

1975  
5161-1

N° d'ordre :

50376  
1975  
15

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Joël MAZURIER

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE  
HUMAINE :



ISOLEMENT ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRAGMENTS  
OBTENUS APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

Présenté le février 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :

M. J. MONTREUIL  
M. P. JOLLES  
Melle G. SPIK  
M. G. BISERTE

Président  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur

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

## TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	4
I - LOCALISATION ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE	5
II - PREPARATIONS DE LA LACTOTRANSFERRINE	10
III - PROPRIETES DE LA LACTOTRANSFERRINE	10
IV - PROPRIETES CHIMIQUES	16
V - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE	19
VI - CONCLUSIONS	20
TRAVAUX PERSONNELS	23
PREPARATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE	
I - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NATIVE ET MODIFIEE	24
II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	
A - Composition centésimale et molaire en monosaccharides	25
B - Composition molaire en acides aminés	27
C - Nature des acides aminés situés en position N- et C-terminale	30
III - CONCLUSIONS	32
ETUDE DE L'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR LA LACTOTRANSFERRINE ET SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES FRAGMENTS LIBERES	
I - PRINCIPE ET MECANISME D'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR LES LIAISONS METHIONYLES	33
II - DETERMINATION DES MEILLEURES CONDITIONS D'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR L'APOLACTOTRANSFERRINE	
III - ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE	
A - Recherche d'homosérine ou d'homosérine lactone libres	38
B - Détermination du nombre de rupture des liaisons méthionyles	

IV - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE TRAITÉE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE	
A - Fractionnement sur colonne de Biogel P 100	41
B - Conclusions	45
<p style="text-align: center;">ETUDE DES PROPRIETES DE LA FRACTION C ET SEPARATION DE SES CONSTITUANTS</p>	
I - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE LA FRACTION C	46
II - CAPACITE DE FIXATION DU FER DE LA FRACTION C	47
III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FRACTION C	
A - Détermination de la masse moléculaire	50
B - Composition en acides aminés de la fraction C	50
C - Composition en monosaccharides de la fraction C	50
IV - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION C	
A - Mode opératoire	51
B - Résultats	54
C - Conclusions	57
V - PURIFICATION DES CONSTITUANTS CI, CII et CIII OBTENUS PAR CHROMATO- GRAPHIE D'ECHANGE D'IONS DE LA FRACTION C OXYDEE	
A - Mode opératoire	57
B - Résultats	58
C - Conclusions	61
<p style="text-align: center;">PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEPT FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE ET RUPTURE DES PONTS DISULFURES DE LA LACTOTRANSFERRINE</p>	
I - ETUDE DE LA MASSE MOLECULAIRE DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES	64
II - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES	70
III - NATURE DES ACIDES AMINES N- ET C-TERMINAUX DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES	
A - Nature des acides aminés situés en position N-terminale	70
B - Nature des acides aminés situés en position C-terminale	72
C - Conclusions	
IV - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES	74
V - HYDROLYSE TRYPSIQUE DES FRAGMENTS FI ET FII ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES	
A - Hydrolyse trypsique des fragments FI et FII	77

B - Fractionnement des glycopeptides obtenus par hydrolyse trypsique des fragments FI et FII	77
C - Etude des glycopeptides tryptiques des fragments FI et FII, FI T1 et FII T1 obtenus par hydrolyse	80
D - Conclusions	80
CONCLUSIONS GENERALES	
APPENDICE TECHNIQUE	87
I - TECHNIQUE D'UTILISATION DES COLONNES DE TAMISAGE MOLECULAIRE ET D'ECHANGE D'IONS	
A - Tamisage moléculaire	88
B - Chromatographie d'échange d'ions	88
II - REACTIONS DE MODIFICATIONS CHIMIQUES DES CHAINES PEPTIDIQUES	
A - Coupure des ponts disulfures	89
1 - Oxydation performique	
2 - Réduction et alkylation	
B - Maléylation	
1 - Mode opératoire	90
2 - Démaléylation	
C - Succinylation	91
III - ANALYSE CHIMIQUE DES FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION DU BrCN	
A - Analyse de la composition molaire en monosaccharides	
1 - Méthanolyse	91
2 - Trifluoroacétylation	92
3 - Chromatographie en phase gazeuse	92
B - Analyse des acides aminés N-terminaux	
1 - Réaction de dansylation	92
2 - Chromatographie des acides aminés dansylés	93
C - Analyse des acides aminés C-terminaux	
1 - Hydrazinolyse	93
2 - Carboxypeptidase A	95
IV - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES	
A - Ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation	
1 - Théorie	95
2 - Mode opératoire	96
B - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	
1 - Réactifs	98
2 - Conditions de l'électrophorèse	99
C - Tamisage moléculaire	101

Le travail concernant l'action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine humaine a fait l'objet de la communication et des publications suivantes :

Communication

J. MAZURIER et G. SPIK - Action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine humaine - Réunion commune de la Société de Chimie Biologique et de la Société Belge de Biochimie, Louvain, 18-19 avril 1974.

Publications

1 - J. MAZURIER et G. SPIK  
Action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine humaine. Arch. Intern. Physiol. Bioch., 1974, 82, 27.

2 - J. MAZURIER, G. SPIK and J. MONTREUIL  
Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments from human lactotransferrin .  
F.E.B.S. Letters, 1974, 48, 262 à 265

## INTRODUCTION

La lactotransferrine est une glycoprotéine qui appartient au groupe des transferrines. Les transferrines fixent réversiblement, à saturation, deux atomes de fer en deux sites spécifiques.

La lactotransferrine humaine découverte il y a une dizaine d'années par MONTREUIL et MULLET (1) est étudiée au Laboratoire d'une manière comparative avec la sérotransferrine humaine.

La lactotransferrine et la sérotransferrine possèdent de nombreux points communs (fixation réversible de deux atomes de fer par molécule, même masse moléculaire, présence de deux groupements glycaniques de structure voisine) et jouent un rôle important lié au métabolisme du fer.

La sérotransferrine transporte le fer aux réticulocytes, stimule la synthèse du DNA et la mitose et possède une activité bactériostatique, elle transporte de plus l'acide folique.

La lactotransferrine, dont le complexe fer-protéine est plus stable que celui de la transferrine, semble jouer un rôle important dans la régulation de l'absorption du fer et la protection de l'intestin du nourrisson. Elle capterait le fer de la sérotransferrine au niveau de la glande mammaire et le lui céderait au niveau de l'intestin.

Au sein de l'Equipe, le travail qui nous a été confié concerne l'étude structurale de la lactotransferrine.

La plupart des propriétés physiques et chimiques de la lactotransferrine sont actuellement connues, mais la structure primaire de la chaîne polypeptidique monocaténaire composée de 640 aci-

des aminés est à peine ébauchée.

Après coupure trypsique et chymotrypsique, deux glycopeptides ont été isolés, la structure des deux glycannes ainsi que la séquence des acides aminés au voisinage du point d'attache ont été déterminées. La séquence en acides aminés de ces deux glycopeptides ne représente que 4 p. 100 de la structure primaire de la chaîne peptidique.

Cependant, la connaissance de la structure primaire des transferrines est indispensable pour déterminer la configuration spatiale de ces protéides en vue :

1) D'effectuer une étude structurale comparée de la lactotransferrine et de la sérotransferrine.

2) De préciser l'emplacement des deux groupements glycaniques qui participent vraisemblablement à la reconnaissance des membranes des cellules cibles et d'étudier les interactions glycanne-glycanne et glycanne-protéine.

3) De déterminer les modalités de la fixation réversible des deux atomes de fer et leur emplacement dans ces molécules.

4) D'étudier les modalités de la fixation de ces transferrines sur leurs cellulescibles: réticulocytes pour la sérotransferrine, cellule de la bordure en brosse pour la lactotransferrine.

Avant d'aborder l'étude passionnante de l'activité biologique des transferrines, nous avons entrepris l'étude de la structure primaire de la lactotransferrine, en la soumettant à l'action du bromure de cyanogène.

Le bromure de cyanogène est un réactif très spécifique qui permet la coupure de la chaîne peptidique au niveau des liaisons méthionyles. La lactotransferrine ne contenant que six résidus de



méthionine , nous devrions ainsi libérer et séparer sept fragments peptidiques sur lesquels il serait possible de localiser les centres actifs de la molécule et de comparer les fragments obtenus avec ceux obtenus à partir de la sérotransferrine.

Dans le présent mémoire, nous résumons d'abord succinctement les connaissances actuelles concernant la lactotransferrine, puis nous exposons nos résultats. Après la description des caractéristiques physiques et chimiques d'une lactotransferrine isolée par un nouveau procédé industriel, nous discutons des conditions de coupure de la glycoprotéine par le bromure de cyanogène. Puis, nous décrivons un mode de fractionnement qui nous permet d'isoler et d'étudier les propriétés physico-chimiques des sept fragments peptidiques qui sont présents dans la chaîne polypeptidique de la lactotransferrine.

GENERALITES

La lactotransferrine humaine appartient à un groupe homogène de glycoprotéines, qui fixent réversiblement, à saturation, deux atomes de fer en deux sites spécifiques.

Elle a été découverte et isolée pour la première fois du lait de Femme, en 1960 par MONTREUIL et al. (1) et par JOHANSON (2). Par la suite, elle a été identifiée dans de nombreux milieux de sécrétions.

Dans ce chapitre, nous allons préciser la localisation, le rôle biologique et les propriétés physiques et chimiques de la lactotransferrine humaine.

## I - LOCALISATION ET ROLE BIOLOGIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

### A - LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine a été découverte et isolée du lait de Femme par MONTREUIL et al. (3), par JOHANSON (4), puis par BLANC et ISLIKER (5) et par MASSON et HEREMANS (6). Sa concentration dans le lait humain est importante et, comme l'ont démontré MASSON et al. (7), elle varie au cours de la lactation. Son taux atteint 6g/l dans le colostrum, puis tombe rapidement pour se stabiliser, selon MONTREUIL et al. (8), à 1 à 2 g/l.

BISERTE et al. (9) ont identifié les premiers la lactotransferrine dans les expectorations bronchiques. Par la suite, LOISILLIERS et al. (10) et MASSON et al. (11) l'ont trouvée en quantités variables dans de nombreux milieux de sécrétion : sécrétion gastro-intestinale, liquide duodénal, mucus utérin, mucus nasal, bile hépatique, urine, mucus bronchique.

Enfin, MASSON et al. (12) l'ont mise en évidence dans les épithéliums sécréteurs de la glande mammaire, du tractus respiratoire, des glandes sous-maxillaires, des muqueuses gastro-intestinales et du rein. Certains de ces épithéliums sont capables de synthétiser la lactotransferrine; il s'agit de la glande mammaire, de la muqueuse rectale, de l'endomètre, de l'endocol, du rein, et des vésicules séminales (HECKMAN et RUMKE -13-). Les quantités de lactotransferrine secrétée sont variables et peuvent atteindre, dans la salive, 40 mg par jour.

La lactotransferrine est en outre présente, comme l'ont démontré MASSON et al. (14) par des techniques d'immunoélectrophorèse, dans les leucocytes neutrophiles. Elle y est associée aux granules spécifiques, son taux faible est de 3,4  $\mu$ g par million de leucocytes. La lactotransferrine leucocytaire est synthétisée par les tissus hématopoïétiques.

Au Laboratoire, nous avons mis en évidence, dans les selles de nourrissons alimentés au lait maternel, de faibles quantités de lactotransferrine ayant gardé la capacité de fixer le fer (MAZURIER - DEHAINE -15-).

## B - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Le rôle biologique de la lactotransferrine est encore mal connu ; il est principalement lié, comme nous allons le voir, à la capacité de la lactotransferrine de lier réversiblement le fer.

### 1) Source du fer dans le lait humain

Il existe, d'après BLANC (16), 0,8 mg de fer par litre de lait de Femme ; ce fer est localisé dans la fraction lipidique, la caséine et en grande partie dans le lactosérum. Le fer est fixé réversiblement par la lactotransferrine et les ferrilactines.

Selon BLANC et ISLIKER (17), la lactotransferrine, en captant le fer de la transferrine sérique, permettrait l'introduction directe de celui-ci dans le lait. La grande stabilité du complexe fer-lactotransferrine (SPIK et MONTREUIL -(18), BLANC -(19)-) pose le problème du mécanisme de libération du fer au niveau de l'intestin du nourrisson. Pour SPIK ( 20 ), la lactotransferrine ne serait pas attaquée par des protéases, mais céderait son fer à des agents chélateurs, ou bien des transférases réaliseraient activement le transfert du fer aux chélateurs. Le rôle de la lactotransferrine dans l'apport du fer au nourrisson est mis en doute par MASSON (21), car il n'existe aucune relation entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine dans le lait des différents mammifères. Cependant, cet auteur n'exclut pas définitivement l'intervention de la lactotransferrine, qui pourrait agir de la façon suivante : le fer de la glycoprotéine pourrait être capté par les cellules épithéliales de la glande mammaire et être stocké dans des granules lipidiques qui seraient à l'origine du fer véhiculé par le lait.

## 2) Activité bactériostatique

Elle a été posée en hypothèse, par analogie avec la sérotransferrine humaine, par MONTREUIL et al. (22), puis par BLANC et ISLIKER (23) et mise en évidence par BLANC (24), ORAM et REITER (25) et MASSON et HEREMANS (26). Récemment, BULLEN et al. (27) ont démontré que la lactotransferrine renfermant entre 56 et 89 p. 100 de son fer, associée à des anticorps spécifiques, possède une puissante activité bactériostatique vis-à-vis de E. Coli, cette activité est détruite par la saturation en fer de la protéine. Ils supposent que l'activité bactériostatique du lait qui, elle aussi, est inhibée par la saturation en fer, est due à la lactotransferrine.

Selon une hypothèse de MONTREUIL, la protection de l'intestin du nourrisson pourrait se faire par l'intermédiaire de

complexes formés par la lactotransferrine, les immunoglobulines, le lysozyme, le facteur  $\alpha_1$ -antitrypsique et <sup>des</sup> glycopeptides acides.

### 3) Hyposidérémie des états inflammatoires

Pour MASSON (28), la lactotransferrine leucocytaire serait le facteur qui provoque l'hyposidérémie des états inflammatoires. Libérée du leucocyte, elle capterait le fer de la transferrine pour le céder, au niveau des macrophages, à la ferritine.

### 4) Lactotransferrine et cancer

LOISILLIERS et al. (29) ont démontré que les cellules épithéliales d'organes cancéreux (sein, foie, poumon, rein, côlon, estomac) ont une concentration en lactotransferrine multipliée par 4. Néanmoins, RUMKE et al. (30) ont constaté que la haute concentration en lactotransferrine des tissus mammaires cancéreux est due à une contamination des leucocytes neutrophiles qui, lors du prélèvement de l'organe, libèrent la lactotransferrine leucocytaire.

## II - PREPARATIONS DE LA LACTOTRANSFERRINE

De nombreux procédés de préparation de lactotransferrine ont été décrits ; nous donnerons simplement le principe des méthodes utilisées.

### Premier procédé de JOHANSON (31).

Le précipité obtenu à 80 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium à pH 8 du lait délipidé est chromatographié sur DEAE cellulose, puis sur hydroxyapatite.

### Deuxième procédé de JOHANSON (32)

Le lait délipidé et décaséiné est chromatographié sur CM-Sephadex C50. La lactotransferrine fixée est éluée par un tampon

TRIS 0,05 M NaCl 2 M pH 8, puis repurifiée dans les mêmes conditions. La lactotransferrine ainsi préparée cristallise au bout de plusieurs semaines, à partir de la gomme formée au cours de la dialyse.

Procédé de BLANC et ISLIKER (33)

La lactotransferrine est précipitée par l'éthanol dans les filtrats de lait délipidé décaséliné et traité par la rivanol. Elle est ensuite purifiée par chromatographie sur DEAE cellulose.

Procédé de GOT (34)

Cet auteur extrait la lactotransferrine par chromatographie sur Sephadex G100 d'un précipité au sulfate d'ammonium obtenu lui-même, à partir d'un précipité éthanolique.

Procédé de MASSON et HEREMANS (35)

Ces auteurs séparent la lactotransferrine à divers degrés de saturation en fer, en chromatographiant sur DEAE cellulose, un précipité obtenu à partir du lacto-serum traité par le sulfate d'ammonium à pH 6, 8.

Procédé de MONTREUIL et al. (36)

Le lait délipidé puis fractionné par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium combiné à un gradient de pH fournit un précipité qui, chromatographié sur Amberlite XE 64 puis sur DEAE cellulose, permet d'isoler la lactotransferrine.

Ce procédé a été modifié par DESCAMPS et al. (37) : le précipité P7 P8 du lactosérum traité au sulfate d'ammonium est chromatographié sur CM-cellulose, puis sur Sephadex G100 ; la lactotransferrine ainsi obtenue cristallise à + 4°C en plusieurs semaines, sous la forme de longues plaquettes.

Récemment, HAUPT et BAUDNER (38), en préparant la lactotransferrine saturée par chromatographie de tamisage moléculaire et d'échanges d'ions sur CM cellulose, réussissent à la cristalliser à 2°C, à pH 8,5-9,5, sous forme de longues aiguilles.

### III - PROPRIETES PHYSIQUES

#### A - MASSE MOLECULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

L'étude statistique de la masse moléculaire de la lactotransferrine par l'application de différentes méthodes : équilibre de sédimentation, coefficient de sédimentation et viscosité intrinsèque, électrophorèse en gel de polyacrylamide, tamisage moléculaire et titration du fer, a permis à SPIK (39), LEGER (40) et LEGER et al. (41) (tableau I p. 11) de lui attribuer une valeur de  $76\,700 \pm 1000$ . Une valeur identique a été trouvée pour la sérotransferrine (MONTREUIL et al. -42-) (MANN et al. -43-), (GREEN et FEENEY -44).

#### B - CONFORMATION DE LA MOLECULE

La valeur de la viscosité intrinsèque de 4,0 ml/g obtenue par LEGER (45) montre que la lactotransferrine est une protéine globulaire. D'autre part, LEGER (46) a pu démontrer en étudiant sa constante de sédimentation et sa viscosité intrinsèque, que la lactotransferrine est un ellipsoïde de révolution aplati dont le rapport des axes est peu différent de 1.

La forme apo de la protéine est beaucoup plus facilement dénaturée en présence de chlorhydrate de guanidine ou d'urée que la forme saturée (TEUWISSEN et al. -47-, LEGER -48-) ce qui peut s'expliquer par le nombre restreint de ponts disulfures (13) ou par une dénaturation partielle de la structure de la protéine lors de l'élimination du fer.

60 p.100 des résidus de lysine de la lactotransferrine sont



TABLEAU I : CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE LA LACTOTRANS-  
FERRINE HUMAINE

	a	b	c	d
<u>Constante de sédimentation</u>				
$S_{20}^w$	4,8	-	-	-
$S_{20}^i, w$	-	5,5	4,9	5,35
<u>Constante de diffusion D</u>	4,6	-	5,6	
<u>Volume spécifique partiel</u>				
Calculé	-	0,735	-	
Mesuré	-	0,732	0,716	
<u>Viscosité intrinsèque (D)</u>				4,0
<u>Masse moléculaire</u>				
Constantes de sédimentation et de diffusion	95 000			
Diffusion de la lumière	89 000			
Equilibre de sédimentation				76700
Gel filtration		76000		
Electrophorèse en gel de polyacrylamide			76800	
Titration du fer		75980	80000	
Viscosité				77500
Viscosité et coefficient de sédimentation				78100

- a : MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (49)
- b : SPIK (50)
- c : MASSON et HEREMANS (51) - QUERINJEAN MASSON et HEREMANS (52)
- d : LEGER et al. (53)



accessibles à la succinylation (BUTTKUS et al. - 54), ce qui laisse supposer que de nombreuses lysines sont à la surface du protéide.

### C - POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoelectrique de la lactotransferrine a été déterminé par électrofocalisation par différents auteurs. BRAZIER (55) le situe à pH 5,8 et MASSON (56) à pH 6,9. Par la même technique, HAUPT et BAUDER (57) constatent que le protéide précipite dans la colonne d'électrofocalisation, dans une zone de pH s'étalant de pH 4,8 à pH 8,5.

### D - ASSOCIATIONS MOLECULAIRES DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine possède la propriété de s'associer avec des composés plus acides qu'elle ; c'est pourquoi, la migration électrophorétique de la lactotransferrine du lactosérum est anodique alors que la lactotransferrine purifiée ne migre pas en électrophorèse. Ce comportement anodique de la lactotransferrine du lactosérum est dû, comme l'a démontré DESCAMPS (58), à une interaction avec des glycopeptides. HEKMAN (59) a mis en évidence que la lactotransferrine présente dans les sécrétions des cellules épithéliales possède, elles-aussi, une mobilité électrophorétique plus anodique que le protéide purifié. La lactotransferrine peut s'associer avec différents composés, tels que la sérum-albumine, la caséine, l' $\alpha$ -lactalbumine, le lysozyme et l'ovalbumine.

Enfin, LOISILLIERS et al. (60) ont décrit un complexe LTF ARN-protéinase qui constituerait un auto-antigène responsable de la formation d'auto-anticorps chez les malades atteints de lésions mammaires.

La nature de la liaison de la lactotransferrine avec des composés acides n'est pas encore connue. D'après MALMQUIST et JOHANSON (61) qui ont étudié les interactions de la lactotransferrine avec le bleu Trypan, cette liaison n'est certainement pas de

nature covalente, mais plus probablement de nature électrostatique ou hydrophobe.

## E - FIXATION DU FER

La lactotransferrine, tout comme les transferrines, fixe à saturation et réversiblement, deux atomes de fer en deux sites spécifiques en développant une coloration dont le maximum d'absorption se situe à 460 nm (MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (62) ; JOHANSON (63)). La lactotransferrine native n'est que partiellement saturée en fer.

### 1) Stabilité du complexe lactotransferrine-fer

Le complexe lacto-transferrine-fer est stable dans une gamme de pH s'étalant de pH 4 à pH 10 (MONTREUIL et al. (64)). L'élimination totale du fer nécessite un abaissement du pH à pH 2. La stabilité de ce complexe est différente de celle du complexe fer-transferrine, qui lui, perd la totalité de son fer à pH 4. La constante d'affinité du fer de la lactotransferrine, étudiée en équilibre de dialyse par AISEN et LEIBMAN (65) est 260 fois plus importante que celle de la transferrine. BLANC et ISLIKER (66) ont démontré que la lactotransferrine est capable de capter tout le fer de la transferrine à pH 6,5, ce phénomène n'existe plus selon MASSON (67) pour des pH supérieurs à 6,5.

Par des études d'équilibre de dialyse AISEN et LEIBMAN (68) mettent en évidence pour la lactotransferrine, une légère différence dans les constantes d'affinité pour le fer des deux sites spécifiques.

### 2) Sites de fixation du fer de la lactotransferrine

La structure des deux sites spécifiques de fixation du fer a été étudiée par des méthodes physiques et chimiques. Les indications données par les méthodes utilisées sur les différentes transferrines sont identiques, ce qui laisse supposer que leurs sites

spécifiques de fixation du fer ont la même structure, bien que la stabilité des complexes soit différente. Nous allons dans ce chapitre, étudier successivement les facteurs intervenant dans la structure de ces sites.

#### a) Intervention du bicarbonate

La fixation de deux atomes de fer se traduit par l'apparition d'un spectre d'absorption dans le visible, dont le maximum se situe vers 460 nm (MONTREUIL et al. -69 -) pour un coefficient d'absorption molaire de  $4,28 \cdot 10^3$  (pour une masse de 77 000). Ce spectre ne se développe d'après MASSON et HEREMANS (70) qu'en présence d'une molécule de bicarbonate par site de fixation du fer.

#### b) Valences du fer

Les expériences réalisées en résonance paramagnétique nucléaire par AISEN et LEIBMAN (71) ont permis de démontrer que le fer est fixé sous forme ferrique et que ses coordinances sont octaédriques et de symétrie orthorombique.

#### c) Participation de la tyrosine

La fixation d'un atome de fer entraîne selon TEUWISSEN et al. (72), la libération de trois protons. Le groupement qui libère ces protons devant avoir un pK voisin de 10, il ne peut s'agir que de la tyrosine :

Les études de différence de spectre réalisées par AISEN et LEIBMAN (73) et TEUWISSEN et al. (74) montrent l'apparition d'un maximum d'absorption à 295 nm ; cette absorption à 295 nm est caractéristique de la tyrosine ionisée. Les auteurs ont ainsi déduit que 6 résidus de tyrosine ionisés interviennent dans la fixation spécifique du fer.

Les paramètres obtenus par l'étude en résonance paramagnétique électronique du complexe fer-lactotransferrine (AISEN et

LEIBMAN (75) démontrent l'implication de la tyrosine dans les sites de fixation.

Enfin, les études de modifications chimiques de la tyrosine par nitration (TEUWISSEN et al. (76) -) montrent que 2 à 3 résidus de tyrosine sont impliqués dans la fixation du fer.

d) Intervention des atomes d'azote

L'étude en résonance paramagnétique électronique du complexe lactotransferrine-cuivre, réalisée par AISEN et LEIBMAN (77), prouve la participation d'au moins un atome d'azote par site de fixation. Cet atome d'azote n'étant pas protoné à pH 7, doit provenir de l'histidine. En supposant, que les sites de fixation du cuivre et du fer sont les mêmes, les auteurs admettent que, par analogie avec la transferrine, les deux résidus d'histidine sont impliqués dans la liaison avec chaque atome de fer. La démonstration chimique de la participation de l'histidine dans les sites de fixation a été réalisée par KRYSTEVA et al. (78) par action comparative du diéthyl pyrocarbonate sur les formes apo et saturée de la lactotransferrine.

e) Comparaison des deux sites de fixation du fer sur la lactotransferrine

Les études des spectres de résonance paramagnétique électronique de AISEN et LEIBMAN (79) ont démontré jusqu'à présent l'identité des deux sites. Les études de dialyse réalisées par AISEN et LEIBMAN (80) montrent que  $K_2 = \frac{1}{R} K_1$  avec  $R = 0,5$  ou R est un paramètre qui égale l'unité quand<sup>4</sup> les constantes d'affinité  $K_1$  et  $K_2$  pour le fer sont identiques.

Malgré cela, les auteurs concluent à l'identité des deux sites.

#### IV - PROPRIETES CHIMIQUES

##### A - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDE

Les compositions centésimales et molaires en monosaccharides de la lactotransferrine sont précisées dans le tableau II p. 17. Il est intéressant de noter que la composition en monosaccharides de la transferrine humaine ne diffère de celle de la lactotransferrine humaine que par la présence de fucose (SPIK et al. -(81)-) alors que celle de la lactotransferrine bovine s'en éloigne nettement par la présence de 20 résidus de mannose et de galactosamine (CHERON -(82)).

##### B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les compositions en acides aminés données par les différents auteurs sont rassemblées dans le tableau III (p. 18).

Le nombre total d'acides aminés est voisin de 640, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par LEGER (83) sur la longueur de la chaîne peptidique par les études de viscosité en milieu dénaturant sur la protéine réduite et alkylée.

Cette protéine est riche en acides aminés dicarboxyliques (132-134 pour 80 acides aminés basiques), alors que son pHi se situe entre pH 6 et 7. Il est donc probable que de nombreux acides aminés dicarboxyliques sont soit sous forme amidée, soit cachés à l'intérieur de la molécule. D'autre part, la lactotransferrine possède un grand nombre d'acides aminés hydrophobes (330 pour 314 résidus d'acides aminés hydrophiles).

#### V - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

La structure primaire de la lactotransferrine est peu connue. La masse moléculaire de 77000 rend difficile l'exploration de la séquence peptidique. Les seuls résultats que nous ayons concernent l'enchaînement des acides aminés au voisinage des points d'attache des glycanes (SPIK et al. -(84)-) et la structure des 2 gly-

TABLEAU II : ETUDE COMPAREE DES COMPOSITIONS CENTESIMALES ET MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

	: MONTREUIL :	BLANC et	: SPIK	: DEBRAY -	:
	: <u>et al.</u> (85)	: ISLIKER (86)	: (87)	: VANDERSYP:	:
	:	:	:	: PE (88)	:
-----					
: <u>Composition centésimale</u>	:	:	:	:	:
: Monosaccharides neutres	: 3,9	: 4,1	: 3,11	: 3,11	:
: N-acétyl-hexosamines	: 2,4	: 2,3	: 2,43	: 2,00	:
: Acide N-acétyl-neuraminique	: 0,87	: 0,8	: 1,22	: 1,22	:
:	:	:	:	:	:
: <u>Composition molaire</u>	:	:	:	:	:
: D-galactose	: 10	: -	: 5	: 6	:
: D-mannose	: 7	: -	: 5	: 5	:
: L-fucose	: 5	: -	: 4	: 3	:
: N-acétyl-D-glucosamine	: 13	: -	: 10	: 8	:
: Acide N-acétyl-neuraminique	: 3	: -	: 3	: 3	:
:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:



TABLEAU III : COMPOSITION EN ACIDES AMINES  
DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

	a	b	c
Asp	70	62	65
Thr	31	29	33
Ser	45	38	46
Glu	77	58	69
Pro	37	29	33
Gly	58	49	49
Ala	63	48	56
1/2 Cys	28	30	26
Val	44	34	43
Met	5	3	5
Ile	18	14	16
Leu	58	49	54
Tyr	25	18	20
Phe	32	45	28
His	11	8	10
Lys	49	40	39
Arg	45	38	38
Try	8	6	11

a : BLANC, BUJARD et MAURON (89)

b : SPIK (90)

c : QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (91)





cannes (SPIK et al. (92)-)

## A - NATURE DES EXTREMITES N ET C-TERMINALES

### 1) Acide aminé N-terminal

MONTREUIL et al. (93) et SPIK et MONTREUIL (94) n'ont pas caractérisé de fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre à l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine. Récemment, LEGER et SPIK (95) ont isolé le peptide N-terminal de la protéine, et ont démontré que l'extrémité  $\alpha$ NH<sub>2</sub> est bloquée par un groupement acétyl.

### 2) Acide aminé C-terminal

SPIK (96) et SPIK et al. (97) ont mis en évidence, par hydrazinolyse du glycolle et de la sérine en position C-terminale. Ce résultat permettait de penser que la lactotransferrine était constituée d'au moins deux chaînes peptidiques.

## B - MONOCATENARITE DE LA CHAINE PEPTIDIQUE

Diverses expériences (SPIK et al. (98)-, GOT et al. (99)-) semblaient être en faveur de la nature pluricaténaire de la chaîne peptidique. Cependant, les derniers travaux de QUERINJEAN et al. (100), et ceux du Laboratoire LEGER(101), LEGER et al. (102) montrent que la longueur de la chaîne peptidique du protéide et sa masse moléculaire, ne sont pas modifiées par la réduction et l'alkylation. Ces résultats prouveraient la monocatéarité de la chaîne peptidique.

## C - ETUDE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES

### 1) Nature du point d'attache

Il semble maintenant établi que les monosaccharides sont répartis en deux glycanes liés par une liaison  $\beta$ aspartyl-N-acétylglucosylaminique. Ce type de liaison a été mis en évidence par SPIK(103)et SPIK et al. (104 a, 104 b).

## 2) Localisation des glycannes

L'isolement et l'étude de la séquence des acides aminés des glycopeptides tryptiques et chymotryptiques a permis à SPIK et al. (105) d'affirmer que les deux glycannes proviennent de deux sites différents de la molécule de lactotransferrine.

L'enchaînement des résidus d'acides aminés des deux glycopeptides est donné dans la figure 1 (p. 21).

Ces structures peptidiques confirment que la première N-acétyl-glucosaminyl transférase nécessite la reconnaissance de la séquence Asn-X-Thr (Ser) pour fixer la première N-acétyl-glucosamine (HUNT et DAYHOFF - 106-).

## 3) La structure des glycannes

La structure des glycannes a été établie par SPIK et al. (107) à partir des glycopeptides pronasiques, chymotryptiques et tryptiques, en combinant les techniques d'hydrolyse acide partielle, d'oxydation périodique, d'hydrazinolyse, d'acétolyse et de méthylation. Les anoméries des différentes liaisons ont été établies par action de glycosidases spécifiques. Nous représentons dans la figure 2 p. 22, la structure des deux groupements glycanniques de la lactotransferrine asialylée. La position du résidu de Fucose qui est lié par une liaison  $\alpha$ -1,6 sur un des résidus de N-acétyl-glucosamine n'a jusqu'à présent pu être précisée.

## VI - CONCLUSIONS

Le bref historique que nous venons de développer sur la lactotransferrine humaine montre que cette glycoprotéine possède un rôle biologique très important, et que nos connaissances actuelles sur sa structure sont nettement insuffisantes pour expliquer son mécanisme d'action, lié principalement à la capacité de fixer réversiblement le fer.

GLYCOPEPTIDE I. T

Mannose	3
Galactose	2
Fucose	1
N-acétyl- glucosamine	4

Pro-Phe-Leu-Asn-Gln-Thr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ile-Glu-Ala-Val-Try-Arg

GLYCOPEPTIDE II. T

Mannose	3
Galactose	2
Fucose	1
N-acétyl- glucosamine	4

Leu-Phe-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-Cys-CM-Try-Lys

Fig. 1 - Séquence peptidique et composition molaire en mono-saccharides des asialo-glycopeptides trypsiques I. T et II. T isolés à partir de la lactotransferrine par SPIK et al. (108).



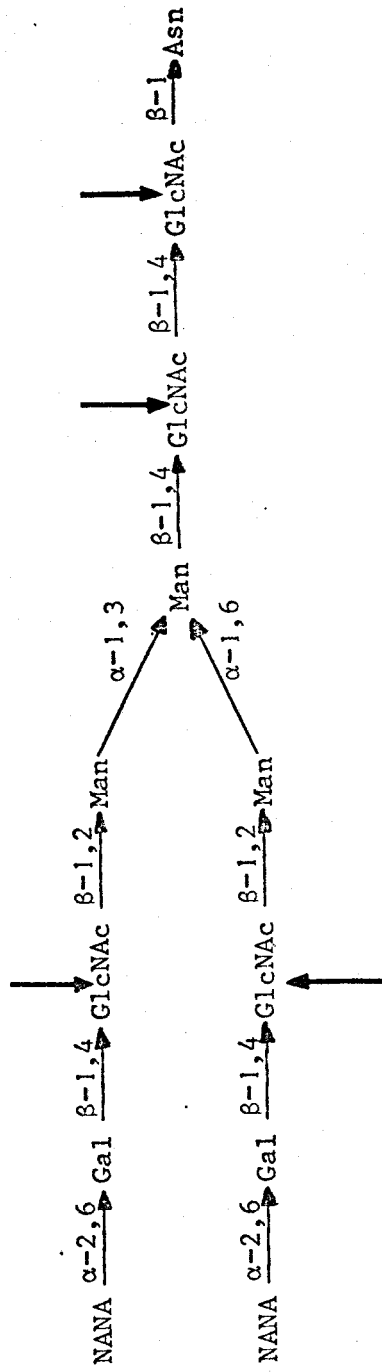


Figure 2

Schéma de structure des groupements glycaniques I et II de la lactotransferrine



TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA  
LACTOTRANSFERRINE

Les échantillons de lactotransferrine sur lesquels nous avons travaillé proviennent d'un nouveau type de fractionnement du lactosérum. Aussi, avant de mettre au point l'action du bromure de cyanogène sur ces échantillons, nous avons repris l'analyse de quelques propriétés physico-chimiques indispensables à notre étude.

Nous avons, en particulier, défini les compositions centésimale et molaire en monosaccharides et en acides aminés de nos échantillons et nous les avons comparées avec celles précédemment obtenues. En outre, nous avons essayé de repreciser la nature des acides aminés N-et-C terminaux par l'application de nouvelles techniques.

Les résultats obtenus sont exposés dans ce chapitre.

I - PREPARATIONS DE LACTOTRANSFERRINE NATIVE ET MODIFIEE

A - PREPARATION DE LACTOTRANSFERRINE NATIVE

La lactotransferrine humaine est préparée par chromatographie sur échangeurs de cations à partir du lactosérum saturé en fer suivant une méthode mise au point par CHERON(109) pour la préparation industrielle de la lactotransferrine bovine. Cette méthode permet d'obtenir avec un rendement de 80 p. 100 une lactotransferrine saturée en fer, homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide et en immunoélectrophorèse.

Au cours de la dialyse contre de l'eau distillée, la lactotransferrine éluée de la colonne d'échangeurs d'ions, cristallise sous la

forme d'aiguilles longues de 1 à 2 cm, qui fondent à 20°C. Cependant, par traitement préalable de ces cristaux à 37°C en présence de traces d'octanol, se forme une gomme qui, ramenée lentement à température ambiante, donne naissance à des cristaux stables à 20°C (fig. 3, p. 26).

#### B - PREPARATION D'APOLACTOTRANSFERRINE

La préparation d'apolactotransferrine s'effectue par abaissement du pH d'une solution à 1 p. 100 de lactotransferrine saturée en fer, par addition d'acide formique à 70 p. 100, jusqu'à pH 2 suivi d'une dialyse de 24 h contre une solution de EDTA à 1 p. 100, puis d'une dialyse de 48 h contre de l'eau distillée.

#### C - PREPARATIONS D'APOLACTOTRANSFERRINE MODIFIEE

L'apolactotransferrine a été modifiée par réduction et alkylation des groupements SH suivant la méthode de CRESTFIELD, MOORE et STEIN (110), décrite page 89, par oxydation performique suivant HIRS (111) (voir page 89), par succinylation selon KLAPPER et KLOTZ (112) (voir page 91).

### II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'étude des différentes propriétés physico-chimiques a été réalisée sur des échantillons d'apolactotransferrine.

#### A - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES

##### 1) Mode opératoire

Les compositions centésimales des différents monosaccharides ont été obtenues par l'application des méthodes classiques décrites dans la monographie de MONTREUIL et SPIK (113).

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et

Fig. 3 - Cristaux de lactotransferrine humaine saturée en fer



trifluorocétylation de la glycoprotéine suivant la méthode de ZANETTA et al. (114). Les conditions de libération des monosaccharides et de séparation chromatographique sont décrites à la page 91

## 2) Résultats et discussion

Les valeurs concernant les compositions centésimales et molaires des différents monosaccharides de la lactotransferrine sont rassemblées dans le tableau IV, page 28. L'étude comparée de ces valeurs avec celles obtenues à partir d'apolactotransferrine préparée selon la méthode décrite précédemment par DESCAMPS, SPIK, BRAZIER et MONTREUIL (115), montre que les compositions centésimales sont très voisines, mais qu'une légère différence apparaît en ce qui concerne la composition centésimale et molaire de la N-acétylglucosamine. Le nombre de résidus de N-acétylglucosamine passe de 10 dans l'ancienne préparation à 8 pour la nouvelle préparation. Cette discordance peut s'expliquer, d'une part, par le changement de préparation et d'autre part, par l'emploi d'une nouvelle méthode de libération de la N-acétylglucosamine : la méthanolyse, au lieu de l'hydrolyse chlorhydrique.

La stabilité de la liaison  $\beta$ -aspartyl-N-acétylglucosylaminique a nécessité une modification des conditions de méthanolyse préconisées par ZANETTA et al. (116), en augmentant la normalité de l'acide chlorhydrique de 0,5 à 1,5 N. Cependant, il est possible que ces conditions restent insuffisantes pour libérer la totalité des résidus de glucosamine.

## B - COMPOSITION MOLLAIRE EN ACIDES AMINES

L'hydrolyse chlorhydrique d'une glycoprotéine, dans les conditions classiques, provoque généralement une oxydation des résidus de méthionine. Pour pallier cet effet, nous avons hydrolysé l'apolactotransferrine en présence de 2-mercapto-éthanol suivant la méthode de KEUTTANS et POTTS (117).

---

Les analyses d'acides aminés ont été réalisées par Mme BENAÏSSA

Nous la remercions vivement.

TABLEAU IV - COMPOSITIONS CENTESIMALES ET MOLAIRES  
EN MONOSACCHARIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE  
PREPAREE SUIVANT LA METHODE DE DESCAMPS, SPIK,  
BRAZIER ET MONTREUIL (118) ET SUIVANT LA METHODE  
ADAPTEE DE CHERON (119),

		: Préparation	: Préparation	
		: suivant	: suivant	
		: DESCAMPS	: CHERON	
		: et al.		
-----				
: <u>Composition centésimale</u>	:	:	:	:
: Monosaccharides neutres	:	3, 11	: 3, 30	:
: N-acétyl-hexosamines	:	2, 43	: 2, 07	:
: Acide N-acétyl-neuraminique	:	1, 22	: 1, 22	:
:	:	:	:	:
: <u>Composition molaire</u> <sup>(x)</sup>	:	:	:	:
: D-galactose	:	5	: 5	:
: D-mannose	:	5	: 5	:
: L-fucose	:	4	: 3	:
: N-acétyl-D-glucosamine	:	10	: 8	:
: Acide N-acétyl-D-neuraminique	:	3	: 3	:
:	:	:	:	:

(x) Les compositions molaires ont été calculées pour une masse moléculaire de 77 000.



### 1) Mode opératoire

500  $\mu$ g de glycoprotéine sont hydrolysés par 500  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 5,6 N en présence de 2-mercapto-éthanol à une concentration de 1p. 2000 (v/v) pendant des temps de 24, 48 et 72 h.

Après évaporation de l'acide chlorhydrique, les acides aminés sont séparés et dosés à l'auto-analyseur BECKMAN S 120 B, suivant le principe général de SPACKMAN, STEIN et MOORE (120) adapté par CHARET (121).

### 2) Résultats et discussion

Si nous comparons les résultats obtenus par l'hydrolyse classique sur l'ancienne préparation d'apolactotransferrine, avec les résultats obtenus par l'hydrolyse en présence de 2-mercapto-éthanol sur la nouvelle préparation d'apolactotransferrine, nous pouvons remarquer qu'il existe une bonne concordance entre les résultats (tableau V, p. 32). Une différence très importante apparaît cependant en ce qui concerne le nombre de résidus de méthionine, qui passe de 3 à 6. Il est à noter qu'en présence de 2-mercapto-éthanol, les acides aminés hydroxylés et la tyrosine, restent stables après 72 h d'hydrolyse et que la cystine est détruite.

Selon KEUTTANS et POTTS (122), cette dégradation s'accompagne de l'apparition d'un composé non identifié qui migre au niveau de la proline dans les conditions chromatographiques utilisées par ces auteurs. Dans les conditions de chromatographie utilisées au laboratoire, le produit de dégradation de la cystine est élué entre la proline et le glycoColle.

L'addition de 2-mercaptoéthanol nous paraît importante pour la détermination du nombre de résidus de méthionine, donc, pour la prévision du nombre de coupure au niveau des liaisons méthionyles par le bromure de cyanogène.

## C - NATURE DES ACIDES AMINES SITUES EN POSITION N<sub>et</sub>

### C-TERMINALE

Les résultats acquis précédemment au Laboratoire étaient en faveur de la présence en position N-terminale, d'un acide aminé possédant une fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> bloquée et de la présence de 2 résidus d'acides aminés en position C-terminale. Sur la nouvelle préparation de lactotransferrine nous avons repris la caractérisation de ces acides aminés en utilisant d'une part la méthode de dansylation et d'autre part, en faisant agir l'hydrazine en présence d'un catalyseur, ou en utilisant la carboxypeptidase A sur la lactotransferrine réduite et alkylée.

#### 1) Dansylation de la lactotransferrine modifiée

L'apolactotransferrine réduite et alkylée a été dansylée suivant la méthode de GROS et LABOUESSE (123), modifiée par PERCY et al. (124), décrite page 92.

Les résultats obtenus confirment ceux précédemment acquis au Laboratoire, c'est-à-dire l'absence d'acide aminé possédant une fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre à l'extrémité N-terminale.

#### 2) Hydrazinolyse de la lactotransferrine modifiée

L'hydrazinolyse de l'apolactotransferrine réduite et alkylée en présence d'Amberlite CG-50 conduit à la mise en évidence d'acide aspartique de sérine et de glycolle dans des proportions identiques à celles trouvées précédemment. Aucune trace de S-carboxyméthyl-cystéine n'a pu être détectée.

Les résultats montrent que la présence de catalyseur n'élimine pas les artefacts au cours de l'hydrazinolyse et qu'il n'existe pas de cystine en position C-terminale de la lactotransferrine.

#### 3) Action de la carboxypeptidase A sur la lactotransferrine modifiée

L'hydrolyse enzymatique par la carboxypeptidase A de l'a-

TABLEAU IV - ETUDE COMPAREE DE LA COMPOSITION MOLAI-  
RE EN ACIDES AMINES DE L'APOLACTOTRANSFERRINE.

: Nature des : Acides aminés	: Ancienne : Nouvelle préparation de	
	: de lactotrans- : ferrine hydro- : lysée dans les : conditions : classiques	: lactotransferrine hydrolysée : Dans les : conditions : classiques : En présence : de 2-mercapto- : éthanol
: Asp	: 62	: 71
: Thr (1)	: 29	: 32-33
: Ser (1)	: 38	: 50-51
: Glu	: 58	: 59
: Pro	: 29	: 31
: Gly	: 49	: 51
: Ala	: 48	: 60
: 1/2 Cys	: 30	: 26
: Val(2)	: 33	: 36
: Met	: 3	: 2
: Ile (2)	: 15	: 12
: Leu(2)	: 47	: 52
: Tyr	: 18	: 24
: Phé	: 25	: 31
: Lys	: 40	: 41
: His	: 8	: 8
: Arg.	: 39	: 42
:	:	:

1 - Après extrapolation au temps zero de l'hydrolyse

2 - Pour une hydrolyse de 72 h

N.D. : non déterminée



polactotransferrine succinylée est réalisée dans les conditions décrites page 91 . Elle conduit à une libération progressive de sérine, qui atteint une valeur de 0,3 mole par mole de glycoprotéine après 24 h.

La présence de glyocolle à une concentration stable de 0,2 mole a été caractérisée au cours de la cinétique de libération.

De nombreuses variations des conditions opératoires : activation de l'enzyme, modification du pH n'ont pas apporté de renseignements supplémentaires.

### III - CONCLUSIONS

Les résultats obtenus sur les échantillons de lactotransferrine préparés suivant la nouvelle méthode confirment l'ensemble des résultats précédemment acquis.

Nous pouvons noter cependant que la chromatographie en phase gazeuse effectuée après méthanolyse conduit à la détermination de 8 résidus de N-acétyl-glucosamine. Ce chiffre est en accord avec la composition molaire en N-acétyl-glucosamine des deux glycopeptides tryptiques isolés par SPIK et al. (125) à partir de la lactotransferrine réduite et carboxyméthylée.

Malgré de nombreux essais, la nature de l'acide aminé C-terminal n'a pu être précisée avec certitude. En effet, les résultats d'hydrazinolyse restent entachés d'erreur.

Il est important de signaler que de nombreux auteurs en particulier KASAI et al. (126) ont mis en évidence la présence systématique de sérine et de glyocolle dans de nombreux hydrazinolyats de protéine ne possédant pas ces acides aminés en position C-terminale.

Comme l'hydrolyse de la glycoprotéine en présence d'agent réducteur libère 6 résidus de méthionine, l'action du bromure de cyanogène doit conduire à l'isolement d'au moins 7 fragments peptidiques. L'isolement et la caractérisation de ces fragments fait l'objet de la suite de ce mémoire.

ETUDE DE L'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR LA  
LACTOTRANSFERRINE ET SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE  
DES FRAGMENTS LIBERES

L'action du bromure de cyanogène a été réalisée sur de l'apolactotransferrine. Dans un premier temps, nous avons cherché à définir les conditions optimales de rupture des liaisons méthionyles et à séparer les fragments obtenus.

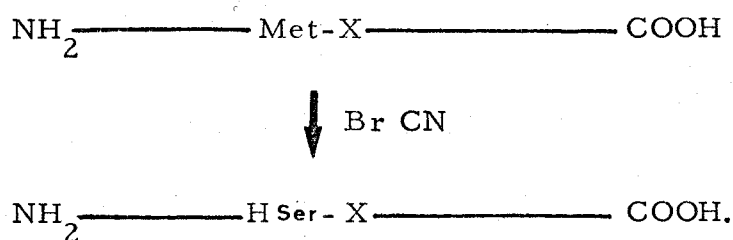
Avant de décrire les résultats nous exposerons rapidement le principe du mode d'action du bromure de cyanogène sur les liaisons méthionyles

I - PRINCIPE ET MECANISME D'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE  
SUR LES LIAISONS METHIONYLES

A - PRINCIPE

CAHOURS (127) puis BRAUN et ENGELBERTZ (128) ont décrit les premiers l'action du bromure de cyanogène sur les liaisons thioéthers et sur les sulfures. GROSS (129) a démontré la possibilité de coupure des liaisons peptidiques au niveau de la méthionine par l'action du bromure de cyanogène avec la conversion de la méthionine en homosérine ou sa lactone.

Tous les fragments d'une chaîne polypeptidique, après rupture par le bromure de cyanogène, possèdent un résidu d'homosérine ou homosérine lactone en position C-terminale, à l'exception du fragment C-terminal de la protéine.



Lorsqu'il existe des séquences répétitives du genre :  
X-Met-Met-Y, il y a libération des fragments X-Hse et Y et d'homosérine (homosérine lactone) libre. Il est à noter, en outre, que la réaction n'a pas lieu sur les résidus de méthionine oxydés.

## B - MECANISME DE LA REACTION

En milieu acide, la fonction thio-méthyl de la méthionine polarise le bromure de cyanogène en  $\text{Br}^- \text{CN}^+$  ce qui permet la formation d'un bromure de cyanosulfonium qui se scinde en méthylthiocyanate et en bromhydrate d'imminolactone d'homosérine. Ce dernier se décompose et libère d'un côté la lactone d'homosérine et de l'autre un peptide ayant comme acide aminé N-terminal l'acide aminé lié primitivement à la méthionine. Le mécanisme de la réaction est décrit dans la figure 4 (p. 35).

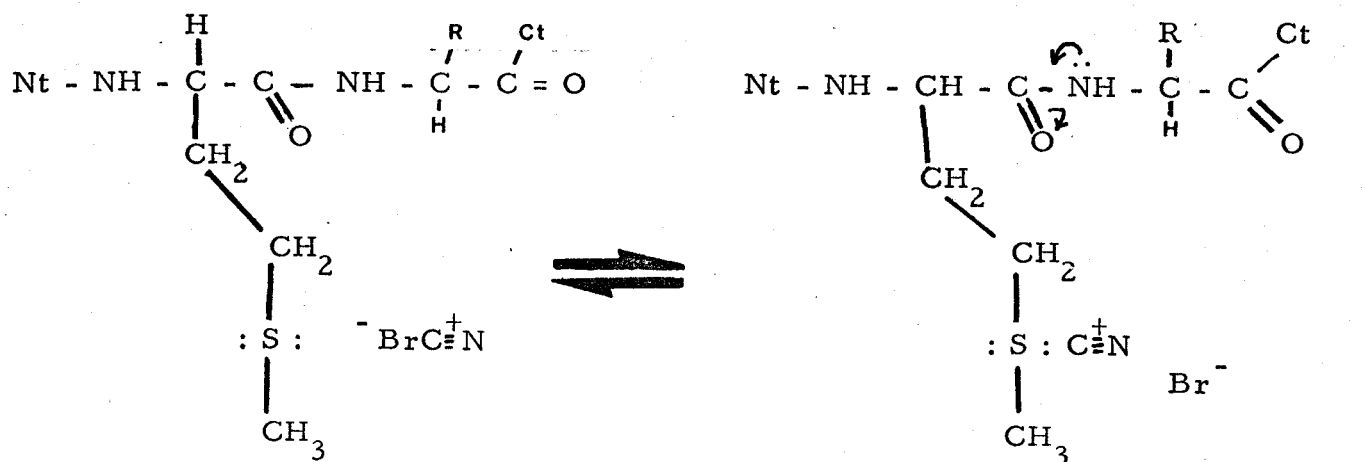
Lorsque la méthionine est liée à un acide aminé hydroxylé, la réaction est plus lente et la coupure ne s'effectue qu'à 50 p. 100. On peut expliquer ce mauvais rendement (HAN -130-) par le fait que la fonction hydroxylée de la sérine ou de la thréonine réagit avec le bromure d'imminolactone pour former un cycle oxazolidine qui peut évoluer, comme le montre la figure 5 (p. 36), de deux manières différentes :

1 - Transformation de la méthionine en homosérine sans coupure de la chaîne peptidique.

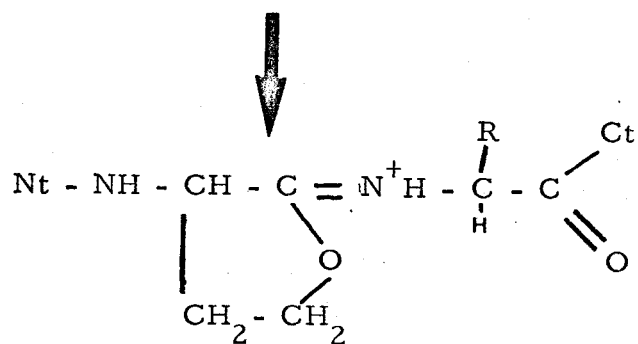
2 - Transformation en homosérine avec rupture mais à une vitesse beaucoup plus lente.

La méthode originale décrite par GROSS et WITKOP (131) s'opère en milieu HCl 0,1 N. Dans ces conditions, la réaction est quantitative à 30°C, mais conduit d'après HOFMAN (132) à des coupures secondaires, qui donnent naissance à des peptides ayant la leucine en position N-terminale. En milieu acide, le  $\text{Br}^- \text{CN}^+$  peut attaquer lentement la cystéine par son groupement thiol sans couper la liaison peptidique. STEERS et al. (133) ont remplacé le mi-





Bromure de cyanosulfonium



Bromure d'iminolactone

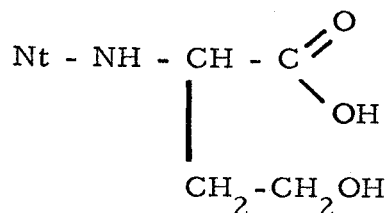
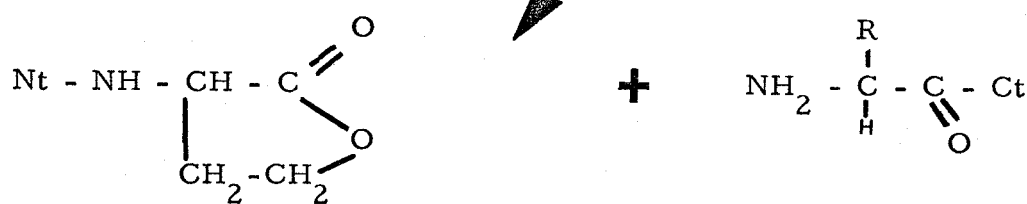
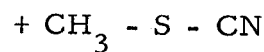


Fig. 4 - Mécanisme de la coupure de la liaison peptidique au niveau de la méthionine par le bromure de cyanogène.

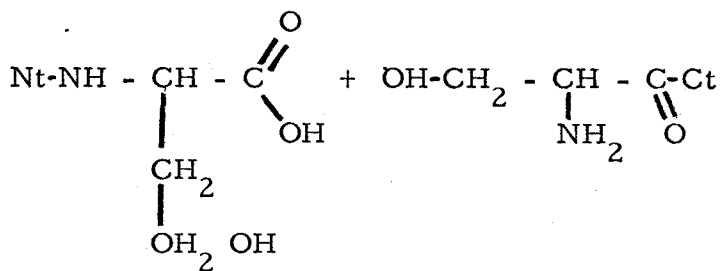
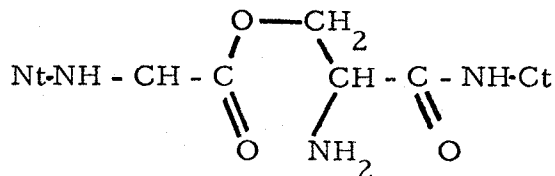
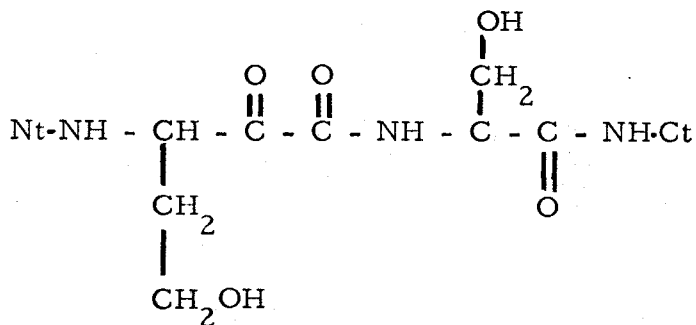
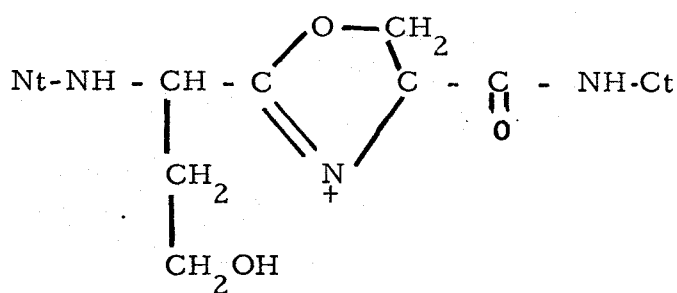
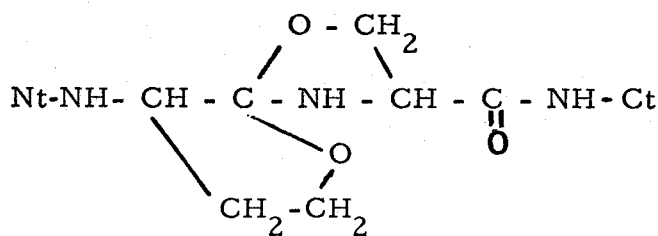
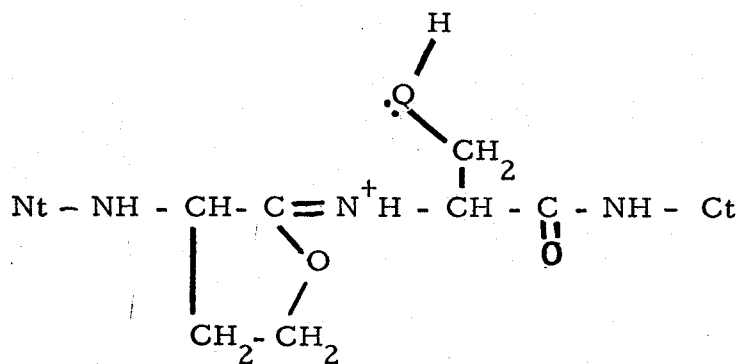


Fig. 5 - Mécanisme d'action du bromure de cyanogène dans le cas d'une liaison Met - Ser ou Met - Thr.

lieu HCl 0,1 N par de l'acide formique 70 p. 100, ce qui permet une réaction complète, même à 25°C, sans réaction secondaire.

## II - DETERMINATION DES MEILLEURES CONDITIONS D'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE SUR L'APOLACTOTRANSFERRINE

### A - MODE OPERATOIRE

L'action du bromure de cyanogène sur l'apolactotransferrine a été réalisée dans des conditions inspirées de celles de STEERS et al. (134).

A une solution d'apolactotransferrine à 1 p. 100 dans de l'acide formique à 70 p. 100, on ajoute une quantité de bromure de cyanogène 200 fois supérieure à la quantité théorique.

Le mélange, placé à l'obscurité et à 25°C, est soumis à une agitation douce pendant des temps de 12, 24 et 48 heures. La réaction est arrêtée par addition de 10 volumes d'eau glacée ; les produits de dégradation du bromure de cyanogène sont ensuite éliminés par évaporation à l'évaporateur rotatif ou par lyophilisation. La cinétique de rupture des liaisons méthionyles a été suivie par étude de la modification de la méthionine en homosérine à l'auto-analyseur Beckman après hydrolyse de lactotransferrine et décyclisation de l'homosérine lactone par la méthode de AMBLER (135).

### B - RESULTATS

L'hydrolyse des acides aminés de la lactotransferrine traitée au bromure de cyanogène pendant des temps variables, montre que la disparition totale de la méthionine est obtenue au bout de 48 h ; la composition des autres acides aminés ne varie pas. Après 24 h, la disparition des résidus de méthionyl n'atteint que 80 p. 100. Nous avons cependant, par la suite, continué à faire agir le bromure de cyanogène pendant 24 h car, d'une part au bout de 48 h, les fragments peptidiques sont très dénaturés et difficiles à solubiliser, et, d'autre part, la coupure partielle des liaisons méthionyles obtenue

après 24 h libère des fragments plus importants, permettant d'envisager la reconstitution de l'enchaînement de fragments CNBr de la lactotransferrine.

### III - ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE TRAITÉE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

Après action du bromure de cyanogène dans les conditions choisies, la présence éventuelle d'homosérine libre a été recherchée et le nombre de fragments obtenus a été déterminé soit par identification des acides aminés situés en position N-terminale, soit par la caractérisation de peptides après séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

#### A - RECHERCHE D'HOMOSERINE OU D'HOMOSERINE LACTONE LIBRES

##### 1) Mode opératoire

L'apolactotransferrine traitée par le bromure de cyanogène a été solubilisée dans une solution d'acide formique 0,1 M ou après maléylation dans du bicarbonate de sodium 0,1 M. Après précipitation de la protéine par addition d'acide acétique, le surnageant obtenu est lyophilisé et étudié à l'auto-analyseur Beckman.

##### 2) Résultats

Le passage d'homosérine et d'homosérine lactone témoins à l'auto-analyseur Beckman a permis de localiser l'emplacement de ces acides aminés sur le diagramme d'élution. Dans les conditions utilisées au Laboratoire, l'homosérine est éluée entre la sérine et l'acide glutamique, alors que l'homosérine lactone est éluée avant la lysine.

L'analyse à l'auto-analyseur de la fraction surnageante obtenue après précipitation de la lactotransferrine traitée par le Br CN, montre qu'il n'existe aucune trace au niveau de l'homosérine ou de l'homosérine lactone.

Ce résultat indique qu'il n'existe probablement pas de liaison Met-Met dans la lactotransferrine.

## B - DETERMINATION DU NOMBRE DE RUPTURE DES LIAISONS METHIONYLES.

La détermination du nombre de liaisons méthionyles coupées a été réalisée par dansylation ou par caractérisation des peptides après électrophorèse en gel de polyacrylamide.

### 1) Dansylation

La dansylation de la lactotransferrine traitée par le BrCN, a été réalisée suivant la méthode de GROS et LABOUESSE (135'), modifiée par PERCY et al. (136), décrite page 92.

Six dérivés dansylés ont été identifiés au dérivé du glycolle, de la sérine, de l'acide aspartique, de la leucine, de la phénylalanine, de l'alanine et parfois de la proline.

La présence de 6 acides aminés situés en position N-terminale laisse supposer que les six résidus de méthionine présents dans la lactotransferrine ont été transformés en homosérine.

D'autre part, l'identification de la sérine en position N-terminale est en faveur de l'existence d'une liaison Met-Ser. Comme cette liaison est difficile à rompre, nous pouvons prévoir l'existence de fragment de lactotransferrine partiellement coupée.

### 2) Séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide

La séparation électrophorétique de la lactotransferrine traitée par le BrCN, avant et après rupture des ponts disulfures par réduction et alkylation, a été réalisée en gel de polyacrylamide en présence de SDS suivant la méthode de NEVILLE (137) décrite à la page 97.

Les résultats obtenus montrent que la lactotransferrine traitée par le BrCN se dissocie en 2 fragments, de masse moléculaire différente, BI et BII (fig. 6, p. 40).

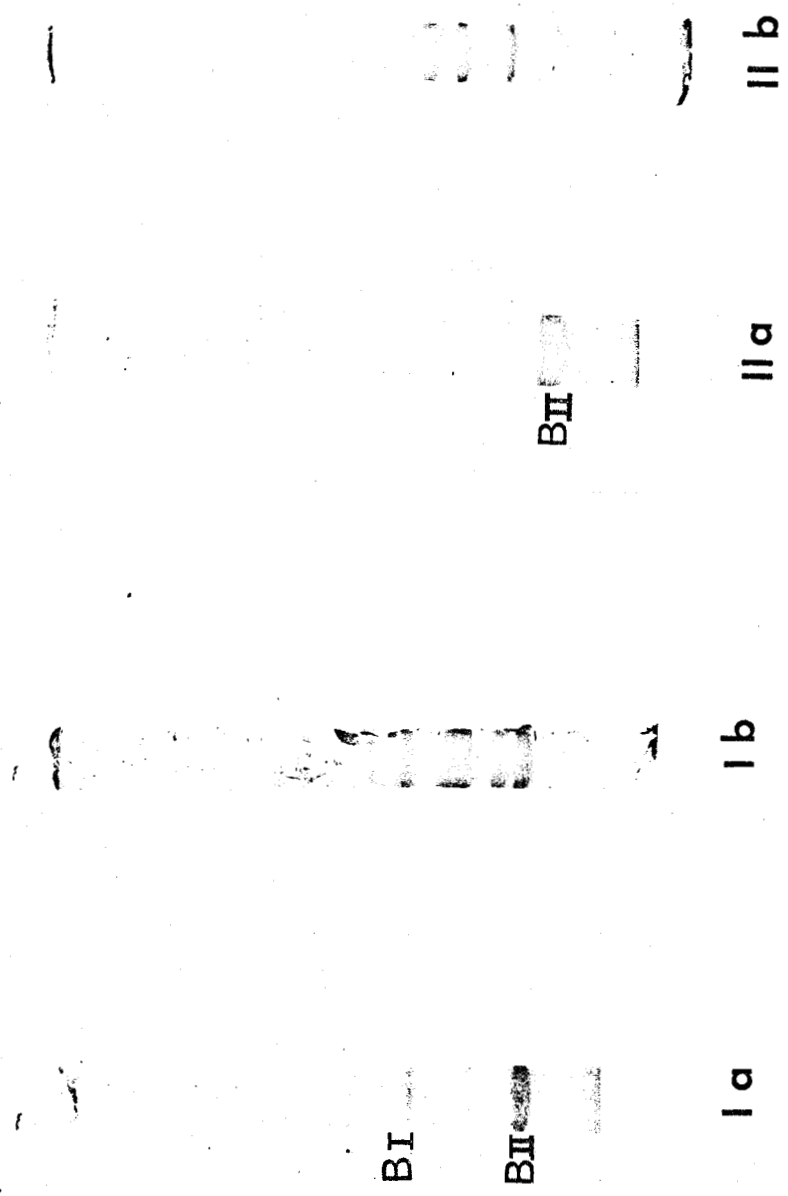


Fig. 6 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de NEVILLE ( 138 ) des fragments CNBr de la lactotransferrine.

I - Mélange total  
a : avant coupure des ponts disulfures  
b : après coupure des ponts disulfures.

II - Fraction C



Après réduction et alkylation, la lactotransferrine traitée par le BrCN se dissocie en 6 fragments peptidiques dont les masses moléculaires approximatives sont de 13, 20, 28, 30, 40 et 60 000.

L'ensemble de ces résultats montre que :

1 - Il n'existe plus de lactotransferrine native ; en effet, aucune bande de protéine possédant une masse moléculaire de 77 000 n'a pu être mise en évidence en gel de polyacrylamide.

2 - De nombreux ponts disulfures donnent à la lactotransferrine une structure compacte et maintiennent entre eux les fragments obtenus après action du bromure de cyanogène.

3 - La rupture des ponts disulfures libère des fragments de masse moléculaire variant de 13 000 à 60 000. Le nombre de peptides obtenus après action du bromure de cyanogène ne peut cependant être fixé avec exactitude ; en effet des peptides de masse moléculaire voisine peuvent posséder la même vitesse de migration et la présence de composé de masse moléculaire élevée peut s'expliquer par une coupure partielle de la liaison Met-Ser.

#### IV - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE TRAITÉE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

La séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide de la lactotransferrine traitée par le BrCN a montré l'existence de 2 fragments de masse moléculaire différente, que nous avons cherché à fractionner, sur colonne de Biogel P 100, dans les conditions décrites page 88.

##### A - FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE BIOGEL P 100

Le diagramme d'éluion enregistré, après tamisage moléculaire de la lactotransferrine traitée au BrCN sur colonne de Biogel P100, est donné dans la fig. 7, page 42.

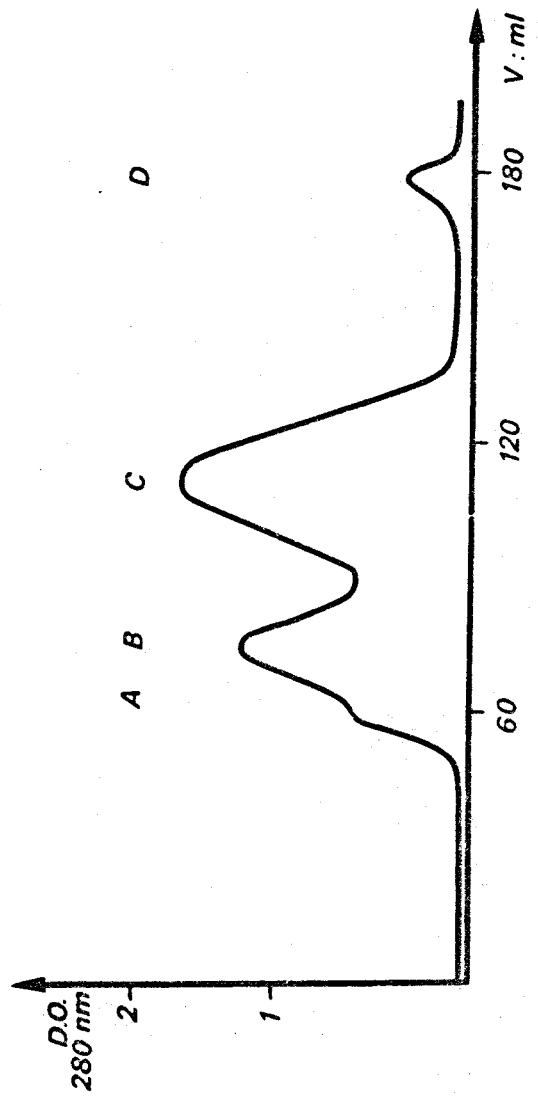


Fig. 7 - Fractionnement de l'apolactotransferrine traitée par le BrCN sur colonne de Biogel P 100  
L'éluion de la colonne est réalisée par une solution d'acide formique 0,1 M.





L'analyse de ce diagramme montre que 4 fractions peuvent être obtenues. Les trois premières fractions A, B et C, assez mal séparées entre elles, se différencient nettement de la fraction D qui possède une masse moléculaire plus faible et qui est éluée beaucoup plus tardivement.

Chacune de ces fractions a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et les acides aminés N-terminaux ont été identifiés par la méthode de dansylation.

#### 1) Etude de la fraction A

La fraction A représente 5 p. 100 du poids total de la lactotransferrine traitée au BrCN, cette fraction est éluée au volume mort de la colonne; après solubilisation et recyclage de cette fraction sur colonne de Biogel P 100 dans les mêmes conditions on obtient un diagramme d'éluion identique à celui obtenu à partir de la lactotransferrine totale, traitée au BrCN. La fraction A peut donc être considérée comme formée d'aggrégats, cette fraction a été éliminée par la suite.

#### 2) Etude de la fraction B

La fraction B représente 10 p. 100 de la lactotransferrine traitée au BrCN. Cette fraction se révèle homogène en gel de polyacrylamide. La bande protéique obtenue possède une vitesse de migration très voisine de celle de la lactotransferrine totale.

Après rupture des ponts disulfures par oxydation performique, la fraction B se dissocie en gel de polyacrylamide en 6 fragments peptidiques.

La dansylation de la fraction B permet l'identification des mêmes dansyls amino-acides que ceux obtenus à partir de la lactotransferrine totale traitée au BrCN, à l'exception du dansyl-sérine qui a disparu de la fraction B. La disparition du dansyl-sérine indique que la fraction B correspond à de la lactotransferrine partiellement coupée par le BrCN.

### 3) Etude de la fraction C

La fraction C représente la fraction majeure de la lactotransferrine traitée par le BrCN, soit 70 p. 100. En gel de polyacrylamide, cette fraction C migre sous forme d'une seule bande protéique qui correspond à la bande B II obtenue à partir de la lactotransferrine totale traitée au BrCN (fig. 6, p. 40).

La dansylation de cette fraction C conduit à l'identification de tous les dansyls amino-acides présents dans la lactotransferrine totale traitée au BrCN à l'exception du dansyl-alanine que nous retrouverons dans la fraction D.

Après rupture des ponts disulfures par oxydation performique, la fraction C se dissocie, en gel de polyacrylamide, en trois fragments peptidiques, d'une masse moléculaire approximative de 10 à 13 000 ; 18 à 20 000 et de 25 000.

L'analyse des acides aminés N-terminaux montre que la fraction C est constituée d'au moins 6 fragments peptidiques reliés par des ponts disulfures, seuls trois d'entre eux sont identifiés en gel de polyacrylamide.

### 4) Etude de la fraction D

La fraction D correspond à 2 p. 100 de la fraction de lactotransferrine traitée au BrCN. Cette fraction possède une masse moléculaire très faible ; ceci explique son élution au volume total de la colonne de Biogel et l'absence de révélation par le bleu de Coomassie en gel de polyacrylamide.

La pureté de la fraction a été étudiée par électrophorèse sur papier dans le tampon de MICHL (139) à pH 3,9 et par la méthode de dansylation de HARTLEY (140).

Les résultats obtenus montrent que la fraction D donne, dans la zone neutre, une tache majeure révélée au réactif à la ninhydrine après électrophorèse sur papier. L'identification d'un seul dansyl-amino-acide correspondant à l'alanine confirme l'homogénéité de cette fraction qui a été appelée, par la suite, fragment FVII. Sa composition en acides aminés sera précisée plus loin.

## B - CONCLUSIONS

La filtration sur colonne de Biogel P 100 de la lactotransferrine traitée au BrCN permet d'éliminer dans un premier temps les fractions A et B constituées d'aggrégats et de lactotransferrine partiellement modifiée.

Les faibles quantités de fraction D récupérées ne nous ont pas permis d'approfondir son étude ; seule la fraction C a été soumise à une analyse poussée. Nous détaillerons, dans un premier temps, quelques unes de ses propriétés physico-chimiques; puis, dans un autre chapitre, nous décrirons les méthodes de fractionnement utilisées pour séparer les 6 fragments peptidiques présents dans cette fraction, après rupture des ponts disulfures.

ETUDE DES PROPRIETES DE LA FRACTION C  
ET SEPARATION DE SES CONSTITUANTS

Avant d'aborder la séparation chromatographique des 6 fragments présents dans la fraction C, nous avons essayé de mieux définir cette fraction en comparant, d'une part, ses propriétés immunologiques et sa capacité de fixation du fer avec celles de la lactotransferrine et d'autre part, en étudiant sa masse moléculaire et sa composition en acides aminés et en monosaccharides.

I - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE LA FRACTION C

La fraction C difficilement soluble a d'abord été maléylée et ses propriétés immunologiques ont été comparées avec celles de la lactotransferrine maléylée.

A - MODE OPERATOIRE

L'immunoélectrophorèse et l'immunodiffusion de la fraction C et de la lactotransferrine maléylées suivant la méthode de ITANO et al. (141) (p. 86) ont été réalisées en présence d'un sérum de Lapin anti-lactotransferrine native. Nous avons employé la micro-méthode d'immunoélectrophorèse de SCHEIDEGGER (142) sur plaques de gélose, et la méthode d'immunodiffusion décrite par OUCHTERLOONY (143). Le sérum antilactotransferrine a été préparé, au Laboratoire, à partir de nos propres préparations de lactotransferrine.

B - RESULTATS

Les résultats obtenus par immunoélectrophorèse et immunodiffusion de la fraction C et de la lactotransferrine sont donnés dans

la fig. 8 , (page 48).

Nous pouvons remarquer que la migration électrophorétique de la lactotransferrine maléylée est beaucoup plus rapide que celle de la lactotransferrine native, mais que ses propriétés immunologiques ne semblent pas modifiées.

En immunoélectrophorèse, la fraction C forme un arc de précipitation parfois dédoublé ; son comportement est légèrement moins anodique que celui de la lactotransferrine native maléylée.

L'analyse en immunodiffusion radiale double (fig. 8, p. 48) de la fraction C montre qu'elle forme un arc de précipitation avec le sérum antilactotransferrine humaine native. Nous pouvons donc dire que la fraction C possède au moins un déterminant antigénique de moins que la lactotransferrine native.

Plusieurs explications peuvent être suggérées :

- Les techniques employées sont limitées et l'absence d'arc de précipitation n'implique pas nécessairement l'absence d'un antigène.

- Les déterminants antigéniques de la lactotransferrine peuvent avoir été dénaturés soit lors de l'action du BrCN, soit lors de la maléylation.

## II - CAPACITE DE FIXATION DU FER DE LA FRACTION C

La fraction C, difficilement soluble, a d'abord été maléylée et ses propriétés de fixation du fer ont été comparées avec celles de la lactotransferrine maléylée.

### A - MODE OPERATOIRE

La lactotransferrine renfermant 1,25 p. 1000 de fer et la fraction C ont d'abord été maléylées suivant la méthode de ITANO et al. (144) décrite à la page 90.

Les saturations en fer de la lactotransferrine et de la fraction C maléylées ont été ensuite réalisées suivant la méthode décrite par SPIK (145) en présence du tampon citrate, bicarbonate de so-

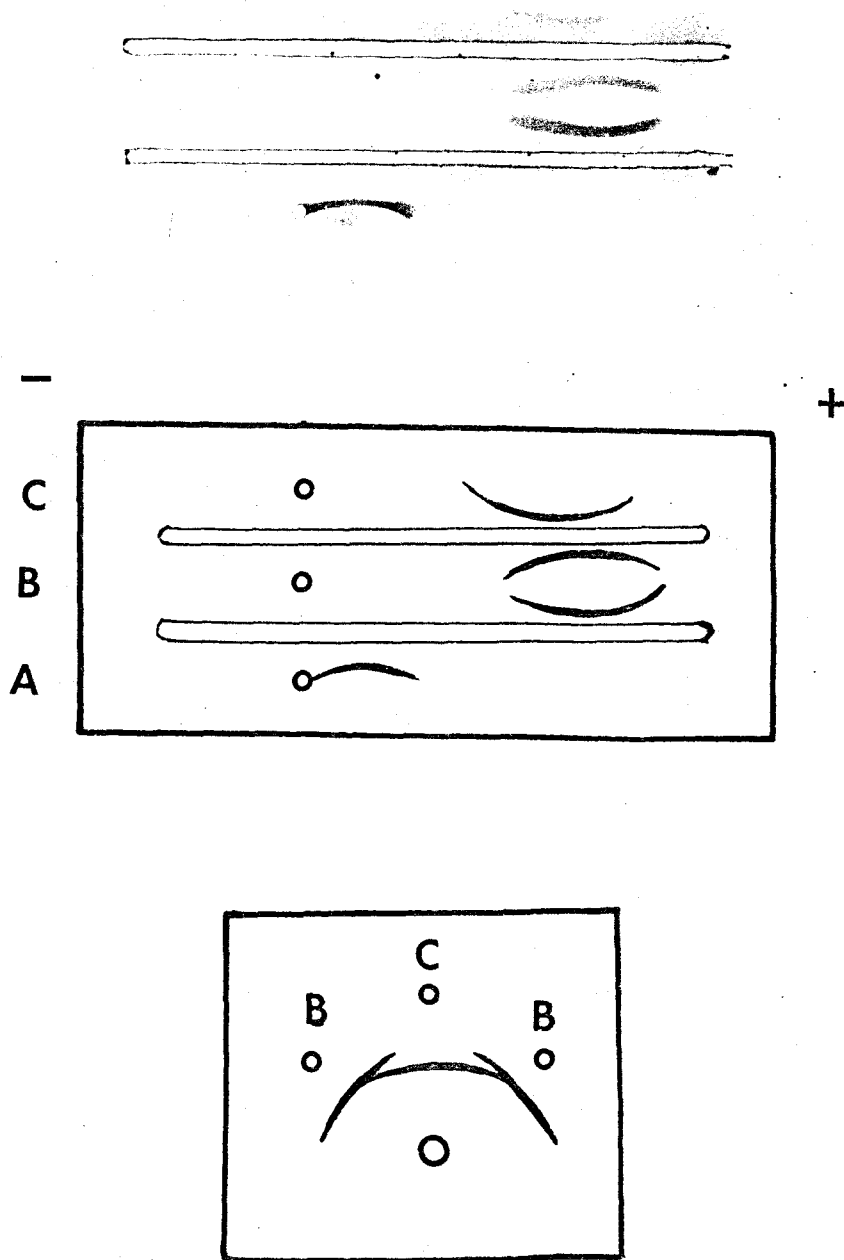


Fig. 8 - Immunoélectrophorèse et immunodiffusion de la lactotransferrine native(A), de la lactotransferrine traitée au BrCN et maléylée(B) et de la fraction C maléylée(C)



dium 0,2 M de pH 8,6 et de chlorure ferrique. La fixation spécifique du fer se traduit par une augmentation de la densité optique à 460 nm qui prend une valeur maximale de 0,53 pour une solution saturée de protéine à 1 p. 100.

Cette augmentation de la densité optique est proportionnelle au nombre d'atomes de fer fixé. La mesure de la densité optique à 460 nm permet donc lors de l'addition de quantité croissante de fer à la protéine désaturée, de déterminer le nombre d'atomes de fer que la protéine fixe spécifiquement.

## B - RESULTATS

La lactotransferrine native, après maléylation, fixe deux atomes de fer; le spectre d'absorption du complexe formé présente un maximum d'absorption à 450 nm voisin de celui obtenu à partir de la lactotransferrine native qui présente un maximum d'absorption à 460 nm. Le coefficient d'absorption molaire de l'apolactotransferrine maléylée saturée en fer est égal à  $2,8 \times 10^3$  et est inférieur à celui obtenu à partir de l'apolactotransferrine native :  $3,3 \times 10^3$ . L'addition de fer à la fraction C maléylée provoque une légère augmentation de l'absorption à 450 nm mais cette augmentation n'est pas proportionnelle à la quantité de fer ajoutée.

## C - CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats obtenus, en accord avec ceux de BUTTKUS et al. (146), montre que les résidus de lysine de la lactotransferrine totale ne doivent pas intervenir dans la fixation du fer, car la maléylation de ces résidus conduit à une légère diminution de la formation du complexe coloré due fort probablement à une modification de la conformation de la protéine après maléylation. La fraction C maléylée a perdu la capacité de former un complexe coloré lors de l'addition de sels ferriques.

### III - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FRACTION C

#### A - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

La masse moléculaire de la fraction C a été déterminée par ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation.

##### 1) Mode opératoire

L'équilibre de sédimentation de la fraction C après maléylation a été réalisée en milieu chlorhydrate de guanidine 6 M suivant la méthode d'YPHANTIS (147) décrite page 95.

##### 2) Résultats

La valeur de la masse moléculaire de la fraction C déterminée à l'équilibre de sédimentation est de 38 000.

Cette valeur de 38 000 est surprenante si l'on considère que la fraction C est constituée par tous les fragments présents dans la lactotransferrine, mais peut s'expliquer si l'on considère que l'action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine a permis la libération de deux sous-unités peptidiques de masse moléculaire voisine de 38 000.

#### B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA FRACTION C

L'hydrolyse de la fraction C montre que la composition en acides aminés de la fraction C est très peu différente de la composition en acides aminés de la lactotransferrine traitée au BrCN -(tableau V, p. 52 ).

L'hydrolyse de la fraction C révèle la présence de 5 résidus d'homosérine, ce résultat est en accord avec la mise en évidence par dansylation de 5 acides aminés situés en position N-terminale, le sixième possédant sa fonction  $\alpha\text{-NH}_2$  bloquée.

#### C - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DE LA FRACTION C

Les compositions centésimale et molaire des monosaccha -



rides de la fraction C sont déterminées dans les conditions classiques. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI, page 53.

L'étude comparée des compositions centésimale et molaire en monosaccharides de la fraction C avec celles de la lactotransferrine native et celles de la lactotransferrine traitée par le BrCN montre très peu de différence. Nous ne constatons que la perte d'un résidu de fucose et d'un résidu d'acide N-acétyl-neuraminique. La perte du résidu d'acide sialique est vraisemblablement consécutive à l'action du Br CN, IKENAKA et al. (148) et BEZKOROVANY et al. (149) ont constaté de même que l'action du BrCN, réalisée en milieu acide sur des glycoprotéines, provoquait la perte d'un ou plusieurs résidus d'acide N-acétyl-neuraminique.

La perte du résidu de fucose peut certes, elle aussi, être imputée à l'action du BrCN; cependant, les deux glycopeptides tryptiques isolés par SPIK et al. (150) à partir de la lactotransferrine renferment aussi un seul résidu de fucose.

#### IV - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION C

Comme nous venons de le voir (p. 50), la fraction C est constituée de deux sous-unités peptidiques de masse moléculaire voisine de 38000, chacune de ces sous-unités est constituée de fragments reliés par des ponts disulfures. Nous avons cherché à séparer les 6 constituants de la fraction C, après coupure des ponts disulfures, en combinant les techniques de chromatographie, d'échange d'ions, et de tamisage moléculaire. Dans ce chapitre, nous exposons le fractionnement que nous avons utilisé et les raisons qui nous ont amené à choisir ce type de fractionnement.

##### A - MODE OPERATOIRE

###### 1) Rupture des ponts disulfures

La rupture des ponts disulfures a été réalisée par oxydation performique, suivant la méthode de HIRS (151), décrite page 89.

TABLEAU V - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA LACTO-  
TRANSFERRINE TRAITÉE PAR LE BrCN ET DE LA FRACTION C  
OBTENUE APRES ACTION DU BrCN ET FILTRATION SUR COLON-  
NE DE BIOGEL P 100

: Nature des acides	: LTF-BrCN	: Fraction C
: aminés	:	:
: Asp	: 70	: 72
: Thr	: 29	: 32
: Ser	: 46	: 44
: HSer	: 6	: 5
: Glu	: 66	: 66
: Pro	: 27	: 30
: Gly	: 51	: 51
: Ala	: 60	: 60
: 1/2 Cys	: 26	: 28
: Val	: 35	: 34
: Met	: -	: -
: Ile	: 12	: 13
: Leu	: 54	: 54
: Tyr	: 20	: 20
: Phe	: 31	: 31
: Lys	: 41	: 41
: His	: 8	: 8
: Arg	: 41	: 40



TABLEAU VI - COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE  
EN MONOSACCHARIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE TRAI-  
TEE AU BrCN ET DE LA FRACTION C

Composition en oses	LTF	LTF BrCN	Fraction C
<u>Composition centésimale</u>			
Monosaccharides neutres	3,11	3,20	3,08
Hexosamines	2,00	2,15	2,09
<u>Composition molaire<sup>(x)</sup></u>			
Mannose	6	6	6
Galactose	5	4	4
Fucose	3	2	2
N-acétyl-glucosamine	8	8	8
Acide N-acétyl-neurami- nique	3	2	2

(x) Les compositions molaires sont calculées pour une masse moléculaire de 76 000 pour la lactotransferrine native et la fraction C.



2) Séparation chromatographique de la fraction C oxydée par l'acide performique

La filtration sur gel de la fraction C oxydée et maléylée a été réalisée sur colonnes de Biogel P60 et P150 dans les conditions décrites page 88.

La chromatographie sur échangeurs d'ions a été réalisée sur colonne de DEAE-Sephadex A50 en présence d'urée 4M. L'élution de la colonne se fait dans les conditions décrites page 88.

B - RESULTATS

La séparation par chromatographie d'échange d'ions des deux sous-unités peptidiques de la fraction C non modifiée a été impossible, les deux sous-unités s'éluant presque simultanément, quel que soit le type de gel et les gradients de pH et de force ionique utilisés.

1) Tamisage moléculaire de la fraction C après rupture des ponts disulfures

Après rupture des ponts disulfures par oxydation performique et après maléylation, la fraction C est chromatographiée sur une colonne de Biogel P60 ou P100.

L'examen du profil d'élution obtenu (fig. 9, p. 55) montre que la séparation des 6 fragments est mauvaise, une purification plus poussée nécessite de nombreux recyclages, ce qui entraîne des rendements très faibles. Cette méthode a été abandonnée et remplacée par une chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A50.

2) Chromatographie d'échange d'ions de la fraction C après rupture des ponts disulfures

Le repérage des protéines (fig. 10, p. 56) en lumière ultraviolette permet de mettre en évidence trois fractions principales dénommées CI, CII et CIII, après chromatographie de la fraction C sur colonne de DEAE-Sephadex dans les conditions décrites page 88. Ces trois fractions sont obtenues dans les proportions suivantes :

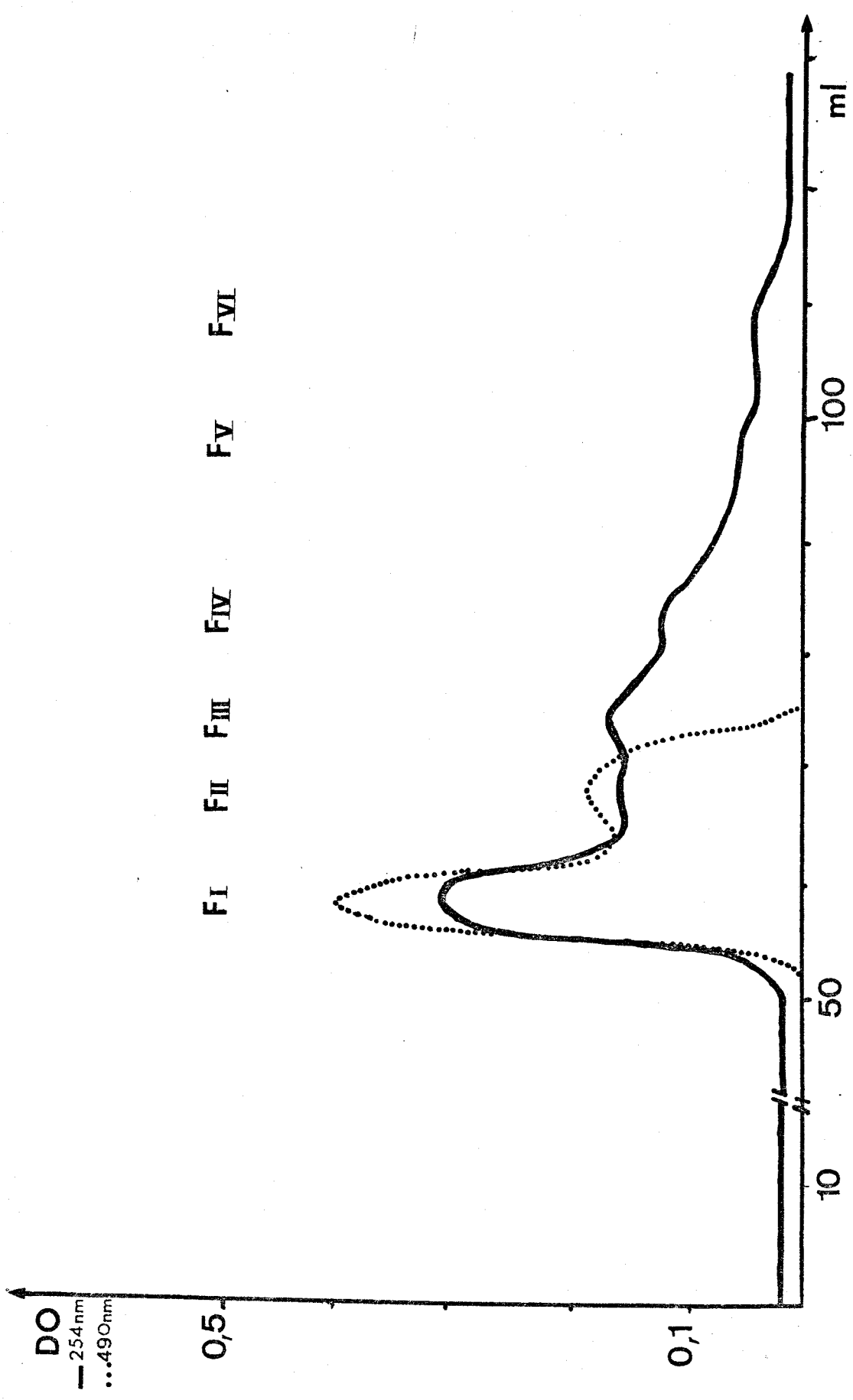


Fig. 9 - Tamisage moléculaire sur colonne de Biogel P60 de la fraction C après oxydation performique et maléylation.

L'éluion de la colonne est réalisée par un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.



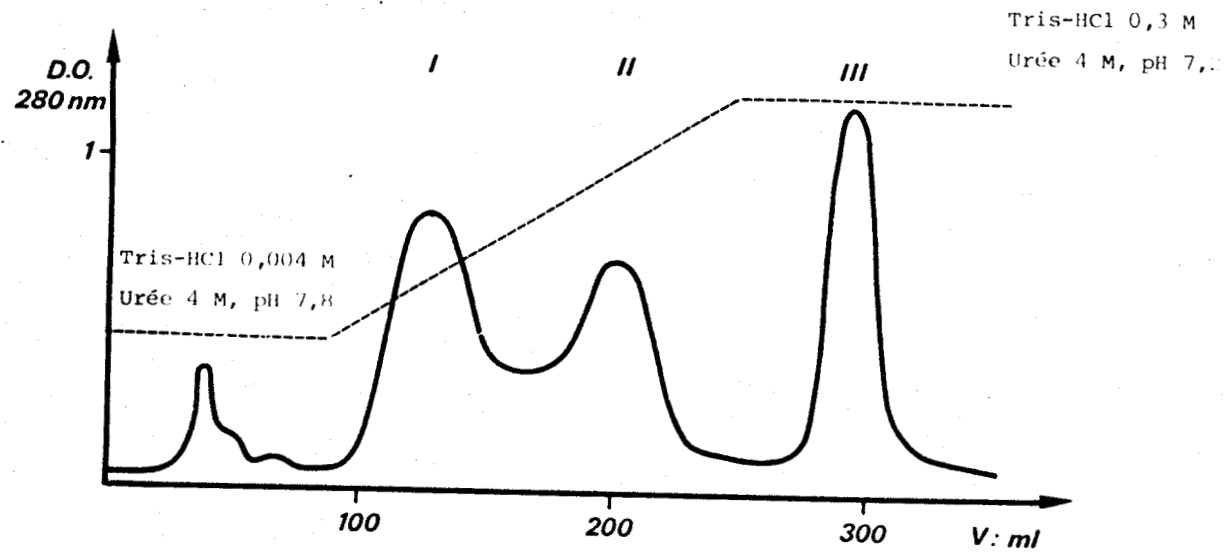


Fig. 10 - Fractionnement sur colonne de DEAE-Sephadex A50 de la fraction C après oxydation performique.

L'élution est réalisée par un gradient de force ionique et de pH d'un tampon de Tris, HCl urée 4 M de 0,004 M, pH 7,8 à 0,3 M pH 7,2.



20 p. 100 pour la fraction CI, 30 p. 100 pour la fraction CII et 45 p. 100 pour la fraction CIII.

Le repérage des monosaccharides par le réactif au phénol sulfurique permet de mettre en évidence une fraction glucidique majeure correspondant à la fraction CIII.

### C - CONCLUSIONS

La fraction C est constituée de six fragments qu'il est difficile de séparer par tamisage moléculaire.

La chromatographie d'échange d'ions permet d'obtenir cependant trois fractions dénommées CI, CII, CIII. La fraction CIII est de nature glycopeptidique.

## V - PURIFICATION PAR TAMISAGE MOLECULAIRE DES CONSTITUANTS

### CI, CII, et CIII OBTENUS A PARTIR DE LA FRACTION C OXYDEE

Nous avons essayé d'obtenir la séparation totale des six fragments de la fraction C par chromatographie d'échange d'ions, par l'emploi d'un autre gradient d'élution, mais cette modification entraîne l'élution d'un nombre de pics supérieur au nombre de fragments présents, chaque peptide s'élue en plusieurs endroits. Cette multiplicité de forme pour un peptide bromure de cyanogène a déjà été constatée par COZZONE (152) et peut s'expliquer par l'isomérisation homosérine -homosérine lactone, par la désamination non sélective de résidus d'asparagine ou de glutamine et par la plus ou moins grande dénaturation des fragments. Nous avons donc choisi de poursuivre le fractionnement en soumettant ces trois fractions CI, CII, CIII, au tamisage moléculaire.

### A - MODE OPERATOIRE

Nous avons fractionné les trois constituants sur des colonnes de Biogel P60 ou de Séphadex G 50 dans les conditions décrites page 88

## B - RESULTATS

### 1) Etude de la fraction CI

Cette fraction est insoluble en milieu basique comme en milieu acide. Afin d'éviter de travailler en présence de dénaturant comme le chlorhydrate de guanidine, l'acide propionique ou de détergent comme le SDS très difficile à éliminer, nous avons préféré solubiliser cette fraction en la maléylant, suivant les conditions décrites page 90. La fraction maléylée dissoute dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M est ensuite chromatographiée sur colonne de Biogel P60. Le diagramme d'éluion est représenté dans la figure 11, p. 59. Cette fraction se subdivise en trois sous-fractions dénommées CIa, CIb, CIc.

La sous-fraction CIa réagit positivement au phénol sulfurique, possède du glycolle en position  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminale.

La sous-fraction CIb, la plus importante, paraît homogène après repurification sur la même colonne de Biogel P60. Elle a été appelée fragment FIII.

La sous-fraction CIc possède de la sérine en position N-terminale, il s'agit d'une contamination de la fraction CII.

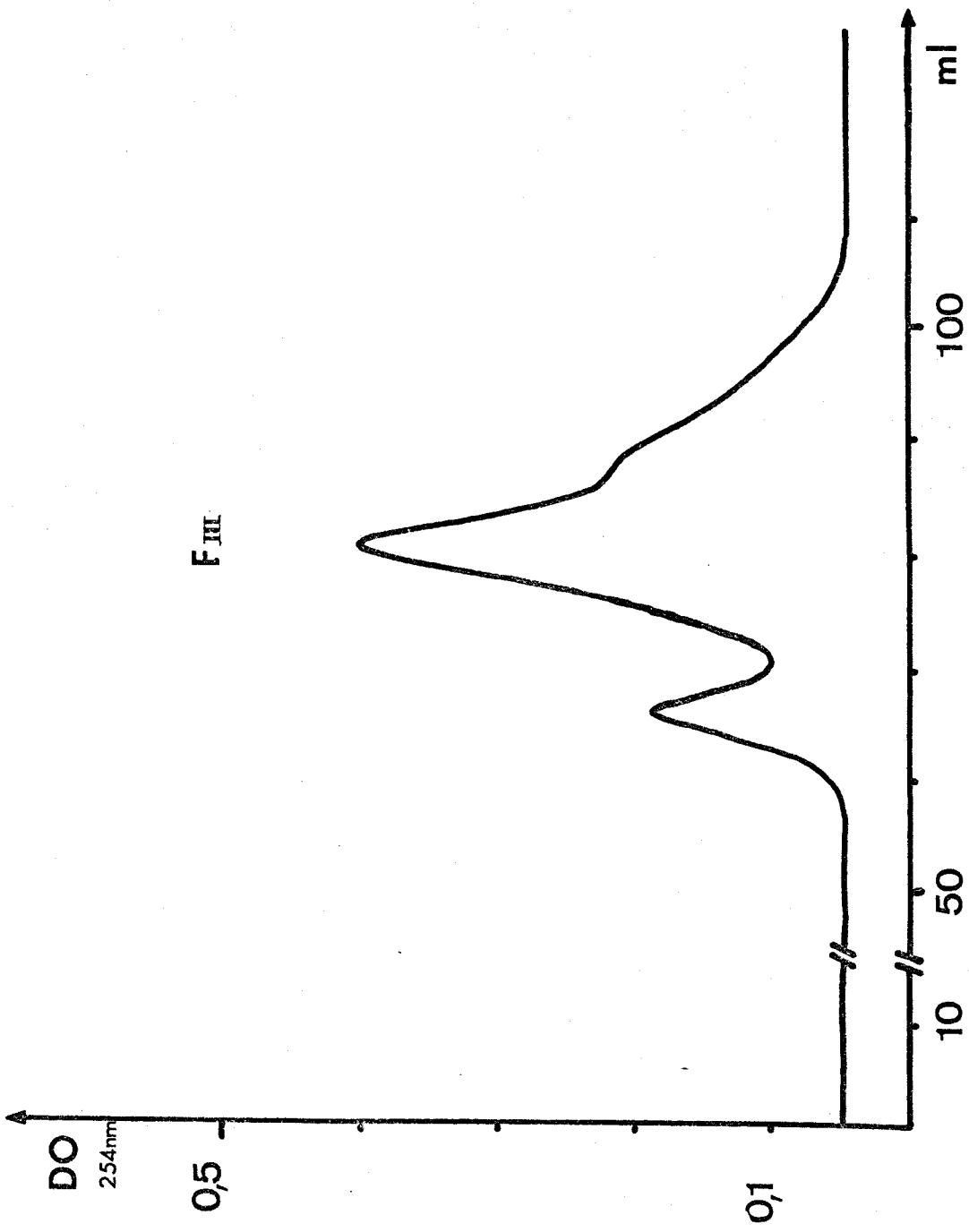
Le fragment FIII ainsi purifié est obtenu avec un faible rendement (15 p. 100). Nous avons constaté qu'il s'absorbait sur les gels et en particulier sur les Séphadex.

### 2) Etude de la fraction CII

La fraction CII est soluble dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M ; néanmoins, avant d'effectuer la chromatographie sur colonne de Séphadex G50, nous la maléylons pour éviter les phénomènes d'absorption. Le diagramme d'éluion représenté sur la figure 12, page 60, montre la dissociation de la fraction CII en quatre sous-fractions CIIa, CIIb, CIIc et CIId.

La sous-fraction CIIa représente 5 p. 100 de la fraction injectée ; elle est très hétérogène et formée d'aggrégats, elle a été éliminée par la suite.





FR

Fig. 11 - Fractionnement sur colonne de Biogel P60 de la fraction CI.  
Les conditions d'élution sont les suivantes : colonne de 1,5 x 120' cm ; débit 6 ml/h ; tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.



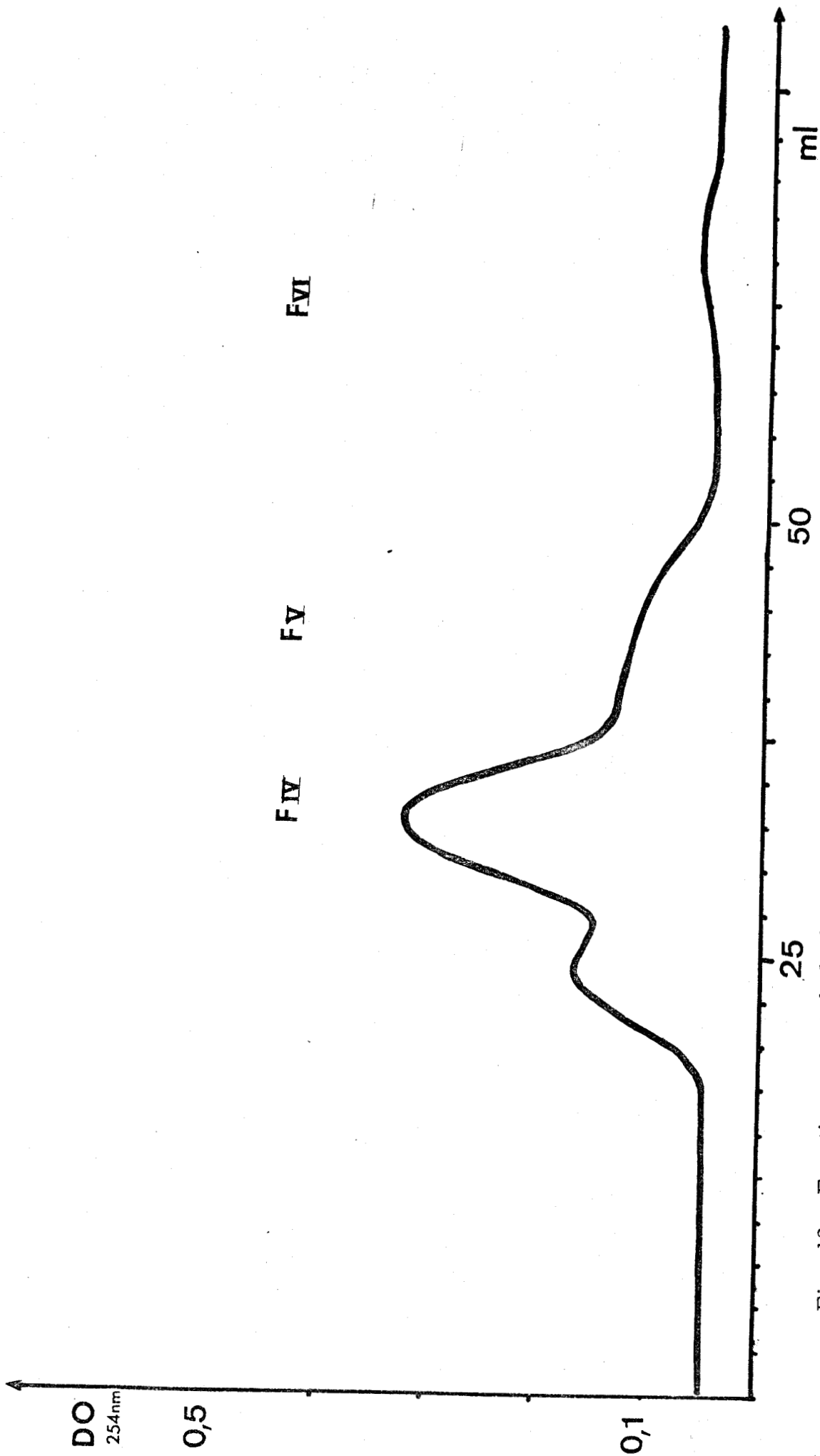


Fig. 12 - Fractionnement de la fraction CII sur colonne de Sephadex G50.

Les conditions d'élution sont les suivantes : colonne de 1 x 80 cm ; débit 8 ml/h ; tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.



La sous-fraction CIIb chromatographiée sur la même colonne donne un pic unique que nous appelons fragment F IV. Ce fragment est obtenu avec un rendement de 50 p. 100.

La sous-fraction CIIc rechromatographiée dans les mêmes conditions, avec un rendement de 50 p. 100, conduit à une fraction homogène appelée fragment FV.

La sous-fraction CIII d, homogène, a été appelée fragment FVI. Ce fragment a été obtenu avec un rendement de 30 p. 100.

### 3) Etude de la fraction CIII

Cette fraction très soluble en milieu basique a été purifiée sur colonne de Biogel P60. Le diagramme d'élution montre (fig. 13, p. 62) la présence de deux pics bien séparés et appelés respectivement fragments FI et FII. Les fragments FI et FII rechromatographiés dans les mêmes conditions se révèlent être homogènes. Ils réagissent tous deux avec le réactif au phénol-sulfurique, il s'agit donc de deux fragments de nature glycopeptidique.

## C - CONCLUSIONS

Nous avons séparé, en combinant les techniques de chromatographie d'échange d'ions et de tamisage moléculaire, les six fragments de la fraction C avec un rendement et une pureté satisfaisante pour entreprendre l'étude de leurs propriétés physico-chimiques.

Dans le tableau VII, p. 63, nous avons résumé les différentes techniques utilisées pour obtenir l'ensemble des 7 fragments (FI à FVII) obtenus par action du BrCN sur la lactotransferrine.

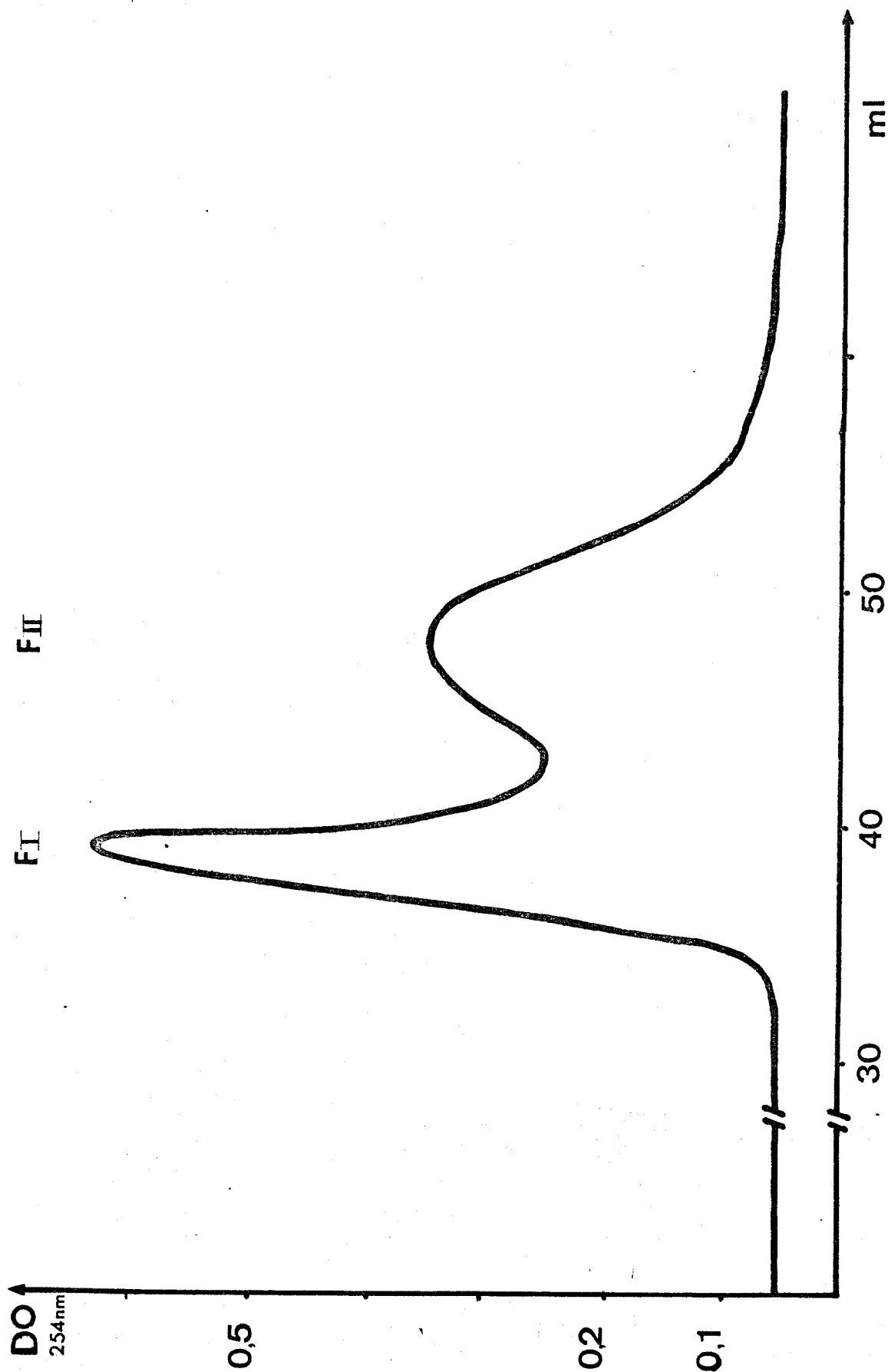


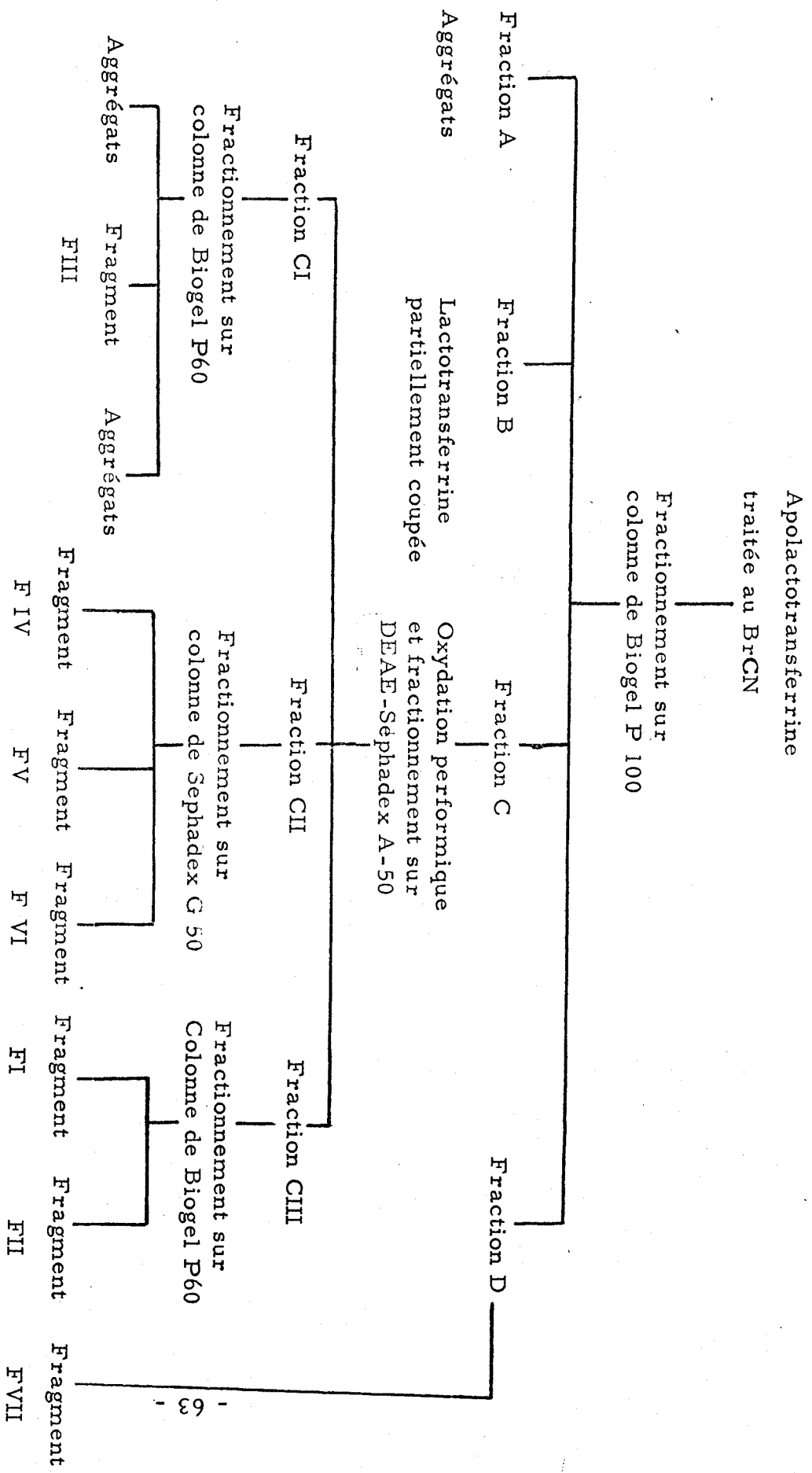
Fig. 13 - Fractionnement de la fraction CIII sur colonne de Biogel P60.

Les conditions d'élution sont les suivantes : colonne de 1,5 x 120 cm ; débit 6 ml/h ; tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.





TABEAU VII - RESUME DES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ISOLEMENT DES SEPT FRAGMENTS (F I à F VII) OBTENUS PAR TRAITEMENT DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LE BrCN



PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEPT FRAGMENTS  
OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ET RUPTURE DES PONTS  
DISULFURES DE LA LACTOTRANSFERRINE.

Les propriétés physico-chimiques des 7 fragments (FI à FVII) obtenus par gel filtration et par chromatographie d'échange d'ions de la lactotransferrine traitée au BrCN et oxydée par l'acide performique ont été analysées.

La masse moléculaire, la nature des acides aminés N-et C-terminaux, la composition en acides aminés, en monosaccharides de chacun de ces fragments ont été déterminées après vérification de leur homogénéité par électrophorèse en gel de polyacrylamide, par dansylation et par chromatographie de tamisage moléculaire.

I - ETUDE DE LA MASSE MOLECULAIRE DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES

Les 7 fragments peptidiques possèdent des masses moléculaires très variables comprises entre 2000 et 25000; aussi, les techniques utilisées pour déterminer avec précision ces masses moléculaires varient avec la taille du fragment peptidique étudié.

A - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION

Par ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation les masses moléculaires peuvent être déterminées avec une précision de 5 p. 100 pour des valeurs supérieures à 10000. C'est pourquoi, seuls les fragments FI, FII, FIII, FIV ont été soumis à l'ultracentrifugation.

1) Mode opératoire

La méthode de détermination des masses moléculaires par

ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation est décrite page 95

## 2) Résultats

Les masses moléculaires obtenues sont données dans le tableau VIII (p. 68).

Le fragment FI a la plus grande masse (24 000) alors que les fragments FIII et FIV donnent le même résultat (10 000). La valeur 18000, de la masse moléculaire du fragment FII est intermédiaire.

## B - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide de protéines réduites, existant sous la forme d'une chaîne polypeptidique étirée grâce à la présence de SDS, permet dans les conditions décrites par NEVILLE (153), de déterminer des masses moléculaires comprises entre 100 000 et 15 000 avec une précision de 5 p. 100. La présence de groupements polysaccharidiques entraîne cependant une modification de la vitesse de migration de la fraction glycopeptidique et est à l'origine de causes d'erreur dans la détermination de leur masse moléculaire.

Seules les masses moléculaires des fragments FI, FII, FIII et FIV ont été déterminées par cette méthode.

### 1) Mode opératoire

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été réalisée dans les conditions décrites page 97.

### 2) Résultats

Dans la fig. 14, p. 66, sont représentés les électrophorogrammes des fragments FI, FII et FIII. Il est à noter que les fragments étudiés sont difficilement révélables par les colorants des protéines tels que le réactif à l'Amidoswartz et le bleu de coomassie.

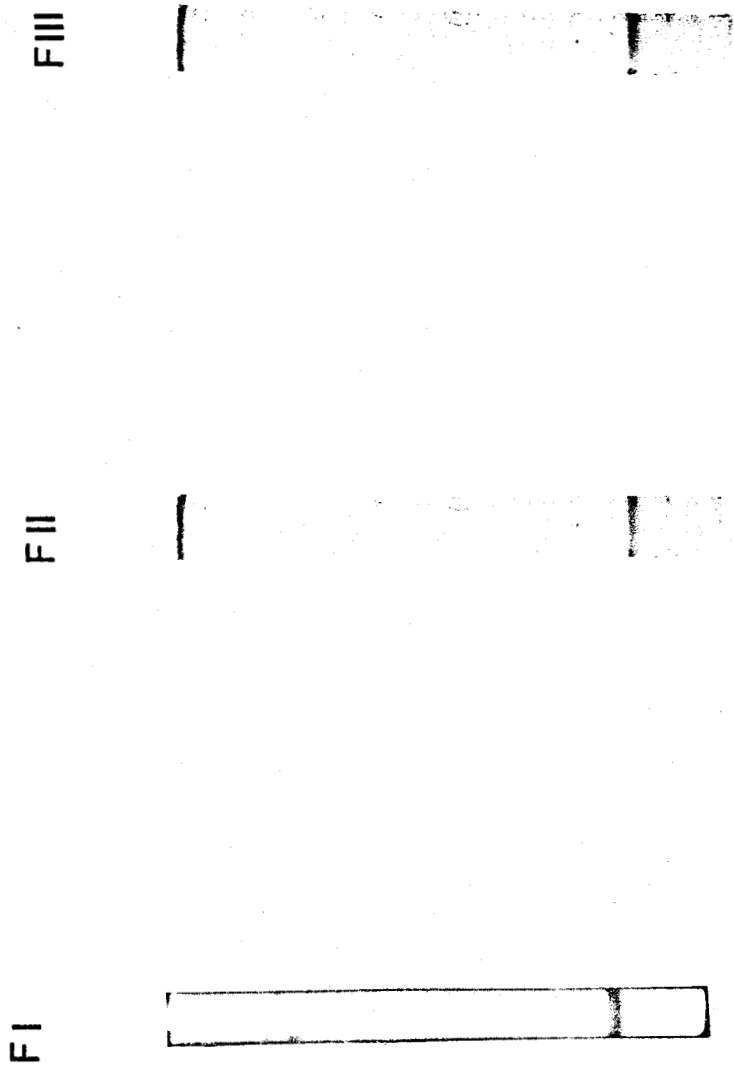


Fig. 14 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de fragments FI, FII, FIII, obtenus à partir de la lactotransferrine traitée au BrCN et oxydée par l'acide performique.





Les valeurs de masses moléculaires calculées d'après la migration électrophorétique sont rassemblées dans le tableau VIII, p. 68. La valeur (24000) obtenue pour le fragment FI confirme le résultat obtenu par ultracentrifugation. La valeur (10 à 13000) donnée pour le fragment FIV est peu précise car la taille de ce fragment le situe dans une zone où des écarts notables de la masse moléculaire n'entraînent que de faibles variations de  $R_f$  (page 100).

### C - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE

La masse moléculaire des fragments FV, FVI, et FVII n'a pu être déterminée par les méthodes précédemment décrites. Nous avons mesuré les masses moléculaires des fragments par chromatographie de gel filtration dans des conditions telles que l'élution de la molécule soit proportionnelle à la longueur de la chaîne peptidique.

#### 1) Mode Opératoire

La méthode que nous avons mise au point est décrite page 101. Elle permet de déterminer des masses moléculaires comprises entre 3000 et 15000.

#### 2) Résultats

Les résultats obtenus par cette méthode sont indiqués dans le tableau VIII, p. 68.

Le fragment FVII étant élué au volume total de la colonne, nous n'avons pu préciser sa masse moléculaire, mais nous pouvons dire qu'elle est inférieure à 2000.

### D - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE D'APRES LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

En déterminant la composition en acides aminés sur la base d'un résidu d'acide aspartique ou d'un résidu d'alanine, nous avons pu calculer la masse moléculaire du fragment FVII qui, comme le

TABLEAU VIII - MASSE MOLECULAIRE DES SEPT FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION DU BrCN SUR LA

LACTOTRANSFERRINE

Fragments	Vsp. (x)	VALEURS DES MASSES MOLECULAIRES				
		Electrophorèse	Tamissage	Composition : en acides aminés	Composition : en monosaccha	Composition : en hexosamines
F I	0,714	24 000	24 000	23 200	21 000	24 000
F II	0,711	18 000	20 000	17 034	17 000	20 000
F III	0,724	10 000	13 000	15 000		
F IV	0,724	10 000	10 - 13 000	10 039		
F V				5 500	5 629	
F VI				3 500	3 940	
F VII				2 000	1 468	

(x) Volume spécifique partiel calculé d'après la composition en acides aminés.



montre la chromatographie de tamisage moléculaire, doit être inférieure à 2000. La masse calculée est de 1468.

#### E - ETUDE COMPAREE DES MASSES MOLECULAIRES OBTENUES PAR L'APPLICATION DE DIFFERENTES METHODES

Les résultats que nous donnons dans le tableau VIII page 68 sont les moyennes obtenues après plusieurs expérimentations sur des fragments provenant de différents fractionnements.

Les valeurs des masses moléculaires des fragments FI et FII obtenues par l'application des différentes méthodes sont très voisines et égales respectivement à 24 000 et 18 000. La vérification de la valeur des masses moléculaires a été réalisée d'après la composition centésimale en monosaccharides. En effet, les valeurs obtenues sur la base de 4 résidus d'hexosamine, de 5 résidus d'hexoses et de 1 fucose, sont compatibles avec les valeurs de masse moléculaire préalablement obtenues.

La discordance qui existe pour le fragment FIII entre les valeurs de masse moléculaire calculées par équilibre de sédimentation (10 000) et les valeurs obtenues par application des autres méthodes (13 à 15 000), peut être due à l'utilisation d'une valeur de volume spécifique partiel erronée. La connaissance précise du volume spécifique partiel est en effet indispensable au calcul de la masse moléculaire, mais cette valeur n'a pu être mesurée, elle a été seulement calculée, d'après la composition en acides aminés, en supposant une répartition égale des acides carboxyliques et de leurs amides.

Les valeurs de masse moléculaire obtenues par tamisage moléculaire pour les fragments FV et FVI, soit 5500 et 3500, sont en bon accord avec celles calculées d'après leur composition en acides aminés.

Les masses moléculaires des différents fragments, mesurées ou calculées par différentes méthodes se montrent donc relativement homogènes.

La somme des masses des sept fragments CNBr est en accord,

aux erreurs expérimentales près, avec celle de la lactotransferrine native, ce qui semble donc indiquer que nous avons isolé tous les fragments libérés par action du BrCN sur la lactotransferrine.

## II - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES 7 FRAGMENTS PEPTIDIQUES

### A - MODE OPERATOIRE

La composition a été déterminée après hydrolyse par de l'acide chlorhydrique 5,6 N à 105°C pendant 24 h, sous vide, et analyse à l'autoanalyseur Beckman dans les conditions décrites page 29.

### B - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX page 71.

L'examen de ce tableau entraîne les remarques suivantes :

- 1 - Le fragment FI contient peu d'acide cystéique.
- 2 - L'acidité du fragment FII est surtout due à sa teneur de 20 résidus d'acide aspartique.
- 3 - Le fragment FIII est riche en histidine : en effet, il renferme le tiers des résidus présents dans la lactotransferrine.
- 4 - Le fragment FIV est riche en valine, soit sept résidus, ce qui représente 10 p. 100 du nombre des résidus totaux présents dans la lactotransferrine.
- 5 - Le fragment FVI ne possède pas d'homosérine, ni d'homosérine lactone.
- 6 - La somme des compositions en acides aminés des sept fragments est égale à celle de la lactotransferrine totale.

## III - NATURE DES ACIDES AMINES N-ET C-TERMINAUX

### A - NATURE DES ACIDES AMINES SITUES EN POSITION N-TERMINALE

#### 1) Mode opératoire

Nous avons déterminé la nature de ces acides aminés par dan-

TABLEAU VIII : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES SEPT FRAGMENTS  
PEPTIDIQUES (FI à FVII) OBTENUS A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE  
TRAITEE AU BrCN ET OXYDEE PAR L'ACIDE PERFORMIQUE

Acides Aminés	LTF	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI	FVII	Total
CySO <sub>3</sub> H	-	8	8	6	5	3	2	-	32
Asp	71	18	20	14	12	5	4	2	75
Thr	30	8	5	8	6	3	2	1	33
Ser	54	15	10	15	7	5	3	2	57
Glu	62	20	13	11	7	5	4	1	61
Pro	26	8	4	5	4	3	1	-	25
Gly	53	16	11	15	7	5	3	1	58
Ala	59	19	13	10	8	5	3	2	60
1/2 Cys	26	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	37	9	5	3	7	2	1	1	28
Met	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	14	5	2	2	1	1	1	-	12
Leu	54	15	11	12	8	4	3	1	54
Tyr	21	4	3	3	3	1	1	-	15
Phe	32	12	8	7	3	2	2	-	34
Lys	41	12	8	8	7	3	2	1	41
His	8	2	1	3	1	0	1	1	9
Arg	40	13	8	5	5	2	1	1	36
HSer	-	1	1	1	1	1	-	1	6

Les nombres de résidus de sérine et de thréonine sont extrapolés au temps zéro alors que ceux de leucine et d'isoleucine sont déterminés après 72 h d'hydrolyse.



sylation, selon la méthode décrite par PERCY et al. (154) pour les peptides FI, FII, FIII et FIV de masse moléculaire supérieure à 10 000, et par celle de HARTLEY (155) pour les fragments FV, FVI et FVII, de masse moléculaire plus faible.

## 2) Résultats et discussion

La nature des acides aminés situés en position N-terminale dans 6 fragments (FII, FIII, FIV, FV, FVI, et FVII) sur les 7 isolés à partir de la lactotransferrine est indiquée dans le tableau X, p. 73. Seul le fragment FI ne libère pas, après dansylation et hydrolyse, d'acide aminé dansylé.

Dans la mesure où nous avons séparé tous les fragments CNBr de la lactotransferrine, nous pouvons identifier le fragment FI à l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine.

## B - NATURE DES ACIDES AMINES SITUES EN POSITION C-TERMINALE

### 1) Mode opératoire

La nature de l'acide aminé situé en position C-terminale a été identifiée par l'analyse des acides aminés libérés par action de l'hydrazine selon la méthode de AKOBORI (156) décrite page 93.

### 2) Résultats

Nous avons mis en évidence, après hydrolyse chlorhydrique, de l'homosérine dans les fragments FI, FII, FIII, FIV, FV, et FVI. Pour les fragments FIV, FV et FVII, le nombre de résidus d'homosérine a pu être dosé et déterminé à une valeur comprise entre 0,25 et 0,70 résidu par mole de peptide. Par contre, le grand nombre de d'acides aminés présents dans les fragments FI, FII et FIII n'a pas permis de déterminer exactement le nombre de résidus d'homosérine présent dans ces fragments. Le fragment FVI de masse moléculaire 3500 ne présente pas d'homosérine ou d'homosérine-lactone dans sa composition en acides aminés.

TABLEAU X - NATURE DES ACIDES AMINES SITUES EN POSITION  
N-TERMINALE DANS LES SEPT FRAGMENTS OBTENUS A PARTIR  
DE LA LACTOTRANSFERRINE TRAITÉE PAR LE BrCN ET APRES  
RUPTURE DES PONTS DISULFURES

: Nature du fragment :	Nature de l'acide aminé N-terminal :
: LTF totale	: Pas de groupement $\alpha$ -NH <sub>2</sub> libre
: Fraction C	: Gly, Asp, Ser, Phe, Leu
: Fraction D	: Ala
: Fragment FI	: Pas de groupement $\alpha$ -NH <sub>2</sub> libre
: Fragment FII	: Gly
: Fragment FIII	: Asp
: Fragment FIV	: Ser
: Fragment FV	: Phe
: Fragment FVI	: Leu
: Fragment FVII	: Ala
:	:



Les résultats de l'action de l'hydrazinolyse sont rassemblés dans le tableau XI, p. 75. Ils confirment les résultats précédemment acquis, à savoir : absence d'homosérine dans le fragment FVI et présence d'homosérine en position C-terminale dans chacun des 6 autres fragments. Outre la présence d'homosérine dans chaque hydrazinolysat, nous avons identifié des résidus de sérine, de glycolle et, quelquefois, d'acide aspartique.

Il est vraisemblable que ces acides aminés correspondent à des artefacts dus à l'action de l'hydrazine.

#### C - CONCLUSIONS

La présence d'un seul fragment (FVI) ne possédant pas d'homosérine en position C-terminale et la présence d'un seul fragment (FI) possédant, tout comme la lactotransferrine, sa fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminale bloquée, confirme la structure monocaténaire de la chaîne peptidique de la lactotransferrine, et permet de localiser ces deux fragments sur la chaîne peptidique.

La mesure systématique de glycolle et de sérine ainsi que d'acide aspartique et de lysine dans les hydrazinolysats confirme que cette libération est un artefact technique. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une variance au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine. Le nombre d'acides aminés situés en position N-terminale et le nombre total d'acides aminés présents dans les 7 fragments peptidiques confirment le fait que nous avons récupéré tous les fragments libérés par l'action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine.

#### IV - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DES 7 FRAGMENTS CNBr

##### ISOLES A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE

#### A - MODE OPERATOIRE

La composition centésimale en monosaccharides des fragments a été déterminée par les méthodes colorimétriques décrites



TABLEAU XI - NATURE DES ACIDES AMINES LIBERES PAR  
ACTION DE L'HYDRAZINE SELON AKABORI ( 157 ) SUR LES  
FRAGMENTS CNBr DE LA LACTOTRANSFERRINE (EN RESI-  
DUS PAR MOLE DE PEPTIDE)

		Nature des fragments						
Acides	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----:							
Aminés	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI	FVII	
=====+=====+=====+=====+=====+=====+=====:								
Asp	: 0	: 0	: 0,18	: 0	: 0,17	:traces	: 0	:
Ser	: 0,15	: 0,40	: 0,65	: 0,15	: 0,11	: 0,145	: 0,15	:
HSer	: 0,21	: 0,70	: 0,53	: 0,20	: 0,25	: 0	: 0,3	:
Gly	: 0,20	: 0,60	: 0,42	: 0,25	: 0,12	: 0,17	: 0,25	:
Lys	: 0	:traces	: 0,20	: 0,20	:traces	: 0,11	: 0	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:



par MONTREUIL et SPIK (158), la composition molaire a été déterminée après chromatographie en phase gazeuse dans les conditions précisées page 91.

## B - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII, p.77. Seuls les fragments FI et FII renferment des glucides. La composition molaire en monosaccharides de ces deux fragments est identique. Nous identifions en effet, dans chacun de ces fragments, la présence de galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique dans les proportions 2/3/1/4/1

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par SPIK et al. (159) qui ont montré qu'il est possible d'isoler, après hydrolyse trypsique ou chymotrypsique de la lactotransferrine réduite et alkylée et asialylée, 2 glycopeptides possédant une fraction glycanique dans laquelle les monosaccharides se trouvent dans des rapports molaires identiques entre eux et identiques à ceux que nous avons caractérisés dans les fragments FI et FII.

Comme les deux glycopeptides tryptiques se différencient nettement par leur séquence en acides aminés, nous avons cherché à localiser ces deux séquences peptidiques au niveau des fragments FI et FII.

## V - HYDROLYSE TRYPSIQUE DES FRAGMENTS PEPTIDIQUES FI et FII, ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES LIBERES

Les fragments FI et FII ont été soumis à une hydrolyse tryptique et les peptides obtenus ont été isolés et caractérisés après gel filtration.

TABLEAU XII - COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES, DES FRAGMENTS FI et FII, ISOLEES A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE APRES ACTION DU BrCN ET OXYDATION PERFORMIQUE, ET DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES IT et IIT, ISOLEES PAR SPIK ( 160 ) A PARTIR DE LA LACTOTRANSFERRINE ASIALYLEE, REDUITE ET CARBOXYMETHYLEE.

	Fragment	Fragment	Glycopeptide:	Glycopeptide:
	FI	FII	IT	IIT
<u>Composition centésimale</u>				
Monosaccharides neutres	5,1	6,2	27,0	32,7
N-acétyl-hexosamines	3,0	3,5	19,7	23,5
<u>Composition molaire</u>				
Mannose	3	3	3	3
Galactose	2	2	2	2
Fucose	1	1	1	1
N- acétyl-glucosamine	4	4	4	4
Acide-N-acétyl-neuraminique	1	1	-	-



## A - HYDROLYSE TRYPSIQUE DES FRAGMENTS FI ET FII

### 1) Mode opératoire

2 à 3  $\mu$  moles de fragments FI ou FII sont soumis à l'action de la trypsine (EC 3. 4. 4. 4.) (firme SERAVAC), pendant 8 heures à 37°C dans un tampon TRIS-HCl 0,55 M, de pH 8,2. L'enzyme dans le rapport E/S : 1/40 est ajoutée en deux temps à 4 h d'intervalle.

Une aliquote de l'hydrolysate, déposée sur papier W3, est soumise d'abord à une électrophorèse dans l'acide acétique normal à pH 2,4, puis à une chromatographie dans le système solvant de PARTRIDGE (161).

Les peptides sont révélés avec le réactif à la n<sup>h</sup>hydrine-cadmée, à 1 p. 100, et les glycopeptides par le réactif de MONTGOMERY et WU (162) à l'acide periodique-benzidine.

### 2) Résultats et discussion

Les cartes peptidiques des deux fragments FI et FII ne sont pas superposables (fig. 15, p.79)

## B - FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DES FRAGMENTS FI et FII

### 1) Mode opératoire

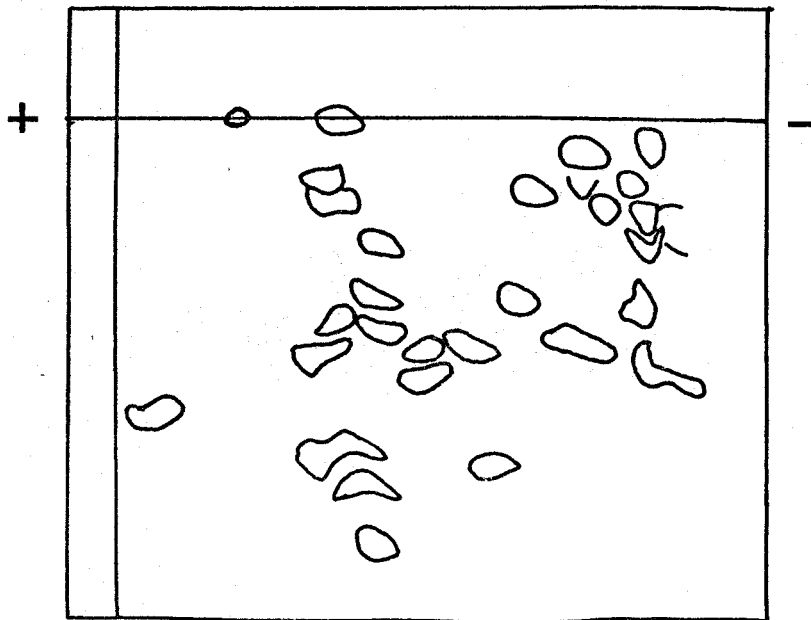
Nous avons donc d'abord purifié les glycopeptides par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 stabilisée dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, puis par électrophorèse sur papier Whatman 3 MM en milieu acide acétique N de pH 2,4.

### 2) Résultats et discussion

Le fractionnement sur colonne de Sephadex G50 permet de séparer, à partir des deux fragments FI et FII, deux fractions glycopeptidiques. Comme le montre la figure 16, p. 80, la fraction glycopeptidique du fragment FI est éluée avant celle du fragment FII, ce qui semble signifier que les 2 glycopeptides possèdent des masses moléculaires différentes.

F<sub>I</sub>

-79-



F<sub>II</sub>

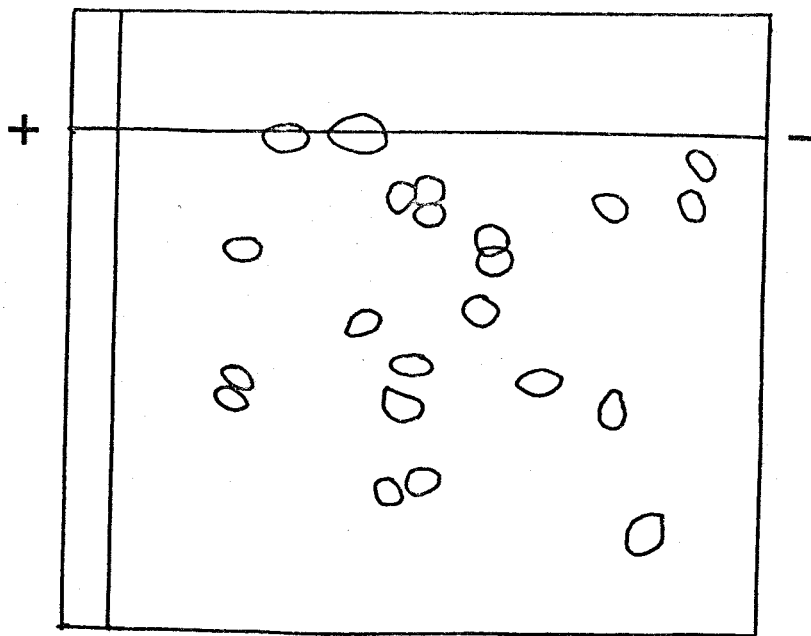


Fig. 15 - Finger-print des fragments F<sub>I</sub> et F<sub>II</sub> après hydrolyse trypsique et séparation électrophorétique en milieu acide acétique N suivie d'une chromatographie dans le système-solvant de PARTRIDGE. (163).

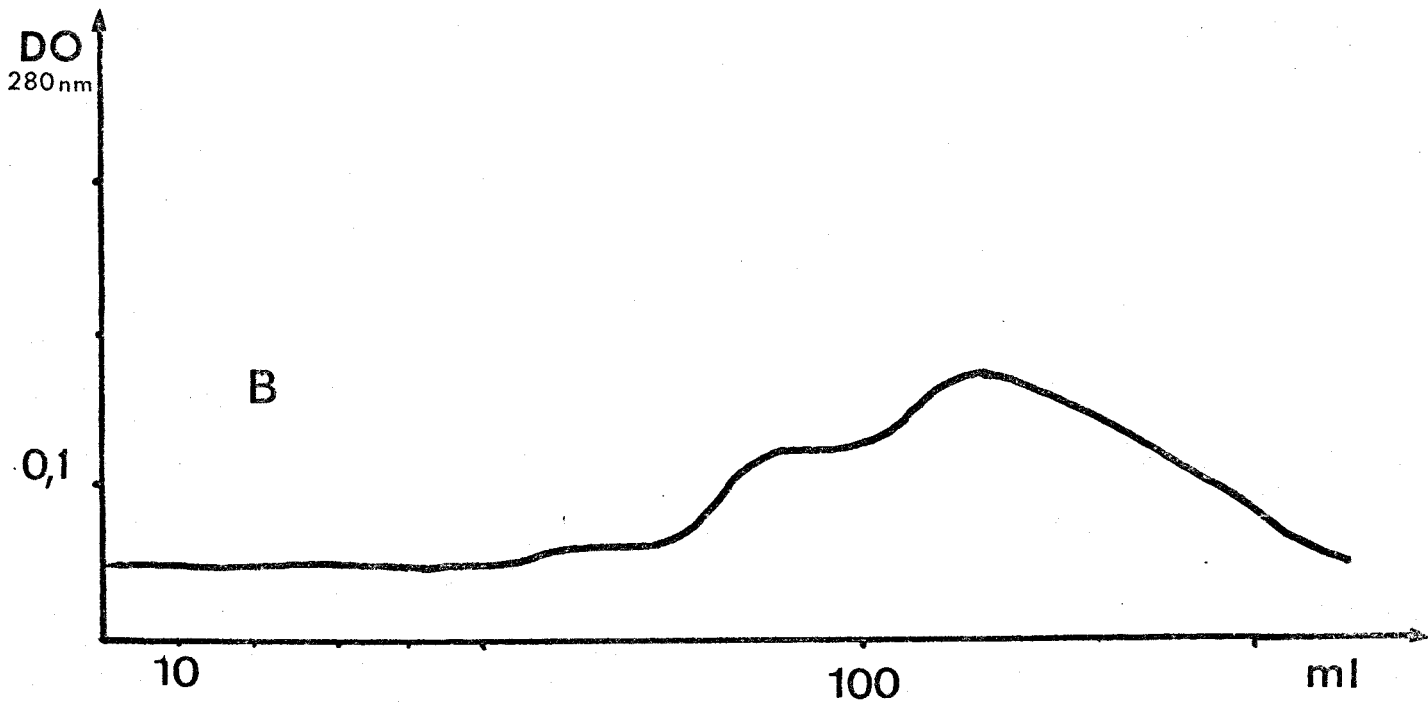
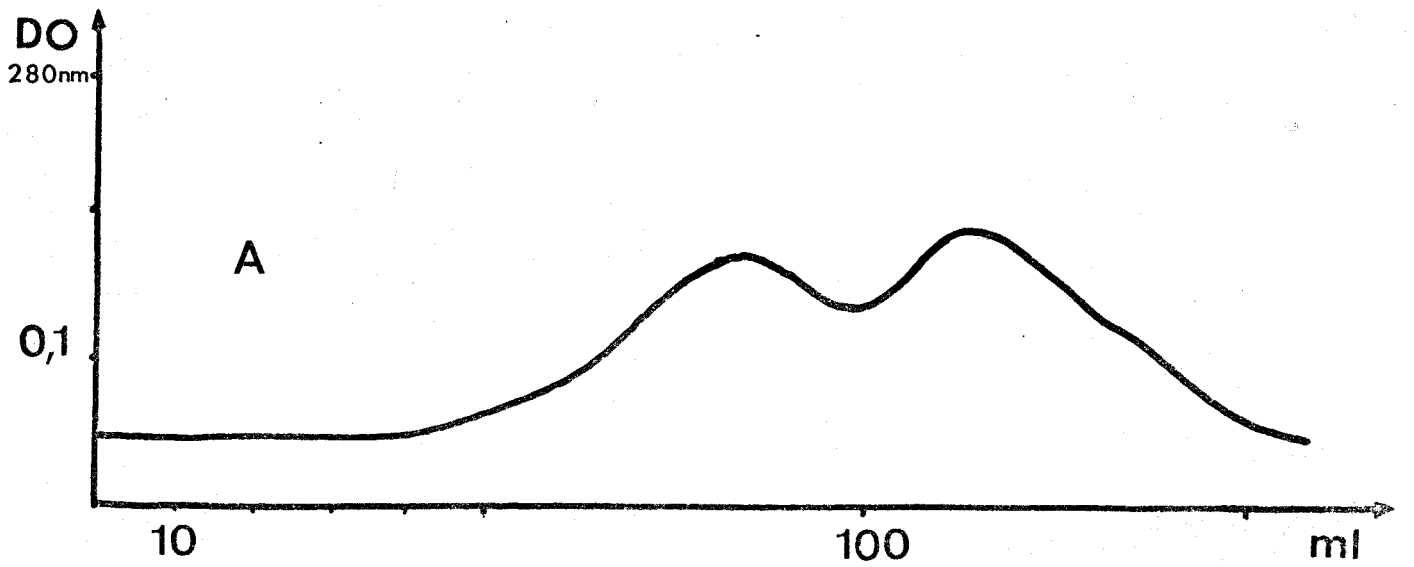


Fig. 16 - Fractionnement sur colonne de Sephadex G-50 des hydrolysats trypsiques du fragment FI (A) et du fragment FII (B).

Les conditions d'élution sont les suivantes : colonne de 1 x 80 cm, débit 8 ml/h, tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.

Une électrophorèse sur papier à pH 2,4 permet d'éliminer les peptides qui souillent les fractions glycopeptidiques obtenues après tamisage moléculaire. Il est à noter que la fraction glycopeptidique du fragment FI se dissocie en deux glycopeptides appelés FI-T1 et FI-T2. Le glycopeptide FI-T1 est obtenu avec un trop faible rendement pour être étudié.

La fraction glycopeptidique du fragment FII se dissocie de même en deux glycopeptides appelés FII-T1 et FII-T2.

### C - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES FI-T1 et FII-T1, ET FII-T2 ISOLES A PARTIR DES FRAGMENTS FI et FII.

#### 1) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des glycopeptides FI-T1, FII-T1 et FII-T2 est donnée dans le tableau XIII, p.82. L'étude comparée de cette composition avec celle des glycopeptides tryptiques asialylés obtenus à partir de la lactotransferrine réduite et alkylée, montre l'identité des glycopeptides IT isolé par SPIK et al. (164) et FI-T2 d'une part, et l'identité des glycopeptides IIT isolé par SPIK et al. (165), FII-T1 et FII-T2 d'autre part.

#### 2) Détermination de l'acide aminé N-terminal

La dansylation selon HARTLEY (166) des fractions glycopeptidiques FI-T1 et FII-T1 obtenus à partir de FI et FII conduit à l'identification respectivement de la proline et de la leucine en position N-terminale.

### D - CONCLUSIONS

Le glycopeptide FI-T2, comme le montre sa composition en acides aminés et la nature de son extrémité N-terminale, correspond au glycopeptide IT obtenu à partir de l'hydrolysate tryptique de la lactotransferrine asialylée réduite et carboxyméthylée.

Les glycopeptides FII-T1 et FII-T2 correspondent au glycopeptide tryptique IIT.

TABLEAU XIII - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES IT et IIT DE LA LAC-  
TOTRANSFERRINE (SPIK et al. - 167-) ET DES GLYCOPEPTIDES FI T1, FII T1 et FII T2 OBTENUS PAR HY-  
DROLYSE TRYPSIQUE DES FRAGMENTS FI et FII.

Nature des acides aminés	Nature des glycopeptides				
	IT	FI T2	IIT	FII T1	FII T2
Cys. CM			1,04		
Cys. SO <sub>3</sub> H		0,6		0,7	1,05
Asp	1,2	2	1,09	1	1,9
Thr	0,8	1,1	1,08	0,7	0,6
Ser	0,4	1,2	1,08	1,3	1,0
Glu	1,6	2,1	1,09	1,2	1,3
Pro	3,6	3,3	1,08	0,3	0,7
Gly	1,0	1,4	1,1	1,3	1
Ala	1,9	1,8	0,1	0,4	0,7
Val	0,6	0,6		0,1	0,4
Ile	0,6	0,5		0,1	0,2
Leu	1,0	1,3	1	0,9	0,7
Phe	0,8	0,7	0,9	0,7	0,6
Lys	0,2	0,3	0,8	0,6	0,6
Arg	0,6	0,7		0,1	0,4
Try	+	N.D	+	N.D	N.D





Nous pouvons donc localiser le glycopeptide IT sur le fragment FI et dans la partie N-terminale de la lactotransferrine. Le dédoublement des glycopeptides tryptiques des fragments FI et FII provient certainement d'une hétérogénéité au niveau du nombre de résidus d'acide N-acétyl-neuraminique. Nous n'avons pas pu déterminer les compositions respectives en acide N-acétyl neuraminique de ces glycopeptides à cause de la faible quantité de glycopeptides que nous avons mis en évidence. Les glycopeptides tryptiques de la lactotransferrine non désialylée présentent selon DEBRAY-VANDERSYPPE (168) une hétérogénéité identique à celle que nous avons mise en évidence.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre travail, qui a porté sur l'action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine humaine et sur l'isolement et la caractérisation des peptides obtenus sont les suivantes :

1 - Après une étude cinétique des conditions d'action du bromure de cyanogène, nous avons réussi à libérer sept fragments peptidiques dénommés FI à FVII. En combinant les techniques de chromatographie d'échanges d'ions et de tamisage moléculaire, nous avons mis au point une méthode de fractionnement de la lactotransferrine traitée au bromure de cyanogène et oxydée par l'acide performique. Cette méthode nous permet de séparer les sept fragments FI à FVII avec un rendement satisfaisant et une pureté suffisante pour entreprendre l'étude de leurs principales propriétés physiques et chimiques.

2 - Les sept fragments que nous avons séparés se différencient par leur masse moléculaire déterminée par différentes méthodes (ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation, électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, tamisage moléculaire, composition en acides aminés). La composition totale en acides aminés et en monosaccharides et la somme des masses moléculaires de ces sept fragments sont en accord aux erreurs expérimentales près, avec le nombre total d'acides aminés et de monosaccharides de la lactotransferrine.

Ceci nous permet de penser que nous avons séparé la totalité des fragments obtenus par l'action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine.

3 - L'analyse de ces sept fragments nous a permis de confirmer la monocaténerité de la chaîne peptidique. En effet, nous n'isolons qu'un seul fragment qui, comme la lactotransferrine native, possède son extrémité  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminale bloquée par un groupement acétyl et un seul fragment ne possédant pas d'homosérine (ou sa lactone) en position C-terminale.

4 - Les fragments FI et FII renferment chacun un glycanne de composition identique en monosaccharides. L'hydrolyse trypsique des fragments FI et FII nous a permis d'isoler deux glycopeptides dont la composition en acides aminés et l'extrémité N-terminale sont identiques à celles des glycopeptides IT et IIT isolés par SPIK et al. ( 169 ) à partir d'hydrolysats trypsiques de la lactotransferrine réduite et alkylée.

Ces résultats nous ont permis de localiser le glycopeptide IT sur le fragment FI à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine.

5 - Les résultats acquis par l'étude des fragments BrCN de la lactotransferrine montrent que la structure primaire de cette transferrine diffère de celle des autres transferrines étudiées : la sérotransferrine ( BEZKOROVANY et al.(170) -, SUTTON et al. (171) - CHARET et al.(172) -) et l'ovotransferrine (TSAO et al.(173) ). En effet, le nombre de fragments libérés (9 pour les sérotransferrines et 8 pour l'ovotransferrine) leur masse moléculaire, et leur extrémité N-terminale et leur composition en acides aminés sont différents. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les transferrines sont constituées de la duplication de la même chaîne peptidique, et l'hypothèse selon laquelle la transferrine et la lactotransferrine humaines dérivent de la même protéine ancestrale (QUERIN JEAN et al. (174)-, FEENEY et ALLISON (175)-, AISEN et LEIBMAN -(176)-) peuvent être mises en doute.

La poursuite de l'étude des fragments BrCN de la lacto-transferrine nous permet d'envisager la détermination de la structure primaire de la chaîne polypeptidique, en association avec d'autres méthodes chimiques et physiques, comme la diffraction des rayons X et la fluorescence. Cette expérimentation devrait aboutir à la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine, ce qui nous permettrait de préciser les relations existant entre la structure et l'activité biologique de cette glycoprotéine.

APPENDICE TECHNIQUE

## I - TECHNIQUES D'UTILISATION DES COLONNES DE TAMISAGE MOLECULAIRE ET D'ECHANGEURS D'IONS

### A - TAMISAGE MOLECULAIRE

#### 1) Préparation des gels

Le gel sec est mis à gonfler 24 h. dans de l'eau distillée puis lavé par le tampon d'élution. La colonne est ensuite montée et stabilisée pendant 3 jours à une semaine. La colonne doit posséder un débit libre minimum afin d'obtenir le maximum de séparation.

#### 2) Fractionnement sur colonne de gels

Nous avons utilisé trois types de colonnes.

a - Colonne de Biogel P100 de 5 x 100 cm ; l'élution a été réalisée avec une solution d'acide formique 0,1 M de débit 35 ml/h, des fractions de 17,5 ml ont été recueillies.

b - Colonne de Biogel P60 de 1,5 x 120 cm stabilisée et éluee par un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M avec un débit de 6 ml/h, des fractions de 3 ml ont été recueillies.

c - Colonne de Sephadex G50 de 1,5x80 cm stabilisée et éluee par un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M de débit 8 ml/h. Nous avons recueilli des fractions de 2,7 ml.

### B - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

#### 1) Préparation du support chromatographique

Nous avons utilisé comme échangeur d'anions de la DEAE-Sephadex A-50. Après deux cycles d'activation par HCl 0,5 N et NaOH 0,5 N, l'échangeur d'ions est abondamment lavé sur bûchner puis stabilisé dans un tampon de Tris-HCl 0,004 M de pH 7,8 en présence d'urée 4 M.

## 2) Elution de la colonne

La colonne de 3 x 20 cm après stabilisation de 24 h. est éluée par le tampon de stabilisation, puis par un gradient de force ionique et de pH obtenu à partir de 500 ml de tampon Tris-HCl 0,004 M, pH 7,8, urée 4 M et de 500 ml de tampon Tris-HCl 0,3 M, pH 7,2, urée 4M.

Le mélange à séparer est injecté en solution à 5 p. 100 dans le tampon de stabilisation. Le débit est de 20 ml/h, des fractions de 10 ml sont recueillies.

## II - REACTIONS DE MODIFICATION CHIMIQUE DES FRAGMENTS PEPTI- DIQUES

### A - COUPURE DES PONTS DISULFURES

#### 1) Oxydation performique

L'oxydation performique a été réalisée selon la technique de HIRS (177).

L'acide performique est préparé en additionnant à 5 ml d'eau oxygénée, 45 ml d'acide formique concentré. La solution est laissée au repos 2 h à la température ambiante, puis 15 mn à - 10° C.

A la protéine (1g), dissoute dans 25 ml d'acide formique concentré et 5 ml de méthanol, nous ajoutons lentement sous agitation à 4°C 50 ml d'acide performique. La réaction se poursuit pendant 2 h 30 à 4°C et à l'obscurité.

La réaction est ensuite arrêtée par addition de 800 ml d'eau refroidie à 4°C, puis la solution est lyophilisée.

#### 2) Réduction et alkylation

##### a - Réduction

La réduction est effectuée suivant le procédé de CRESTFIELD MOORE et STEIN (178) :

- La protéine (1 g) dissoute dans 50 ml de tampon Tris-0,1 M de pH 8,2 renfermant de EDTA 0,03 M et du chlorhydrate de guanidine 6 M est soumise à l'action du 2-mercaptoéthanol (2,3 ml, soit 30 mM). La réaction se poursuit pendant 3 h à l'abri de la lumière



et sous azote débarrassée de son oxygène par passage dans une solution de pyrogallol à 1 p. 100.

#### b - Alkylation

Les groupements thiol libérés sont stabilisés par alkylation avec l'acide iodoacétique. Une quantité de 50 mM d'acide iodoacétique est ajoutée à la solution, la réaction s'effectue à pH 8,6 jusqu'à ce que le test au nitroprussiate soit négatif.

Le réactif au nitroprussiate est obtenu par addition extemporanée de 1 volume d'ammoniaque 4 N et de 1 volume de nitroprussiate à 2 p. 100, dans l'eau, il vire au rouge violacé en présence de groupements thiols libres.

La solution est dialysée pendant 4 jours contre de l'eau distillée avant d'être lyophilisée.

#### B - MALEYLATION DES PEPTIDES

L'anhydride maléique réagit spécifiquement à pH basique, avec les groupements  $\alpha\text{NH}_2$  de la lysine.

La réaction avec la tyrosine donne 1 dérivé O - maléyl-tyrosine qui est instable en milieu basique.

La maleylation, en substituant les groupements  $\alpha\text{NH}_2$  de la lysine, par des groupements carboxyliques, permet, par répulsion électrostatique, de déployer la chaîne peptidique, de solubiliser la protéine et de dissocier les éventuels agrégats.

Un autre intérêt non négligeable de cette réaction est de limiter l'hydrolyse trypsique aux seules liaisons arginyles

La réaction est réversible en milieu acide.

#### Mode opératoire

La réaction s'effectue suivant la méthode de ITANO (179) sur la protéine, en solution à 1 p. 100, pH 9, soit dans un tampon de bicarbonate d'ammonium, soit dans un tampon de Tris-HCl 0,1 M, chlorure de guanidine : 6 M.

L'anhydride maléique purifié par sublimation et solubilisé dans un minimum de dioxanne, est ajouté en plusieurs fois à raison de 100 moles par mole de lysine,

La réaction se poursuit pendant 30 mn, puis les sels sont éliminés soit par dialyse soit par chromatographie de tamisage moléculaire.

La démaléylation totale ne s'effectue qu'à pH 3 en milieu acide acétique pendant 20 h en présence de toluène pour éviter le développement de bactéries et à 40°C.

### C - SUCCINYLATION

La succinylation tout comme la maléylation permet de substituer deux groupements carboxyles à la fonction  $\alpha\text{NH}_2$  de la lysine. Cependant la succinylation n'est pas réversible.

Nous avons utilisé le protocole décrit par KLAPPER et KLOTZ (180).

A 1 g de protéine en solution à 1 p. 100 dans de l'eau à pH 7 1 g d'anhydride succinique est ajouté par petite quantité en 15 mn à 1 h. Le pH est maintenu à 7 par addition d'une solution de soude. Après addition de l'anhydride succinique, la solution est laissée au repos 30 mn, puis mise en dialyse.

## III - ANALYSE CHIMIQUE DES FRAGMENTS OBTENUS

### A - ANALYSE DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES

Nous avons analysé la composition molaire en monosaccharide après méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse liquide selon le procédé de ZANETTA et al. (181).

#### 1) Méthanolyse

Un échantillon de glycoprotéine contenant de 300 à 500  $\mu\text{g}$  d'oses totaux est préalablement lavé par des mélanges binaires de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  dans les rapports 2:1, puis 1:2 et enfin par du méthanol seul. Le produit ainsi traité est additionné de 50  $\mu\text{g}$  de

méso-inositol (témoin interne) puis lyophilisé et placé en dessiccation sur anhydride phosphorique. Le résidu est repris par 2 ml de méthanol chlorhydrique (0,5 N ou 1,5 N en acide chlorhydrique) et placé à 80°C pendant 24 h. Le méthanolysat est refroidi puis séché sous courant d'azote.

### 2) Trifluoro-acétylation

Le résidu est repris par 400  $\mu$ l de mélange dichlorométhane anhydride trifluoroacétique (v/v). La trifluoroacétylation est effectuée à 150°C pendant 5 mn. Après refroidissement le tube est de nouveau chauffé à 150°C pendant 5 mn. La solution refroidie est prête à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse.

### 3) Conditions de la chromatographie

Les O-méthyl-glycosides trifluoracétylés des monosaccharides neutres, des N-acétylosamines et de l'acide N-acétyl-neuramique sont chromatographiés sur colonne (300 x 0,3 cm en verre) de Varaport 30 à 5 p. 100 (p/p) de silicone OV 210 à la température programmée de 110° à 210° (1° par mn) avec un débit de gaz vecteur azote de 7,5 ml/mn.<sup>(x)</sup>

## B - ANALYSE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

### 1) Réaction de dansylation

Nous avons utilisé deux techniques de dansylation suivant la masse moléculaire des peptides.

#### a - Peptides de masse moléculaire supérieure à 10 000.

Nous avons appliqué la méthode de GROS et LABOUESSE (182) modifiée par PERCY et BUCHWALD (183).

Une quantité de 5 nM de peptides est dissoute dans 500  $\mu$ l d'urée 8 M, la solution est tamponnée par 150  $\mu$ l de bicarbonate de sodium 0,2 M pH 9,2, puis 200  $\mu$ l de diméthyl formamide et 5 mg

---

<sup>(x)</sup> Les dosages ont été réalisés par Y. LEROY sous la direction du Dr. FOURNET. Nous les remercions vivement.

de chlorure de dansyl dissous dans 100  $\mu$ l d'acétonitrile sont ajoutés. La réaction se poursuit pendant 1 h à 37°C.

La protéine dansylée est ensuite précipitée par de l'ATCA à 10 p. 100 à 4°C, puis lavée par de l'acétone pour éliminer l'excès de chlorure dansyl. Le précipité est enfin hydrolysé par de l'HCl 5,6 N pendant 8 h à 18 h à 105°.

b - Peptides de masse moléculaire inférieure à 10 000.

Nous avons utilisé la technique de HARTLEY (184).

1 à 5 nM de peptides sont dissoutes dans 10  $\mu$ l de bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,2, puis 10  $\mu$ l d'une solution de chlorure de dansyl à 2,5 mg par ml d'acétone "pH 9,8" sont additionnés. La réaction dure 1 h à 37°C. La solution est séchée sous excicateur contre NaOH puis le précipité est hydrolysé dans les conditions décrites précédemment.

## 2) Chromatographie des acides aminés dansylés

L'hydrolysats séché sous vide contre NaOH est chromatographié sur des plaques de micropolyamide suivant le procédé de WOODS et WANG (185) et de HARTLEY (186).

Les acides aminés dansylés sont extraits par de l'acétate d'éthyl saturé en eau, à l'exception de DNS Arg,  $\alpha$  DNS Lys,  $\epsilon$  DNS Lys et DNS His, qui sont repris dans un mélange acide acétique acétone dans les rapports 3 : 2.

## C - ANALYSE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

### 1) Hydrazinolyse

a - Réaction selon AKOBORI (187)

1  $\mu$ M de protéine desséchée à 105°C pendant 12 h est soumise à l'action de 200  $\mu$ l d'hydrazine anhydre à 105°C pendant 6 heures. L'hydrazinolysat est séché dans un excicateur contre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dans ces conditions, les acides aminés sont dégradés très facilement et le pourcentage de récupération des acides aminés témoins est de l'ordre de 30 à 50 p. 100. Des acides aminés comme l'acide aspar-

tique et la cystine sont presque entièrement détruits, le glyco-colle et la sérine apparaissent comme artéfacts.

#### b - Réaction en présence de catalyseur

Cette méthode a été mise au point par BRAUN et SCHROEDER (188) pour faciliter l'attaque de la liaison peptidique.

L'hydrazinolyse de  $1\mu\text{M}$  de protéine par 2 ml d'hydrazine a lieu en présence de 50 mg d'amberlite CG 50. L'amberlite CG 50 est sous forme  $\text{H}^+$  et deshydratée par passage dans une étuve à  $80^\circ\text{C}$  pendant 24 h. La réaction se poursuit à  $80^\circ\text{C}$  pendant 24 à 72 h, puis la solution est séchée dans un excicateur contre de l'acide sulfurique concentré. Le résidu est repris par 3 ml d'eau, centrifugé pour éliminer le culot d'amberlite, puis amené à pH 2, par addition de 1 ou 2 gouttes d'HCl.

#### c - Récupération des acides aminés C-terminaux

Les hydrazides ont été éliminés par extraction à la benzaldéhyde ou par chromatographie sur phospho-cellulose.

##### Extraction à la benzaldéhyde

La benzaldéhyde lavée par de la soude puis par de l'eau distillée, est distillée, puis séchée, en présence de  $\text{CaCl}_2$ . Avant emploi, la benzaldéhyde est soumise à nouveau à une distillation.

L'hydrazinolysat est extrait 3 à 5 fois par la benzaldéhyde jusqu'à ce qu'il devienne incolore.

##### Chromatographie sur colonne de phospho-cellulose (BRAUN et SCHROEDER - 189-).

La phosphocellulose est lavée par de la soude 0,5 M, par de l'acide chlorhydrique N, puis par de l'eau distillée, elle est enfin stabilisée dans un tampon formiate de pyridine 0,4 M, pH 3,2. La séparation chromatographique s'effectue à  $20^\circ\text{C}$  sur une colonne de 1 x 30 cm, avec un débit de 30 ml/h. Des fractions de 1,7 ml sont recueillies. Les acides aminés neutres et acides apparaissent entre

les fractions 33 et 43, l'histidine entre les fractions 47 et 53, et enfin l'arginine est éluée entre les fractions 55 et 56.

## 2) Carboxypeptidase A

### a - Préparation de l'enzyme

La carboxypeptidase (1,25 mg) traitée au DIFP est lavée selon la technique de HARRIS (190) par 1 ml d'eau, les cristaux récupérés après centrifugation sont solubilisés dans 0,1 ml de bicarbonate de sodium 1 p. 100 par addition de soude 0,1 N. Après dissolution totale, le pH de la solution enzymatique est amené à pH 8-9 par de l'HCl 0,1 N.

Par une deuxième technique d'activation, la carboxypeptidase lavée est dissoute dans du chlorure de lithium à 10 p. 100.

### b - Mode opératoire

1 à 2  $\mu$  M d'apolactotransferrine réduite alkylée et succinylée sont dissoutes dans 7 ml de tampon bicarbonate d'ammonium de pH 7 à 8,5, contenant une quantité connue de norleucine et sont traitées par la carboxypeptidase tel que le rapport/enzyme substrat, soit égal à 1/50 (mole/mole).

La réaction s'effectue à 37°C.

### c - Analyse des acides aminés libérés

Des aliquotes correspondant à 25 nM de protéine sont prélevées à des temps de 0, 1, 4, 8, 24 h. La protéine est précipitée par deux gouttes d'acide acétique, le surnageant recueilli après centrifugation est séché puis analysé à l'auto-analyseur Beckman.

## III - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

### A - ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION<sup>(x)</sup>

#### 1) Théorie

L'ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation permet de

---

(x) Les équilibres de sédimentations ont été réalisés par Mme CONIEZ sous la direction du Dr. VERBERT. Nous les remercions vivement.

calculer la masse moléculaire d'une molécule. Dans des conditions caractéristiques de la molécule (vitesse et temps de sédimentation) le flux de sédimentation égalant le flux de diffusion, la relation

$$M = \frac{RT}{1 - \bar{V}\rho} \frac{1}{w^2} \frac{dc/dt}{cr}$$

permet de calculer la masse moléculaire :

- $\bar{V}$  : Volume spécifique partiel de la molécule
- $\rho$  : Densité du solvant (g/l)
- $w$  :  $\frac{2 \pi}{60}$  (tpm) radian /s
- $c$  : Concentration de la solution
- $r$  : Distance à l'axe de rotation.

## 2) Mode opératoire

### a - Matériel

Les déterminations ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse analytique "Beckman" modèle E, équipée du système optique interférentiel de RAYLEIGH en utilisant la méthode d'YPHANTIS (191) modifiée par CHERVENKA (192).

Les ultracentrifugations sont faites à 20°C, la température du rotor est réglée par le système RITC. Le rotor utilisé est en titane (réf. AnH) et les cellules sont à double secteur.

### b - Détermination des caractéristiques de la sédimentation

Les vitesses de centrifugation varient de 16 000 tpm pour le fragment FI à 56 000 tpm pour le fragment FIV. Elles sont déterminées d'après l'équation proposée par CHERVENKA

$$\text{tpm} = 1,4 \times 10^5 \left( \frac{T}{M(1-\bar{V}\rho)} \right)^{1/2}$$

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

### c - Préparation de l'échantillon

Nous avons travaillé sur les peptides en solution dans un tam-

pon Gu. HCl. 6M, Tris 0,1 M, pH 7,5 ou sur les peptides maleylés dissous dans un tampon Tris-HCl pH 8,5.

Dans les deux cas, l'échantillon est dissous à raison de 0,2 à 0,7 mg par ml de tampon, puis est dialysé deux jours contre le même tampon.

#### d - Méthode de calcul

Nous avons utilisé le système optique interférentiel de RAYLEIGH, et appliqué l'équation :

$$M = \frac{2RT}{1 - \phi' e} \frac{1}{c \omega^2} \frac{d \log c}{dr^2}$$

- où
- M est la masse moléculaire de la protéine
  - R =  $8,313 \times 10^7$
  - T =  $273 + \Theta$        $\Theta$  = température de l'expérience en °C
  - $\phi'$  = Volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le solvant
  - e = Densité du solvant
  - c = Concentration de la solution
  - r = Distance à l'axe de rotation.

Le volume spécifique partiel de chaque peptide a été calculé d'après la composition en acides aminés et en monosaccharides suivant la méthode décrite par COHN et EDSALL (193) et SQUIRE (194)

#### B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS D'APRES LA METHODE DE NEVILLE (195)

La fixation du dodécyl sulfate de sodium (SDS) sur une chaîne peptidique confère à celle-ci des charges négatives telles que la migration électrophorétique anodique de la protéine ne dépend plus que de la longueur de sa chaîne peptidique.



1) Réactifs

Nous avons utilisé le gel standard 11, 1 x 0, 9.

Composition du gel inférieur :

Acrylamide	11 p. 100	
Bisacrylamide	0, 1 p. 100	à dissoudre dans
TEMED	0, 15 p. 100	le tampon de gel
Persulfate d'ammonium	0, 05 p. 100	inférieur

Tampon du gel inférieur :

pH	9, 18 (pH 9, 5 pendant l'électrophorèse)
HCl	0, 0308 N
Tris	0, 4244 M

Composition du gel supérieur :

Acrylamide	3 p. 100	
Bisacrylamide	0, 2 p. 100	à dissoudre dans
TEMED	0, 15 p. 100	le tampon du gel
Persulfate d'ammonium	0, 05 p. 100	supérieur

Tampon du gel supérieur :

pH	6, 1 (pH 8, 64 pendant l'électrophorèse)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0, 027 M
Tris	0, 0541 M

Tampon du réservoir supérieur :

pH	8, 64
Acide borique	0, 04 M
Tris	0, 041 M
SDS	0, 1 p. 100

Tampon du réservoir inférieur :

pH	9, 18
HCl	0, 0308 N
Tris	0, 4244 M

## 2) Conditions d'électrophorèse

### a - Préparation de l'échantillon

Nous avons travaillé avec des protéines réduites et alkylées solubilisées dans le tampon  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,005 M SDS 5 p. 100, 2 mercapto-éthanol 10 p. 100 (v/v) ou avec des protéines natives solubilisées dans le tampon  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,005 M, S.D.S. 5 p. 100.

Dans les deux cas, nous ajoutons du bleu de bromophénol comme marqueur interne.

Le dépôt est de 20  $\mu\text{l}$  de la solution de protéine à 1 p. 100.

### b - Condition de l'électrophorèse

Les gels de 5mm de diamètre et de 10 cm de long sont soumis à l'électrophorèse de 1,5 mA par tube à 25°C, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol migre à 1 cm environ de l'extrémité du tube.

### c - Révélation du gel

Le gel démoulé est coupé au niveau du bleu de bromophénol puis coloré par le réactif au bleu de comassie pendant 16 h. La décoloration s'effectue pendant 48 à 72 h.



#### Composition du colorant :

Bleu de comassie brillant	1,25 g
Méthanol à 50 p. 100	45 4 ml
Acide acétique	46 ml
filtrer sur papier Whatman n° 1.	

#### Composition du décolorant :

Acide acétique	75 ml
Méthanol	50 ml
Eau	875 ml.

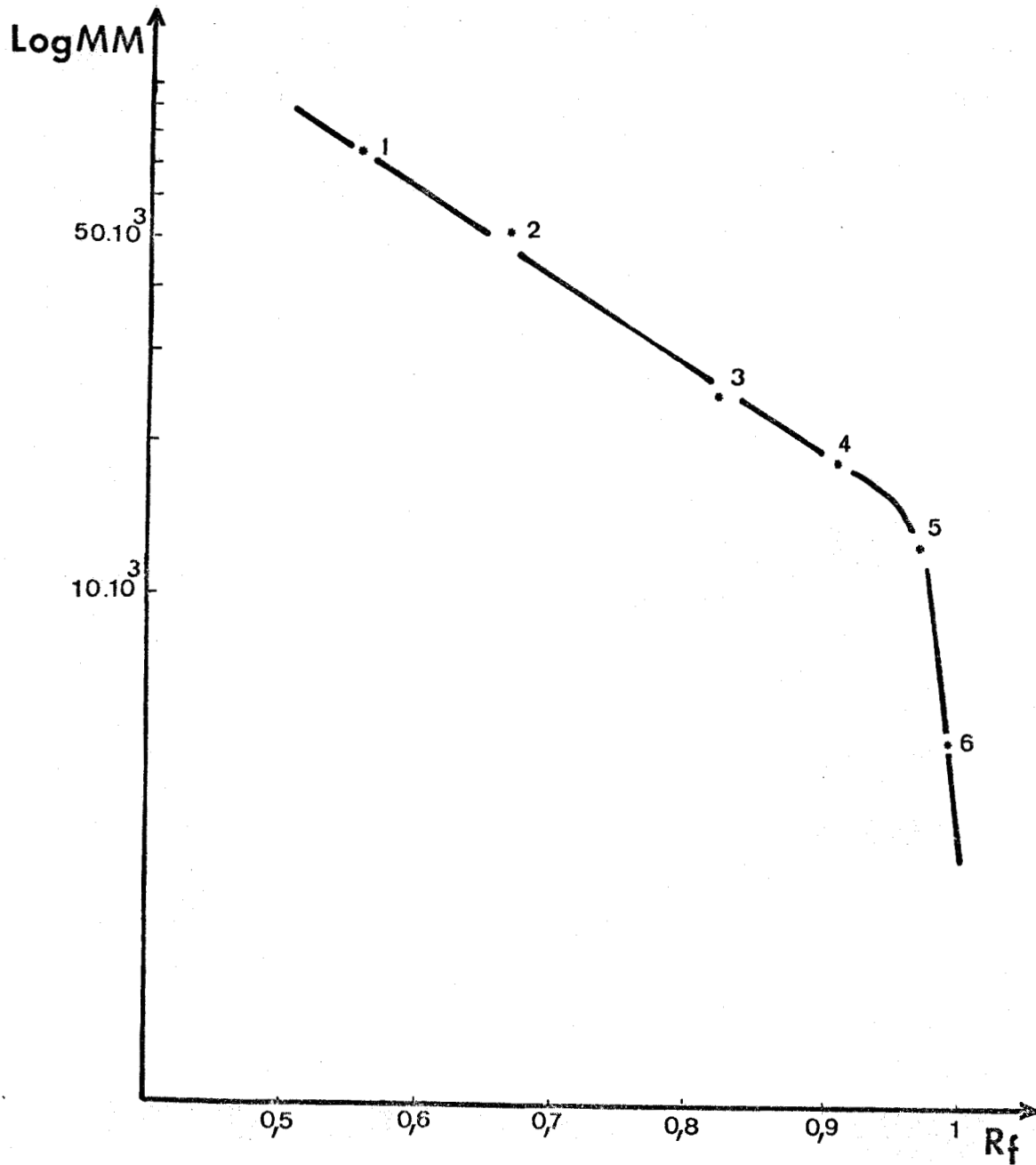


Fig. 17 - Courbe d'étalonnage des masses moléculaires en fonction de la migration des complexes protéines-SDS en électrophorèse en gel de polyacrylamide suivant NEVILLE (196).  
1 = lactotransferrine humaine ; 2, 3 = chaînes H et L des IgG de Vache ; 4 =  $\beta$ -lactoglobuline ; 5 = cytochrome C de Cheval ; 6 = Insuline.

#### d - Etalonnage du gel

Nous avons utilisé comme témoins : la lactotransferrine (76 000), les chaînes H et L des immunoglobulines IgG du colostrum de Vache (50 000 et 25 000), la  $\beta$ -lactoglobuline (18 000) et le cytochrome C de Cheval (12 400) et de l'Insuline oxydée par l'acide performique (2900)

La courbe d'étalonnage (fig. 18, p. 96) est obtenue en portant la valeur du Rf en fonction du logarithme de la masse moléculaire.

$$\text{Rf} : \frac{\text{Migration du bleu de bromophénol}}{\text{Migration de la protéine.}}$$

#### C - TAMISAGE MOLECULAIRE

---

Les peptides dont les ponts disulfures sont coupés par oxydation performique sont maleylés de manière à solubiliser et éliminer les risques d'aggrégation et de manière à modifier la chaîne peptidique par remplacement des fonctions  $\text{NH}_3^+$  de la lysine par des fonctions  $\text{COO}^-$ .

Après ce traitement, l'élution du peptide ne se fait plus suivant le rayon de Stokes mais d'après la longueur de la chaîne peptidique (HARTLEY - (197)-).

##### 1) Conditions de la chromatographie

La détermination des masses moléculaires a été réalisée sur des colonnes de gel de Sephadex G-50 qui permettent théoriquement la préparation de peptides de masse moléculaire comprise entre 5000 et 30000. Les peptides maleylés de masse moléculaire supérieure à 15 000 sont exclus de la colonne.

Nous avons utilisé une colonne de Sephadex G-50 de 1,5 x 80 cm stabilisée dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, l'élution s'effectue avec le même tampon avec un débit de 8 ml/h.

Le produit (5 mg par 500  $\mu$ l de tampon) est injecté juste après maleylation ; l'acide maléique libéré lors de la réaction sert à mesurer le volume total de la colonne.

## 2) Choix des témoins

Nous avons utilisé comme témoin les protéines et les fragments de protéine suivants :

Cytochrome c	:	PM	12 400
Cytochrome BrCN1 (STEERS (198))		PM	7 650
Fragment BrCN de la transferrine humaine (SUTTON et al. (199)-, CHARET (200)-).			
CN <sub>4</sub>			9 200
Insuline oxydée			2 900

## 3) Etalonnage de la colonne

Nous avons utilisé la relation entre la masse moléculaire et le Kd calculé par PORATH (201) qui assimile le peptide à un polymère de monomères identiques flexibles et linéaires.

$$Kd^{1/3} = A - Ba$$

$$\text{où } Kd = \frac{Vt - Ve}{Vo}$$

$$a = \frac{K}{RG} \quad \begin{array}{l} RG = \text{rayon de giration} \\ Ve : \text{volume d'élution} \\ Vt : \text{volume total.} \end{array}$$

$$Vo = \text{volume mort} \quad Ve = \text{volume d'élution}$$

Dans le cas de chromatographie dans un milieu dénaturant comme le chlorhydrate de guanidine :  $RG = k M^{0,555}$ .

En traçant  $Kd^{1/3} : k M^{0,555}$  nous avons constaté, que dans le cas des peptides maleylés tout comme dans le cas des peptides chromatographiés en milieu dénaturant, comme le chlorhydrate de guanidine ou le SDS, la courbe obtenue est linéaire. (fig. 18 p 103)

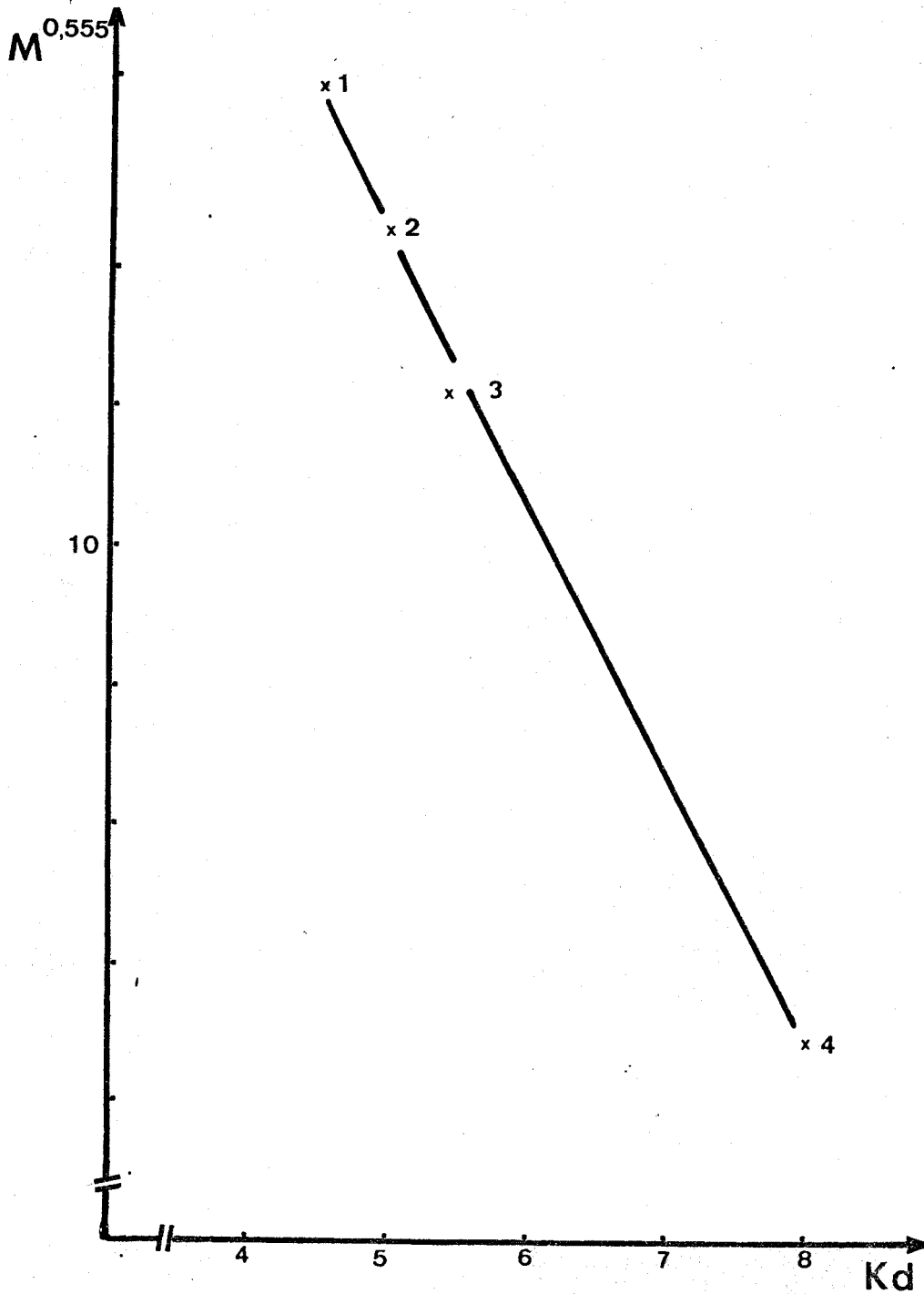


Fig. 18.



Représentation graphique de la relation existant entre la masse moléculaire d'un peptide maléylé et son élution sur une colonne de Sephadex G 50.

Les conditions d'élution sont les suivantes : colonne de 1,5 x 80cm, débit 8 ml/h ; tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.

1 = cytochrome C ; 2 = peptide CN<sub>4</sub> de la transferrine humaine ; 3 = cytochrome C BrCN ; 4 = insuline oxydée.

## BIBLIOGRAPHIE

AISEN P., LEIBMAN A.

Biochim. Biophys. Acta, 1971, 257, 3414-3423 (65, 68, 71, 73, 75, 77, 79, 80, 176)

AKOBORI S.

Bull. Chem. Soc. Japan, 1952, 25, 67-85 (156, 157, 187)

AMBLER R. P.

Biochim J. , 1965, 96, 32 P (135)

BEZKOROVANY A., GROHLICH D.

Biochim. Biophys. Acta, 1973, 310, 365-375 (149, 170)

BISERTE G., HAVEZ R., CUVELIER R.

Exp. Ann. Biochim. Méd., 1963, 25, 85 (9)

BLANC B.

Thèse Doct. ès Sciences Editions Médecine et Hygiène Genève 1964  
(16, 23)

BLANC B.

In PEETERS H., Protides of the Biological Fluids,  
Elsevier éd. Amsterdam, 1966, 14, 125, (19, 24)

BLANC B., BUJARD E., MAURON J.

Experimentia, 1963, 19, 299 (89)

BLANC B., ISLIKER M.

Bull. Soc. Chim. Biol. , 1961, 43, 929 (5, 23, 33, 86)

BLANC B., ISLIKER M.

Helv. Chim. Acta, 1963, 322, 2905 (17, 66)

BRAUN V J., ENGELBERTZ P.

Berichte , 1918, 51, 96 (128)

BRAUN V., SCHROEDER W.H.

Arch. Biochim. Biophys. , 1967, 118, 241 (188, 189)

BRAZIER J.

Communication personnelle (55)

- BULLEN T. J. , ROGERS H.J. , LEIGH L.  
British Medical Journal, 1972, 1, 69-75 (27)
- BUTTKUS H. , CLARK J.R. , FEENEY R.E.  
Biochemistry, 1965, 4, 998-1004 (54, 146)
- CAHOURS A.  
Ann. Chim. Phys. , 1877, 10, 13 (127)
- CHARET P.  
Résultats non publiés (172, 200)
- CHARET P. , TETAERT D. , HAN K.K. , MONTREUIL J.  
C.R. Acad. Sci., 1973, 276D, 1629 (121)
- CHERON A.  
Résultats non publiés (82, 109, 119)
- CHERVENKA C.M.  
Anal. Biochem., 1970, 34, 24 (192)
- COHN E.J. , EDSALL J.T.  
Proteins, amino acids and peptide as ions and dipolar ions,  
Reinhold, NEW YORK, 1943, (193)
- COZZONE P.  
Thèse Doct. ès Sci. , 1971, Provence (152)
- CRESTFIELD A.M. , MOORE S. , STEIN W.H.  
J. Biol. Chem , 1963, 238, 522 (110, 178)
- DEBRAY-VANDERSYPPE R.  
Thèse Doct. 3ème cycle, 1975, Lille (88, 168)
- DESCAMPS J.  
Thèse Doct. ès Sci., 1974, LILLE (58)
- DESCAMPS J. , SPIK G. , BRAZIER J. , MONTREUIL J.  
Non publiés (37, 115, 118)



FEENEY R.E., ALLISON R.G.

Evolutionary Biochemistry of Proteins Wiley Interscience,  
New York 1969, 171 (175)

GOT R.

Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 432 (34)

GOT R., GOUSSAULT Y., FONT J.

Carbohydrate Res., 1966, 3, 157 (99)

GREEN F.C., FEENEY R.E.,

Biochemistry, 1968, 7, 1366-1371 (44)

GROS C., LABOUESSE B.

European J. Biochem, 1969, 7, 4, 463 (123, 135, 182)

GROSS E., WITKOP B.

J. Biol. Chem., 1962, 237, 1856 (129,131)

HAN K.K.

Thèse Biologie Humaine, 1970, Lille (130)

FRAENKEL-CONRAT H., HARRIS J., LEVY A.L.

Methods Biochem. Anal., 1955, 2, 339 (150)

HARTLEY R.S.

Biochem J., 1970, 119, 805-822 (140, 155, 166, 184, 186, 197)

HAUPT H., BAUDNER S.

Hoppe -Seyler's Z. Physiol. Chem, 1973, Bd 354, 944-948 (38,57)

HEKMAN A.M.

Biochem.Biophys. Acta, 1971, 251, 380 (59)

HECKMAN A., RUMKE P.

Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq. Bruges, 1968, 16, 549-552 (13)

HIRS C.M.W.

J. Biol. Chem., 1956, 219, 611-621 (111, 151, 177)

HOFMAN T.

Biochemistry, 1964, 3, 356 (132)

HUNT L.T., DAYHOFF M.O.

Biochem. Biophys. Res. commun, 1970, 39, 757 (106)

IKENAKA T., ISHIGURO M., EMURA J.K., KAUFMAN H.,  
ISEMURA S., BAUER W., SCHMID K.

Biochemistry, 1972, 11, 3817-3829 (148)

ITANO J.A., GOTTLIEB A.J.

Biochem. Biophys. Res. Commun, 1963, 12, 405-408 (141, 144, 179)

JOHANSON B.

Acta Chem.Scand, 1960, 14, 510 (2, 4, 31, 63)

JOHANSON B.

Acta.Chem.Scand., 1969, 23, 683 (32)

KASAI K.I., YOKOYAMA S., ISHII S.I.

F.E.B.S. Letters, 1970, 11, 298-300 (126)

KEUTTMANS H.T., POTTS J.T.

Anal. Biochem., 1969, 29, 175 -185 (117, 122)

KLAPPER M.H., KLOTZ T.

Methods in enzymology, XI, "Enzyme Structure", Academic Press,  
New York et Londres, 1967 (112, 180)

KRYSTEVA M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J.

Résultats non publiés (78)

LEGER D.

Thèse Doc. 3ème cycle, 1974, Lille (40, 45, 46, 48, 83, 101)

LEGER D., SPIK G.

Résultats non publiés (95)

LEGER D., SPIK G., VERBERT A., DUPIRE C., MONTREUIL J.,  
XIè Journées Biochimiques Latines, Salamanque, 24-27 avril 1973,  
C 66 (41, 53, 102)

LOISILLIERS F., BURTIN P., GRABAR P.

Ann.Inst.Pasteur, 1968, 115, 829 (60)

LOISILLIERS F., GOT R., BURTIN F., GRABAR F.

In PEETERS H., Protides of the Biological Fluids , Elsevier éd.

Amsterdam, 1960, 14, 133 (10)

LOISILLIERS E., POZZOLI R., BURTIN P.

Path. Biol. , 1971, 19, 167-170 (29)

MALMQUIST J., JOHANSSON BG.

Biochem.Biophys. Acta, 1971, 236, 38 (61)

MANN K.G., FISH WW., COX A.C., TANFORD C.

Biochemistry , 1970, 9, 1348 (43)

MASSON P.

In "la LACTOFERRINE", 1970, Arscia Ed., Bruxelles (21, 28,

56, 57)

MASSON P.L., HEREMANS J.F.

In Peeters H., Protides of the biological Fluids, Elsevier éd.,

Amsterdam, 1966, 14, 115 (7, 26, 35, 70)

MASSON P.L., HEREMANS J.F.

Eur. J. Biochem. , 1968, 6, 579-584 (51)

MASSON, HEREMANS, DIVE.

Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 735 (11)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE MD.

The Journal of Experimental Medecine , 1969, 130, 643 (14)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E., CRABBE P.A.

In Peeters H., Protides of the Biological fluids, Elsevier éd., Amsterdam

1968, 16, 633 (12)

MAZURIER-DEHAINE C.

Thèse Doct. 3è cycle , 1973 Lille (15)

MICHL H.

Monatsh. Chem., 1951, 82, 489 (139)

MONTGOMERY R., WU Y.C.

J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (162)

MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G., LEROY N.

C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 4065 (93)

MONTREUIL J., MULLET S.

C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376, (1, 3, 8)

MONTREUIL J., SPIK G.

Microdosage des glucides, fasc. 1, Laboratoire de Chimie

Biologique Fac. Sci. Ed., Lille, 1963, (113, 158)

MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BIZERTE G.,

DAUTREVAUX M.

Experientia, 1965, 21, 254 (42)

MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S.

Biochim. Biophys. Acta., 1960, 45, 413 (22, 36, 49, 62, 64, 69, 85)

NEVILLE D. Jr.

J. Biol. Chem., 1971, 246, 6328 (137, 138, 153, 195, 196)

ORAM J.D., REITER B.

BBA., 1968, 170, 351-365 (25)

OUCHTERLONY O.

Ark.Kemi, 1949, 261, (143)

PARTRIDGE S.M.

Biochem.J., 1948, 42, 238, (161, 163)

PERCY M.E., BUCHWALD B.M.

Anal. Biochem., 1972, 45, 6067 (124, 136, 154, 183)

PORATH J.

J. Pure Appl. Chem., 1969, 244, 4985, (201)

QUERINJEAN P., MASSON P. L., HEREMANS J. P.  
Eur. J. Biochem, 1971, 20, 420 (52, 91, 100, 174)

RUMKE P. H., VISSER D., KWA H. G., HART A. A.  
Folia Med. Neerl, 1971, 14, 156-168 (30)

SCHEIDEGGER J. J.

Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (142)

SPACKMAN P. H., STEIN W. H., MOORE S.  
Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (120)

SPIK G.,

Thèse Doct. ès Sci., 1968, Lille, (39, 50, 87, 90, 96, 103, 145)

SPIK G.

Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, A81 - A 134 (20)

SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G.  
BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J.

Arch. Inter. Physiol. Biochim., 1974, 82, 29 (92)

SPIK G., MONSIGNY A., MONTREUIL J.,

C. R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893 (104 b)

SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2186 (97, 98)

SPIK G., MONTREUIL J.

C. R. Soc. Biol., 1966, 160, 94 (18)

SPIK G., MONTREUIL J.

International Symposium IV Chromatographie -Electrophorèse  
Bruxelles, 1966, Presses Acad. Europeennes éd., Bruxelles,  
1968, 36, (1046)

SPIK G., MONTREUIL J.

Résultats non publiés (94)

SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J.

Actes du colloque international n°211 du CNRS sur les glyco conjugués, Villeneuve d'Ascq 21-27 juin 1973, Ed. CNRS, Paris, 1974, 483-500 (81)

SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D. HAN K. K.,

FEBS Letters, 1974, 38, 213 (84, 105, 108, 125, 150, 159, 160, 164, 165, 167, 169)

SQUIRE P.G., DELIN S., PORATH T.

Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 409-421, (194)

STEERS E., CRAVEN G.R., ANFINSEN C.B., BETHUNE J.C.

J. Biol. Chem., 1965, 240, 2478 (198, 133, 134)

SUTTON M.R., BREW K.

Biochem J., 1974, 139, 163-168 (199, 171)

TE UWISSEN B., MASSON P.L., OSINSKI P., HEREMANS J.F.

Eur. J. Biochem., 1972, 31, 239-245 (72, 74)

TEUWISSEN B., MASSON P.L., OSINSKI P., HEREMANS J.F.

Eur. J. Biochem., 1973, 35, 366-371 (76)

TEUWISSEN B., SCHANCK K., MASSON P.L., OSINKI P.A., HEREMANS J.

Eur. J. Biochem., 1974, 42, 411-417 (47)

TSAO D., AZARI P., PHILLIPS J.

Biochem J., 1974, 13, 397-403 (173)

WOODS K.S., WANGS K.T.

Biochem. Biophys. Acta, 1967, 133, 369-370, (185)

YPHANTIS D.A.

Biochemistry, 1964, 3, 297 (147, 191)

ZANETTA J.C., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G.

J. Chromatogr., 1972, 69, 291-304 (114, 116, 181)