADE, REINHART et LEVY (15) et WARNER et WEBER (16).

4 - MODALITES DE FIXATION DU FER

a) Il est bien démontré que la transferrine fixe 2 ions ferriques en 2 sites bien distincts. Des études de spectre de résonnance paramagnétique électronique effectuées récemment sur la STF et sur l'ovotransferrine par AASA (17) et AISEN, LANG et WOODWORTH (18) ont montré que les 2 sites n'étaient pas rigoureusement identiques. Ces 2 sites se trouvent l'un par rapport à l'autre sur la STF et sur l'ovotransferrine à une distance de l'ordre de 4,3 nm d'après LUK (19).

b) La fixation du fer s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs amino-acides de la chaîne peptidique. Actuellement, on admet la participation de la fonction phénolique de la tyrosine à la fixation du fer à raison de 3 résidus de cet acide aminé par atome de fer, sur la base de résultats obtenus par des méthodes physiques et chimiques.

La participation d'atomes d'azote dans la liaison fer-STF est également certaine. Ces atomes n'étant pas ionisés à pH 7 proviendraient de résidus d'histidine.

Des expériences de blocage d'histidine par l'acide bromoacétique (BEZKOROVAINY et GROHLICH) (20) ou par le pyrocarbonate d'éthyle (KRISTEVA, MAZURIER et al.) (21) sont en faveur de la participation de 2 résidus d'histidine par atome de fer.

Des résultats voisins ont été obtenus par des méthodes physiques

comme l'indique la revue générale récente de BEZKOROVAINY (22).

c) L'intervention du bicarbonate dans la fixation du fer est également certaine, à raison d'un ion bicarbonate par atome de fer fixé, aussi bien dans la STF humaine que dans la lactotransferrine et l'ovo-transferrine. L'ion bicarbonate jouerait d'ailleurs un rôle important dans le transfert du métal aux cellules cibles.

Cet ensemble de résultats permet de penser que le fer est lié à la chaîne peptidique selon une structure hexacoordinée.

Quant à la différence de réactivité des deux sites de fixation, elle n'est pas encore démontrée. Toutefois, il est acquis que la fixation du fer modifie la forme et les propriétés de la molécule et stabilise celle-ci, notamment vis-à-vis de l'action des protéinases, SPIK (23) et SPIK et MONTREUIL (24).

B - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

Les résultats concernant la masse moléculaire de la sérotransferrine ont pendant longtemps été très dispersés comme le montrent les valeurs rassemblées dans le tableau I (p.10).

Mais les résultats les plus récents obtenus au Laboratoire par LEGER, SPIK et al. (25) par une étude critique des différentes méthodes de détermination permettent d'attribuer à la STF une masse moléculaire de 75200 ± 2000 daltons.

Ces résultats confirment ceux obtenus par SPIK (25) et, plus récemment, par MANN, FISH et al. (26).

C - COMPOSITION EN GLUCIDES

La nature glycoprotéinique de la STF a été démontrée dès 1952

Tableau I

Valeurs de la masse moléculaire de la sérotransferrine humaine

	STF							
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
Constantes de sédimentation et de diffusion	91000 82000	-	73800	90000	77600	-	-	75400
Equilibre de sédimentation	114000	68000	73400	-	72900	76600	76200	75000
Chromatographie de filtration sur gel	-	-	-	-	76000	-	78000	76000
Electrophorèse en gel de polyacrylamide	-	-	-	-	-	-	81000	75000
Titration du fer	93000	-	74100	-	75980	-	-	-
Viscosité intrinsèque et constante de sédimentation	-	-	-	-	-	79300	-	74000
Viscosité intrinsèque	96000	-	-	-	-	78300	-	74700

(a) BEZKOROVAINY, RAFELSON et LIKHTE (27) ; BEZKOROVAINY et RAFELSON (28) ; BEZKOROVAINY (29) ; BEZKOROVAINY et GROHLICH (30).

(b) CHARLWOOD (31).

(c) ROBERTS, MAKEY et SEAL (32).

(d) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (33).

(e) SPIK (34) ; SPIK et MONTREUIL (35) ; SPIK (36).

(f) MANN, FISH, COX et TANFORD (38).

(g) PALMOUR et SUTTON (39).

(h) LEGER, SPIK, VERBERT, DUPIRE, MONTREUIL et LOUCHEUX (40).



par KOECHLIN (41) et par SURGENOR, KOECHLIN et STRONG (42) qui ont trouvé un taux d'oses neutres de 1,8 p. 100.

1 - COMPOSITION CENTESIMALE

La première détermination complète de la composition centésimale en glucides de la STF a été effectuée par SCHULTZE, GOLLNER et coll. (43). D'autres travaux furent réalisés par la suite et nous avons rassemblé dans le tableau II (p.12) les résultats obtenus par les auteurs. L'examen de ces tableaux montre, par exemple, qu'à côté de 2,3 p. 100 d'oses neutres, il existe 2 p. 100 d'hexosamines et 1,35 p. 100 d'acide sialique.

Les résultats donnés par différents auteurs révèlent très peu de différences puisque les valeurs en oses neutres oscillent entre 2,3 et 2,8 p. 100, les valeurs en acides sialiques entre 1,2 et 1,4, des différences plus grandes apparaissent dans les valeurs données pour les hexosamines : 1,3 à 2. Cette discordance peut s'expliquer par la présence du fer dans la STF, celui-ci catalysant notablement la destruction des osamines lors de l'hydrolyse (MONTREUIL et SPIK) (44).

2 - COMPOSITION MOLAIRE

Les oses neutres ont été identifiés pour la première fois par chromatographie sur papier au galactose et au mannose par SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et coll. (45) en 1958. En outre, ces auteurs ont signalé la présence de traces d'acide uronique et de fucose, mais ces résultats ne reçurent ultérieurement aucune confirmation. La présence de galactose et de mannose a été vérifiée en 1961 par MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (46), puis par JAMIESON (47) en 1964. L'osamine a été identifiée, pour la première fois, à la glucosamine et l'acide sialique à l'acide N-acétyl-neuraminique en 1961 par MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (48). Ce dernier résultat concernant l'acide sialique a

Tableau II

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

Hexoses (a)	Fucose	Osamines (b)	Acides sialiques (c)	Acides uroniques	Références
2,4	0,07	1,7-2	1-1,4	0,05	SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et coll., 1958 (49)
2,4	0,07	2	1,4	-	HEIMBURGER, HEIDE et coll., 1964 (50)
2,8	-	1,8	1,2	-	BEZKOROVAINY, RAFELSON et coll., 1963 (51)
2,5	-	1,3	1,4	-	JONES et PERKINS, 1965 (52)
2,6	-	-	1,3	-	JAMIESON, 1964 (53)
2,3 (d)	-	1,98 $\begin{pmatrix} d \\ e \end{pmatrix}$	1,43	-	SPIK, 1968 (54)

(a) Galactose + mannose.

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

(c) Exprimée en acide N-acétylneuraminique.

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

(e) L'osamine est la glucosamine.



été confirmé par JAMIESON (55) en 1966. Le tableau III (p.14) donne les derniers résultats obtenus par SPIK (56) au Laboratoire.

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

D - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les premiers dosages d'acides aminés de la STF ont été effectués par SCHULTZE, HEIDE et MULLER (57) en 1957. Ils ont été répétés à plusieurs reprises par de nombreux auteurs et nous avons fait figurer dans le tableau IV (p.15) les résultats les plus récents.

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

E - POLYMORPHISME DE LA TRANSFERRINE HUMAINE

Le manque d'homogénéité des résultats concernant les propriétés physico-chimiques de la STF peut s'expliquer dans une certaine mesure par le polymorphisme de ce protide qui a été révélé par SMITHIES (58) en 1957 à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon.

Cet auteur montre que, en plus de la bande habituelle de trans-

Tableau III

Composition molaire en oses de la
transferrine suivant différents auteurs

	SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT (1958) (59)	JAMIESON (1965) (60)	SPIK (1974) (61)
	(a)	(b)	(c)
Galactose	8	4	5
Mannose	4	8	6
Fucose	1	-	-
N-acétyl glucosamine	8	8	8
Acide N-acétyl neuraminique	4	4	3 ou 4

(a) Pour une masse moléculaire de 88000.

(b) Pour une masse moléculaire de 90000.

(c) Pour une masse moléculaire de 76000.



Tableau IV

Composition molaire en amino-acides de la sérotransferrine
humaine suivant différents auteurs

Acides aminés	(a)	(b)	(c)	(d)
Asp	77	81	75	71
Thr	30	30	27	25
Ser	42	40	37	35
Glu	62	58	60	53
Pro	33	30	30	36
Gly	48	54	46	46
Ala	55	59	53	51
$\frac{1}{2}$ Cys	30	32	38	30
Val	41	43	40	40
Met	5	4	7-8	7-8
Ile	15	14	14	14
Leu	58	57	56	52
Tyr	26	24	21	24
Phe	29	28	26	27
Try	7	9	-	-
Lys	54	51	57	49
His	17	19	19	17
Arg	20	24	25	23
Total	634	657	632	601
Masse moléculaire	76000	76600	76000	76700

(a) SPIK (62) ; MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (63) ; MONTREUIL, SPIK, MONSIGNY, DESCAMPS, BISERTE et DAUTREVAUX (64).

(b) MANN, FISH, COX et TANFORD (65).

(c) BEZKOROVAINY et GROHLICH (66).

(d) SUTTON et BREW (67).



ferrine désignée par les lettres C, il existe, dans certains sérums, une bande supplémentaire plus rapide (bande B) ou une bande plus lente D, qui ont été identifiées à de la STF.

Chacune des bandes B et D, présente, en outre, des variations de mobilité. On connaît actuellement 18 variants génétiques de la transferrine. Ces variants possèdent les caractères identiques suivants :

- 1 - Taux de fixation du fer (ALLISON) (68) ;
- 2 - Réactions immunologiques (ALLISON (69) ; PARKER et BEARN (70)) ;
- 3 - Teneur en acide sialique ;
- 4 - Constante de sédimentation (PARKER et BEARN) (71).

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

Bien que des différences existent également au niveau de la partie glucidique selon SPIK et al. (72) (73) ce qui explique les anomalies relevées au niveau de la composition molaire en oses neutres.

II - ROLE BIOLOGIQUE DE LA TRANSFERRINE

A - REPARTITION ET METABOLISME DE LA TRANSFERRINE

La STF constitue le véhicule du fer à travers tout l'organisme. Un individu normal possède de 10 à 11 g de transferrine dont 52 à 53 p. 100 sont extravasculaires selon AWAI et BROWN (74) et 56 à 62 p. 100 selon KATZ (75).

1 - LA TRANSFERRINE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES - La STF se trouve essentiellement dans le sang, à la concentration de 2 g par litre environ. Mais, d'après la revue générale de SPIK (76), la STF existe dans les urines

en quantité relativement importante et le taux augmente considérablement dans les cas de néphroses. La STF a également été identifiée dans le liquide céphalo-rachidien, dans le lait, où sa concentration est de l'ordre de 10 mg par litre, et aussi dans la bile, les sécrétions nasales, la salive, la lymphe. La présence de transferrine a également été mise en évidence par électrophorèse en gel d'amidon ou par la technique des anticorps fluorescents dans de nombreux tissus.

2 - METABOLISME DE LA TRANSFERRINE - La STF est essentiellement synthétisée dans le foie. Toutefois, d'après THEORBECKE (77), elle serait aussi fournie par la glande sous-maxillaire, la glande mammaire, les testicules et les ovaires. La quantité de STF catabolisée quotidiennement est de 1 g environ et sa demi-vie a été fixée entre 7 et 12 jours suivant les auteurs (voir, à cet égard, la thèse de G. SPIK) (78).

B - LA TRANSFERRINE ET LE METABOLISME DU FER

Nous n'exposerons pas en détail le métabolisme du fer, mais nous situons le rôle de la STF à l'aide du schéma de la figure 1 (p.18) emprunté à SPIK (79). Nous ajoutons que d'après FORTH et RUMMEL (80), l'entrée aussi bien que la sortie du fer dans la cellule duodénale sont contrôlées par des chélateurs micromoléculaires.

D'après OSAKI (81), l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique pour être fixé par la STF est contrôlé par la céruléoplasmine et la xanthine oxydase suivant le schéma de la figure 1 bis (p.18).

C - ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

L'activité bactériostatique a été mise en évidence in vitro

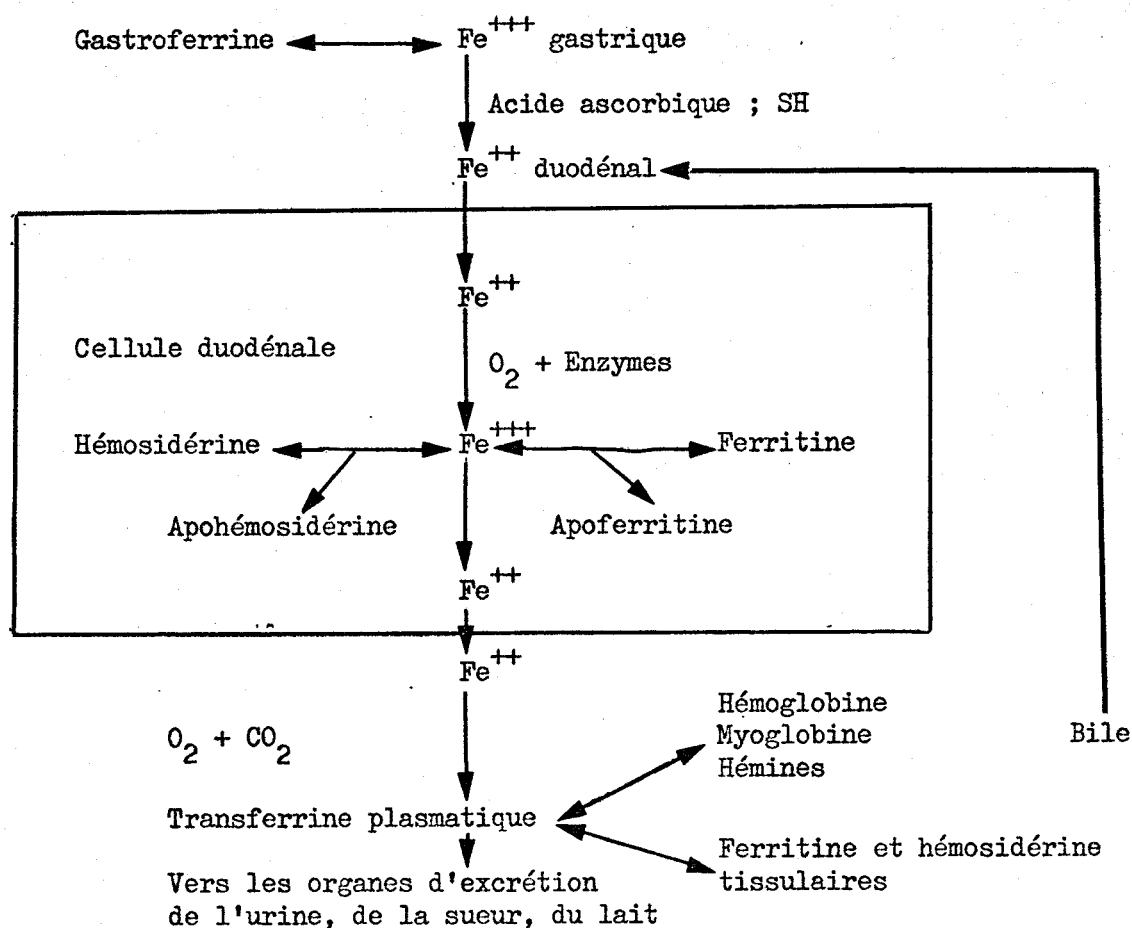


Figure 1

Rôle de la transferrine dans le métabolisme du fer, d'après SPIK (82).

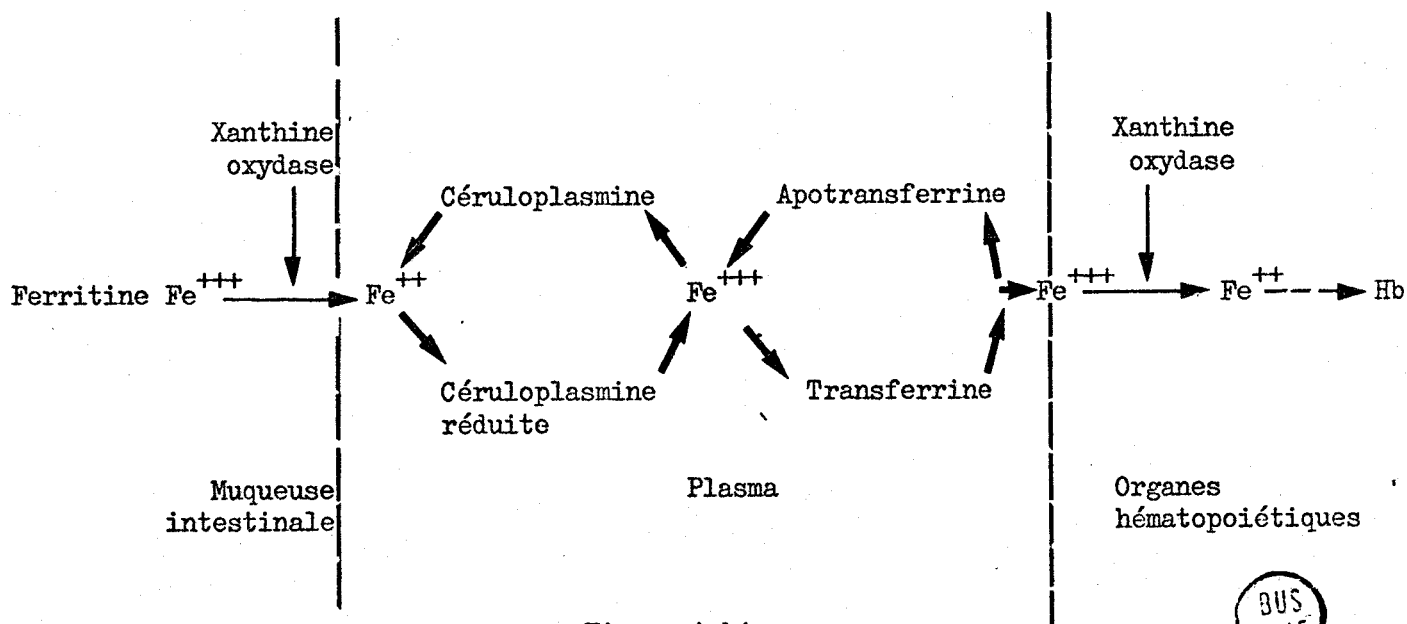


Figure 1 bis

Intervention de la céruléoplasmine et de la xanthine oxydase dans l'absorption et le transport du fer, d'après SEELIG (83).

BUS
LILLE

par SCHADE et CAROLINE (84) et par SCHADE (85).

Elle s'explique par une ferriprivation des milieux de culture. Toutefois, l'activité de la STF reste très faible in vivo, (MARTIN, JANDL et FINLAND) (86).

Etendue au virus, l'expérimentation montre que la STF inhibe puissamment la multiplication, en culture des tissus, des virus de la polyomyélite et les adénovirus. Elle est sans action sur les virus de la vaccine.

Le maximum d'activité bactériostatique serait obtenu par un mélange de STF, de fraction α_2 et d'immunoglobulines.

D - TRANSPORT DE L'ACIDE FOLIQUE

Récemment, MARKANNEN, VIRTANEN et al. (87), ont mis en évidence la propriété de la transferrine de transporter de l'acide folique, se situant ainsi comme le troisième transporteur après l' α_2 macroglobuline et l'albumine.

E - STIMULATION DE LA SYNTHÈSE DE L'ADN ET DE LA MITOSE

Les résultats obtenus par VOGT et al. (88) et ROBBINS et PEDERSON (89) indiquent que le fer joue un rôle important dans la mitose et la synthèse des ADN.

En 1972, TORMEY et al. (90) (91) montrent que, comme les phytohemagglutinines et les antigènes, la STF stimule la mitose des lymphocytes et que cet effet ne peut pas être reproduit avec des ions ferriques provenant de chlorure ferrique ; ces auteurs suggèrent que la transferrine intervient directement et qu'il existe, sur les lymphocytes, des sites récepteurs spécifiques.

F - ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LA RECONNAISSANCE DES CELLULES CIBLES
ET MECANISME DE TRANSFERT DU FER

On sait, depuis 1949 (WALSH, THOMAS et al.) (92) que la STF, en cédant son fer aux réticulocytes, joue un rôle important dans la biosynthèse de l'hémoglobine. Cependant, les mécanismes par lesquels la STF reconnaît les cellules cibles et cède son fer n'ont pas encore été élucidés. Des recherches éparses ont permis cependant, de parvenir aux conclusions suivantes :

1 - MECANISME SPECIFIQUE

Le complexe fer-STF est un complexe stable dans les conditions physiologiques et une dissociation spontanée est à exclure. Des expériences faites in vivo et in vitro, montrent que la STF se retrouve intacte après élimination du fer. Il s'agit donc d'un mécanisme spécifique.

2 - RECONNAISSANCE DES CELLULES CIBLES

Si le fer possède pour chacun des sites spécifiques de la STF une même affinité, chacun de ces sites joue biologiquement un rôle différent. En effet, par des expériences réalisées in vitro, FLETCHER et HUEHNS (93) (94) ont montré que les érythrocytes fixent de préférence le fer provenant d'un site de fixation tandis que l'autre site fournit son fer préférentiellement à des formes de stockage. Ceci a été confirmé in vivo par HAHN (95), en accord avec des expériences physiques démontrant la non-identité des 2 sites.

Dans tous les cas, il s'agit d'un phénomène de membrane qui a été principalement étudié à propos du passage du fer dans les cellules. Il a, en effet, été démontré que la STF chargée en fer se fixait sur les membranes de différents cellules : les réticulocytes, - qui ont fait

l'objet des principales recherches effectuées à ce jour -, les fibroblastes de hamster (MESMER) (96), et les cellules de moelle osseuse du rat d'après VERHOEF, KREMERS et LEIJNSE (97).

3 - PROTEINES MEMBRANAIRES IMPLIQUES DANS LE MECANISME DU PASSAGE DU FER DE LA STF DANS LE RETICULOCYTE

Les recherches ont porté jusqu'à présent sur les réticulocytes du Rat et du Lapin et les principaux résultats obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

a) les réticulocytes, contrairement aux érythrocytes matures, fixent la ferri-STF sur leurs membranes. Après le transfert du métal dans le cytoplasme, - où il est pris en charge par une protéine cytosolique de transport (protéine C) -, l'apotransferrine se détache de la membrane et repasse dans le plasma, voir à ce sujet les travaux de JANDL et KATZ (98), MORGAN et LAURELL (99), MORGAN (100) ;

b) d'après les travaux récents de EGYED (101), SCHULMAN, MARTINEZ-MEDELLIN et SIDLOI (102), et MORGAN et BAKER (103), les réticulocytes intacts ne peuvent détacher le fer que du complexe ternaire Fe-STF-bicarbonate, tandis que les hémolysats le détachent du complexe binaire Fe-STF. L'hypothèse suivante a donc été émise : le passage du fer dans le réticulocyte implique l'élimination préalable du "reste bicarbonate" du complexe ternaire. Cette seconde étape est enzymatique et n'a lieu qu'avec les cellules intactes ;

c) d'après les travaux de GARRETT, BURRISS-GARRETT et ARCHDEACON (104) et ceux plus récents de SPEYER et FIELDING (105) et FIELDING et SPEYER (106), le fractionnement chromatographique sur Sépharose de la solution obtenue par l'action du Triton X-100 sur des membranes de réticulocytes

préalablement incubés avec de la ^{59}Fe -STF fournit 3 protéides marqués par le ^{59}Fe : A, B₁ et B₂. Le composant B₂ de masse moléculaire 230.000 donne des complexes avec de la STF dont il serait le site de fixation sur la membrane. Les composants B₁ de masse moléculaire 1.000.000, puis A seraient des intermédiaires dans le mouvement du fer vers le composant cytosolique C ;

d) d'après VERHOEF, KREMERS et LEIJNSE (107), les réticulocytes de Lapin fixent indifféremment les STF du Lapin, du Rat ou de l'Homme, mais la quantité de fer "absorbée" par le réticulocyte est 2 fois supérieure avec la STF homologue.

4 - MECANISME MOLECULAIRE DE LA FIXATION DE LA STF SUR LES MEMBRANES RETICULOCYTAIRES

Actuellement, pratiquement rien n'est connu du mécanisme de la fixation de la STF sur les membranes réticulocytaires. Les seules informations acquises concernent :

a) le rôle des groupements SH dans le déroulement du phénomène : leur blocage n'affecte pas la fixation de la STF sur les membranes, mais inhibe le transfert du métal du composant B₂ au composant B₁, provoquant une accumulation du complexe fer-STF-récepteur B₂, voir à ce sujet les travaux de EDWARDS et FIELDING (108), MORGAN et BAKER (109) et FIELDING et SPEYER (110) ;

b) d'après KORNFELD (111) le blocage des groupements aminés de la STF provoque une diminution de son affinité pour les membranes, tandis que l'élimination de l'acide N-acétylneuraminique n'affecte pas profondément l'affinité de la STF pour celles-ci.

5 - CONCLUSIONS

Malgré les progrès certains effectués dans la connaissance du mécanisme du transport du fer à travers tout l'organisme, beaucoup reste encore à déterminer.

III - STRUCTURE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

Les résultats obtenus concernant la structure de cette glycoprotéine sont, jusqu'en 1967, peu nombreux puisque, à cette époque, on discutait encore du nombre de chaînes peptidiques de la fraction protéique. Seul le problème des modalités de la liaison glycanne-protide était résolu. Les travaux effectués par le groupe de SUTTON et par notre laboratoire, associé au groupe de P. JOLLES, ont fait avancer ce problème et il est à présent raisonnable d'envisager la détermination complète de la structure primaire de la STF dans un avenir relativement proche.

A - STRUCTURE DE LA PROTEINE

1 - NATURE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Un seul acide aminé N-terminal, la valine, a été identifié par de nombreux auteurs : GOLLNER en 1955 (112) ; PUTNAM en 1955 (113) ; MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (114) ; BEARN et PARKER en 1966 (115) ; JEPPSSON en 1967 (116) ; SPIK (117). Cependant, selon JEPPSSON (118), il existerait en plus des traces d'acide aspartique.

2 - NATURE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

SPIK (119) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (120) ont identifié la proline et le glycolle ainsi que des traces de sérine comme acides aminés C-terminaux. Nous avons nous-mêmes retrouvé et étendu ces résultats en identifiant, en plus, une cystine comme résidu C-terminal. Ce

résultat sera discuté dans la partie réservée aux travaux personnels.

3 - NATURE MONOCATENAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

La présence de plusieurs résidus C-terminaux est en opposition avec le fait que la STF possède un seul amino-acide N-terminal, d'autant plus que JEPPSSON (121) affirme que la rupture des ponts disulfures entraîne l'apparition de deux chaînes de masse moléculaire de 39.000 et 40.000. En outre, sur la carte peptidique de l'hydrolysate tryptique de l'une de ces deux sous-unités existe un peptide qui ne se révèle pas à la ninhydrine mais seulement avec le réactif de RYDON et SMITH. L'auteur conclut qu'il existe donc, outre la valine, un autre amino-acide N-terminal dont la fonction NH_2 est bloquée.

Ce résultat est cependant infirmé par les nombreuses études effectuées sur la STF. Nous citerons, à cet égard, les travaux de PARKER et al. (122), de GREEN et FEENEY (123), de BEZKOROVAINY (124), de MANN et al. (125) et, plus récemment, au laboratoire de LEGER et al. (126).

La STF est formée d'une chaîne peptidique comprenant environ 650 résidus et, s'il existe une deuxième chaîne peptidique, elle ne pourrait posséder que quelques résidus d'amino-acides, ce qui expliquerait que son départ n'entraîne pas de variation apparente de la masse moléculaire.

4 - ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

L'importance de la chaîne peptidique de la STF interdit toute étude directe de sa séquence. Aussi, pour aborder cette étude, différents auteurs, - et nous-mêmes -, ont utilisé le bromure de cyanogène comme agent de coupure primaire.

Dès 1967, JEPPSSON (127) publie un mémoire où il indique que l'action du bromure de cyanogène sur la STF libère 3 fragments. Puis,

en 1973, BEZKOROVAINY et GROHLICH (128) décrivent l'isolement de 6 fragments. Plus récemment, SUTTON et BREW (129) isolent par action du bromure de cyanogène sur la STF, après réduction et alkylation des fragments contenant de la cystine, 7 peptides et glycopeptides. Leurs propriétés physico-chimiques et leurs compositions sont données dans le tableau V (p.26).

Ce résultat ne correspond pas au fait que, d'après leurs propres dosages, la STF possède 7 à 8 résidus de méthionine, ce qui devait entraîner la libération de 8 à 9 peptides.

Simultanément, au Laboratoire, nous effectuons des recherches semblables qui nous permettaient d'isoler les 9 peptides espérés (CN-1 à CN-9) et de confirmer les autres résultats de SUTTON et BREW.

Actuellement, la séquence peptidique complète de 4 d'entre eux est connue :

1°) SUTTON et BREW (130) ont déterminé la séquence du peptide CN-6 qui contient 26 résidus. Ce peptide est le seul à posséder de la valine en position N-terminale. Il représente donc d'après les auteurs la fraction N-terminale de la transferrine. Mais une telle affirmation n'est possible que si on a obtenu tous les fragments libérés par le bromure de cyanogène ou si cette séquence a été reconnue par dégradation directe de la STF ;

2°) au Laboratoire, en collaboration avec le groupe de P. JOLLES, nous avons déterminé la structure complète des peptides CN-7 (53 résidus), CN-8 (5 résidus) et CN-9 (4 résidus).

5 - CONCLUSIONS

Les connaissances actuelles concernant la structure peptidique de la STF ont considérablement progressé au cours des dernières années. Compte tenu des progrès effectués par la méthodologie en matière de

Tableau V

Composition en amino-acides, masse moléculaire et amino-acide N-terminal des 7 peptides isolés après action du bromure de cyanogène sur la sérotransferrine humaine selon SUTTON et BREW (131)

	CN-1	CN-2	CN-3	CN-4	CN-5	CN-6	CN-7	Total
Asp	26,1 (26)	13,2 (13)	8,4 (8)	5,0 (5)	10,7 (11)	2,0 (2)	5,0 (5)	70
Thr	10,7 (11)	4,5 (5)	3,7 (4)	4,1 (4)	1,8 (2)	1,8 (2)	-	28
Ser	9,6 (10)	6,1 (6)	3,8 (4)	3,0 (3)	4,9 (5)	1,7 (2)	3,8 (4)	34
Glu	18,8 (19)	9,1 (9)	6,0 (6)	7,0 (7)	6,3 (6)	3,1 (3)	7,0 (7)	57
Pro	10,9 (11)	6,6 (7)	3,6 (4)	3,4 (3)	5,9 (6)	1,1 (1)	2,7 (3)	35
Gly	16,7 (17)	9,9 (10)	6,1 (6)	3,4 (3)	4,9 (5)	-	5,0 (5)	46
Ala	14,8 (15)	9,6 (10)	6,6 (7)	4,4 (4)	13,5 (13)	2,0 (2)	2,1 (2)	53
$\frac{1}{2}$ Cys	7,0 (7)	5,9 (6)	3,9 (4)	4,1 (4)	2,1 (2)	2,0 (2)	-	25
Val	6,5 (7)	3,7 (4)	4,8 (5)	4,1 (4)	10,1 (10)	2,5 (3)	1,2 (1)	34
Met	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	2,3 (2)	2,3 (2)	2,1 (2)	2,3 (2)	3,2 (3)	1,0 (1)	1,0 (1)	12
Leu	23,3 (23)	11,8 (12)	4,5 (5)	3,5 (4)	5,6 (6)	-	6,5 (7)	57
Tyr	12,5 (13)	4,7 (5)	5,0 (5)	2,9 (3)	5,8 (6)	-	-	32
Phe	12,2 (12)	5,4 (5)	1,7 (2)	0,97 (1)	3,0 (3)	0,95 (1)	4,5 (5)	29
Trp	N.D.	1 (1)	N.D.	N.D.	- (-)	1 (1)	1 (1)	-
His	8,3 (8)	2,5 (3)	1,8 (2)	2,3 (2)	-	1,6 (2)	2,8 (3)	20
Lys	15,9 (16)	9,8 (10)	8,0 (8)	5,0 (5)	7,4 (7)	1,8 (2)	7,0 (7)	55
Arg	10,7 (11)	4,3 (4)	1,7 (2)	2,3 (2)	1,1 (1)	1,9 (2)	1,0 (1)	23
Masse moléculaire	27000	15000	8900	7200	9290	3040	5840	76200
N-terminal	Gly	Asp	Ser	Tyr	Lys	Val	Gly	

séquences peptidiques, il est possible actuellement d'envisager la détermination de la structure primaire de la sérotransferrine.

B - MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

SPIK (132) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (133) ont démontré sans ambiguïté que les deux glycanes étaient conjugués, dans la STF, par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine. Ce mode d'attache avait été posé en hypothèse, mais non démontré, par JAMIESON (134) en 1964 et en 1965. Cet auteur a confirmé ces résultats en 1967 (135), en isolant par dégradation récurrente de SMITH d'un glycopeptide de la STF, le chafnon "asparaginy-N-acétylglucosamine".

Etude des glycopeptides isolés de l'apo-asialotransferrine SPIK (136) et SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (137) ont établi la nature exacte de l'attache glycanne-protide en isolant des hydrolysats pronasiques de l'apo-asialotransferrine par chromatographie de gel filtration et électrophorèse préparative 2 fractions glycopeptidiques de masse moléculaire 2800 : glycopeptide I et glycopeptide II, identiques par leur composition en oses mais différents par leur composition en acides aminés. Des fractions glycopeptidiques semblables avaient été également obtenues par JAMIESON, par chromatographie sur DEAE-cellulose (138).

Les compositions molaires en glucosamine et acides aminés ainsi que les compositions centésimales en oses de chacun de ces glycopeptides sont précisées dans les tableaux VI (p.28) et VII (p.28). Les proportions molaires galactose : mannose sont de 1:1 dans chacun des glycopeptides. L'application des procédés classiques de détermination des séquences peptidiques a permis aux auteurs de démontrer que la fraction glycannique était attachée dans le glycopeptide I à un reste séryl-aspartique et dans

Tableau VI

Composition molaire en glucosamine et en acides aminés des glycopeptides I et II provenant de l'hydrolyse pronasique de la transferrine, d'après SPIK (139) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (140) ; SPIK et MONTREUIL (141).

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

Tableau VII

Composition centésimale en oses des glycopeptides I et II, d'après SPIK (142).

	Glycopeptide I	Glycopeptide II
Oses "neutres"	38	42,8
Osamines	20,6	22,50
<u>Oses "neutres"</u> Osamines	1,94	1,90



le glycopeptide II à un reste aspartyl-lysine.

L'ensemble de ces résultats leur a permis de préciser la structure des glycopeptides I et II (fig. 2 - p.30) sans qu'il leur soit possible d'affirmer avec certitude avoir obtenu les deux groupements polysaccharidiques de la transferrine. En effet, les fractions pouvaient provenir du même enchaînement peptidique Ser-Asn-Lys par hydrolyse de la liaison séryl-asparagine ou de la liaison asparaginyll-lysine.

C - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

La transferrine contient deux groupements glycaniques (JAMIESON (143) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (144) ; SPIK (145)). La composition en oses des 2 groupements glycaniques semble être identique pour SPIK (146).

L'hydrolyse partielle des glycannes fournit les enchaînements suivants : N-acétyl-lactosamine, deux mannobioses isomères, un mannobiose, comme dans de nombreuses autres glycoprotéines (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (147) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (148) ; SPIK (149) ; SPIK et MONTREUIL (150)).

L'acide sialique se trouve en position externe (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (151) ; JAMIESON (152) ; ROBINSON et PIERCE (153) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (153 b) ; SPIK (154) SPIK et MONTREUIL (155)). L'élimination de l'acide N-acétylneuraminique s'accompagne de modifications profondes de la mobilité électrophorétique qui ont été étudiées par POULIK (156) dès 1959-1961, par PARKER et BEARN en 1961 (157) et par BLUMBERG et WARREN en 1961 (158). Ces auteurs ont montré, en faisant varier la concentration en enzyme qu'on pouvait obtenir jusqu'à 5 bandes en électrophorèse en gel d'amidon qui correspondent à des transferrines contenant 0, 1, 2, 3 ou 4 résidus d'acide N-acétylneuraminique.

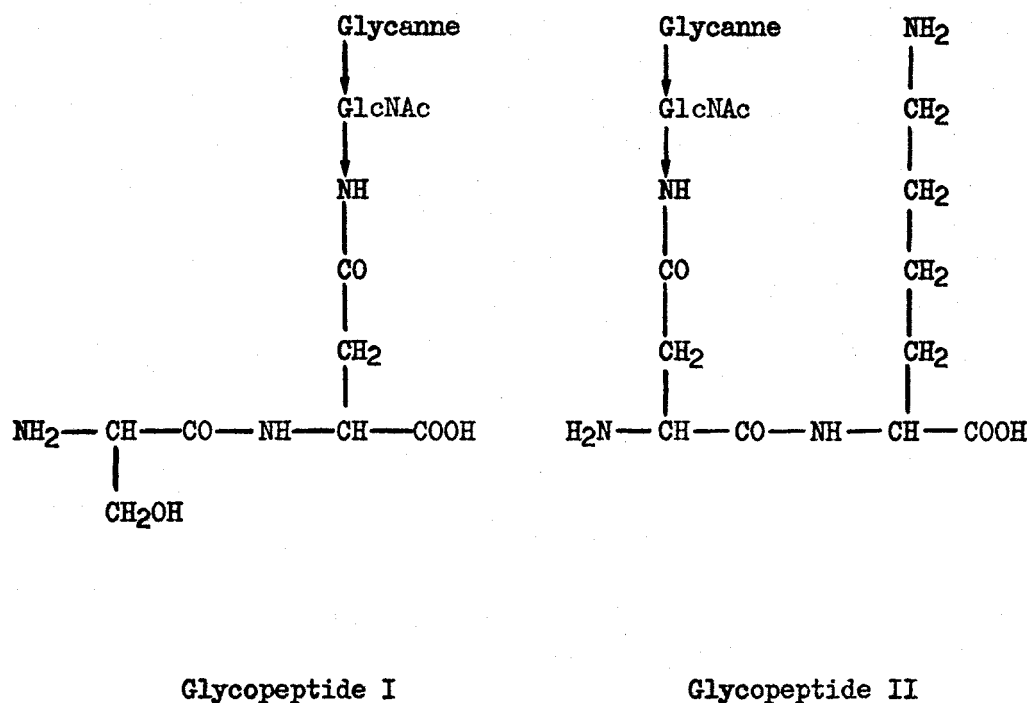


Figure 2

Schéma de structure des glycopeptides I et II obtenus à partir d'hydrolysat pronasique de l'apo-asialotransferrine par SPIK (159) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (160) ; SPIK et MONTREUIL (161).

L'action successive de la neuraminidase, puis de la galactose-oxydase montre que l'acide sialique est conjugué à des résidus de galactose (ROBINSON et PIERCE) (162), résultats également obtenus par SPIK (163).

1 - STRUCTURE PROPOSEE PAR JAMIESON, JETT ET DE BERNARDO (164)

Les auteurs ont utilisé pour déterminer la structure de 2 glycannes, deux glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de la sérotransferrine.

Sur la base de compositions identiques en sucres et sur des résultats semblables obtenus par dégradation récurrente de SMITH, ils affirment que les 2 chaînes glycaniques sont identiques. L'étude des sucres libérés par action des glycosidases et par méthylation des glycopeptides permet de proposer la structure des glycannes rapportée dans la figure 3 (p.32).

2 - STRUCTURE DETERMINEE PAR SPIK ET al. (165)

Au Laboratoire, les recherches concernant la structure des glycannes de la STF ont permis d'aboutir aux résultats suivants :

a) il existe des variants de STF possédant des compositions en sucres différentes (SPIK et al.) (166) ;

b) l'action de la pronase sur l'apotransferrine libère plusieurs glycopeptides. Ces glycopeptides se classent en 2 groupes : l'un possédant la structure glycanne I — Asn-Lys et l'autre la structure Ser-Asn — glycanne II.

Nos travaux, CHARET et al. (167) (168) (169), ont permis de montrer que chacun des glycannes provient d'endroits différents de la chaîne peptidique. Il est donc possible d'affirmer que les glycopeptides obtenus par action de la pronase représentent les glycannes I et II de la trans-

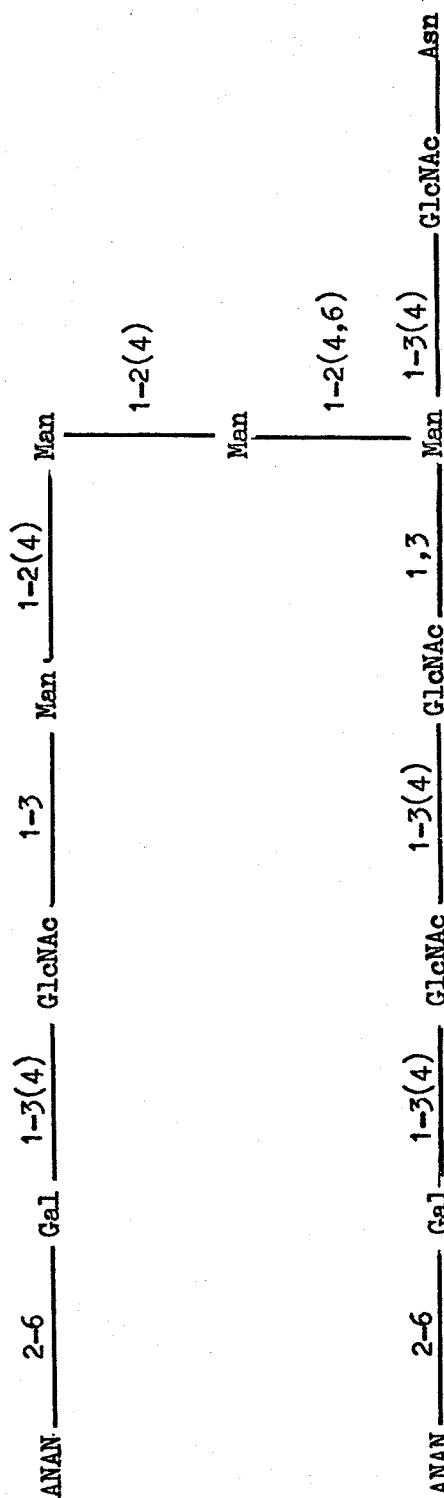


Figure 3

Structure des glycannes de la STF proposée par JAMIESON, JETT et DE BERNARDO (170).



ferrine et non un mélange des deux ;

c) composition en glucides - La composition molaire des 4 glycopeptides est rapportée dans le tableau VIII (p.34).

Seul le glycopeptide G P-I est notablement différent des autres qui diffèrent exclusivement par le nombre de résidus d'acide sialique. Les glycopeptides G P-II, III et IV contiennent du galactose, mannose et N-acétylglucosamine dans le rapport 2:3:4. Seuls les glycopeptides II, III et IV ont été entièrement étudiés ;

d) méthylation - La méthylation des glycopeptides II et III conduit à l'identification des mêmes dérivés méthylés : 3,4,6-tri-o-méthylmannose, 2,4-di-o-méthylmannose, 2,3,4-tri-o-méthylgalactose et le 3,6-di-o-méthyl-N-méthylglucosamine.

La méthylation complète des glycopeptides II et III débarrassés de leur acide sialique par la neuraminidase conduit à l'identification des mêmes dérivés méthylés à l'exception du 2,3,4-tri-o-méthylgalactose qui est remplacé par 2,3,4,6-tétra-o-méthylgalactose. Sur la base de ce résultat, nous pouvons conclure que les résidus de galactose sont substitués en 6 par l'acide N-acétylneuraminique.

Les dérivés méthylés se retrouvent dans les mêmes proportions dans chacun des glycopeptides.

e) hydrolyse partielle acide - L'hydrolyse partielle par l'acide sulfurique dilué des 4 glycopeptides libère de l'acide N-acétylneuraminique, du galactose et de la N-acétylglucosamine et un dissaccharide dont la structure a été déterminée par méthylation et hydrolyse par la β -galactosidase : Gal- β -(1-4) GlcNAc.

Par hydrolyse partielle par la résine Dowex-50, deux dissacha-

Tableau VIII

Composition molaire en oses des glycopeptides G P-I, G P-II, G P-III et G P-IV obtenus à partir d'hydrolysats pronasiques de sérotransferrine d'après SPIK, BAYARD, FOURNET, STRECKER, BOUQUELET et MONTREUIL (171).

	G P-I Ser-Asn	G P-II Ser-Asn	G P-III Asn-Lys	G P-IV Asn-Lys
ANAN	3	2	2	1
Gal	3	2	2	2
Man	3	3	3	3
GlcNAc	5	4	4	4

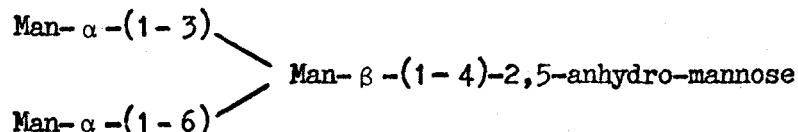


rides sont libérés en plus. Leurs structures ont été déterminées

Man- α -(1-3) Man et Man- α -(1-6) Man

f) acétolyse - L'acétolyse de toutes les glycopeptides libère une série d'oligosaccharides dont les structures ont été déterminées par méthylation et par action des osidases : Gal- β -(1-4) GlcNAc ; GlcNAc- β -(1-2) Man ; Man- β -(1-4) GlcNAc ; ANAN- α -(2-6) Gal- β -(1-4) GlcNAc- α -(1-2) Man ; ANAN- α -(2-6) Gal β -(1-4) GlcNAc- β -(1-2) Man- α -(1-3) Man

g) hydrazinolyse-diazotation - L'hydrazinolyse suivie de la diazotation des glycopeptides II, III et IV libère 3 composés qui sont identifiés au 2-5 anhydro-mannose, et Gal- β -(1-4) 2,5 anhydro-mannose et Man- α -(1-3)



La réduction au borohydrure tritiée permet de déterminer chacun des constituants se trouvant dans le rapport 1:2:1. La présence de 2,5 anhydro-mannose libéré indique la présence d'un chaînon GlcNAc GlcNAc

h) conclusions - Ces résultats permettent d'attribuer aux glycopeptides G P-II et G P-III la structure de la figure 4 (p.37). Le G P-IV possède la même structure mais avec un résidu d'acide sialique en moins. La structure du glycopeptide I n'est pas encore complètement déterminée, bien que vraisemblablement un troisième chaînon ANAN- α -(2-6)-Gal- β -(1-4)-GlcNAc vienne se fixer sur un résidu de mannose. Cette structure est notablement différente de celle proposée par JAMIESON et al. (172). Mais cette structure avait été établie à partir de rapport molaire en oses différent, et uniquement par oxydation périodique et des méthodes enzymatiques, sur un mélange de glycopeptides, ce qui ne peut pas permettre une détermination précise.

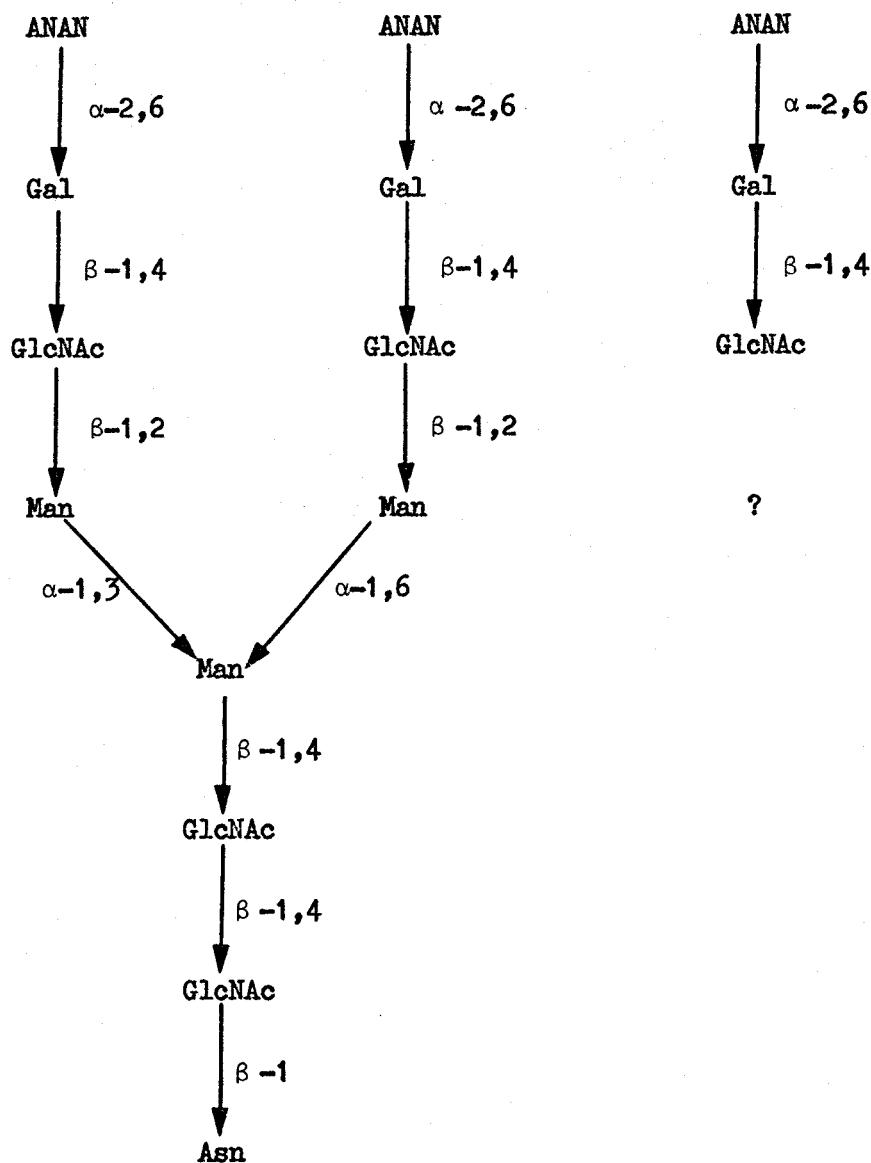


Figure 4

Structure des glycopeptides de la sérotransferrine humaine d'après SPIK, BAYARD, FOURNET, STRECKER, BOUQUELET et MONTREUIL (173).

TRAVAUX PERSONNELS

—oo 0 oo—

CHAPITRE I

--oo 0 oo--

PREPARATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

DE LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE

--oo 0 oo--

Les travaux rapportés dans le présent mémoire sont effectués sur la sérotransferrine fournie par la firme BEHRINGWERKE ou sur la STF que nous avons préparée nous-mêmes à partir de la fraction IV-7 de COHN. Cette fraction nous est généreusement fournie par le CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE, dont nous remercions vivement le Directeur, le Professeur GOUEMAND.

I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

Le support de chromatographie "DEAE-Séphadex" et Séphadex G-75 nous est fourni par la firme PHARMACIA. Les produits chimiques utilisés correspondent à la qualité pour analyse.

B - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE

Le procédé de préparation est une modification de la méthode de ROOP et PUTNAN (174) appliquée au sérum humain. Il est résumé dans la figure 5 (p.40).

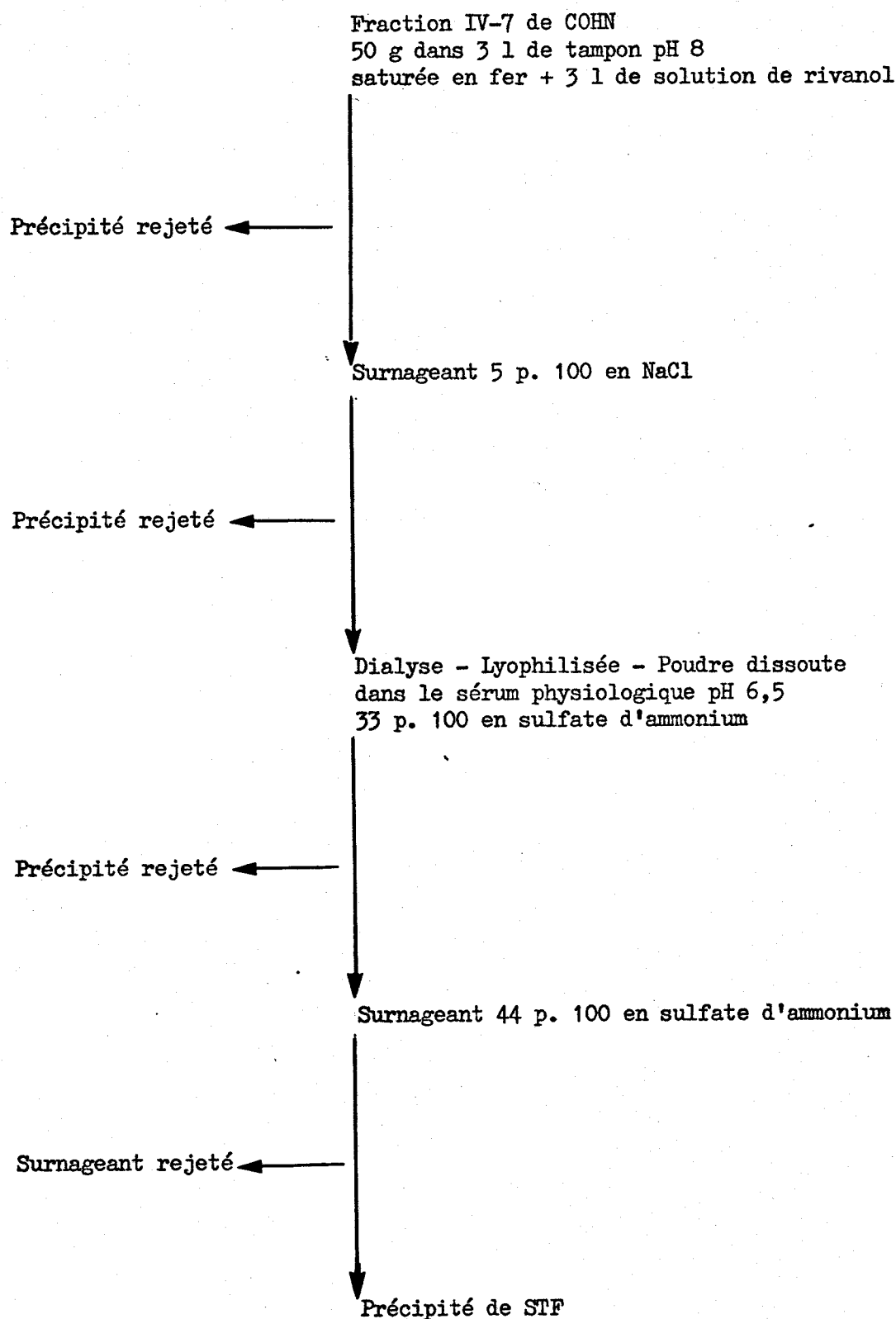


Figure 5

Préparation de sérotransferrine par précipitation.

Réactifs

- Solution de chlorure de sodium à 9 g p. litre.
- Tampon 0,05 M en 2-amino-2hydroxyméthyl-1,3propanediol ou "Tris", ajusté à pH 8 avec de l'acide chlorhydrique.
- Solution de rivanol à 0,6 pour 100, obtenue en dissolvant 6 g de lactate de 6,9 diamino-2-éthoxy-acridine ou rivanol dans 1 litre du tampon "Tris" précédent.
- Solution de chlorure ferrique à 2,32 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ par litre de tampon 0,1 M en citrate de sodium et 0,1 M en bicarbonate de sodium de pH 8,6.

Mode opératoire - 50 g de fraction IV de COHN sont dissous dans 750 ml de sérum physiologique et complétés par 2250 ml avec du tampon "Tris" de pH 8. L'ensemble est stabilisé pendant au moins une heure à 4° C. On ajoute alors 50 ml de solution ferrique de façon à saturer la STF. Puis, toujours à 4° C, on ajoute goutte à goutte 3 litres de la solution de rivanol. Le mélange est maintenu une nuit à 4° C. Le précipité est centrifugé et le surnageant qui contient la STF est additionné de chlorure de sodium cristallisé de façon à obtenir une solution à 5 g de NaCl p. 100 ml. Après un repos d'une nuit à 4° C, le rivanol qui a précipité est éliminé par centrifugation et filtration et le surnageant, après une dialyse, est lyophilisé. La poudre obtenue est dissoute dans le sérum physiologique ajusté à pH 6,5. On ajoute alors, sous agitation, du sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration finale de 33 g p. 100 ml. Les immunoglobulines G (IgG) précipitent et, après une nuit à 4° C, le précipité est éliminé par centrifugation. Au surnageant, on ajoute du sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration finale de 44 g p. 100 ml, entraînant ainsi la précipitation de la STF. Après un

repos d'une nuit à 4° C, la STF est récupérée par centrifugation, dialysée et lyophilisée.

C - PURIFICATION SUR DEAE-SEPHADEX A-50

La STF obtenue par précipitation sélective est purifiée sur DEAE-Séphadex A-50 de la façon suivante : l'échangeur d'anion DEAE-Séphadex A-50 activé est placé sous sa forme Cl⁻ et stabilisé dans un tampon 0,005 M en "Tris" ajusté à pH 8,6 avec de l'acide chlorhydrique. Nous travaillons sur une colonne 4 cm x 50 cm qui permet de purifier des quantités de STF de l'ordre de 4 g.

L'élution s'effectue par passage d'un tampon 0,01 M en "Tris" ajusté à pH 8,6 avec de l'acide chlorhydrique, puis d'un tampon identique, mais 0,1 M en NaCl, et enfin d'un dernier tampon 0,2 M en NaCl.

D - CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX G-75

La STF peut subir une ultime purification par tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-75 (colonne de 2 cm x 120 cm) stabilisée dans l'acide formique 0,1 M ou dans le bicarbonate d'ammonium 0,01 M, de façon à éliminer toute impureté micromoléculaire.

E - CONTROLE DE PURETE

Chaque fraction est analysée par électrophorèse sur acétate de cellulose selon la méthode classique en tampon véronol de pH 8,6, mais aussi par électrophorèse en gel d'amidon selon le procédé de KRISTJANSSON (175) et aussi en gel de polyacrylamide, selon la technique de "disc electrophoresis" de DAVIS (176).

Enfin, des immuno-électrophorèses classiques sont effectuées avec un immunsérum antiprotéides sériques humaines.

F - DESATURATION DE LA TRANSFERRINE

La STF est désaturée selon le procédé préconisé par SPIK (177 b) : une solution à 5 p. 100 de STF dans l'eau est amenée à pH 4,5 avec quelques gouttes d'acide acétique et la solution est dialysée plusieurs jours contre une grande quantité d'eau contenant un peu d'éthylène diamine tétracétate de sodium (E.D.T.A.).

G - COMPOSITION CHIMIQUE

1 - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

Les compositions en amino-acides sont déterminées à l'auto-analyseur Beckman Multichrom selon un procédé que nous avons nous-mêmes mis au point et qui nous permet, avec une seule injection, de doser tous les amino-acides classiques plus l'homosérine (HSer), l'homosérine lactone, la glucosamine et la galactosamine.

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

La séparation des hydrolysats est réalisée sur résine de type M-82 (0,9 x 57 cm) après régénération par de la soude 0,2 N, par 4 tampons formant un gradient discontinu de pH et de force ionique ; le débit de la colonne est de 68 ml/heure.

Composition du gradient :

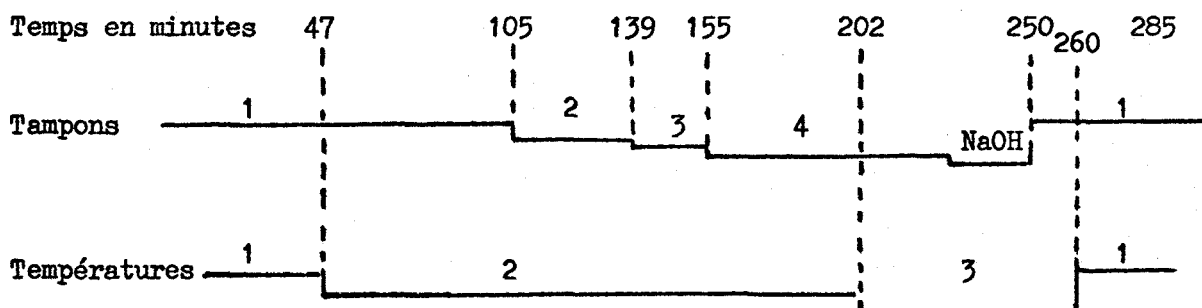
- tampon 1 0,2 N - pH 3,88
- tampon 2 0,2 N - pH 4,25
- tampon 3 0,35 N - pH 5,28
- tampon 4 1,2 N - pH 6,28

La séparation est améliorée par un gradient de température :

- température 1 : 45° C
- température 2 : 55° C
- température 3 : 62,5° C

La révélation de l'éluat de colonne est opérée automatiquement par la ninhydrine (débit : 34 ml/heure) et l'absorbance mesurée à 440 et 570 nm.

Les systèmes de changement de tampon, de température et de révélation sont réalisés automatiquement et programmés par avance sur l'appareil. Le couplage du gradient de tampons et de températures est schématisé sur la figure suivante :



La séquence d'élution des acides aminés, par ce procédé, est la suivante : Asp, Thr, Ser, HSer, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Nor-Leu, Tyr, Phe, GlcNH₂, GalNH₂, His, Lys, Arg.

2 - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

- OSES NEUTRES - Les oses neutres sont dosés par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique de TILIMANS et PHILIPPI (177 b), modifiée par RIMINGTON (178). Les "témoins internes" sont des solutions titrées de galactose + mannose, en proportions égales.

- DOSAGE DES OSAMINES - Les osamines sont dosées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (179), modifiée par BELCHER et coll. (180) après avoir été libérées par une hydrolyse effectuée à 100° C, en tube scellé sous vide, avec de l'acide chlorhydrique 4 N, pendant 4 heures.

- DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES - L'acide N-acétylneuraminique est dosé par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (181). Les protocoles expérimentaux sont ceux préconisés par MONTREUIL et SPIK (182).

H - DETERMINATION DE LA NATURE DES EXTREMITES TERMINALES

1 - RUPTURE DES PONTS DISULFURES

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

a) Oxydation performique - Nous utilisons le procédé préconisé par HIRS (183). L'acide performique est préparé en ajoutant à 9,5 ml d'acide formique pur, 0,5 ml d'eau oxygénée à 110 volumes et en abandonnant le mélange pendant 2 heures à la température du Laboratoire. D'autre part, 20 mg de protéine ou de glycopeptide sont dissous dans 1 ml d'acide formique pur additionné de 0,3 ml de méthanol absolu pour éviter la congélation. Les solutions sont refroidies séparément à - 10° C et mélangées volume à volume. Après 2,5 heures de réaction à - 10° C, la solution est diluée avec 10 volumes d'eau distillée et lyophilisée.

b) Réduction et alkylation

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

Dans le cas d'une protéine, 100 mg sont dissous dans 10 ml d'une solution 0,55 M en "Tris" et 8 M en urée, ajustée à pH 8,6 avec de l'acide

chlorhydrique. Après dégazage de la solution sous vide pendant 5 mn, une quantité de mercapto-éthanol 100 fois supérieure à la quantité théorique-nécessaire est ajoutée et la solution est maintenue pendant 2 heures sous un courant d'azote.

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

2 - AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

Les amino-acides N-terminaux sont déterminés par la méthode des DNP-amino-acides de SANGER suivant le protocole préconisé par BISERTE et coll. (184) ou par la méthode des dansyl-amino-acides de GRAY et HARTLEY (185).

Le protocole suivant est utilisé pour les protéines ou pour les gros peptides : 10 nm de protéine sont placés dans un tube à centrifuger et dissous dans 0,5 ml d'une solution urée 8 M. Puis la solution est complétée avec 0,15 ml d'une solution de bicarbonate de sodium de pH 9,2 et 0,25 ml de diméthyl formamide. Enfin, 0,1 ml d'acétonitrile contenant 5 mg de chlorure de dansyl sont mélangés à la solution par vigoureuse agitation. La solution est maintenue 1 heure à 37° C.

La protéine est alors précipitée par 10 ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 10 p. 100. Ce précipité est lavé à l'acétone, séché

sous azote et redissous par 0,5 ml d'HCl 5,6 N, placé en tube scellé et laissé une nuit à 105° C.

L'hydrolysate, séché sous vide, est extrait par l'acétate d'éthyle. Les dansyl-amino-acides de l'arginine, de l'histidine et de l'acide cystéique sont extraits par un mélange d'acétone et d'acide acétique (3/2 ; v/v).

L'identification de dansyl-amino-acides a été effectuée par chromatographie sur couche mince de micropolyamide sur plaque de 5 cm x 5 cm, suivant le protocole de WOOD et WANG (186).

3 - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES AMINO-ACIDES C-TERMINAUX

Nous avons utilisé la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI et coll. (187), dont le principe général est le suivant : l'hydrazine coupe les liaisons peptidiques en transformant les acides aminés constituant le protéide en hydrazide sauf l'acide aminé C-terminal qui reste intact. Après purification, cet acide aminé peut être identifié et dosé.

Nota : Dans le cas d'une cystine en position C-terminale, celle-ci doit préalablement être oxydée ou réduite et alkylée avant d'effectuer l'hydrazinolyse.

Mode opératoire

Une μ M de protéine ou de glycoprotéine convenablement desséchée est dissoute dans 1 ml d'hydrazine anhydre obtenu suivant le procédé de KUSAMA (188) puis maintenue en tube scellé 8 heures à 105° C.

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

Le résidu est purifié sur résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite IRC-50 "mesh" 150-200, suivant le protocole décrit par DE LA LLOSA et coll. (189).

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

L'élution est réalisée :

- par 40 ml d'eau distillée : élution des acides aminés neutres et acides et de l'asparthydrazide 4 et le glutamhydrazide 5 ;

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

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

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE

1 - PRECIPITATION AU RIVANOL PUIS AU SULFATE D'AMMONIUM

Les précipitations successives au rivanol puis au sulfate d'ammonium nous fournissent une préparation de STF qui est homogène par électrophorèse en acétate de cellulose, mais que l'immuno-électrophorèse révèle souillée d'IgG et d'hémopexine. C'est pour cette raison que cette préparation est soumise à une chromatographie sur gel de DEAE-Séphadex.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

4 g de la préparation de STF saturée en fer sont dissous dans 100 ml de tampon "Tris" 0,005 M de pH 8,6 dans lequel est stabilisé l'échangeur et cette solution est déposée sur la colonne. La STF se fixe et, après un lavage par le tampon de départ, l'élution est effectuée .

Nous obtenons ainsi 5 fractions de STF, selon le schéma

rapporté dans la figure 6 (p.50). Chacune de ces fractions est soumise à une série d'analyses de façon à essayer de mettre en évidence d'éventuelles différences.

3 - ELECTROPHORESE ET IMMUNO-ELECTROPHORESE

Chacune de ces fractions est constituée uniquement de STF. En effet, l'immuno-électrophorèse effectuée sur des solutions de STF à 0,2 et 0,5 p. 100 fournit un arc unique correspondant à la transferrine (fig. 7 ; p.51). Mais on peut observer des migrations électrophorétiques légèrement différentes.

Ce résultat est confirmé par l'électrophorèse en gel d'amidon, les fractions les plus retenues sur DEAE étant les plus anodiques. Mais il faut aussi remarquer que chaque fraction donne plusieurs bandes.

Nous nous trouvons donc en présence de variants, soit de variants génétiques vrais dus à des mutations dans la chaîne peptidique, soit de variants glycaniques possédant un nombre variable de résidus d'acide sialique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous faisons agir sur les différentes fractions de transferrine la neuraminidase dans les conditions préconisées par SPIK (190).

Nous constatons que l'élimination complète de l'acide sialique n'enlève pas la micro-hétérogénéité. Nous sommes donc en présence des variants génétiques, ce qui est normal étant donné que nous travaillons sur un mélange de sérum de différentes provenances. Mais ce résultat n'exclut pas une hétérogénéité au niveau des groupements glycaniques de la transferrine.

B - PRESENCE DE SUBSTANCES MICROMOLECULAIRES DANS LES PREPARATIONS DE TRANSFERRINE

200 mg d'apo-STF fournissent par chromatographie de tamisage

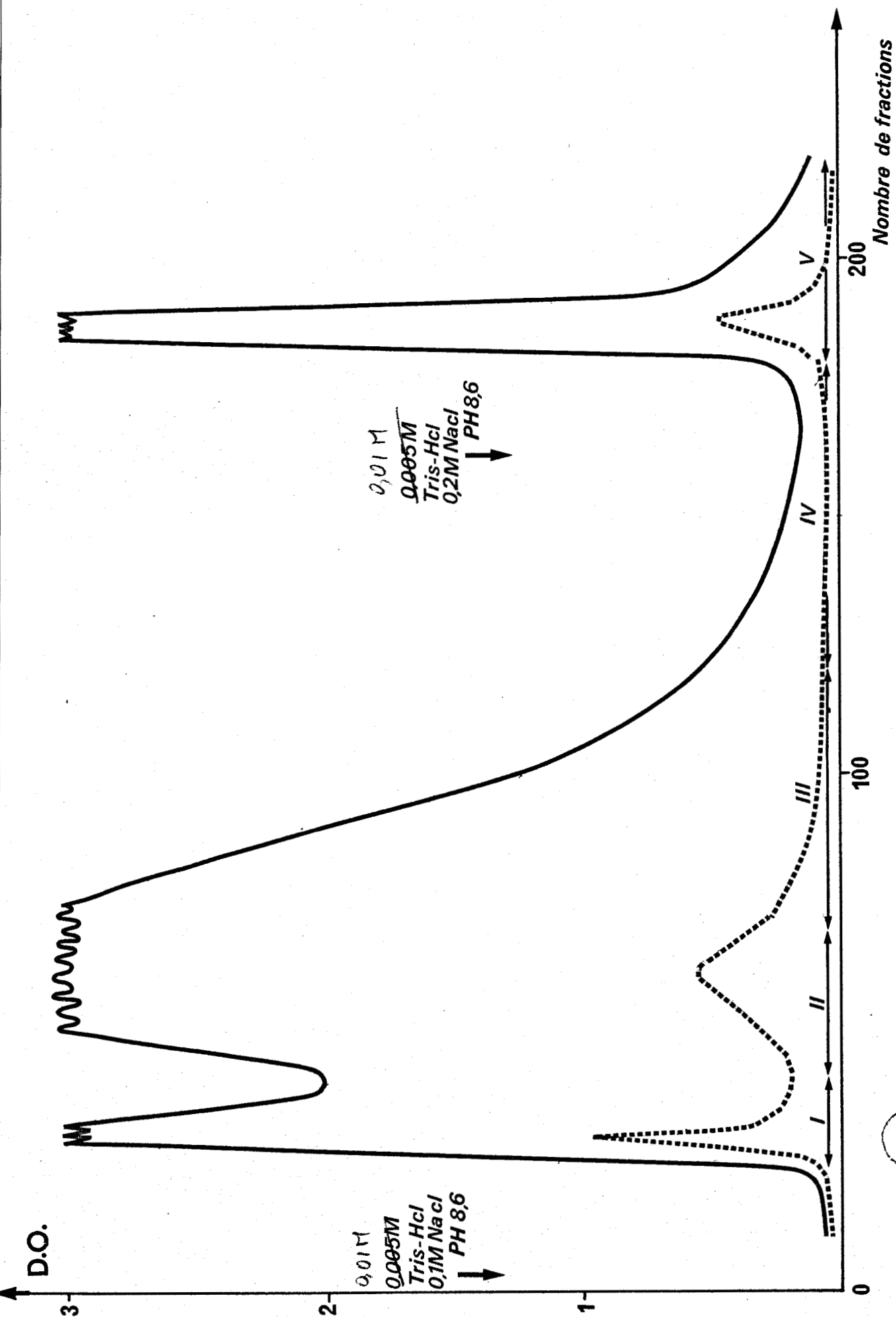


Figure 6

Chromatographie sur DEAE-Séphadex de la sérotransferrine obtenue par précipitation.

-

+

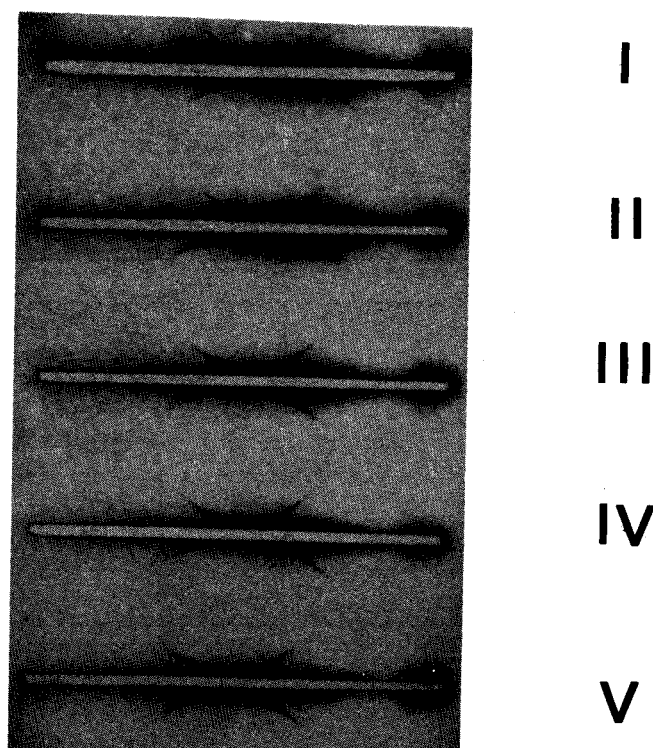


Figure 7



Immunoélectrophorèse des fractions de STF obtenues par chromatographie sur DEAE-Séphadex. Les fractions I, II, III, IV et V sont déposées à des concentrations de 0,5 p. 100 et 0,2 p. 100.

moléculaire sur Séphadex G-75 de la STF éluée au front, puis éluée avec du kd égal à 1, une fraction micromoléculaire absorbant fortement la lumière ultra-violette.

Cette fraction analysée par électrophorèse sur papier (fig. 8 ; p.53), révèle la présence d'au moins trois constituants de caractère acide :

1) une substance absorbant à 254 nm et non révélée par la ninhydrine contenant du fer. Il pourrait s'agir d'E.D.T.A. complexé au fer et qui reste absorbé sur la transferrine ;

2) deux fractions peptidiques révélées à la ninhydrine.

C - COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS DE TRANSFERRINE

1 - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

Les compositions en acides aminés sont rapportées dans le tableau IX (p.54). Ces compositions sont déterminées après des hydrolyses à 24, 48 et 72 heures de façon à extrapoler au temps zéro le taux des hydroxy-amino-acides et à prendre pour les amino-acides hydrophobes la valeur maximale. Aucune différence notable de composition n'apparaît entre les différentes fractions de transferrine.

Nous pouvons donner pour le nombre de résidus de méthionine la valeur de 8, ce qui est en accord avec les résultats de BEZKOROVAINY et GROHLICH (191), ainsi que ceux de SUTTON et BREW (192). La présence de 16 résidus d'histidine est confirmée par KRYSTEVA, MAZURIER et al. (193) utilisant une méthode spectrophotométrique.

2 - COMPOSITION EN OSES

Les compositions centésimales en oses neutres, glucosamines et acide N-acétylneuraminique sont rapportées dans le tableau X (p.55).

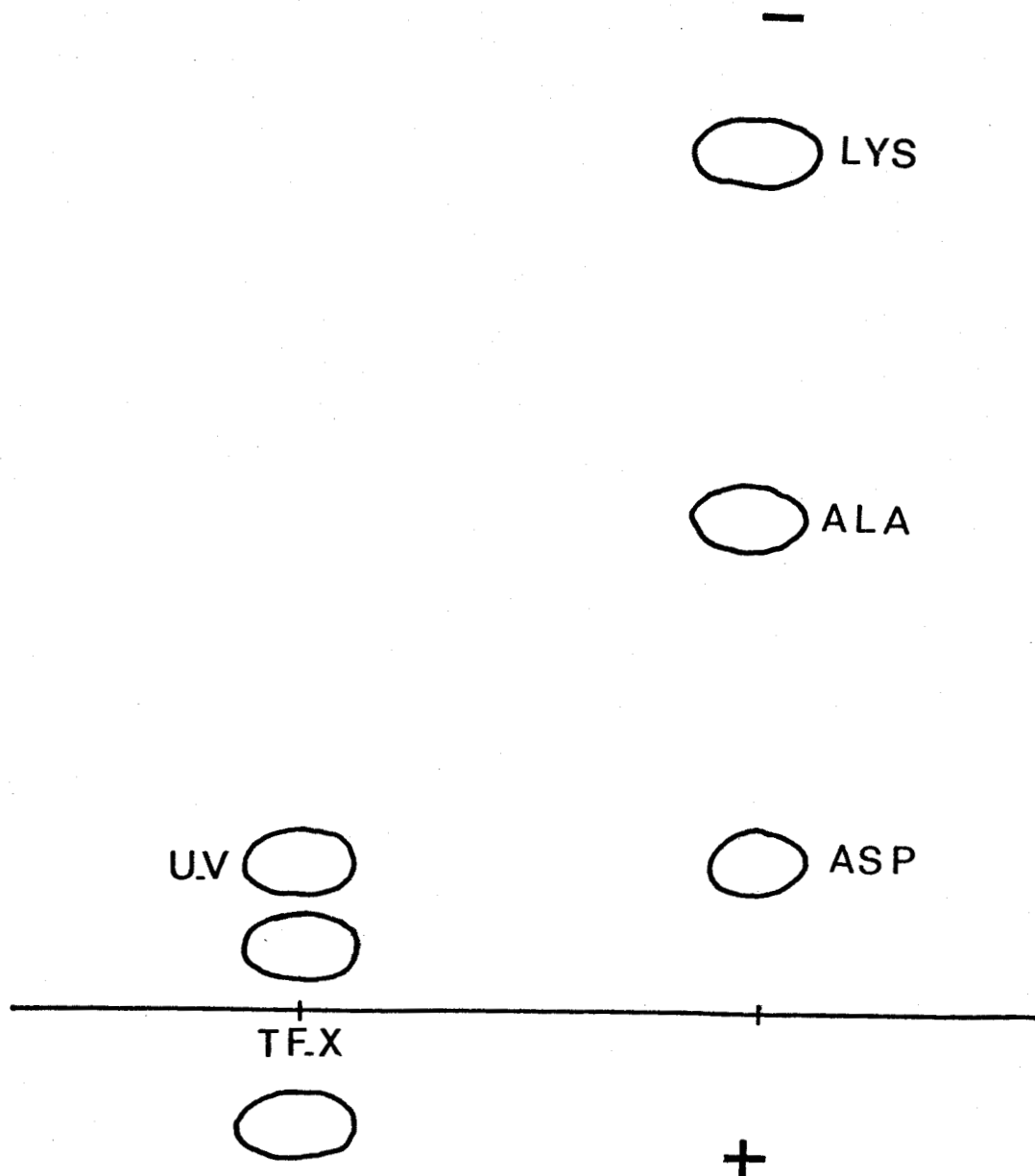


Figure 8

Electrophorèse de la fraction micromoléculaire (TF-X)
souillant les préparations de transferrine. Tampon de
pH 3,9, papier Whatman n° 3, 10 V par cm, 15 h.



Tableau IX

Composition en amino-acides des fractions I, II, III, IV
et V obtenues par chromatographie sur DEAE-Séphadex de
préparations de sérotransferrine (a)

	I	II	III	IV	V	Moyenne
Asp	77	74,5	72,4	74,3	74,4	74,5
Thr	27,7	29,3	27,0	27,3	29,5	28,2
Ser	37,5	36,1	35,4	36,6	37,5	36,6
Glu	53	56,5	52,9	50,8	56,5	53,9
Pro	34,3	36,2	35,4	36,1	35,4	35,5
Gly	51,4	45,1	42,5	46,9	45,5	46,3
Ala	61,3	54,2	58,0	52,8	53,6	55,9
$\frac{1}{2}$ Cys	35,6	36,1	34,1	34,2	35,3	35,1
Val	39,5	38,4	38,7	41,1	39,5	39,4
Met	7,9	7,7	7,7	7,8	8,1	7,8
Ile	11,9	13,5	11,9	13,6	14,2	13,0
Leu	55,3	54,2	52,2	58,7	54,2	54,9
Tyr	27,7	27,0	29,0	26,6	26,3	27,3
Phe	31,6	29,3	31,0	29,3	29,7	30,2
Lys	53,4	49,7	52,2	52,8	50,9	51,8
His	17,4	16,0	16,0	17,6	16,3	16,6
Arg	23,7	22,6	22,3	24,8	22,7	23,1

(a) Chaque détermination est déduite de l'analyse des résultats
obtenus après 24, 48 et 72 heures d'hydrolyse.



Tableau X

Composition centésimale en oses des fractions I, II, III, IV et V
de sérotransferrine obtenues par chromatographie sur DEAE-Séphadex

	I	II	III	IV	V
Oses "neutres" (a)	3,22	2,93	2,66	2,64	2,92
N-acétyl glucosamine	1,9	1,79	1,81	1,93	2,02
Acide N-acétyl-neuraminique	2,82	2,67	2,94	2,4	3,1

(a) Galactose + Mannose



Aucune différence notable n'apparaît entre les différents échantillons.

D - RECHERCHE DES EXTREMITES N- ET C-TERMINALES

1 - AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

La recherche des amino-acides N-terminaux est effectuée systématiquement sur chaque échantillon de STF. Chaque fois, la valine est mise en évidence par la méthode des dansyl-amino-acides, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par les différents auteurs. Afin de détecter la présence éventuelle d'un résidu de cystéine en position N-terminale, nous appliquons la méthode des DNP-amino-acides sur un échantillon global de STF réduite et S-carboxy-méthylée. Le dinitrophényl dérivé de la S-carboxyméthyl-cystéine est recherché suivant le protocole préconisé par MOSCHETTO et BISERTE (194). Nous identifions uniquement la valine en position N-terminale.

2 - AMINO-ACIDES C-TERMINAUX

Dans une étude antérieure de la STF, SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (195) avaient identifié le glycolle, la proline et des traces de sérine en position C-terminale de la STF. Ces résultats sont obtenus par application de la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI (196).

Cette méthode, appliquée aux différentes fractions de STF donne le même résultat. Toutefois, afin de mettre en évidence un éventuel résidu de cystine en position C-terminale, nous effectuons l'hydrazinolyse sur un échantillon global de STF réduit et alkylé, ou oxydé par l'acide performique. En caractérisant dans les hydrazinolysats la S-carboxyméthyl-cystéine ou l'acide cystéique, nous démontrons la présence d'un résidu de cystéine en position C-terminale dans la transferrine. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par l'isolement du glycopeptide C-terminal à partir d'hydrolysats

trypsiques de STF et à partir de peptides résultant de l'action du bromure de cyanogène sur la STF.

La STF semblait donc posséder plusieurs chaînes peptidiques. Cependant, ce résultat était en contradiction avec les résultats de BEZKOROVAINY et GROHLICH (197), de GREENE et FEENEY (198), de MANN et al. (199), de LEGER, SPIK et al. (200) qui ont démontré que la STF est composée d'une seule chaîne peptidique.

La présence de plusieurs amino-acides C-terminaux peut s'expliquer de 3 façons différentes :

a) présence d'une courte chaîne peptidique liée par un pont disulfure à la chaîne principale. Cette hypothèse expliquerait le fait qu'après réduction totale, la masse moléculaire reste analogue à celle de la protéine native ;

b) présence de peptides souillant les préparations de transferrine. En effet, JEPPSSON (201) identifie dans la transferrine la valine en position N-terminale, mais également des traces d'acide aspartique et de sérine ; ces peptides pouvant d'ailleurs se former par protéolyse au cours de la préparation ;

c) défaut de la méthode utilisée. L'hydrazinolyse, qui souvent libère des amino-acides, comme le glycolle, la valine, la sérine..., probablement par décomposition d'hydrazide correspondant. C'est le cas dans la lipase pancréatique qui possède également un demi résidu de cystine en position C-terminale, ROVERY (202). En effet, l'hydrazinolyse effectuée sur cette protéine, préalablement oxydée par l'acide performique, libère de l'acide cystéique, mais aussi de l'acide aspartique, du glycolle, de la valine et de la méthionine.

Les deux premières hypothèses ne tiennent pas dans la mesure où la présence de sérine, proline, glycolle et demi-cystine est mise en évidence sur de la STF réduite et alkylée et purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-75 qui doit normalement éliminer les petits peptides. La troisième hypothèse paraît la plus plausible.

E - CONCLUSIONS

1°) L'application du procédé de ROOP et PUTNAM à la préparation de la sérotransferrine humaine à partir de la fraction IV-7 de COHN nous fournit des fractions de STF qui présentent entre elles des différences mineures.

2°) L'étude effectuée sur chacune de ces fractions montre qu'il existe une micro-hétérogénéité aussi bien au niveau de la chaîne peptidique que des groupements glycaniques.

3°) Les préparations obtenues par ce procédé sont utilisées pour nos études structurales. Nous travaillons d'ailleurs sur le mélange de différentes fractions puisque chacune d'elles ne représente pas une sorte de STF. Ces préparations nous permettent d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés.

4°) Si le problème de la monocaténarité semble résolu, tous les auteurs s'accordent sur ce sujet, celui de la nature du C-terminal reste entier. Nous verrons, dans les autres chapitres, comment nous avons confirmé la présence d'un résidu de cystéine en position C-terminale dans la STF humaine.

CHAPITRE II

--oo 0 oo--

ISOLEMENT ET SEQUENCES PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA TRANSFERRINE

--oo 0 oo--

Comme nous l'avons vu dans le chapitre des généralités concernant la structure de la sérotransferrine, la nature de la liaison glycanne protide a été déterminée par SPIK et al. (203) (204) (205) à partir des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de l'apo-asialo-STF (voir p.27).

L'ensemble de ces résultats leur a permis de préciser la structure des glycopeptides I et II (voir fig. 2 ; p.30) sans qu'il leur soit possible d'affirmer avec certitude avoir obtenu les deux groupements polysaccharidiques de la transferrine. En effet, les fractions pouvaient provenir du même enchaînement peptidique Ser-Asn-Lys par hydrolyse de la liaison séryl-asparagine ou de la liaison asparaginyl-lysine. Or, l'obtention à l'état pur des groupements polysaccharidiques est une nécessité si on désire effectuer leur structure détaillée. Nous nous sommes donc attaché, la composition en oses semblant ne pas le permettre, à séparer les chaînes glycaniques en jouant sur des variations de séquence des acides aminés au voisinage du point d'attache ose-acide aminé. Pour cela, nous devions utiliser un procédé de rupture enzymatique des chaînes peptidiques ayant une

spécificité très étroite et conduisant à des chaînes peptidiques relativement courtes. L'utilisation d'enzymes protéolytiques comme la trypsine ou la chymotrypsine couramment utilisée dans la détermination des structures de protéine nous a paru à cet égard la plus judicieuse.

—oo 0 oo—

ISOLEMENT ET SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE

—oo 0 oo—

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

Tout d'abord, nous désirions obtenir des glycopeptides ne risquant pas de dériver les uns des autres à cause de ruptures secondaires. Or, la trypsine est l'enzyme protéolytique la plus spécifique puisqu'il coupe exclusivement et totalement les liaisons arginyl et lysyl (les souillures chymotrypsiques étant éliminées par un inhibiteur). D'autre part, dans le but de déterminer la séquence des amino-acides au voisinage du point d'attache, il était intéressant d'obtenir des composés possédant une chaîne peptidique relativement courte. Comme la STF contient environ 80 résidus d'arginine et de lysine, le choix de la trypsine se justifiait parfaitement. Enfin, la trypsine a une grande souplesse d'utilisation car on peut facilement réduire ou augmenter les points de ruptures spécifiques des chaînes peptidiques. En effet, l'action de l'enzyme peut être limitée aux seules liaisons arginyl en "dénaturant" les résidus

de lysine par substitution de la fonction ϵ -aminée ou aux seules liaisons lysyl en substituant la fonction guanidyle. Au contraire, l'action de l'enzyme peut être étendue aux liaisons cystéinyl par amino-éthylation de la cystéine. C'est pourquoi, nous avons choisi d'hydrolyser l'apo-STF par la trypsine. Nous avons ensuite fractionné les hydrolysats par différents procédés, notamment par chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions. Ensuite, nous nous sommes attachés à démontrer que les glycopeptides ainsi isolés provenaient de sites différents de la chaîne peptidique. Enfin, ce travail nous a permis de mettre au point un schéma général de fractionnement des glycopeptides et nous a familiarisé avec les procédés de détermination des séquences peptidiques.

I - MATERIEL ET METHODES

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

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

A - HYDROLYSE TRYPSIQUE

1 - Le procédé que nous avons appliqué dérive de la méthode de HIRS, MOORE et STEIN (206).

L'hydrolyse est effectuée à 37° C au pH-stat pendant 8 heures.

A une solution aqueuse d'apotransferrine à 2 g p. 100 ml, ajustée à pH 8,5 par de l'ammoniaque diluée, on ajoute, en 2 fois à 4 heures d'intervalle,

une quantité de trypsine dans un rapport enzyme-substrat de $\frac{1}{50}$. La quantité nécessaire de trypsine est diluée dans une solution centimolaire d'acétate de calcium et maintenue pendant au moins une demi-heure à la température du Laboratoire avant d'être utilisée. On active, de cette manière, la trypsine et on détruit, en outre, la chymotrypsine éventuellement présente. L'hydrolysate ainsi obtenu est congelé et lyophilisé après arrêt de la réaction par abaissement du pH à 6 par addition de quelques gouttes d'acide acétique.

2 - CONTROLE DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE

Nous avons systématiquement vérifié que les hydrolyses étaient satisfaisantes, en appliquant la méthode d'électrochromatographie bidimensionnelle des peptides et des amino-acides de BISEITE et coll. (207). Le mode opératoire est le suivant :

Des volumes d'hydrolysate trypsique correspondant à 1 mg de protéide sont déposés en plusieurs additions de 100 μ l sur des feuilles de papier Whatman n° 3 et soumis à une électrochromatographie bidimensionnelle effectuée dans les conditions suivantes :

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

- chromatographie descendante dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5, V/V/V) pendant 18 heures. Après séchage, les électrochromatogrammes sont soumis à l'un des procédés de révélations suivants :

a) révélation des protides par la ninhydrine

La ninhydrine cadmiée à 1 p. 100 permet de révéler les peptides et de conserver les chromatogrammes sans avoir besoin d'utiliser un fixa-

teur. La composition du révélateur est la suivante : 1 g d'acétate de cadmiun est dissous dans un mélange de 100 ml d'eau et 50 ml d'acide acétique ; 10 g de ninhydrine sont d'autre part dissous dans de l'acétone ; les deux solutions sont mélangées et complétées à 1000 ml par de l'acétone. La révélation des électrophorégrammes se fait par trempage car il n'y a aucun risque de solubilisation des produits et les taches apparaissent au bout de quelques minutes dans une étuve à 100° C ;

b) révélation des liaisons peptidiques

La révélation des liaisons peptidiques est effectuée suivant la technique de RYDON et SMITH (208). Le chromatogramme ou l'électrophorégramme est placé pendant 2 heures dans une atmosphère saturée en chlore (obtenue en faisant réagir de l'acide chlorhydrique sur du permanganate de potassium). Après une ventilation de 2 heures dans un courant d'air frais, le papier est imprégné par pulvérisation d'une solution obtenue en mélangeant extemporanément à volumes égaux, une solution aqueuse d'iodure de potassium à 1 g p. 100 ml et une solution aqueuse de thiodène. L'emplacement des composés contenant des liaisons peptidiques se révèle par la formation de taches brunes sur un fond blanc. Ces taches sont fugaces et il convient de les délimiter très rapidement ;

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

Les fractions glycaniques, après chromatographie ou électrophorèse, sont révélées selon le procédé de MONTGOMERY et WU (209). Le papier est trempé rapidement dans une solution acétonique d'acide periodique fraîchement préparée (acide periodique 0,1 M/acétone) (1:19,V/V). Après 5 minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée extemporanément de benzidine dans l'acétone (0,15 g p. 100 ml). L'emplacement des glycanes est révélée

par l'apparition de taches blanches sur un fond uniformément bleu.

B - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE

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

- 1°) chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex ;
- 2°) chromatographie d'échanges d'ions ;
- 3°) chromatographie ou électrophorèse préparative sur papier.

1 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

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

Une telle colonne permet de chromatographier des quantités de 500 mg d'hydrolysat tryptique. Ceux-ci, dissous dans 10 ml de tampon, sont introduits au sommet de la colonne. Des fractions de 5 ml sont recueillies au collecteur de fractions (débit : 60 ml/h). Le repérage des glycopeptides dans l'effluent est effectué par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et coll. (210) qui est spécifique des glucides. Les fractions qui donnent une réaction positive sont rassemblées, concentrées à quelques millilitres et additionnées de 10 volumes d'éthanol absolu. Le précipité de glycopeptide recueilli par centrifugation et dissous dans une faible quantité d'eau distillée. La solution est ensuite soumise à la chromatographie d'échange d'ions.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

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

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

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

Le débit d'élution est de 25 ml/heure. Les fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions. Les fractions glycopeptidiques, repérées par la méthode au phénol sulfurique, sont rassemblées, concentrées à quelques millilitres sous pression réduite et les glycopeptides sont précipités par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu.

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

- pH 1,5 : acide formique/acide acétique/eau (5:15:180,v/v/v) ;
- pH 2,4 : acide acétique/eau (6:94,v/v) ;
- pH 3,9 : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387,v/v/v).

3 - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE PREPARATIVES SUR PAPIER

Les fractions obtenues peuvent être soumises à une dernière purification par électrophorèse effectuée dans un des systèmes cités ou par chromatographie préparative descendante, sur papier MACHEREY-NAGEL 281 dépourvu d'acides aminés, avec le système-solvant de PARTRIDGE (211) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

D - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EN GLUCIDES DES GLYCOPEPTIDES

1 - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

Les compositions en amino-acides sont déterminées après hydrolyse chlorhydrique dans les conditions que nous avons déjà décrites.

2 - COMPOSITION EN GLUCIDES

Les compositions centésimales et molaires sont déterminées par la méthode classique couramment utilisée au Laboratoire selon les procédés mis au point par MONTREUIL et SPIK (212).

PROCEDES DE DETERMINATION DES SEQUENCES

PEPTIDIQUES DANS LES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides, une fois isolés, sont soumis aux différents procédés d'exploration de structure des chaînes peptidiques. D'autre part, la présence de cystéine nous a amené à appliquer les procédés de ruptures spécifiques des ponts disulfures.

A - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR DOSAGE DES GROUPEMENTS NH₂ LIBRES

La méthode que nous utilisons est adaptée du procédé original

de GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (213).

Mode opératoire

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

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

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

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

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

B - RUPTURE DES PONTS DISULFURES

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

L'oxydation performique, ainsi que la réduction et l'alkylation, sont effectuées dans les mêmes conditions que pour la protéine totale.

Blocage par l'éthylène-imine

L'action de l'éthylène-imine sur les groupements SH de la cystéine transforme celle-ci en S-aminoéthyl-cystéine qui, étant un isostère

de la lysine, voit ses liaisons coupées par la trypsine.

La réduction est menée de la même manière que dans le cas précédent. Le blocage des groupements SH libres est réalisé par l'éthylène-imine liquide. Une quantité supérieure à la quantité théoriquement nécessaire est ajoutée en 3 ou 4 fois. Le pH est rigoureusement maintenu à 8,6 tout au long de la réaction par addition continue d'acide acétique 2 N. Quand la réaction est terminée, le pH est amené à 7 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et le glycopeptide précipité par addition de 10 volumes d'éthanol absolu.

C - IDENTIFICATION DES AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

1 - METHODE DES DNP-AMINO-ACIDES

Nous utilisons la méthode de dinitrophénylation de SANGER (Technique de BISERTE, HOLLEMAN et coll.), adaptée par MONSIGNY (214) aux glycopeptides. Les DNP-glycoprotides sont ensuite hydrolysés et analysés suivant les techniques décrites par BISERTE et coll. (215).

2 - METHODE DES DANSYL AMINO-ACIDES

Nous avons utilisé la méthode de dansylation de HARTLEY (216).

a) Dansylation des glycopeptides

5 nM de glycopeptides, introduites dans un tube à dansyl, sont séchées à l'exsiccateur. On ajoute 10 microlitres d'une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et on dessèche de nouveau sous vide. Le résidu est additionné de 10 microlitres d'eau, 10 microlitres d'une solution acétonique de chlorure d'acide 5-diméthyl-amino naphthalène sulfonique (DNSCl) à 2,5 mg/ml. Le tube à dansyl est scellé par une feuille de papier paraffine et on laisse 1 heure dans une étuve à 37° C. Après séchage en exsiccateur, on introduit dans le tube à dansyl 50 microlitres d'acide chlorhydrique 5,6 N ; le tube est à nouveau scellé et on effectue l'hydrolyse à 105° C

pendant 18 heures. L'hydrolysate est ensuite séché en exsiccateur en présence de soude, puis repris par 10 microlitres d'acétate d'éthyle saturée en eau, en vue d'une identification par chromatographie.

Au cours de cette extraction, quelques amino-acides dansylés ne sont pas solubles. Il s'agit des dérivés de l'arginine, de l'histidine et de l'acide cystéique. Ceux-ci sont extraits par le mélange acétone/acide acétique (3:2,v/v).

b) Chromatographie des dansyl amino-acides (WOODS et WANG)

Nous avons utilisé la chromatographie en couche mince de polyamide (plaque 5 x 5 cm).

La première migration est faite dans le solvant eau/acide formique (200:3,v/v). Ce premier solvant est ensuite bien éliminé, en exsiccateur, sous vide partiel.

Après rotation de la plaque d'un quart de tour, on effectue une deuxième migration dans le solvant benzène/acide acétique (180:20,v/v).

Après avoir éliminé ce deuxième solvant, on peut faire une troisième migration dans la même dimension que la deuxième, dans le solvant acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique (20:1:1,v/v/v).

La révélation des plaques est faite en lumière U.V. (330 nm) et le dansyl amino-acide est identifié par rapport à des cartes témoins.

Remarque - Nous utilisons aussi la méthode d'identification sur couche mince de Silicagel selon le procédé préconisé par STEHELIN et DURANTON (217). Mais cette méthode a été abandonnée car elle est plus longue et moins sensible que la précédente.

3 - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

Nous avons utilisé la méthode de dégradation récurrente selon EDMAN (218).

Les phénylthiohydantoïnes formées ne sont pas systématiquement

identifiées. Nous avons couplé cette méthode avec les méthodes des dansyl amino-acides après chaque dégradation, le nouvel amino-acide N-terminal est identifié. Nous avons également utilisé la méthode de HIRS (219) de dosage des amino-acides restant après chaque dégradation.

Le protocole expérimental utilisé est celui que DOPHEIDE, MOORE et STEIN (220) ont adapté, à partir de celui qu'EDMAN préconise pour son appareil automatique.

Une micromole de peptide ou de glycopeptide est dissoute dans 1 ml de tampon pyridine, H₂O, N-éthyl morpholine (150:100:29,v/v) ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique. Puis, 50 microlitres de phénylisothiocyanate sont ajoutés et l'ensemble placé sous courant d'azote est maintenu à 37° C pendant 1 à 2 h 30.

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

La phase aqueuse est lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite desséché sous vide pendant une demi-heure en présence de P₂O₅.

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

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

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

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

D - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES C-TERMINAUX

Nous avons utilisé pour identifier les acides aminés situés en

position C-terminale la méthode d'hydrazinolyse et l'action des carboxypeptidase A et B.

1 - METHODE D'HYDRAZINOLYSE

Nous avons utilisé la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI et al. Le protocole expérimental est précisé dans le chapitre précédent.

2 - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

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

a) Traitement de l'enzyme

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

b) Hydrolyse enzymatique

Une quantité exactement connue de peptide ou glycopeptide correspondant à 3 ou 4 micromoles est dissoute dans 3 ml d'une solution de norleucine 0,5 mM ; la solution obtenue est lyophilisée.

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

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

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

E - METHODE DE RUPTURE SPECIFIQUE DES CHAINES PEPTIDIQUES

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

1 - METHODES ENZYMATIQUES

a) Hydrolyse par la chymotrypsine

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

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

b) Hydrolyse par la subtilisine

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

c) Hydrolyse par la thermolysine

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

2 - HYDROLYSE CHIMIQUE

Hydrolyse par les acides dilués. Nous avons utilisé l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,03 N qui libère préférentiellement l'acide aspartique.

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

Nous utilisons le protocole préconisé par TSUNG et FRAENKEL-CONRAT (221).

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

L'hydrolyse est réalisée en tube scellé sous vide pendant 16 h à 105° C.

L'hydrolysate est congelé et lyophilisé.

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES A PARTIR DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE L'APOTRANSFERRINE

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

1 - PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX G-50

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

sont soumis à la chromatographie sur échangeurs d'ions.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'IONS

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

L'élution à l'eau fournit une fraction glycopeptidique, glycopeptide A. L'élution par un gradient formiate de pyridine donne une autre fraction glycopeptidique correspondant au glycopeptide B qui est récupéré par précipitation éthanolique.

3 - CONCLUSIONS

Nous avons rassemblé dans la figure 9 (p.75) les différentes étapes du fractionnement que nous avons appliqué. Le bilan pondéral est le suivant : à partir de 100 mg de "glycopeptides totaux" (correspondant à 1 g de transferrine), nous obtenons en moyenne :

- glycopeptide A 19 mg
 - glycopeptide B 30 mg
- soit un rendement de 50 p. 100.

B - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

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

1 - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE A

Le glycopeptide A soumis à l'électrophorèse sur papier dans les tampons de pH 1,5 - 1,4 et 3,9 se révèle homogène : il donne, en effet, une

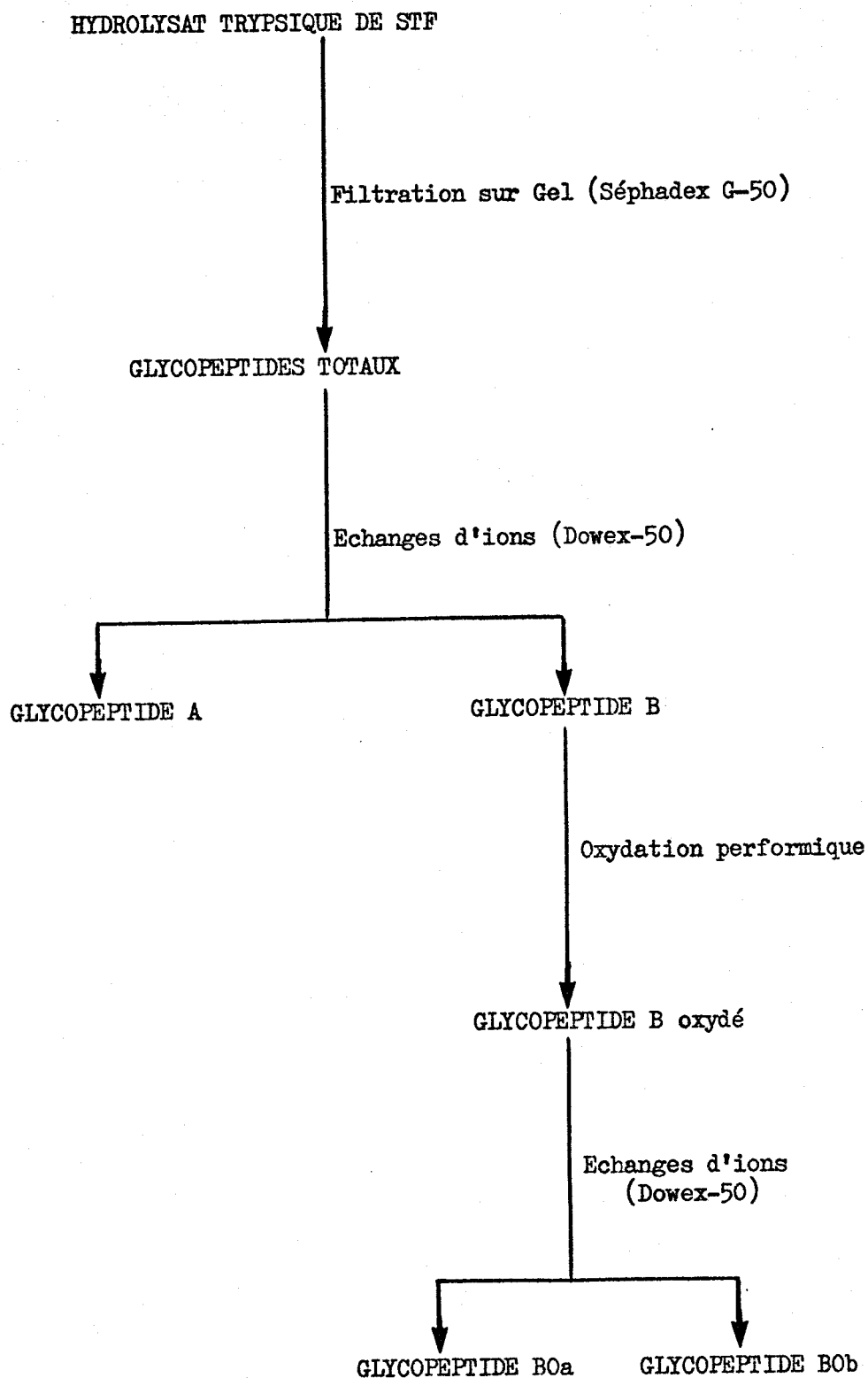


Figure 9

Schéma de fractionnement des hydrolysats tryptiques de la STF

seule tache après révélation par le réactif à la ninhydrine et par le réactif à l'acide periodique benzidine.

a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés, pour une masse moléculaire de 3200 est précisée dans le tableau XI (p.77).

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

b) Composition en oses

La composition en oses est donnée dans le tableau XII (p.78).

Cette composition correspond à celle de la transferrine, en tenant compte des masses moléculaires.

2 - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE B

Le glycopeptide B soumis à l'électrophorèse sur papier dans les différents tampons est hétérogène.

En utilisant le tampon de pH 2,4, 3 taches correspondant à des glycopeptides apparaissent (fig. 10 ; p.79). Il existe, en outre, une tache uniquement révélée par la méthode à l'acide periodique benzidine et que nous avons identifiée à de l'acide sialique libre.

a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de la fraction B est décrite dans le tableau XI (p.77).

Tableau XI

Composition molaire (a) des glycopeptides A et B présents
dans les hydrolysats tryptiques de la sérotransferrine

	Glycopeptide A	Glycopeptide B
Oses neutres (b)	5	5
GlcNAC	4	4
ANAN	2	2
Asp	3	4
Thr	1	1,1
Ser	2	1,3
Glu	-	1
Gly	2,1	1,6
Ala	-	0,6
Val	0,9	1
$\frac{1}{2}$ Cys	2,1	1,4
Leu	1,1	1,3
Tyr	-	0,4
Phe	2,1	1
Lys	-	2

(a) En résidus pour 4 résidus de N-acétylglucosamine.

(b) Galactose et mannose (1:1)



Tableau XII

Composition centésimale en glucides des glycopeptides
trypsiques A et B de la sérotransferrine

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

Tableau XIII

Composition centésimale en glucides des glycopeptides
trypsiques B₁, B₂ et B₃ de la sérotransferrine

	Glycopeptides		
	B ₁	B ₂	B ₃
Oses neutres	28,5	29,3	26,5
N-acétylglucosamine	15,3	15,3	-
Acide N-acétylneuraminique	33	23	13
<u>Acide N-acétylneuraminique</u> Oses neutres	1,16	0,7	0,5



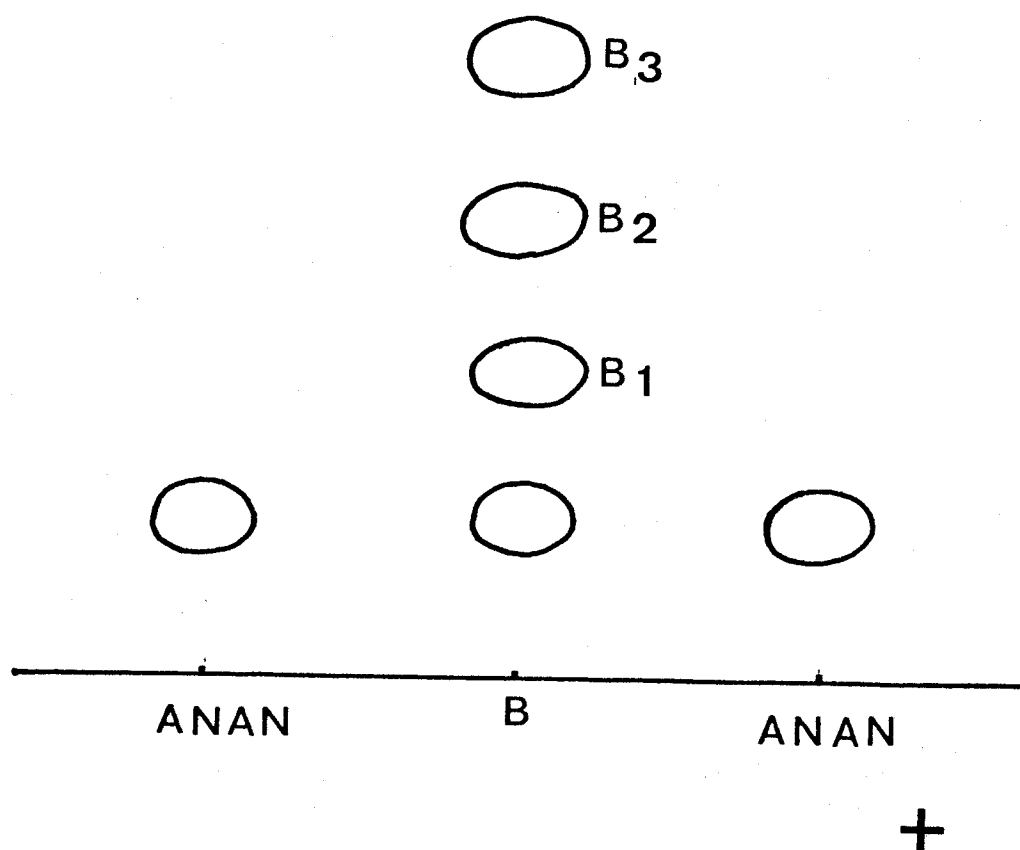


Figure 10

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



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

- 1°) la présence de lysine ;
- 2°) la présence de cystéine.

b) Composition en oses

La composition molaire en oses du glycopeptide B est précisée dans le tableau XI (p.77).

4 - CONCLUSIONS

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

C - PURIFICATION DU GLYCOPEPTIDE B

1 - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR PAPIER

A partir du glycopeptide B, par électrophorèse préparative dans le tampon de pH 2,4, nous obtenons 3 fractions glycopeptidiques que nous avons appelées fractions B₁, B₂ et B₃ (fig. 10 ; p.79) dont les compositions en acides aminés sont pratiquement identiques à celle du glycopeptide B natif.

La composition centésimale en oses neutres et en acide sialique est précisée dans le tableau XIII (p.78). La composition en oses neutres est la même pour chacune des fractions et correspond à la composition en oses neutres du glycopeptide B natif.

Au contraire, les compositions en acide sialique sont nettement différentes pour chacun des glycopeptides et, en considérant que la masse

molaire de ces glycopeptides est de l'ordre de 3600, les glycopeptides B₁, B₂ et B₃ possèderaient respectivement 3 résidus, 2 résidus et 1 résidu d'acide sialique.

L'hétérogénéité du glycopeptide B est donc due en partie aux différences de composition en acides sialiques des glycopeptides. Nous pensons que cette hétérogénéité s'explique, non pas par la préexistence de glycanes différents dans la transferrine native mais par une hydrolyse partielle des liaisons sialyl au cours de la chromatographie sur résines échangeuses de cations. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, de l'acide sialique libre est présent dans les préparations de glycopeptide B (voir l'électrophorégramme de la figure 10 (p.79)).

Mais les fractions B₁, B₂ et B₃ sont encore hétérogènes car les résidus d'acides aminés ne sont pas, entre eux, dans des rapports simples.

Pour pouvoir effectuer une séparation chromatographique ou électrophorétique, il était donc nécessaire de modifier le glycopeptide B.

2 - SOUS-FRACTIONNEMENT DU GLYCOPEPTIDE B

Le glycopeptide B ne pouvant être purifié, la présence de cystine nous a suggéré de modifier la charge des constituants de ce mélange en l'oxydant par l'acide performique.

Le glycopeptide oxydé est purifié par chromatographie sur résines échangeuses de cations (Dowex-50 ; forme H⁺).

L'élution par l'eau fournit 3 fractions glycopeptidiques "acides" : les fractions BOa₁, BOa₂, BOa₃.

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

Les rendements de chacune des fractions sont les suivants : pour 300 mg de glycopeptide B traité ; 68 mg de fraction BOa₁, 20 mg de fraction BOa₂, 30 mg de fraction BOa₃ et 70 mg de fraction BOb.

- Glycopeptides BOa

Chaque fraction est soumise à l'électrophorèse sur papier dans les différents tampons de pH 1,5 - 2,4 et 3,9. Chacun des glycopeptides se résout en plusieurs fractions d'importance variable. La composition en amino-acides de chaque fraction est donnée par le tableau XIV (p.83), qui confirme l'hétérogénéité de chaque fraction.

- Glycopeptides BOb

Le glycopeptide BOb est hétérogène en électrophorèse. Toutefois, le glycopeptide BOb possède une composition en amino-acides très simple ; en effet, il contient 1,1 résidu d'acide aspartique pour 0,9 résidu de lysine souillé par des traces d'autres amino-acides. Ainsi donc, l'hétérogénéité électrophorétique provient des modifications de la fraction glucidique au cours des divers traitements chimiques.

D - CONCLUSIONS

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

Cette étude devait également nous permettre de montrer :

1°) que les séquences d'acides aminés au voisinage du point d'attache sont différentes ;

2°) que chacun des glycopeptides est issu d'un endroit différent de la molécule de transferrine ;

Tableau XIV

Composition (a) en acides aminés des glycopeptides
trypsiques B0a₁, B0a₂, B0a₃, de la sérotransferrine

	B0a ₁	B0a ₂	B0a ₃
Cy SO ₃ H	2	1,7	2
Asp	4,5	3,6	4,2
Thr	1	1	1
Ser	1,7	1,7	1
Glu	0,7	1,1	2
Pro	1 à 2	1 à 2	2
Gly	3,1	2,1	1,9
Ala	0,5	0,6	0,8
Glc NH ₂	4	4	4
Val	1,5	1,5	1,9
Leu	1,5	1,3	1,9
Tyr	0,2	0,3	0,5
Phe	1,5	1,1	0,8
Lys	0,3	0,7	1,2
Arg	0,3	0,4	0,2



(a) En résidus d'acides aminés pour 4 résidus de glucosamine.

3°) que nous avons ainsi isolé chacune des 2 chaînes glucidiques dont le nombre avait été démontré par le calcul par JAMIESON (222) et SPIK et MONTREUIL (223).

DETERMINATION DES SEQUENCES
PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE DU GLYCOPEPTIDE A

Les expérimentations qui nous ont permis de déterminer la séquence du glycopeptide A sont résumées dans la figure 11 (p.85).

1 - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

La masse moléculaire déterminée par le dosage des fonctions amines libres est de 3200 pour un groupement NH_2 libre. Cette valeur est très certainement faible car il peut rester dans le glycopeptide des traces d'acides aminés libres.

2 - NATURE DU PONT DISULFURE

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

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

3 - AMINO-ACIDE C-TERMINAL ET SEQUENCE C-TERMINALE

L'hydrazinolyse effectuée sur le glycopeptide natif ne libère

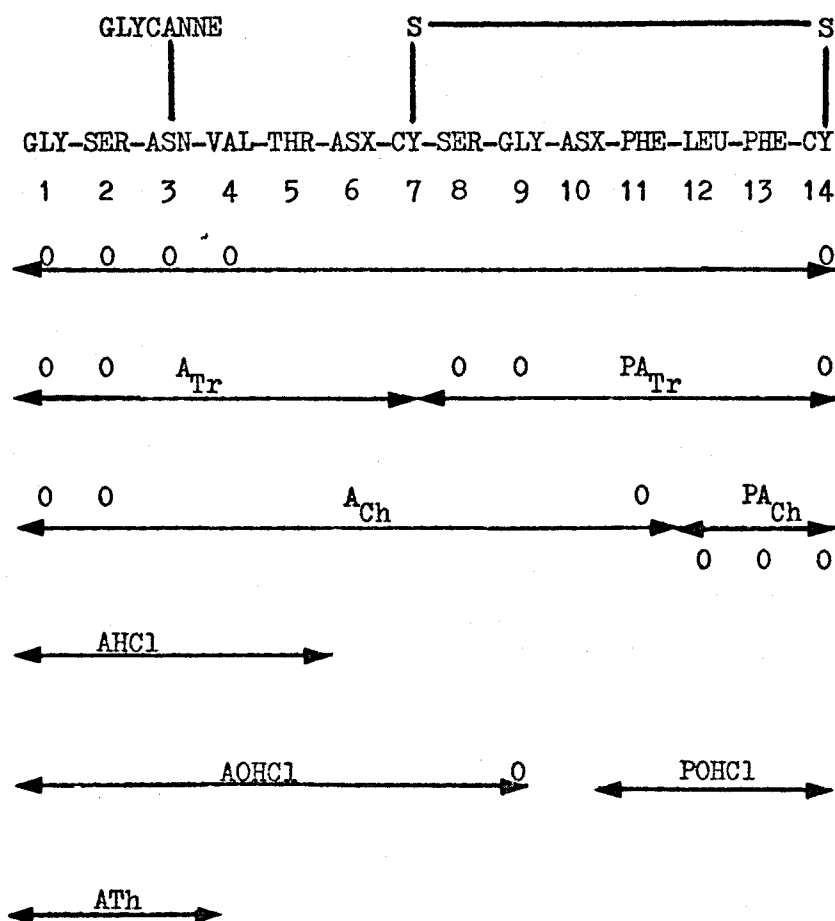


Figure 11

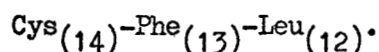
Schéma de structure du glycopeptide A.

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



aucun acide aminé. Toutefois, après oxydation performique, l'hydrazinolyse libère un résidu d'acide cystéique. Le glycopeptide possède donc un demi-résidu de cystine en position C-terminale. Ce résultat a été confirmé par l'action de la carboxypeptidase B. En effet, sur le glycopeptide A réduit et S-amino-éthylé, la carboxypeptidase B libère 0,6 micromole d'amino-éthylcystéine, 0,6 micromole de phénylalanine et 0,45 micromole de leucine pour 1 micromole de glycopeptide.

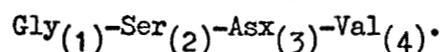
Ce résultat est en faveur de la séquence C-terminale suivante :



4 - SEQUENCE N-TERMINALE

L'existence d'une seule chaîne peptidique est confirmée par la présence d'un seul résidu d'acide aminé N-terminal : le glycocolle.

La dégradation récurrente d'Edman associée à la méthode de dansylation de GRAY et HARTLEY nous a permis de déterminer sur le glycopeptide la séquence N-terminale suivante :

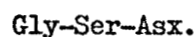


5 - HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE

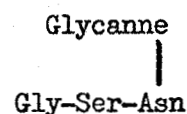
L'hydrolyse par la thermolysine du glycopeptide A oxydé nous a permis d'isoler par chromatographie préparative sur papier un glycopeptide A_{Th} dont la composition en amino-acides est la suivante :

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

La dégradation récurrente d'Edman fournit la séquence suivante :



Compte tenu des résultats de SPIK et al. (224) qui démontraient l'existence de la liaison entre l'asparagine et le glycanne, nous localisons le glycanne sur la partie N-terminale du peptide :



En outre, compte tenu de la spécificité d'action de la thermolysine (coupure préférentielle des liaisons au niveau de la valine), la position du résidu de valine⁽⁴⁾ par rapport à l'asparagine⁽³⁾ liée au glycanne est confirmée.

6 - HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE

Nous avons fait agir la trypsine sur le glycopeptide A réduit et S-amino-éthylé. L'hydrolyse a été effectuée pendant 24 heures en ajoutant trois fois la trypsine dans le rapport enzyme-substrat : 1/50 de façon à couper les liaisons S-amino-éthyl-cystéinyl qui sont hydrolysées moins rapidement que les liaisons lysyl.

Par chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G-50 des hydrolysats, nous avons isolé deux fractions : un glycopeptide A_{Tr} et une fraction peptidique PA_{Tr}.

Le glycopeptide A_{Tr} possède la composition en amino-acides suivante :

Asx : 2,0 ; Thr : 0,9 ; Ser : 1,2 ; Gly : 1,0 ; Val : 1,1 ;

Cys A-E : 1,1.

La position C-terminale de l'amino-éthyl-cystéine correspondant à la spécificité de coupure par la trypsine est confirmée par hydrazinolyse.

La dégradation récurrente d'Edman selon HIRS et al. (225) libère le glycocolle puis la sérine.

La fraction peptidique PA_{Tr} possède la composition suivante :

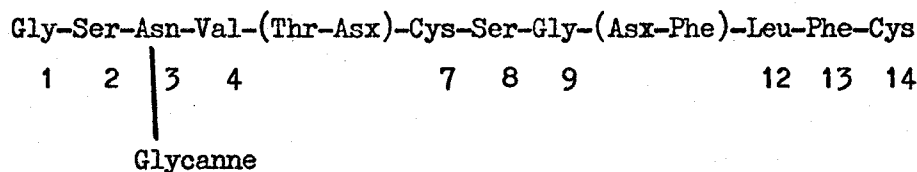
Asx : 1,0 ; Ser : 1,1 ; Gly : 0,8 ; Leu : 1,2 ; Phe : 0,9 ;

Cys A-E : 0,3.

Le défaut de phénylalanine et de S-amino-éthyl-cystéine s'explique par une activité chymotrypsique secondaire de la trypsine.

Cependant, la dégradation récurrente d'Edman sur la fraction peptidique PA_{Tr} libère la sérine puis le glycocolle.

Les résultats obtenus jusqu'à présent conduisent à la séquence partielle suivante :



7 - HYDROLYSE PAR LA CHYMOTRYPSINE

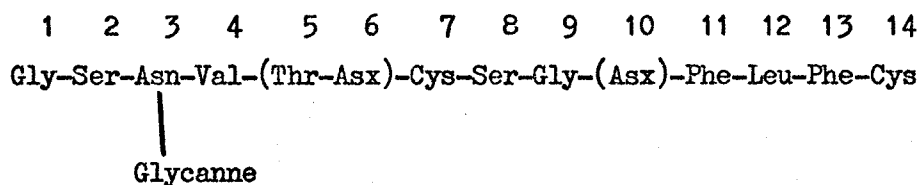
a) Le glycopeptide A est oxydé par l'acide performique et hydrolysé par la chymotrypsine pendant 8 heures.

Par chromatographie préparative sur papier, nous isolons deux fractions :

1°) un peptide qui possède la composition suivante : leucine : 0,6 ; acide cystéique : 0,6 ; phénylalanine : 1. Nous avons identifié l'acide cystéique en position C-terminale.

2°) un glycopeptide composé d'acide cystéique : 1 ; acide aspartique : 3,1 ; thréonine : 0,8 ; sérine : 2 ; glycolle : 2,1 ; valine : 1,0 ; phénylalanine : 1,1. Ce glycopeptide possède la phénylalanine en position C-terminale.

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



b) Ces résultats ont été confirmés de la manière suivante :

Le glycopeptide A, oxydé par l'acide performique, est hydrolysé par la chymotrypsine pendant 2 heures. Le seul amino-acide libre présent dans l'hydrolysat est l'acide cystéique, ce qui est en faveur d'une séquence Phe-Cys .

La dégradation récurrente d'Edman, selon HIRS et al. (226), a été effectuée sur un hydrolysats complet. Nous avons dosé avant et après chaque cycle.

- Au premier cycle, nous voyons disparaître le glycolle⁽¹⁾, la leucine⁽¹²⁾ et l'acide CySO_3H ⁽¹⁴⁾.

- Au deuxième cycle, disparaissent la sérine⁽²⁾ et la phénylalanine⁽¹³⁾.

Cet ensemble de résultats confirme donc la séquence proposée.

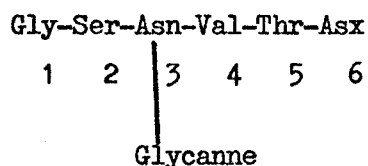
8 - HYDROLYSE PARTIELLE ACIDE

a) Hydrolyse du glycopeptide A natif.

L'hydrolyse du glycopeptide A natif par l'acide chlorhydrique 0,03 N fournit par chromatographie sur papier un glycopeptide dont la composition est la suivante : acide aspartique : 1,1 ; thréonine : 0,9 ; sérine : 1 ; glycolle : 0,9 ; valine : 0,9.

Le seul amino-acide libéré dans l'hydrolysats est l'acide aspartique.

Ces résultats, compte tenu de la spécificité de ce type d'hydrolyse qui libère préférentiellement l'acide aspartique, et, compte tenu de la séquence N-terminale du glycopeptide A natif, nous permettent de proposer la séquence suivante pour ce glycopeptide :



b) Hydrolyse du glycopeptide B oxydé.

Le glycopeptide préalablement oxydé par l'acide performique a été hydrolysé par HCl 0,03 N dans les mêmes conditions : l'hydrolysats ne

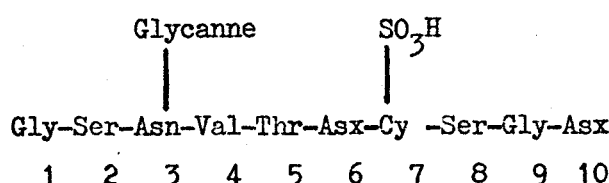
contient qu'un seul amino-acide libre : l'acide aspartique.

Par chromatographie sur papier, nous isolons :

1°) un glycopeptide dont la composition en acides aminés est la suivante : CySO_3H : 0,8 ; Asx : 1,8 ; Thr : 1,1 ; Ser : 1,7 ; Gly : 1,5 ; Val : 1,1. Ce glycopeptide possède en position C-terminale un résidu de glycolle et des traces de thréonine, d'acide aspartique et de sérine.

2°) une fraction peptidique dont la composition est la suivante : CySO_3H : 0,75 ; Asp : 0,5 ; Gly : 0,4 ; Leu : 0,9 ; Phe : 2.

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



9 - HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE M

L'hydrolyse pronasique suivie d'une hydrolyse M-aminopeptidasique du glycopeptide A oxydé ou réduit libère des acides aminés parmi lesquels nous n'avons pas caractérisé d'asparagine. Il n'y aurait donc pas de résidu d'asparagine dans le glycopeptide A, autre que le résidu (3) lié au glycane.

10 - CONCLUSIONS

Cet ensemble de résultats nous permet de proposer la séquence complète de la figure 11 (p.85) pour le glycopeptide A.

B - SEQUENCE PEPTIDIQUE DU GLYCOPEPTIDE BOB

La composition très simple en amino-acides de ce glycopeptide nous a permis d'établir la séquence peptidique et de l'identifier au

glycopeptide de SPIK et MONTREUIL (227) (228).

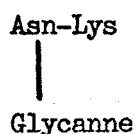
1 - AMINO-ACIDE N-TERMINAL

Les méthodes de dinitrophénylation et de dansylation révèlent la présence d'acide aspartique en position N-terminale dans le glycopeptide BOb.

2 - AMINO-ACIDE C-TERMINAL

La méthode d'hydrazinolyse nous a permis d'identifier la lysine en position C-terminale.

Ces résultats nous permettent d'attribuer au glycopeptide BOb le schéma de structure suivant :



C - CONCLUSION

1°) Les schémas de structure des glycopeptides A et BOb sont suffisamment différents pour que nous puissions conclure que les deux glycopeptides proviennent de points différents de la chaîne protéique de la transferrine. L'hydrolyse trypsique nous a permis d'atteindre le but que nous nous étions fixé : isoler deux glycopeptides, chacun portant un des deux groupements glucidiques. Ce résultat a été obtenu en fractionnant les hydrolysats tryptiques de la transferrine. L'exploration de la structure des deux groupements glycaniques ainsi séparés peut donc, à présent, être envisagée.

2°) Les séquences Ser-Asn-Glycanne et Glycanne-Asn-Lys déterminées par SPIK (229), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (230) et par SPIK et MONTREUIL (231), sont confirmés ainsi que l'existence de deux groupements

glucidiques par mole de transferrine.

3°) La présence d'une cystéine en position C-terminale ne correspond pas à la spécificité de la trypsine, puisque cet enzyme coupe exclusivement les liaisons arginyl et lysyl. Le glycopeptide A correspond donc à une séquence C-terminale de la transferrine native. Nous appellerons d'ailleurs le glycanne intra-caténaire glycanne I et le glycanne voisin du C-terminal glycanne II. Ce résultat confirme ce que nous avons décrit au chapitre précédent où nous avons montré qu'il existe dans la transferrine un résidu de cystéine en position C-terminale. Ce résultat a été d'ailleurs confirmé de nouveau par l'étude de l'action du bromure de cyanogène sur la transferrine.

4°) Dans le glycopeptide A, la position du résidu de thréonine en β de l'asparagine lié au glycanne, du côté C-terminal de la chaîne peptidique confirme l'hypothèse proposée par EYLAR en 1965 (233), par NEUBERGER en 1968 (234), puis par MONTREUIL (235), GOTTSCHALK (236) et SPIRO (237) en 1969, selon laquelle la présence d'un hydroxy-amino-acide en position de l'asparagine est nécessaire pour que le premier résidu de N-acétyl-glucosamine se fixe sur cette dernière. Selon MONTREUIL (238), la deuxième étape de la glycosylation serait constituée par une courte série de transosylations dirigée par des séquences peptidiques au voisinage du point d'attache. Or, si dans le glycopeptide A, nous déterminons une séquence peptidique relativement longue (14 résidus), il n'en est pas de même dans le glycopeptide B. Dans le but de confirmer ou d'infirmer d'emblée l'hypothèse de MONTREUIL, nous avons cherché à élargir la connaissance que nous avons des séquences peptidiques au voisinage de l'attache glycanne-protide. C'est pourquoi, nous avons repris une étude similaire sur des hydrolysats chymotrypsiques.

HYDROLYSE PAR LA CHYMOTRYPSINE

--oo 0 oo--

Dans le but d'étendre nos connaissances sur les séquences d'acides au voisinage du point d'attache glycanne-protide, dans le but futur d'étudier les interactions glycanne-peptide, nous avons substitué la chymotrypsine à la trypsine.

Le procédé de fractionnement de l'hydrolysate chymotrypsique est directement inspiré du procédé utilisé pour l'hydrolysate tryptique : chromatographie de tamisage moléculaire, puis, chromatographie d'échanges d'ions, et, enfin, électrophorèse.

I - MATERIEL ET METHODES

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1 - OXYDATION PERFORMIQUE

L'apo-STF est préalablement oxydée par l'acide performique dans les conditions précédemment décrites (voir p.45). Nous avons pu ainsi traiter des quantités de STF de l'ordre de 3 g.

2 - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

L'hydrolyse est menée dans les conditions classiques précédemment décrites, à l'aide des préparations de chymotrypsine ("grade V" ; firme Seravac). Le contrôle de l'hydrolyse est effectuée dans les mêmes conditions que dans le cas des hydrolysats tryptiques.

3 - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

Les hydrolysats chymotrypsiques sont soumis à une chromatographie de tamisage moléculaire sur le type de colonne de Séphadex G-50 qui est utilisée pour des hydrolysats trypsiques. La fraction glycopeptidique est traitée de la même manière et soumise à une seule chromatographie d'échanges d'ions sur une résine identique : (Dowex 50 x 2, forme acide, "mesh" 200-400) mais stabilisée dans l'acide acétique normal.

L'élution est réalisée par le passage de 300 ml d'une solution d'acide acétique normal, puis, d'un gradient linéaire d'acétate de pyridine, de molarité et de pH croissant de 0,2 M et pH 3,1 à 2 M et pH 5. Ce gradient est réalisé à l'aide de 2 réservoirs de 300 ml chacun.

Enfin, les glycopeptides subissent une ultime purification par électrophorèse sur papier.

4 - ELECTROPHORESE HAUT VOLTAGE EN VEINE LIQUIDE

Pour des raisons de facilité de préparations et de rendement, nous avons parfois substitué à l'électrophorèse sur papier l'électrophorèse en veine liquide.

Cette technique d'électrophorèse libre préparative a été réalisée avec un appareil Elphor-Vap II.

Les substances sont séparées dans un film liquide de 0,5 mm d'épaisseur qui s'écoule entre 2 plaques de verre. Perpendiculairement au sens d'écoulement du tampon est appliqué un champ électrique. La particule migre suivant une trajectoire qui, toute chose égale par ailleurs, est fonction de sa charge propre.

Cette technique est utilisée pour le fractionnement des glycopeptides en tampon de pH 2,4, sous une tension de 1700 V, suivant le protocole mis au point par CHERON (239). Les fractions contenant les glycopeptides sont repérés classiquement.

5 - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN GLUCIDES ET EN AMINO-ACIDES

La détermination de la composition en glucides et en amino-acides est effectuée suivant des techniques déjà décrites, à l'exception des compositions molaires en glucides qui sont déterminées suivant la technique de ZANETTA et al. (240).

B - PROCEDES DE DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

Les procédés de détermination des séquences peptidiques que nous avons appliqués ont été décrits plus haut (voir p.69) à propos de la détermination de la séquence peptidique des glycopeptides obtenus par hydrolyse trypsique, à l'exception toutefois de la méthode de dégradation récurrente d'Edman. Nous utilisons une microtechnique particulière mise au point par HAN (241) avec identification systématique des PTH-amino-acides.

1 - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN SELON HAN ET Coll. (242)

Tous les produits utilisés sont de qualité "Sequanal Grade" et proviennent de la firme Pierce Chemicals, sauf l'éther que nous purifions nous-mêmes par distillation sur SnCl_2 .

- Couplage :

1 micromole de peptide est dissoute dans 100 microlitres d'un tampon propanol/eau (3:1,v/v) 0,4 M en diméthylallylamine ajustée à pH 9,5 avec de l'acide trifluoro-acétique (ATFA), 10 microlitres de phénylisothiocyanate (PITC) sont alors ajoutés sous atmosphère d'azote. L'ensemble est maintenu à 50° C pendant 30 minutes, puis refroidi pour vérifier que l'excès de PITC précipite. Sinon, 5 microlitres de PITC sont ajoutés et le peptide est remplacé à 50° C pendant 20 minutes. L'excès de PITC est extrait 7 fois par le benzène. La phase aqueuse est séchée sous courant d'azote, puis, par un séjour à 50° C sous vide.

- Clivage :

La libération de la thiazolinone est effectuée en ajoutant 100 microlitres d'ATFA anhydre, l'ensemble étant placé pendant 7 minutes à 50° C sous azote, puis séché sous courant d'azote. (ATFA : acide trifluoroacétique).

- Extraction :

La thiazolinone est extraite 3 fois par 0,5 ml d'éther sans peroxyde contenant du dithiothréitol (1 mg/10 ml). La phase étherée est séchée sous azote.

- Conversion :

La thiazolinone est convertie en phénylthiohydantoïne (PTH) en reprenant l'extrait étheré par 200 microlitres d'acide chlorhydrique 1 N qui sont placés à 80° C pendant 10 minutes. Les PTH-amino-acides sont extraits 3 fois par 0,7 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sous azote et le résidu repris par 20 microlitres d'acétate d'éthyle.

2 - IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES

L'identification systématique des phénylthiohydantoïnes est effectuée sur plaques de Silicagel (type D₅F, Merck) contenant un indicateur fluorescent.

Les migrations sont effectuées suivant la "technique du couloir" et en cuves classiques, à l'obscurité.

Nous utilisons les systèmes solvants décrits par EDMAN et BEGG (24).

- Système D :

La plaque est trempée dans le mélange formamide/acétone (3:7, v/v) pendant une seconde, puis séchée entre 2 feuilles de papier filtre. La migration est effectuée.

- Système E :

97 ml d'acétate d'éthyle sont mélangés à 3 ml d'eau. L'ensemble est laissé une nuit au repos. La phase supérieure est récupérée et additionnée de 4 ml de formamide et 3 ml d'acide propionique. Le mélange est stabilisé pendant 2 heures.

- Système H :

Le solvant est composé de 60 ml de chlorure d'éthylène pour 14 ml d'acide acétique. Dans certains cas, l'acide aminé est régénéré par hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6 N ; à 150° C pendant 20 heures), puis, identifié par électrophorèse sur papier ou à l'autoanalyseur d'acides-amino. C'est le cas des phénylthiohydantoïnes non extractibles par l'acétate d'éthyle, et pour la discrimination de la leucine d'avec l'isoleucine.

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

L'ensemble du fractionnement est schématisé dans la figure 12 (p.98).

1 - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

La chymotrypsine dégrade peu l'apo-STF. C'est pourquoi, nous oxydons l'apo-STF par l'acide performique avant de la soumettre à l'hydrolyse. Dans ces conditions, la protéolyse est profonde comme l'indique l'électrochromatographie réalisée sur l'hydrolysate.

2 - PURIFICATION SUR GEL SEPHADEX G-50

L'hydrolysate, chromatographié sur gel de Séphadex G-50, fournit une seule fraction glycopeptidique (fraction des "glycopeptides totaux")

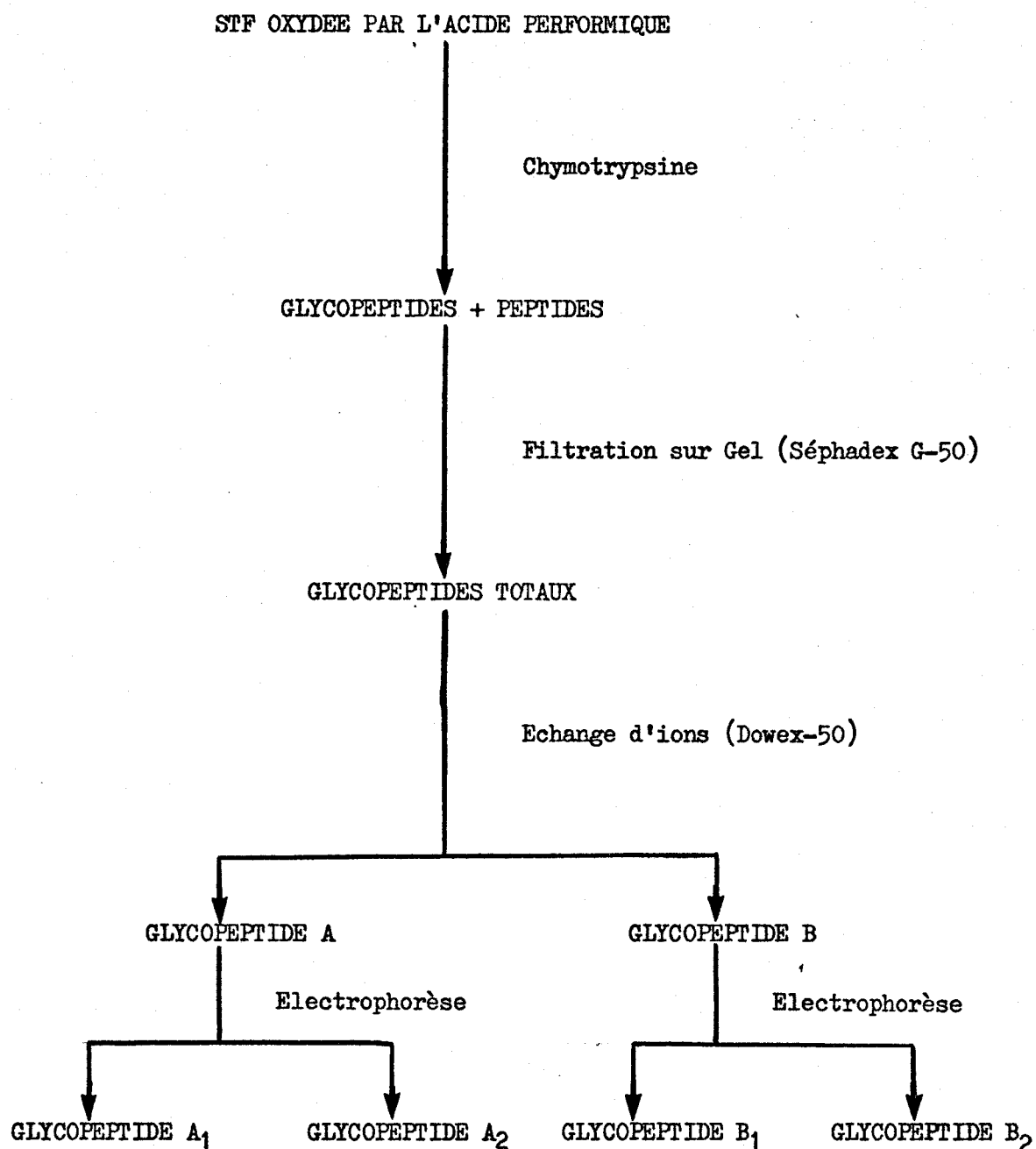


Figure 12



Schéma de fractionnement des hydrolysats chymotrypsiques de la STF

avec un rendement de 100 mg environ pour 1 g d'apo-STF.

3 - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

La fraction "glycopeptides totaux" est injectée sur une colonne de résines échangeuses de cations.

L'élution par acide acétique 1 N fournit une première fraction (Glycopeptide A) de 40 mg.

L'élution par le gradient formiate de pyridine donne une seconde fraction (Glycopeptide B) de 60 mg.

B - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

1 - ETUDE DU "GLYCOPEPTIDE A"

La fraction glycopeptidique A soumise à l'électrophorèse sur papier (10 v/cm ; pH 2,4) se subdivise en 2 glycopeptides : A₁ et A₂. Un résultat analogue est obtenu par électrophorèse en veine liquide dans le même tampon.



2 - COMPOSITION CHIMIQUE DES GLYCOPEPTIDES A₁ ET A₂

Les 2 glycopeptides A₁ et A₂ possèdent la même composition en acides aminés, (tableau XV ; p.100) et ne diffèrent que par leur composition en acide sialique : 20 p. 100 pour A₁ et 17,3 p. 100 pour A₂.

Leur composition en amino-acides correspond, à un résidu de phénylalanine, à un résidu de leucine et à un résidu de cystéine près, à la composition du "Glycopeptide A tryptique" : Glycopeptide C-terminal.

3 - ETUDE DU "GLYCOPEPTIDE B"

Le "Glycopeptide B" fournit de la même façon, en proportions égales, 2 glycopeptides B₁ et B₂ qui possèdent la même composition en acides aminés, (tableau XV ; p.100) et ne diffèrent que par leur composition

Tableau XV

Composition molaire en amino-acides des glycopeptides isolés
des hydrolysats chymotrypsiques de la sérotransferrine

	Glycopeptides A ₁ et A ₂	Glycopeptides B ₁ et B ₂
Cy SO ₃ H	1	0,9
Asp	3,2	4
Thr	1	1
Ser	2,1	1,1
Glu	-	2
Pro	-	1
Gly	2,3	1,2
Ala	-	1,1
Val	1	-
Tyr	-	0,8
Phe	1,1	-
Lys	-	0,9



en acide sialique : 25,5 p. 100 et 12 p. 100 pour B₁ et B₂ respectivement. La présence en lysine dans le glycopeptide B indique que ce composé provient du même endroit de la chaîne peptidique que le glycopeptide BOB trypsique.

4 - CONCLUSIONS

L'hydrolyse chymotrypsique nous fournit des glycopeptides dans un état de pureté suffisant pour que l'étude des séquences peptidiques de part et d'autre du point d'attache avec le glycanne soit envisagée.

Le "Glycopeptide B" contient 14 amino-acides et provient du même endroit de la chaîne peptidique que le "Glycopeptide BOB trypsique" qui ne contient que 2 amino-acides. Il nous serait donc possible d'élargir à ce niveau notre connaissance de la séquence peptidique.

C - DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES

1 - SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES A₁ ET A₂

Nous travaillons indifféremment sur les Glycopeptides A₁ ou A₂ qui possèdent la même composition en amino-acides.

L'application des procédés d'exploration des structures peptidiques nous apporte les résultats suivants :

1°) L'hydrazinolyse montre que la phénylalanine est en position C-terminale.

2°) La dégradation récurrente d'Edman associée à la méthode de dansylation nous permet de préciser la séquence N-terminale :

Gly-Ser-Asn-(Glycanne II)-Val

Cette séquence est identique à celle du Glycopeptide A que nous isolons des hydrolysats tryptiques de la transferrine et dont nous précisons la séquence complète dans le chapitre précédent.

Compte tenu de la composition en amino-acides des Glycopeptides A_1 et A_2 , d'une part, et de la séquence N-terminale, d'autre part, nous pouvons admettre que la structure de la fraction peptidique est la suivante :

Gly-Ser-Asn-(Glycanne)-Val-Thr-Asp-Cys-Ser-Gly-Asp-Phe.

2 - SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES B_1 ET B_2

Les déterminations ont été menées indifféremment sur les glycopeptides B_1 ou B_2 .

1°) L'acide aspartique est identifié en position N-terminale.

2°) L'hydrazinolyse des glycopeptides démontre que la tyrosine est en position C-terminale. Ce résultat est confirmé par l'action de la carboxypeptidase A qui libère un résidu de tyrosine et 0,5 résidu de glycocolle et des traces d'alanine.

3°) L'action de la thermolysine sur le glycopeptide nous a fourni une fraction glycopeptidique qui est constituée par les acides aminés suivants : Asx : 3,7 ; Lys : 1 ; Ser : 1 ; Thr : 1 ; Glx : 1,9 ; Pro : 0,9 ; $CySO_3H$: 1 ; et une fraction peptidique ayant pour composition : Ala : 0,5 ; Gly : 1 ; Tyr : 1. Ces résultats associés aux précédents permettent de préciser la séquence C-terminale : $Ala_{(12)}-Gly_{(13)}-Tyr_{(14)}$.

4°) La trypsine coupe le glyco-tétradécapeptide en 2 fractions qui ont été isolées par chromatographie sur papier.

a) L'une est le glyco-dipeptide de SPIK et MONTREUIL :

Glycanne-Asn-Lys.

b) La seconde est un peptide qui est composé de 12 résidus d'acides aminés : Ala : 1,1 ; Asx : 3 ; $CySO_3H$: 0,9 ; Gly : 1,2 ; Glx : 2,1 ; Pro : 0,8 ; Ser : 1,2 ; Thr : 0,9 ; Tyr : 0,85 ; et dont la structure peut s'écrire :

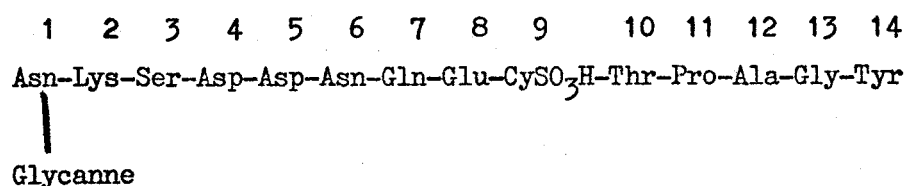
Ser-Asp-Asp-Asn-Gln-Glu- $CySO_3H$ -Thr-Pro-Ala-Gly-Tyr.

En effet :

1 - 10 dégradations récurrentes successives ont permis de préciser l'enchaînement jusqu'à l'antépénultième amino-acide ;

2 - la séquence C-terminale Ala-Gly-Tyr étant déterminée.

En associant les structures du glyco-dipeptide et du dodécapeptide libérés par action de la trypsine sur le glyco-tétradécapeptide B, nous pouvons proposer pour ce dernier, le schéma de structure suivant :



D - CONCLUSIONS

1°) En conjuguant les résultats obtenus par hydrolyse tryptique et chymotryptique, nous pouvons donner les séquences peptidiques au voisinage des glycanes I et II de la STF (fig. 13 ; p.104).

2°) Le glycane I et le glycane II sont liés à des séquences peptidiques totalement différentes. En conséquence, si l'hypothèse de MONTREUIL (244) est exacte, la structure des 2 chaînes glycaniques doit être profondément différente.

3°) Il est remarquable de noter que la trypsine et la chymotrypsine coupent la chaîne peptidique au même endroit du côté N-terminal des glycopeptides. Ainsi, la trypsine et la chymotrypsine coupent la même séquence X-Gly et X-Asn dans chacun des cas.

La connaissance des séquences est très faible du côté N-terminal et c'est pour cette raison que nous avons appliqué d'autres types d'hydrolyses enzymatiques.

Glycane I



Asn-Lys-Ser-Asp-Asp-Asn-Gln-Glu-Cys-Thr-Pro-Ala-Gly-Tyr

Glycane II



Gly-Ser-Asn-Val-Thr-Asp-Cys-Ser-Gly-Asp-Phe-Leu-Phe-Cys



Figure 13



Séquences peptidiques au voisinage du point d'attache des glycannes I et II avec la chaîne peptidique en associant les résultats de l'étude des glycopeptides trypsiques et chymotrypsiques.

HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE

—oo 0 oo—

I - MATERIEL ET METHODES

Nous appliquons les mêmes principes que pour l'étude des hydrolysats tryptiques et chymotryptiques.

Toutefois, notre problème est uniquement un problème de séquence peptidique, afin d'éliminer l'influence de l'acide sialique sur le fractionnement, la fraction glycopeptidique totale obtenue par tamisage moléculaire est désialylée par la neuraminidase pour permettre de séparer des glycopeptides par électrophorèse sans que la charge due aux acides sialiques intervienne.

A - HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE

Sur l'apo-STF réduite et alkylée par l'acide iodacétique, nous faisons agir la thermolysine dans les conditions classiques déjà décrites, pendant 24 h.

B - ACTION DE LA NEURAMINIDASE

La neuraminidase est fournie par la firme WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un tampon de pH 5,6 (SPIK) (245), dans une étuve à 37° C, pendant 24 heures, en utilisant un rapport enzyme/substrat 1:20.

C - ELECTROPHORESE SUR PAPIER A HAUTE TENSION

Pour obtenir un meilleur pouvoir de résolution, nous avons séparé

les glycopeptides par électrophorèse à haute tension. Toutes ces électrophorèses, analytiques, puis préparatives, ont été réalisées dans les conditions suivantes : en tampon acétate de pyridine (100 ml/litre), pH 6,4, de 1 h 30 à 2 h, à 4000 V sur papier Whatman n° 3.

La feuille d'électrophorèse est préalablement mise à tremper dans le tampon pendant au moins 10 minutes. Elle est ensuite époncée délicatement entre deux feuilles de papier filtre et le dépôt est fait sur la feuille humide. La feuille est placée bien à plat sur le socle de l'appareil, puis, on place les ponts de papier humide, recouverts d'une feuille de cellophane pour éviter l'évaporation. La feuille d'électrophorèse est enfin serrée entre deux plaques recouvertes de plastique.

Les glycopeptides séparés par électrophorèse analytique ont été isolés par électrophorèse préparative dans les mêmes conditions. Les bandes de papier, découpées, ont été éluées par l'acide acétique 10 p. 100 dans un éluant de DENT.

D - DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

Les séquences peptidiques sont déterminées par des méthodes classiques déjà décrites.

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1 - COUPURE DES PONTS DISULFURES

Sur 1 gramme d'apo-STF, dénaturée en urée 8 M, on réalise une coupure de ponts disulfures. Les cystéines libérées sont ensuite alkylées par l'acide iodacétique. La solution est alors soigneusement dialysée contre de

l'eau permutée.

2 - HYDROLYSES ENZYMATIQUES

L'adialysable, concentré à l'évaporateur rotatif est hydrolysé par la thermolysine pendant 24 heures. L'hydrolysate concentré est ensuite purifié sur une colonne de Séphadex G-50, éluée à l'eau.

On collecte la fraction phénol positive qui est évaporée et désialylée par la neuraminidase pendant une nuit dans une étuve à 37° C. La solution est de nouveau purifiée sur une colonne de Séphadex G-50 et la fraction glycopeptidique collectée et lyophilisée.

3 - ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE

Un essai d'électrophorèse à haut voltage de la fraction glycopeptidique, révélée à la ninhydrine et à l'acide periodique/benzidine montre la présence d'un grand nombre de peptides contaminants.

C'est pourquoi, la fraction phénol positive collectée est de nouveau fractionnée par électrophorèse préparative en veine liquide à pH 2,4. Le repérage sur une aliquote, par la réaction au phénol sulfurique, permet d'obtenir 3 pics phénols positifs. Ces 3 fractions F_I , F_{II} et F_{III} sont collectées séparément et lyophilisées.

4 - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

Sur une aliquote de chaque fraction F_I , F_{II} et F_{III} , on effectue deux électrophorèses à haut voltage sur papier, dans les mêmes conditions. L'une est révélée à la ninhydrine, l'autre à l'acide periodique-benzidine. Les deux types de révélation fournissent le même nombre de taches. La répartition des glycopeptides obtenus est schématisée dans la figure 14 (p.108).

Cette séparation étant assez satisfaisante, on effectue ensuite des électrophorèses préparatives de chacune des 3 fractions, dans les mêmes conditions. Les bandes obtenues sont découpées et éluées par de l'acide acé-

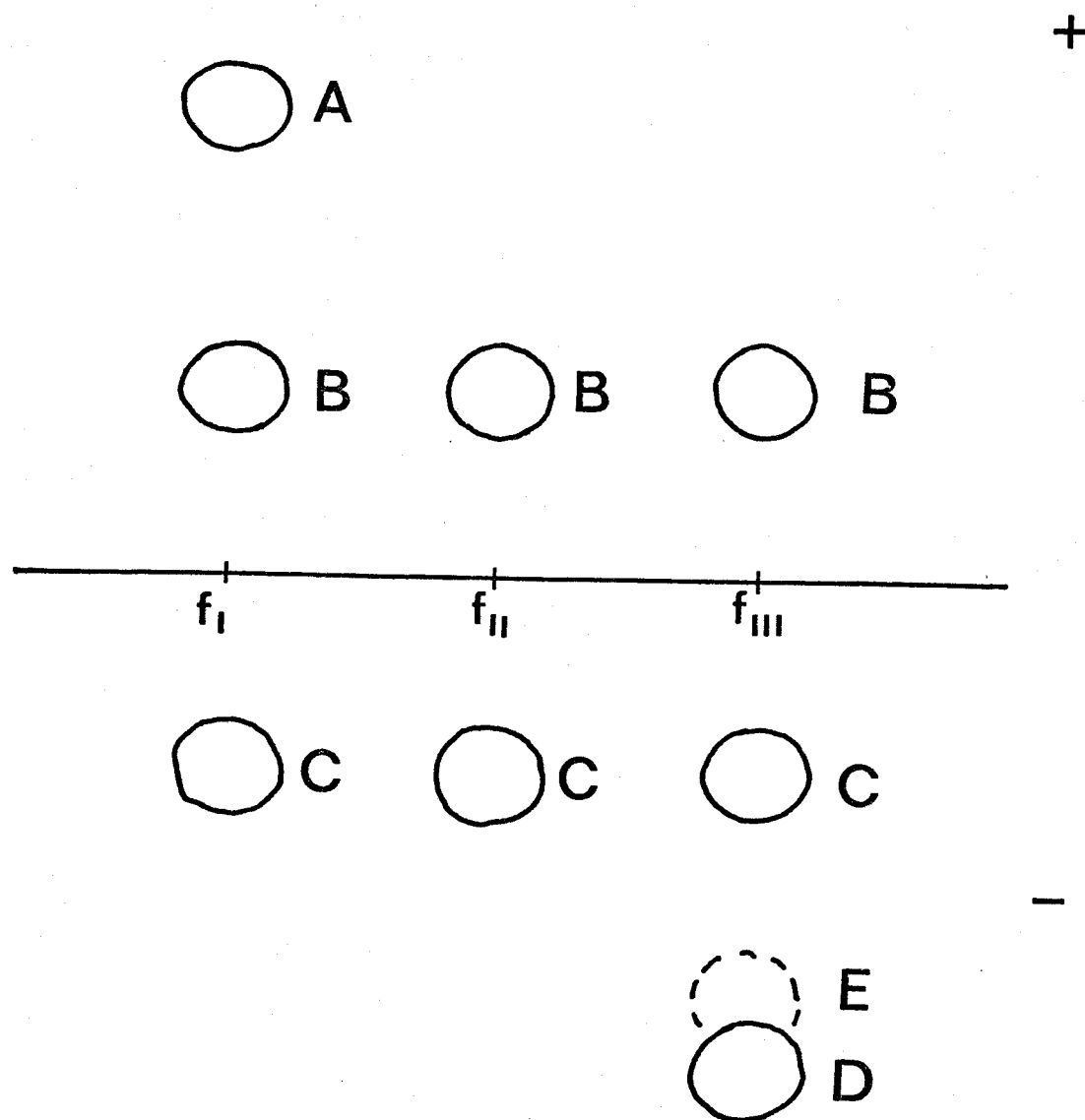


Figure 14



Glycopeptides thermolysiques d'apotransferrine. Electrophorèse pH 6,4 (papier Whatman n° 3 ; 70 V/cm pendant 1 h 30) des fractions F_I , F_{II} et F_{III} .

tique 10 p. 100.

B - SEQUENCES PEPTIDIQUES

1 - COMPOSITION

Une aliquote des glycopeptides C et D est hydrolysée par HCl 5,6 N en tube scellé sous vide, puis, les hydrolysats sont passés à l'Auto-analyseur d'acides aminés. Leur composition est précisée dans le tableau XVI (p.110).

2 - SEQUENCES

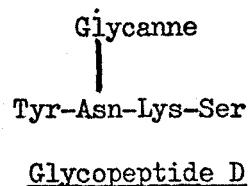
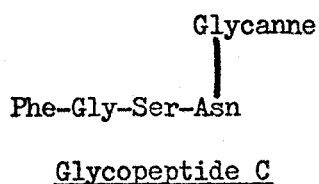
Par dansylation du glycopeptide D, nous avons identifié la tyrosine comme acide aminé N-terminal.

De même, la phénylalanine a été mise en évidence à l'extrémité N-terminal du glycopeptide C. La dégradation récurrente d'Edman, couplée avec la méthode de dansylation, nous a permis de déterminer sur le glycopeptide C la séquence N-terminale : Phe-Gly-Ser.

Les dansylations effectuées sur les glycopeptides A, B et E, beaucoup moins nettes, n'ont pas permis de donner un résultat sans ambiguïté.

3 - CONCLUSIONS

Les résultats précédents permettent de donner aux glycopeptides C et D la structure suivante, compte tenu des résultats acquis antérieurement :



C - CONCLUSIONS

a) Les schémas de structure étant suffisamment différenciés, ces deux glycopeptides correspondent bien aux deux groupements glycaniques de la transferrine.

Tableau XVI

Composition molaire en acides aminés des glycopeptides
thermolysiques C et D de la sérotransferrine

	Glycopeptides	
	C	D
Asn	0,8	1,2
Ser	0,8	1
Gly	-	0,8
GlcNH ₂	3,2	2,8
Phe	-	0,6
Tyr	1	-
Lys	1	-

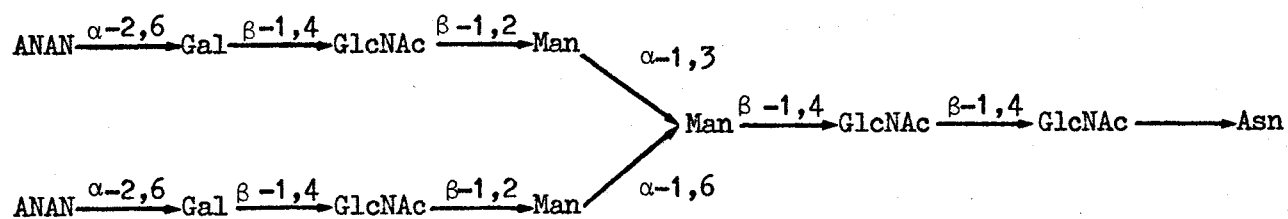


b) Ce fractionnement, après coupure par la thermolysine de la S-carboxyméthyl-STF, nous a permis d'élargir les séquences obtenues antérieurement. Un résidu de phénylalanine et un résidu de tyrosine ont été identifiés chacun en N-terminal de deux glycopeptides correspondant aux deux glycanes de la transferrine.

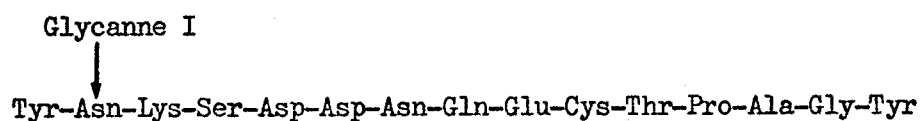
c) Toutefois, les tentatives pour retrouver et approfondir les résultats obtenus dans cette expérience, ont échoué. Cette difficulté semble due à la faible spécificité de l'enzyme, dont l'action varie très facilement en fonction des conditions expérimentales.

C'est pourquoi, mis à part le cas particulier de ruptures secondaires sur de petits peptides ou glycopeptides, il semble inopportun d'utiliser la thermolysine en vue de couper de manière spécifique une glycoprotéine, les expériences étant difficilement reproductibles.

d) Les actions de la trypsine et de la chymotrypsine ont conduit à des coupures au même niveau du côté N-terminal des deux glycopeptides : la trypsine et la chymotrypsine ont coupé une liaison phénylalaninyl dans un cas et une liaison tyrosyl pour l'autre glycopeptide. Cette spécificité inhabituelle de la trypsine, ainsi que l'analogie d'action des deux enzymes dans le cas de la STF pourrait provenir de la proximité des chaînes glycaniques qui modifierait, par empêchement stérique, ou par interaction, la spécificité enzymatique.



GLYCOPEPTIDE I



GLYCOPEPTIDE II

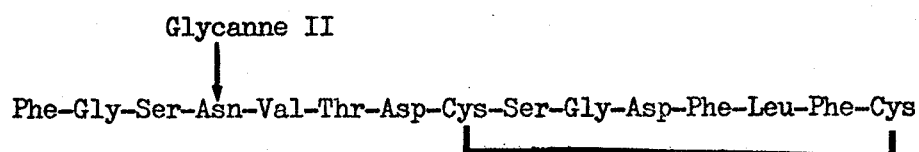


Figure 15

Structure complète des glycopeptides de la sérotransferrine humaine.

CONCLUSIONS GENERALES

--oo 0 oo--

Les recherches que nous venons d'exposer concernaient les glycanes et la partie de la protéine qui leur est liée dans un double but :

1 - LIAISONS ENTRE LA STRUCTURE ET LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

Grâce à la détermination de la structure des glycanes de la STF qui a été effectuée au Laboratoire par SPIK, BAYARD, FOURNET, STRECKER, BOUQUELET et MONTREUIL (246), nous pouvons analyser les différentes hypothèses proposées.

La figure 15 (p.112) donne la structure complète des 2 glycopeptides de la STF.

Chacune de ces structures confirment sans ambiguïté l'hypothèse proposée par EYLAR (247), NEUBERGER (248), MONTREUIL (249), GOTTSCHALK (250) et SPIRO (251) selon laquelle la présence d'un hydroxy-amino-acide en position β du côté C-terminal de l'asparagine, liée au glycanne est nécessaire pour que le premier résidu de N-acétylglucosamine se fixe sur celle-ci. Dans un cas, ici, nous avons la séquence : Asn-Val-Thr, dans l'autre, la séquence : Asn-Lys-Ser.

Par contre, selon une ancienne hypothèse émise par MONTREUIL (252), la deuxième étape de la glycosylation serait constituée par une courte série de transosylations dirigée par des séquences peptidiques.

Or, si les glycanes I et II sont identiques, les séquences peptidiques sont très différentes. Nous pouvons donc exclure l'intervention des séquences d'amino-acides aux environs du point d'attache dans le contrôle

de la spécificité de la structure des glycanes. Toutefois, nous ne pouvons éliminer l'intervention de séquences peptidiques situées plus loin du point d'attache.

2 - ROLE BIOLOGIQUE DES GLYCANES DANS LES GLYCOPROTEINES

L'un des rôles que jouent les glycanes est celui de signaux de reconnaissance des cellules cibles. Si l'on veut étudier ce problème, il est indispensable de connaître la structure des glycanes, mais, aussi, la position de ceux-ci sur la molécule.

L'étude des hydrolysats enzymatiques de la transferrine nous a permis d'aborder ce problème, en confirmant l'existence des 2 groupements glycaniques dans la molécule et en montrant que chaque glycanne est lié à une partie bien différente de la molécule.

Enfin, il nous a été possible de montrer que l'un des glycanes est situé dans la partie C-terminale de la sérotransferrine.

Il nous reste à localiser l'autre glycanne pour avoir un peu plus d'informations sur leurs positions relatives dans l'espace, leurs positions exactes ne pouvant être déterminées que si l'on connaît la structure tridimensionnelle de la molécule, ce qui implique la connaissance complète de sa structure primaire.

C'est dans le but d'aborder ce problème que nous avons entrepris le fractionnement des peptides libérés par le bromure de cyanogène.

CHAPITRE III

--oo 0 oo--

ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR LA TRANSFERRINE SERIQUE HUMAINE

--oo 0 oo--

La coupure des protéines par le bromure de cyanogène (CNBr) au niveau de la méthionine est le seul type de coupure chimique donnant de bons résultats. Les protéines possèdent, en général, un petit nombre de résidus de méthionine, donc le bromure de cyanogène libère un nombre restreint de peptides, ce qui est intéressant pour l'étude des structures primaires. La STF possède 8 résidus de méthionine et sa coupure par le CNBr doit fournir 9 fragments.

Nous n'avons pas effectué l'action de CNBr dans le but principal de déterminer la séquence peptidique complète de la transferrine, nos préoccupations premières étaient, en effet, d'obtenir :

1°) des glycopeptides ayant une chaîne peptidique plus longue qu'avec les enzymes protéolytiques et, si possible, un glycopeptide contenant les 2 glycannes de la transferrine de façon à essayer de localiser ces glycannes sur la molécule - ce dernier point est très important pour l'étude du rôle biologique des glycannes dans les glycoprotéines ;

2°) de confirmer la présence du demi-résidu de cystéine en position C-terminale dans la transferrine - le peptide C-terminal étant aisé-

ment repéré par le fait qu'il ne contient pas d'homosérine ainsi que par la présence du glycanne II au voisinage du C-terminal ;

3°) d'amorcer, enfin, l'étude de la structure primaire complète de la transferrine.

--oo 0 oo--

ISOLEMENT ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES 9

PEPTIDES LIBERES PAR ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

--oo 0 oo--

I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

Nous utilisons l'apo-STF obtenue dans les conditions décrites à la page 40. Le CNBr est de qualité "Pour Analyse" et fourni par la firme Fluka. Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité "Pour Analyse" et proviennent des firmes Carlo Erba ou Merck.

B - COUPURE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

Le principe de la coupure des chaînes peptidiques au niveau de la méthionine est résumé dans le schéma de la figure 17 (p.117). Il convient de rappeler que la coupure de liaison Met-Ser est difficile en raison de la formation d'une lactone interne (Fig. 17 bis ; p.118).

Mode opératoire

Nous utilisons la méthode classique de STEERS et al. (253).

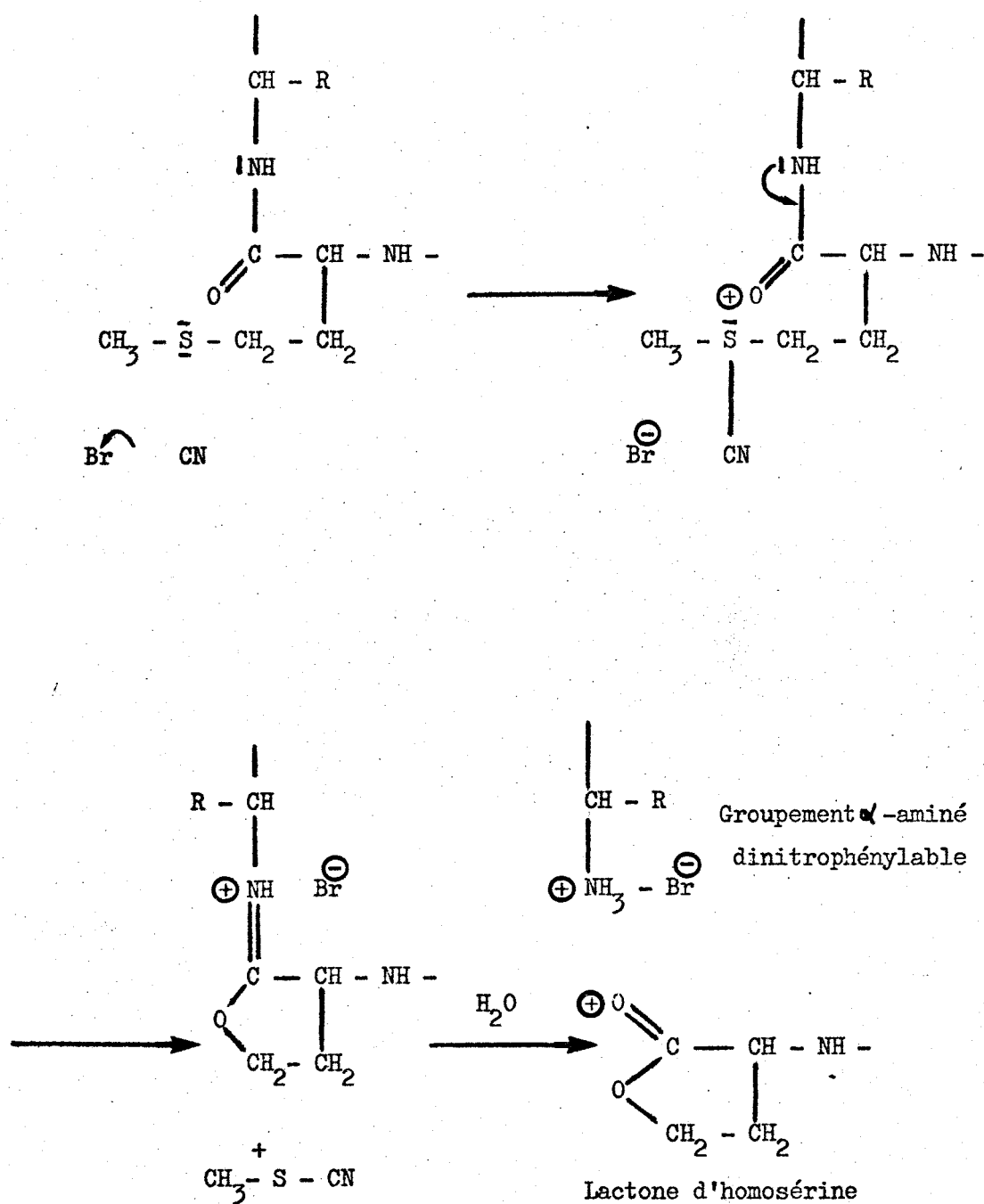


Figure 17

Coupage chimique des liaisons méthionyl-X
par le BrCN, d'après HAN (253 b).



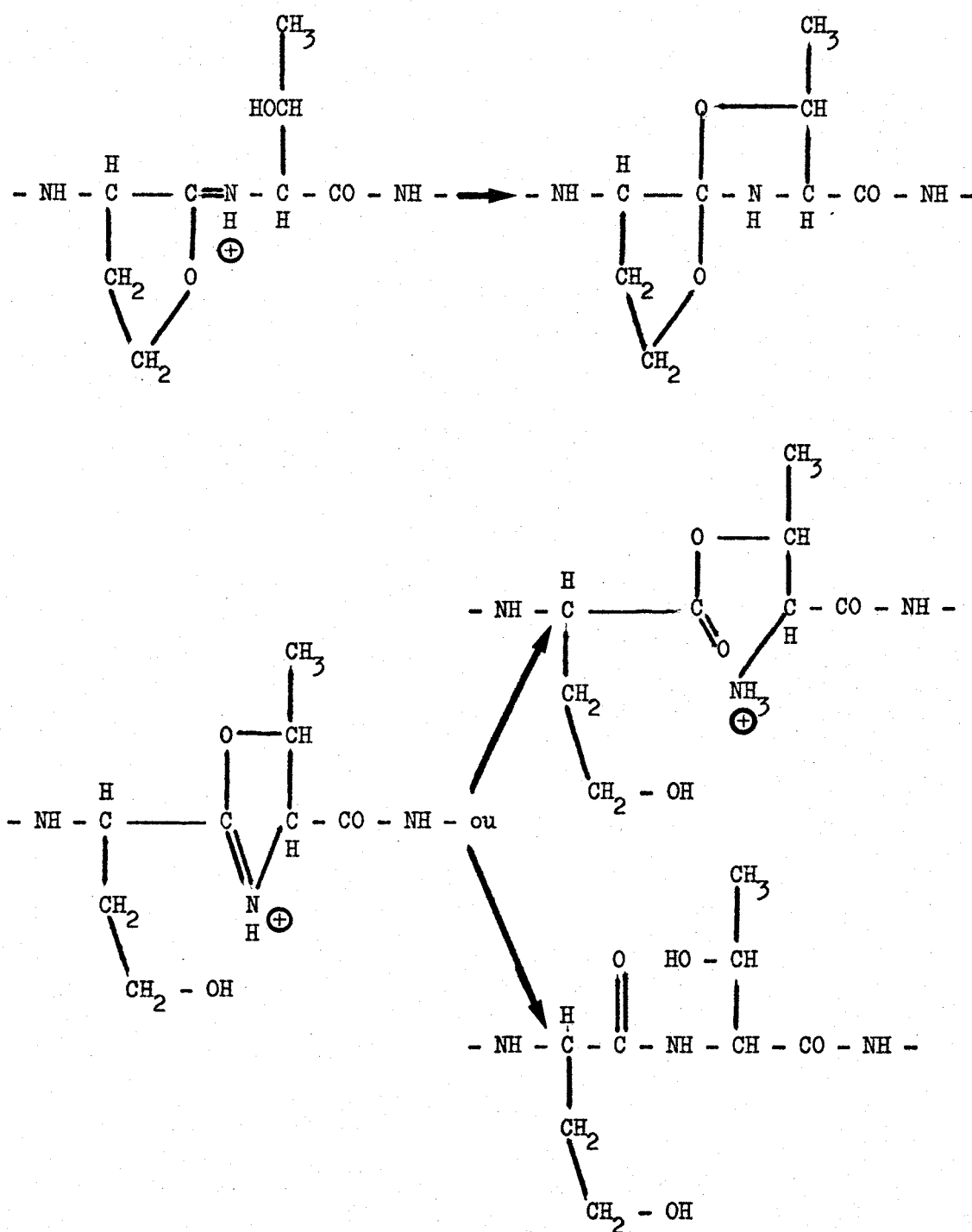


Figure 17 bis

Mécanisme de la formation des liaisons intra-moléculaires entre iminolactone et hydroxyle des résidus de sérine et de thréonine au cours de la coupure chimique des liaisons méthionyl-séryl et méthionyl-thréonyl par le BrCN, d'après HAN (253 b).

A 300 mg d'apo-STF, dissous dans 20 ml d'acide formique à 70 p. 100, nous ajoutons 500 mg de CNBr cristallisé et le mélange est maintenu sous agitation pendant 24 heures à l'obscurité et à la température du Laboratoire. La solution est alors diluée 10 fois et lyophilisée ou évaporée sous pression réduite.

C - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES LIBERES

Le fractionnement des peptides et glycopeptides libérés par action du CNBr sur la STF est effectué en appliquant successivement les procédés suivants :

- 1°) chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-75 ;
- 2°) coupure des ponts disulfures sur certaines fractions ;
- 3°) séparation des peptides libérés par chromatographie d'échanges d'ions (DEAE-Séphadex) et par tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-100 ou G-75.

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR GEL

Les peptides libérés par action du CNBr sont préalablement séparés par chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-75 "fine" (colonne de 130 cm x 2,5 cm) stabilisé dans l'acide formique 0,1 N, suivant le procédé préconisé par JEPPSSON (254).

Nous disposons, en outre, de colonnes de gel de Séphadex G-100 et G-75 (2 cm x 120 cm) stabilisé dans le bicarbonate d'ammonium 0,01 M de pH 8,6 qui nous permet de repurifier certaines fractions.

2 - RUPTURE DES PONTS DISULFURES

Nous utilisons l'oxydation performique suivant le procédé préco-

nisé par HIRS (255), et la réduction et l'alkylation par l'acide iodacétique.

3 - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGES D'IONS SUR GEL SEPHADEX MODIFIEE

Nous employons des gels de DEAE-Séphadex.

Le gel gonflé est activé par la soude 0,5 N. Après un abondant lavage à l'eau distillée, l'échangeur, mis sous la forme chlorure, est stabilisé dans un tampon 5 mM en "Tris", 8 M en urée désionisée (par un passage sur échangeur d'ions) et ajustée à pH 8,6 avec de l'acide chlorhydrique. L'échangeur ainsi préparé est chargé dans une colonne de 2 cm x 30 cm, dont les dimensions sont suffisantes pour fractionner environ 300 mg de peptides. L'élution est effectuée successivement par une solution 150 mM en "Tris", 8 M en urée désionisée et ajustée à pH 8,2 avec de l'acide chlorhydrique, puis, par une solution de 300 mM en "Tris" de même concentration en urée et de même pH.

Les fractions ainsi obtenues subissent une ultime purification par chromatographie de tamisage moléculaire sur Séphadex G-100 ou G-75.

D - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEPTIDES ET GLYCOPEPTIDES

1 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Le fractionnement du mélange, l'homogénéité et la pureté des fractions obtenues sont contrôlés par la méthode de "disc electrophoresis" en gel de polyacrylamide en milieu urée-dodécyl sulfate de sodium suivant le procédé préconisé par WEBER et OSBORN (256) avec des gels à 15 p. 100 en acrylamide.

La révélation des peptides est effectuée au "Noir Amido".

2 - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES ET EN SUCRES

Les compositions en amino-acides sont déterminées après hydro-

lyse par HCl 5,6 N à l'aide d'un Auto-analyseur du type Beckman "Multichrom" suivant un procédé d'élution mis au point par nous-mêmes.

Les compositions molaires en sucres sont déterminées après méthanolyse, par chromatographie de phase gazeuse selon ZANETTA et al. (257).

3 - AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

Les amino-acides N-terminaux sont identifiés par la méthode des dansyl-amino-acides de GRAY et HARTLEY (258), suivant le protocole déjà décrit (voir p.46).

4 - AMINO-ACIDES C-TERMINAUX

Les amino-acides C-terminaux sont déterminés par la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI (259) (voir p.46).

5 - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

Les masses moléculaires sont déterminées par ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation suivant la méthode d'YPHANTIS, modifiée par CHERVENKA (260) ou par tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-50 suivant la méthode de ANDREWS (261).

II - RESULTATS

ISOLEMENT DES PEPTIDES LIBERES PAR ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE DE L'APO-TRANSFERRINE

La composition en amino-acides de la STF après action du CNBr indique que plus de 90 p. 100 de la méthionine est transformée en homosérine.

Nous pouvons donc entreprendre le fractionnement du mélange, et le mode opératoire est illustré par la figure 18 (p.122). Les caractéristiques physico-chimiques des peptides isolés sont rassemblées dans le tableau XVII (p. 123).

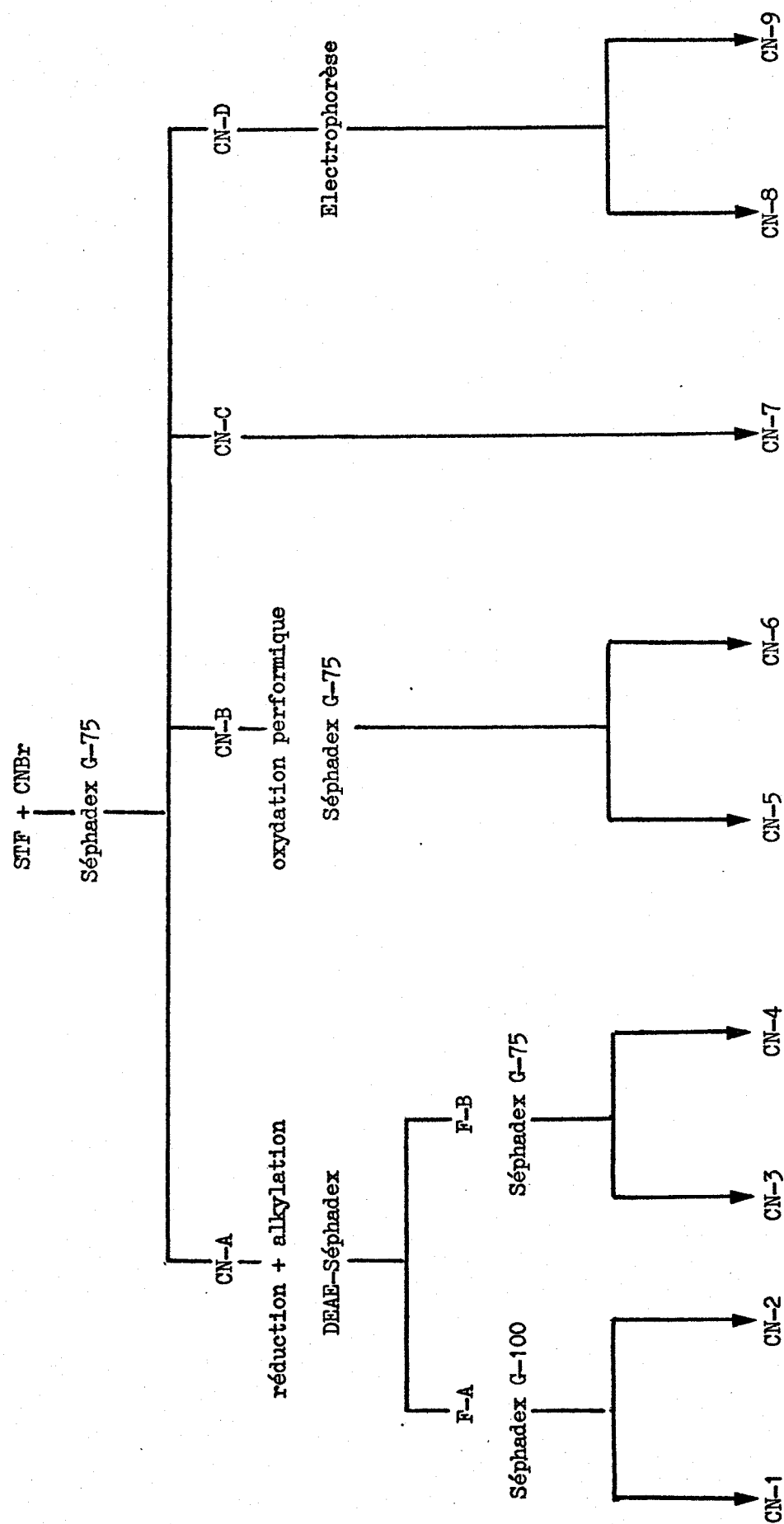


Figure 18

Fractionnement des peptides et glycopeptides libérés par action du bromure de cyanogène (CNBr) sur la STF.

Tableau XVII

Caractéristiques des peptides libérés par action du bromure de cyanogène sur la sérotransferrine humaine (a)

	CN-A				CN-B		CN-C	CN-D		Total	Séro- transferrine native
	CN-1	CN-2	CN-3	CN-4	CN-5	CN-6	CN-7	CN-8	CN-9		
Asx	30,1	14,0	8,2	5,8	10,8	2,1	5,2	1,9	1,0	77,9	74,5
Ser	13,0	4,8	2,2	3,6	2,0	1,8	-	-	-	27,4	28,2
Thr	9,5	6,6	4,3	3,7	5,3	2,3	3,8	-	-	35,5	36,6
Glu	19,0	6,8	5,4	7,0	5,4	3,1	7,1	1,0	-	54,6	53,9
Pro	10,1	5,8	4,3	3,3	4,3	1,0	2,6	-	-	31,4	36,5
Gly	16,1	10,2	6,4	3,8	3,8	0,5	5,1	1,0	-	47,0	46,3
Ala	15,5	10,1	5,8	4,9	11,8	2,9	2,1	2,0	1,0	55,1	55,9
$\frac{1}{2}$ Cys	7,0	5,8	3,8	4,0	4,1	2,0	-	-	-	26,7	35,1
Val	15,6	6,8	3,9	4,2	7,1	2,8	0,8	-	-	41,2	39,4
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,8
Ileu	2,0	2,6	1,7	2,6	3,0	0,8	0,8	-	-	13,6	13,0
Leu	21,4	8,2	6,2	3,8	5,7	0,6	7,1	-	-	53,0	54,9
Tyr	9,8	3,2	2,8	1,9	4,4	0,4	-	-	-	22,5	27,3
Phe	9,6	3,6	3,5	0,9	3,7	1,4	5,1	-	-	27,8	30,2
His	6,0	1,9	1,7	1,4	0,2	1,6	2,8	-	-	15,6	16,6
Lys	16,8	9,0	4,2	3,7	6,3	2,4	7,1	-	0,9	50,4	51,8
Arg	11,8	3,1	2,4	1,9	1,1	1,6	1,0	-	-	22,9	23,1
HSer (b)	-	1	1	1	1	1	1	1	1	8	0
Gal (c)	2	2	-	-	-	-	-	-	-	4	4
Man	2,7	2,8	-	-	-	-	-	-	-	5,5	6
GlcNAc	4,1	3,7	-	-	-	-	-	-	-	7,8	8
ANAN	1,7	1,8	-	-	-	-	-	-	-	3,5	3,5
N-terminal	Gly	Asx	Ser	Tyr	Lys	Val	Gly	Asx	Asx	-	Val
C-terminal	Cys	HSer	HSer	HSer	HSer	HSer	HSer	HSer	HSer	-	Cys
Masse molé- culaire	26500 (d) (± 2000)	14500 (d) (± 1500)	8300 (e) (± 500)	7200 (e) (± 500)	9200 (f) (± 1000)	4400 (f) (± 500)	6052 (g)	491 (g)	432 (g)	77000	75200 (± 2000)

a) Les compositions sont données en moles p. mole de peptide ou de STF.

(b) HSer : homosérine ; (c) Gal : galactose, Man : mannose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, ANAN : acide N-acétylneuraminique ;

(d) déterminée par ultracentrifugation ; (e) déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide ;

(f) déterminée par chromatographie de tamisage moléculaire ; (g) déterminée par le calcul, la séquence peptidique étant connue (voir p. 138)

A - CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-75

Le tamisage moléculaire sur une colonne de Séphadex G-75 fournit 4 fractions peptidiques CN-A, CN-B, CN-C et CN-D (fig. 19 ; p.125).

La fraction précédant CN-A correspond à des agrégats ou à du matériel insuffisamment coupé. Les quantités récupérées sont d'ailleurs très faibles.

Les fractions CN-A, CN-B et CN-C ont déjà été identifiées par JEPPSSON (262) dès 1967, puis, par SUTTON et BREW (263), mais la fraction CN-D n'a pas été identifiée par ces auteurs.

Nous avons alors entrepris l'étude systématique de chacune de ces fractions.

B - ETUDE DE LA FRACTION CN-A

La fraction CN-A est obtenue avec un rendement pondéral d'environ 70 p. 100. Cette fraction contient tous les sucres présents dans la STF native.

La méthode des dansyl-amino-acides nous permet de mettre en évidence 4 amino-acides N-terminaux : le glycocolle, l'acide aspartique, la sérine et la tyrosine. Le peptide est donc constitué de 4 chaînes peptidiques liées entre elles par des ponts disulfures.

1 - COUPURE DES PONTS DISULFURES

Les ponts disulfures sont coupés par réduction avec le mercapto-éthanol suivie d'une alkylation par l'acide iodacétique. L'analyse des amino-acides montre qu'il ne reste plus de cystine.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide de la fraction CN-A ainsi traitée indique la présence d'au moins 3 peptides ou glycopeptides.

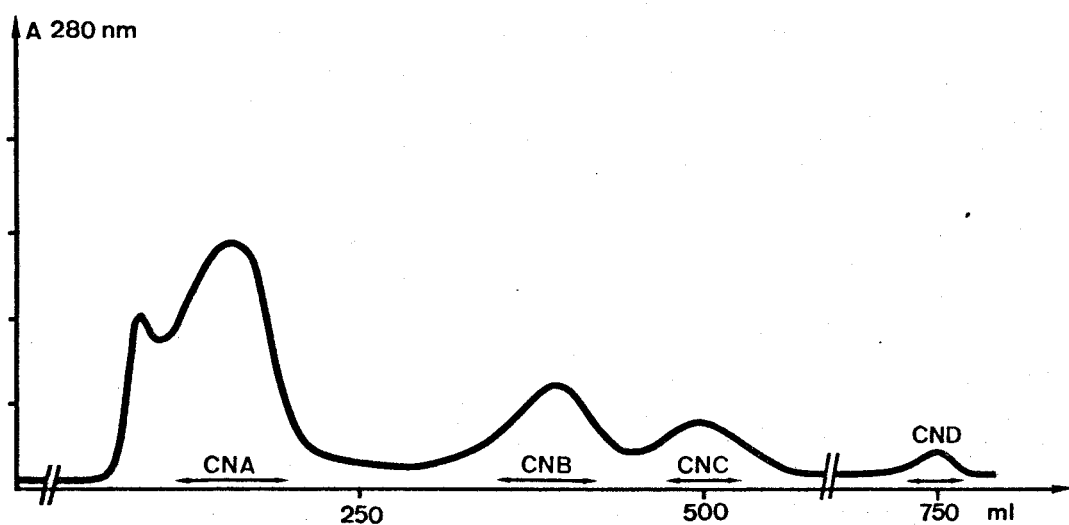


Figure 19

Chromatographie sur gel de Séphadex G-75 des peptides libérés par action du bromure de cyanogène sur la sérotransferrine humaine.

Ce mode d'électrophorèse ne sépare pas les constituants en fonction de leurs charges mais, en fonction de leur masse moléculaire. Ainsi s'explique le résultat que, malgré la présence de 4 amino-acides N-terminaux dans la fraction CN-A, nous ne puissions observer que 3 bandes en électrophorèse, 2 peptides pouvant avoir des masses moléculaires très voisines et se confondre. Nous avons donc entrepris de fractionner ce mélange.

2 - FRACTIONNEMENT SUR DEAE-SEPHADEX

La fraction CN-A réduite et alkylée est dissoute dans la quantité de tampon 5 mM en "Tris", 8 M en urée et ajusté à pH 8,2 nécessaire pour obtenir une solution à 5 p. 100 en protéines et chromatographiée sur colonne de DEAE-Séphadex.

L'élution par un tampon 150 mM en "Tris", 8 M en urée et de pH 8,2 fournit une première fraction glycopeptidique F-A. Cette fraction est récupérée, dialysée et lyophilisée. L'élution par un deuxième tampon 300 mM en "Tris" et de même pH fournit une autre fraction peptidique F-B₂ qui est également dialysée et lyophilisée (fig. 20 ; p.127).

3 - PURIFICATION DE LA FRACTION F-A

La fraction F-A est soumise à une chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex G-100. Le profil d'élution indique la présence de 2 constituants que nous nommons CN-1 et CN-2 et qui sont récupérés et purifiés par une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions.

4 - PURIFICATION DE LA FRACTION F-B₂

La fraction F-B₂ est soumise à une chromatographie sur Séphadex G-75, ce qui nous fournit encore deux fractions CN-3 et CN-4, elles-mêmes repurifiées par une ultime chromatographie effectuée dans les mêmes conditions.

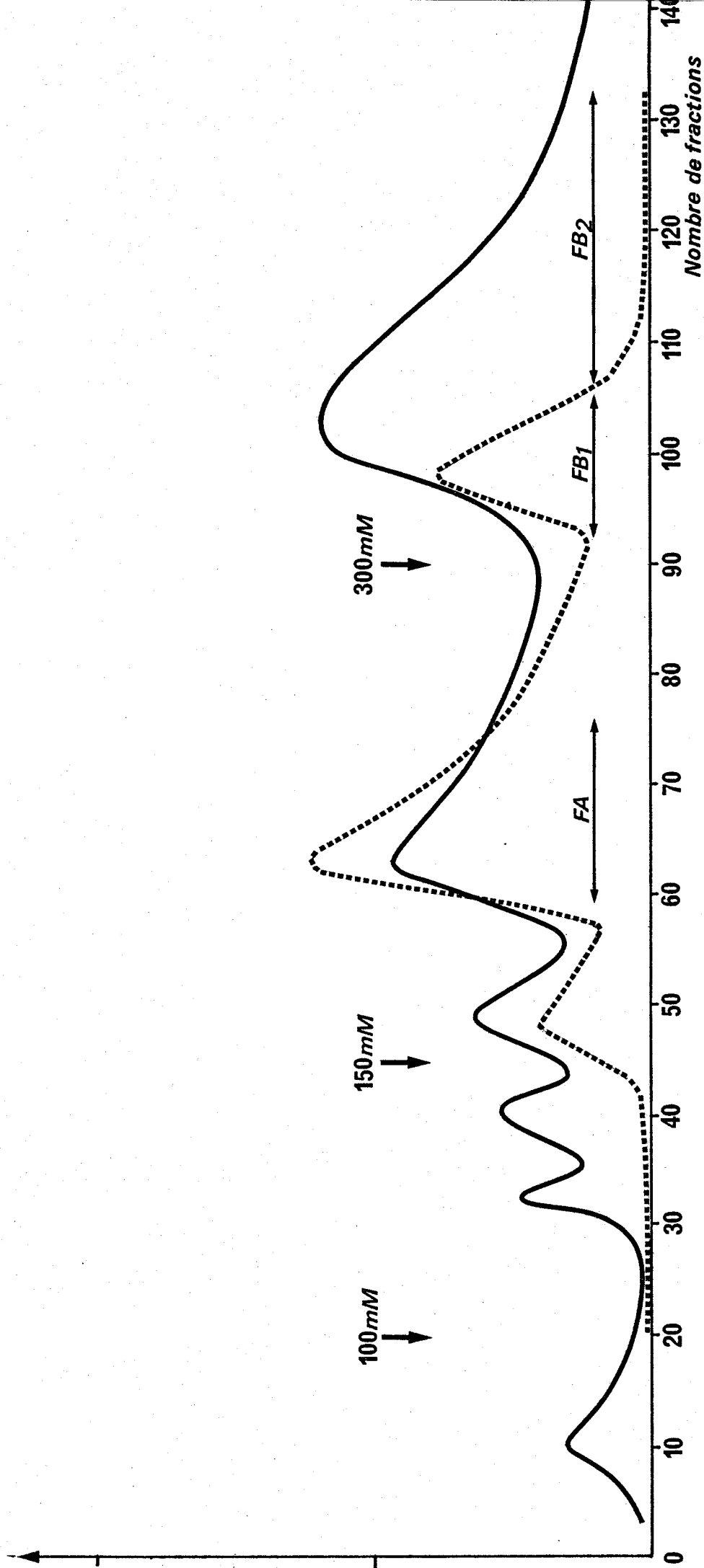


Figure 20

Fractionnement sur DEAE-Séphadex de la fraction CN-A réduite et alkylée. Elution par un gradient de concentration tampon "Tris"-HCl, pH 8,2, urée 8 M. Densité optique à 280 nm (-) et après réaction au phénol-sulfurique (---).

La fraction CN-A nous fournit donc 4 peptides : CN-1, CN-2, CN-3 et CN-4. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont rassemblées dans le tableau XVII (p.123).

5 - PROPRIETES DES PEPTIDES CN-1, CN-2, CN-3 ET CN-4

PEPTIDE CN-1

Le peptide CN-1 possède le glyco-colle en position N-terminale. La masse moléculaire, déterminée par la méthode d'ultracentrifugation de CHERVENKA (264), est de 26500 ± 2000 .

La composition en amino-acides est voisine de celle donnée par SUTTON et BREW (265), mais nous pouvons affirmer qu'il ne contient pas d'homosérine, ce peptide serait donc le peptide C-terminal. Enfin, ce peptide contenant des monosaccharides est bien un glycopeptide.

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, une étude plus approfondie de ce glycopeptide nous permettra de confirmer ces résultats.

PEPTIDE CN-2

Le peptide CN-2 possède l'acide aspartique ou l'asparagine en position N-terminale. Sa masse moléculaire, déterminée par ultracentrifugation, est égale à 14500 ± 1500 .

Sa composition en amino-acides montre la présence de glucosamine. Ce peptide est donc un glycopeptide.

PEPTIDE CN-3

Le peptide CN-3 possède la sérine en position N-terminale. Il ne contient pas de sucre, mais de l'homosérine. Sa masse moléculaire déterminée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide est de 8300 ± 500 .

PEPTIDE CN-4

Le peptide CN-4 possède la tyrosine en position N-terminale. Sa

masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide est évaluée à 7200 ± 500 .

CONCLUSIONS

Nous confirmons ainsi les résultats obtenus par SUTTON et BREW (266) à partir de cette fraction. Mais, nous avons, en outre, démontré qu'un glycopeptide ne contient pas d'homosérine et représente donc la séquence C-terminale de la transferrine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux glycopeptides ainsi libérés (voir chapitre suivant).

C - ETUDE DE LA FRACTION CN-B

La fraction CN-B est repurifiée par une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions que lors de son fractionnement. Le rendement pondéral est d'environ 15 p. 100. La composition en amino-acides montre la présence de cystine. La méthode des dansyl-amino-acides nous permet de mettre en évidence 2 amino-acides N-terminaux : la lysine et la valine. Nous en concluons que ce peptide est constitué de 2 chaînes peptidiques que nous avons entrepris de séparer.

1 - COUPURE DES PONTS DISULFURES

Les ponts disulfures sont coupés par oxydation performique selon HIRS (267). Ensuite, en vue d'augmenter la solubilité, nous effectuons une maléylation. La solution est chromatographiée sur gel de Séphadex G-75. Des fractions sont collectées dont l'absorbance est mesurée à 280 nanomètres. (fig. 21 ; p.130). Nous obtenons ainsi 2 fractions qui sont repurifiées par une nouvelle chromatographie. Nous obtenons ainsi 2 nouveaux peptides : CN-5 et CN-6.

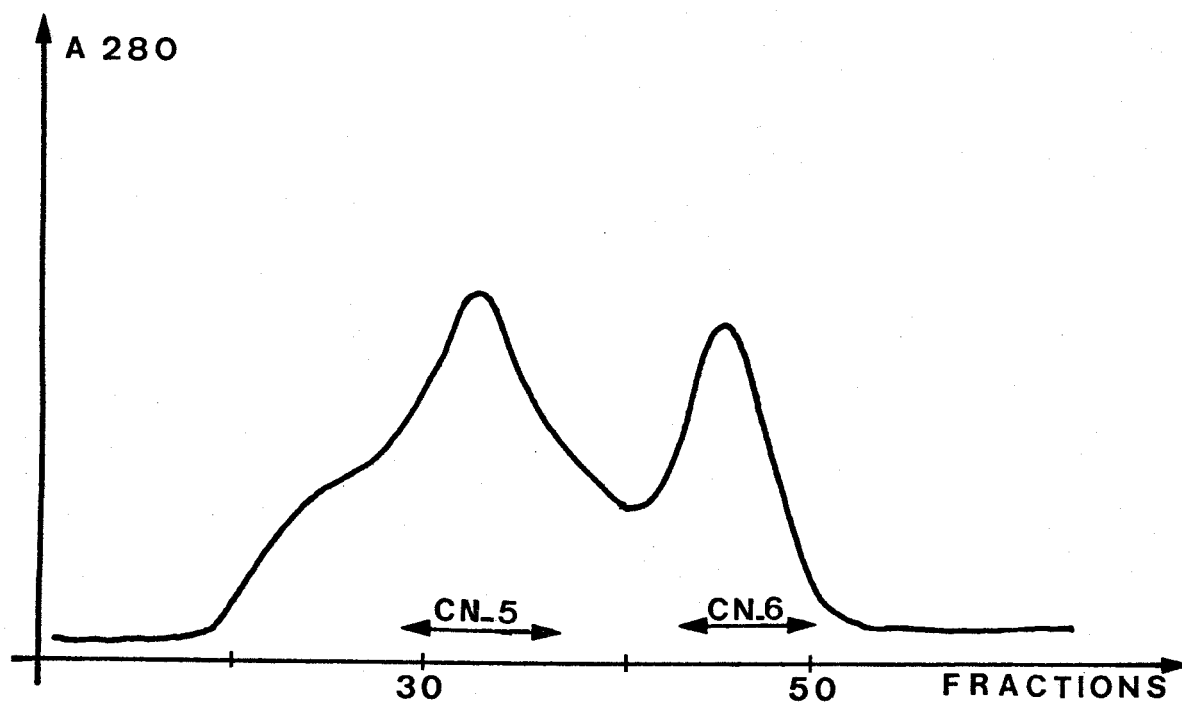


Figure 21

Fractionnement sur Séphadex G-75 de la fraction
CN-B après coupure des ponts disulfures.



2 - PROPRIETES DES PEPTIDES CN-5 ET CN-6

PEPTIDE CN-5

Sa masse moléculaire déterminée par chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de Séphadex est de 9200 ± 1000 . La lysine est en position N-terminale.

Sa composition en amino-acides indique la présence d'homosérine.

PEPTIDE CN-6

Ce peptide dont la masse moléculaire déterminée par tamisage sur gel de Séphadex est évaluée à 4400 ± 500 possède la valine en position N-terminale et sa composition en amino-acides indique la présence d'homosérine.

CONCLUSIONS

Nous confirmons encore les résultats publiés par SUTTON et BREW. Les auteurs ont effectué une séquence peptidique complète du peptide CN-6.

En se fondant sur le fait que le N-terminal de ce peptide est la valine, comme dans la STF native, ils affirment que cette séquence est la séquence N-terminale de la STF, ce qui est vraisemblable mais incertain. En effet, les auteurs n'ont pas confirmé ces résultats en travaillant directement sur la transferrine ou en isolant tous les peptides libérés par le bromure de cyanogène.

D - ETUDE DE LA FRACTION CN-C

La fraction CN-C est repurifiée par une chromatographie dans les mêmes conditions que lors de son fractionnement.

La composition en acides aminés montre que cette fraction ne contient pas de cystéine. Elle ne présente qu'un seul amino-acide N-terminal : le glycocolle. Cette fraction est donc homogène et constituée d'une seule chaîne peptidique.

La méthode d'ultracentrifugation permet d'attribuer à ce peptide une masse moléculaire de 6000 ± 1000 . Ce résultat est confirmé par chromatographie de tamisage moléculaire. La composition précise en amino-acides montre la présence de 53 résidus d'amino-acides.

CONCLUSIONS

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de SUTTON et BREW (268). La composition simple de ce peptide incite, dans le cadre de la détermination de la séquence peptidique complète de la STF, à préciser la structure peptidique complète de ce peptide.

E - ETUDE DE LA FRACTION CN-D

La fraction CN-D est une fraction micromoléculaire. La détermination de la composition en acides aminés de cette fraction permet de mettre en évidence des quantités importantes d'homosérine. Ce résultat incite à rechercher dans cette fraction des petits peptides libérés par l'action du bromure de cyanogène, et, non par une protéolyse secondaire.

L'électrophorèse sur papier dans un tampon de pH 3,9 révèle la présence de 2 fractions majeures, l'une possédant un comportement neutre CN-8, et l'autre, un comportement basique CN-9 (fig. 22 ; p.133). Ces fractions éluées subissent une ultime purification par chromatographie sur papier dans le système-solvant de Partridge.

PEPTIDE CN-8

Ce peptide a une composition très simple en amino-acides. Il s'agit d'un heptapeptide qui possède l'acide aspartique ou l'asparagine en position N-terminale. Il contient un résidu d'homosérine et il est obtenu avec un rendement molaire d'environ 20 p. 100.

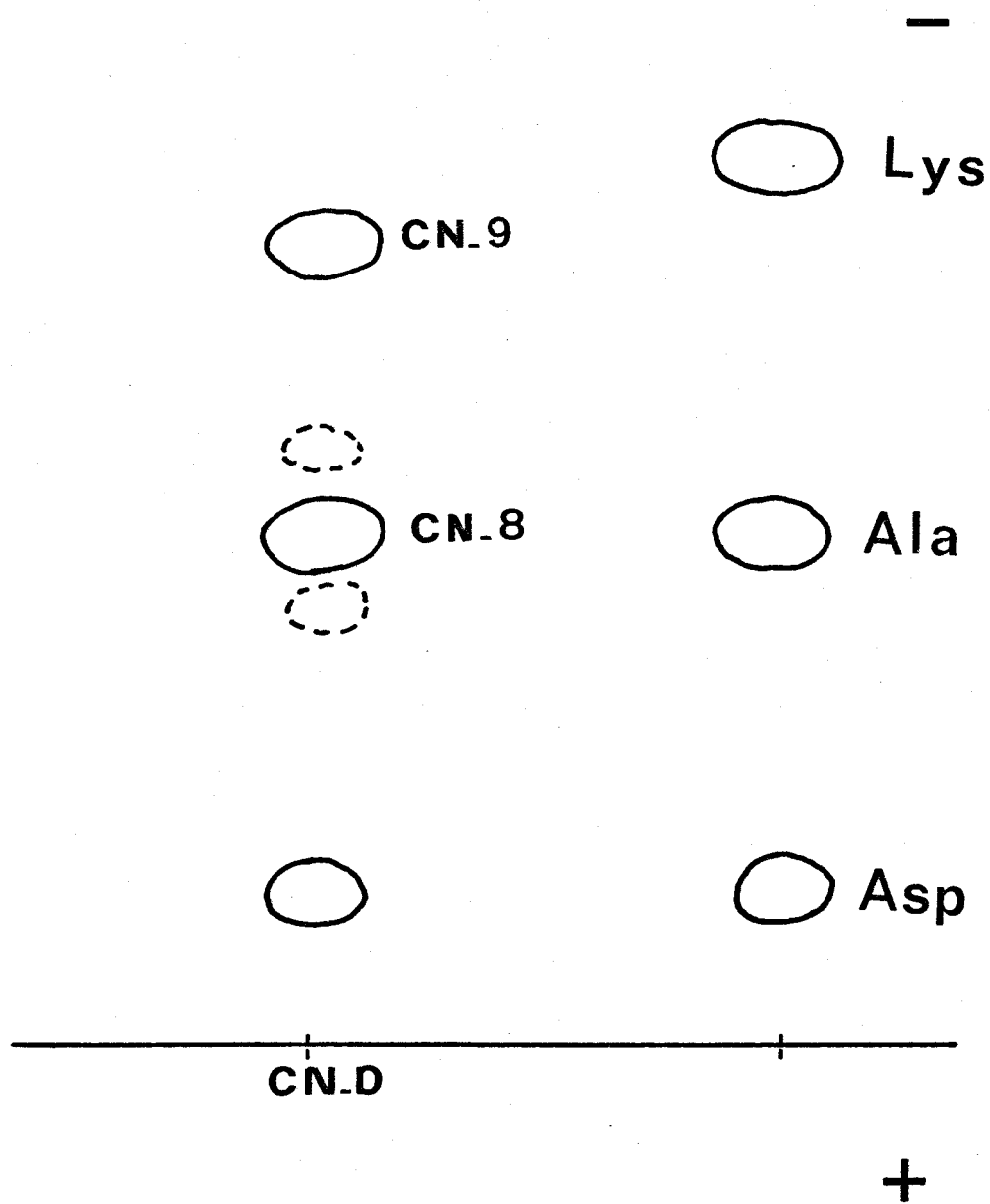


Figure 22

Electrophorèse sur papier de la fraction CN-D. Tampon de pH 3,9, papier Whatman n° 3, 10 V/cm, 15 h.



PEPTIDE CN-9

Ce peptide qui a un comportement basique est un tétrapeptide comme l'indique sa composition en amino-acides. Il possède également de l'acide aspartique ou de l'asparagine en position N-terminale. Nous obtenons encore un rendement molaire d'environ 30 p. 100.

CONCLUSIONS

Les rendements molaires relativement importants permettent d'affirmer que les peptides CN-8 et CN-9 ne sont pas le résultat de ruptures secondaires de la STF, au cours des traitements chimiques, mais qu'ils sont effectivement libérés par l'action du CNBr sur la méthionine.

Nous retrouvons ainsi les 9 peptides escomptés puisque nos dosages d'amino-acides indiquent la présence de 8 résidus de méthionine.

F - CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches nous ont permis de mettre au point un procédé de fractionnement des peptides et glycopeptides libérés par action du bromure de cyanogène sur la STF. Elles confirment, pour la plupart, les résultats publiés par SUTTON et BREW. Toutefois, nous avons isolé 2 peptides supplémentaires, un heptapeptide : le peptide CN-8, et un tétrapeptide : le peptide CN-9, retrouvant ainsi les 9 peptides que devait libérer le CNBr. En outre, nous avons identifié le peptide ne contenant pas d'homosérine qui représente donc la séquence C-terminale de la transferrine.

Nous pouvions donc, dès à présent, envisager la détermination de la séquence peptidique complète de la STF. Cependant, dans un premier temps, nous nous sommes limité à l'étude plus précise de chacun des glycopeptides et à la détermination des séquences peptidiques des 3 peptides les plus simples : les peptides CN-7, CN-8 et CN-9.

ETUDE DES DEUX GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR

ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

SEQUENCE PEPTIDIQUE COMPLETE DES PEPTIDES

CN-7, CN-8 ET CN-9

--oo 0 oo--

L'un des objectifs que nous poursuivons dans l'étude de l'action du bromure de cyanogène sur la STF concernait la localisation des 2 glycannes sur la chaîne peptidique et leur identification. Nous avons donc hydrolysé les glycopeptides CN-1 et CN-2 par la trypsine de façon à retrouver les glycopeptides que nous avons déjà décrits (voir fig. 15 ; p.112), et dont les séquences peptidiques sont caractéristiques.

De plus, dans le but d'aborder la séquence peptidique complète, nous avons effectué, en collaboration avec le laboratoire de P. JOLLES, les séquences peptidiques des peptides CN-7, CN-8 et CN-9.

I - MATERIEL ET METHODES

A - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES

1 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE

L'action de la trypsine ou de la pronase est effectuée dans les

conditions classiques décrites plus haut.

2 - PURIFICATION DES HYDROLYSATS

Les hydrolysats sont purifiés par chromatographie sur Séphadex G-50, puis, par électrophorèse sur papier, selon un mode opératoire que nous avons déjà décrit à propos des glycopeptides tryptiques ou chymotryptiques (voir p. 61).

Dans certains cas, le glycopeptide obtenu après chromatographie sur Séphadex G-50, est traité par la neuraminidase de façon à éliminer l'interférence de l'acide sialique au cours de l'électrophorèse.

3 - COMPOSITION ET SEQUENCE PEPTIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES

La seule détermination de la composition en amino-acides des glycopeptides nous permet de localiser le glycanne. En effet, les séquences au voisinage de l'attache glycanne-protide pour chacune des chaînes glycaniques sont fondamentalement différentes : Asn-(Glycanne)-Lys-Ser d'un côté, Asn-(Glycanne)-Val-Thr de l'autre (fig. 15 ; p.112).

Nous avons, en outre, déterminé l'acide-amino N-terminal afin de confirmer les résultats obtenus.

B - DETERMINATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

1 - DEGRADATION RECURRENTTE D'EDMAN

Les séquences peptidiques sont déterminées manuellement ou à l'aide de l'appareil automatique SOCOSI, Modèle PS-100.

Les dégradations effectuées directement sur le peptide CN-7 sont exécutées avec le "quadrol" comme tampon de départ, avec double clivage, selon la méthode d'EDMAN et BEGG (26). Les dégradations effectuées sur les peptides plus courts sont réalisées suivant la méthode de NIALL et al. (27),

avec la diméthylallylamine comme tampon de départ et simple clivage.

Les thiazolinones sont extraites par du 1-chlorobutane contenant 30 mg de dithiothréitol par litre pour éviter toute dégradation par oxydation. Les groupements aminés des peptides contenant de la lysine subissent un premier cycle de dégradation par l'isothiocyanate de 4-sulfophényl, selon le procédé de BRAUNITZER et al. (271), l'acide aminé N-terminal étant préalablement déterminé par dansylation sur une aliquote.

Les thiazolinones sont converties en phénylthiohydantofines qui sont identifiées par chromatographie sur couche mince, par chromatographie en phase gazeuse, ou encore à l'autoanalyseur d'acides-amino, après régénération selon le procédé décrit par JOLLES et al. (272).

C - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU PEPTIDE CN-7

1 - HYDROLYSE TRYPSIQUE

Le peptide CN-7 est hydrolysé par la trypsine dans les conditions suivantes : 20 mg de peptide sont traités par 0,65 mg de trypsine et incubés pendant 22 heures à 37° C dans du bicarbonate d'ammonium 0,1 M. La trypsine est prétraitée par incubation dans l'acide chlorhydrique 0,0625 M durant 16 heures à 37° C.

L'hydrolysat est fractionné par électrophorèse sur papier Whatman n° 1 à pH 6,5 (pyridine/acide acétique/eau 100:4:900,v/v/v) sous tension de 50 V/cm et, parfois, par chromatographie sur papier Whatman n° 1 (n-butanol/pyridine/acide acétique/eau 15:10:3:12,v/v/v/v).

2 - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

Le peptide CN-7 est hydrolysé par la chymotrypsine dans les conditions suivantes : 6 mg de peptide sont digérés par 0,2 mg de chymotrypsine, dans un tampon de bicarbonate d'ammonium à 37° C, durant 16 heures. La puri-

fication des peptides libérés est effectuée dans les mêmes conditions que pour l'hydrolysats trypsique.

II - RESULTATS

A - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE CN-1

1 - RAPPEL

Le glycopeptide CN-1 possède une masse moléculaire de 26500. Son amino-acide N-terminal est le glycolle et ne contient pas d'homosérine. Il doit donc représenter la partie C-terminale de la STF.

2 - RECHERCHE DE L'AMINO-ACIDE C-TERMINAL

La méthode d'hydrazinolyse est appliquée au glycopeptide. Les amino-acides sont identifiés et dosés à l'Autoanalyseur.

Comme dans la STF, on met en évidence de la sérine, du glycolle, de la proline, et de la S-carboxy-méthylcystéine. Ce glycopeptide représente la fraction C-terminale de la transferrine.

Une ultime preuve doit être apportée par la caractérisation du glycanne liée à ce peptide. En effet, le glycanne II (fig. 15 ; p.112) est lié à la fraction C-terminale de la protéine.

3 - HYDROLYSE TRYPSIQUE DU GLYCOPEPTIDE CN-1

La chromatographie sur Séphadex G-50 de l'hydrolysats trypsique du glycopeptide CN-1 fournit une fraction glycopeptidique qui est traitée par la neuraminidase et de nouveau purifiée sur Séphadex G-50. Le glycopeptide soumis à une électrophorèse à pH 2,4 ne donne plus qu'une seule tache avec la ninhydrine.

La composition en amino-acides de ce glycopeptide est la suivante :

SCM-Cys : 1,8 ; Asx : 3,2 ; Thr : 1 ; Ser : 2,1 ; Gly : 2,2 ;

Val : 1 ; Leu : 0,7 ; Phe : 1,6.

Cette composition est caractéristique : le glycopeptide ne contient pas de lysine, mais tous les amino-acides correspondant au glycopeptide A trypsique. L'acide aminé N-terminal est le glycocolle, comme dans le glycopeptide A trypsique.

4 - CONCLUSIONS

Le glycopeptide CN-1 contient le glycanne II et représente la fraction C-terminale de la transferrine.

B - ETUDE DU GLYCOPEPTIDE CN-2

1 - RAPPEL

Le glycopeptide CN-2 possède une masse moléculaire de 14500. Son acide aminé N-terminal est l'acide aspartique ou l'asparagine. Il contient de l'homosérine. Ce glycopeptide doit contenir le glycanne I (fig. 15 ; p.112).

2 - AMINO-ACIDE C-TERMINAL

L'hydrazinolysé libère du glycocolle de la sérine et de l'homosérine.

3 - HYDROLYSE PRONASIQUE DU GLYCOPEPTIDE CN-2

Le glycopeptide CN-2, hydrolysé par la pronase, puis chromatographié sur gel de Séphadex G-50 ou G-25, fournit un glycopeptide dont la composition en amino-acides est la suivante :

Asx : 2 ; Ser : 0,8 ; Tyr : 0,65 ; Lys : 1.

Cette composition correspond à la séquence : Tyr-Asn-Lys-Ser-Asp de l'attache glycanne I-protide (voir fig. 15 ; p.112).

4 - CONCLUSIONS

Le glycopeptide CN-2 contient le glycanne I et provient d'une partie non terminale de la transferrine.

C - SEQUENCE PEPTIDIQUE DU PEPTIDE CN-7

1 - SEQUENCE N-TERMINALE

La dégradation d'Edman effectuée automatiquement permet d'établir la séquence des 32 premiers résidus (fig. 23 ; p.141).

2 - ETUDE DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE

7 peptides sont isolés de l'hydrolysat trypsique : T-1 à T-4, T-5a, T-5b et T-6. Le tableau XVIII (p.142) donne la composition, le rendement et le Rf ou la mobilité électrophorétique de chaque peptide.

Les structures des peptides T-2, T-3, T-4 et T-5b sont établies par dégradation d'Edman automatique.

La composition en amino-acides du peptide T-6 ainsi que des dipeptides T-5a et T-1 indique que ces peptides proviennent de la séquence N-terminale déjà déterminée.

Le peptide T-6 possède 2 résidus de lysine. La présence de 2 résidus acides près de la lysine 3 inhibe l'action de la trypsine.

Si les peptides T-6, T-5a, T-1, T-4 peuvent être réenchaînés par la connaissance de la séquence N-terminale déterminée par dégradation directe, il n'en est pas de même pour les peptides T-5b et T-3, le peptide T-2 pouvant se placer en position C-terminale puisqu'il contient le résidu d'homosérine. Nous entreprenons donc de fractionner l'hydrolysat chymotrypsique.

3 - ETUDE DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE

4 peptides principaux sont isolés et étudiés : C-1, C-2, C-3 et C-4. Le tableau XIX (p.143) précise la composition en amino-acides, le Rf et la mobilité électrophorétique de chacun de ces peptides, ainsi que l'acide aminé N-terminal.

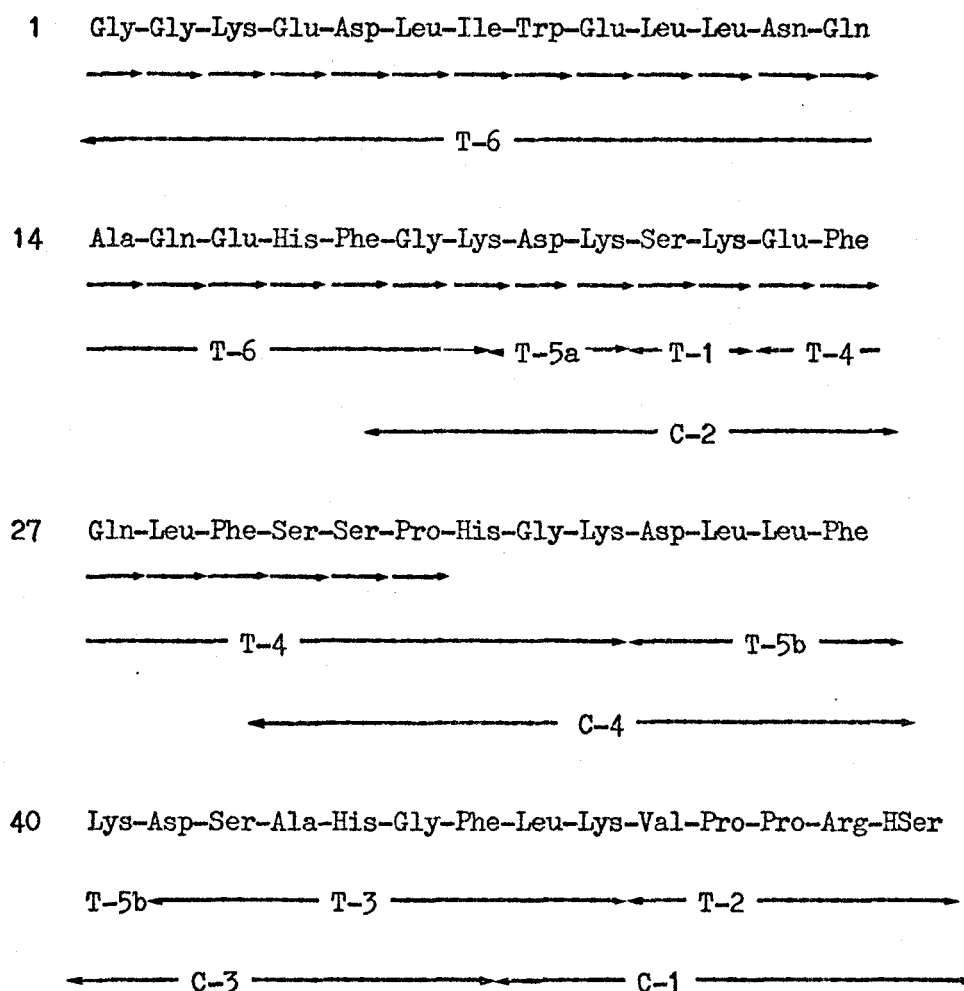


Figure 23

Séquence du peptide CN-7

→ = Amino-acide déterminé par dégradation d'Edman automatique.



Tableau XVIII

Composition en amino-acides des peptides
tryptiques du peptide CN-7

Amino-acides	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5a	T 5b	T 6	Total	CN-C
Asp			1,00 (1)		1,00 (1)	0,88 (1)	2,17 (2)	5	5
Ser	0,92 (1)		1,00 (1)	1,55 (2)				4	4
Glu				1,45 (2)			4,32 (5)	7	7
Pro		2,00 (2)		0,77 (1)				3	3
Gly			1,05 (1)	1,07 (1)			2,75 (3)	5	5
Ala			0,93 (1)				1,07 (1)	2	2
Val		1,00 (1)						1	1
HSer		0,70 (1)						1	1
Ile							0,85 (1)	1	1
Leu			1,00 (1)	0,89 (1)		1,73 (2)	2,67 (3)	7	7
Phe			0,95 (1)	1,45 (2)		1,00 (1)	1,08 (1)	5	5
Trp*							+	1	1
Lys	1,00 (1)		1,06 (1)	1,00 (1)	1,08 (1)	1,07 (1)	2,00 (2)	7	7
His			0,76 (1)	0,78 (1)			0,72 (1)	3	3
Arg		0,85 (1)						1	1
Total	2	5	8	11	2	5	20	53	53
Rendement p. 100	35	40	26	37	30	46	28		
Rf	0,19	0,47	0,38	0,45	0,12	0,70			
m**	+0,75	+0,45	+0,22	+0,12	0	0	-0,10		
N-terminal	Ser	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Gly		Gly

Entre parenthèses, nombre de résidus arrondis.

* Caractérisé par le réactif d'Ehrlich.

** Mobilité à pH 6,5 ; m = 1 pour Arg ; m = 0 pour Gly et m = - 1 pour
Cy SO₃H.



Tableau XIX

Composition en amino-acides des 4 principaux peptides obtenus
par action de la chymotrypsine sur le peptide CN-7

Amino-acides	C 1	C 2	C 3	C 4
Asp		0,80 (1)	1,00 (1)	0,95 (1)
Ser		0,81 (1)	0,95 (1)	1,45 (2)
Glu		0,96 (1)		
Pro	1,52 (2)			1,04 (1)
Gly		0,94 (1)	1,08 (1)	1,05 (1)
Ala			1,05 (1)	
Val	0,68 (1)			
HSer	0,45 (1)			
Leu	0,70 (1)			1,87 (2)
Phe		0,80 (1)	0,81 (1)	0,90 (1)
Lys	1,10 (1)	3,00 (3)	1,00 (1)	1,00 (1)
His			0,76 (1)	0,78 (1)
Arg	0,80 (1)			
Total	7	8	7	10
Rendement p. 100	47	60	36	14
Rf	0,53	0,12	0,22	0,53
Mobilité à pH 6,5	+0,50	+0,27	+0,17	+0,17
N-terminal	Leu	Gly	Lys	Ser

Entre parenthèses, nombre de résidus arrondis.

4 - ENCHAINEMENT DES PEPTIDES TRYPSIQUES

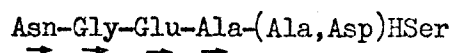
Les résultats concernant le peptide C-4 permettent de relier les peptides T-4 à T-5b, ceux qui concernent le peptide C-3, de relier les peptides T-5b à T-3 et, enfin, ceux qui concernent le peptide C-1, de relier T-3 à T-2.

La séquence complète des 53 résidus du peptide CN-7 est ainsi déterminée.

D - SEQUENCE PEPTIDIQUE DES PEPTIDES CN-8 ET CN-9

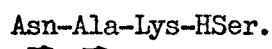
1 - PEPTIDE CN-8

Ce peptide est un pentapeptide dont la séquence peptidique déterminée par dégradation automatique est la suivante :



2 - PEPTIDE CN-9

Il s'agit d'un tétrapeptide, dont la séquence, déterminée manuellement, est la suivante :



E - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont les suivantes :

1°) La présence de 8 résidus de méthionine dans la STF doit conduire, sous l'action du CNBr, à la libération de 9 fragments que nous avons isolés.

2°) Seul le peptide CN-6 contient de la valine. Comme tous les

peptides sont isolés, nous pouvons, à présent, affirmer que ce peptide représente la séquence N-terminale de la STF.

3°) Le glycopeptide CN-1 contient le glycanne II de la STF et représente la partie C-terminale de la molécule.

4°) Le glycopeptide CN-2 contient le glycanne I de la STF.

5°) La séquence complète des peptides CN-7 (53 résidus), CN-8 (7 résidus), CN-9 (4 résidus) a été déterminée.

CONCLUSIONS GENERALES

—oo 0 oo—

Si les travaux que nous venons d'exposer relèvent exclusivement de problèmes de structure, ils représentent en fait une manière d'aborder les problèmes biologiques relatifs :

a) à la biosynthèse et à la fonction des glycanes dans les glycoprotéines ;

b) à la fixation réversible et au transport du fer par la sérotransferrine.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

I - Dans une première série de recherches, nous avons isolé les 2 glycanes de la sérotransferrine humaine sous la forme de glycopeptides, à partir d'hydrolysats tryptiques, chymotryptiques et thermolytiques d'apo-STF.

L'isolement de ces glycopeptides et l'établissement de leurs séquences peptidiques ont permis :

- 1 - De démontrer que les 2 glycanes sont liés à des segments peptidiques de structures différentes (Fig. 15 ; p. 112) et qu'ils proviennent donc de parties bien distinctes de la chaîne protéique (Fig. 24 ; p. 147).
- 2 - De démontrer l'existence d'une demi-cystine en position C-terminale dans la molécule de STF et de localiser l'un des glycanes (le glycanne II) sur cette partie C-terminale.

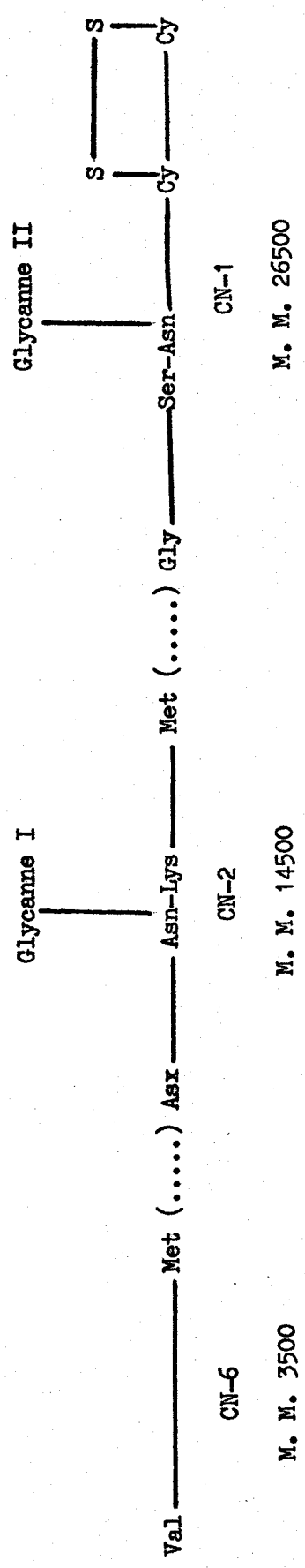


Figure 24

Schéma général de la molécule de sérotransferrine humaine.



- 3 - De contribuer, dans le cadre d'un travail d'équipe, à la détermination de la structure complète des glycanes I et II.

II - Dans une seconde série de travaux, nous avons tenté de préciser l'emplacement des glycanes sur la chaîne peptidique de la sérotransferrine, et aussi d'aborder l'étude de la structure primaire de cette glycoprotéine.

Nous nous sommes adressés à la méthode de rupture des liaisons méthionyle par le CNBr dont l'application nous a permis d'acquérir les résultats suivants :

- 1 - Nous avons isolé les 9 fragments que devait fournir la rupture des 8 liaisons méthionyle présentes, en position intracaténaire, dans la sérotransferrine : 2 sont des glycopeptides, 7 sont des peptides.
- 2 - Seul, le peptide CN-6, contient comme la sérotransferrine native un résidu de valine en position N-terminale. Il représente donc une longue séquence N-terminale de la STF.
- 3 - Le glycopeptide CN-1 ne contient pas d'homosérine, mais un résidu de demi-cystine, comme dans la STF native. Il provient donc de la partie C-terminale de la STF et sa fraction glucidique représente le glycanne II (Fig. 24 ; p. 147).
- 4 - Le glycopeptide CN-2 contient donc le glycanne I et se trouve en situation par rapport au glycopeptide précédent.
- 5 - Les séquences complètes de 3 peptides : les peptides CN-7, CN-8 et CN-9 ont été déterminées en collaboration avec le groupe du Professeur P. JOLLES.

III - L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

- 1 - A propos de la biosynthèse des glycoprotéines.

Chacune des structures des glycopeptides confirme, s'il en était encore besoin, l'hypothèse proposée par EYLAR (273) NEUBERGER (274), MONTREUIL (275), GOTTSCHALK (276) et SPIRO (277) selon laquelle la présence d'un hydroxy-amino-acide en position β -C-terminale de l'asparagine liée au glycanne est nécessaire pour que le premier résidu de N-acétylglucosamine se fixe sur celle-ci.

Par contre, l'une des hypothèses émises par MONTREUIL (278) selon laquelle la spécificité des premiers transferts de monosaccharides sur le résidu de N-acétylglucosamine conjugué à la chaîne peptidique pourrait être déterminée par les séquences peptidiques environnant le point d'attache glucide-peptide n'a pas été vérifiée. En effet, les glycanes I et II possédant des structures identiques sont conjugués à des séquences totalement différentes.

2 - A propos du rôle biologique des glycanes.

Les glycanes de nombreuses glycoprotéines reconnaissent des sites portés par les membranes cellulaires et il est important, à présent, de déterminer leur structure tridimensionnelle et leurs positions relatives sur la chaîne peptidique. Les résultats que nous avons obtenus représentent une bonne approche de ce problème qui ne trouvera sa solution que dans la détermination de la structure primaire complète de la fraction protéique de la STF et dans la mise en oeuvre de moyens physiques d'exploration des structures moléculaires.

Dans le cas particulier de la STF qui apporte le fer non seulement aux érythrocytes pour l'érythropoïèse, mais aussi à d'autres cellules, les glycanes jouent peut-être un rôle dans la reconnaissance de cellules cibles et dans le mécanisme d'échanges du fer entre la STF et les cellules

réceptrices.

Là encore, la connaissance de la structure de la STF est indispensable pour comprendre ce phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

—oo 0 oo—

- AASA R. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 49, 806 (17)
- AISEN P., LANG G. et WOODWORTH R. - J. Biol. Chem., 1973, 248, 649 (18)
- AKABORI S., OHNO K. et NARITA K. - Bull. Chem. Soc., Japan, 1952, 25, 214 (187,196,259)
- ALLISON A.C. - Experientia, 1959, 15, 281 (68,69)
- ANDREWS P. - Biochem. J., 1964, 91, 297 (261)
- AWAI M. et BROWN E.R. - J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 363 (74)
- BATES G.W., WORKMAN E.F. et SCHLABACH M.R. - Biochim. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 84 (14)
- BEARN A.G. et PARKER W.C. - Gottschalk A. in glycoproteins, Elsevier, 1966, 4, 13 (115)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M. - Analyst., 1954, 79, 201 (180)
- BEZKOROVAINY A. - Biochim. Biophys. Acta, 1966, 127, 535 (29)
- BEZKOROVAINY A. - Arzneim. Forsch. (Drug. Res.), 1974, 24, 476 (22)
- BEZKOROVAINY A. et GROHLICH D. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 147, 497 (30)
- BEZKOROVAINY A. et GROHLICH D. - Biochem. J., 1971, 123, 125 (20)
- BEZKOROVAINY A. et GROHLICH D. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 310, 365 (66,128,191)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D. et GERBECK C.M. - Biochem. J., 1968, 110, 765 (124,197)
- BEZKOROVAINY A. et RAFELSON M.E. - Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 302 (28)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M.E. et LIKHTE V. - Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103, 371 (27,51)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P. - J. Chromatog., 1959, 3, 25 (184,215)
- BISERTE G., PLAQUET-SCHOONAERT T., BOULANGER P. et PAYSANT P. - J. Chromatog., 1960, 3, 25 (207)
- BLUMBERG B.S. et WARREN L. - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 90 (158)
- BRAUNITZER G., SCHRANK B. et RUHFUS A. - Z. Physiol. Chem., 1970, 351, 1589 (271)

- CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1969, 269 D, 1019 (167)
- CHARET P., SPIK G. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1971, 273 D, 422 (168)
- CHARET P., TETAERT D., HAN K.K. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1973, 276 D, 1629 (169)
- CHARLWOOD P.A. - Biochem. J., 1963, 88, 394 (31)
- CHERON A. - Thèse Doct., Lille, 1975 (239)
- CHERVENKA C.H. - Anal. Biochem., 1970, 34, 24 (260,264)
- COHN E.J. - Science, 1945, 101, 51 (9)
- DAVIS B. - Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 104 (176)
- DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M. - Experientia, 1964, 20, 204 (189)
- DOPHEIDE T.A.A., MOORE S. et STEIN N.H. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 1833 (220)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. - Anal. Chem., 1956, 28, 350 (210)
- EDMAN P. et BEGG G. - European J. Biochem., 1967, 1, 80 (218,243,269)
- EDWARDS S.A. et FIELDING J. - Brit. J. Haematol., 1971, 20, 405 (108)
- EGYED E. - Biochim. Biophys. Acta, 1974, 363, 240 (101)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1933, 27, 1824 (179)
- EYLAR E.H. - J. Theor. Biol., 1965, 10, 89 (233,247,273)
- FIELDING J. et SPEYER B.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1974, 363, 387 (106,110)
- FLETCHER J. et HUEHNS E.R. - Nature, 1967, 215, 584-586 (93)
- FLETCHER J. et HUEHNS E.R. - Nature, 1968, 218, 1211 (94)
- FORTH W. et RUMMEL W. - Physiol. Rev., 1973, 53, 724 (80)
- GARRETT N.E., BURISS-GARRETT R.J. et ARCHDEACON J.W. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 52, 466 (104)
- GHYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.M. et STROMINGER J.L. - Biochemistry, 1965, 4, 2245 (213)
- GOLLNER I. - Behringwerk. Mitt., 1955, 30, 42 (112)
- GOTTSCHALK A. - Nature, 1969, 222, 452 (236,250,276)
- GRAY W.R. et HARTLEY B.S. - Biochem. J., 1963, 89, 59 et 379 (185,258)
- GREENE F.C. et FEENEY R.E. - Biochemistry, 1968, 7, 1367 (123,198)
- HAHN D. - Eur. J. Biochem., 1973, 34, 311 (95)
- HAN K.K. - Thèse Biologie Humaine, Lille, 1970 (253 b)

- HAN K.K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. - Ann. Pharmaceutiques Fr., 1973, 31, 539 (241,242)
- HARTLEY B.S. - Biochem. J., 1970, 119, 805 (216)
- HEIMBURGER N., HEIDE K., HAUPT H. et SCHULTZE H.E. - Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 293 (50)
- HIRS C.H.W. - J. Biol. Chem., 1956, 219, 611 (183,255,267)
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.A. - J. Biol. Chem., 1956, 221, 151 (206)
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.A. - J. Biol. Chem., 1960, 235, 663 (219,225,226)
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. - Acta Chem. Scand., 1947, 1, 944 (12)
- HOREJSI J. et SMETANA R. - Acta Med. Scand., 1966, 115, 66 (10)
- JAMIESON G.A. - Biochim. Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 775 (47,53,152)
- JAMIESON G.A. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 2914 (1,60,134,138,222)
- JAMIESON G.A. - Biochim. Biophys. Acta, 1966, 121, 326 (55)
- JAMIESON G.A. - 14ème Colloque de Bruges, 1966, Elsevier (Ed.), 1967, 71 (135)
- JAMIESON G.A., JETT M. et DE BERNARDO S.L. - J. Biol. Chem., 1971, 246, 3686 (164,170,172)
- JANDL J.H. et KATZ J.H. - J. Clin. Invest., 1963, 42, 314-326 (98)
- JEPPSSON J.O. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 140, 477 (116,118,127,201,254,262)
- JEPPSSON J.O. - Acta Chem. Scand., 1967, 21, 1686 (121)
- JOLLES J., SCHOENTGEN F., HERMANN J., ALAIS C. et JOLLES P. - Eur. J. Biochem., 1974, 139, 163 (272)
- JONES H.D.C. et PERKINS D.J. - Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 122 (13,52)
- KATZ J.H. - J. Clin. Investig., 1961, 40, 2143 (75)
- KOECHLIN B.A. - J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 2649 (41)
- KORNFELD S. - Biochemistry, 1968, 7, 945 (111)
- KRISTJANSSON F.K. - Genetics, 1963, 48, 1059 (175)
- KRYSTEVA M., MAZURIER J., SPIK G. et MONTREUIL J. - F.E.B.S. Letters, (Sous presse) (21,193)
- KUSAMA K. - J. Biochem., 1957, 44, 375 (188)
- LEGER D., SPIK G., VERBERT A., DUPIRE C., MONTREUIL J. et LOUCHEUX M.H. - XIe Journées Biochimiques Latines, Salamanque, 1973, CGG ; Biochimie (Sous presse)
- LUK C.K. - Biochemistry, 1971, 10, 2838 (19)
- MANN K.G., FISH W.W., COX A.L. et TANFORD C. - Biochemistry, 1970, 9, 1348 (26,38,65,125,199)

- MARKANNEN T., VIRTANEN S., HIMANEN P. et PAJULA R.L. - Acta Haemat., 1972, 48, 213 (87)
- MARTIN C.M., JANDL J.H. et FINLAND M. - J. Infect. Diseases., 1963, 112, 158 (86)
- MESMER T.O. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 320, 663 (96)
- MONTGOMERY R. et WU Y.C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (209)
- MONSIGNY M. - Thèse Doc., Lille, 1968 (214)
- MONTREUIL J. - Pure and Applied Chemistry, 1971, 27, 549 (235,238,244,249, 252,275,278)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSEON A. et SPIK G. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1867 (148,153 b)
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G. et LEROY N. - C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 4065 (46,48,63,114)
- MONTREUIL J. et SPIK G. - Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux - Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille, 1963 (44,182,212)
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSEON A. - C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493 (147,151)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BISERTE G. et DAUTREVAUX M. - Experientia, 1965, 21, 254 (64)
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S. - Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (33)
- MORGAN E.H. - Brit. J. Haematol., 1964, 10, 442-452 (100)
- MORGAN E.H. et BAKER E. - Biochim. Biophys. Acta, 1974, 363, 240 (103,109)
- MORGAN E.H. et LAURELL C.B. - Brit. J. Haematol., 1963, 2, 471 (99)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 75 (194)
- NEUBERGER A. et MARSHALL R.D. - Aspects of the structure of glycoproteins, in H.W. SCHULZ, CAIN R.F., WROLSTAD R.D. First Symposium on Foods : Carbohydrates and their roles. Oregon State University, July 1968, The Air Pub. Co., Westpoint, Coun. Ed. (234,248,274)
- NIALL H.D., KEUTMANN H.T., COPP D.H. et POTTS Jr J.T. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1969, 64, 771 (270)
- OSAKI S., JOHNSON D.A. et FRIEDEN E. - J. Biol. Chem., 1969, 841, 2746 (81)
- PALMOUR R.M. et SUTTON H.E. - Biochemistry, 1971, 10, 4027 (39)
- PARKER W.C. et BEARN A.G. - Science, 1961, 133, 1014 (157)
- PARKER W.C. et BEARN A.G. - J. Exp. Med., 1962, 115, 83 (70,71)
- PARKER W.C., CRESTFIELD A.M. et BEARN A.G. - Gottschalk A. Glycoproteins, Elsevier, 1966, 423 (122)
- PARTRIDGE S.M. - Biochem. J., 1948, 42, 238 (211)

- POULIK M.D. - J. Immunology, 1959, 82, 502 et Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 493 (156)
- PUTNAM F.W. - Science, 1955, 122, 275 (113)
- RIMINGTON C. - Biochem. J., 1931, 25, 1062 (178)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G. et SEAL U.S. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 4907 (32)
- ROBBINS E. et PEDERSON T. - Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 66, 1244 (89)
- ROBINSON J.C. et PIERCE J.E. - Arch. Biochem. Biophys. 1964, 106, 348 (153,162)
- ROOP W.E. et PUTNAM F.W. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 2502 (174)
- ROVERY M. - Actes du Colloque international de l'Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale, Montpellier, 28 et 29 septembre 1971, INSERM Ed., Paris, 1971, 217 (202)
- RYDON H.N. et SMITH P.W.G. - Nature, 1953, 169, 922 (208)
- SCHADE A.L. - Biochem. Z., 1963, 338, 140 (85)
- SCHADE A.L. et CAROLINE L. - Science, 1946, 104, 340 (11,84)
- SCHADE A.L., REINHART R.W. et LEVY H. - Arch. Biochem., 1949, 20, 170 (15)
- SCHULMAN H.M., MARTINEZ-MEDELLIN J. et SIDLOI R. - Biochem. Biophys. Acta, 1974, 343, 529 (102)
- SCHULTZE H.E., GOLLNER I., HEIDE K., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G. - Z. Naturf., 1955, 106, 463 (43)
- SCHULTZE H.E., HEIDE K. et MULLER H. - Behringwerk Mitt., 1957, 32, 25 (57)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R. et HAUPT H. - Biochem. Z., 1958, 329, 490 (45,49,59)
- SEELIG M.S. - Arn. J. Clin. Nutr., 1972, 25, 1022 (83)
- SMITHIES O. - Nature, 1957, 180, 1482 (58)
- SPEYER B.E. et FIELDING J. - Biochem. Biophys. Acta, 1974, 332, 192 (105)
- SPIK G. - Thèse Doct., Lille, 1968 (2,23,25,34,54,62,76,78,79,82,117,119,132,136,139,142,145,146,149,154,159,177 b,190,203,228,229,245)
- SPIK G. - Communication personnelle (56,61,163)
- SPIK G. - Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, A 81 (36)
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. - F.E.B.S. Letters, 1975, 50, 296 (7,165,171,173,246)
- SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P. et MONTREUIL J. - Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1974, 82, 29 (73,166)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 50, 2186 (120,195)

- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137 (3,6,133,137,139,144,160,204,224,230)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 94 (24)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - International Symposium IV Chromatographie Electrophorèse, Bruxelles 1966, Press. Acad. Européennes, Ed. Bruxelles, 1968, 386 (150,155)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - Résultats non publiés (35)
- SPIK G. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1271 (4,5,141, 161,205,223,227,231)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G. et MONTREUIL J. - Actes du Colloque international n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Ed. CNRS, Paris, 1974, 483 (72)
- SPIRO R.G. - New England Journal of Medicine, 1969, 281, 991,1043 (237, 251,277)
- STEERS E., CRAVEN G.R. et ANFINSEN C.B. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 2478 (253)
- STEHELIN D. et DURANTON H. - J. Chromatog., 1969, 43, 93 (217)
- SURGENOR D.M., KOECHLIN B.A. et STRONG L.E. - J. Clin. investig., 1949, 28, 73 (42)
- SUTTON M.R. et BREW K. - F.E.B.S. Letters, 1974, 40, 146 (130)
- SUTTON M.R. et BREW K. - Biochem. J., 1974, 139, 163 (8,67,129,131,192, 263,265,266,268)
- TIJMMANS J. et PHILIPPI K. - Biochem. J., 1929, 215, 36 (177 b)
- TORMEY D.C., IMRIE R.C. et MUELLER G.C. - Exptl. Cell. Res., 1972, 74, 163 (90)
- TORMEY D.C. et MUELLER G.C. - Exptl. Cell. Res., 1972, 74, 220 (91)
- TSUNG C.M. et FRAENKEL-CONRAT H. - Biochemistry, 1965, 4, 793 (221)
- VERHOEF N.J., KREMERS J.H.W. et LEIJNSE B. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 304, 114 (107)
- VERHOEF N.J., KREMERS J.H.W. et LEIJNSE B. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 304, 114 (97)
- VOGT A., MISHELL R.I. et DUTTON R.W. - Exptl. Cell. Res., 1969, 54, 195 (88)
- WALSH R.J., THOMAS E.D., CHOW S.K., FLUHARTY R.G. et FINCH C.A. - Science, 1949, 110, 396 (92)
- WARNER R.C. et WEBER I. - J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 5094 (16)
- WEBER L. et OSBORN M. - J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406 (256)

- WERNER I. et ODIN L. - Acta Soc. Med. Upsalensis, 1952, 57, 230 (181)
- WOOD K.R. et WANG K.T. - Biochem. Biophys. Acta, 1967, 133, 369 (186)
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE N.C. et VINCENDON G. - J. Chromatog., 1972, 69, 291 (240,257)

