

50376
1979
35

50376
1979
35

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

ANNEE 1979

THESE

présentée pour obtenir le diplôme

de Docteur d'Etat
en "Sciences Naturelles"

par

SIMONE JUNQUA

LES CONSTITUANTS MOLECULAIRES DE LA
MATRICE INTERCELLULAIRE DES SPONGIAIRES

Soutenue le 30 mai 1979



Jury : MM. J. BOREL
C. LEVI
J. MONTREUIL
M. PAVANS de CECCATTY
L. ROBERT
Mlle G. SPIK

Monsieur ROBERT m'a accueillie dans son laboratoire et m'a ainsi permis de trouver une nouvelle orientation. Je lui dois aussi le choix de ce sujet, qu'il veuille trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur MONTREUIL de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être l'un des rapporteurs de cette thèse.

A Monsieur le Professeur BOREL j'exprime ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Que Mademoiselle SPIK, Monsieur LEVI et Monsieur PAVANS de CECCATTY trouvent ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie sincèrement Mademoiselle BAZIN dont la bienveillance et les encouragements m'ont été très précieux.

Je dois beaucoup à la collaboration qui s'est établie dès le début de ce travail avec Monsieur GARRONE. Je lui exprime toute ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à
Madame LEMONNIER et Monsieur VACELET
pour leur aide précieuse.

J'ai beaucoup apprécié l'aide dactylogra-
phique de Madame FISCHER, je l'en remercie
très amicalement. Mes remerciements vont
aussi à Madame DEROUETTE pour sa contribution.

Je ne saurais oublier mes collègues et amis
du Laboratoire de Biochimie du Tissu
Conjonctif, qu'ils trouvent ici l'expression
de toute ma sympathie.

LES CONSTITUANTS MOLECULAIRES DE LA
MATRICE INTERCELLULAIRE DES SPONGIAIRES

	Page
<u>CHAPITRE I : LES MACROMOLECULES DE LA TRAME CONJONCTIVE</u>	
1 - COLLAGÈNE	3
A - STRUCTURE	3
B - BIOSYNTHESE	5
a) Assemblage ribosomal des chaînes polypeptidiques	6
b) Hydroxylation de la proline et de la lysine	6
c) Glycosylation	9
d) Formation de la triple hélice	9
e) Sécrétion	10
2 - PROTÉOGLYCANNES	12
A - ACIDE HYALURONIQUE	12
B - CHONDROITINE	12
C - CHONDROITINE SULFATES	14
D - DERMATANE SULFATÉ	14
E - HEPARANE SULFATE	14
F - KERATANE SULFATE	14
3 - GLYCOPROTÉINES DE STRUCTURE	16
4 - ELASTINE	25

CHAPITRE II - LES SPONGIAIRES

A - CARACTERES GENERAUX	29
B - CLASSIFICATION	32
C - ESPECES ETUDIEES	34

CHAPITRE III - LES FORMATIONS COLLAGENES DES EPONGES

1 - Isolement des formations collagènes	38
A - PAR DIGESTION ENZYMATIQUE	38
B - PAR DIGESTION DANS LE SDS	40
2 - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE	42
A - LES FIBRILLES	42
B - LES MICROFIBRILLES	42
3 - HYDROLYSE	49
A - ENZYMATIQUE	49
B - ACIDE	50
C - ALCALINE	50
4 - TENTATIVES D'ISOLEMENT DES CHAÎNES ALPHA	56
5 - COMPOSITION CHIMIQUE	58
A - COMPOSITION GLOBALE	58
B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES	60
C - HYDROXYLATION DE LA PROLINE	66
D - HYDROXYLATION DE LA LYSINE	71
E - GLYCOSYLATION DE L'HYDROXYLYSINE	73
F - RESIDUS CYSTEINE	77
G - LIAISONS COVALENTES INTRA- ET INTERMOLECULAIRES	78

6 - CONCLUSIONS	85
<u>CHAPITRE IV</u> - LES COMPOSANTS NON COLLAGENIQUES	88
1 - PRÉSENCE DES GLYCOPROTÉINES DE STRUCTURE DANS LA MATRICE INTERCELLULAIRE DES ÉPONGES	89
2 - ISOLEMENT DES COMPOSANTS NON-COLLAGÉNIQUES	98
A - DESCRIPTION DE LA METHODE D'ISOLEMENT	98
B - PROTEASES TISSULAIRES	103
C - BACTERIES ASSOCIEES	106
D - CHOIX DES SOLUTIONS TAMPONNEES	109
3 - ELIMINATION DU DODÉCYL SULFATE	113
4 - FRACTIONNEMENT DES GLYCOCONJUGUÉS DE SPONGIA SUR LES LECTINES	116
A - FRACTIONNEMENT SUR ConA-SEPHAROSE 4B	117
B - FRACTIONNEMENT SUR WGA-SEPHAROSE 4B	118
C - COMPOSITION EN GLUCIDES DES CINQ FRACTIONS ISOLEES SUIVANT LEUR AFFINITE POUR LES LECTINES	122
a) Distinction de deux types moléculaires	122
b) Détermination des constituants glucidiques	125
c) Les acides sialiques existent-ils chez les Spongiaires ?	127
d) L'affinité des constituants glucidiques pour les lectines	130
D - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES CINQ FRACTIONS ISOLEES SUIVANT LEUR AFFINITE POUR LES LECTINES	132
5 - ETUDE DE LA FRACTION POLYSACCHARIDIQUE AI	134
6 - ETUDE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES FRACTIONS GLYCOPROTÉINES ET DE LA FRACTION POLYSACCHARIDE ACIDE	141

7 - DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE APPARENT DES FRACTIONS GLYCOPROTÉINES	143
A - EN GELS DE POLYACRYLAMIDE EN SDS	144
B - SUR COLONNE CALIBRÉE DE BIOGEL-A 1,5 m	146
8 - PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES DES GLYCOCONJUGUÉS DE SPONGIA	148
A - L'ANTIGENICITÉ	148
B - LA SPÉCIFICITÉ IMMUNOLOGIQUE D'ESPECE	153
C - L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	158
9 - LOCALISATION SUR COUPE D'ÉPONGE DES CONSTITUANTS NON COLLAGÉNIQUES MONTRANT UNE AFFINITÉ POUR LES LECTINES	160
10 - CONCLUSION	164
A - LES GLYCOPROTEINES	165
B - LES POLYSACCHARIDES ACIDES	167
<u>CHAPITRE V</u> - LES SPONGIAIRES ET LA PHYLOGÈNESE DE LA TRAME CONJONCTIVE	169
<u>CHAPITRE VI</u> - METHODES	181
1 - DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES PROTÉINES	182
2 - DÉTERMINATION DE L'AZOTE PAR LA MICROMÉTHODE KJELDAHL	182
3 - DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS	183
A - CHROMATOGRAPHIE SUR UN AUTO-ANALYSEUR	183
B - DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'HYDROXYPROLINE	184

4 - RÉDUCTION ET CARBOXYMÉTHYLATION DES PROTÉINES	184
5 - FILTRATION SUR GEL	185
6 - ESTIMATION DU POIDS MOLÉCULAIRE	185
A - PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE DE DODECYL-SULFATE	185
B - PAR FILTRATION SUR BIOGEL A-1,5 m	187
7 - HYDROLYSES DES FORMATIONS COLLAGÈNES	188
A - HYDROLYSES ENZYMATIQUES	188
B - HYDROLYSES ACIDES ET ALCALINES	188
8 - ÉTUDE DES LIAISONS COVALENTES INTRA- ET INTER- MOLÉCULAIRES DU COLLAGÈNE	189
A - REDUCTION DES COLLAGENES	190
B - HYDROLYSE DES COLLAGENES REDUITS	190
C - ISOLEMENT DES COMPOSANTS RADIOACTIFS DU COLLAGENE REDUIT ET HYDROLYSE	190
D - ANALYSE DES FRACTIONS DE LA COLONNE	191
9 - DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN GLUCIDES	191
A - DOSAGES COLORIMÉTRIQUES	191
a) Les oses neutres	192
b) Les hexosamines	192
c) Les acides uroniques	192
B - EVALUATION PAR CHROMATOGRAPHIE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES	192
a) par chromatographie en couche mince	192
b) par chromatographie en phase gazeuse	193

C - DETERMINATION DES ACIDES SIALIQUES	193
a) Hydrolyse des liaisons "sialyl"	193
b) Purification sur échangeurs d'ions des acides sialiques	194
c) Dosages colorimétriques	195
d) Evaluation des acides sialiques par chromatographie en couche mince	195
D - DETERMINATION DES UNITES MONO- ET DISACCHARIDIQUES LIEES AU COLLAGENE	196
10 - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR LECTINES	197
A - SUR ConA-SEPHAROSE	197
B - SUR WGA-SEPHAROSE	198
a) Couplage de la lectine au gel	198
b) Chromatographie sur colonne	198
11 - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES POLYSACCHARIDES ANIONIQUES (GLYCOSAMINOGLYCANNES DES TISSUS DE VERTÉBRÉS)	199
A - DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PARTIE PROTEINIQUE	199
B - PRECIPITATION AU CHLORURE DE CETYL-PYRIDINIUM (CPC)	199
C - ELECTROPHORESE	200
D - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GLYCOSAMINOGLYCANNES	200
a) Digestion sur la chondroïtinase ABC	200
b) Digestion avec la hyaluronidase	201
E - SEPARATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES SUR UNE MICRO-COLONNE DE CELLULOSE	201
12 - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES PAR DIFFUSION ET ÉLECTROPHORÈSE	202
A - PREPARATION DE L'ANTISERUM	202

B - DOUBLE DIFFUSION EN GEL D'AGAROSE	202
C - IMMUNO-ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	204
a) Première dimension	204
b) Deuxième dimension	205
D - IMMUNO-ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE EN TANDEM	205
13 - MÉTHODE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	206
A - COUPE ET FIXATION	206
B - PREPARATION DU CONJUGUE FLUORESCENT	207
a) Précipitation des globulines	207
b) Combinaison globulines-isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine	207
c) Chromatographie du mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex G50	208
d) Fractionnement du conjugué sur colonne de cellulose DE 52	209
e) Détermination du rapport fluorochrome/protéine	209
C - REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	211
14 - MISE EN ÉVIDENCE SUR COUPE DE TISSU DE L'AFFINITÉ DES GLYCOPROTÉINES POUR LES LECTINES	212
15 - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	213
16 - DOSAGE DU SULFATE	214
17 - DOSAGE DU FER	214
18 - DOSAGE DES CENDRES	214

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

LES MACROMOLÉCULES DE LA MATRICE INTERCELLULAIRE

Le tissu conjonctif est une organisation formée essentiellement de cellules et d'une matrice extracellulaire. Cette matrice peut être définie comme la matière extracellulaire organisée localisée en surface des cellules et entre les cellules des organismes multicellulaires. Les molécules qui la composent sont impliquées dans la protection, l'organisation, l'assemblage et les transferts intercellulaires d'information dans le tissu en voie de développement ou mature.

Les principaux constituants macromoléculaires de la substance fondamentale conjonctive sont au nombre de quatre : protéoglycannes, collagène, glycoprotéines de structure, élastine. Les proportions relatives de ces 4 familles de macromolécules, leur minéralisation éventuelle et leur organisation dans les espaces intercellulaires, vont déterminer les caractéristiques des différents types de tissus conjonctifs : lâche, fibreux, élastique, cartilagineux, osseux, etc. Une même catégorie cellulaire pourrait donc sécréter tous les constituants de la matrice fondamentale, mais en quantité variable selon le type de tissu.

Les fibroblastes de la peau sécrètent du collagène et, en quantité moindre, de l'élastine. Les cellules musculaires lisses de l'aorte déposent également du collagène, mais beaucoup plus d'élastine.

Les kératocytes synthétisent une matrice dont l'organisation régulière va permettre la transparence de la cornée. Les chondrocytes forment la matrice du cartilage, particulièrement riche en protéoglycannes. Les ostéoblastes de l'os élaborent un collagène qui sera fortement minéralisé.

Les cellules des invertébrés synthétisent également une trame conjonctive qui reste encore souvent mal définie. Ce travail a pour but d'essayer de caractériser les macromolécules qui constituent la matrice extracellulaire d'animaux pluricellulaires très primitifs, les Spongiaires, et de les comparer à celles qui ont été isolées à partir des tissus de vertébrés ou à partir d'autres invertébrés.

Avant d'aborder l'essentiel de ce travail, les principales caractéristiques structurales des 4 types de macromolécules vont être brièvement rappelées.

1 - LE COLLAGÈNE

De nombreuses études ont été faites sur le collagène et nous ne saurions les citer toutes. Nous nous permettons donc de ne citer que quelques excellentes revues récentes (Vieillard et Borel, 1973 ; Grant et Jackson, 1976 ; Kivirikko et Risteli, 1976 ; Piez, 1976 ; Prockop et coll., 1976).

Nous ne rappellerons ici que les notions essentielles. Certains points de détail seront repris et soulignés au cours de l'étude du Collagène des Eponges dans le Chapitre III.

A - STRUCTURE

Les fibres de collagène constituent le principal élément structural de la plupart des tissus conjonctifs de vertébrés. Ces fibres sont formées par l'alignement exact de monomères ou molécules de tropo-collagène. Ces molécules sont constituées de trois chaînes polypeptidiques élémentaires appelées chaînes α qui s'enroulent en spirale formant une triple hélice. Le poids moléculaire d'une chaîne α est d'environ 95.000, aussi celui de la molécule de procollagène est d'environ 300.000.

Cinq chaînes α génétiquement différentes, ont été actuellement décrites à partir de tissus de vertébrés. Leur composition en acides aminés et leur arrangement dans la molécule a permis de distinguer plusieurs types de collagène, dont la composition et l'origine tissulaire sont données dans le Tableau 1. De plus, récemment Burgeson et coll. (1976) décrivent deux nouvelles chaînes α

Tableau 1 : Répartition tissulaire des différents types de collagène connus.

Type	Composition	Tissu d'origine
I	$ \alpha_1(\text{I}) _2 \alpha_2$	os derme tendon dentine
II	$ \alpha_1(\text{II}) _3$	cartilage
III	$ \alpha_1(\text{III}) _3$	embryon derme jeune système cardiovasculaire
IV	$ \alpha_1(\text{IV}) _3$	membranes basales glomérulaires
V	$\alpha_1^A \alpha_1^B _2$	membranes basales placentaires



qu'ils isolent à partir de la membrane collagénique du foetus humain et qu'ils appellent α [A] et α [B]. Dernièrement Brown et coll. (1978) décrivent dans la membrane synoviale, la gencive et la peau en plus des chaînes α [A] et α [B] une troisième chaîne α [C].

Les tissus mentionnés dans le Tableau 1 contiennent le type de collagène indiqué en quantité prédominante, mais de nombreux tissus contiennent plus d'un type de collagène.

La structure primaire de tous les types de chaînes α possède des caractéristiques constantes. Les chaînes α , à l'exception des parties non hélicoïdales aminoterminals et carboxyterminales, sont constituées de la répétition d'unités tripeptidiques [gly-X-Y]. Dans cette structure, les positions X et Y peuvent être occupées par une variété d'acides aminés, mais fréquemment l'acide aminé en position X est la proline et en position Y la 4-hydroxyproline. Par contre, la 3-hydroxyproline se retrouve en X.

L'hydroxyproline et l'hydroxylysine ont été considérées comme spécifiques du collagène, mais de petites quantités d'hydroxyproline ont été trouvées dans l'élastine (Sandberg, 1976) et l'hydroxyproline et l'hydroxylysine sont toutes deux présentes dans le composant Clq du complément (Reid, 1976).

B - BIOSYNTHESE

Les chaînes polypeptidiques du collagène sont synthétisées par les diverses cellules conjonctives et notamment les fibroblastes suivant le mode général de biosynthèse des protéines. Cependant,

dans une deuxième phase post-transcriptionnelle, plusieurs réactions vont intervenir et modifier la chaîne initiale.

a) Assemblage ribosomal des chaînes polypeptidiques (Figure 1)

Comme les autres protéines, les chaînes polypeptidiques du collagène sont synthétisées dans les complexes du ribosome contenant les RNA messagers. Des polypeptides, riches en proline et lysine, sont formés. Dans ce précurseur du collagène, l'hydroxyproline et l'hydroxylysine libres ne sont pas incorporées. L'hydroxylation est un processus enzymatique qui a lieu sur les résidus proline et lysine incorporés dans le peptide en formation. Les chaînes peptidiques synthétisées sont plus longues que les chaînes α définitives. Elles sont formées de 1250 résidus, c'est-à-dire 200 de plus. Comme bien d'autres protéines, le collagène est initialement synthétisé sous la forme d'un précurseur, le procollagène, plus grand qui sera ensuite raccourci par protéolyse (Figure 2).

Les peptides supplémentaires se distinguent de la partie centrale de la molécule par leur composition en acides aminés. Ils contiennent en particulier des quantités importantes de cystéine, tryptophane et tyrosine. Le tryptophane est absent du collagène mature. La cystéine se retrouve en faible quantité dans le collagène de type III et de type IV (Epstein, 1974 ; Kefalides, 1973).

b) Hydroxylation de la proline et de la lysine

Deux enzymes distinctes sont chargées de l'hydroxylation de certains résidus proline et lysine des chaînes polypeptidiques. Ce

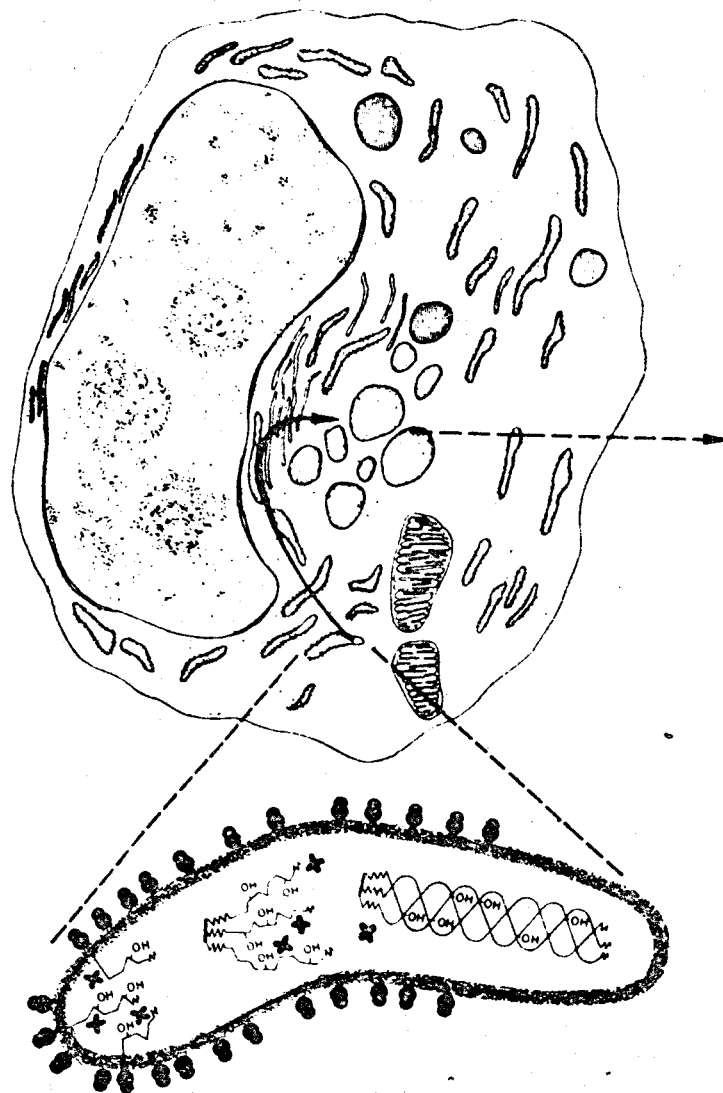


Figure 1 : D'après Prockop et coll. (1976). Représentation schématique de l'assemblage et de la sécrétion du procollagène par un fibroblaste. Le schéma montre l'assemblage du procollagène en triple hélice dans le réticulum endoplasmique, le passage de la protéine dans les vacuoles de Golgi et sa sécrétion.

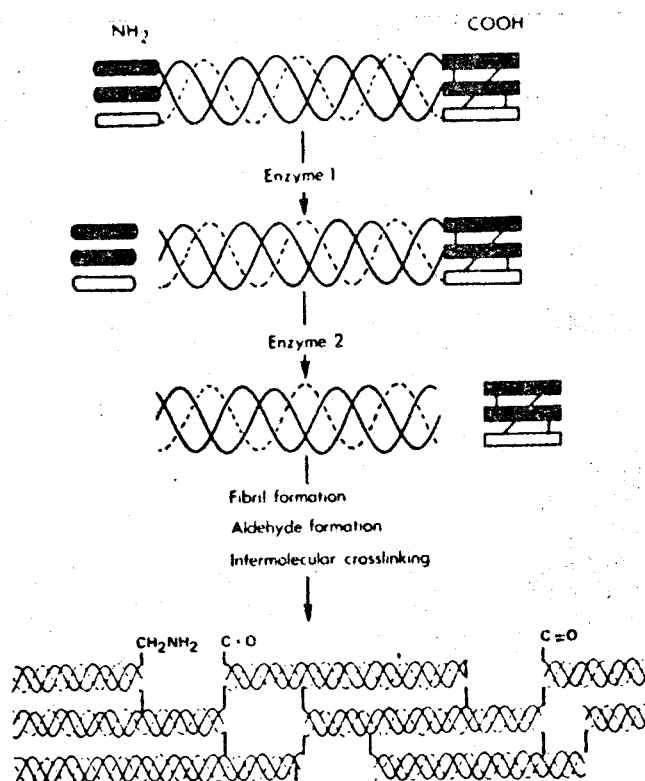


Figure 2 : D'après Grant et Jackson (1976). Résumé des événements survenant extracellulairement au cours de la formation d'une fibre de collagène de type I.

sont respectivement la prolyl-hydroxylase et la lysyl-hydroxylase. L'hydroxylation ne se produit pas au hasard. La prolyl-hydroxylase agit seulement sur les résidus proline précédant immédiatement un résidu glycine. De plus, l'enzyme nécessite pour son fonctionnement la présence d'oxygène moléculaire, d'ions ferreux, d' α -céto-glutarate et d'acide ascorbique. Les mêmes agents sont requis par la lysyl-hydroxylase pour l'hydroxylation de certains résidus lysine, pour la plupart situés aussi en position 3 dans le tripeptide répétitif du collagène Gly-X-Y.

Ces réactions se produisent sur les chaînes peptidiques au cours de leur assemblage avant leur dégagement des ribosomes.

c) Glycosylation

La glycosylation intervient aussitôt après l'hydroxylation de la lysine sur les peptides naissants. Un mono- ou disaccharide, le galactose ou le glucosyl-galactose, va former une liaison covalente O-glucosidique avec un carbone de l'hydroxylysine. La réaction est catalysée par deux transglycosylases.

d) Formation de la triple hélice

L'association des 3 chaînes polypeptides commence au niveau des peptides supplémentaires ou peptides de coordination, et la triple hélice commence à s'établir lorsque les chaînes en formation sont encore attachées aux polyribosomes. Quand la molécule de procollagène est entièrement synthétisée, la formation de ponts disulfures, entre les résidus cystéine du peptide C-terminal, maintient l'assem-

blage des trois chaînes, dans les peptides extra-hélicoïdaux (Schofield et coll. 1974 ; Byers et coll. 1974).

Les résidus hydroxyproline joueraient un rôle essentiel dans la stabilisation de la triple hélice comme le suggèrent certaines études faites sur un collagène non hydroxylé (Berg et Prockop, 1973/a ; Sakakibara et coll. 1973).

e) Sécrétion

Le transport intracellulaire du procollagène est encore peu connu. Les extensions peptidiques des triples hélices pourraient empêcher leur aggrégation et faciliter leur sécrétion.

Le clivage des peptides de coordination du procollagène par une protéase spécifique, la procollagène-peptidase (Lapière et coll. 1971, 1975) a lieu après la sécrétion, hors de la cellule, des molécules.

La présence de procollagène dans les milieux de diverses cultures de cellules indiquerait une action extracellulaire de cette enzyme (Church et coll. 1973). Récemment, a été décrite l'existence d'au moins deux protéases spécifiques, l'une clivant le peptide N-terminal, l'autre le peptide C-terminal (Davidson et coll. 1977). La destinée des peptides de coordination isolés est encore imprécise. Nous indiquerons plus loin (p. 19) les hypothèses actuellement avancées.

Dès que le procollagène est enzymatiquement transformé en tropo-

collagène, les molécules hélicoïdales vont s'organiser et rapidement former les fibres striées, stabilisées par des liaisons quaternaires qui s'établissent entre les molécules. Ces liaisons covalentes se forment par des condensations à partir de résidus lysine et hydroxylysine oxydés sous l'action d'une enzyme amino-dépendante, la lisyloxydase ayant le cuivre comme cofacteur. Dans les fibrilles, les molécules se placent exactement en files parallèles avec un décalage d'un quart de leur longueur. Il est possible que les protéoglycannes et les glycoprotéines, secrétés par les mêmes cellules, puissent guider et orienter les molécules de tropocollagène lors de leur polymérisation en fibrilles.

2 - LES PROTÉOGLYCANNES

Leur structure est formée d'une chaîne peptidique de type épine dorsale sur laquelle sont fixées perpendiculairement de part et d'autre des chaînes polysaccharidiques linéaires ou glycosaminoglycannes. La caractéristique fondamentale de ces glycosaminoglycannes est leur structure primaire : répétition d'unités saccharidiques élémentaires (acide uronique-osamine ou galactose-osamine) (Figure 3). L'enchaînement de ces unités répétitives est attaché au groupement hydroxyl d'un résidu séryl de la protéine porteuse par l'intermédiaire d'une séquence trisaccharide xylose-galactose-galactose.

Certains glycosaminoglycannes sont porteurs de groupements sulfate diversement répartis dans la molécule, le critère de distinction étant la position du groupement sulfate sur l'hexosamine.

A - ACIDE HYALURONIQUE

Largement réparti dans les organismes, l'acide hyaluronique est présent dans toute la substance fondamentale conjonctive. Il est généralement en étroite association avec les autres glycosaminoglycannes et les protéines.

B - CHONDROÏTINE

La chondroïtine n'existe qu'en petite quantité dans la matrice extracellulaire de certains tissus conjonctifs (cornée).

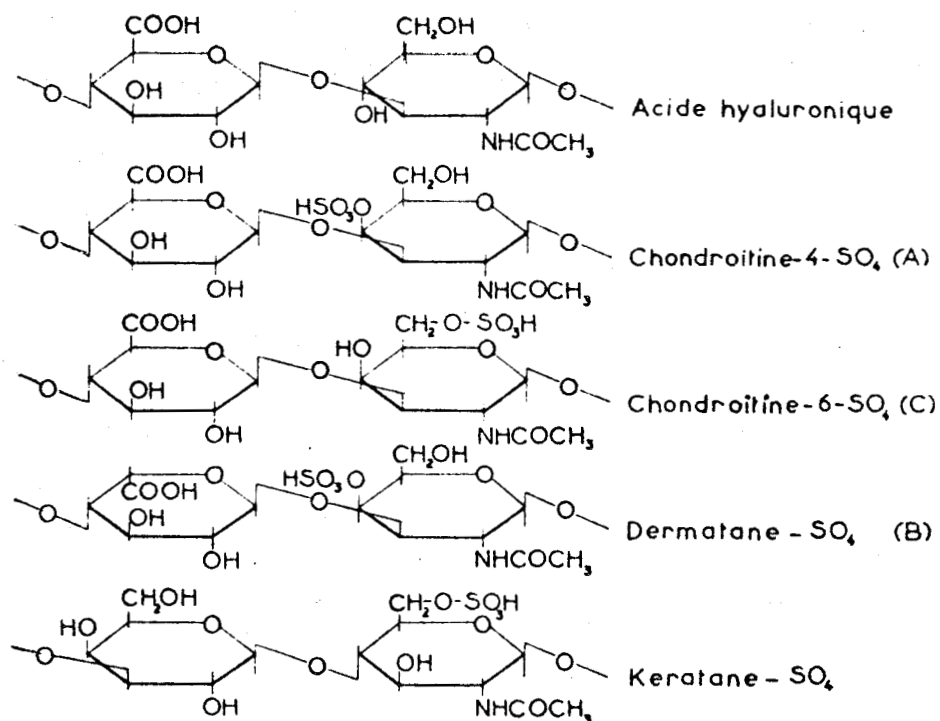


Figure 3 : Formule chimique des unités répétitives (disaccharides) des chaînes glycosaminoglycannes des protéoglycannes.

C - CHONDROÏTINE-SULFATES

L'existence de groupements acides uronique et sulfurique fait des chondroïtine-sulfates des macromolécules porteuses de nombreuses charges négatives, aptes à fixer très fortement les cations.

Le chondroïtine-4-sulfate ou chondroïtine sulfate A est particulièrement abondant dans le cartilage et dans l'os en voie de croissance. On le trouve dans la cornée et la sclère.

Le chondroïtine-6-sulfate ou chondroïtine-sulfate C est en quantité importante dans le cordon ombilical, les tendons, le cartilage.

D - DERMATANE-SULFATE

Ce glycosaminoglycane a été découvert et extrait de la peau de porc par Meyer et Chaffée en 1941. Il a ensuite été détecté dans le tendon, l'aorte, le ligament large, le poumon.

E - HEPARANE-SULFATE

L'héparane-sulfate est une structure porteuse de nombreux groupements sulfate, et existe dans l'aorte.

F - KERATANE-SULFATES

Contrairement aux autres glycosaminoglycannes, les kérate-sulfates ne contiennent pas d'acide uronique mais du galactose lié à la N-acétylglucosamine. La sulfatation, dans un degré très variable, intervient sur le résidu N-acétylglucosamine en position C-6 et aussi sur le résidu galactose en position C-6. Les molécules de

kéراتane-sulfates contiennent en outre un excès de galactose et d'autres monosaccharides comme l'acide sialique, la N-acétyl-galactosamine, des sucres neutres tels que le fucose et le mannose. L'existence de deux kéراتane-sulfates distincts, isolés respectivement de la cornée de boeuf et du cartilage, a été montrée par Meyer et coll. (1953 et 1958). Les deux préparations possèdent la même unité disaccharidique répétitive mais montrent par ailleurs de telles différences que les auteurs ont distingué le kéراتane I de la cornée et le kéراتane II du cartilage (Seno et coll. 1965 ; Mathews et Ciponelli, 1965 ; Hopwood et Robinson, 1974).

Les chaînes glycosaminoglycannes attachées par leurs résidus saccharidiques terminaux à une protéine porteuse constituent des macromolécules : les protéoglycannes (Mathews et Lozaityte, 1958).

Les complexes protéoglycane-acide hyaluornique du cartilage ont été les plus étudiés ; il a été en effet montré que l'interaction des protéoglycannes avec l'acide hyaluronique (Hardingham et Muir, 1972, 1973, 1974 ; Christner et coll. 1977) et sans doute deux protéines de liaison (Baker et Caterson, 1977, 1978 ; Bonnet et coll. 1978) provoquent la formation d'agrégats volumineux stables. L'organisation de ces agrégats a pu être définie (Hascall et Heinegard, 1974/a, 1974/b ; Hardingham et Muir, 1975) et une structure a été proposée (Figure 4).

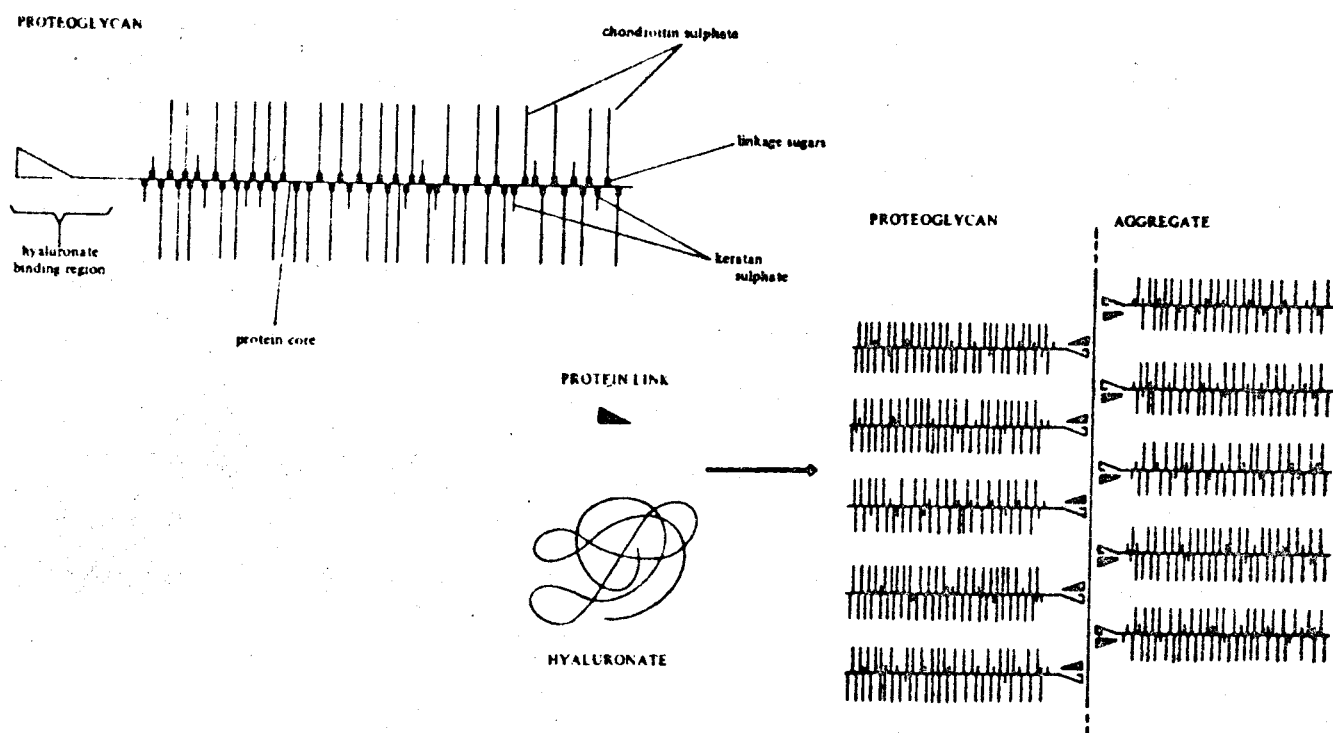


Figure 4 : D'après Muir (1977). Structure et organisation d'agrégats protéoglycanniques formés par l'interaction des protéoglycannes avec l'acide hyaluronique et les protéines de liaison ("protein-link").

3 - LES GLYCOPROTÉINES DE STRUCTURE

Même si elles ne sont pas encore parfaitement définies, l'existence des glycoprotéines non collagéniques comme macromolécules de la trame conjonctive est actuellement admise par tous. Elles ont été décrites sous différents noms et les deux principaux sont : glycoprotéines de structure (Robert et coll., 1966) et protéines de structure acides (Timpl et coll. 1969).

Fortement liées au collagène, elles ont souvent été obtenues après solubilisation de celui-ci dans l'acide trichloracétique à chaud, ou après digestion enzymatique par la collagénase. De nombreux auteurs ont isolé ces glycoprotéines à partir de tissus et d'espèces très variés, en utilisant différentes méthodes. Le Tableau 2 rapporte quelques exemples.

Leur séparation difficile du collagène insoluble, la facilité avec laquelle elles s'associent *in vitro* pour former des complexes macromoléculaires rendent leur purification malaisée et bien peu de glycoprotéines de structure ont été isolées dans un état de pureté satisfaisant.

Toutefois, quelles que soient leur origine, leurs compositions en acides aminés sont très voisines et caractérisées par une forte proportion d'acides aminés dicarboxyliques et hydrophobes et par la présence de cystéine. L'analyse des acides aminés est indubitable-

ISOLEMENTS DE QUELQUES GLYCOPROTEINES DE LA MATRICE
INTERCELLULAIRE RAPPORTES DANS LA LITTERATURE.



SOURCE	METHODE	AUTEURS
Os de boeuf et de lapin	Extraction à l'EDTA	HERRING et KENT (1963)
Cornée	Urée 8M après TCA à 90°C	ROBERT et DISCHE (1963)
Aorte de boeuf	Extraction au NaCl 0,15M, fractionnement $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	RADHKROSHNAMURTHY et coll. (1964)
Aorte thoracique humaine	Extraction dans alcali froid et purification sur DEAE cellulose	BARNES et PARTRIDGE (1968)
Peau de lapin, articulation du genou de veau	Urée 8M et NaOH 0,2M après TCA	TIMPL et coll (1968)
Ligament large de veau fœtal	Extraction guanidine 6M, digestion collagénase	ROSS et BORNSTEIN (1969)
Granulome de la peau de rat	Digestion collagénase et chromatographie sur colonne	RAJAMAKI et KULONEN (1971)
Tendon d'Achille de boeuf Glycoprotéine A Glycoprotéine B	Extraction NaCl 0,2M Extraction MgCl_2 3M	ANDERSON et JACKSON (1971)
Muscle d'Ascaris Lumbricoides	Digestion collagénase ou traitement au TCA chaud	FUJIMOTO et ITSOKA (1972)
Metridium dianthus (anémone de mer)	Extraction acide acétique 2 %	KATZMAN (1972)
Membrane basale glomérulaire	Digestion collagénase	KEFALIDES (1972)
Capsule cristalline de poulet	Extraction avec solution saline pH 7,0	MAISEL et PERNY (1972)
Peau de lapin	Digestion collagénase et colonne Biogel P200	STOUPY et coll (1972)

TABLEAU 2 (Suite)

SOURCE	METHODE	AUTEURS
Intima d'aorte de porc	Extraction dans tampon à pH neutre, fractionnement $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et chromatographie DEAE	WAGH et ROBERTS (1972)
Capsule cristalline de boeuf	Digestion collagénase	DISCHE et MURTY (1973)
Col utérin humain	Extraction TCA chaud et solubilisation urée 8M	GROSCHER-STEWART et coll. (1973)
Capsule cristalline, cornée et sclérotique	Extraction urée 8M après traitement TCA	VAN DER EERDEN et BROEKHUYSE (1973a)
Cortex osseux de lapin	Extraction EDTA et digestion collagénase	TRIFITT et OWENS (1973)
Tissus pulmonaires de boeuf	Urée 8M + urée 8M- NaBH_4 0,1M urée 8M-mercaptoéthanol 0,1M- NaOH 0,1M	FRANCIS et THOMAS (1975)
Cartilage costal de chiot	Digestion collagénase	SHIPP et BOWNESS (1975)
Peau de rat	Extraction solution saline neutre, précipitation acide acétique, solubilisation Triton X 100	CHANDRARAJAN et KLEIN (1975)
Peau Sepia Officinalis	Extraction avec NaCl 0,8 % et CaCl_2 1M	MOCZAR et MOCZAR (1976)

ment un critère de pureté valable pour une préparation de collagène ou d'élastine, car ces protéines sont caractérisées par des profils d'acides aminés très typiques. Par contre, de nombreuses protéines ont un profil d'acides aminés similaire à celui des glycoprotéines de structure; ainsi certaines enzymes des tissus conjonctifs comme la lysyloxydase, et, certaines glycoprotéines sériques (Boenish et Alper, 1970a, 1970b) ont une composition en acides aminés comparable à celle des glycoprotéines de la matrice conjonctive. Toutefois, si une étude des macromolécules extracellulaires est envisagée, une extraction préliminaire des tissus est généralement effectuée avec une solution physiologique qui doit éliminer la plupart des protéines sériques.

Comme nous l'avons vu, le collagène est synthétisé sous la forme d'un précurseur plus grand et plus soluble : le procollagène qui possède des extensions peptidiques dans les régions carboxy et amino-terminales (Fessler et coll, 1975 ; Byers et coll, 1975 ; Davidson et coll, 1975). Ces parties non collagène seraient excisées en bloc plutôt qu'en fragments multiples par des endopeptidases spécifiques (Kohn et coll, 1974). La question de leur devenir se pose. Il a été montré que l'extension peptidique du procollagène, un glycopeptide qui contient 2,3 % d'hexoses, moins de 0,2 % d'acides sialiques et d'hexosamines (Furthmayer et coll, 1972) se trouve dans les extensions peptidiques du procollagène. Ces peptides ont-ils un rapport avec les glycoprotéines de structure et peuvent-ils participer à l'organisation de la trame conjonctive ? Cette possibilité a été mentionnée par Timpl et coll (1973) et von der March et Bornstein (1973).

Pourtant, une absence de corrélation entre la biosynthèse du collagène et celle des protéines non collagène semble se dégager des résultats suivants :

Le tissu de la cornée d'embryon de poulet est nettement plus riche en glycoprotéines de structure qu'en collagène. Au cours du vieillissement, le rapport s'inverse et les glycoprotéines de structure ne représentent plus que 11 % des protéines de la cornée de la poule (Robert et coll, 1969).

En culture organotypique (Reyss-Brion et Salaün, 1971), en présence de proline radioactive, des différences très nettes apparaissent entre la radioactivité des extraits à l'acide trichloracétique qui contiennent le collagène et les extraits de l'urée qui solubilisent les glycoprotéines de structure (Tableau 3) (Résultats non publiés). Les activités spécifiques très différentes, d'une part des imino-acides de la fraction collagène soluble, et, d'autre part de la proline des protéines non collagène suggèrent, pour ces deux types de macromolécules, des processus de biosynthèse indépendants. L'augmentation linéaire de la radioactivité dans l'hydroxyproline et la proline du collagène polymérique souligne l'incorporation lente mais régulière du collagène nouvellement synthétisé dans le stroma.

Pour éviter les méthodes d'extraction sévères qui donnent souvent des préparations hétérogènes de glycoprotéines dénaturées et partiellement dégradées, certains auteurs (Sear et coll, 1975, 1976, 1977, 1978 ; Muir et coll, 1976), choisissant une approche diffé-

TABLEAU 3

Incorporation de la radioactivité dans la proline et l'hydroxyproline
des différents extraits macromoléculaires d'embryon de Poulet de 14 jours
en culture organotypique

Nombre de jours en culture	A c t i v i t é s p é c i f i q u e en dpm/ μ g				
	Protéines solubles dans CaCl_2 1M		Stroma insoluble		
	Extrait TCA collagène soluble	Extrait urée GPS	Extrait TCA collagène	Extrait urée GPS	
1	3600	7000	980	920	3600
2	3860	7900	1950	1940	4100
3	3870	7200	2500	2400	4040
4	4040	6880	3100	3500	4060



rente, ont étudié les glycoprotéines synthétisées par des cellules du tissu conjonctif en culture. Des glycoprotéines similaires de haut poids moléculaire ont été trouvées respectivement dans les milieux de culture des fibroblastes de la peau humaine (Sear et coll, 1975, 1976) et des cellules musculaires lisses de l'aorte (Muir et coll, 1976). Ces derniers auteurs suggèrent que ces glycoprotéines pourraient être une subunité des protéines microfibrillaires trouvées dans les tissus élastiques.

Cependant, de nombreux points communs apparaissent entre ces glycoprotéines présentes dans les milieux de culture et une glycoprotéine qui a été localisée à la surface des cellules fibroblastiques et qui a été décrite sous des termes divers : "LETS" glycoprotéine (Hynes, 1973), CSP (Yamada et Weston, 1974), ou fibronectine (Vaheri et coll, 1976). En 1973, une glycoprotéine de haut poids moléculaire a été trouvée sur la surface des fibroblastes normaux en culture (Hynes, 1973 ; Gahmberg et Hakomori, 1973 ; Ruoslahti et coll, 1973). Cette fibronectine manque à la surface des fibroblastes malins transformés (Hynes, 1973 ; Vaheri et Ruoslahti, 1974). La fibronectine est sécrétée à partir du fibroblaste dans le milieu de culture et une protéine immunologiquement identique a été trouvée dans le plasma (Ruoslahti et coll, 1973 ; Ruoslahti et Vaheri, 1974 ; Vaheri et Ruoslahti, 1975). Or, cette forme plasmatique de la fibronectine s'est trouvée (Ruoslahti et Vaheri, 1975) être identique à la protéine plasmatique connue depuis 1948 (Morrison et coll) sous le nom de "Cold Insoluble Globulin" (CIG) à cause de sa tendance à coprécipiter avec le

fibrinogène. Le CIG est une glycoprotéine constituée de deux chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfure d'un poids moléculaire apparent situé entre 200.000 et 250.000 (Mossesson et coll, 1975 ; Mosher, 1975 ; Ruoslahti et Vaheri, 1974). Cette structure polypeptidique est commune à la fibronectine de forme cellulaire (Keski-Oja et coll, 1977) et à la fibronectine du plasma.

La fonction de la fibronectine est encore peu connue, mais il a été suggéré qu'une protéine apparemment identique à la fibronectine favorise l'attachement des fibroblastes normaux au collagène dans une culture tissulaire (Klebe, 1974 ; Pearlstein, 1976). La fibronectine du plasma présente une affinité pour le fibrinogène (Ruoslahti et Vaheri, 1975 ; Stemberger et Hôrmann, 1976). La fibronectine de la surface des fibroblastes se lie réversiblement au collagène et à la gélatine (Engwall et Ruoslahti, 1977). La fibronectine est très sensible aux actions protéasiques (Hynes, 1976)

Se basant sur leur composition en acides aminés d'après le test de Marchalonis et Weltman (1971), Robert et coll. (1972) suggère une analogie entre les glycoprotéines de structure, les antigènes de transplantation, les glycoprotéines de la paroi cellulaire et la membrane du Streptocoque A. De la constatation que les glycoprotéines de structure sont similaires aux protéines membranaires, découle l'idée que les glycoprotéines de structure sont sécrétées par les fibroblastes comme une sorte de membrane extracellulaire qui pourrait guider et mouler les fibres de la matrice intercellulaire (Robert et Robert, 1970, 1973). Les observations faites sur l'aorte

supportent cette hypothèse. La microscopie électronique souligne l'identité probable des glycoprotéines de structure et des microfibrilles de l'aorte et montre que ces dernières vont servir de base aux dépôts de l'élastine (Kadar et coll., 1973).

4 - L'ELASTINE

Dès 1836, l'élastine a été identifiée et purifiée par Hokenberg. Mais il faudra attendre ces dernières années pour que cette protéine fibreuse fasse l'objet d'études biochimiques systématiques.

L'élastine se trouve sous forme de fibres et de membranes dans les ligaments et les vaisseaux sanguins et, en petites quantités, dans différents tissus tels que la peau et le poumon.

Comme d'autres élastomères biologiques, la résiline (Weis-Fogh, 1961) et l'adductine (Thornhill, 1971), l'élastine est insoluble dans les solvants habituellement utilisés pour extraire et purifier les protéines fibreuses et globulaires. Le préalable à toute purification de l'élastine implique donc une complète élimination du collagène, des protéoglycannes et des glycoprotéines de structure auxquelles celle-ci est toujours associée dans les tissus élastiques. Dans ce but, les alcalis chauds (Lansing et coll, 1952) et l'autoclavage (Partridge, 1968) ont été généralement adoptés. Récemment, pour isoler la protéine dans une conformation aussi voisine que possible de l'état natif, un traitement avec une collagénase, sans traces d'élastase, suivie d'une extraction avec de la guanidine en présence de dithiothréitol a été choisie (Serafini-Fracassini et coll, 1975).

L'élastine purifiée est une protéine de type hydrophobe riche en acides aminés non polaires et contenant seulement quelques résidus

polaires. Elle contient un tiers de glycine et un peu d'hydroxyproline. Les liaisons entre 4 chaînes polypeptidiques s'établissent par la condensation de 4 résidus lysine formant les acides aminés caractéristiques de l'élastine, la desmosine et l'isodesmosine (Partridge, 1970 ; Thomas et coll, 1973).

Au microscope électronique, l'élastine apparaît comme une substance amorphe, transparente aux électrons, à laquelle est plus ou moins fortement associée une substance microfibrillaire (Ross et Bornstein, 1969 ; Kadar et coll, 1973) de nature glycoprotéinique et qui semble augmenter au cours du vieillissement.

La structure primaire de l'élastine insoluble est encore mal définie et les relations entre sa structure et ses propriétés mécaniques sont diversement établies. Suivant les méthodes physicochimiques d'étude employées, l'architecture moléculaire et submicroscopique est interprétée différemment (Partridge, 1968 ; Gotte et coll, 1974).

A partir d'aortes de porcs carencés en cuivre (Carnes, 1968), une protéine soluble a pu être isolée et caractérisée comme un précurseur de l'élastine par sa composition en acides aminés (Smith et coll, 1968, 1972) et son incorporation *in vitro* dans l'élastine aortique insoluble (Smith et coll, 1975).

En se basant uniquement sur des observations histologiques, la présence de l'élastine a été rapportée chez des Invertébrés comme les vers de terre, les arthropodes, les échinodermes et les

mollusques (Anderson, 1954). Pourtant Sage et Gray en 1977 se basant sur des caractéristiques histologiques et sur différents critères biochimiques, comprenant la composition en acides aminés, la présence des desmosines, n'ont pas trouvé d'élastine dans les principaux groupes d'invertébrés. Par contre, tous les groupes représentatifs des vertébrés contiennent de l'élastine, excepté les poissons les plus primitifs sans mâchoire, comme la lamproie.

Il semble donc à peu près certain que l'élastine, sous la forme insoluble et pontée, qui a été décrite chez les vertébrés, n'existe pas chez les invertébrés. Toutefois, l'hypothèse d'une forme soluble, moins fortement pontée, n'est actuellement pas totalement infirmée.

Aucune protéine élastique n'a été mise en évidence dans le phylum Porifera (Garrone, 1978/a)

CHAPITRE II

LES SPONGIAIRES

A - CARACTERES GENERAUX

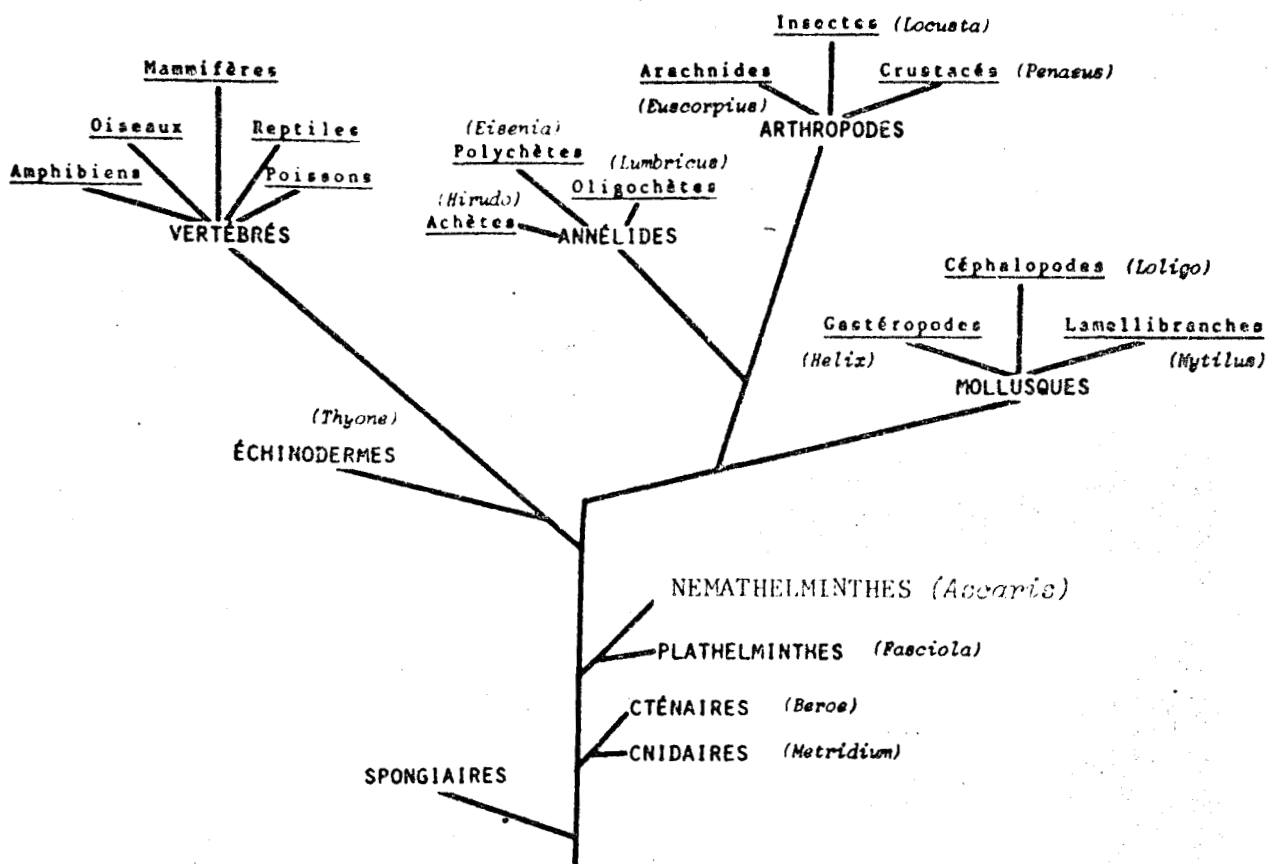
Les Eponges ou Spongiaires ou Porifères, sont les plus simples des Métazoaires, sont aquatiques et existent depuis l'ère pré-cambrienne (voir BRIEN, LEVI, SARA, TUZET, VACELET, 1973). Ils se situent à la base du règne animal (Figure 5).

L'Eponge est limitée par des épithéliums de revêtement constitués de cellules que l'on nomme pinacocytes. On distingue l'épithélium externe appelé l'exopinacoderme, formé d'exopinacocytes (Figure 6). La base de l'animal repose sur un épithélium (le basopinacoderme) composé de cellules aplaties (les basopinacocytes) qui secrètent la spongine d'attache au substratum. Les endopynacocytes tapissent les parois du système aquifère constitué de chambres et de canaux dans lesquels circule l'eau. Celle-ci pénètre par les pores inhalants et rejoint les chambres choanocytaires formées de cellules flagellées caractéristiques des Eponges, les choanocytes. Le courant d'eau circule dans des canaux et ressort de l'Eponge par un orifice exhalant, l'oscule.

Ces épithéliums délimitent un espace clos, le mésohyle qui renferme une substance de nature conjonctive au sein de laquelle se déplacent de nombreuses cellules :

- Les archéocytes capables de donner naissance à tous les autres types cellulaires,

Figure 5 : Arbre généalogique simplifié des grands groupes du règne animal



Les Embranchements figurent en majuscules, et les Classes en minuscules soulignées. Les noms de genre sont entre parenthèses.

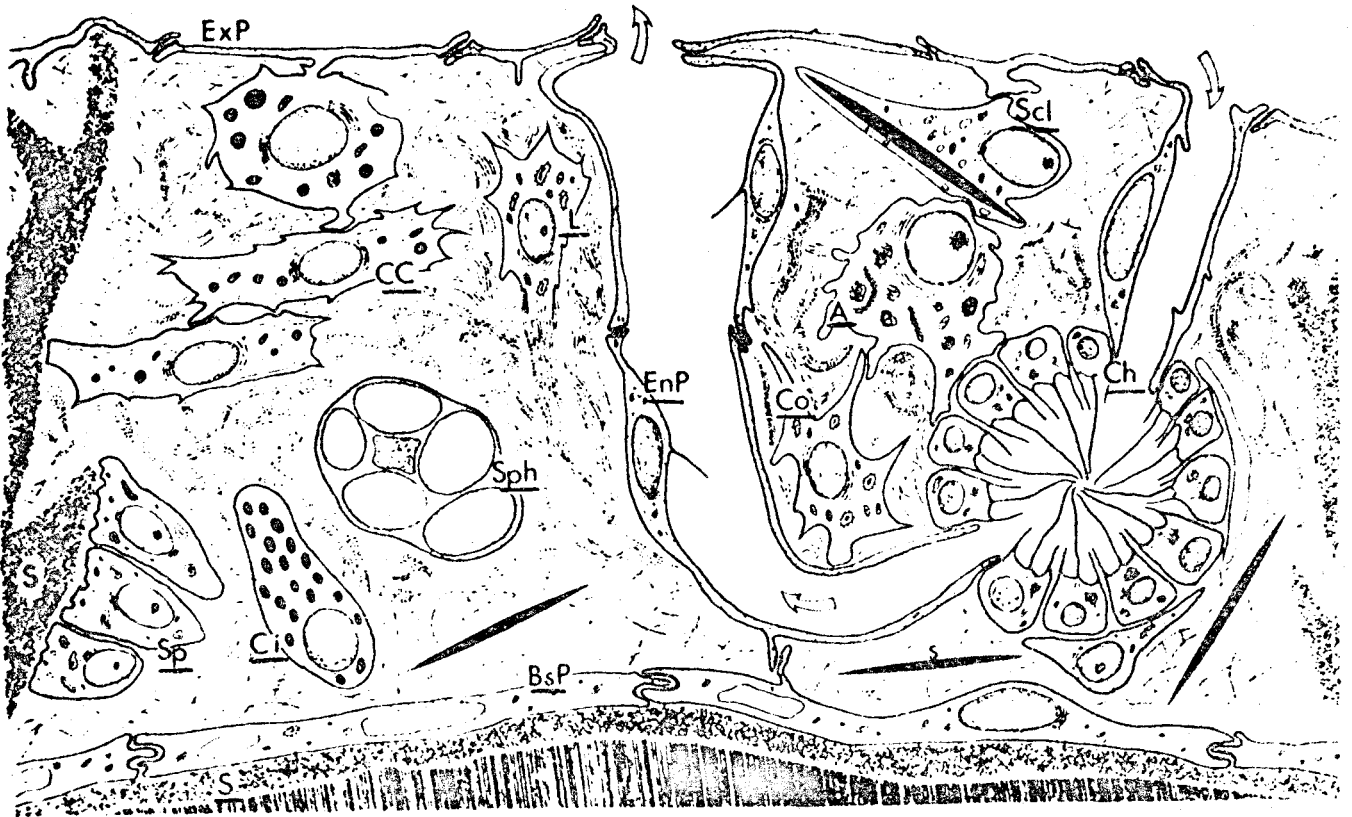


Figure 6 : Structure schématique d'une éponge d'après Garrone (1978).
 Exp. Exopinacocytes, EnP. Endopinacocytes, BsP. Basopinacocytes,
 Ch. Choanocytes, A. Archeocytes, Scl. Sclerocyte, Sp. Spongocyte,
 Co. Collencyte, L. Lophocyte, CC. Cellules Contractiles, Ci. Cellules
 avec des Inclusions, Sph. Cellules sphéruleuses, S. Spongine,
 s. Spicule. Les flèches indiquent le courant d'eau.

- Les cellules à inclusions renfermant des enclaves diverses.
- Les sclérocytes qui sécrètent le squelette minéral (spicules de nature calcaire ou siliceuse selon les espèces).
- Les spongocytes qui élaborent la spongine
- Les collancytes assimilées à des fibroblastes. Elles pourraient sécréter la matrice intercellulaire.

Ces structures ne sont pas figées car chez les Spongiaires la plasticité et la mobilité de tous les types cellulaires sont totales : chaque type est capable de se différencier en l'un quelconque des autres types suivant les besoins des individus.

B - CLASSIFICATION

Les Spongiaires sont divisés en trois classes : les Eponges Calcaires, les Démosponges et les Hexactinellides.

Les Eponges Calcaires :

Elles sont caractérisées par la présence constante de spicules calcaires, et divisées en trois sous-classes :

Les homocoèles possèdent une cavité interne simple entièrement tapissée de choanocytes,

Les Hétérocoeles. La cavité interne n'est plus tapissée que par des pinacocytes. Les choanocytes sont concentrés dans des tubes ou dans des chambres,

Les Pharétrones forment un groupe à part. Leur squelette est souvent renforcé par la soudure des spicules.

Les Démosponges :

Ces Eponges comportent soit des spicules siliceux, soit des fibres de spongine, soit les deux. Quelques genres (*Oscarella*, *Chondrosia*... ne comportent aucun élément squelettique. Les Démosponges sont actuellement subdivisées en quatre sous-classes :

Les Homosclérophorides, ex. *Oscarella*.

Les Tétractinomorphes, dont les ordres principaux sont :

Astrophorida : le genre *Chondrosia* est rattaché à cet ordre

Hadromerida, ex. *Tethya*, *Suberites*

Axinellida, ex. *Axinella*, *Acanthella*.

Les Céractinomorphes sont subdivisés en cinq ordres :

Poecilosclerida, ex. *Microciona*.

Halichondrida, ex. *Halichondria*.

Haplosclérida, ex. *Haliclona*, *Petrosia*. Dans cet ordre sont classées les Eponges d'eau douce. Famille des Spongillidae, ex. *Spongilla*.

Les deux ordres suivants correspondent aux Eponges Cornées qui ne contiennent que des fibres de Spongine :

Dictyoceratida, ex. *Spongia*, *Cacospongia*, *Ircinia*, *Hippospongia*,

Verongia.

Dendroceratida, ex. *Aplysilla*.

Les Hexactinellides :

Ces éponges de grandes profondeurs qui possèdent un squelette constitué de spicules siliceux de formes variées proviennent d'une symétrie d'ordre 3.

C - ESPECES ETUDIEES

Les espèces marines ont toutes été récoltées en plongée sous-marine dans diverses stations méditerranéennes (Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer, Station Marine d'Endoume, Station de Biologie Marine de Sète).

Démosponges Tétractinomorphes :

Chondrosia reniformis (NARDO)

Tethya lyncurium (LAMARCK)

Démosponges Céractinomorphes :

Haliclona rosea (SCHMIDT)

Haliclona elegans (BOWERBANK)

Verongia aerophoba (SCHMIDT)

Ircinia variabilis (SCHMIDT)

Ircinia oros (SCHMIDT)

Hipposongia communis (LAMARCK)

Spongia officinalis (LAMARCK)

Cacospongia scalaris (SCHMIDT)

CHAPITRE III

LES FORMATIONS COLLAGENES DE L'EPONGE

Chez les spongiaires les molécules de collagène peuvent former des structures morphologiquement très différentes. Ainsi, Gross et coll. (1956) ont isolé de *Spongia graminea* deux formes distinctes de collagène qu'ils ont appelées la spongine A et la spongine B. La première correspond aux fibrilles de collagène intercellulaires visibles seulement en microscopie électronique ; la seconde est représentée par les grosses fibres ramifiées caractéristiques des Eponges Cornées. A ce dernier groupe, il faut encore rattacher la substance qui unit les spicules chez certaines éponges siliceuses (Garrone, 1969) ainsi que les coques des gemmules des éponges d'eau douce (Huc et De Vos, 1972). Garrone (1969) et Vacelet (1971/a) ont fait remarquer que le terme de spongine ne s'impose guère pour les fibrilles de collagène de la trame intercellulaire des éponges. Celles-ci sont en effet très comparables à celles qui se rencontrent dispersées dans la substance fondamentale des autres métazoaires. Par contre, les autres formations, plus originales et plus spécifiques, méritent la dénomination particulière de spongine.

Dans le genre *Ircinia* étroitement mêlée au squelette constitué par de grosses fibres de spongine, coexiste une autre structure qui se présente sous la forme de longs filaments comportant un renflement ovoïde à chaque extrémité. Ces éléments ont été l'objet de nombreuses recherches et ont donné lieu à d'ardentes controverses au siècle dernier pour établir s'il s'agissait de parasites ou d'éléments squelettiques propres à l'éponge (Lendenfeld, 1889). La question n'a pu être clarifiée. Plus récemment, Marks et coll. (1949), à la suite d'une étude par diffraction des rayons X, ont

rattaché ces filaments à la famille des collagènes.

Lévi (1965), grâce au microscope électronique, a montré que les filaments, comme la spongine, étaient formés de fines fibrilles, mais que celles-ci étaient disposées plus régulièrement dans les filaments que dans la spongine.

Il nous a paru intéressant de tenter de compléter ces quelques études fragmentaires par une comparaison biochimique systématique de ces différentes formes de collagène rencontrées chez plusieurs espèces de Desmosponges.

1 - ISOLEMENT DES FORMATIONS COLLAGÈNES

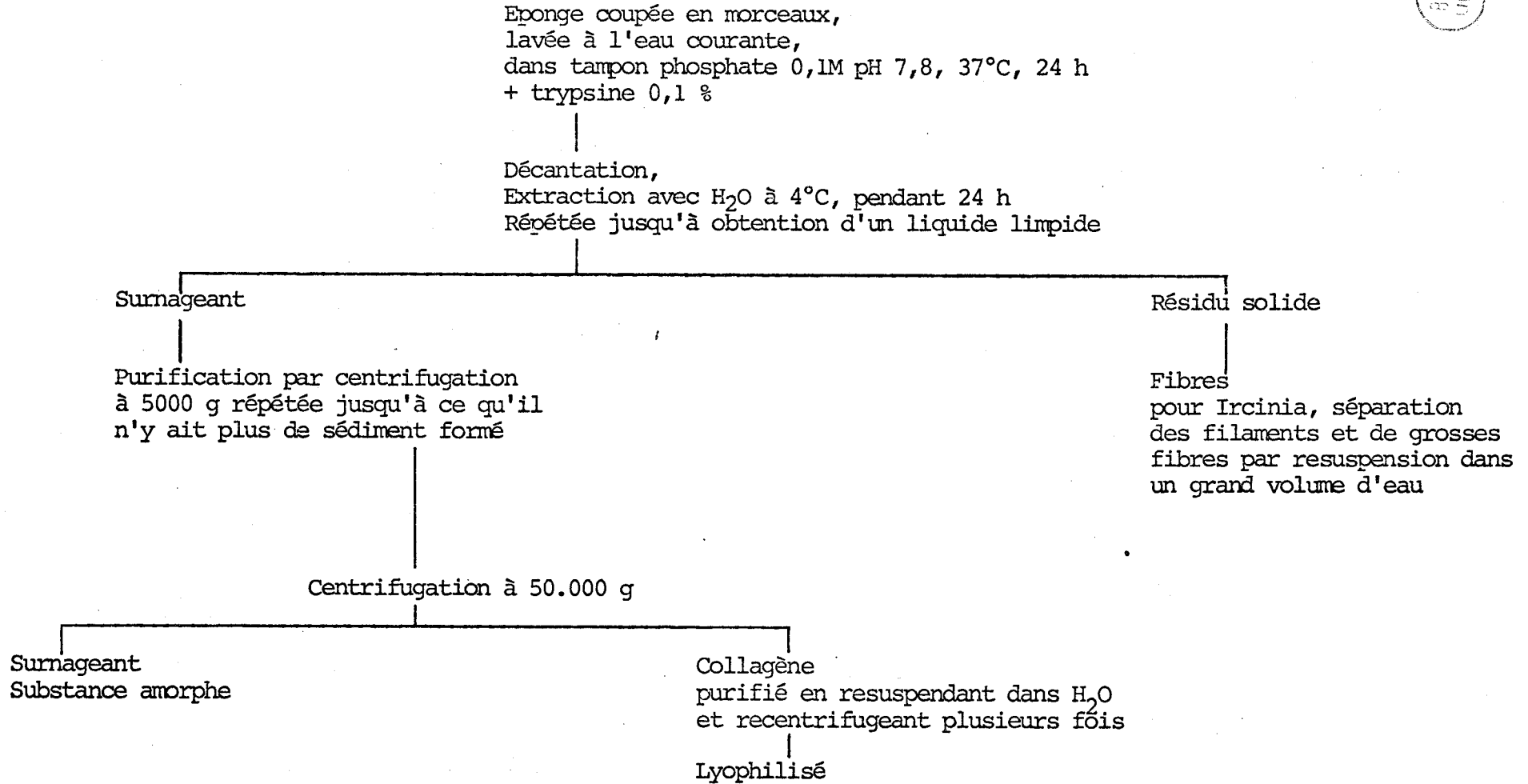
A - PAR DIGESTION ENZYMATIQUE

Les éponges décongelées, coupées en morceaux sont soigneusement lavées à l'eau courante et soumises à une digestion enzymatique reprenant la méthode de Gross et coll (1956) (Figure 7). L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h avec 0,1 % de trypsine dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7,8 en présence de toluène et de chloroforme. Le liquide surnageant est décanté et la masse solide resuspendue plusieurs fois pendant plusieurs heures dans de l'eau distillée jusqu'à ce que celle-ci reste claire.

Ayant ainsi dispersé la substance intercellulaire, seules subsistent intactes et bien nettoyées les fibres de Spongine chez les éponges cornées et dans le genre *Ircinia*, associées à celles-ci les filaments (Figure 10/A). Ces derniers sont séparés des fibres de Spongine en utilisant leur différence de sédimentation, par agitation dans de grands volumes d'eau et décantation. Les filaments qui restent encore accrochés sont dégagés, avec de fines pinces, sous loupe binoculaire, des fibres de Spongine. Chez les *Haposclerides* subsiste intacte la spongine périscopulaire enrobant les spicules siliceux qui seront dissous dans l'acide fluorhydrique à 10 %.

Après traitement à la trypsine, les surnageants sont purifiés par centrifugation à 5000 g et réunis. Le collagène intercellulaire est isolé par ultracentrifugation à 50.000 g. Il est purifié par remise en suspension dans l'eau et centrifugations répétées. Il est ensuite lyophilisé.

Figure 7



B - PAR DISPERSION DANS LE SDS (Dodécyl sulfate)

Les morceaux d'éponge sont broyés 10 minutes à 4°C dans un tampon EDTA 0,1M pH 8,0. Les fibres de Spongine sont séparées par filtration sur une fine gaze. Elles seront ensuite lavées à plusieurs reprises dans un tampon EDTA et dans de l'eau distillée pour éliminer toutes traces de substance intercellulaire. Elles sont finalement séchées dans une étuve à 50°C.

A la suspension obtenue après filtration des formations macroscopiques est ajouté du dodécyl-sulfate (SDS) à la concentration de 1 %, comme agent dissociant et de l'azide de sodium (0,02 %) pour éviter les développements bactériens postérieurs. Une centrifugation à faible vitesse (3000 g) élimine les débris de spongine et les corps étrangers, par exemple le sable, se trouvant mêlés au tissu de l'éponge.

Comme dans la méthode précédente, le collagène est séparé par ultracentrifugation à 50.000 g. Il est purifié plusieurs fois par remise en suspension dans le tampon EDTA contenant du SDS et ultracentrifugé. Le collagène obtenu est longuement dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé.

L'avantage essentiel de la méthode au SDS sur la méthode enzymatique est la préservation, dans un état aussi peu dénaturé que possible, des protéines non collagène qui pourront ainsi être ultérieurement étudiées.

L'inconvénient majeur est l'utilisation d'un détergent ionique, le SDS, pour dissocier les macromolécules de la matrice intercellulaire, qu'il faut ensuite éliminer. Sans prétendre supprimer toutes traces de SDS dans nos préparations, son élimination par passage sur un échangeur anionique a été satisfaisante (voir Chapitre IV).

2 - MORPHOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE

Au cours d'une étude ultrastructurale des formations de collagène chez les Spongiaires, Garrone (1978/a) distingue essentiellement deux types de structure : les fibrilles et les microfibrilles élaborées respectivement par des cellules spécialisées, les lophocytes et les spongiocytes.

A - Les fibrilles sont présentes dans la trame intercellulaire de tous les individus du groupe. Elles se retrouvent isolées ou groupées mais toujours bien individualisées avec un diamètre d'environ 20 nm (Figures 8/A et 9). Une striation transversale très nette est visible sur les fibrilles isolées *in vitro* (Figures 8/B et C). Des bandes plus claires délimitent une période d'environ 66 nm. Ces fibrilles constituent le collagène intercellulaire ou fibrillaire de l'éponge.

B - Les microfibrilles ont un diamètre inférieur à une dizaine de nm et sont toujours groupées pour donner des formations macroscopiques de Spongine d'une grande variété.

L'association plus ou moins lâche, sans organisation particulière, de ces microfibrilles, donne des fibres qui forment le squelette des Eponges Cornées (Figure 9/A). Ce squelette est formé de fibres principales qui peuvent atteindre plusieurs dizaines de microns et se dressent jusqu'à la surface de l'éponge, et, de fibres secondaires généralement plus fines (Figure 10).

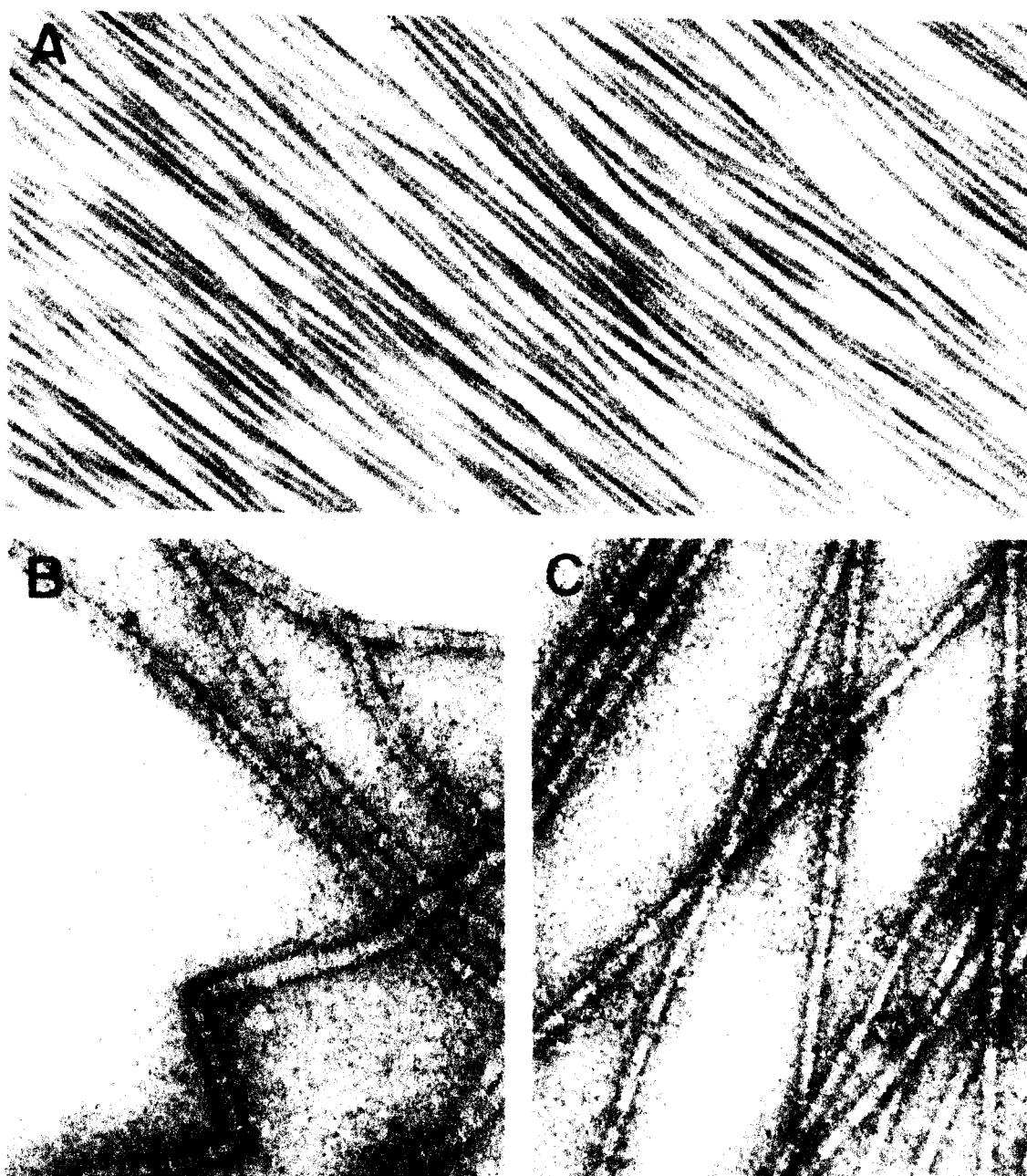


Figure 8 : Fibrilles de collagène *Chondrosia*

A/ "In situ", x 53.800

B/ Isolées avec une solution EDTA, x 120.800

C/ Isolées par la méthode enzymatique de Cross et coll (1956),
x 140.000



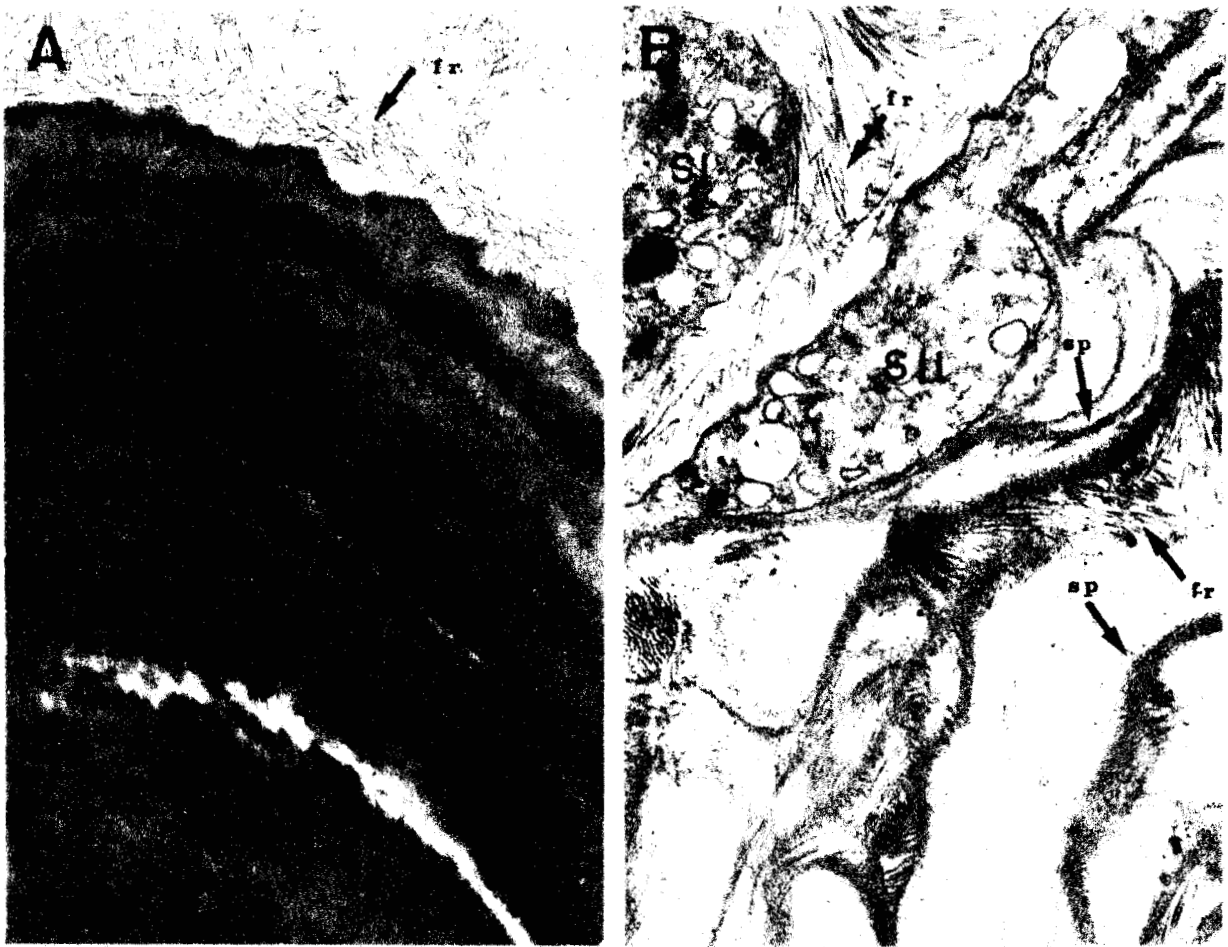


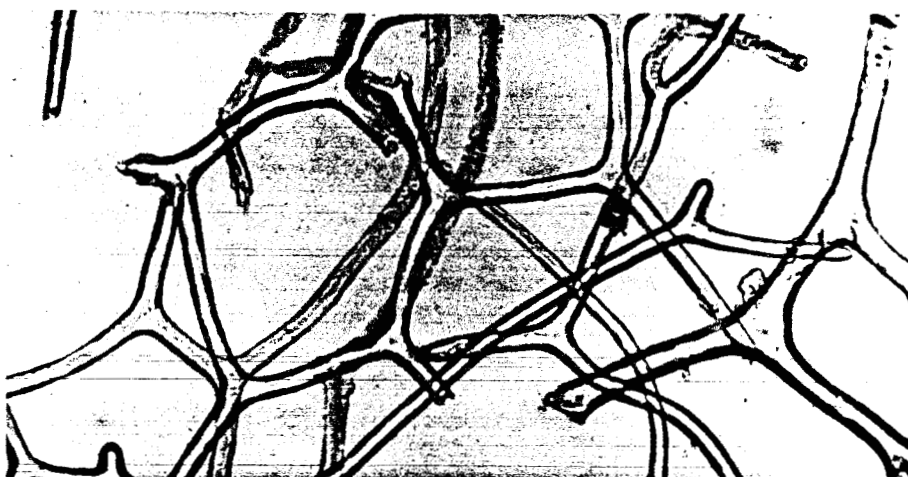
Figure 9

A/ Fibre de spongine (SP) et fibrilles de collagène interfibrillaire (fr) de *Cacospongia*, x 150.000.

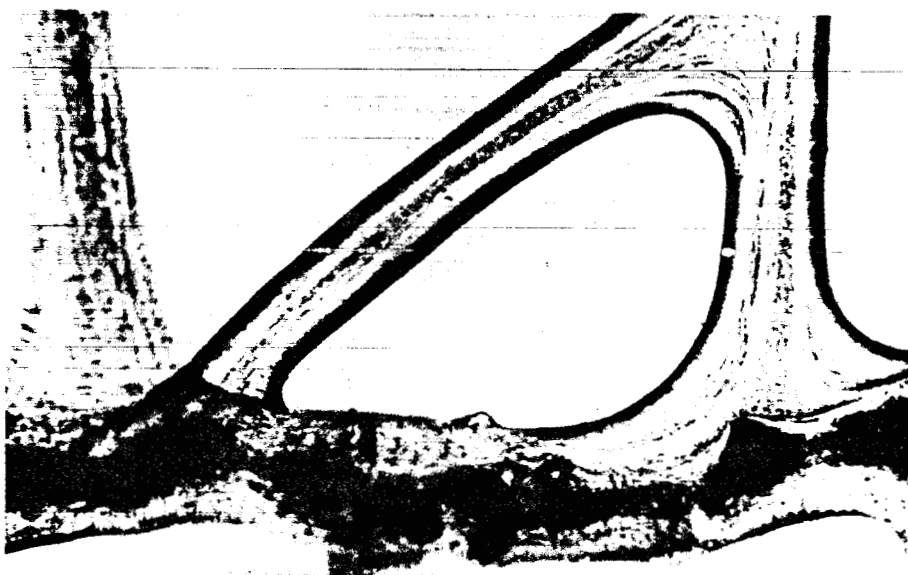
B/ A partir de *Verongia*, lames de spongine (SP) en cours de sécrétion, deux spongocytes (SI et SII) et fibrilles de collagène (fr), x 25.120.



A



B



C

Figure 10 : Fibres de spongine isolées (x 200)

A/ *Ircinia variabilis* : 1) Filaments
2) Spongine

B/ *Hippospongia communis* - spongine

C/ *Cacospongia scalaris* - spongine : dans la fibre principale horizontale, corps étrangers (en noir)



Dans le genre *Ircinia* viennent s'ajouter à cette structure des filaments d'un type particulier (Figure 10/A). Ils se présentent sous la forme de minces fils, longs de plusieurs millimètres pour une dizaine de microns d'épaisseur, et terminés à chaque extrémité par un renflement ovoïde. Au microscope électronique, les filaments se révèlent formés par un ensemble de microfibrilles de 50 à 70 Å de diamètre (Figure 11/A et B), torsadées de façon hélicoïdale (Garrone et coll, 1973) et entourées d'une cuticule amorphe (Figure 11/B).

La charpente squelettique des *Haploscérides* est formée de l'association de spongine et de spicule siliceux. Le réseau formé par les spicules est renforcé en particulier au niveau des noeuds par la spongine (Figure 12/A). Cette spongine périspiculaire est constituée de microfibrilles bien individualisées, dispersées sans ordre particulier (Figure 12/B).

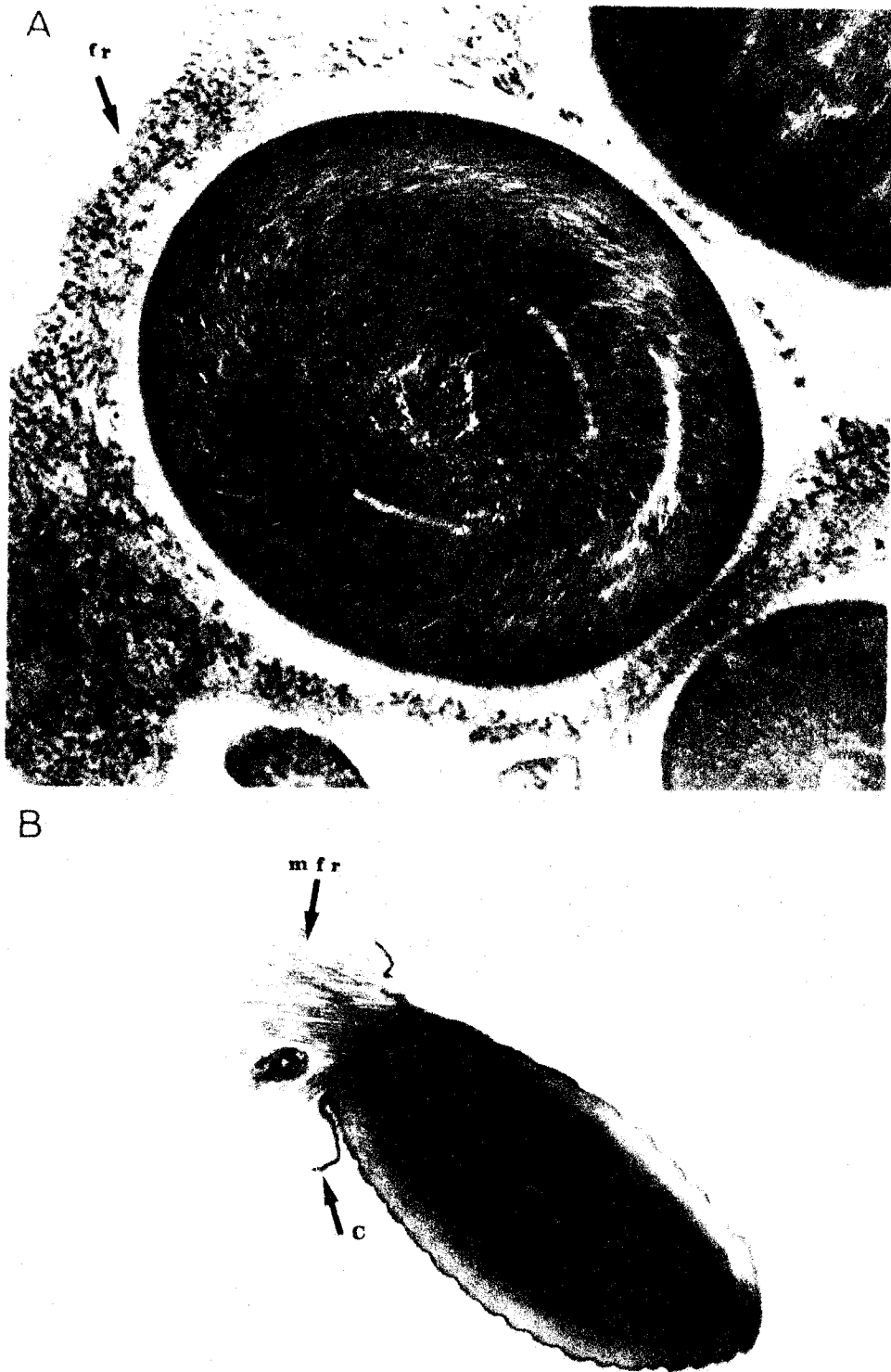


Figure 11

- A/ Section transversale du filament d'*Ircinia* (x 40.600) entouré de fibrilles de collagène (fr) (Garrone et coll, 1973)
- B/ Coupe transversale du filament d'*Ircinia*. Les microfibrilles qui constituent le filament s'échappent par la déchirure. La cuticule amorphe est bien visible (C).

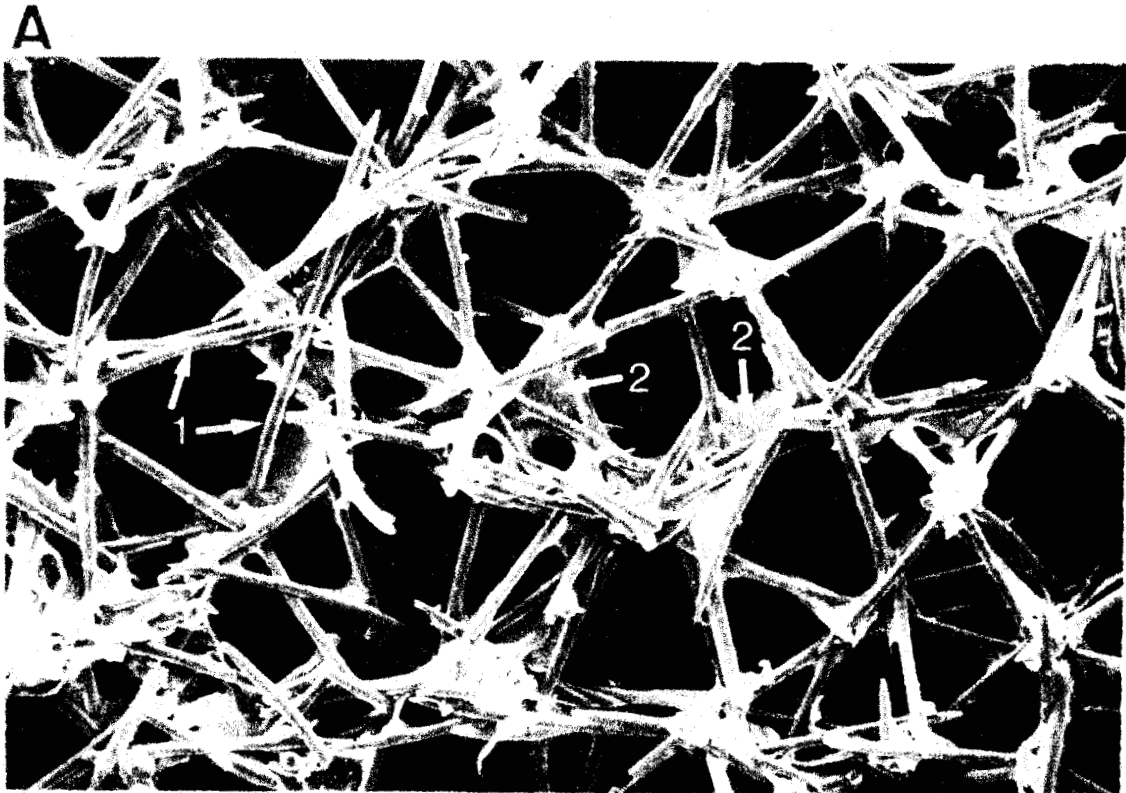


Figure 12

A/ Eponge *Renieride* (Demosponge Haploscleride). Microscopie électronique à balayage (x 200 environ) ; squelette séché, métallisé à l'or, constitué de spicules (1) unis par la spongine périscopulaire (2).

B/ Microfibrilles constituant la spongine périscopulaire d'une *Halichondria* (x 50.200).

Dans l'angle inférieur droit, un morceau de spicule cassé.

3 - HYDROLYSE

Avant d'aborder l'étude de la composition des collagènes d'Eponge, il nous a paru important de connaître leur résistance à divers agents hydrolysants.

Une cuticule amorphe entoure les microfibrilles du filament d'*Ircinia* (Garrone et coll, 1973) et lui assure une certaine protection contre les attaques bactériennes ou chimiques. Les fibres de Spongine, comme *Verongia*, ne montrent pas de cuticule mais une écorce formée de microfibrilles très serrées (Vacelet, 1971).

Pour homogénéiser les substances, les filaments et les fibres utilisées sont réduits en poudre et passés à travers un tamis de 250 microns.

A - HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Gross et coll. (1956) ont souligné l'impossibilité de solubiliser les Spongines "A" et "B" par les enzymes spécifiques des collagènes de Mammifères, la collagénase bactérienne et la pepsine. Nordwig et coll. (1970) ont souligné l'action très limitée des enzymes protéolytiques sur les collagènes d'Invertébrés. Nous avons incubé, sans plus de succès, nos préparations avec ces mêmes protéases.

L'essai systématique de plusieurs autres enzymes a été entrepris. La papaïne, l'élastase, le lysosyme, l'alpha-amylase, la cellulase, suivies ou non de pepsine et de collagénase bactérienne, ne provoquent

aucune hydrolyse notable des formations collagènes dans les conditions décrites dans le Chapitre VI, N° 7/A ; un prétraitement dans l'urée 8M contenant du 2-mercaptoéthanol (0,1M) a été essayé, mais sans succès.

B - HYDROLYSE ACIDE

Il est bien connu que l'acide trichloracétique chaud (TCA) "solubilise" le collagène (Fitch et Harkness, 1955). Le collagène fibrillaire a été entièrement hydrolysé dans du TCA 3 % à 90°C en 30 minutes. Par contre, à 5 % et même à 10 %, le TCA est resté à peu près sans effet sur les filaments et la Spongine, même en prolongeant le temps de chauffage.

C - HYDROLYSE ALCALINE

Ces fibres sont par contre nettement plus sensibles aux alcalins. Les Figures 13/A et B montrent les cinétiques d'hydrolyse dans la soude 0,2N à 80° des fibres de Spongine d'*Hippospongia* et des filaments d'*Ircinia*. Sur ces deux graphiques, nous voyons que la libération des hexoses suit exactement la même courbe que celle des peptides. Par contre, la vitesse d'hydrolyse des deux types de fibres est nettement différente. En effet, pour un degré d'avancement de la réaction de 50 %, les vitesses absolues proportionnelles à l'inverse du temps sont dans un rapport de 3. L'hydrolyse du filament est la plus rapide.

L'hydrolyse alcaline des fibres et du filament produit une population hétérogène de peptides qui ont pu être séparés sur une colonne

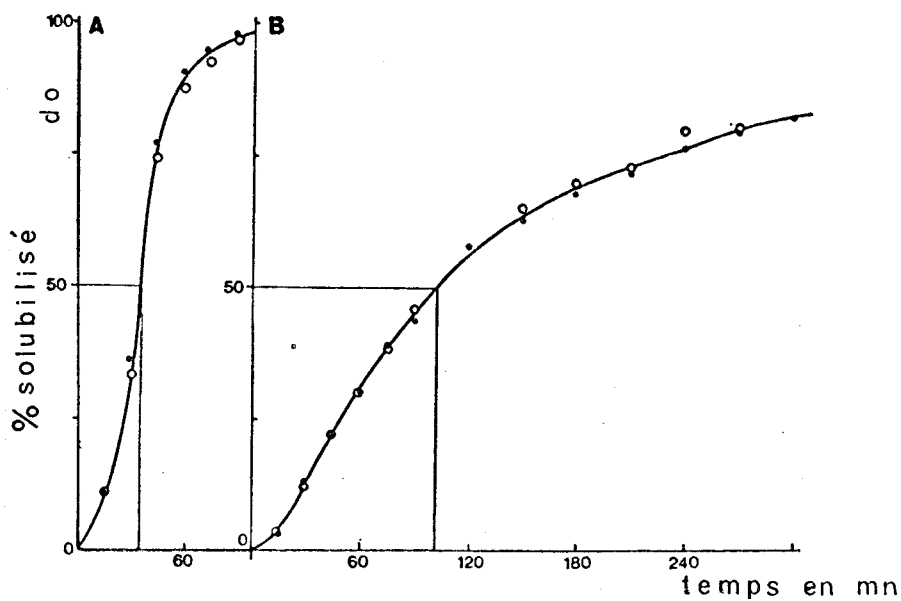


Figure 13 : Cinétique d'hydrolyse dans la soude 0,2N à 80°C
des filaments d'*Ircinia* (A) et de la spongine d'*Hippospongia* (B).

- protéines
- oses neutres

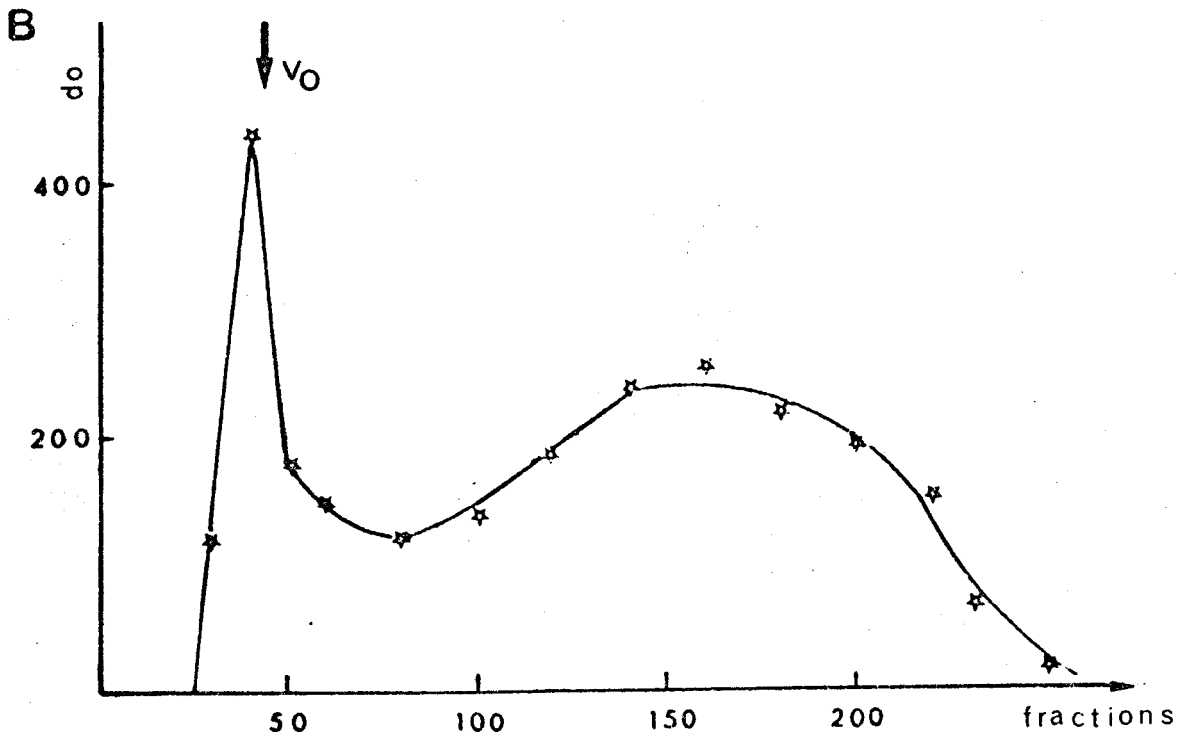
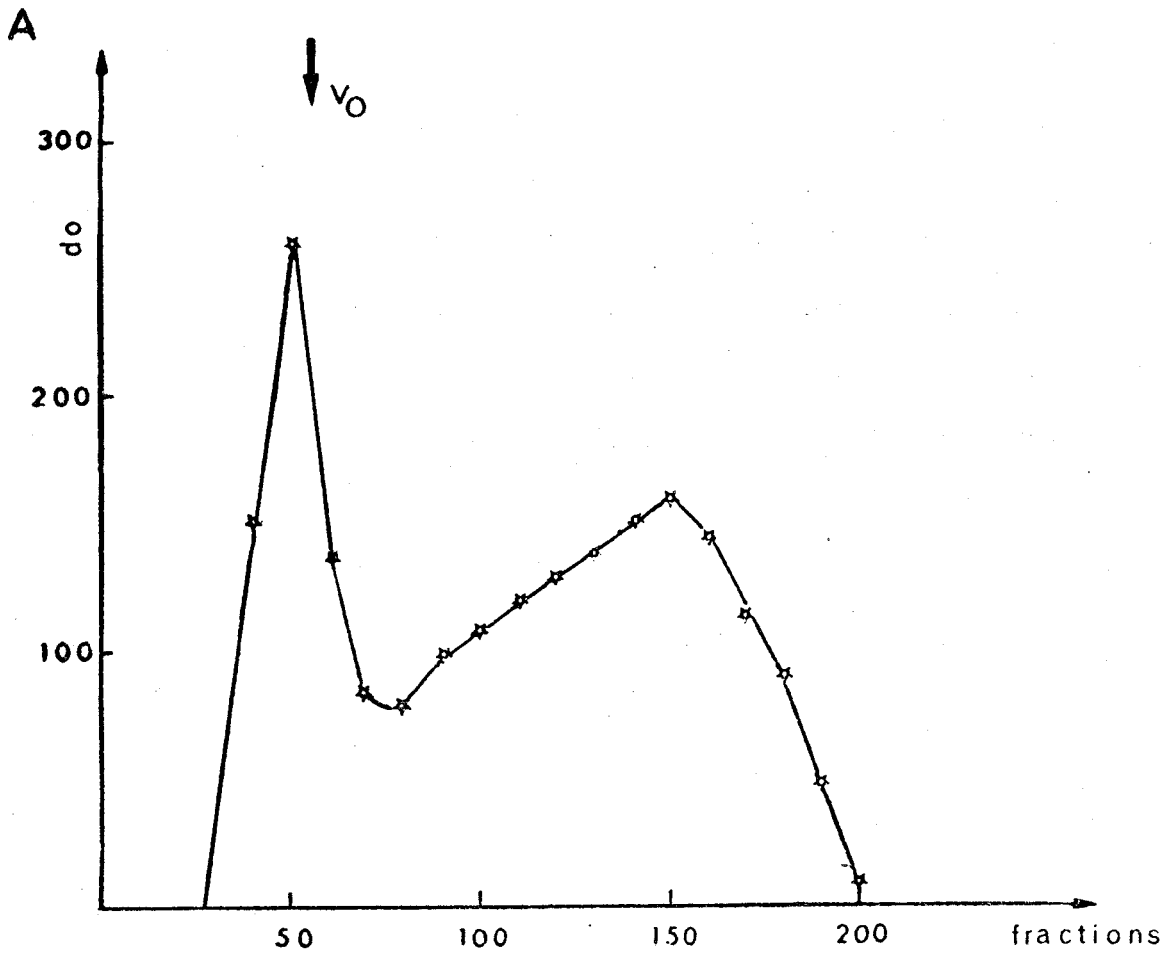


Figure 14 : Filtration sur Biogel P 200 des hydrolysats alcalins dans un tampon tris-HCl 0,1M, pH 7,6.

A/ Des filaments

B/ Des fibres de spongine



de Biogel P200 en deux fractions principales (Figure 14). La première se situe dans le volume exclu de la colonne et contient des peptides ou des agglomérats d'un poids moléculaire dépassant 200.000 ; la seconde contient des peptides de poids moléculaire plus faible qui sont plus ou moins retenus dans le gel de la colonne. Les profils d'éluion des fibres de Spongine et des filaments sont très similaires.

Dans chacune de ces fractions peptidiques, des quantités appréciables de fer ont toujours été dosées même après une dialyse prolongée contre une solution d'EDTA 0,1M. Le fer ne serait donc pas un simple contaminant mais pourrait former une liaison stable non labile aux alcalis avec les polypeptides de la Spongine. Nous souhaiterions y voir une explication de l'extraordinaire résistance de ces collagènes, mais nous n'avons pu, jusqu'à ce jour, apporter aucun élément supplémentaire pour confirmer cette hypothèse.

L'élastine qui résiste aussi à une hydrolyse dans le TCA 5 % à 90°C (Robert et coll., 1968, 1971), montre une forte accélération de la vitesse d'hydrolyse alcaline en présence d'éthanol (Kornfeld-Poullain et Robert, 1968). En ajoutant à la potasse 1M 80 % d'éthanol, la vitesse d'hydrolyse du filament est augmentée dans un rapport de 6 (Figure 15/F), celle des fibres de Spongine de 11 (Figure 15/S). Une certaine analogie apparaît ainsi avec l'élastine dont on sait qu'elle est largement stabilisée par des interactions hydrophobes (Kornfeld-Poullain et Robert, 1968 ; Partridge, 1970). Ces résultats évoquent l'importance possible des interactions

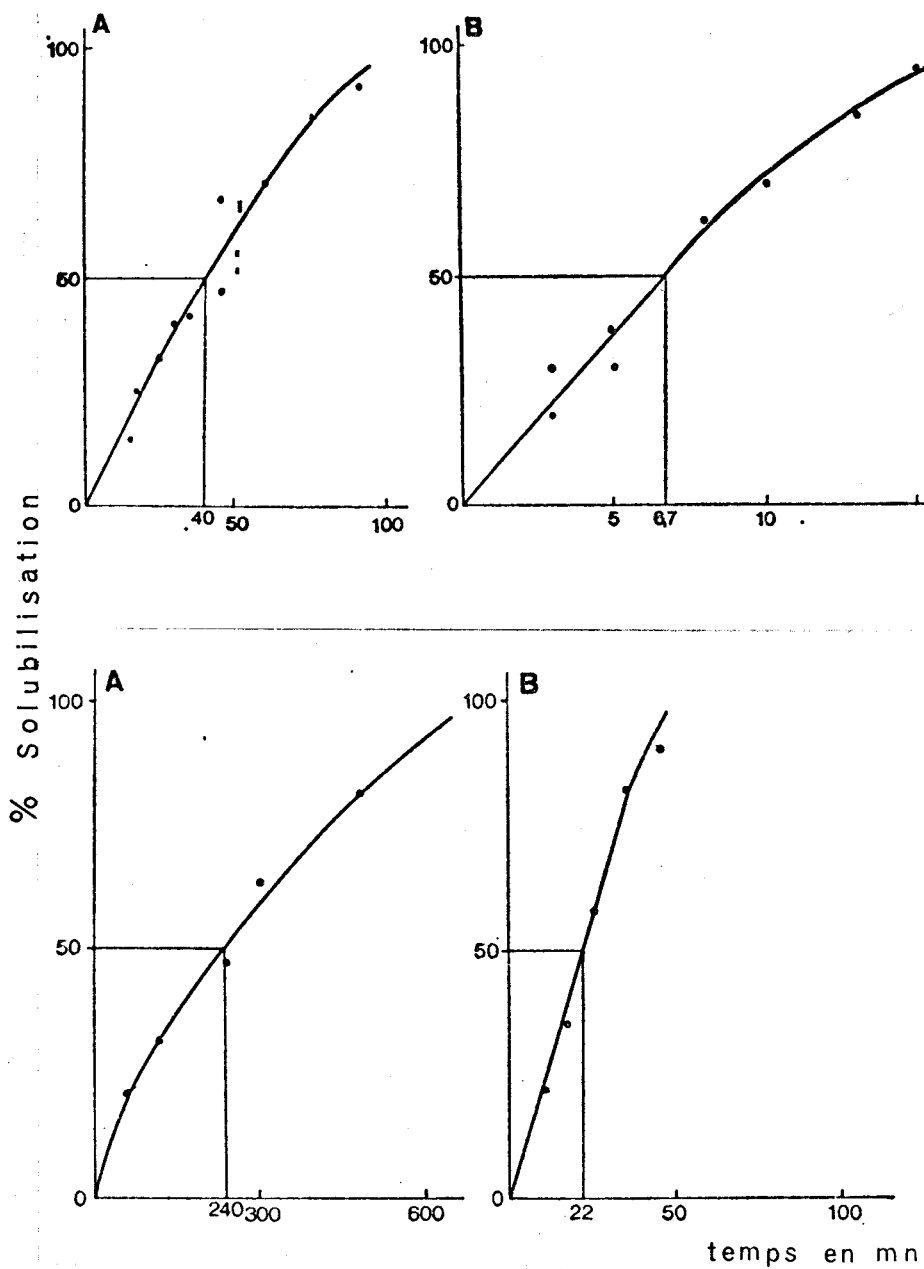


Figure 15

F = Filaments d'*Ircinia*

S = Spongine d'*Hippospongia*

Cinétique d'hydrolyse à 37°C.

A/ Dans KOH 1M en solution aqueuse

B/ Dans KOH 1M dans un mélange eau-méthanol (20:80 v/v)



hydrophobes dans la stabilisation des fibres et des filaments. Toutefois, les différences notées dans leur vitesse d'hydrolyse suggèrent des différences ultrastructurales que confirmeront les analyses biochimiques.

4 - TENTATIVES D'ISOLEMENT DES CHAÎNES ALPHA

L'extraordinaire résistance des formations collagène des Eponges aux agents hydrolytiques va rendre difficile, sinon impossible, l'obtention, à partir de ces formations, des chaînes α libres et intactes.

L'hypothèse de trois chaînes α identiques semblait pouvoir être postulée par analogie avec le collagène de l'anémone de mer dont l'identité des chaînes α a été confirmée (Katzman et Kang, 1972 ; Nordwig et coll, 1973) et avec le collagène des membranes basales qui, comme nous le verrons, présente des caractères similaires : teneur élevée en 3-hydroxyproline, forte hydroxylation et glycosylation (Kefalides, 1971).

Pourtant l'identité des chaînes α ne semble pas être une propriété générale des collagènes d'invertébrés. Kimura et Matsuura (1973) ont montré que les collagènes de la peau de Seiche et d'Octopus, de la membrane subcuticulaire du crabe et du homard ont la composition $[(\alpha_1)_2 \alpha_2]$ du collagène de Vertébrés de type I.

Toutes nos tentatives, et elles ont été nombreuses, pour isoler les unités qui constituent les triples hélices des collagènes d'Eponge sont restées infructueuses jusqu'à ce jour. Les formations collagènes ont été soumises à divers prétraitements (EDTA, acide fluorhydrique, urée + mercaptoéthanol, hyaluronidase...) qui n'ont pas davantage facilité leur hydrolyse par la pepsine. Par contre,

des dénaturations trop importantes ont été obtenues par hydrolyse alcaline ménagée en présence de sulfate d'ammonium comme l'ont décrit Nordwig et coll (1970). La liqueur de Schweitzer, utilisée par Garrone et coll (1973) pour l'étude structurale du filament d'*Ircinia*, n'a pas donné de meilleurs résultats.

5 - COMPOSITION CHIMIQUE

A - COMPOSITION GLOBALE (Tableau 4)

La teneur en cendres des fibres présente une grande variabilité suivant les individus et leur provenance. Il est certain que les grains de sable et les corps étrangers, souvent inclus dans les fibres (Figure 10/C), expliquent en grande partie ces résultats.

Plus intéressante est la proportion importante de fer pouvant aller de 0,14 % du poids des fibres jusqu'à 5,5 % selon la provenance des individus examinés, c'est-à-dire pouvant représenter jusqu'à 40 % du poids des cendres. En corrélation avec cette teneur, peut être associée la coloration plus ou moins intense des éponges. Celle-ci passe du jaune clair au brun rouge pour les échantillons les plus riches en fer.

Towe et Rütgler (1968) ont remarqué des granulations à la surface des fibres colorées et ont montré que celles-ci étaient constituées de cristaux de lépidocrocite, forme minérale d'un hydroxyde de fer. Ces dépôts bruns peuvent aussi être observés à l'intérieur des fibres. Toutes les éponges n'en possèdent pas. Ils sont surtout abondants chez certaines Eponges Cornées des genres : *Spongia*, *Hippospongia* et *Ircinia*.

La signification de ces formations minérales n'est pas connue. Selon Towe et Tütler (1968), cette minéralisation serait due à des processus biologiques.

TABLEAU 4

Analyse comparative des formations collagène d'éponges

Espèces	Formations collagène	% poids sec		% poids sec sans cendres		
		Cendres	Fe	N	Oses neutres	Hexosamines
<i>Hippospongia communis</i>	1 Spongine	1,7	0,14	15,9	5,7	0,5
	2 Spongine	13,3	5,5			
<i>Cacospongia scalaris</i>	Spongine	18,4	0,15	15,4	4,4	0,4
<i>Ircinia variabilis</i>	1 Filaments	17,7	0,31	16,4	7,0	0,7
	2 Filaments	23,4	4,2			
<i>Ircinia variabilis</i>	Collagène inter-cellulaire	-	0,15	14,8	7,0	3,0



Il reste encore 0,15 % de fer dans le collagène fibrillaire purifié d'*Ircinia*. Sa présence ne semble pas être due à une simple contamination. En effet, l'utilisation de tampon EDTA au cours des étapes de purification ne permettant pas l'élimination du fer, laisserait prévoir une fixation plus spécifique.

Les teneurs en azote restent dans l'éventail des valeurs rapportées par Eastoe (1968) pour des collagènes de différentes espèces.

La teneur en hexoses des formations collagènes examinées est relativement élevée. Ces oses sont essentiellement représentés par du glucose et du galactose en quantité à peu près identique. Le mannose signalé par Gross et coll (1956) dans la Spongine B de *Spongia graminea* et par Katzman et Jeanloz (1970/a) dans la Spongine d'*Hippospongia gossypina* n'a pu être mis en évidence dans nos préparations par la microméthode de chromatographie des hexoses sur papier Kodak que nous avons utilisée (Moczar et coll. 1967).

B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les formations collagènes analysées présentent les caractéristiques admises pour les collagènes (Eastoe, 1968) : plus de 300 résidus glycine pour 1000 résidus, teneur élevée en hydroxyproline, présence d'hydroxylysine (Tableau 5). Trois spongines se distinguent pourtant par un nombre de résidus glycine inférieur à 300, une teneur en hydroxyproline plus faible et une quantité de lysine nettement plus élevée : ce sont les fibres de *Cacospongia* et

TABLEAU 5

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FORMATIONS COLLAGENES DES EPONGES,
EXPRIMEES EN RESIDUS POUR 1000 RESIDUS



61.

Acides aminés	Collagène fibrillaire			Filament	Spongine					Spongine périspiculaire
	Ircinia	Chondrosia	Tethya		Ircinia	Ircinia fibres	Hippo-spongia	Caco-spongia	Spongia	
3-HYDROXYPROLINE	24	27	26	15	13	10	9	12	8	tr
4-HYDROXYPROLINE	79	71	75	85	79	87	63	76	46	20
ACIDE ASPARTIQUE	86	104	102	82	110	94	110	105	100	92
THREONINE	43	43	42	27	24	26	20	28	66	42
SERINE	42	45	45	20	19	25	21	24	102	55
ACIDE GLUTAMIQUE	104	90	86	80	83	79	69	78	70	110
PROLINE	63	63	60	74	67	67	87	67	80	67
GLYCINE	309	306	309	328	323	319	260	318	257	201
ALANINE	63	62	57	101	83	84	69	79	54	76
VALINE	39	29	30	28	24	30	31	29	29	52
1/2 CYSTINE	7	-	-	6	16	7	37	10	8	16
METHIONINE	tr	2	2	3	2	tr	4	2	3	tr
ISOLEUCINE	26	25	28	20	19	21	23	22	2	49
LEUCINE	33	36	37	22	23	27	33	27	28	54
NORLEUCINE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TYROSINE	4	6	6	3	9	2	4	3	16	22
PHENYLALANINE	10	18	23	9	10	10	18	10	6	29
HYDROXYLYSINE	13	16	16	30	25	29	32	29	26	12
LYSINE	9	7	7	20	25	34	56	34	39	44
HISTIDINE	2	4	4	5	4	4	4	5	10	11
ARGININE	44	46	45	42	42	45	50	42	50	48

Verongia, la spongine périscopulaire d'*Halichona*. L'analyse des fibres de *Verongia* montre de plus un nombre de thréonine et sérine étonnamment important.

Ces résultats suggèrent dans ces 3 fibres de Spongine, la présence, en quantité non négligeable, de protéines non collagène.

Au cours de l'élaboration de la Spongine par les cellules spécialisées, les spongioblastes, des corps étrangers peuvent se mêler aux fibrilles en cours de sécrétion. Nous avons noté précédemment la présence de sable ou débris divers dans les fibres de *Cacospongia* par exemple. Des petits morceaux de la trame intercellulaire peuvent aussi se trouver inclus dans les microfibrilles d'une fibre de Spongine au cours de sa sécrétion. Un bel exemple est fourni pour les fibres de *Verongia*. Ces fibres présentent une écorce et une large moelle constituées toutes deux d'un dense feutrage de microfibrilles de 4 à 6 nm sans striation périodique, différentes des fibrilles de collagène du milieu intercellulaire (Figure 8/A) (Vacelet et Garrone, 1976). Incluses dans les mailles arrondies du réseau microfibrillaire de Spongine de la moelle, des fibrilles de collagène sont aisément reconnaissables (Figure 9/B) et soulignent indubitablement l'hétérogénéité macromoléculaire de ces fibres.

De même, la Spongine périscopulaire des Haplosclérides contient des inclusions constantes et identifiables de fibrilles de collagène, mais aussi des enclaves variées plus ou moins complexes (Garrone,

1969 et 1978/a). De plus, le traitement à l'acide fluorhydrique du squelette de l'éponge dissout le spicule siliceux et laisse le filament axial dans la cavité spiculaire. La nature protéique non collagénique de cet axe spiculaire a été récemment confirmée (Shore, 1972). Celui-ci, difficilement séparable de la Spongine périspiculaire, apparaît comme un contaminant supplémentaire.

Les différences majeures relevées dans la composition en acides aminés de ces trois Spongines semblent donc essentiellement dues à une contamination de substances étrangères à la Spongine. Nous considérons comme constitué de spongine pure les fibres contenant plus de 300 résidus de glycine pour 1000 résidus. La composition en acides aminés de la Spongine périspiculaire largement contaminée ne pourra donc guère être comparée à celle des grosses fibres des Eponges Cornées au cours de cette étude.

La composition en acides aminés de la Spongine des grosses fibres d'*Ircinia*, *Hippospongia* et *Spongia* montre une assez bonne analogie (Tableau 5). Celle du filament d'*Ircinia* est très voisine. Elle se distingue par une légère différence dans les teneurs en acide aspartique et alanine, mais s'oppose essentiellement par une inversion du rapport hydroxyllysine/lysine.

Des différences beaucoup plus significatives apparaissent lorsque nous comparons les formations de Spongine aux collagènes fibrillaires (Tableau 5). Sont évidentes immédiatement les teneurs plus élevées de 3-hydroxyproline et surtout de thréonine et sérine des

collagènes fibrillaires. Par contre, les quantités d'hydroxylysine et de lysine sont plus faibles avec une prédominance de l'hydroxylysine sur la lysine qui se retrouve aussi dans les filaments d'*Ircinia*.

Pour situer les formations collagènes d'Eponge par rapport aux collagènes de Vertébrés et d'Invertébrés, nous avons comparé les acides aminés par groupes (Tableau 6).

Les acides aminés hydroxylés restent assez constants tout au long de l'échelle phylogénétique, le collagène interstitiel de l'éponge et celui des membranes basales se distinguant par une teneur plus élevée. Toutefois, la somme thréonine + sérine diminue en remontant vers les Vertébrés avec une nette exception : les Spongines dont la somme atteint à peine celle des collagènes de type II et III.

La teneur en proline et hydroxyproline des formations collagènes de l'éponge et les collagènes d'Invertébrés est régulièrement inférieure à celle des différents types de collagène des Vertébrés. Au contraire, la teneur en acides aminés dicarboxyliques des collagènes diminue en remontant l'échelle phylogénétique.

La somme des acides aminés basiques montre peu de variations ; le collagène fibrillaire de l'éponge se caractérise par une valeur relative assez basse.

Ces quelques considérations globales et rapides nous ont permis

TABLEAU 6

COMPARAISON DES TENEURS EN ACIDES AMINÉS DE QUELQUES COLLAGÈNES

Groupe d'acides aminés	OH Acides aminés	Ser + Thre	Pro OH-Pro	Acides aminés hydrophobes	Acides aminés carboxyliques	Acides aminés basiques
<u>EPONGES</u>						
Collagène fibrillaire ¹	200	85	164	170	192	71
Filament Ircinia	166	47	161	180	165	97
Spongine ²	166	49	153	166	185	106
<u>INVERTEBRES</u>						
Anémone de mer ³	189	94	121	152	170	112
Moule byssus ⁴	163	86	147	164	158	85
Ormeau ⁵ muscle α -chaîne	176	75	183	152	154	84
Seiche ⁵ $\alpha 1$	159	67	182	172	140	90
α	155	55	178	166	147	108
<u>VERTEBRES</u>						
Type I ⁶ , $\alpha 1$ (I)	167	61	226	175	121	88
$\alpha 2$ (I)	162	63	201	190	112	89
Type II ⁷ α (II)	182	52	218	169	127	88
Type III ⁸ α (III)	172	52	221	169	125	92
Membrane basale glomérulaire humaine α (IV) ⁹	253	60	202	156	135	98

Notes

OH Acides aminés = OH-Pro + Thre + Ser + Tyr + OH-Lys

Acides aminés hydrophobes = Ala, Val, Leu, Isoleu, Phe

Acides aminés dicarboxyliques = Glu et Asp

Acides aminés basiques = Lys, OH-Lys, His, Arg

¹ : moyenne des valeurs obtenues pour les trois éponges² : moyenne des fibres d'Ircinia, Hippospongia et Spongia³ : Katzman et Kang, 1972⁴ : Pikkarainen et coll, 1968⁵ : Kimura et Matsuura, 1974⁶ : Piez et coll, 1963⁷ : Miller, 1971⁸ : Byers et coll, 1974⁹ : Kefalides, 1971

de situer les formations collagènes des Eponges dans un contexte phylogénétique et de souligner leurs particularités.

Nous allons maintenant discuter plus en détail l'étude des acides aminés qui jouent un rôle essentiel dans la genèse de la fibre de collagène pour essayer de mieux expliquer la structure et la morphologie des différentes formations collagène de l'Eponge.

C - HYDROXYLATION DE LA PROLINE

Comme nous venons de le noter en examinant le Tableau 5, la teneur globale en proline et hydroxyproline des collagènes d'éponges et en général des collagènes d'Invertébrés est plus faible que celle des différents types de collagène de Vertébrés.

Nous avons obtenu pour le collagène interstitiel d'éponges un rapport proline/hydroxyproline d'environ 0,61 et pour les Spongines autour de 0,74. Pourtant, dans les collagènes d'Invertébrés généralement étudiés (Tableau 7), celui-ci varie entre 1,1 et 1,4, valeurs que l'on retrouve dans les collagènes interstitiels de Vertébrés de type I et II (seulement 0,85 dans le type III). Dans les collagènes de membranes basales (Kefalides, 1973), ce rapport varie de 0,41 à 0,62, soulignant comme dans les collagènes d'Eponges, une forte hydroxylation de la proline.

Actuellement, la raison de cette augmentation de l'hydroxyproline totale dans les membranes basales n'est pas très claire. Elle

TABLEAU 7

COMPARAISON DES TENEURS EN HYDROXYPROLINE
ET PROLINE DE DIFFERENTS COLLAGENES

	HYDROXYPROLINE		Pro/OH-Pro
	4-isomère (rés/1000)	3-isomère (rés/1000)	
Coll. Fib. Ircinia	79	24	0,61
Filament d'Ircinia	85	15	0,74
Spongine	79	13	0,73
Anémone de mer ¹	61	6	1,24
Ormeau muscle ²	80	1	1,26
Poulpe peau α_1 ²	81	2	1,1
Crabe membrane α_1 ²	85	1	1,3
Homard membrane α_1 ²	81	1	1,4
Peau de seiche ² α_1	75	2	1,33
α_2	71	2	1,44
Type I ³ α_1 (I)	99	1	1,3
α_2	89	1	1,3
Type II ⁴ α_1 (II)	103	2	1,10
Type III ⁵ α_1 (III)	112	ND	0,97
Type IV ⁶ α_1 (IV)	130	11	0,41
Type V ⁷ α (A)	109	2,5	0,87
α (B)	109	2,9	1,0

ND : non déterminé

¹ : Katzman et Kang, 1972

² : Kimura et Matsuura, 1974

³ : Epstein et coll, 1971

⁴ : Miller, 1971

⁵ : Byers et coll, 1974

⁶ : Kefalides, 1971

⁷ : Burgeson et coll, 1976



pourrait être due à des différences dans la structure primaire et dans la position des résidus prolyle dans le triplet Gly-X-Y. Certains auteurs ont montré que la proline en position 3 des triplets du type Gly-X-Pro est préférentiellement hydroxylée (Kivirikko et Prockop, 1967 ; Fujimoto et Prockop, 1969), mais aussi qu'une fraction significative de l'acide aminé en troisième position dans de tels triplets est la proline plutôt que l'hydroxyproline dans les cinquante premiers résidus d'acides aminés de la partie NH₂ terminale de la chaîne α_1 du collagène de la peau et du tendon de rat (Bornstein, 1967 ; Bornstein et Kang, 1970). Il est, cependant, concevable qu'au cours de l'hydroxylation du collagène des membranes basales, une proportion plus élevée de triplets de type Gly-X-Pro soit hydroxylée ; en effet, les molécules synthétisées par les cellules de la capsule cristalline restent plus longtemps à l'intérieur de la cellule que celles produites par les cellules de la peau et du tendon (Grant et coll, 1972/a, 1972/b ; Dehm et Prockop, 1971). L'hydroxylation des résidus prolyle commence sur les polypeptides au cours de leur assemblage et se poursuit sur les chaînes pro- α jusqu'à ce que celles-ci forment une triple hélice stable (Juva et coll, 1966 ; Bhatnagar et Liu, 1973 ; Uitto et Prockop, 1974).

Chez les Spongiaires, la durée de la synthèse complète d'une fibrille de collagène a pu être évaluée approximativement à plusieurs heures (une dizaine peut-être chez *Chondrosia* (Garrone et coll, 1975). Chez les Vertébrés, l'élaboration d'une chaîne de collagène dure environ sept minutes (Vuvst et Piez, 1972) et celle d'une fibrille moins d'une heure (Ross et Benditt, 1965).

Ainsi, par comparaison avec ce qui se passe dans le fibroblaste, la formation de la triple hélice étant plus lente dans le lophocyte ou le spongiocyte, les chaînes polypeptidiques non encore hélicoïdales resteront plus longtemps sous l'action des hydroxylases. Comme pour les membranes basales, un nombre de résidus prolyle plus important pourra être hydroxylé.

Hydroxylation en position 3 de la proline

Piez et Gross (1959) avaient noté la présence d'un acide aminé cyclique particulier dans les hydrolysats de collagène d'éponges. Ce composé a été isolé et identifié par comparaison avec un produit synthétique comme étant la 3-hydroxyproline (Irreverre et coll, 1962).

Cet acide aminé est généralement signalé en faible quantité dans les collagènes de Vertébrés ou d'Invertébrés : 1 à 2 résidus pour 1000 résidus (Tableau 7) (Piez et coll, 1963 ; Kimura et Matsuura, 1974). Mais, des teneurs plus élevées ont été rapportées pour le collagène de l'anémone de mer (Katzman et Kang, 1972 ; Nordwig et coll, 1973) et pour le collagène isolé à partir des membranes basales (Kefalides, 1971) : 8 à 15 résidus pour 1000 résidus.

Le seul résidu 3-hydroxyproline normalement trouvé dans les chaînes $\alpha_1(I)$, de même que les résidus trouvés dans le collagène de type IV se retrouvent dans la séquence Gly-3Hyp-4Hyp (Gryder et coll, 1974). Mais les séquences Gly-Pro-4Hyp sont courantes dans le collagène et les possibilités de 3-hydroxyproline en position 2

dans le triplet sont nombreuses dans la molécule. Existe-t-il des répresseurs qui limitent cette hydroxylation par une deuxième prolyl-hydroxylase aux spécificités différentes de celle qui est connue ? Aucune synthèse de 3-hydroxyproline n'a pu être détectée avec une prolyl-4-hydroxylase pure d'embryons de Poulet, suggérant que des enzymes différentes interviennent dans la synthèse des deux isomères (Berg et Prockop, 1973/b ; Risteli et coll, 1977). En effet, récemment (Tryggvason et coll, 1977) la prolyl-3-hydroxylase a pu être séparée de la prolyl-4-hydroxylase et des études comparatives indiquent que la formation de la 3-hydroxyproline dépend de la présence de 4-hydroxyproline. Il semble donc que la 3-hydroxyproline est formée au cours de la biosynthèse du collagène après la 4-hydroxylation d'un nombre convenable de résidus prolyle, mais avant la formation de la triple hélice.

Sur la base des données rapportées pour les vitesses de formation de la 4-hydroxyproline et de formation de la triple hélice dans les cellules synthétisant les collagènes de type I ou IV, il peut être estimé que le temps disponible pour la formation de 3-hydroxyproline dans la biosynthèse du collagène de type IV peut être 10 fois plus long que dans le type I (Grant et coll, 1973 ; Schofield et coll, 1974). La différence d'un dixième dans la teneur en 3-hydroxyproline entre ces deux collagènes (Piez, 1976) peut donc être attribuée au facteur temps, bien que naturellement la possibilité qu'il y ait aussi des différences dans les degrés d'activité de la 3-hydroxylase entre les cellules synthétisant ces deux types de collagène ne soit pas exclue.

D - HYDROXYLATION DE LA LYSINE

L'étendue de l'hydroxylation des résidus lysyle de procollagène dépendrait, comme pour l'hydroxylation de la proline, de la concentration des polypeptides non hydroxylés dans les vésicules du réticulum endoplasmique, de l'activité de la lysyl-hydroxylase dans le même compartiment, et du temps pendant lequel les chaînes pro- α restent non-hélicoïdales.

Chez les organismes supérieurs, la teneur en hydroxylysine d'un collagène varie beaucoup d'un tissu à l'autre et en fonction du degré de développement (Miller et coll, 1967 ; Barnes et coll, 1974). Cependant, le pourcentage de lysine hydroxylée est faible dans les collagènes de type I et III et atteint 80 % dans les membranes basales (Tableau 8).

Une étude en survie de différents tissus d'embryons de poulet a montré que les tissus qui contiennent un collagène avec une haute teneur en hydroxylysine, tendraient à avoir un rapport élevé de l'activité de la lysyl-hydroxylase par rapport à celle de la prolyl-hydroxylase, tandis que les tissus qui contiennent un collagène avec une faible teneur en hydroxylysine tendraient à avoir une valeur basse pour ce rapport (Ryhänen et Kivirikko, 1974). Cette corrélation suggère que le taux de prolyl-hydroxylase pourrait être un facteur contrôlant le niveau d'activité de la lysyl-hydroxylase, lequel définirait la teneur en hydroxylysine du collagène synthétisé par le tissu.

TABLEAU 8

COMPARAISON DE LA TENEUR EN HYDROXYPROLINE
ET LYSINE DE DIFFERENTS COLLAGENES

Collagène	Lysine (rés/1000)	OH-Lys (rés/1000)	Total Lys + OH-Lys	% de Lys hydroxylée
Ircinia coll. Fib.	9	13	22	60
Filament	20	30	50	60
Spongine	25	25	50	50
Anémone de mer ¹ α	16	24	40	60
Ormeau muscle ² α	8,4	13,6	22	62
Peau de seiche ² α_1	13	11	24	46
	α_2	11	25	36
Type I ³ α	30	5	35	14
	α^1	21	10	31
α^2	22	14	36	39
Type II ⁴	35	5	40	12
Type III ⁵	10	45	55	82
Type IV ⁶	12	22	34	64
Type V ⁷ αA	13	39	52	75
	αB			

- ¹ : Katzman et Kang, 1972
² : Kimura et Matsuura, 1974
³ : Epstein et coll, 1974
⁴ : Miller et Lunde, 1973
⁵ : Byers et coll, 1974
⁶ : Kefalides, 1971
⁷ : Burgeson et coll, 1976



Dans le collagène interstitiel des éponges, la teneur en lysine plus hydroxylysine est basse et un peu inférieure à la moitié de celle trouvée dans les Spongines (Tableau 8). Mais le pourcentage de l'hydroxylation est assez voisin, dans les deux formations collagènes, et atteint respectivement 60 et 50. Des valeurs de cet ordre sont rapportées pour les collagènes d'Invertébrés.

La teneur en hydroxylysine d'un collagène peut avoir d'importantes conséquences biologiques. En effet, les liaisons pontiques ("cross-links") du collagène dérivées des résidus lysyle sont moins stables que celles dérivées des résidus hydroxylysyle (Miller et Robertson, 1973).

E - GLYCOSYLATION DE L'HYDROXYLYSINE

Butler et Cunningham (1966) et Cunningham et Ford (1968) ont montré que dans le collagène de la peau de cobaye, les unités d'hexoses neutres sont composées de disaccharides (glucosylgalactose) et de monosaccharides (galactose), liés par une liaison o-glycosidique à l'hydroxylysine.

Ces deux dérivés saccharidiques existent dans tous les collagènes de Vertébrés, mais le degré de glycosylation de l'hydroxylysine et le rapport des résidus di-glycosylés aux résidus monoglycosylés varie indépendamment suivant les types de collagène et, suivant les tissus, en fonction de leur développement (Spiro, 1969 ; Pinnell et coll, 1971 ; Cintron, 1974).

Dans la plupart des collagènes interstitiels de Vertébrés, le rapport des unités disaccharidiques aux unités monosaccharidiques varie entre 1:1,5 et 3:1 (Spiro, 1969). Dans les collagènes de membranes basales, les résidus diglycosylés prédominent nettement dans un rapport de 19 disaccharides pour 1 monosaccharide (Kefalides, 1971). Ces mêmes unités saccharidiques se retrouvent dans les collagènes d'Invertébrés. La glucosylgalactosyl-hydroxylysine a été isolée et caractérisée à partir de la gélatine d'un échinoderme *Thyone briareus*, du collagène d'une anémone de mer *Metridium dianthus* et de la Spongine d'une éponge *Hippospongia gossypina* (Katzman et coll, 1972).

Le Tableau 9 donne les teneurs et les pourcentages en hydroxylysine libre, monoglycosylée et diglycosylée, des différentes formations de collagène issues de plusieurs espèces d'éponges. Les collagènes fibrillaires se distinguent encore nettement des Spongines. Ils sont moins riches en hydroxylysine totale et bien que présentant des quantités relatives plus faibles en résidus mono- et disaccharides, leur taux de glycosylation est toujours plus élevé.

Comparée aux collagènes de Vertébrés (Spiro, 1969), la Spongine se rapproche du collagène de la cornée par son pourcentage en hydroxylysine glycosylée (environ 50 %), mais le nombre d'unités saccharidiques liées à l'hydroxylysine est aussi élevé que celui rencontré dans les membranes basales.

TABLEAU 9

TENEUR ET POURCENTAGE EN HYDROXYLYSINE LIBRE, MONOGLYCOSYLEE ET
DIGLYCOLYSEE, DE DIFFERENTS COLLAGENES D'EPONGE

Formations collagènes	Hyl totale (rés/1000)	Gal.Hyl		Glc-Gal-Hyl		Hyl libre		Hyl totale/Hyl libre
		(rés/1000)	%	(rés/1000)	%	(rés/1000)	%	
<u>Coll. fibrillaire</u>								
Ircinia	13	0,4	3,0	9,2	70,8	3,4	26,2	3,8
Spongia	14	0,8	5,7	8,7	62,1	4,5	32,2	3,1
Chondrosia	16	0,7	4,4	11,1	69,4	4,2	26,3	3,8
Tethya	16	0,8	5,0	11,1	69,4	4,2	26,3	3,8
Suberites	15	0,7	4,7	10,1	67,3	4,2	28,0	3,6
<u>Fil. Ircinia</u>	30	0,9	3,0	14,1	47,0	15,0	50,0	2,0
<u>Spongine</u>								
Hippospongia	29	1,2	4,1	13,2	45,5	14,5	50,0	2,0
Spongia	29	1,0	3,4	13,5	46,6	14,5	50,0	2,0
Cacospongia	32	0,8	2,5	16,8	52,5	14,3	44,7	2,2
<u>Spongine périscopulaire</u>								
Haliclona	12	traces	-	7,0	58,3	5,0	31,7	2,4

(rés/1000) = résidus pour 1000 résidus d'acides aminés

% de Hyl totale

Le collagène fibrillaire de l'Eponge montre des taux de glycosylation assez similaires à ceux rapportés pour des collagènes d'invertébrés (Stemberger et Nordwig, 1974).

Il y a relativement peu d'informations sur les facteurs qui contrôlent la glycosylation du procollagène avant qu'il ne soit secrété, mais Myllyla et coll (1975) ont apporté la preuve que la transférase qui fixe le deuxième sucre, le glucose, ne peut pas agir sur le collagène constitué en triple hélice. L'importance de la glycosylation dépendrait donc de l'activité des transférases et du temps pendant lequel les polypeptides du collagène restent non-hélicoïdaux.

La fonction biologique des hexoses trouvés dans le collagène reste encore très confuse. Un rôle dans le contrôle de la morphologie des fibres de collagène leur a cependant été attribué (Spiro, 1969 ; Grant et coll, 1969) : entre le degré de glycosylation et le diamètre des fibres, une relation inverse semble exister (Morgan et coll, 1970 ; Schofield et coll, 1971). Ainsi, une glycosylation élevée du collagène du tendon de l'embryon de poulet est compatible avec l'observation de fibrilles plus fines que chez l'oiseau de 6 mois (Fitton Jackson, 1968). De récentes études sur le collagène de la cornée normale et cicatricielle soulignent cette corrélation (Cintron, 1974). Le collagène de la cornée cicatricielle présente une faible teneur en glucides et un diamètre des fibres plus grand et variable (Jakus, 1962).

Nous sommes tentés d'étendre cette hypothèse aux formations collagène de l'Eponge. Ainsi, les spongines qui contiennent environ 15 résidus glucides liés à l'hydroxylysine (Tableau 9) s'organisent en fibrilles beaucoup plus fines (Garrone, 1978/a) que le collagène interstitiel qui n'en contient qu'une dizaine.

F - LES RESIDUS CYSTEINE

L'extension peptidique carboxy-terminale des chaînes pro- α de type I et II contiennent des résidus cystéine (Merry et coll, 1976 ; Lichtenstein et coll, 1976 ; Olsen et coll, 1977) qui vont consolider l'assemblage des trois chaînes pro- α par la formation de ponts disulfure (Grant et coll, 1973 ; Uitto et Prockop, 1973 ; Harwood et coll, 1973, 1977).

Contrairement aux collagènes de type I et II, les collagènes de type III et IV possèdent des liaisons disulfure dans la partie hélicoïdale résistante aux protéases (Kefalides, 1973 ; Epstein, 1974 ; Byers et coll, 1974 ; Chung et Miller, 1974 ; Trelstad et Lawley, 1977).

La présence de ces ponts disulfure a été signalée dans le collagène d'Invertébrés comme l'ascaris (McBride et Harrington, 1967 ; Fujimoto, 1968 ; Fujimoto et coll, 1969). Les collagènes de l'éponge contiennent aussi plusieurs résidus cystéine (Tableau 4). Pourtant, la réduction et l'alkylation des ponts disulfure ne permet pas d'améliorer la solubilité de ces collagènes.

G - LIAISONS COVALENTES INTRA- ET INTERMOLECULAIRES

Par réduction avec le borohydrure tritié, les liaisons intermoléculaires des différentes formations collagène d'éponges ont été étudiées en appliquant la méthode mise au point par Bailey (1968). La description de cette technique est donnée Chapitre VI, N° 8. Le collagène de la peau de veau a été utilisé comme témoin (Figure 16).

Deux types de liaisons intermoléculaires couramment rencontrées dans les collagènes de Vertébrés, ont été retrouvés sous leur forme réduite dans les formations collagène des Eponges : la dihydroxylysinonorleucine et l'hydroxylysinonorleucine. La dihydroxylysinonorleucine montre une très légère prédominance sur l'hydroxylysinonorleucine dans le collagène interstitiel de *Tethya* et dans les filaments d'*Ircinia* (Figures 17-18). Au contraire, dans la spongine d'*Hippospongia*, l'hydroxylysinonorleucine prédomine nettement (Figure 19).

Précédemment, différentes études sur les collagènes de tissus de mammifères et d'oiseaux ont montré la présence de ces liaisons intermoléculaires dérivées des aldéhydes de la lysine et de l'hydroxylysine (Bailey et Peach, 1968 ; Bailey et coll, 1970). Celles-ci ont aussi été mises en évidence dans les collagènes reprécipités *in vitro*, après leur isolement sous forme soluble de différents tissus de Vertébrés (Kang et coll, 1970 ; Tanzer et coll. 1970). L'étude comparative des collagènes d'Invertébrés a montré que leur stabilité était basée sur les mêmes systèmes de

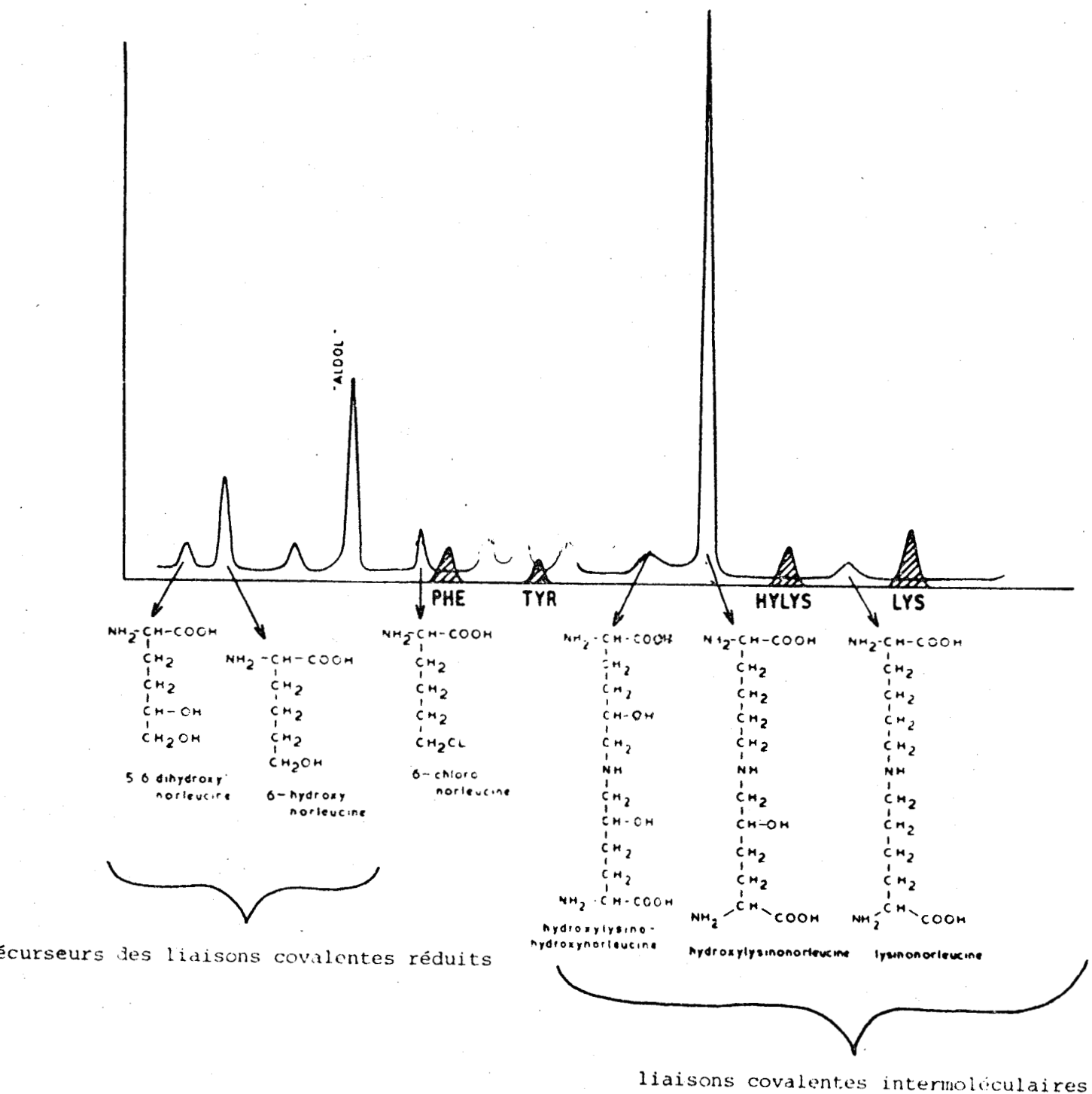


Figure 16 : Collagène de la peau de boeuf



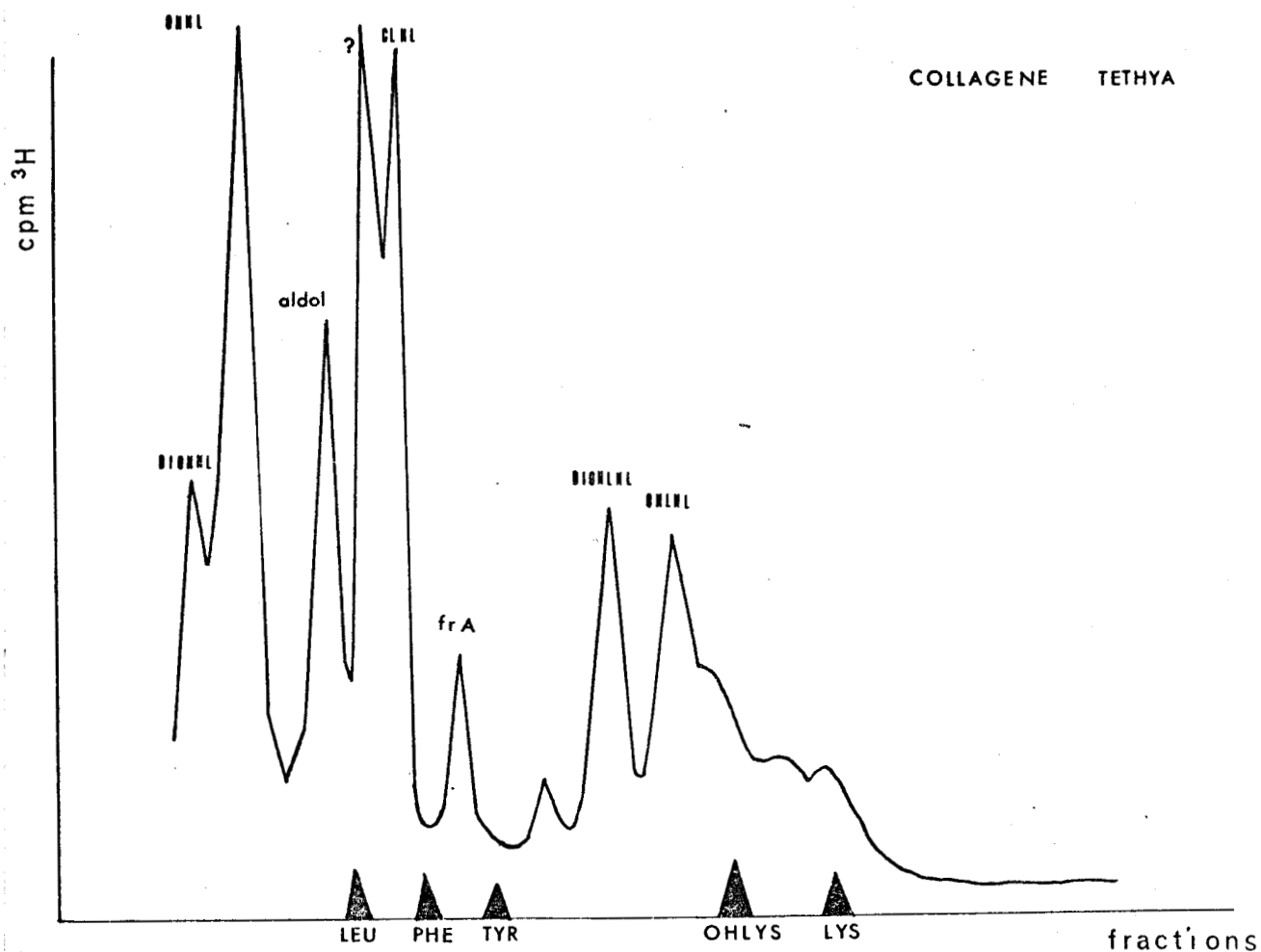


Figure 17 : Distribution du tritium dans les hydrolysats acides du collagène intercellulaire de *Tethya*. Le diagramme montre la position des deux liaisons intermoléculaires réduites : la dihydroxylysine (DIOHNL) et l'hydroxylysine (OHNL)

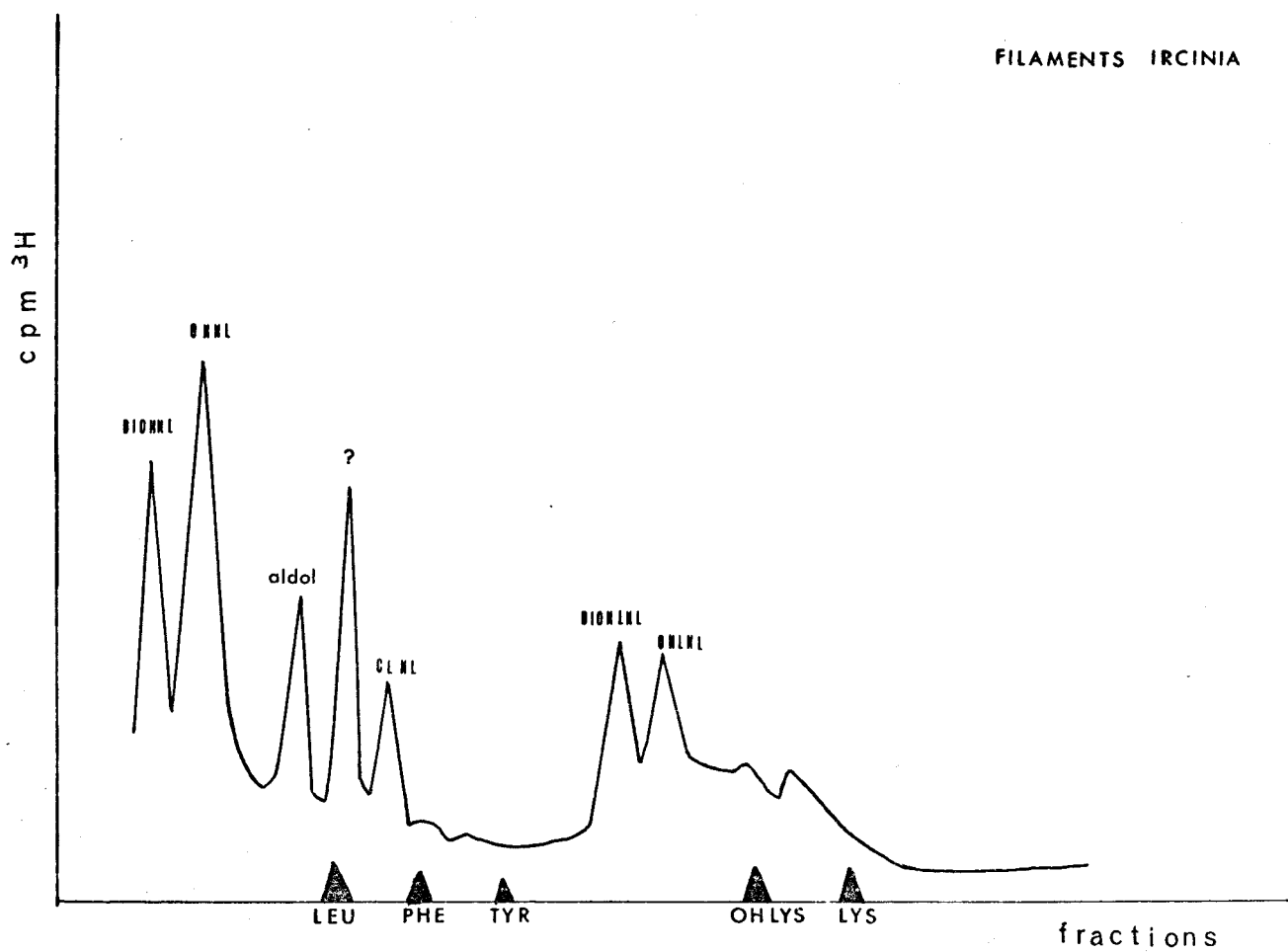


Figure 18 : Distribution du tritium dans les hydrolysats acides des filaments d'*Ircinia*.



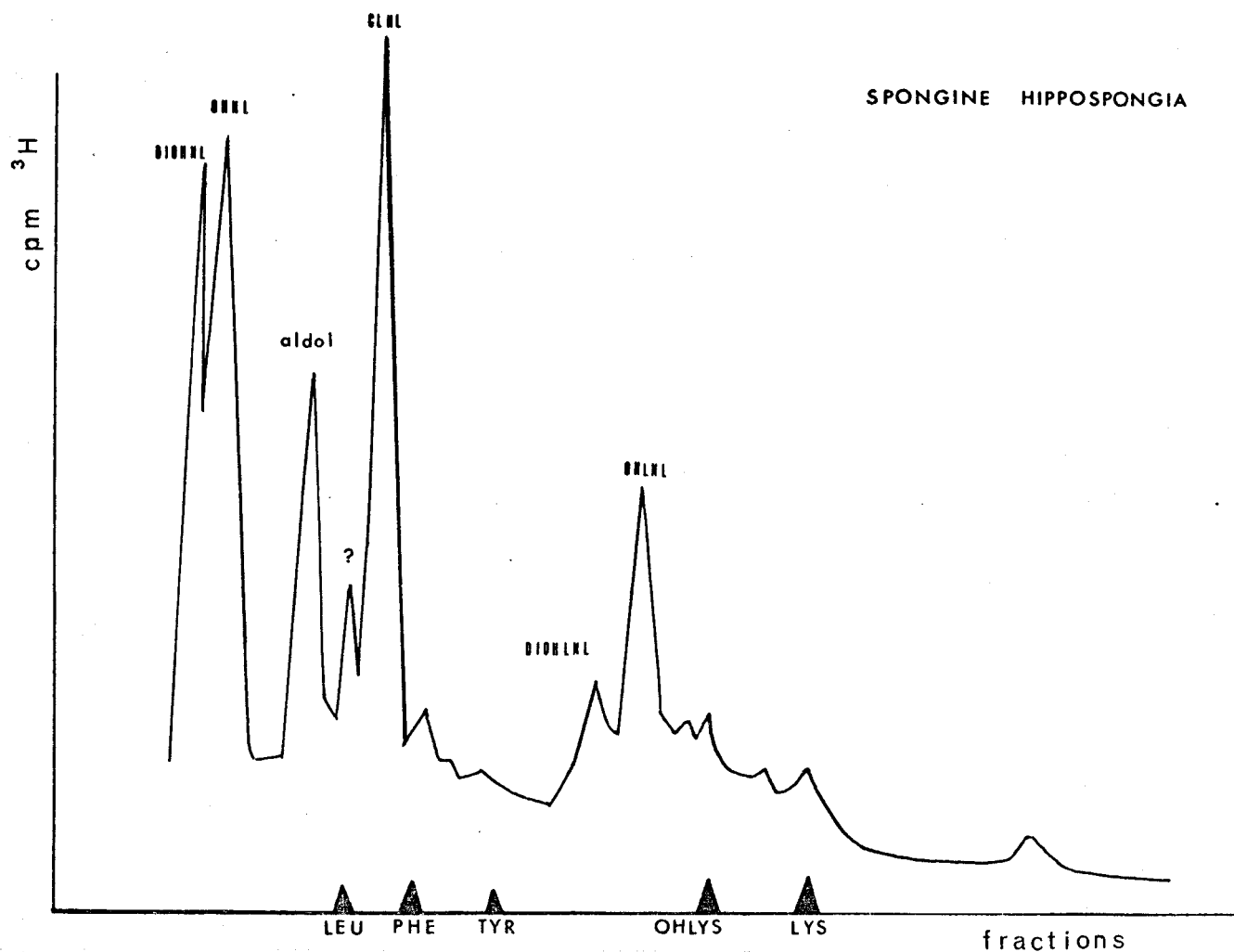


Figure 19 : Distribution du tritium dans les hydrolysats acides des fibres de spongine d'*Hippospongia*.



liaisons covalentes que dans les collagènes des Vertébrés les plus évolués (Bailey, 1971 ; Eyre et Glimcher, 1971).

L'existence de la dihydroxylysino-norleucine et de l'hydroxylysino-norleucine dans les collagènes de l'Eponge, le plus primitif des êtres multicellulaires, confirme la préservation des mêmes types de liaisons intermoléculaires au cours de la phylogénèse.

Pourtant, les collagènes de l'Eponge montrent une stabilité particulière plus grande que celle observée pour l'ensemble des collagènes de Vertébrés et même d'Invertébrés. L'impossibilité d'isoler leurs chaînes α semble impliquer la présence de liaisons d'un type très différent. L'hypothèse de l'intervention d'un ion minéral (fer ou silice) a été soulevée. Mais, actuellement, aucune donnée n'a pu être apportée pour la confirmer ou l'infirmier.

Faudrait-il chercher une explication dans l'importance des précurseurs réduits des liaisons covalentes, c'est-à-dire des composés, obtenus après réduction au borohydrure tritié, tels que dihydroxy-norleucine, hydroxynorleucine et chloronorleucine dans les hydrolysats de collagènes d'Eponge (Figures 17, 18, 19) ? Eyre et coll (1971) a montré des résultats identiques aux nôtres pour une éponge *Haliclona oculata*. De même, Bailey (1971) a obtenu, à partir d'un morceau d'éponge (*Suberites*) mis en suspension et réduit, une petite fraction de la radioactivité au niveau des pics correspondant aux deux liaisons intermoléculaires, mais la majorité de la radioactivité se retrouve dans les pics correspondant aux

précurseurs. Aucune tentative d'isolement du collagène n'ayant été faite, les composés réduits marqués pourraient provenir des molécules non-collagène présentes dans le tissu de l'éponge étudiée. Une telle objection ne peut être maintenue après la purification des formations collagène de l'Eponge que nous avons fait subir à nos préparations avant la réduction.

6 - CONCLUSIONS

L'étude de la composition biochimique des diverses formations collagène de l'Eponge fait apparaître, malgré une résistance très particulière aux agents hydrolysants, des caractéristiques très comparables à celles qui ont été décrites chez les Vertébrés.

En effet, si les étapes intercellulaires de la biosynthèse des collagènes n'ont pas été étudiées dans un lophocyte ou un spongio-cyte d'Eponge comme elles l'ont été dans le fibroblaste des Vertébrés, l'analogie des molécules respectivement synthétisées suggère des processus de régulation identiques : transcription et arrangement des chaînes polypeptidiques dans les ribosomes, hydroxylation des résidus prolyle et lysyle, glycosylation de ces derniers, formation de la triple hélice, sécrétion de la molécule et établissement des liaisons quaternaires intermoléculaires. Existe-t-il aussi dans l'Eponge une ou deux endopeptidases qui vont raccourcir la molécule de collagène au moment de la sécrétion ? (Lapière et coll, 1971, 1975). La présence de plus de 300 résidus glycine pour 1000 résidus dans de nombreuses formations collagène d'Eponge étudiées est en faveur de leur existence. Pourtant, quelques spongines donnent un chiffre inférieur à 300 (Tableau 5). Cette valeur faible pourrait être le reflet d'une contamination par une protéine non collagénique plutôt que d'une absence de clivage des extensions peptidiques du procollagène. Nous avons en effet noté que dans les formations contenant moins de 300 résidus glycine, des fragments de la matrice extracellulaire

ont été observés, inclus au milieu des microfibrilles de spongine. Nous avons de plus retrouvé dans les collagènes des Eponges les deux principaux types de liaisons covalentes intermoléculaires décrits dans les collagènes de Vertébrés et représentés sous formes réduites par la dihydroxylysinonorleucine et l'hydroxylysinonorleucine.

Nos connaissances actuelles ne nous ont pas encore permis d'isoler et donc de caractériser les chaînes α des formations collagéniques des Eponges, aussi, seules les différences notées dans leurs compositions en acides aminés et observées dans leur aspect morphologique, permettent quelques remarques. En effet, le collagène extracellulaire se distingue significativement des Spongines par ses teneurs plus élevées en thréonine et sérine, et plus faibles en hydroxylysine + lysine. Ces résultats laissent supposer des modèles transcriptionnels différents pour ces deux molécules.

Les compositions en acides aminés du filament d'*Ircinia* et des fibres de Spongine sont par contre extrêmement voisines et pourraient supporter l'hypothèse de l'existence d'un même type de collagène dans ces formations particulières aux Eponges.

Les différences notées dans les degrés d'hydroxylation de la lysine et de glycosylation de l'hydroxylysine proviennent par contre de mécanismes enzymatiques post-transcriptionnels et pourraient apporter une explication aux différences ultrastructurales et morphologiques observées entre les formations collagéniques de l'Eponge.

Il reste aussi à souligner la grande parenté de la composition chimique des collagènes d'Eponge avec les collagènes des membranes basales de Mammifères qui sont bien moins structurés. Cette parenté ressort essentiellement des taux d'hydroxylation et de glycosylation élevés, de l'importance de la teneur en 3-hydroxyproline et en cystéine. Il semble que le temps pendant lequel les chaînes polypeptidiques des procollagènes en formation sont exposées à l'action des hydroxylases et glycosyltransférases soit un facteur qui pourrait expliquer l'importance des résidus hydroxylés et glycosylés dans le collagène d'Eponge comme dans le collagène des membranes basales. Cependant, les facteurs qui limitent l'hydroxylation et la glycosylation du collagène sont probablement complexes, et, impliquent les activités relatives des prolyl- et lysylhydroxylases et les concentrations relatives des substrats et cofacteurs dans les mêmes compartiments des cellules.

CHAPITRE IV

LES COMPOSANTS NON COLLAGENIQUES

1 - PRÉSENCE DES GLYCOPROTÉINES DE STRUCTURE DANS LA MATRICE INTERCELLULAIRE DES ÉPONGES

Dans une première approche, il nous a paru intéressant de démontrer la présence des glycoprotéines de structure dans la matrice intercellulaire des éponges. La méthode de fractionnement chimique, généralement utilisée dans notre laboratoire pour extraire les différentes macromolécules de la trame conjonctive des tissus de Vertébrés, et consistant à employer du TCA chaud pour éliminer le collagène et de l'urée 8M pour solubiliser les glycoprotéines de structure (Robert et Dische, 1963), a été adaptée au tissu spongiaire

Les morceaux d'éponges congelées sont lavés dans de l'eau distillée, et les macromolécules de la matrice intercellulaire sont dispersées soit par digestion enzymatique, soit par le dodécyl-sulfate, comme pour l'extraction du collagène (cf Chapitre III).

Après centrifugation à faible vitesse (5000 g), le surnageant, maintenu dans un bain de glace fondante, est acidifié avec de l'acide acétique à la concentration finale de 4 %. Le collagène et les glycoprotéines coprécipitent immédiatement. Le précipité centrifugé est soumis à deux extractions dans l'acide trichloracétique à 5 % à 90°C pendant 15 minutes. Le collagène partiellement hydrolysé passe en solution. Le résidu insoluble contient les glycoprotéines de structure, qui sont dissoutes dans l'urée 8M à la température du laboratoire (Robert et Parlebas, 1965 ; Robert et Robert, 1967 ; Timpl et coll., 1968, 1969). La préparation est

ensuite réduite et alkylée (Chapitre VI, N° 4).

Deux espèces d'éponges ont été soumises à un tel traitement :

Suberites massa et *Ircinia variabilis*. Une caractérisation partielle des extraits urée a été effectuée.

En électrophorèse sur bandes de cellogel (Figure 20/A), les extraits urée de *Suberites* et *Ircinia* migrent approximativement à la vitesse de l'albumine de sérum humain, en une large bande.

Par contre, en électrophorèse sur gel d'acrylamide (7 %) en présence de SDS 1 %, la majeure partie des glycoprotéines reste au sommet du gel (Figure 20/B). La petite fraction qui pénètre dans le gel donne deux ou trois bandes plus ou moins diffuses dans les zones de migration de l'albumine de sérum de boeuf et de l'ovalbumine.

La filtration sur Biogel P300 confirme ces résultats (Figure 21). Les limites d'exclusion et de fractionnement données pour ce gel sont 400,000-600,000. Le profil d'élution des extraits urée de *Suberites* et *Ircinia* montrent trois pics. Le premier apparaît dans le volume d'exclusion, soulignant la présence de protéines ou d'agrégats protéiniques de poids moléculaires élevés. Viennent ensuite deux pics de moindre importance assez mal séparés, mais nettement retenus dans le gel.

La composition en acides aminés des extraits urée et des trois fractions obtenues par filtration sur Biogel P300 de l'extrait

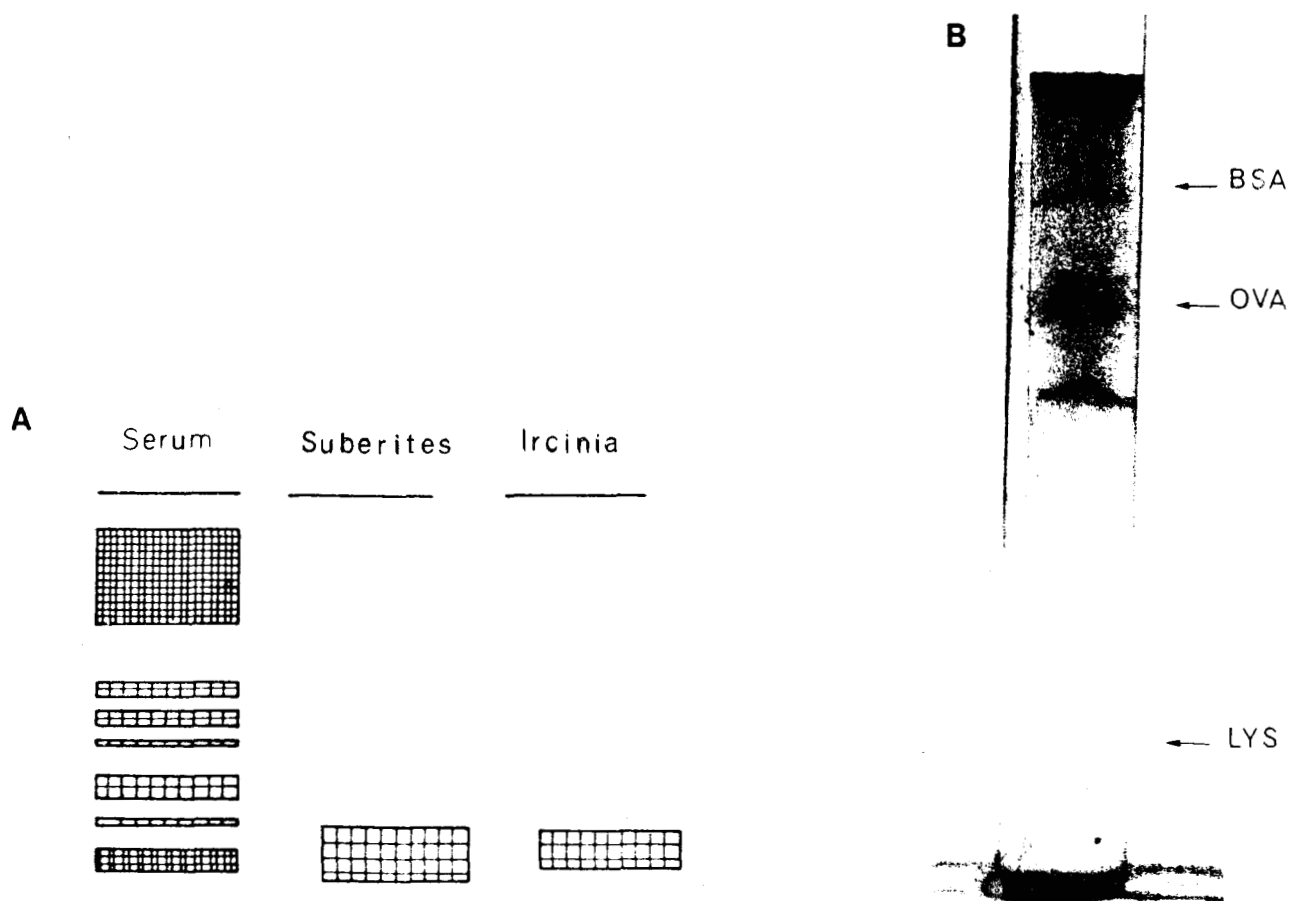


Figure 20

A/ Electrophorèse sur cellogel en tampon barbital pH 8,6 du sérum humain et de l'extrait urée de *Suberites* et d'*Ircinia*.

B/ Gel d'acrylamide en SDS de l'extrait urée de *Suberites*.

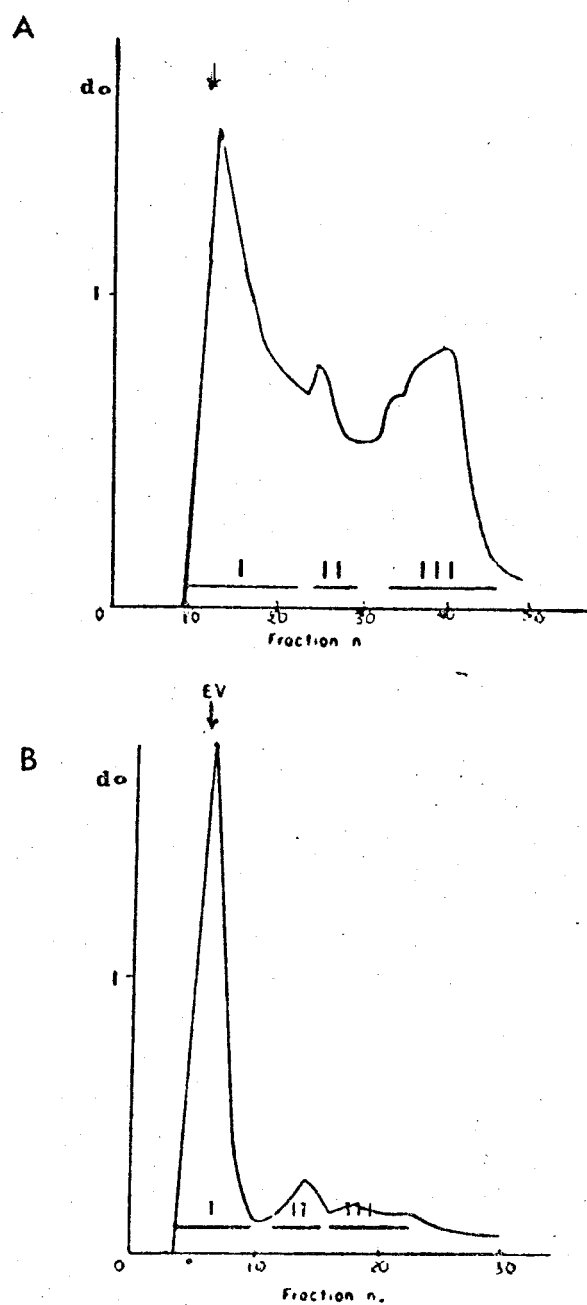


Figure 21

Filtration sur gel P300 dans un tampon tris-HCl 0,1M, pH 7,6
des extraits TCA urée d'Eponge :

A/ *Suberites*, colonne 2,5 x 50 cm

B/ *Ircinia*, colonne 1 x 40 cm

urée de *Suberites* a été établie (Tableau 10). Les résultats donnés pour les extraits urée de *Suberites* et *Ircinia*, ainsi que ceux obtenus à partir des pics I et II de *Suberites*, sont très comparables. Le pic III se distingue essentiellement des précédentes fractions par une diminution de l'acide aspartique, des thréonine et de sérine et de la cystine, une augmentation de l'alanine, de la leucine, de la lysine et de l'histidine. Ce pic de faible poids moléculaire contient vraisemblablement les peptides libérés au cours du violent traitement dans l'acide trichloracétique chaud. Des liaisons peptidiques labiles sont probablement hydrolysées (Wolff et coll., 1971), particulièrement les liaisons aspartyle et séryle, qui sont aisément clivées (Witkop, 1961).

Certains auteurs ont montré que les liaisons peptidiques comprenant l'acide aspartique (Schultz, 1967), les sérine et thréonine (Iwai et Ando, 1967), sont acido-labiles. Comme les glycoprotéines étudiées ont une teneur élevée en ces acides aminés (environ 220 résidus pour 1000, cf Tableau 10), l'exposition à un acide chaud ne peut laisser ces glycoprotéines dans leur état natif. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, contrairement aux autres protéines - comme par exemple le collagène - plus ces glycoprotéines seront dénaturées, dégradées par les acides, plus leur insolubilité augmentera. Leur tendance à se polymériser, à former des agrégats, sera très forte. La réduction et l'alkylation des ponts disulfure ne suffira pas à les dissocier, comme le montre la filtration sur gel d'agarose et l'électrophorèse en gel d'acrylamide (Figs 20 et 21)

TABLEAU 10



Composition en acides aminés des extraits urée d'Ircinia et de Subérites et des fractions obtenues par gel filtration.

Acides aminés	Subérites				Ircinia
	extrait urée	Pic I	Pic II	Pic III	extrait urée
Acide Aspartique	108	102	105	64	114
Threonine	49	53	55	33	51
Serine	38	38	38	25	46
Acide Glutamique	98	106	110	110	102
Proline	46	45	50	45	48
Glycine	89	91	92	91	98
Alanine	92	97	96	120	81
Valine	87	94	100	92	82
1/2 Cystine	21	19	17	3	12
Methionine	25	17	18	22	20
Isoleucine	63	68	65	71	57
Leucine	80	81	77	103	87
Tyrosine	39	21	10	13	40
Phénylalanine	54	53	52	53	55
Lysine	43	49	54	79	46
Histidine	17	17	18	26	12
Arginine	51	49	43	50	49

Comparée à la composition en acides aminés des glycoprotéines préparées à partir de quelques tissus conjonctifs d'Invertébrés et de Vertébrés, la composition en acides aminés des extraits urée d'éponges est très similaire. Le Tableau 11 donne une estimation chiffrée de l'analogie de la composition en acides aminés de nos préparations et de celles obtenues à partir de différents tissus. Les valeurs obtenues ne dépassent guère 50 et soulignent la stabilité de la composition en acides aminés tout au long de l'échelle phylogénétique.

La teneur et la composition en glucides des extraits urée d'éponges sont résumées dans le Tableau 12. Les deux extraits contiennent des quantités relativement importantes d'hexoses et d'hexosamines. La glucosamine est le composant essentiel, et la galactosamine existe seulement à l'état de traces. Les compositions en oses, des glycoprotéines des deux éponges, révélées par chromatographie sur couche mince, sont très différentes. Les mêmes composants sont présents mais leurs teneurs sont variables. L'arabinose n'a pas pu être révélé à partir des extraits *Suberites*.

Le chauffage dans l'acide trichloracétique hydrolyse les résidus d'acides sialiques (Moczar et Robert, 1970). D'autres résidus glucidiques sont vraisemblablement hydrolysés après un tel traitement.

Aussi, ayant acquis chez les éponges, premiers êtres multicellulaires, une preuve suffisante de la présence de glycoprotéines de structure comparables à celles qui ont été isolées à partir de différents



TABLEAU 11

Estimation du coefficient d'analogie (d'après Marchalonis et Weltman, 1971) de la composition en acides aminés des extraits urée d'Eponge comparée à celle des glycoprotéines de structure de tissus conjonctifs d'Invertébrés et de Vertébrés.

Glycoprotéines d'Eponge	Glycoprotéines d'Invertébrés et de Vertébrés							Collagène intercel- lulaire d'Ircinia ++++
	Ircinia	Seiche +	Anémone de mer ++	aorte de porc +++	Cartilage de veau +++	Cornée de veau +++	aorte humaine +++	
<i>Suberites massa</i>	5	51	39	28	54	32	35	707
<i>Ircinia variabilis</i>		46	31	23	45	18	29	658

+ Moczar et Moczar (1976)

++ Katzman (1972)

+++ Robert et Comte (1968)

++++ Junqua et coll. (1974)

Le coefficient d'analogie est calculé en faisant la somme des carrés des différences entre les valeurs de chaque acide aminé des deux protéines comparées.

TABIEAU 12

Composition en glucides des extraits *Suberites* et *Ircinia*. Les oses neutres sont identifiés par chromatographie couche mince (Chapitre VI n° 9/Ba) et exprimés en rapport molaire, le galactose = 1.

	Hexoses & protéines	Hexosamines	Gal	Glc	Man	Fuc	Ara
Extrait urée <i>Suberites</i>	8,4	1,7	1	0,93	0,24	1,2	-
<i>Suberites</i> pic I	6,0		1	0,93	0,44	±	-
Extrait urée <i>Ircinia</i>	6,2	2,2	1	0,46	0,78	0,8	0,1



tissus conjonctifs de vertébrés, nous avons recherché une méthode d'isolement spécifique évitant tout agent hydrolytique et conservant les glycoprotéines dans un état aussi proche que possible de leur état natif.

- o -

2 - ISOLEMENT DES COMPOSANTS NON-COLLAGÉNIQUES

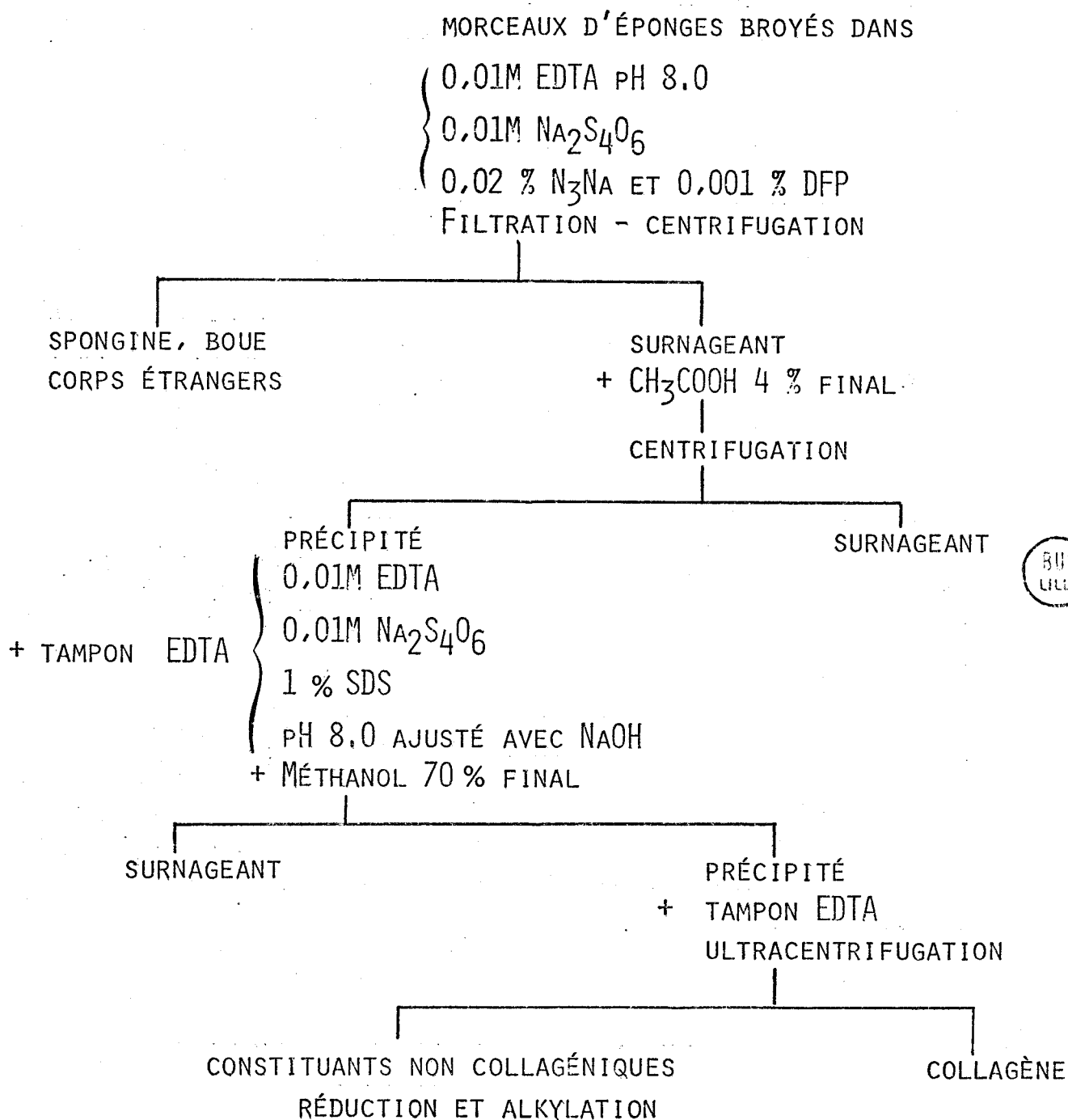
L'extraordinaire insolubilité du collagène interstitiel de la trame conjonctive des éponges est un caractère qui prend toute son importance dans l'isolement des constituants non collagéniques. L'élimination du collagène va en être grandement facilitée.

Les différentes étapes de fractionnement, le choix des agents ioniques et dissociants, sont des facteurs déterminants dans la séparation des macromolécules d'une trame conjonctive. Nous nous proposons de décrire le processus d'extraction et de purification choisi, d'en expliquer, puis discuter les différentes étapes.

A - DESCRIPTION DE LA METHODE D'ISOLEMENT (Figure 22)

Elle s'inspire de celle utilisée pour l'isolement du collagène (cf Chapitre III, 1/B), mais quelques modifications ont été apportées dans le but d'améliorer la purification et d'éviter toute dégradation hydrolytique des glycoprotéines.

Figure 22

Schéma d'extraction des constituants non-collagéniques de *Spongia*

L'éponge congelée est coupée en morceaux, rapidement décongelée et lavée dans de l'eau distillée à 4°C. Un broyage de 10 minutes est aussitôt effectué à l'aide d'un Omnimixer Sorvall, maintenu dans un bain de glace fondante. Cette opération est réalisée dans un "tampon EDTA" 0,01M à pH 8 contenant du tétrathionate de sodium (0,01M), du fluorophosphate de diisopropyle (0,001 %) et de l'azide de sodium (0,02 %).

Le mélange obtenu est filtré sur gaze de nylon et centrifugé à 5000 g pendant 20 minutes. Les fibres de Spongine, la boue, des matériaux étrangers comme les grains de sable, sont ainsi éliminés. Le surnageant maintenu à 4°C est acidifié avec de l'acide acétique à la concentration finale de 4 %. Le collagène et les glycoprotéines coprécipitent immédiatement et sont centrifugés à froid pendant 10 minutes. Le surnageant est écarté et le précipité est dissous à la température du laboratoire, sous agitation, dans le "tampon EDTA" auquel est ajouté 1 % de SDS. Le pH est réajusté à 8,0. Une seconde étape de purification par précipitation est effectuée en ajoutant à la suspension macromoléculaire du méthanol à la concentration finale de 70 %. Après centrifugation et remise en suspension dans du "tampon EDTA" contenant 1 % de SDS, le collagène est ultracentrifugé à 50.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant contient les glycoprotéines, qui sont réduites en présence d'un large excès de 2-mercaptoéthanol et alkylées avec de l'iodoacétamide (cf Chapitre VI, N° 4). La préparation est concentrée dans une cellule filtrante Amicon équipée d'une membrane PM 10.

Une filtration sur Sepharose 4B de cette préparation (colonne 5 cm x 80 cm) est effectuée à l'échelle préparative et l'élution est réalisée avec un tampon EDTA 0,01M pH 8,0 contenant 0,1 % de SDS, et 0,02 % de N_3Na .

Le profil d'élution des glycoprotéines montre trois pics bien séparés (Figure 23). Le premier, de faible importance, se situe dans le volume d'exclusion de la colonne. Son haut poids moléculaire, la présence d'hydroxyproline (2 à 5 %), suggèrent une agrégation macromoléculaire de collagène et de glycoprotéines fortement associés. Ce pic sera écarté sans mener plus loin son étude.

Le second pic, d'une importance majeure, contient l'essentiel des glycoprotéines. Aucune trace d'hydroxyproline n'a pu être décelée dans cette fraction par nos méthodes de dosage. L'hypothèse d'une contamination collagénique peut donc être écartée. Ce pic, représentant plus de 80 % de la fraction protéinique séparée du collagène par ultracentrifugation en présence de SDS, sera spécialement étudié.

Le dernier pic se situe en fin de colonne et correspond à des peptides de faible poids moléculaire (< 10.000). En effet, ce pic est fortement diminué et même à peu près supprimé par filtration sur une membrane Amicon PM 10 (zone de rétention un peu supérieure à 10.000). Il ne retiendra pas davantage notre attention.

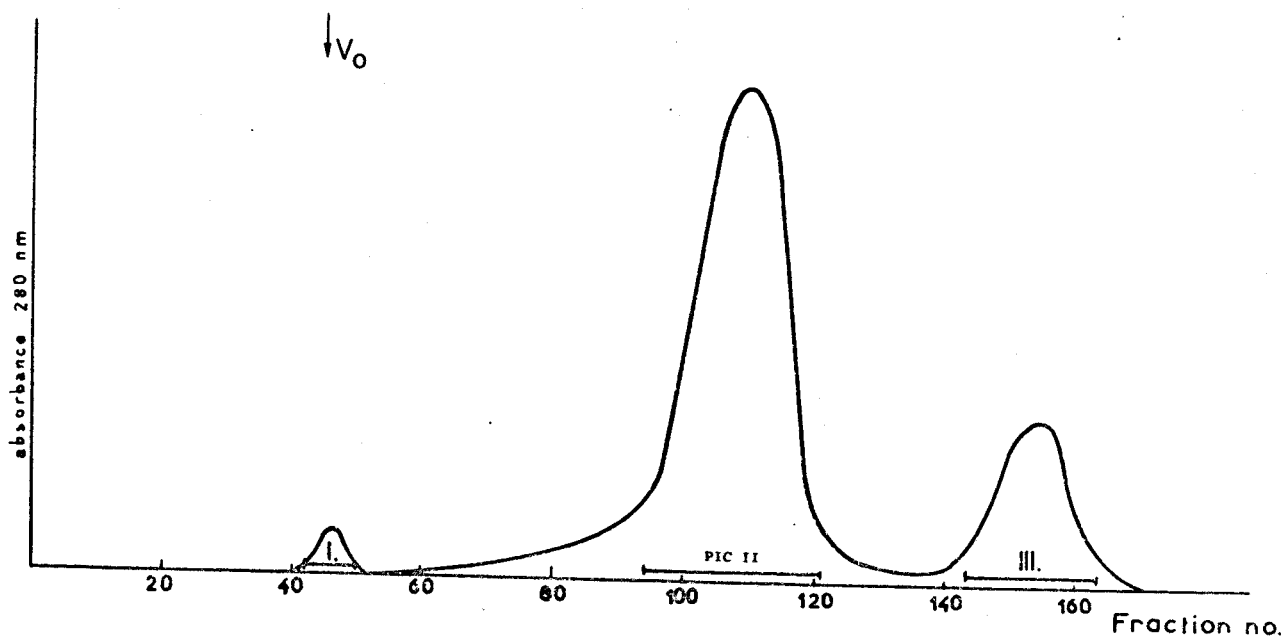


Figure 23 : Filtration sur colonne de Sepharose 4B (5 x 80 cm) de l'extrait EDTA ultracentrifugé de *Spongia*. Elution : tampon EDTA 0,1M, pH 8,0 contenant 0,1 % de SDS et 0,002 % N_3Na .

B - PROTEASES TISSULAIRES

Il ne fait plus de doute maintenant que les tissus conjonctifs contiennent des enzymes - telles que des protéases et des glycosidases - qui peuvent dégrader les glycoprotéines au cours de leur extraction.

Woessner (1973) a démontré la présence de cathepsine D dans les tissus conjonctifs et son activité protéolytique rapide sur un complexe protéine-polysaccharide à pH 5. Le pH optimum de cette enzyme se situe entre 3 et 4 (Barrett, 1970).

La cathepsine D a été identifiée dans la peau de lapin par Lazarus et Dingle (1974), qui observent une ligne de complète identité entre les extraits bruts de peau et la cathepsine D purifiée à partir du foie.

La présence d'autres protéases lysosomales comme les cathepsines B₁, B₂ et E, qui ont aussi des pH optima acides, n'a pas encore été démontrée extracellulairement.

Woessner (1973) note aussi une dégradation des protéines à pH 7,2 qui n'est peut-être pas à imputer à la cathepsine D (complètement inactive à ce pH), mais qui pourrait être due à la contamination d'une protéase neutre. Lazarus et Barrett (1974) extraient de la peau de lapin, en présence de KCl 1M, une enzyme active à pH neutre (pH optimum 7,5). Celle-ci n'est pas inhibée par le fluorophosphate de diisopropyle, l'EDTA ou les réactifs bloquant les résidus thiol.

Benya et coll (1973) retrouvent encore, après extraction avec des solutions salines, une activité protéasique dans les résidus insolubles de la muqueuse palatine de lapin et de la peau de rat. Cette activité est mise en évidence par incubation avec un substrat marqué (Peterkofsky et Diegelmann, 1971). Elle n'est pas inhibée par le chlorure de phénylméthylsulfonyle, la tosyllysylchlorométhylcétone, la N-éthylmaléimide, mais peut être supprimée par chauffage à 80°C pendant 15 minutes.

L'extraction et l'isolement des glycoprotéines de la trame conjonctive des éponges étant effectuée dans un tampon EDTA à pH 8,0, la dégradation par des protéases, qui ont un pH optimum acide, est minime.

Mais toute activité protéolytique ne pouvant être exclue, les extraits d'éponges ont été testés par diffusion radiale dans un gel d'agarose 1 % contenant 0,5 % d'hémoglobine (Schumarcher et Schüll, 1971). Pendant 4 heures à 37°C dans le tampon EDTA 0,01M pH 8,0, contenant 0,1 % de SDS, des zones de lyse ont été obtenues avec nos préparations (Figure 24). Le 2-mercaptoéthanol (0,1M) et le dithiothréitol (0,01M) n'inhibent pas l'activité protéolytique et semblent même la stimuler. L'inhibiteur de la trypsine obtenu à partir du soja et le DFP n'entraînent aucune inhibition. Par contre, l'iodacétamide, le chlorure de zinc ou de mercure empêchent la formation des zones de lyse.

Le propos de ce travail n'étant pas l'étude des protéases extra-

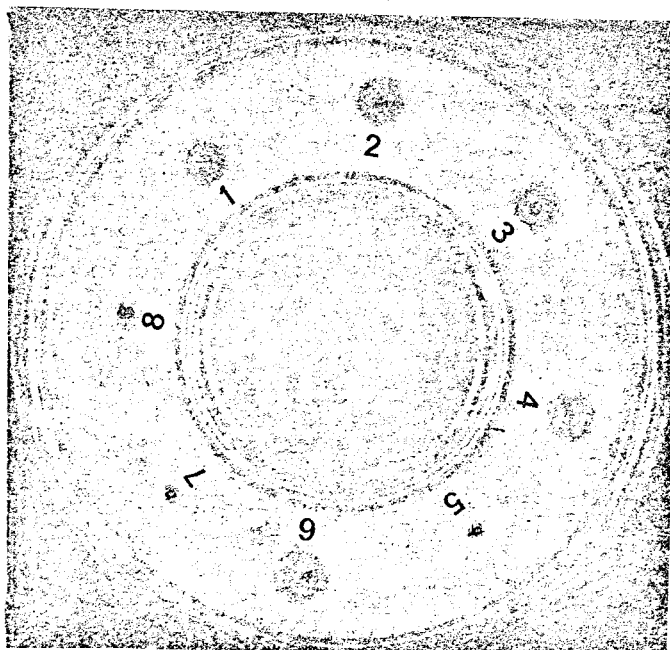


Figure 24 : Zones de lyse obtenues par diffusion radiale dans un gel d'agarose contenant 0,5 % d'hémoglobine d'un extrait EDTA de *Spongia*, seul en (1), puis en présence de 2-mercaptoéthanol (2), de l'inhibiteur de la trypsine du Soja (3), de DFP (4), d'iodoacétamide (5), de dithiothréitol (6), de chlorure de zinc (7) et de chlorure de mercure (8).

cellulaires des éponges, nous n'avons pas mené plus loin ces investigations. Dans les extraits de *Spongia*, la présence d'une enzyme contenant un groupe thiol dans son site actif ne pouvait pourtant plus être ignorée. Dès les premières étapes des extractions la nécessité d'inhiber son activité s'est imposée. Le plus simple était de bloquer ses groupes SH libres. Du tétrathionate de sodium (Arnon, 1970 ; Liener et Friedenson, 1970) a donc été ajouté aux solutions d'extraction, permettant ainsi d'attendre la réduction et l'alkylation des glycoprotéines pour bloquer de façon irréversible l'activité de la protéase.

C - BACTERIES ASSOCIEES

Les tissus d'un grand nombre de Spongiaires contiennent des bactéries (Lévi et Porte, 1962). L'importance de ces populations bactériennes chez certaines espèces a été soulignée (Lévi et Lévi, 1965 ; Bertrand et Vacelet, 1971).

Les bactéries intracellulaires peu nombreuses sont soit à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire des "bactériocytes" (Vacelet, 1970, 1975), soit dans le cytoplasme des cellules sphéruleuses (Bertrand et Vacelet, 1971).

Les bactéries extracellulaires sont nettement plus nombreuses et peuvent représenter chez certaines éponges cornées au moins le tiers du volume total de l'animal. Bertrand et Vacelet (1971) calculent, par micrographies électroniques sur coupes de tissus de deux espèces du genre *Verongia*, que les bactéries extracellulaires occupent

38 % du volume de matière vivante, alors que la substance inter-cellulaire représente 41 % de ce volume et que les cellules de l'éponge n'interviennent que pour 21 %. Ces auteurs confirment aussi que l'abondance de ces bactéries n'est pas due à un artéfact de putréfaction après la récolte, mais représente un phénomène d'association constant, de symbiose.

Des quantités comparables de bactéries sont observées dans d'autres éponges de la famille Spongiidae : *Spongia officinalis*, *Hippospongia communis*, *Cacospongia scalaris* et différentes espèces d'*Ircinia*. De plus, la microflore examinée dans toutes ces éponges présente des caractères très analogues.

Comme l'ont souligné Lévi et Lévi (1965), l'importance de ces relations entre l'éponge et les bactéries a des conséquences pratiques non négligeables pour les études biochimiques.

Des relations comparables à celles qui existent avec les bactéries symbiotes ont été décrites entre les tissus de l'éponge et les cyanophycées (Vacelet, 1971/b ; Sara, 1971).

Deux opérations nous permettent d'affirmer que les bactéries et les cyanophycées, et simultanément d'ailleurs les cellules de l'éponge, sont éliminées de nos préparations : la première, la plus importante, est l'ultracentrifugation à 50.000 g pendant 30 minutes, qui rassemble bactéries, cellules et débris divers dans un culot au-dessus duquel le collagène se dépose en formant un halo

translucide. Ensuite, les surnageants contenant les glycoprotéines brutes sont réunis et ultrafiltrés sur membranes Millipore d'un diamètre de pore de 0,22 μm , assurant ainsi une élimination totale des bactéries qui pourraient encore être présentes.

Il n'est sans doute pas exclu pour autant que des substances d'origine bactérienne ne contaminent pas nos préparations glycoprotéiniques. La caractérisation chimique et l'étude immunologique de ces dernières vont nous permettre de répondre à cette question.

De plus, récemment, Wilkinson et coll (1978) isolent de différentes éponges, en particulier de *Spongia officinalis*, des bactéries symbiotes qu'ils cultivent *in vitro* sur membranes de collagène d'éponge. Ces auteurs mettent ainsi en évidence une digestion de ce collagène insoluble par les bactéries isolées des éponges.

Au cours d'une première approche, nous avons examiné une aliquote du milieu de culture lyophilisé de bactéries provenant de *Spongia officinalis*. Après élimination des sels minéraux par dialyse contre un tampon EDTA 20 mM pH 8,0, traitement par un détergent et centrifugation, nous avons dosé, en quantités faibles mais égales, des protéines (Chapitre VI, N° 1) et des sucres (N° 9/A). Actuellement l'étude chimique n'a pu être menée plus loin (la chromatographie en phase gazeuse de la partie glucidique a donné un diagramme difficilement interprétable). Toutefois, aucune ligne de précipitation n'a pu être obtenue entre le milieu de culture dialysé des bactéries et un antisérum anti-glycoprotéines de *Spongia* (voir plus loin paragraphe 8).

D - CHOIX DES SOLUTIONS TAMPONNEES

Le pH des solutions revêt un caractère essentiel. Nous avons vu précédemment qu'il pouvait être un des facteurs déterminant l'activité protéolytique des différentes protéases susceptibles de dégrader les macromolécules des tissus conjonctifs au cours de leur extraction.

Les solutions d'extraction à pH acide ne conviennent pas aux glycoprotéines de structure. Nous savons en effet que ces dernières sont insolubles dans les acides, l'utilisation de cette propriété ayant ultérieurement permis de les séparer du collagène par chauffage dans l'acide trichloracétique. Nous avons noté que les glycoprotéines d'Eponge en solution commençaient à précipiter lorsque le pH atteignait 6,0. Elles sont par contre très solubles en milieu alcalin, et un pH de 8,0 a été définitivement choisi pour toutes nos solutions d'extraction et de séparation.

L'utilisation de l'EDTA a paru essentielle. Sa possibilité de complexer les cations bivalents, comme le calcium et le fer, a favorisé la dissociation des macromolécules. Une confirmation en est apportée Figure 25. Le borate est utilisé à la place de l'EDTA au même pH et avec la même concentration de SDS pour l'extraction et la filtration des glycoprotéines sur Sepharose 4B. Le profil d'élution des glycoprotéines (Figure 25/A) montre un premier pic de faible importance situé au niveau du volume d'exclusion de la colonne. Le pic suivant, qui contient les glycoprotéines, est toujours très important, mais se situe immédiatement après le premier, assez mal séparé de celui-ci. Il est, de plus, large et

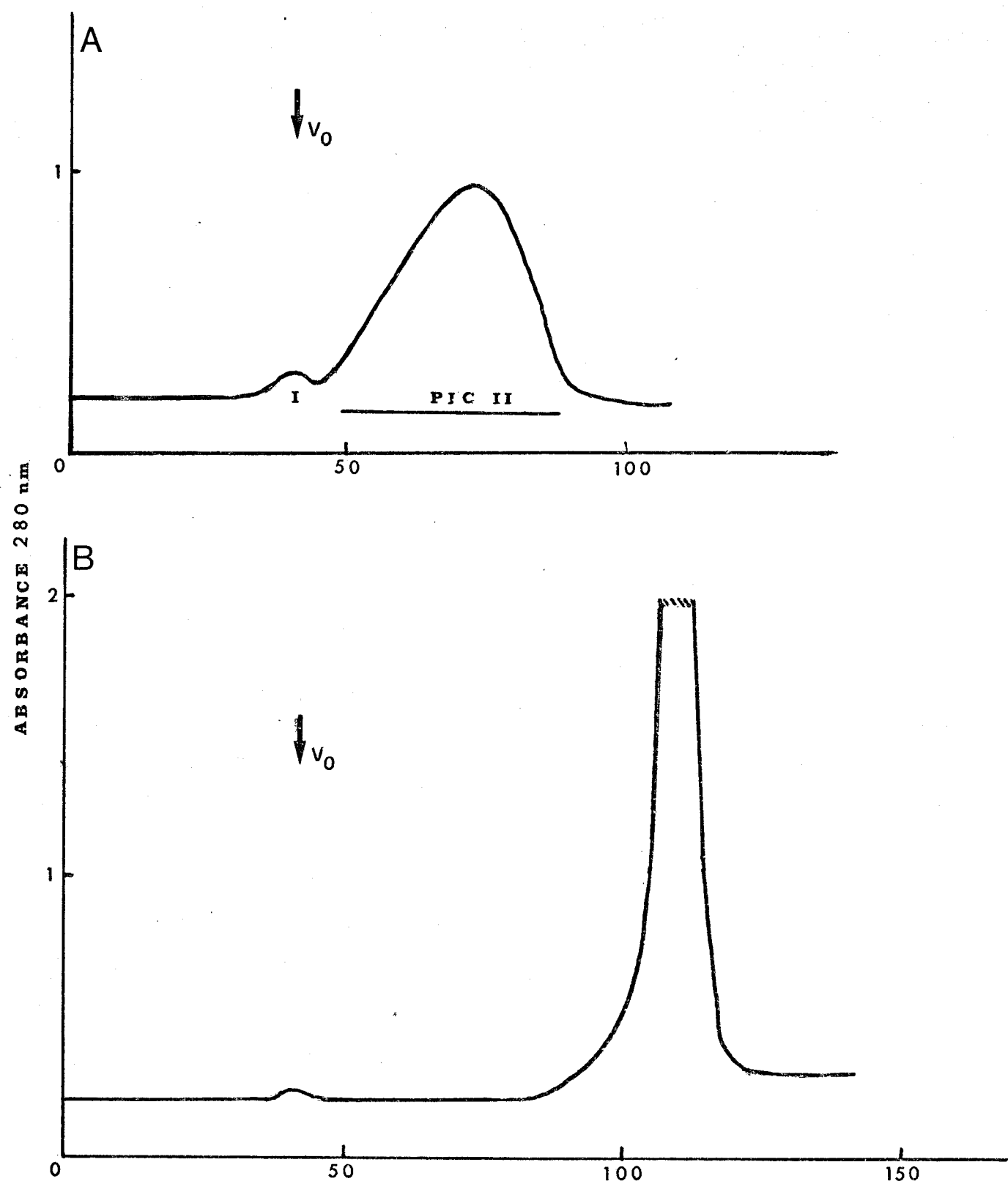


Figure 25 : Profil d'élution de la fraction non-collagénique, réduite et alkylée, de *Spongia* sur une colonne de Sepharose 4B en présence de SDS (0,2 %)

A/ Dans un tampon borate 0,1M pH 8,0

B/ Le pic II obtenu ci-dessus en A/, passé sur la même colonne mais dans un tampon EDTA (0,01M, pH 8,0).



très étalé. Les fractions de ce pic sont réunies, concentrées et dialysées contre du tampon EDTA 0,01M pH 8 contenant 0,1 % de SDS, puis passées sur une colonne de Sepharose 4B équilibrée et éluée avec le tampon EDTA. Le pic d'éluion des glycoprotéines est nettement retardé et beaucoup plus étroit (Figure 25/B). Il indique un poids moléculaire plus faible et plus homogène que celui obtenu en présence de borate.

Un autre facteur important est l'ouverture des ponts disulfure qui se forment entre les résidus cystéine de la partie peptidique des glycoprotéines. En l'absence d'agents réducteurs, au cours de l'extraction et de la filtration sur colonne de Sepharose 4B, on obtient le profil d'éluion montré sur la Figure 26/A. Le pic d'éluion des glycoprotéines est large et hétérogène. Une incubation préalable de la préparation glycoprotéinique en présence de 2-mercaptoéthanol 0,1M à 50°C pendant 1 heure permet de retrouver (Figure 26/B) le diagramme d'éluion sur Sepharose 4B précédemment décrit (Figure 23).

Une réduction et une alkylation préalables des glycoprotéines offrent l'avantage d'éviter l'addition de mercaptoéthanol dans le tampon d'éluion.

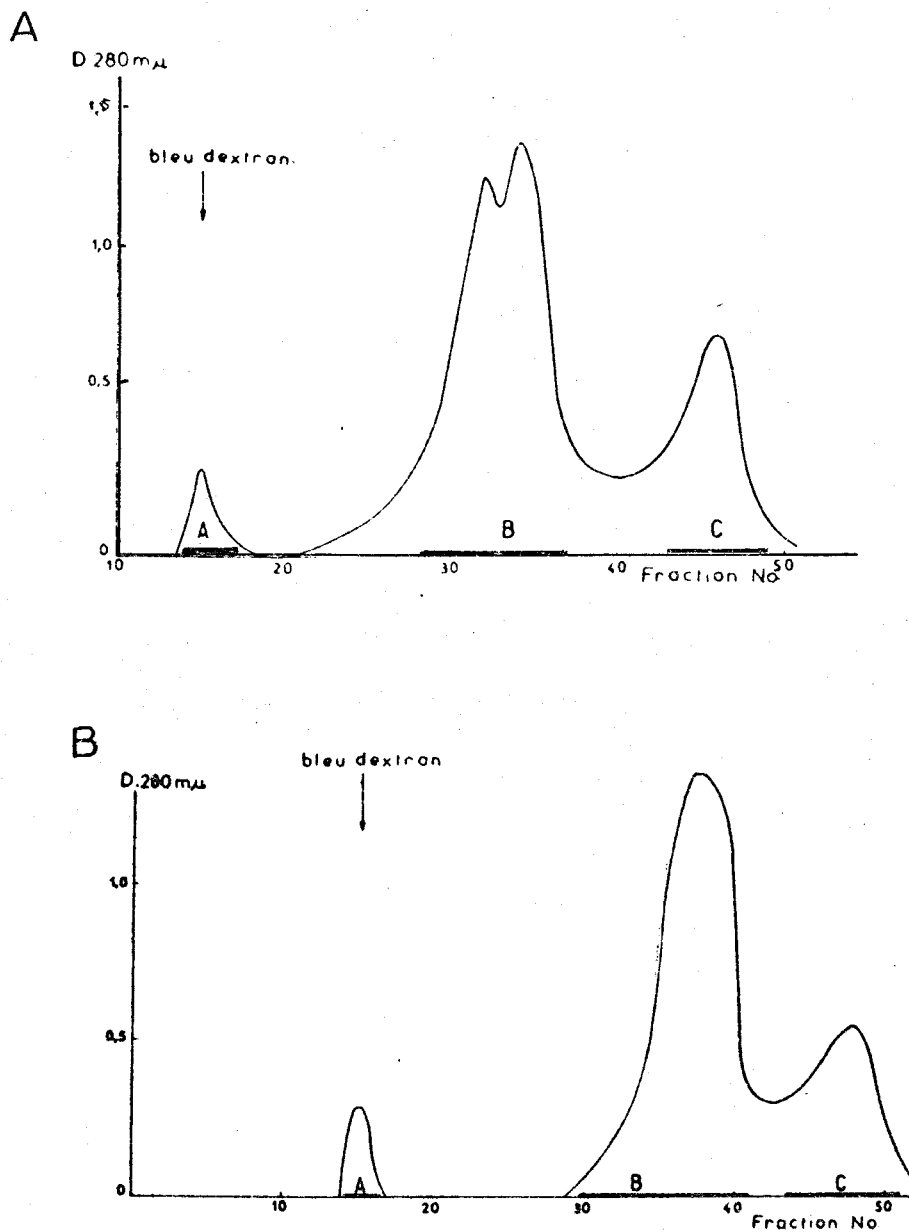


Figure 26 : Filtration sur colonne de Sepharose 4B de la fraction non-collagénique de *Spongia* dans un tampon EDTA (0,01M pH 8,0) contenant 0,02 % de SDS (sans réduction et alkylation).

A/ Ne contenant pas de 2-mercaptoéthanol.

B/ Contenant du 2-mercaptoéthanol.



3 - ELIMINATION DU DODÉCYL-SULFATE

Le SDS est un excellent agent de dissociation moléculaire. Son utilisation a permis une extraction et un isolement satisfaisants de glycoprotéines de *Spongia*. Mais les études immunologiques et les fractionnements par chromatographie d'adsorption ou d'affinité donnent des résultats ambigus en présence de SDS. Son élimination des préparations est donc nécessaire avant d'entreprendre de telles investigations.

A froid (4-7°C), le SDS est très peu soluble et cristallise. Une fraction importante peut ainsi être séparée des solutions refroidies par simple filtration sur coton de verre. Une dialyse en Diaflo ou en sac de dialyse contre un tampon à pH 8,0 permet de compléter son élimination. Mais elle est longue et souvent insuffisante .

Un passage sur un échangeur d'anions (WEBER et KUTER, 1971), le Dowex AGI-X2 (200-400 mesh) a permis de se débarrasser plus complètement du SDS contenu dans les préparations purifiées sur colonne de Sepharose 4B. La résine est équilibrée et éluée avec un tampon tris acétate 0,05M pH 8,0. Après dialyse contre ce tampon, 95 % des glycoprotéines chargées sur la colonne de Dowex ne sont pas retenus et sont élués avec le tampon de départ (Figure 27). Une fraction négligeable est obtenue en ajoutant au tampon du NaCl à la concentration de 0,4 M. L'essentiel du SDS reste accroché sur la colonne.

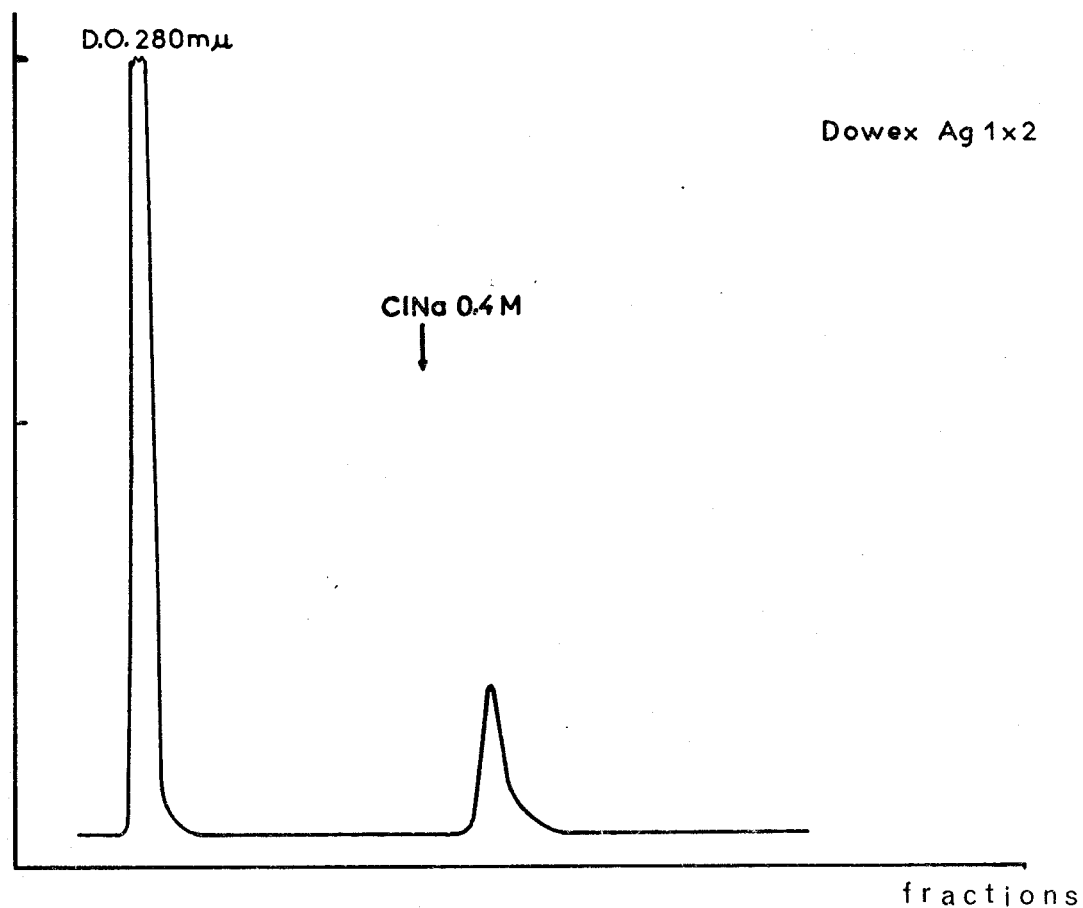


Figure 27 : Profil d'élution sur Dowex AGI-X2 de la préparation non collagénique de *Spongia* purifiée sur Sepharose 4B, dans un tampon tris acétate 0,05M, pH 8,0. Après retour à la ligne de base, du NaCl à une concentration molaire croissante est ajouté au tampon d'élution.

Randoux et coll. (1976) sont parvenus à séparer par chromatographie sur Dowex 1X2 deux sous-unités constituant les glycoprotéines de structure obtenues par extraction dans l'urée 8M du résidu insoluble après digestion collagénasique du derme de lapin. La solution de glycoprotéines réduites et alkylées a été fractionnée sur une colonne de Dowex 1X2 équilibrée avec un tampon phosphate 0,1M de pH 7,1 contenant de l'urée 8M. Une fraction glycoprotéinique n'était pas fixée sur la colonne. Utilisant un gradient linéaire de concentration en NaCl, une deuxième fraction a été éluée à la concentration de 0,6M. Ces deux glycoprotéines avaient une masse moléculaire d'environ 16.000 mais n'avaient pas le même acide aminé N-terminal.

Les glycoprotéines de l'éponge ne semblent pas contenir de sous-unités très acides, du type de celles décrites par Randoux et coll (1976) dans le derme de lapin. En effet, en ajoutant de l'urée 8M au tampon d'élution et en amenant son pH à 7,1, la chromatographie sur Dowex AGI-X2 des glycoprotéines de *Spongia* n'est pas modifiée (Figure 27). Aucune fraction significative en glycoprotéines n'est éluée en augmentant la concentration en NaCl du tampon d'élution.

Le passage de nos préparations de glycoprotéines sur colonne de Dowex AGI-X2 a donc été effectué pour les débarrasser du SDS qu'elles contenaient. Cette élimination est suffisante et nous a permis de fractionner dans de bonnes conditions les glycoprotéines de l'Eponge par chromatographie d'affinité et de faire quelques études immunologiques.

Nous avons aussi tenté d'éliminer le SDS par électrodialyse (Tuszynski et Warren, 1975). Mais nous n'avons pas obtenu de résultats plus satisfaisants que par chromatographie sur Dowex et cette technique n'a pas été retenue.

- o -

4 - FRACTIONNEMENT DES GLYCOCONJUGUÉS DE SPONGIA SUR LECTINES

Des essais de fractionnement des glycoconjugués de l'Eponge ont été tentés sur colonne d'hydroxyapatite. La possibilité d'exécuter cette chromatographie en présence de SDS nous a paru séduisante (Moss et Rosenblum, 1972). Mais le manque de reproductibilité des résultats nous a conduit à abandonner cette méthode.

Des tentatives de séparation ont été effectuées sur colonne de DEAE cellulose. Des gradients linéaires en concentration de NaCl ont été utilisés. Puis, pour décrocher les protéines fortement adsorbées, une solution de NaOH 1,0N est passée sur la colonne à la fin du gradient. La récupération des glycoprotéines chargées sur la colonne étant toujours restée inférieure à 50 %, les investigations n'ont pas été menées plus loin par cette méthode.

Le fractionnement des glycoprotéines de *Spongia* a alors été entrepris sur lectines immobilisées par liaison covalente au Sepharose 4B.

A - FRACTIONNEMENT SUR ConA-SEPHAROSE 4B

La Concanavaline A (ConA) de *Canavalia ensiformis* est une métalloprotéine d'origine végétale qui réagit spécifiquement avec certains sucres, des polysaccharides et des glycoprotéines. Ces réactions dépendent de la présence de Mn^{2+} et Ca^{2+} pour la formation des sites de liaison sur la ConA avec les α -D-glucopyranosyles, α -D-mannopyranosyles et les résidus glucides qui leur sont apparentés stériquement. Les complexes qui en résultent sont dissociés par le méthyl α -D-glucopyranoside et le méthyl α -D-mannopyranoside (So et Goldstein, 1967).

Svensson et coll. (1970) ont aussi montré que le borate de sodium inhibe la précipitation des polysaccharides par la ConA.

L'emploi des lectines insolubilisées pour isoler et étudier les complexes saccharidiques a été inspiré par les résultats déjà obtenus au moyen des anticorps immobilisés pour isoler les antigènes (Silman et Katchalski, 1966). La méthode utilise la capacité des lectines fixées d'adsorber spécifiquement certains glycoconjugués et la possibilité de les éluer aisément et efficacement avec des inhibiteurs de faible poids moléculaire à des pH voisins de la neutralité.

La préparation glycoprotéinique de *Spongia*, purifiée sur colonne de Sepharose 4B et débarrassée du SDS, est dialysée contre un tampon (TTA) tris acétate 20 mM pH 8,0 contenant des chlorures de calcium, de magnésium et de manganèse, chacun à la concentration 1mM et 0,001 de phénylacétate de mercure ; puis 50 mg sont appliqués sur la

colonne de ConA-Sepharose (Chapitre V,10A). Trois fractions distinctes sont obtenues (Figure 28) :

- La fraction A contient les glycoprotéines qui n'ont aucune affinité pour la ConA et ont été éluées avec le tampon de départ TTA.

- La Fraction B contient les glycoprotéines liées par la ConA et éluées en ajoutant au tampon TTA de l' α -méthylglycosid à la concentration de 0,25 M. Celui-ci peut être remplacé par de l' α -méthylmannoside à la même concentration sans qu'aucune modification soit apportée au profil d'éluition des glycoprotéines.

- La fraction C contient les glycoprotéines très fortement liées et éluées par un tampon borate 20 mM pH 8,0 (TB) contenant du chlorure de Mg, Mn et Ca (1 mM chacun) et 0,001 % de phénylacétate de mercure.

Leur répartition dans les fractions A, B et C représente respectivement 65 %, 29 % et 6 % des protéines totales.

Chaque fraction est concentrée sur une membrane Amicon PM10 dans une cellule Diaflo et dialysée contre un tampon tris acétate 20 mM contenant 0,001 % de phénylacétate de mercure.

B - FRACTIONNEMENT SUR WGA-SEPHAROSE 4B

La lectine du germe de blé de *Triticum vulgare* (WGA) est spécifique

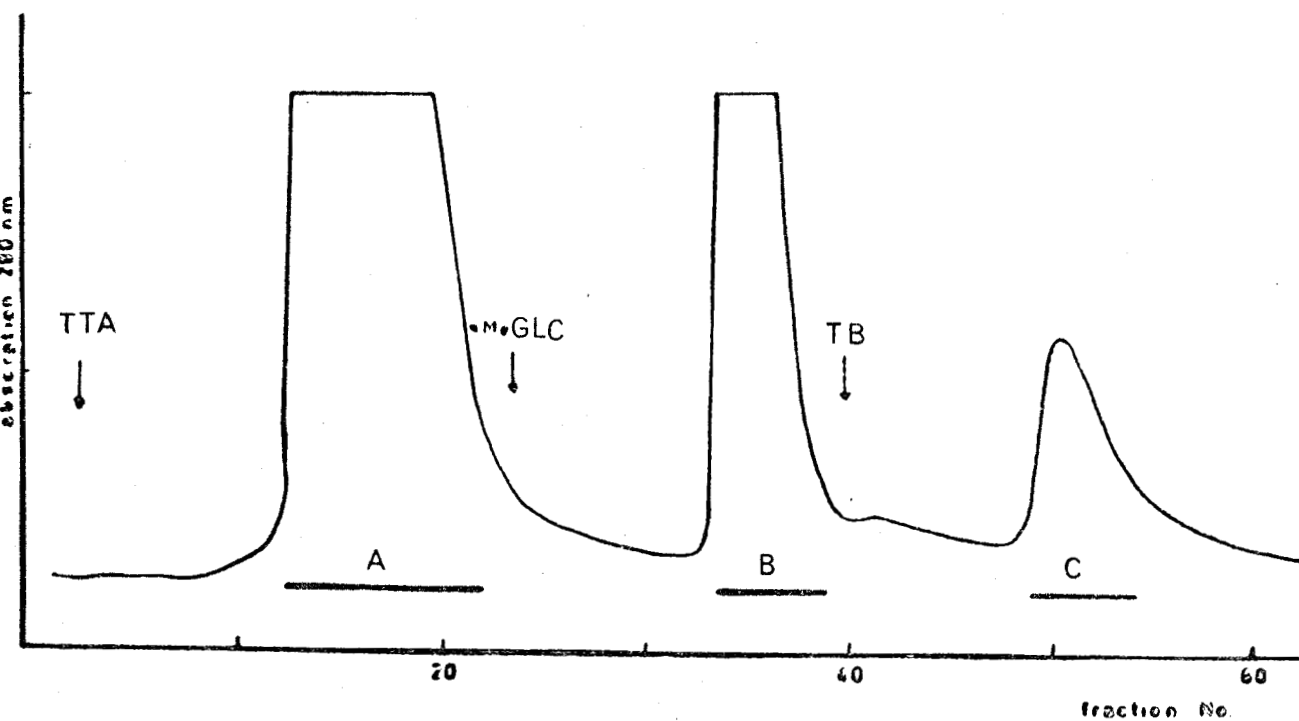


Figure 28 : Profil d'élution sur colonne de ConA-Sepharose 4B (1,5 x 30 cm) de la préparation non-collagénique purifiée sur Sepharose 4B et débarrassée du SDS de *Spongia*.

Première flèche : élution avec un tampon (TTA) tris acétate 20 mM pH 8,0 contenant 1mM de CaCl_2 , MgCl_2 et MnCl_2 .

Deuxième flèche : élution avec le tampon TTA + 0,25 M α -méthylglucoside.

Troisième flèche: élution avec un tampon borate contenant 1 mM de CaCl_2 , MgCl_2 et MnCl_2

des glycoconjugués contenant de la N-acétylglucosamine (Allen et coll., 1973). Les 1-4 di- et trisaccharides de la N-acétylglucosamine montrent de plus grandes affinités pour la WGA que le monomère (Nagata et Burger, 1974 ; Privat et coll, 1974). Cette lectine peut également fixer l'acide N-acétylneuraminique.

La WGA est liée de façon covalente du CNBr-Sepharose (Chapitre VI, N° 10/B) et la colonne de WGA-Sepharose préparée est équilibrée avec le tampon tris acétate 20 mM contenant 0,001 % de phényl-acétate de mercure. Chacune des 3 fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur ConA est chargée sur la colonne de WGA Sepharose :

- La fraction A non liée par la ConA est séparée en deux fractions (Figure 29/A) : la fraction AI non retenue sur la colonne de WGA Sepharose représente 57 % des protéines de la fraction A ; la fraction AII éluée par la N-acétylglucosamine contient 43 % des protéines.

- La fraction B montrant une affinité pour la ConA est totalement liée par la WGA et éluée en un seul pic par la N-acétylglucosamine (Figure 29/B).

- La fraction C donne deux fractions CI et CII (Figure 29/C). Seule la fraction CII présente une affinité pour la WGA. La répartition des protéines est respectivement de 76 et 24 %.

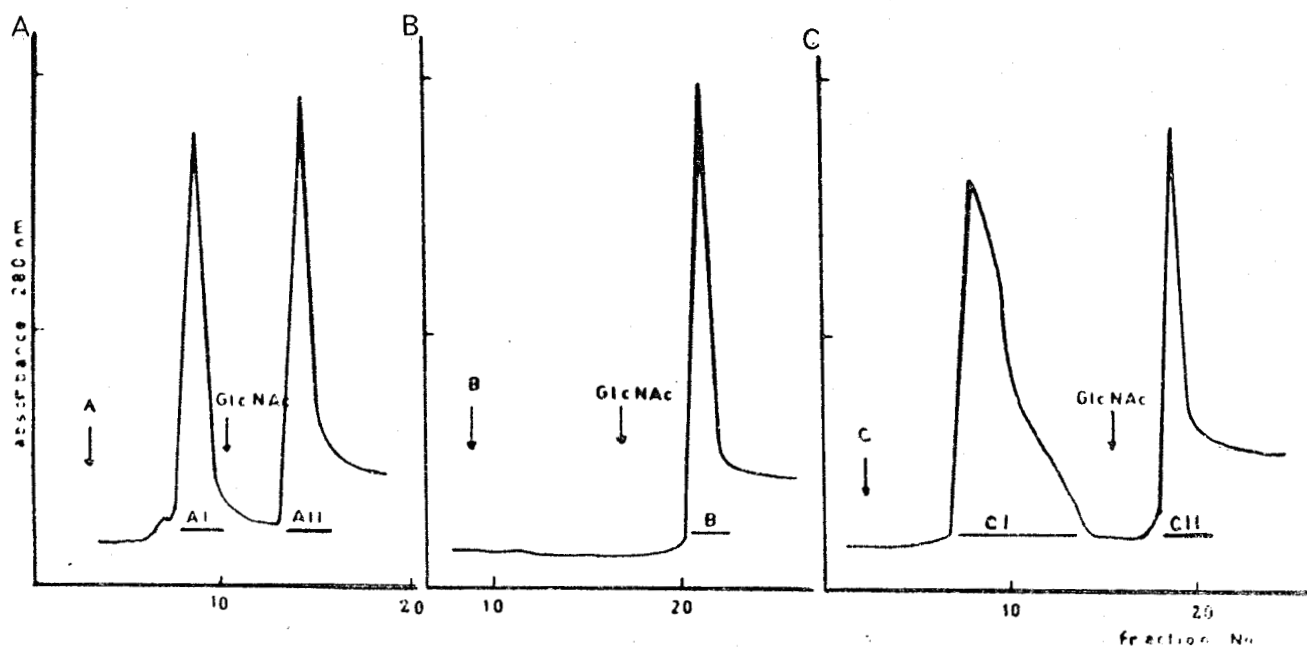


Figure 29 : Profil d'élution sur colonne (1 x 17 cm) de WGA-Sepharose 4B des fractions de *Spongia* obtenues sur colonne de ConA-Sepharose (Figure 28) :

A - Fraction A non retenue sur ConA

B - Fraction B retenue

C - Fraction C fortement retenue.

Après retour à la ligne de base, 0,25M de N-acétylglucosamine est ajouté au tampon tris-acétate 20 mM pH 8,0.



L'affinité pour les deux lectines et la teneur en protéines des 5 fractions obtenues sont résumées dans le Tableau 13. Les trois premières fractions sont les plus importantes. Les fractions CI et CII sont en très faibles quantités et ne représentent que 6 % des protéines.

C - COMPOSITION EN GLUCIDES ET EN SULFATE DES CINQ FRACTIONS ISOLEES SUIVANT LEUR AFFINITE POUR LES LECTINES

a - Distinction de deux types moléculaires

Les teneurs en oses, hexosamines, acides uroniques et sulfate des 5 fractions séparées par chromatographie d'affinité sur lectines sont déterminées par des méthodes colorimétriques (cf Chapitre VI, N° 9/A et N° 16). Les résultats résumés Tableau 14 font apparaître deux types de molécules.

Les fractions AII, B, CI et CII, plus ou moins liées par les lectines, contiennent 2,4 à 6 % d'oses neutres, 1,4 à 2,6 % d'hexosamines, une petite quantité d'acides uroniques et pas de sulfate. Ces teneurs en glucides permettent donc de continuer à désigner ces molécules sous le terme de glycoprotéines.

La fraction AI ne présentant aucune affinité pour la ConA et la WGA révèle une partie glucidique nettement plus importante. Elle renferme 20 % d'oses neutres, 6,8 % d'hexosamines, 1,5 % d'acides uroniques et 2,7 % de sulfate. Nous appellerons ces molécules des complexes protéines-polysaccharides acides. Leur étude sera reprise

TABLEAU 13

Affinité pour les lectines et teneurs en protéines des 5 fractions non-collagéniques de *Spongia*.

Fraction	Affinité pour LA ConA	Affinité pour la WGA	Protéines % des protéines totales
AI	-	-	37
AII	-	+	28
B	+	+	29
CI	+	-	4,6
CII	+	+	1,4



TABLEAU 14



Teneur en glucides et en sulfate des fractions séparées par chromatographie d'affinité sur lectines.

Fractions	Oses neutres	Hexosamines	Acides uroniques	Sulfate
AI	20,4	6,8	1,5	2,7
AII	2,4	2,6	0,3	0
B	3,1	2,6	0,3	0
CI	6,0	1,4	0,4	n.d.
CII	5,5	2,0	0,3	n.d.

Les résultats sont exprimés en % des protéines
n.d. = non déterminé

au cours de ce travail en fonction de leur aptitude à précipiter en présence de cétylpyridinium.

b - Détermination des constituants glucidiques

La détermination par chromatographie en phase gazeuse de la composition en glucides des fractions glycoprotéiniques est exprimée dans le Tableau 15 en rapports molaires, la glucosamine étant égale à 1. Celle-ci est présente dans toutes les fractions. La galactosamine existe seulement dans la fraction AI, mais la glucosamine y est prédominante.

Le glucose n'est rencontré en quantité non négligeable que dans les fractions CI et CII. Les galactose, mannose, fucose, arabinose sont retrouvés en proportions variables dans toutes les fractions. L'arabinose est un sucre très commun dans le règne végétal comme constituant des homo- et hétéropolysaccharides. Il est décrit dans les glycoprotéines de la paroi cellulaire des plantes, où il participe à la liaison glycoprotéinique avec l'hydroxyproline (Lamport, 1969). L'arabinose est aussi trouvé dans les bactéries ; il est un composant caractéristique du polysaccharide de surface de certains groupes (Davies, 1955 ; Cummins et Harris, 1958).

L'arabinose est par contre très rarement rencontré dans le règne animal. Sa présence a été rapportée dans le collagène d'un coelentéré d'un échinoderme et d'une éponge (Gross et coll, 1958). Mais Katzman et Jeanloz (1969), examinant le tissu conjonctif de ces Invertébrés, ne le retrouvent que dans l'éponge. Ils l'isolent et le caractéri-

TABLEAU 15

Rapport molaire des composants glucidiques des fractions séparées par chromatographie d'affinité sur lectines

Fraction	GlCNAC	GalNAC	GlC	Gal	Man	Fuc	Ara	GlCA
AI	1	0,29	trace	1,17	0,44	1,70	1,16	0,28
AII	1	0	0	0,33	0,34	0,60	0,41	0,09
B	1	0	trace	0,36	0,65	0,72	0,39	0,12
CI	1	0	0,63	1,06	0,86	1,22	0,61	0,28
CII	1	0	0,52	0,71	0,67	0,69	0,54	0,26



sent à partir de l'*Hippospongia grossypina* sous forme d'un D-énanthiomère. L'arabinose a été aussi décrit dans une fraction glycolipidique et un polysaccharide acide du cerveau humain (Stary et coll, 1965).

Le galactose, le mannose et le fucose sont les constituants habituels des glycoprotéines des tissus vertébrés et en particulier des glycoprotéines de structure (Moczar et coll 1968 ; Moczar et Moczar, 1970). Le glucose est plus irrégulièrement trouvé.

Par contre, la présence d'acides uroniques n'a jamais été décrite dans les glycoprotéines de structure. Ils existent en proportion variable dans toutes les fractions glycoprotéiniques de *Spongia* sous forme d'acide glucuronique.

c - Les acides sialiques existent-ils chez les Spongiaires ?

La chromatographie en phase gazeuse des différentes fractions séparées suivant leur affinité pour les lectines montre dans la zone des acides sialiques plusieurs pics difficilement interprétables. La recherche des acides sialiques chez *Spongia officinalis* a donc été effectuée par d'autres méthodes sur la préparation glycoprotéinique purifiée mais non fractionnée sur lectine pour rendre plus aisée une utilisation importante de matériel.

Après une hydrolyse acide ménagée de la préparation glycoprotéinique de *Spongia officinalis* et une purification sur résines échangeuses

d'ions (Chapitre VI, N° 9/C a et b), une première approche avait donné une réaction légèrement positive à l'acide thiobarbiturique, et une concentration < à 1 % (0,06 %) en acides sialiques avait été établie. Dans les mêmes conditions d'hydrolyse et de purification, aucune réaction positive avec le résorcinol n'a pu être décelée.

La recherche des acides sialiques par chromatographie sur couche mince (Chapitre VI, N° 9/B a) donne un résultat négatif par révélation à l'orcinol trichloracétique, et un résultat plus ou moins positif par révélation à l'acide thiobarbiturique (Figure 30).

Warren (1963) étudiant la présence des acides sialiques dans la nature, ne trouva pas d'acides sialiques mesurables chez les Porifera (*Microciana prolifera* et *Halichondria Sp.*).

Maclennan (1974) obtient une réaction colorée avec l'acide périodique (Warren, 1959) dans les résidus dialysés de 6 espèces d'éponges mais conclut que cette coloration est due essentiellement à l'interférence de deux déoxysucres non identifiés et précédemment décrits (Maclennan, 1970). L'absence probable d'acide sialique est confirmée par la réaction d'Erlich suivant Werner et Odin (1952).

Dans le facteur d'agrégation de *Microciana parthenis*, un complexe polysaccharidique de haut poids moléculaire, Henkart et coll (1973) ont détecté de l'acide sialique à une concentration inférieure à 0,1 %, mais sans préciser leur méthode de détermination.

Récemment, une sialyltransférase, étroitement associée au facteur

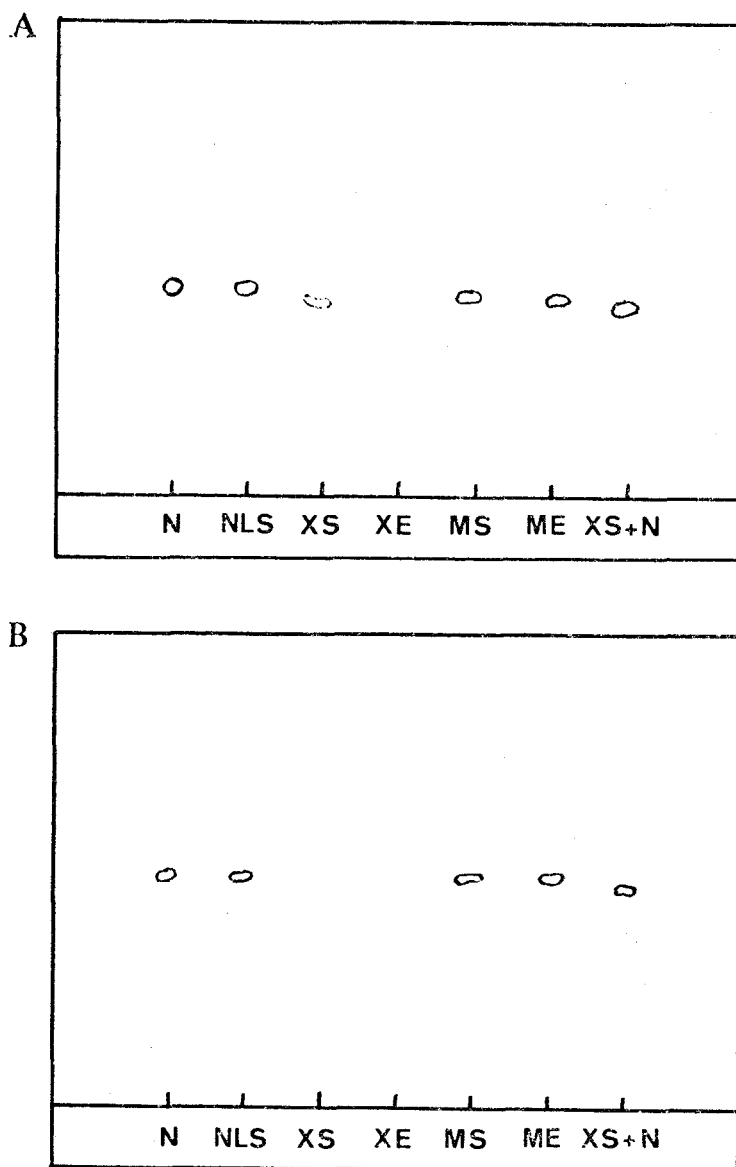


Figure 30 : Chromatographie sur plaques de silice dans le système solvant propanol-eau (7:3)

A/ Révélation à l'orcinol trichloracétique

B/ Révélation à l'acide thiobarbiturique

N = Acide N-acétylneuraminique

NL = N-acetylneuraminosyl-D-galactose

M = Mucine,

X = Fraction non collagénique de *Spongia*, purifiée sur Sepharose 4B

S = Hydrolyse dans SO_4H_2 0,1N

E = Hydrolyse enzymatique

d'agrégation de l'éponge *Geodia cydonium*, a été isolée (Muller et coll, 1977). Mais cette enzyme est-elle très spécifique ?

La présence des acides sialiques dans les éponges apparaît donc assez ambiguë. Toutefois, les quantités rapportées dans les constituants des Eponges étant toujours inférieures à 0,1 %, si ceux-ci ont bien été détachés au cours de l'hydrolyse, un doute peut être émis quant à la signification de ces résultats ; et, la présence des acides sialiques semble peu probable chez les Eponges.

d - L'affinité des constituants glucidiques pour les lectines

La partie glucidique des différentes fractions glycoprotéiniques contient également du mannose et de la N-acétylglucosamine, mais dans des rapports différents, et leur affinité pour les deux lectines n'est pas la même.

Ainsi, la fraction B montre une affinité pour la ConA et la fraction AII n'en montre aucune. Les deux fractions sont par contre liées par la WGA. Elles ont la même teneur en glucosamine. Le rapport N-acétylglucosamine sur mannose est de 3:2 pour la fraction B et 3:1 pour la fraction AII.

Ces résultats peuvent être expliqués par les récentes observations faites sur la liaison des glycopeptides à la ConA. Ogata et coll. (1975) indiquent qu'au moins 2 résidus mannosyle non substitués en O sont nécessaires pour qu'une liaison puisse s'établir avec la lectine.

L'incapacité de tous les composants réagissant avec la ConA d'être fixés sur une colonne de ConA immobilisée est une observation courante. Ce fait a été noté au cours de l'étude des glycoprotéines de groupe sanguin. Une fraction non absorbée sur colonne garde encore la possibilité d'être précipitée par la ConA soluble (Lloyd, 1970).

Des remarques identiques ont été faites avec une glycoprotéine d'érythrocyte humain (Findlay, 1974). Pour obtenir une liaison avec la ConA immobilisée, il serait nécessaire d'avoir un plus grand nombre de sites réactifs par molécule que pour obtenir une précipitation en solution. Or, l'hétérogénéité de leurs chaînes glucidiques étant une propriété commune aux glycoprotéines, la plupart des glycoprotéines contiendraient une population de molécules dont certaines n'auraient pas un nombre suffisant de sites réactifs pour être liées par la ConA insolubilisée.

La fraction polysaccharidique AI est par contre plus riche en mannose - et surtout en N-acétylglucosamine - que les fractions montrant une affinité pour la ConA ou la WGA. Cette observation serait en accord avec quelques résultats précédemment rapportés. A la surface des cellules transformées par un virus, une accumulation de glycopeptides de grande taille moléculaire a été décrite (Buck et coll, 1974). Ils ne sont pas absorbés sur ConA tandis que des glycopeptides plus petits provenant des mêmes cellules et ayant une composition similaire en sucres sont liés par la lectine (Ogata et coll, 1975). De même, Krusius (1976), au cours du frac-

tionnement de glycopeptides sur ConA Sepharose, a noté que les glycopeptides non liés par la lectine sont beaucoup plus grands que les glycopeptides moins acides, qui ont une faible affinité pour la lectine, et que les glycopeptides neutres, qui montrent une forte affinité.

Il convient aussi de noter que des chaînes saccharidiques longues entraînent un encombrement stérique non négligeable qui peut rendre inaccessible, aux sites réactionnels de la lectine, les sucres spécifiques s'ils ne sont pas placés en bout de chaîne.

L'affinité de la N-acétylglucosamine pour la WGA semble répondre aux mêmes lois que celle du mannose (ou du glucose) pour la ConA. Mais l'affinité de la WGA pour la copule glucidique d'une glycoprotéine ou d'un polysaccharide nécessiterait l'accessibilité non pas d'un seul résidu N-acétylglucosamine, mais du disaccharide (Privat et coll, 1974).

D - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES CINQ FRACTIONS ISOLEES SUIVANT LEUR AFFINITE POUR LES LECTINES

Les résultats obtenus par chromatographie en phase liquide des hydrolysats sont présentés dans le Tableau 16.

Par contraste avec l'hétérogénéité de la partie glucidique, la composition en acides aminés des différentes fractions est extrêmement voisine. Mais surtout, celles des fractions AII et B d'une part, et CI et CII d'autre part, apparaissent identiques.

TABLEAU 16

Composition en acides aminés des fractions non collagéniques de *Spongia* obtenues par chromatographie d'affinité sur lectines (Figure 29).

Fractions	AI	AII	B	CI	CII
Hydroxyproline	0	0	0	0	0
Acide aspartique	126	116	117	102	101
Thréonine	59	60	56	63	60
Sérine	48	56	51	64	69
Acide glutamique	109	95	92	80	80
Proline	51	46	49	55	50
Glycine	88	87	83	79	78
Alanine	80	80	78	89	84
Valine	67	66	66	72	71
Carboxyméthyl-cystéine	25	28	33	11	15
Méthionine	19	15	20	16	17
Isoleucine	59	63	64	70	69
Leucine	71	80	83	87	86
Tyrosine	33	34	35	30	35
Phénylalanine	38	47	48	52	51
Lysine	38	47	48	57	60
Histidine	21	17	18	23	21
Arginine	60	55	51	48	53
Tryptophane	8	8	8	n.d.	n.d.

n.d. = non déterminé

Les résultats sont exprimés en résidus pour 1000 résidus. Les valeurs ne sont pas corrigées pour la destruction des acides aminés durant l'hydrolyse.



Les distinctions les plus nettes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Fraction	AI	AII	B	CI	CII
A.A. Carbo-xyliques	235	211	209	182	181
GLY	88	87	83	79	78
ALA	80	80	78	89	84
ILE + LEU	130	143	147	157	155
LYS	38	47	48	57	60

Il semble donc bien que la séparation sur colonne de ConA Sepharose des fractions AII et B soit essentiellement due à l'hétérogénéité de leur copule glucidique. La conclusion est la même pour les fractions CI et CII séparées sur colonne de WGA-Sepharose.

- o -

5 - ETUDE DE LA FRACTION POLYSACCHARIDIQUE AI

Son hétérogénéité est montrée par électrophorèse sur cellogel et précipitation sélective au chlorure de cétypyridinium (CPC) (Chapitre VI, N° 11). Révélés par le bleu d'alcan, plusieurs composés sont mis en évidence (Figure 31). Le premier, qui correspond à des polysaccharides précipitables par le CPC, migre le plus loin vers l'anode un peu au-dessus du kératane-sulfate.

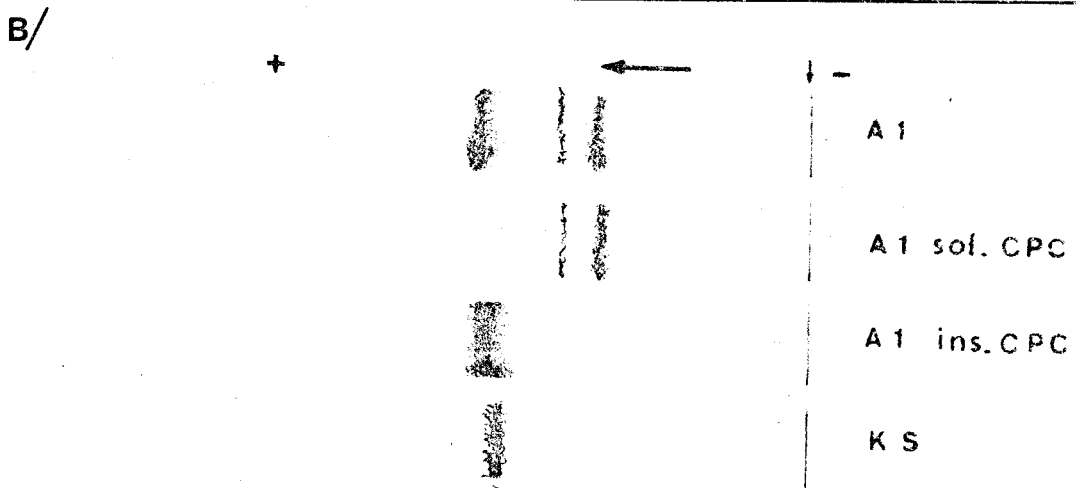
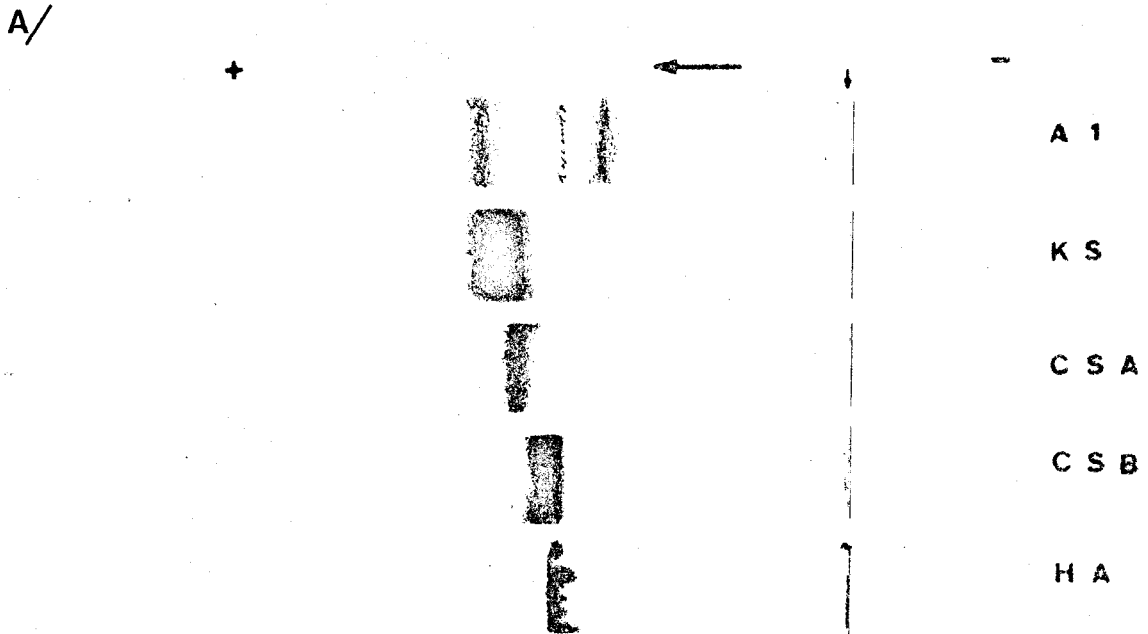


Figure 31 : Electrophorèse sur cellogel des complexes polysaccharidiques de *Spongia* (fraction AI) ; KS = kératane sulfate ; CSA = chondroïtine sulfate A ; CSB = chondroïtine sulfate B ; HA = acide hyaluronique.

A/ Comparaison avec les glycosaminoglycannes de tissus de Vertébrés.

B/ Séparation en fonction de leur précipitation au CPC :

AI sol. CPC = fraction soluble dans le CPC

AI ins. CPC = fraction précipitée par le CPC



Les deux composés saccharidiques qui suivent arrivent après l'acide hyaluronique et ne sont pas précipitables par le CPC. Cette propriété permet de les séparer aisément, par électrophorèse sur cellogel, de la fraction la plus chargée qui migre très en avant (Figure 31/B).

Aucun de ces composés n'est sensible à l'action de la chondroïtinase ABC et de l'hyaluronidase (Figure 32). Ils ne peuvent donc pas être assimilés aux chondroïtines ou à l'acide hyaluronique.

Le polysaccharide précipitable par le CPC a plus particulièrement retenu notre attention. Il partage en effet certaines propriétés des kératane-sulfates : migration assez comparable en électrophorèse sur cellogel, insensibilité à la chondroïtinase et à l'hyaluronidase, précipitation par le CPC mais solubilisation à concentration élevée (1 %). Comme le kératane de la cornée, ce composé est élué d'une micro-colonne de cellulose (Chapitre V, N° 11/E) par du CPC à 1 % (Figure 33).

La séquence répétitive (alternance de résidus galactose et N-acétylglucosamine) du polysaccharide kératane-sulfate a permis de le classer parmi les autres glycosaminoglycannes du tissu conjonctif des Vertébrés. Cependant, comparé à ces glycosaminoglycannes, le kératane-sulfate a une structure beaucoup plus complexe. Généralement, le galactose est en excès molaire sur la glucosamine et d'autres sucres mineurs comme le fucose, le mannose, l'acide sialique et la N-acétylgalactosamine sont présents dans la molécule du kératane-sulfate (Mathews et Cifonelli, 1965 ; Seno et coll., 1965).

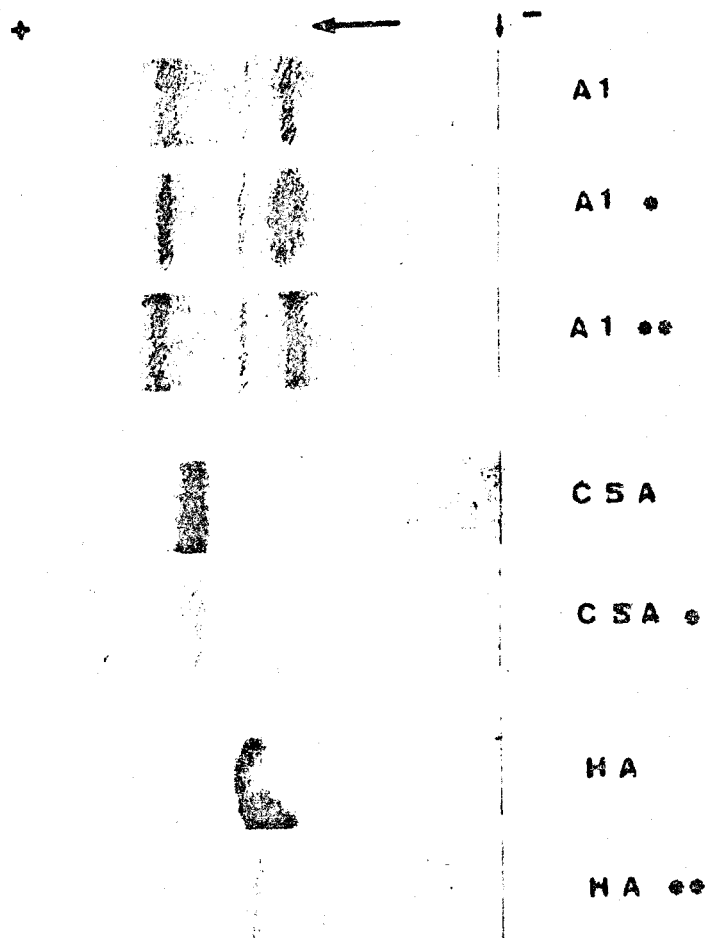


Figure 32 : Action de la chondroïtinase ABC (*) et de l'hyaluronidase (**) sur la fraction AI, la chondroïtine sulfatée A (CSA) et l'acide hyaluronique (HA)



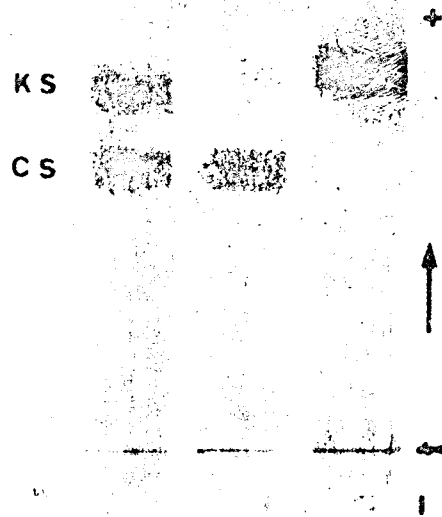


Figure 33 : Séparation sur microcolonne de cellulose de la chondroïtine sulfate (CS) et du kératane (KS) de la cornée.

Le Tableau 17 donne la composition en sucres de préparations de kératane-sulfates isolés à partir du cartilage intervertébral de boeuf (Hopwood et Robinson, 1974) et du polysaccharide d'éponge précipitable par le CPC. Ce dernier montre une composition glucidique très différente de celle du kératane-sulfate qui contient en majorité de la N-acétylglucosamine et du galactose (24 et 26/28 résidus pour 1 résidu de mannose). Dans le polysaccharide de l'éponge, la composition en sucres est plus hétérogène : il n'y a pas de saccharides qui prédominent nettement. Ces résultats ne permettent pas d'envisager une structure disaccharidique répétitive de ce polysaccharide. Et, bien qu'une étude structurale n'ait pas encore pu être faite pour confirmer ces observations, le polysaccharide de l'éponge ne peut pas être assimilé au kératane-sulfate.

D'ailleurs Katzman et Jeanloz (1969) ont isolé du tissu conjonctif d'un échinoderme (*Thyone briones*) un polyfucose sulfate et une chondroïtine sulfate complètement hydrolysés par l'hyaluronidase et en concluent que ces polysaccharides acides sont absents du tissu conjonctif d'un Coelentéré (*Metridium dianthus*) et d'un Porifère (*Hippospongia gossypina*). Ce dernier contient cependant un polysaccharide sulfate avec une grande proportion de D-arabinose (Katzman et coll, 1970). Cette observation est en bon accord avec nos résultats qui viennent confirmer la présence d'un complexe polysaccharide-sulfate non digéré par l'hyaluronidase dans une autre éponge *Spongia officinalis*.

TABLEAU 17

Composition en sucres de préparations de kératane-sulfate et du polysaccharide d'éponge AI, précipitable par le CPC.

Sucres	GLcNAC	GalNAC	GLc	Gal	Man	Fuc	Ara	GLcA
AI	4,2	1,5	0	2,9	1,0	5,1	3,7	1,0
KS.A	24,3	trace	0	26,4	1,0	0,9	0	0
KS.P	24,1	5,8	0	28,2	1,0	1,0	0	4,4

Les résultats sont obtenus par g.l.c. et exprimés en mol/mol de mannose. Les préparations de kératane-sulfate sont isolées du disque intervertébral de boeuf, KSA par clivage alcalin et KSP par digestion dans la papaïne, la pronase et la chondroïtine sulfate lyase (Hopwood et Robinson, 1974).



6 - ÉTUDE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES FRACTIONS GLYCOPROTÉINES ET DE LA FRACTION POLYSACCHARIDE ACIDE.

Après dialyse contre du bicarbonate d'ammonium 0,1M et lyophilisation, la préparation non collagénique, purifiée mais non fractionnée sur lectines, a été examinée au microscope électronique (Chapitre VI, N° 15).

A faible grossissement (x 20 000), la structure microfibrillaire de la préparation apparaît assez homogène (Figure 34/A). A plus fort grossissement (x 300 000), la même préparation révèle une structure plus complexe (Figure 34/C) constituée des fins filaments de 2,5 nm de diamètre et de filaments perlés avec des subunités globulaires d'environ 12,5 nm de diamètre.

Après séparation sur lectines, la présence dans la préparation non collagénique de deux types moléculaires montrant une composition glucidique très différente est confirmée par l'examen en microscopie électronique. En effet, la fraction glycoprotéinique AII montre une structure globulaire (Figure 34/C) assez homogène. Tandis que la fraction polysaccharidique AI apparaît constituée d'unités granuleuses mais aussi de fins filaments (Figure 34/D), des alignements doubles ont de plus tendance à s'établir et ont eux-mêmes un aspect granuleux.

Sans chercher à pousser trop loin l'interprétation de ces images, nous nous contenterons d'y voir une confirmation de la distinction

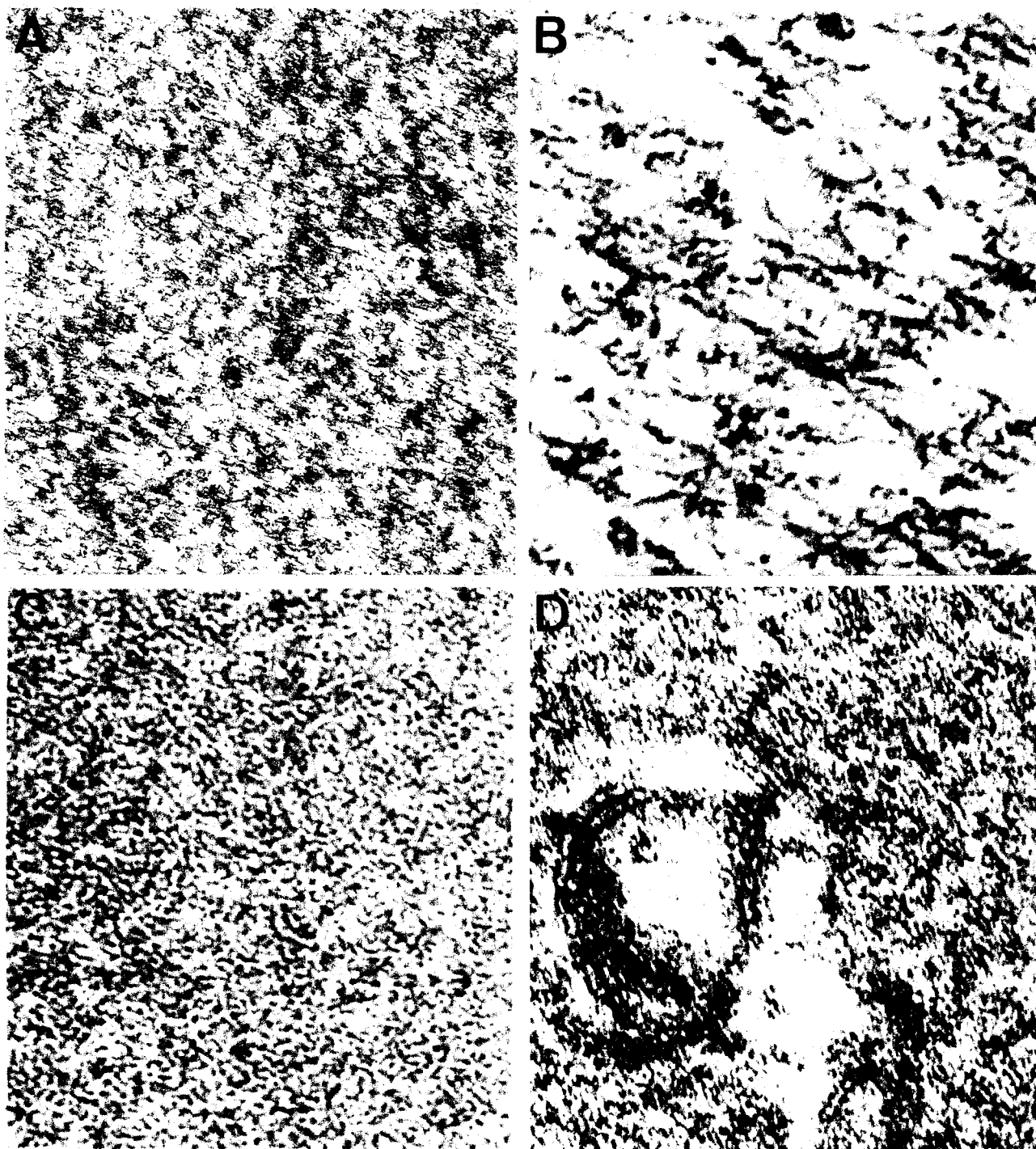


Figure 34 : Microscopie électronique des :

A/ Constituants non collagéniques purifiés sur Sépharose 4B (x20.000)

B/ à plus fort grossissement (x300.000)

C/ de la fraction glycoprotéinique montrant une affinité pour les lectines (x 150.000)

D/ de la fraction polysaccharidique non retenue sur les lectines (x 150.000).

de deux types de molécules non collagéniques que nous avons notée au cours de l'analyse chimique : les glycoprotéines et les polysaccharides acides.

- o -

7 - DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE APPARENT DES FRACTIONS GLYCOPROTÉINES

Les glycoprotéines du tissu conjonctif ont la propriété de s'associer *in vitro* avec une grande facilité pour former des complexes macromoléculaires. Cette réassociation, qui augmente avec le temps, est probablement due à des liaisons hydrophobes et à des ponts disulfure. Ces glycoprotéines contiennent environ 40 % de résidus hydrophobes et 2 à 3% de résidus cystéine. Une détermination du poids moléculaire de glycoprotéines qui ont été lyophilisées ou qui ont été conservées en solution à 4°C devient à peu près impossible. Il se forme des agrégats, qu'une incubation à 50°C en présence de 2-mercaptoéthanol et de SDS ne parviendra pas à dissocier complètement. La proportion d'agrégats de haut poids moléculaire augmente avec le vieillissement des préparations. Le problème de la conservation de nos échantillons se pose donc de façon cruciale. Nous avons essayé sur nos préparations de glycoprotéines d'éponges très concentrées, la méthode utilisée pour la conservation des anticorps purifiés : dilution de la solution avec un volume égal de glycérol et conservation à -20°C. Toutefois, nous n'avons pas encore pu apprécier les avantages et les inconvénients d'un tel mode de conservation.

Deux techniques ont été utilisées pour la détermination du poids moléculaire des glycoprotéines de *Spongia* :

A - EN GELS DE POLYACRYLAMIDE EN SDS

Les glycoprotéines de *Spongia* fraîchement isolées, fractions AII et B, montrent par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS une assez grande homogénéité de leur masse moléculaire. Une bande très peu diffuse est obtenue légèrement au-dessus du lysozyme dans la zone de 16 000. Avec des préparations plus ou moins vieilles, des bandes apparaissent dans des zones de masses moléculaires plus élevées et particulièrement dans celle de 32 000 (Figure 35/A et B). Cette association de deux unités de masse moléculaire apparente de 16 000 paraît dominante dans nos préparations. Ces résultats sont confirmés par des électrophorèses en gel d'acrylamide de concentrations différentes (7 et 10 %). Des bandes correspondant à des masses moléculaires d'environ 62 000 et 80 000 soulignent parfois l'agrégation de plusieurs unités de 16 000.

La fraction C (Figure 28), qui ne représente que 6 % des glycoprotéines de l'éponge et montre une composition un peu différente, révèle une masse moléculaire apparente de 21 000 (Figure 35/C).

La détermination de la masse moléculaire de la fraction AI, non retenue sur lectines et nettement plus riche en sucres, a donné une large bande diffuse au-dessus du lysozyme. L'hétérogénéité des chaînes saccharidiques de ces complexes protéines/polysaccharides acides pourrait expliquer l'étalement de leurs masses moléculaires.

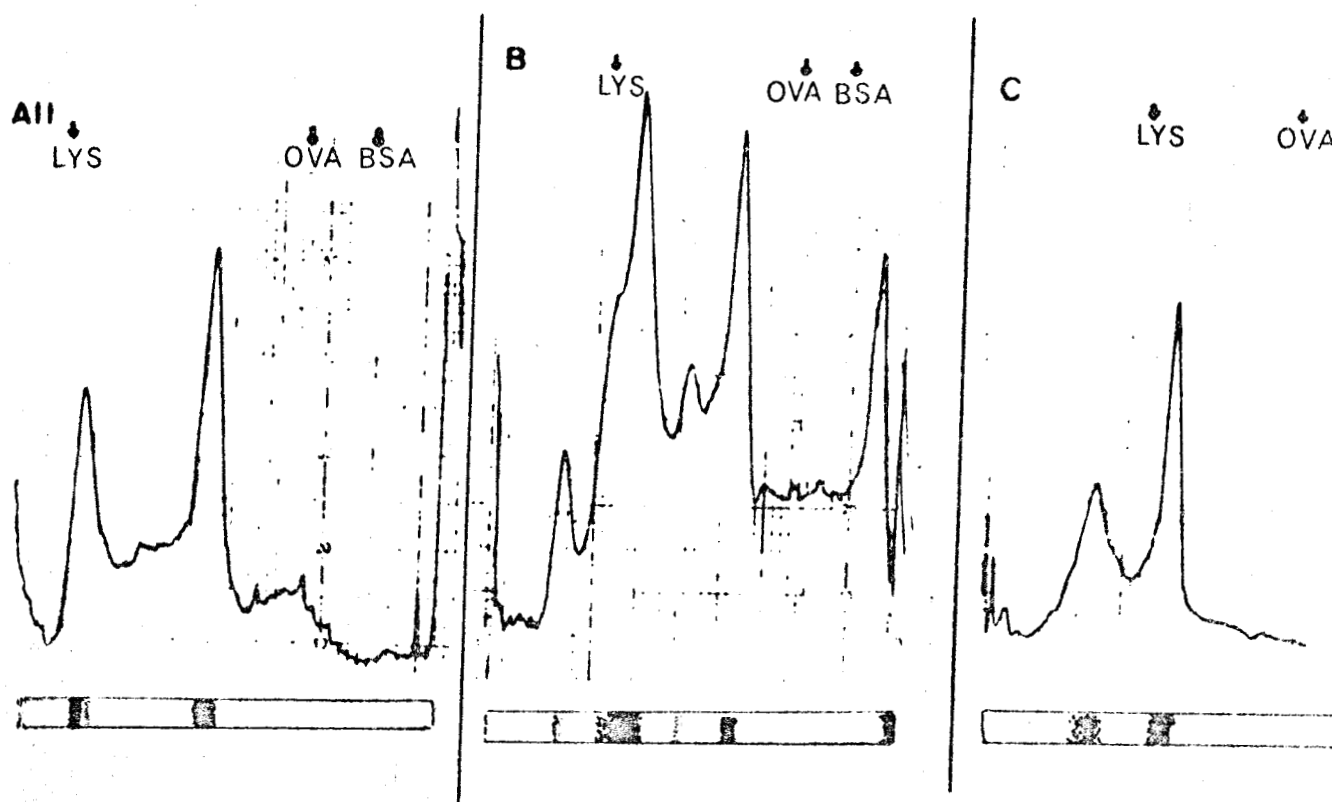


Figure 35 : Gels d'acrylamide en SDS et leurs densitogrammes à une densité optique de 600 nm en scanning obtenu sur spectrophotomètre Beckman, type Acta III, des fractions AII, B, C.

B - SUR COLONNE CALIBREE DE BIOGEL A 1,5m

Les glycoprotéines des fractions AII et B sont éluées sur la colonne calibrée de Biogel A 1,5 m en un seul pic symétrique situé au niveau du poids moléculaire de 16 000 (cf Chapitre V, N° 6/B). Les résultats sont calculés d'après le diagramme présenté Figure 36.

La reproductibilité et l'homogénéité de l'élution des glycoprotéines sur une telle colonne est remarquable. Le poids moléculaire de 16 000 obtenu en gel d'acrylamide est confirmé (Chapitre V, N° 6/A). Mais la réassociation des subunités de 16 000 observées en gel d'acrylamide n'apparaît pas. Nous ne pouvons pas apporter actuellement d'explication à ce phénomène.

La masse moléculaire rapportée pour les glycoprotéines de structure isolées de différents tissus conjonctifs est très variable. Mais surtout, pour une même préparation, plusieurs composants de poids moléculaires différents sont souvent décrits. Katzman (1972) a isolé par exemple des glycoprotéines d'une anémone de mer *Metridium dianthus*. Les poids moléculaires varient entre 40 000 et 120 000 avec une prédominance de ceux de 78 000.

En étudiant les glycoprotéines du tissu sous-cutané, Wolf et coll. (1971) ont montré que l'hétérogénéité constatée en gel d'acrylamide pouvait s'expliquer en admettant l'existence de sous-unités de masse moléculaire voisine de 15 000. A partir du derme de rat, Randoux et coll (1976) ont séparé deux unités glycoprotéiniques de poids moléculaire 16 000. Serafini-Fracassinì et coll. (1975) ont

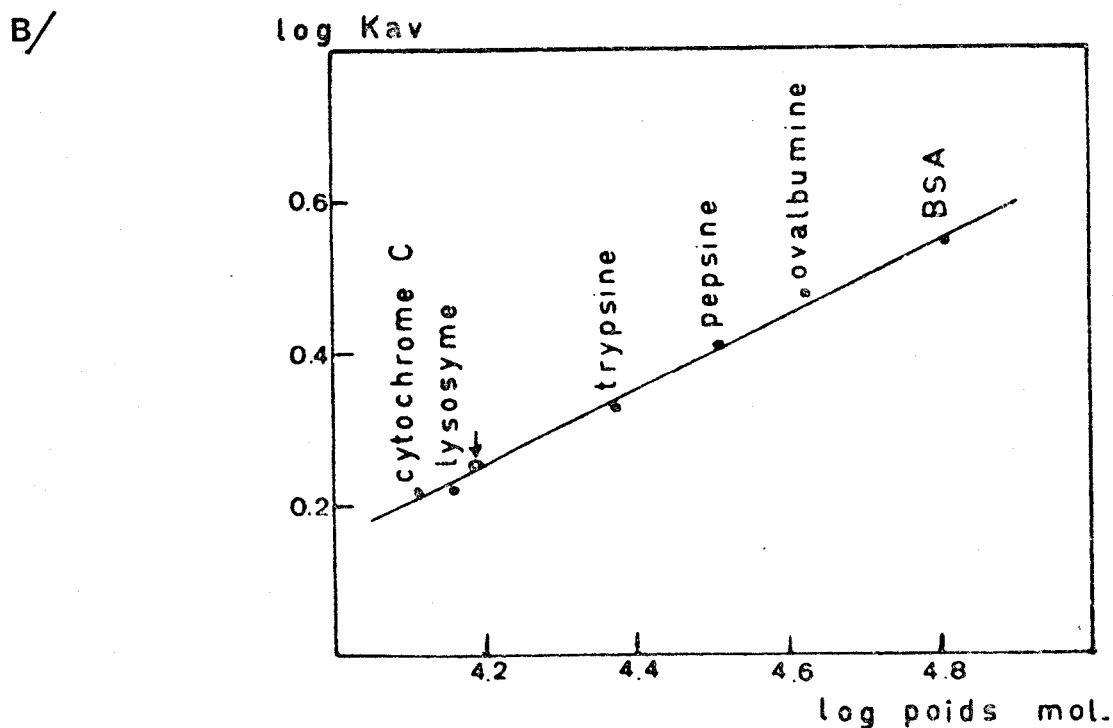
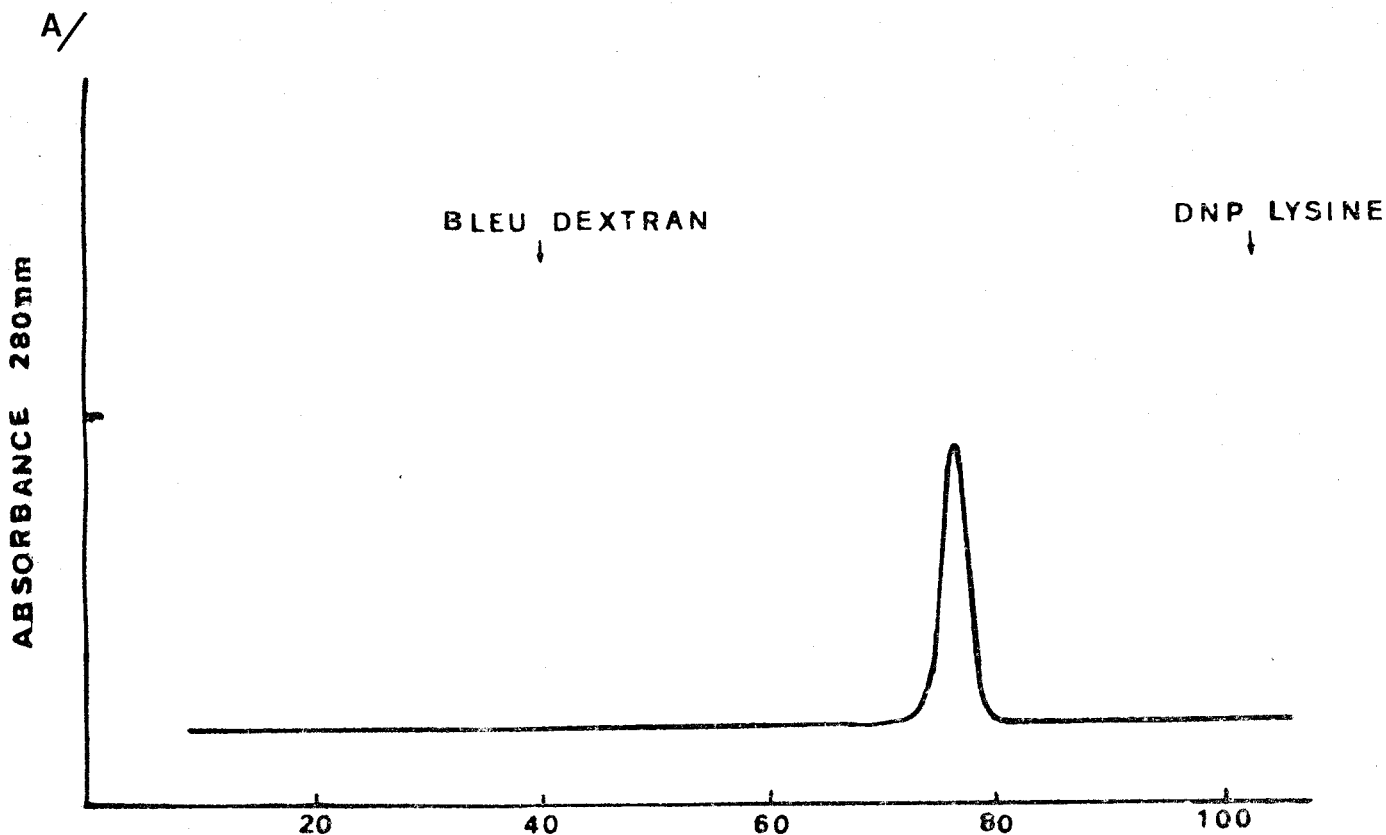


Figure 36 :

A/ Filtration sur une colonne calibrée (1,5x130 cm) de Bioigel A1,5m. des fractions AII et B dans un tampon tris HCl 0,02M pH 8,0 contenant de l'EDTA 0,02M et 0,1 % de SDS.

B/ Graphique du log Kav obtenu en(A) contre le log de la masse moléculaire de différents marqueurs protéiques (●) et des fractions glycoprotéiques de *Spongia* (○).

isolé du ligament de la nuque de boeuf une glycoprotéine ayant un poids moléculaire de 14 000 à 15 000.

Il est possible qu'il existe différentes populations de glycoprotéines tissulaires ayant des caractéristiques bien définies. Mais les difficultés d'isolement de ces glycoprotéines de structure et la variété des méthodes employées pour les extraire pourraient expliquer les divergences des masses moléculaires observées. En se basant sur l'hypothèse d'une association de sous-unités peptidiques de masse moléculaire comprise entre 15 000 et 16 000, une relation entre toutes ces observations qui paraissent contradictoires pourrait être établie.

- o -

8 - PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES DES GLYCOCONJUGUÉS DE SPONGIA

A - L'ANTIGENICITE

L'immunisation des lapins est décrite dans le Chapitre VI (N° 12/A). Deux antigènes ont été utilisés ; d'une part les protéines non collagène purifiées sur Sepharose 4B, alkylées ou non, débarrassées du SDS par chromatographie sur Dowex, d'autre part la fraction glycoprotéine B (voir Figure 28). La formation des anticorps a été contrôlée par double diffusion en gel d'agarose (Figure 37/A). Tous les antisérums donnent des lignes de précipitation avec leurs antigènes. L'alkylation des protéines ne semble pas modifier leurs propriétés immunologiques (Figure 37/B). Contre un antisérum anti-

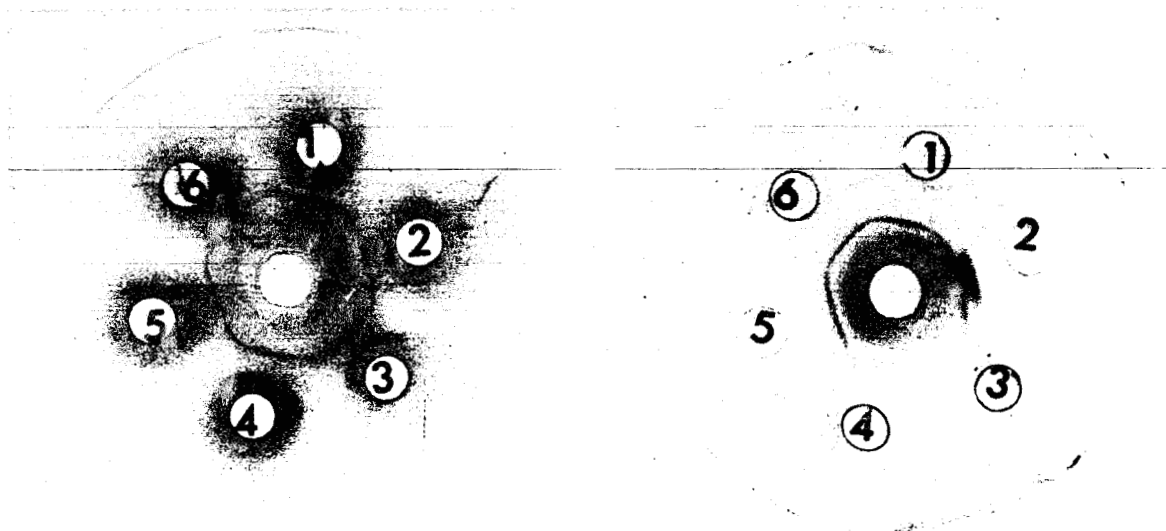


Figure 37 : Diffusion en gel d'agarose :

A/ Au centre : fraction glycoprotéinique de *Spongia* purifiée sur Sépharose 4B (pic II) et passée sur Dowex.

- 1 - 1er antisérum anti-pic II
- 2 - 2ème " " "
- 3 - 1er antisérum anti-pic II alkylé
- 4 - 2ème " " " "
- 5 - idem, mais décomplémenté, c'est-à-dire chauffé à 50°C
- 6 - idem 3

B/ Au centre : antisérum anti-pic II (N° 2) de A/

- 1 - Pic II non alkylé
- 6 - Pic II alkylé
- 5 - Pic II non passé sur Dowex 1X2
- 4 - *Cacospongia* : glycoprotéines obtenues après TCA par solubilisation dans urée
- 3 - *Spongia* : idem
- 2 - *Spongia* : extrait global

glycoprotéines non alkylées, les protéines alkylées ou non montrent une réaction d'identité (ligne de précipitation continue). Le résultat est identique en utilisant un antisérum antiglycoprotéines alkylées.

De même, le passage des glycoprotéines sur Dowex 1X2 n'entraîne aucune modification de leur comportement immunologique (Figure 37/B). Par contre, la purification des préparations non-collagène sur Sepharose 4B fait disparaître la deuxième ligne de précipitation obtenue avec les préparations non purifiées. Cette observation peut sans doute être expliquée par l'élimination sur colonne de Sepharose 4B d'une fraction de haut poids moléculaire (pic I, Figure 23) diffusant plus lentement dans le gel d'agarose et contenant des glycoprotéines, ou polysaccharides, fortement associées au collagène.

Chaque fraction obtenue par chromatographie d'affinité sur lectines (Figure 29) a été testée par diffusion dans un gel d'agarose contre un antisérum anti-fraction B. Toutes les fractions donnent une ligne de précipitation avec ce sérum et montrent une identité immunologique (Figure 38/A).

Ces résultats ont été confirmés par immunoélectrophorèse bidimensionnelle (Laurell, 1965), l'antisérum anti-fraction B étant incorporé au gel d'agarose (Chapitre VI, N° 12/C). Les fractions AII et C, de même que la fraction B, donnent un pic de précipitation symétrique (Figure 39).

L'immunoélectrophorèse simultanée de 2 ou 3 fractions glycoprotéiques différentes appliquées dans des trous situés en ligne, fait

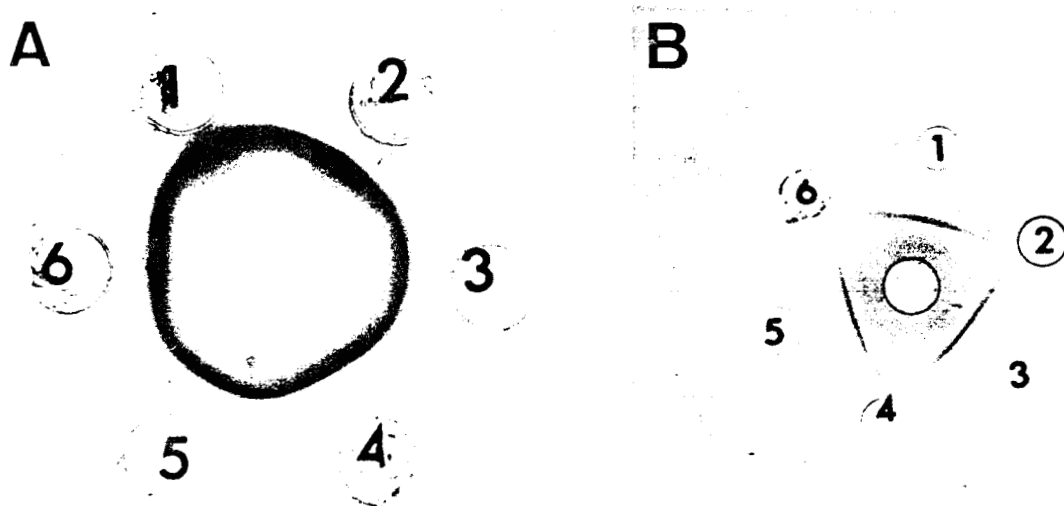


Figure 38 : Diffusion en gel d'agarose.

A/ Au centre : antisérum anti-fraction B

Trous périphériques :

- 1 - Fraction AI précipitée au CPC
- 2 - Fraction B
- 3 - idem
- 4 - Fraction AII
- 5 - idem
- 6 - Fraction C

B/ Au centre : antisérum anti-pic II

Trous périphériques :

- 1 - Pic II
- 2 - Pic II chauffé 20 minutes à 90°C dans du TCA
- 3 - Pic II alkylé
- 4 - *Cacospongia* : glycoprotéines solubilisées dans urée après TCA
- 5 - Pic II
- 6 - *Spongia* : glycoprotéines solubilisées dans urée après TCA.



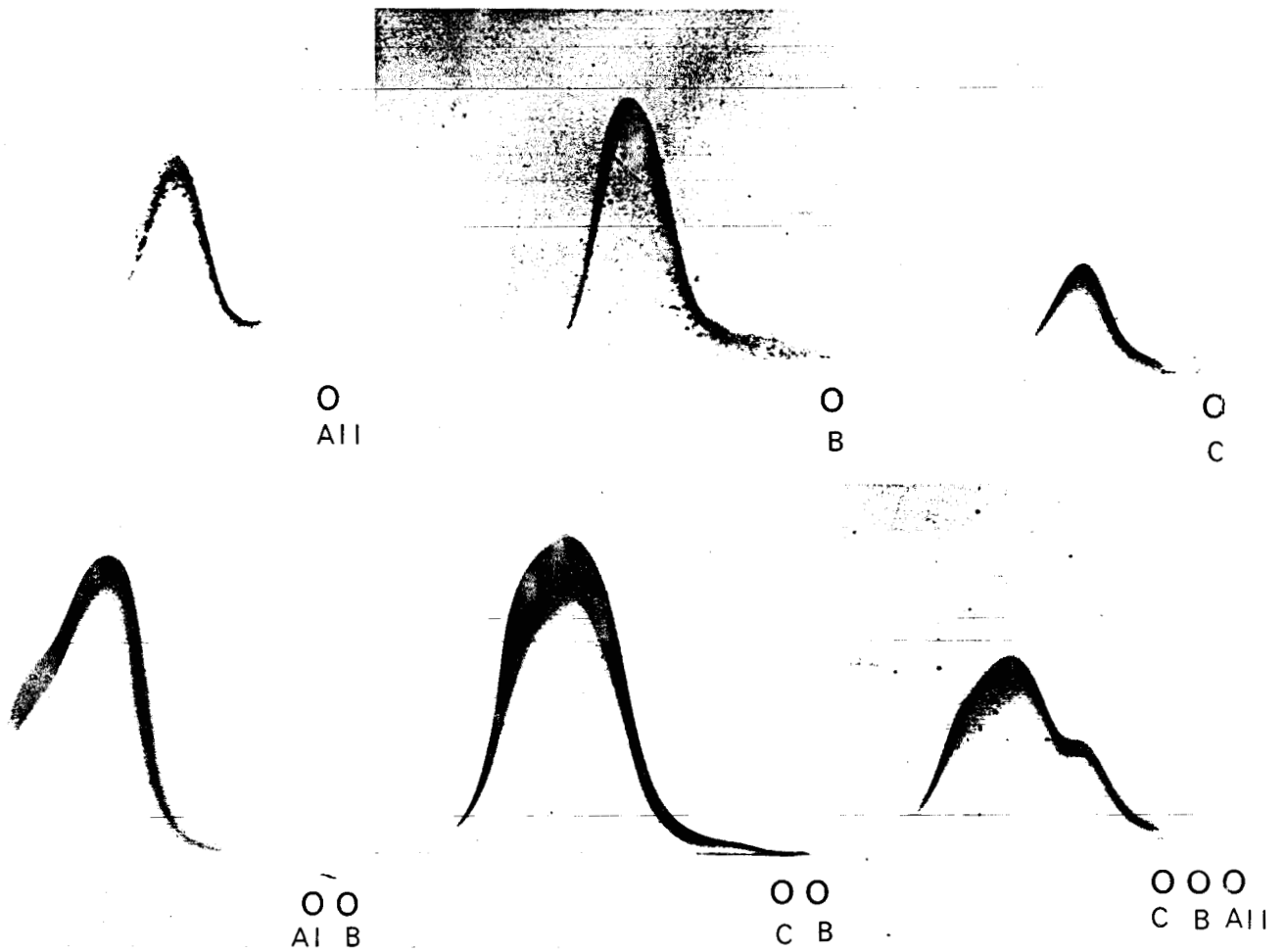


Figure 39 : Immunoélectrophorèse bidimensionnelle des différentes fractions non collagéniques de *Spongia* obtenues par chromatographie d'affinité sur lectines (Figure 29) contre un anti-sérum anti-fraction B.

apparaître une fusion des pics de précipitation correspondant à chaque fraction (Figure 39). Ainsi, bien que montrant quelques légères différences dans leur composition en acides aminés (Tableau 16), les glycoprotéines et polysaccharides de *Spongia*, séparées sur lectines immobilisées, paraissent posséder au moins un déterminant antigénique commun.

Il faut encore noter dans ce paragraphe l'impossibilité d'obtenir des lignes de précipitation avec les préparations non collagène de *Spongia* chauffée dans le TCA à 3 % dans les mêmes conditions que celles décrites Chapitre IV/1. Les glycoprotéines ainsi traitées deviennent difficilement solubles dans le tampon EDTA contenant 1 % de SDS, et, de l'urée 8M doit être employée pour obtenir leur solubilisation. Le chauffage dans le TCA pourrait entraîner une modification importante de leur conformation tridimensionnelle et provoquer une déformation de leurs sites antigéniques. Ainsi, l'extrait EDTA non collagénique de *Spongia* purifié sur Sepharose 4B donne une réaction croisée avec son antisérum (Figure 38/B). Cette même fraction chauffée 15 minutes dans le TCA 3 % à 90°C n'est plus capable de donner une ligne de précipitation avec le même antisérum.

B - LA SPECIFICITE IMMUNOLOGIQUE D'ESPECE

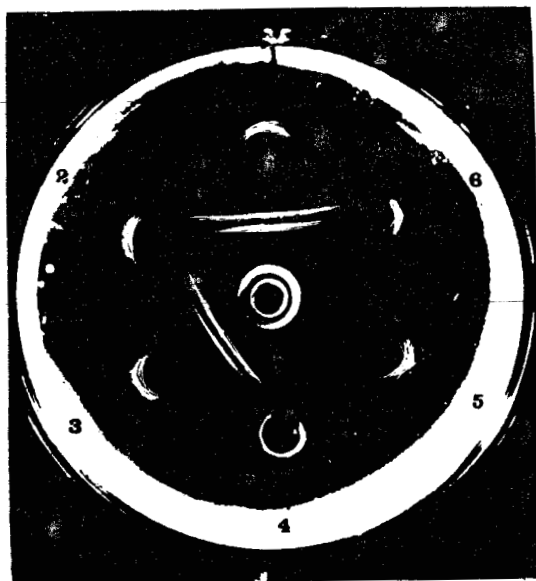
Les propriétés immunogéniques des glycoprotéines d'éponges sont de plus spécifiques d'espèce (Figure 37). Des antisérums obtenus à partir de préparations EDTA non collagéniques brutes (extrait EDTA global) de deux éponges de genres différents - *Spongia officinalis* et *Suberites massa* - donnent par double diffusion en gel d'agarose

une ou plusieurs lignes de précipitation uniquement avec leurs propres antigènes ou avec une fraction purifiée sur Sepharose 4B de ces mêmes antigènes (pic II, Figure 23). Ainsi, un antisérum de lapin anti-extrait global de *Suberites* donne plusieurs lignes de précipitation avec ce même extrait et montre une réaction d'identité avec les fractions purifiées de *Suberites* forme massive et digitée (Figure 40). Par contre, avec cet antisérum, aucune réaction positive n'a pu être mise en évidence avec des préparations EDTA de *Spongia*.

Des glycoprotéines ont été isolées d'*Ircinia oros* et fractionnées sur colonne de lectines suivant la technique décrite pour *Spongia officinalis*. Aucune fraction glycoprotéinique d'*Ircinia* n'a donné de ligne de précipitation avec l'antisérum anti-fraction B de *Spongia*.

Des résultats assez contradictoires ont pourtant été obtenus avec des antisérums anti-glycoprotéines de structure de tissus de Vertébrés. Ces glycoprotéines ont été solubilisées dans l'urée 8M après élimination du collagène dans le TCA chaud. Les glycoprotéines des éponges extraites de la même façon que les glycoprotéines de Vertébrés qui ont servi d'antigènes donnent une ligne de précipitation avec ces antisérums (Figure 41). Les préparations de glycoprotéines extraites dans un tampon EDTA-SDS et non chauffées dans le TCA ne montrent par contre aucune réaction croisée avec ces mêmes antisérums.

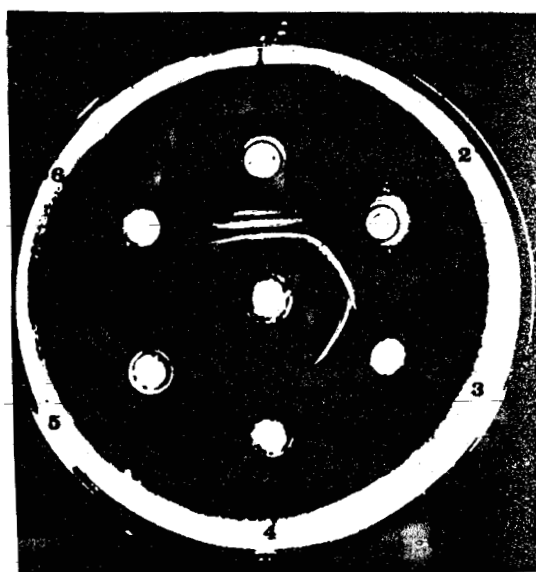
Figure 40 : Immunodiffusion sur gel d'agarose à 1 %



A) Trou central : extrait Spongia global

Trous périphériques : anti-sérum de lapin

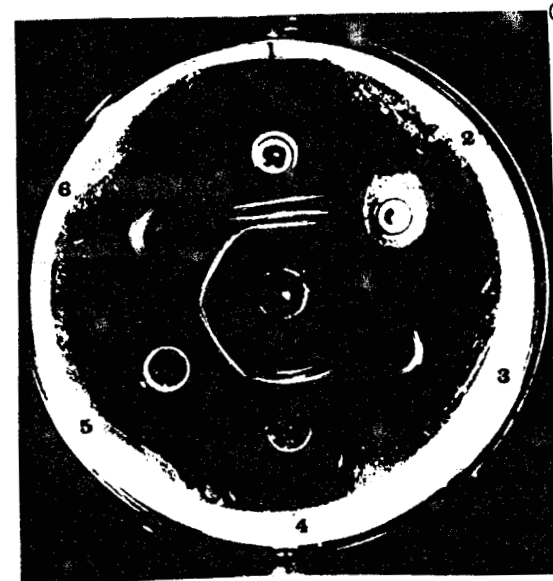
- 1) Anti-extrait Spongia global
- 2) Anti-extrait Suberites (forme massive) global
- 3) Anti-extrait Spongia global
- 4) Anti-extrait peau de souris C3H global
- 5) Anti-extrait Suberites (forme massive) global
- 6) Anti-extrait peau de souris C57 B1 global



B) Trou central : antisérum de lapin anti-Suberites (forme massive) global

Trous périphériques :

- 1) Extrait Suberites (forme massive) global
- 2) Extrait Suberites (forme massive) purifié sur Sépharose 4B
- 3) Extrait Suberites (forme digitée) purifié sur Sépharose 4B
- 4) Extrait d'urée de porc
- 5) Extrait Spongia purifié sur Sépharose 4B (pic II)
- 6) Extrait Spongia global

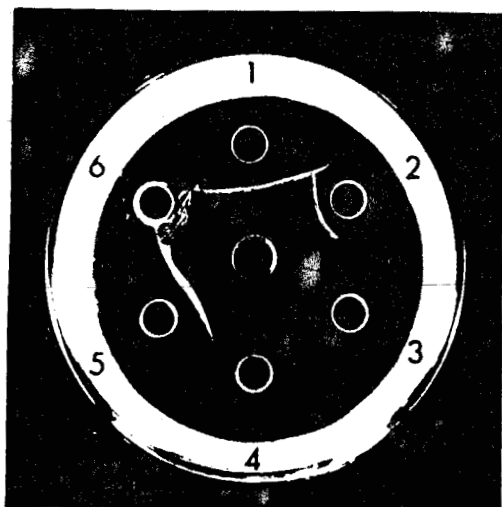


C) Trou central : antisérum de lapin anti-extrait Spongia global

Trous périphériques :

- 1) Extrait Spongia global
- 2) Extrait Suberites global
- 3) Extrait Suberites pic II Sépharose 4B
- 4) et 5) Extraits Spongia isolés par isofocalisation (non publié)
- 6) Extrait Spongia pic II

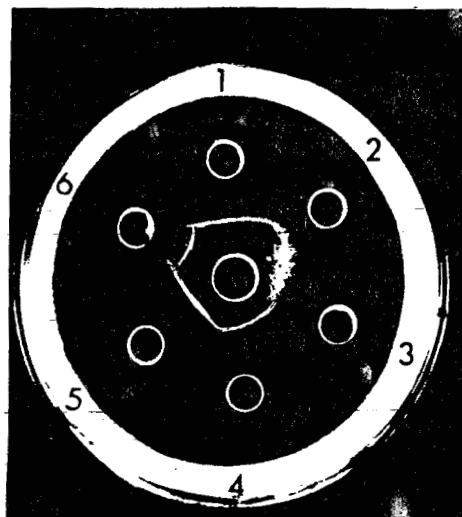
Figure 41 : Double diffusion en gel d'agarose



A) Trou central : extrait TCA-urée de Suberites

Trous périphériques : antisérum de lapin

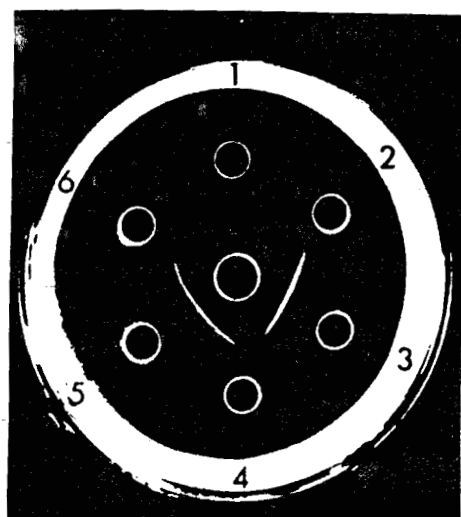
- 1) Glycoprotéines de structure (GPS) de l'aorte humaine
- 2) GPS du ligament large de veau
- 3) GPS de l'aorte de porc
- 4) "Crude Soluble Collagen" (CSC) de la peau embryonique de veau
- 5) GPS de la cornée de veau
- 6) CSC de la cornée de veau



B) Trou central : antisérum de GPS de cornée de veau

Trous périphériques :

- 1) Pic I de l'extrait TCA-urée de Suberites (fig. 21 A)
- 2) Pic I de l'extrait TCA-urée d'Ircinia (fig 211)
- 3) Extrait TCA-urée d'aorte humaine
- 4) Pic III de l'extrait TCA-urée de Suberites
- 5) Pic II de l'extrait TCA-urée de Suberites
- 6) Extrait TCA-urée de la cornée de veau



C) Trou central : antisérum de GPS de cornée de veau

Trous périphériques :

- 1) CSC de la peau embryonique de veau
- 2) Extrait NaCl de la peau de seiche (Moczar et Moczar, 1974)
- 3) Pic I de l'extrait TCA-urée de Suberites
- 4) Extrait de stroma de la peau de seiche
- 5) Pic II de l'extrait TCA-urée de Suberites
- 6) CSC de la peau de seiche

Il semble donc, comme nous le remarquons précédemment, que le traitement par l'acide entraînerait une modification conformationnelle des glycoprotéines et pourrait provoquer un démasquage des sites antigéniques non spécifiques, tandis que les sites antigéniques spécifiques d'espèce disparaîtraient.

Des données ponctuelles souvent ambiguës ont été rapportées sur les caractéristiques immunologiques des glycoprotéines de structure isolées à partir de différents tissus conjonctifs de Vertébrés. Quelques études sont parties de tissus oculaires et les auteurs ont tenté d'établir des relations antigéniques avec d'autres organes (Robert et coll, 1970 ; Philipsen et Broekhuysen, 1972 ; Van der Eerden et Broekhuysen, 1973/a et b). Ces investigations montrent des spécificités de tissu et d'espèce limitées. Mais les glycoprotéines qui ont servi à obtenir les anticorps ont été solubilisées après destruction de la matrice collagénique dans le TCA chaud. Et l'observation que nous avons faite précédemment sur les glycoprotéines d'éponges chauffées dans le TCA et le démasquage de sites antigéniques non spécifiques d'espèce qu'entraînait un tel traitement prend toute sa force. Elle pourrait apporter une explication au peu de spécificité d'espèce et de tissu observé par les auteurs cités ci-dessus, pour différentes glycoprotéines de structure.

Pourtant, récemment, Sear et coll (1976) ont isolé des cultures de fibroblastes de peau humaine des glycoprotéines riches en fucose qui présentent une parenté avec les glycoprotéines de structure

des tissus élastiques. Ces glycoprotéines sont précipitables par un antisérum de lapin obtenu avec une préparation, non soumise à des agents hydrolytiques, de glycoprotéines microfibrillaires du ligament de la nuque de boeuf (Sear et coll, 1978).

Aucune conclusion générale ne peut certes être tirée d'observations aussi limitées et fragmentaires. Une meilleure connaissance des déterminants antigéniques des glycoprotéines de structure et de leur spécificité ne pourra être acquise que par des explorations approfondies et systématiques. Celles-ci devraient aussi apporter une meilleure compréhension du rôle biologique de ces glycoprotéines, en particulier dans la différenciation cellulaire et tissulaire.

C - L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Par immunofluorescence indirecte (Chapitre VI, N° 13) sur coupe de tissu, l'antisérum obtenu à partir de la fraction glycoprotéine B donne une réaction positive nette avec *Spongia officinalis* (Figure 42/A). La fluorescence est localisée entre les fibres de Spongine (non visible à l'observation au microscope équipé du filtre sélectif utilisé pour la Rhodamine) sous forme de nombreuses petites taches irrégulières. En effet, les zones fluorescentes apparaissent entre les fibres de Spongine dont la fluorescence naturelle peut être visualisée avec un filtre n'arrêtant pas son émission, le filtre utilisé pour la fluorescéine par exemple (Figure 42/B). Ces images suggèrent l'idée que les antigènes reconnus sont probablement répartis autour des cellules. Mais l'utilisation de la fluorescence impose les limites d'un examen

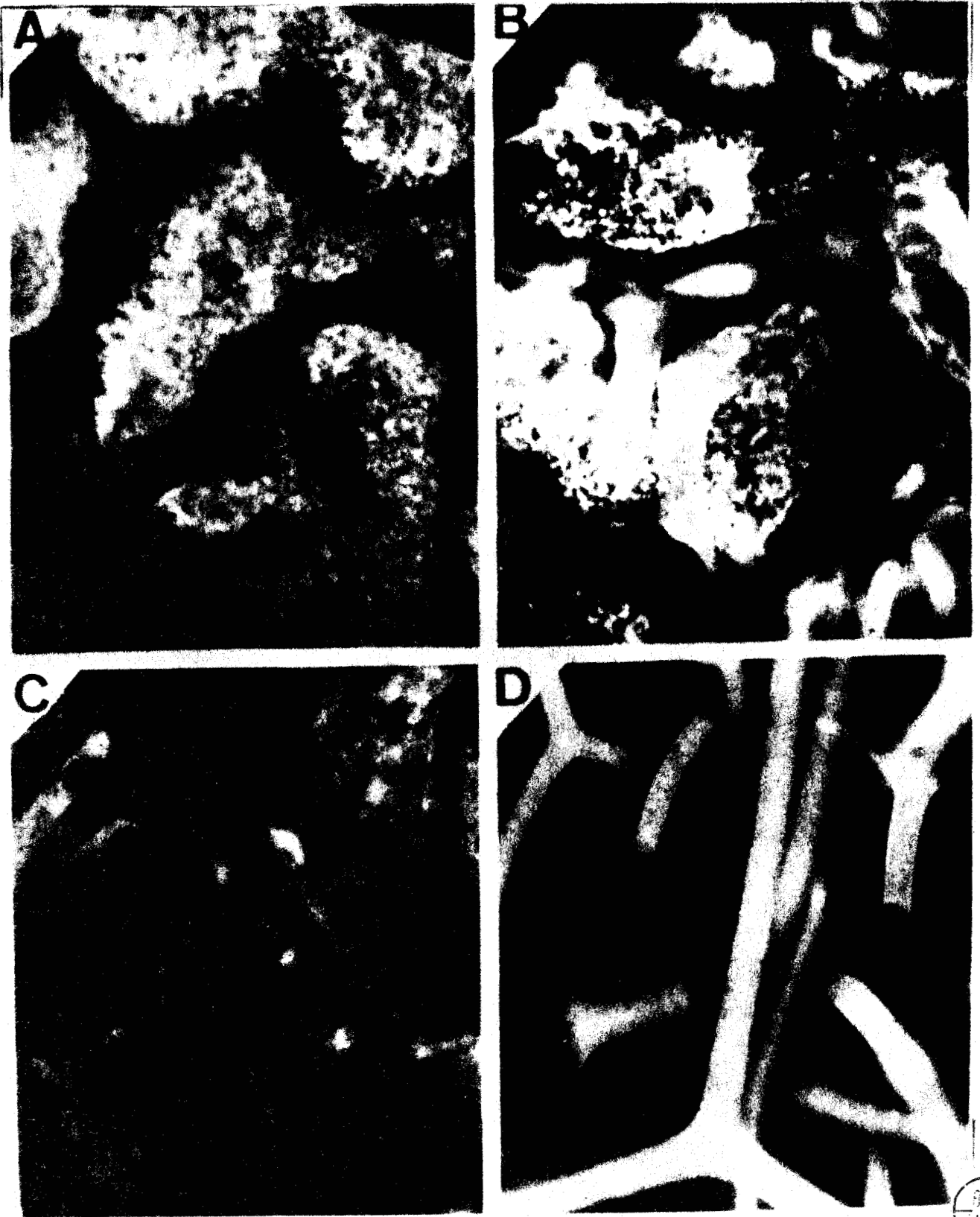


Figure 42 : Immunofluorescence indirecte sur coupes de *Spongia officinalis* incubées avec :

- A/ Antisérum anti-fraction glycoprotéinique B de *Spongia officinalis*.
- B/ idem, mais avec un autre filtre non spécifique de la Rhodamine : la fluorescence naturelle des fibres de Spongine apparaît.
- C/ Sérum de lapin normal
- D/ idem, avec filtre différent.

en microscopie optique. L'application des réactions immuno-enzymatiques (peroxydase) aux coupes d'Eponge va permettre l'examen en microscopie électronique, et une meilleure définition de la localisation des antigènes. Cette étude est en cours.

Cette réaction immunofluorescente apparaît spécifique : un sérum de lapin normal ou un antisérum anti-fraction B absorbé avec son antigène ne donnent pas de réponse positive (Figure 42/C).

Si nous prenons une éponge d'une autre espèce, *Chondrosia reniformis*, aucune réaction positive ne peut être mise en évidence en l'incubant avec l'antisérum anti-fraction B de *Spongia officinalis*. La spécificité d'espèce des glycoprotéines de l'éponge, montrée par diffusion sur plaque ou immunoélectrophorèse, est encore confirmée par cette observation.

- o -

9 - LOCALISATION SUR COUPE D'ÉPONGE DES CONSTITUANTS NON COLLAGÉNIQUES MONTRANT UNE AFFINITÉ POUR LES LECTINES

Les glycoprotéines de *Spongia officinalis* isolées, purifiées, caractérisées suivant leur affinité pour les lectines ConA et WGA, ont montré des déterminants communs spécifiques d'espèce et ont pu être localisées par immunofluorescence indirecte sur coupe de tissu. Ce résultat est important car il nous a permis de prouver que les

anticorps obtenus à partir de substances extraites de l'éponge étaient capables de reconnaître ces mêmes antigènes *in situ* dans la matrice intercellulaire et de les localiser.

Il nous a paru intéressant de compléter cette observation par une réaction analogue à celle de l'anticorps avec son antigène : l'affinité pour les lectines de certains sucres de la copule glucidique des glycoprotéines. Nous avons cherché à retrouver *in situ*, sur coupe d'éponge, l'affinité que les glycoprotéines isolées ont montré pour la ConA et la WGA. Suivant la méthode décrite Chapitre V, N° 14, des coupes de *Spongia* ont été incubées avec les lectines marquées à la rhodamine.

Les résultats ont été très nets. Des images comparables à celles obtenues avec *Spongia officinalis* par immunofluorescence indirecte ont été observées avec la ConA ou la WGA marquées à la rhodamine ; ces images confirment la prépondérance des glycoprotéines autour des cellules. La ConA et la WGA donnent des images tout à fait superposables.

Une autre éponge d'espèce différente, *Chondrosia reniformis*, qui n'avait montré aucune réaction avec l'antisérum anti-fraction B de *Spongia*, donne des images fluorescentes (Figure 43) très significatives lorsque des coupes semi-fines de cette éponges sont incubées avec la ConA ou la WGA marquées à la rhodamine. *Chondrosia* ne contient pas de fibres de Spongine, mais comporte deux régions bien distinctes (Garrone et coll., 1975) :

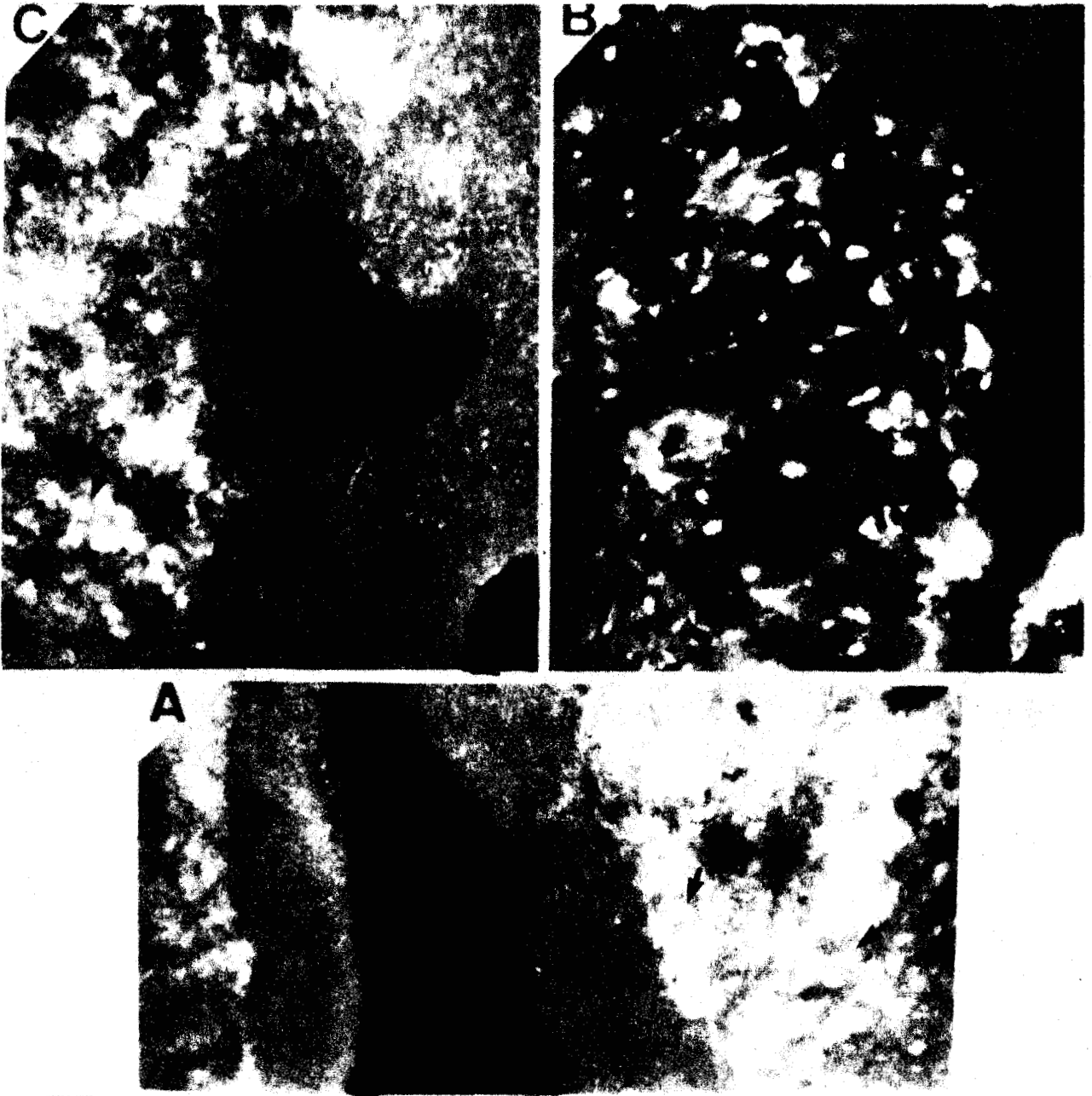


FIGURE 43 : Réactions d'incubation des coupes de *Chondrosia reniformis* avec des dérivés fluorescents des lectines :

A/ ConA (canal aquifère au centre de la photo, médulla à la périphérie) (x 320)

B/ WGA (co-tex) (x 1000)

C/ PHA (canaux aquifères à droite, médulla à gauche) (x 150)

Sur les photos A et C les grandes taches blanches, indiquées par des flèches, correspondent aux chambres choanocytaires.

- une zone périphérique ou cortex très riche en collagène (40 %) et pauvre en cellules dans laquelle circulent les canaux aquifères.

- une zone interne ou medulla qui contient de nombreuses cellules et en particulier les choanocytes groupés en chambres choanocytaires.

Les lectines marquées à la rhodamine soulignent nettement cette organisation de l'éponge et confirment l'accumulation prépondérante des glycoprotéines autour des cellules ; des réactions très intenses sont ainsi observées dans la région des chambres choanocytaires.

La localisation des polysaccharides acides reste plus imprécise. Comme nous l'avons précédemment montré, l'existence d'au moins un déterminant antigénique commun entre ces polysaccharides et les glycoprotéines, permet de supposer une révélation commune de ces substances par les méthodes d'immunofluorescence utilisées. Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer, notamment par l'utilisation d'une autre lectine qui, contrairement à la ConA et la WGA, montrerait une affinité pour les polysaccharides. Nous avons choisi la phytohémagglutinine ELS (PHA) extraite d'un haricot (*Phaseolus vulgaris*). En effet, des études d'inhibition avec des sucres simples ont montré que la PHA fixe les résidus N-acétylgalactosamine (Sharon et Lis, 1973). Et, seuls les polysaccharides des éponges contiennent de la galactosamine.

En incubant des coupes fixées de *Chondrosia* et de *Spongia* avec la PHA marquée à la fluorescéine, des images tout à fait comparables à celles présentées Figure 43 ont été obtenues, c'est-à-dire un marquage péricellulaire avec une réaction très intense au niveau des chambres choanocytaires.

Mais, comme nous l'avons vérifié, les glycoprotéines que nous avons isolées à partir de *Spongia* peuvent être précipitées *in vitro* par la PHA en solution. Cette lectine montre en effet une affinité pour des enchaînements saccharidiques du type Gal-GlcNAC-Man (Kornfeld et Kornfeld, 1970). Et, ces oligosaccharides peuvent aussi bien se trouver dans la partie terminale de la chaîne glucidique des polysaccharides que des glycoprotéines. Aussi, les résultats obtenus avec la PHA ne peuvent encore apporter qu'une probabilité de l'accumulation simultanée des polysaccharides et des glycoprotéines autour des cellules.

- o -

10 - CONCLUSION

La matrice intercellulaire de l'Eponge apparaît donc constituée, outre de différentes formations collagènes, essentiellement de deux types de glycoconjugués. Ces derniers se différencient principalement par l'importance de leur chaîne glucidique. Celle-ci représente pour les glycoprotéines 6 % de la partie protéinique, pour les polysaccharides environ 30 %. Les composants saccharidiques sont les mêmes, exception faite de la galactosamine, qui ne se

retrouve que dans les polysaccharides acides, qui contiennent aussi des résidus sulfate. La présence d'acides sialiques semble peu probable.

La composition en acides aminés de ces deux classes de molécules est extrêmement voisine et ne se distingue que par une légère différence dans le nombre de résidus de quelques acides aminés.

Un ou plusieurs déterminants antigéniques spécifiques d'espèce paraissent communs aux glycoprotéines et aux polysaccharides. Par immunofluorescence indirecte et incubation avec des dérivés fluorescents des lectines, une accumulation prépondérante des glycoprotéines et probablement des polysaccharides a pu être mise en évidence autour des cellules.

A - LES GLYCOPROTEINES

Leur composition en acides aminés, leur teneur en oses neutres (environ 3 %), leur teneur en glucosamine (2,6 %) et l'absence de sulfate soulignent la relation qui peut être établie entre cette classe de glycoprotéines d'éponge et les glycoprotéines de structure des Vertébrés et des Invertébrés (Anderson, 1976 ; Robert et coll. 1975).

L'hétérogénéité de la partie glucidique des glycoprotéines de structure a été rapportée par Moczar et coll. (1968). Les constituants saccharidiques habituels sont la glucosamine, le mannose, le galactose, le fucose et l'acide sialique. La présence de glucose

est aussi généralement indiquée mais elle semble plus équivoque. La proportion relative de ces différents sucres et le rapport sucres/protéines sont variables.

Dans une même éponge, la microhétérogénéité de la copule glucidique des glycoprotéines a pu être mise en évidence par chromatographie d'affinité sur lectine. Elle se manifeste surtout par une teneur en mannose passant du simple au double et une variation appréciable des résidus fucose.

De plus, les glycoprotéines de l'éponge contiennent des quantités appréciables d'arabinose et un peu d'acide glucuronique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'arabinose est un composé saccharidique rare dans le règne animal et qui semble assez particulier aux Spongiaires. Sa présence constante en quantités notables dans toutes les fractions glycoprotéiniques séparées sur lectines, l'identité immunologique de ces fractions, permettent d'affirmer que l'arabinose est un composant des glycoprotéines sécrétées par les cellules de l'éponge. Le rôle de l'arabinose chez ces animaux reste toutefois assez mal compris.

De même, la présence d'acide glucuronique n'est habituellement pas rapportée dans les glycoprotéines de structure. Nous l'avons trouvé en petite quantité dans la copule glucidique des glycoprotéines d'éponge, assimilées aux glycoprotéines de structure des tissus vertébrés.

Moczar (1968) a montré que la liaison glycanne-protide dans les

glycoprotéines de structure de l'aorte est de type asparaginy-N-acétylglucosamine. Les résultats analytiques obtenus avec les glycoprotéines de l'Eponge sont en faveur de l'existence d'un même type de liaison.

B - LES POLYSACCHARIDES ACIDES

Ce sont essentiellement des complexes protéine-hétéropolysaccharide acide dont environ la moitié seulement apparaît précipitable par les détergents ioniques. Ils ne sont pas sensibles aux enzymes spécifiques des glycosaminoglycannes et leur composition glucidique ne laisse guère prévoir une structure disaccharidique répétitive. Ils ne semblent donc guère pouvoir être assimilés aux glycosaminoglycannes des tissus conjonctifs de Vertébrés.

Les polysaccharides que nous avons décrits présentent, par contre, une grande parenté avec les complexes hétéropolysaccharidiques qui, par des méthodes variées, ont été isolés par divers auteurs à partir d'éponges d'espèces différentes et qui apparaissent constitués des mêmes glucides : oses neutres (arabinose, glucose, galactose, fucose, mannose, xylose), les deux hexosamines et l'acide glucuronique. Un alignement d'unités saccharidiques similaires a été trouvé par MacLennan (1970) dans des substances antigéniques sérologiquement apparentées aux constituants de la surface cellulaire de l'éponge et extraites par l'acide trichloracétique froid. Ces complexes polysaccharides isolés à partir de 17 éponges différentes sont spécifiques d'espèces. Les mêmes sucres se retrouvent aussi dans les facteurs d'agrégation qui permettent chez les éponges une

réagrégation des cellules dissociées avec des degrés variables de spécificité (Margoliash et coll., 1965 ; Gasic et Galanti, 1966 ; Henkart et coll., 1973 ; Muller et Zahn, 1973).

CHAPITRE V

LES SPONGIAIRES ET LA PHYLOGENESE DE LA TRAME CONJONCTIVE

Les Spongiaires, organismes pluricellulaires situés à la base du règne animal, présentent un faible degré d'organisation mais possèdent une matrice extracellulaire bien définie, prémices du tissu conjonctif des animaux supérieurs. Essentiellement, trois sortes de molécules constituent la matrice extracellulaire des éponges : le collagène, les polysaccharides acides et les glycoprotéines.

Le collagène, bien que montrant des caractéristiques d'insolubilité très particulières à ce phylum, contient déjà toutes les potentialités des collagènes des animaux supérieurs. En effet, des Eponges aux mammifères, les collagènes paraissent soumis à des étapes de biosynthèse au moins qualitativement identiques, qui comprennent l'assemblage de la structure primaire, l'hydroxylation des résidus prolyle et lysyle appropriés dans les chaînes polypeptidiques naissantes, la glycosylation de certains résidus hydroxylysyle, l'association des chaînes accompagnée des liaisons interchaînes disulfure, et la formation de la triple hélice. La conversion du procollagène en collagène, qui se produit apparemment extracellulairement chez les Vertébrés, reste encore à prouver chez les Spongiaires.

Pourtant, sont déjà présentes dans les collagènes d'Eponges, les liaisons covalentes intramoléculaires que l'on retrouve habituellement dans les collagènes des animaux supérieurs.

Plusieurs des réactions intracellulaires sont sous la dépendance d'enzymes. Leur quantité et leur degré d'activation peut être très différents d'un type de cellules à un autre. Mais aussi le temps

pendant lequel l'enzyme pourra agir, qui est limité par la formation de la triple hélice, a été rapporté très inégal. Il en résulte, pour les collagènes, des taux d'hydroxylation et de glycosylation extrêmement variables qui pourraient expliquer au moins partiellement la modification de leur morphologie et de leur fonction.

Ces taux vont atteindre chez les éponges et chez certains Invertébrés des valeurs aussi élevées que celles rapportées pour les collagènes des membranes basales qui sont bien moins structurés.

A l'intérieur du phylum, les éponges cornées, généralement considérées comme les plus récemment apparues, contiennent à côté du collagène extracellulaire une forme de collagène très particulière : la Spongine. Celle-ci montre une très grande résistance aux agents hydrolysants et constitue des formations très diverses : fibres ramifiées, filaments d'*Ircinia*, spongine périscopulaire.

L'étude analytique comparée du collagène extracellulaire et des spongines fait apparaître des différences dans la composition en acides aminés et dans les taux d'hydroxylation de la lysine et de glycosylation de l'hydroxylysine de ces deux sortes de collagène.

Ces différences chimiques sont accompagnées d'une morphologie distincte : les fibrilles appelées collagène extracellulaire, les microfibrilles qui constituent la Spongine.

Il est possible qu'au sein du phylum Eponge, une évolution particulière

ne se soit établie tendant, par une plus grande cohésion et une plus forte résistance des collagènes, à une meilleure adaptation aux conditions de vie de l'animal constamment traversé de courants d'eau de mer et pénétré de bactéries et de cyanophycées.

Des polysaccharides acides plus ou moins sulfatés existent chez les Eponges. De même, une grande variété de polysaccharides acides a été rapportée chez les Invertébrés (revue dans Hunt, 1970). Par contre, certains Cnidaires n'en contiennent pas. En effet, ces polysaccharides anioniques contenant du sulfate et des acides uroniques sont totalement absents de la paroi conjonctive de *Metridium* (Katzman et Jeanloz, 1970/b). Une autre Cnidaire *Zhizostoma* (Bocquet et coll., 1972) ne renferme aussi que des polysaccharides neutres.

Les polysaccharides acides des Spongiaires ne paraissent pas pouvoir être assimilés aux glycosaminoglycannes des tissus conjonctifs de Vertébrés. Toutefois, les glycosaminoglycannes ont été signalés chez les Invertébrés assez tôt au cours de la phylogénèse. Mais les caractérisations, souvent basées uniquement sur des critères histochimiques, restent sommaires ou incomplètes. Pourtant, en 1967, Matchws a rapporté la présence de glycosaminoglycannes chez les Invertébrés supérieurs. Récemment, Rahemtulla et Løtrup (1974/a et b, 1975/a, b, 1976 ; Høglund, 1976) ont entrepris une étude des glycosaminoglycannes chez des Invertébrés d'embranchements différents, en se basant sur des techniques biochimiques d'électrophorèse ou de séparation sur échangeurs d'ions. Et, ces auteurs donnent la distribution suivante :

Plathelminthes	Chondroïtine-sulfate	(Rahemtulla et Løtrup 1974/a)
Nemathelminthes	Chondroïtine-sulfate, acide hyaluronique	(idem, 1974/b)
Polychètes	Chondroïtine-sulfate acide hyaluronique	(idem, 1974/b)
Oligochètes	Kératane-sulfate	(idem, 1975/a)
Achètes	Kératane-sulfate	(idem, 1975/a)
Lamellibranches	Chondroïtine-sulfate acide hyaluronique, chondroïtine, héparine	(idem, 1975/b)
Céphalopodes	Chondroïtine-sulfate, acide hyaluronique, chondroïtine, kératane-sulfate	(Hunt, 1970)
Insectes	Chondroïtine, acide hyaluronique, chondroïtine-sulfate, peut-être kératane	(Høglund, 1976)
Crustacés	Kératane, chondroïtine, chondroïtine-sulfate, héparine	(Rahemtulla et Løtrup, 1976)

Ces résultats revêtent un grand intérêt phylogénique mais nécessitent une confirmation plus précise des caractéristiques structurales de ces composés polysaccharidiques.

Les glycoprotéines sont, avec le collagène et les polysaccharides acides, un des plus anciens composants de la trame extracellulaire des êtres pluricellulaires. Elles sont en abondance chez les Eponges et ont été signalées chez les Cnidaires (Katzman, 1972) et les Céphalopodes (Moczar et Moczar, 1976).

Si la composition en acides aminés de la partie peptidique de ces glycoprotéines semble conserver une assez forte continuité phylogénétique, la composition de la copule glucidique est moins stable ;

Le taux et la nature de ses composants sont très variables. La glucosamine, le mannose, le galactose, le fucose, sont invariablement rapportés. L'arabinose, particulier aux Spongiaires, et l'acide glucuronique, dont nous verrons plus loin le rôle dans la reconnaissance cellulaire chez les éponges, vont disparaître de la partie saccharidique des glycoprotéines de structure de Vertébrés et, au contraire, les acides sialiques vont apparaître.

Nos résultats confirment en effet l'absence probable des acides sialiques chez les Spongiaires. D'ailleurs, Warren (1963), dans une rapide recherche des acides sialiques dans le règne animal, avait noté leur absence chez les Invertébrés primitifs ; ils seraient seulement caractéristiques des Invertébrés les plus évolués. Cabezas (1973) confirme ces observations : les acides sialiques se manifestent relativement tard au cours de l'évolution.

L'aspect microfibrillaire et globulaire des glycoprotéines extraites et purifiées à partir d'une éponge présente une grande analogie ultrastructurale avec les microfibrilles isolées de la paroi artérielle et assimilées aux glycoprotéines de structure (Kadar et coll., 1973).

Les glycoprotéines de structure dans les tissus conjonctifs restent encore difficiles à visualiser par les méthodes histochimiques et la microscopie électronique. Les techniques d'immunofluorescence actuellement utilisées dans quelques recherches très ponctuelles, paraissent pleines de promesses.

Chez les Spongiaires, nous avons montré que les glycoprotéines et les polysaccharides acides ont un ou plusieurs déterminants communs spécifiques d'espèce. Ces substances ont pu être localisées par immunofluorescence indirecte et par des dérivés fluorescents de trois lectines.

Ainsi, autour des cellules, une accumulation prépondérante des glycoprotéines, et probablement des polysaccharides acides, a été mise en évidence. Ces résultats appellent plusieurs remarques :

On peut effectivement se demander où commence la matrice extracellulaire de l'éponge ; et si, les molécules que nous avons isolées et localisées essentiellement autour des cellules peuvent être considérées comme des constituants matriciels ?

De même, on peut se demander quelle correspondance existe entre ces composés, que nous avons décrits, et ceux, étroitement liés aux fibrilles de collagène, révélés par des méthodes histochimiques (Thiney et Garrone, 1970). Des fibrilles de collagène, observées *in situ* sur coupes d'éponges d'espèces différentes, présentent des aspects divers et une striation transversale souvent peu nette (Garrone, 1978/a). Cette apparence variée des fibrilles de collagène est attribuée à l'interférence des glycoconjugués révélés par des méthodes histochimiques ; après isolement *in vitro* par des méthodes biochimiques ou enzymatiques, les fibrilles de collagène de toutes les espèces présentent un aspect morphologique identique et une striation transversale comparable (voir Figure 8) (Garrone,

1978/b). Or, aucune réaction de fluorescence nette n'apparaît au niveau des fibrilles de collagène au cours de nos études. Il n'est peut-être pas exclu que les sites réactionnels des glycoconjugués, étroitement associés au collagène, soient plus ou moins masqués et deviennent difficilement accessibles aux anticorps et aux lectines.

D'ailleurs, la très forte interaction du collagène et des glycoprotéines de structure, qui a été observée dans la plupart des tissus conjonctifs de Vertébrés et qui rend difficile l'isolement de ces deux molécules (Anderson et Jackson, 1972 ; Moczar et coll., 1975 ; Shipp et Bowness, 1975), existe aussi chez les Eponges:

Nous avons en effet dû utiliser l'action dissociative du dodécylsulfate de sodium pour séparer le collagène des glycoconjugués. Par contre, en l'absence de SDS, un extrait EDTA de *Spongia officinalis* fractionné sur DEAE-cellulose dans un gradient en NaCl de concentration croissante, donne plusieurs fractions qui contiennent toutes de l'hydroxyproline en quantité notable (Figure 44) et qui soulignent de ce fait la très forte interaction du collagène et des protéines non collagène.

La concentration péricellulaire observée suggère de plus une correspondance possible entre les composés que nous avons isolés et caractérisés et les facteurs d'agrégation qui permettent la réagrégation des cellules dissociées chez les éponges.

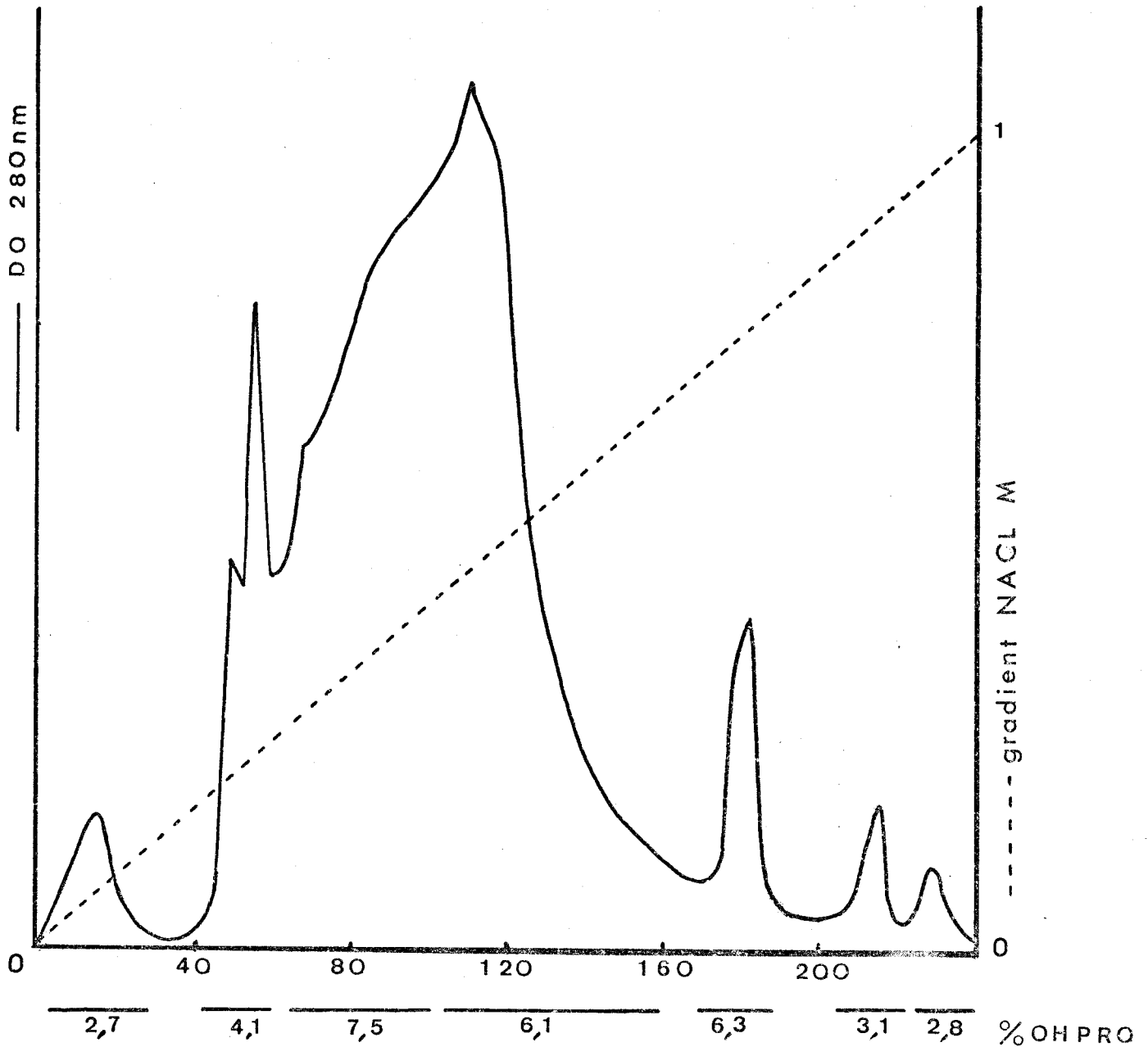


Figure 44 : Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (25 x 300 mm) d'un extrait EDTA (0,1M, pH 8,0) de *Spongia officinalis*, centrifugé à 20 000 rpm. Un gradient en NaCl de concentration croissante est effectué. Sous la barre des fractions isolées, la teneur en hydroxyproline est exprimée en % des protéines dosées dans la fraction.

En effet, dès 1907, Wilson rapporta que les suspensions de cellules d'éponges obtenues en passant des morceaux de tissu à travers un tamis, peuvent se réagréger de façon spécifique d'espèce. Humphreys (1963) et Moscona (1968/a) ont repris ces études en dissociant chimiquement les cellules des éponges en l'absence de cations divalents. Le surnageant des cellules ainsi dissociées contient des facteurs qui permettent l'agrégation cellulaire (Henkart et coll., 1973). L'EDTA entraînerait une rapide et irréversible inactivation de ces facteurs d'agrégation. La rupture et le blocage des ponts disulfure pourraient avoir la même action (Gasic et Galandi, 1966 ; Muller et coll., 1974).

Ces facteurs d'agrégation ont été définis (Henkart et coll., 1973 ; Cauldwell et coll., 1973) comme des complexes hétéropolysaccharidiques de haut poids moléculaire ; ils seraient constitués de 50 % de sucres et de 50 % de protéines. Ces composés macromoléculaires pourraient toutefois être formés de sous-unités globulaires d'environ 2,5 nm (Margoliash et coll., 1965). Mais celles-ci semblent perdre toute activité de réassociation cellulaire.

Dans nos extraits d'Eponge qui ont été traités par l'EDTA, réduits et alkylés, toute tentative d'étude d'activité biochimique comparable à celle du facteur d'agrégation est évidemment exclue.

Toutefois, de nombreuses caractéristiques semblent communes aux glycoconjugués de *Spongia officinalis*, et aux facteurs d'agrégation : propriété immunologique spécifique d'espèce, localisation autour des cellules, influence dissociative de l'EDTA, présence de ponts

disulfure, sous-unités globulaires protéiniques de faible poids moléculaire. De plus, ces constituants montrent une composition en acides aminés et en sucres tout à fait comparable et, plus particulièrement, contiennent tous de l'acide glucuronique qui peut inhiber l'agrégation cellulaire dans un système cellules isolées - facteur d'agrégation (Turner et Burger, 1973). L'acide glucuronique serait en effet impliqué dans le site de reconnaissance du facteur d'agrégation.

Chez les Eponges, la reconnaissance cellulaire représente un système relativement simple. En effet, celle-ci peut non seulement se produire à basse température mais aussi avec des cellules mortes ou fixées (Moscona, 1968/b ; Turner et Burger, 1973). Au contraire, la réagrégation des cellules embryonnaires des organismes supérieurs nécessite diverses activités dynamiques, métaboliques ou biosynthétiques, des cellules vivantes (Roth et coll. 1977).

De nombreuses études ont été faites afin de mieux comprendre l'interaction cellule-tissu au niveau extracellulaire, à la surface et à l'intérieur des cellules des mammifères.

Nous n'entrerons pas dans le détail de ces processus de régulation et de stimulation. Nous signalerons simplement que les deux composantes extracellulaires les plus étudiées, les collagènes et les protéoglycannes, jouent un rôle important dans le contrôle et la régulation des processus de développement (Koscher et Lash, 1975 ; Koscher et Church, 1975 ; Meier et Hay, 1975 ; Nevo et Dorfman, 1972 ; Strudel, 1973). Un accroissement des effets des composants

de la matrice extracellulaire peut être modulé par la membrane plasmique et ses composants (revues par Lash et Vasan, 1977 ; Hay, 1977).

Au cours de l'évolution, la matrice extracellulaire va donc s'organiser vers une plus forte spécificité de ses fonctions et une plus grande complexité des processus de régulation de ses constituants. Le collagène va se différencier en plusieurs types caractéristiques des différents tissus. Les polysaccharides acides vont être remplacés par des glycosaminoglycannes bien structurés et bien définis. Les glycoprotéines vont perdre leur acide glucuronique et acquérir les acides sialiques, en liaison probablement avec une plus grande spécificité des glycosyltransférases. L'élastine apparaîtra plus tardivement.

Les interactions entre les différentes macromolécules vont devenir plus fortes et plus finement définies. Les cellules vont acquérir une plus grande spécificité tissulaire.

CHAPITRE VI

METHODES

1 - DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTÉINES

Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry et coll.(1951). Une solution d'albumine de serum de boeuf est utilisée comme témoin.

- o -

2 - DÉTERMINATION DE L'AZOTE PAR LA MICRO-MÉTHODE KJELDAHL

Réactifs :

- Acide sulfurique concentré exempt d'azote.
- Mélange catalyseur préparé en broyant en une fine poudre 80 g de K_2SO_4 , 20 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et 0,34 g de sélénate de sodium (CHIBNALL et coll., 1942).
- Acide borique (AR), solution aqueuse à 2 %.
- Indicateur constitué d'un mélange à volumes égaux de solutions dans l'éthanol absolu de rouge de méthyle (2 %) et de bleu de méthylène (0,1 %).
- Solution acide standard HCl 0,01N.
- Solution d'hydroxyde de sodium à 40-50 %.

Minéralisation :

Un échantillon contenant 0,5 à 1 mg d'azote est placé dans une fiole à Kjeldahl de 100 ml. L'acide sulfurique concentré (2 ml) est ajouté et le mélange est chauffé jusqu'à ce qu'un début de carbonisation apparaisse. Après refroidissement, 1 g de mélange catalyseur est ajouté. Le chauffage est maintenu pendant 8 à 12 heures. Le contenu du flacon refroidi est dilué avec 20 à 30 ml d'eau distillée.

Distillation :

Elle s'effectue dans un appareil décrit par MARKHAM (1942). Le distillat est recueilli dans 10 ml d'acide borique et quelques gouttes d'indicateur. L'ammoniac retenu dans la solution d'acide borique est titré avec la solution HCl 0,01N à une coloration verte stable indiquant la neutralité. 1 ml de HCl 0,01N correspond à 0,14 mg d'azote.

- o -

3 - DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

A - CHROMATOGRAPHIE SUR UN AUTO-ANALYSEUR

Les échantillons sont hydrolysés en tubes scellés sous atmosphère d'azote par l'acide chlorhydrique 6N pendant 24 heures à 110°C. Les hydrolysats sont évaporés à sec sous vide dans un évaporateur rotatif et repris par un tampon citrate à pH 2,8.

L'analyse des collagènes a été effectuée sur un auto-analyseur TSM Technicon à deux colonnes, celle des glycoprotéines sur un auto-analyseur LKB à une seule colonne.

Les tampons de pH croissant sont à base de citrate de sodium. Le premier tampon contient 2 % d'alcool isopropylique.

Le tryptophane est déterminé sur l'auto-analyseur dans un hydrolysat obtenu dans de la baryte 4M à 110°C pendant 70 heures. Les quantités

relatives de tryptophane et de leucine sont évaluées sur les chromatogrammes. Le tryptophane est exprimé en résidu de leucine.

La cystéine est évaluée sur les chromatogrammes sous forme de carboxyméthylcystéine après réduction et alkylation. Le pic sort au début du chromatogramme devant l'hydroxyproline.

La 3-hydroxyproline sort dans nos conditions de chromatographie devant la 4-hydroxyproline et est exprimée en résidus de 4-Hydro.

B - DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'HYDROXYPROLINE

La méthode de STEGEMANN (1958) fait appel à l'oxydation par la chloramine T. Nous avons suivi une modification de cette méthode établie par WOESSNER (1961). Le dosage est effectué après hydrolyse des échantillons dans l'acide chlorhydrique 6N pendant 8 h à 110°C. Ce dosage utilise une réaction d'oxydation suivie de condensation avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde qui est spécifique de la 4-hydroxyproline : la 3-hydroxyproline ne peut donc pas être dosée dans ces conditions (SZYMANOVICZ et coll., 1978).

- o -

4 - RÉDUCTION ET CARBOXYMÉTHYLATION DES PROTÉINES

La préparation protéinique en solution contenant une solution d'EDTA (10 mM), 1 % de SDS et un tampon tris HCl 0,1M pH 8,0 est réduite par un large excès de 2-mercaptoéthanol. Le mélange est maintenu à 40°C pendant 2 heures. Le flacon est ensuite protégé de la lumière et le mélange est placé sous azote. Une solution d'iodoacétamide (légèrement moins en molarité par rapport au 2-mercaptoéthanol) fraîchement dissoute dans de la soude normale, est ajoutée lentement en agitant. Sous le contrôle d'un pH-mètre, le pH est réajusté à 8,0 avec de la soude normale. Au bout d'une demi-heure d'incubation

sous azote, la préparation est immédiatement mise en dialyse.

- o -

5 - FILTRATION SUR GEL

Le Sepharose 4B (Pharmacia) ou le Biogel P200 (BioRad) ont été utilisés pour purifier les extraits bruts de glycoprotéines suivant leur taille moléculaire ; les Biogel P30 et P10 (BioRad) pour dessaler certaines préparations, le Biogel A1,5 m (BioRad) pour estimer le poids moléculaire apparent des glycoprotéines.

Les gels sont gonflés dans l'éluant choisi contenant généralement 0,02 % d'azide de sodium et, après avoir été désaérés sous vide, sont coulés dans des colonnes de tailles appropriées à l'importance de l'échantillon à filtrer.

Le volume mort d'une colonne est déterminé avec le bleu dextran. La fin de l'élution est marquée avec la DNP-lysine.

L'absorption de l'effluent des colonnes est mesurée sur un enregistreur ISCO à 280 nm.

- o -

6 - ESTIMATION DU POIDS MOLÉCULAIRE

A - PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE DE DODECYLSULFATE

Nous avons appliqué la technique décrite par WEBER et OSBORN (1969). Deux concentrations d'acrylamide ont été utilisées (10 et 7 %) dans un tampon phosphate à pH 7,8 avec 0,1 % de SDS. Les tubes de verre pour les gels avaient 10 cm de long et un diamètre intérieur de 7 mm.

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 2 heures dans un tampon phosphate 0,01M pH 7,8 en présence de 1 % de SDS et de 1 % de 2-mercaptoéthanol. Avant de le déposer sur les gels, 1 goutte de glycérol et 1 goutte de bleu de bromophénol (0,05 % dans l'eau) sont ajoutées à la solution de protéines réduites (10 à 50 µl).

Les gels sont calibrés avec des protéines de poids moléculaires connus : l'albumine de sérum de boeuf (67.000), l'ovalbumine (45.000) le lysozyme (14.300).

L'électrophorèse est conduite dans un appareil de confection artisanale avec un courant constant de 8 mA par gel ; l'électrode positive est placée dans la chambre du bas. Dans ces conditions, la migration dure environ 4 heures.

La coloration des bandes protéïniques s'obtient en plaçant pendant 2 heures les gels sortis de leurs tubes dans une solution colorante :

Bleu de Coomassie R 250	2,5 g
Méthanol	225 ml
Acide acétique glacial	50 ml
Eau distillée	225 ml

La décoloration des gels est obtenue dans la solution suivante :

Acide acétique	100 ml
Méthanol	200 ml
Eau distillée	700 ml

B - PAR FILTRATION SUR BIOGEL A1,5 m

Gonflé dans un tampon tris HCl 0,02M pH 8,0 contenant de l'EDTA 0,02M et 0,1 % de SDS, le gel est désaéré et coulé dans une colonne de 1,5 x 130 cm. Dialysés contre le même tampon, 2 ml d'une solution de glycoprotéines alkylées (5 mg/ml) sont passés sur la colonne calibrée avec des protéines de poids moléculaires connus.

Selon la théorie de la filtration sur gel, l'équation suivante (LAURENT et KILLANDER, 1963) peut être appliquée aux substances passées sur une telle colonne :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e est le volume d'éluion de la substance

V_t est le volume total de gel dans la colonne

V_o est le volume mort de la colonne déterminé par du bleu dextran

Une ligne droite est obtenue si le log de K_{av} des substances est porté sur un graphique contre le log de leur poids moléculaire (LOCASCIO et al., 1969).

7 - HYDROLYSES DES FORMATIONS COLLAGÈNES

A - HYDROLYSES ENZYMATIQUES

- α -amylase (bactérienne Sankyo Co., Tokyo) à 20° dans tampon phosphate de sodium 0,22M, pH 5,4.
- Cellulase (90 U/mg Merck) dans les mêmes conditions.
- Chymotrypsine (Beef pancreas, Mann Research Laboratories Inc.) à 37° dans tampon tris-HCl 0,1M, pH 7,6.
- Collagénase (Worthington Biochemical Corp., 194 U/mg) 37°, tampon tris 0,1M HCl, pH 7,4.
- Elastase (Whatman 294 U/mg) à 37°, avec tampon tris 0,1M HCl, pH 7,8.
- Lysozyme (hautement purifiée) à 37° dans tampon tris-HCl 0,1M pH 7,9 et tampon phosphate 0,1M, pH 7,6.
- Papaïne (Merck) à 60° dans une solution EDTA 0,005M de cystéine 0,005M, pH 7,3.
- Pronase (B grade Calbiochem) à 50° avec un tampon tris-HCl 0,1M, pH 8,5 contenant de 1/20 v/v CaCl₂ 0,04M.
- Trypsine lyophilisée (Worthington Biochemical Corp., 200 U/mg) à 37°, tampon phosphate 0,1M à pH 7,8.

Tous ces essais de digestion enzymatique ont été exécutés dans un rapport enzyme/substrat de 1 à 2 %.

B - HYDROLYSES ACIDES ET ALCALINES

L'hydrolyse dans l'acide trichloracétique à 5 et même 10 % des

filaments et de la spongine broyés et tamisés (250 microns) et du collagène intercellulaire a été effectuée sous agitation dans un bain-marie à 90° pendant 10, 30 ou 60 minutes si nécessaire. Après centrifugation, les protéines hydrolysées ont été déterminées dans le surnageant.

L'hydrolyse des spongines dans la soude 0,2N a été effectuée à 80° pendant des temps variables. Après centrifugation, les surnageants sont neutralisés avec de l'acide acétique dilué. Les peptides et les hexoses sont déterminés respectivement par la méthode de LOWRY et la réaction à l'anthrone.

Les hydrolysats de 500 mg de spongine et de filaments dans 50 ml de soude 0,2 NaOH, sont filtrés sur une colonne de Biogel P200.

Les cinétiques des hydrolyses alcalines ont été réalisées à 37°C dans la potasse aqueuse 1M ou dans la potasse 1M dans 80 % d'éthanol. Avant d'être soumis à ces hydrolyses, les filaments et la spongine ont été réduits en poudre dans un broyeur "Culatti" et passés à travers un tamis ayant des pores de 250 microns. Ils sont ensuite mis en suspension dans les solvants à la concentration de 2 mg/ml.

- 0 -

8 - ÉTUDE DES LIAISONS COVALENTES INTRA- ET INTERMOLECULAIRES DU COLLAGÈNE

Cette étude a été effectuée sous les conseils du Dr. BAILEY dans

son laboratoire et suivant la technique décrite par BAILEY et al. (1970).

A - REDUCTION DES COLLAGENES

Les fibres ou les formations collagène d'Eponge sont suspendues dans 0,9 % NaCl tamponné à pH 7,4 avec du carbonate de sodium. Du NaB^3H_4 est dilué avec du borohydrure non radioactif à approximativement 10 mCi/m mole, puis est ajouté directement à la suspension maintenue sous agitation de façon à obtenir un rapport collagène/borohydrure de 30/1 (P/P). La réduction s'effectue à la température de la pièce pendant 1 heure. Elle est stoppée par addition d'acide acétique jusqu'à l'obtention d'un pH inférieur à 4,0. La suspension est dialysée 24 heures contre de l'eau distillée plusieurs fois renouvelée puis est lyophilisée.

B - HYDROLYSE DES COLLAGENES REDUITS

Elle s'effectue sous reflux dans du HCl 6N fraîchement redistillé et l'ébullition est maintenue pendant 24 heures. Le HCl est éliminé des hydrolysats par évaporation sous vide.

C - ISOLEMENT DES COMPOSANTS RADIOACTIFS DU COLLAGENE REDUIT ET HYDROLYSE

Les hydrolysats sont passés sur une colonne (1,2 cm x 60 cm) remplie de ZeoKarb 225 (300-400 mesh) et maintenue à 60°C. Les acides aminés

sont élués par un gradient formé par l'arrivée d'un tampon 1,0M en pyridine-acide formique à pH 5,0 dans un récipient de mélange contenant 350 ml de tampon 0,1M pyridine-acide formique à pH 2,9. Le débit de la colonne est ajusté à 40 ml/h et des fractions de 10 minutes sont recueillies dans un collecteur de fractions automatique.

D - ANALYSE DES FRACTIONS DE LA COLONNE

La radioactivité des différentes fractions obtenues est évaluée en dissolvant une fraction aliquote (0,2 ml) dans 3 ml de solution de Bray (1960) et en mesurant la radioactivité du H^3 par scintillation liquide dans un Packard 3375.

Les acides aminés sont localisés sur papier Whatmann imbibé de réactif à la ninhydrine et chauffé en étuve à 80°C pendant 30 minutes.

Le collagène de la queue de rat de type I a été pris comme témoin.

- o -

9 - DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN GLUCIDES

A - DOSAGES COLORIMÉTRIQUES

Pour tous les dosages, nous nous sommes particulièrement référés aux résultats et conseils donnés par MONTREUIL et SPIK (1963).

- a) Les oses neutres sont déterminés par la méthode à l'orcinol sulfurique ou à l'anthrone (MONTREUIL et SPIK, 1963). Les dosages sont effectués respectivement avec une solution témoin composée de galactose et mannose (1/1) ou une solution de glucose.
- b) Les hexosamines sont déterminés après une hydrolyse en tubes scellés dans HCl 4N pendant 4 heures à 100°C d'après la méthode d'ELSON et MORGAN modifiée par ANTONOPOULOS (1966).
- c) Les acides uroniques sont dosés par la méthode de BITTER et MUIR (1962) au carbazol-borate de sodium. Le dosage est effectué par rapport à une solution témoin d'acide glucuronique. Les calculs des teneurs en acides uroniques de nos échantillons ont été faits en introduisant une formule de correction (MONTREUIL et SPIK, 1963) qui tient compte de l'interférence des oses neutres dosés par la méthode à l'orcinol.

B - IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES

- A) Par chromatographie en couche mince (MOCZAR et coll, 1967) sur plaque Eastman Kodak 511V (10 x 10 cm) imprégnée de tampon phosphate 0,2M à pH 6,8.

Pour la détermination des oses neutres, les échantillons sont hydrolysés en tubes scellés dans HCl 2N pendant 2 heures à 100°C.

L'hydrolysate est évaporé sous vide dans un dessiccateur en présence de potasse et repris avec un peu d'eau distillée.

Pour la détermination des hexosamines, l'hydrolyse est effectuée dans HCl 4N pendant 4 heures à 100°C.

Le solvant utilisé pour la chromatographie des oses neutres est le mélange propanol-éthylacétate-eau (5:1:1 v/v/v) et pour les hexosamines, éthanol-25 % ammoniac-eau (85:0,5:14,5 v/v/v).

Après séchage, les plaques sont plongées dans le mélange fraîchement préparé (1:1, v/v) d'une solution éthanolique à 1 % de chlorure de triphényl-tétrazolium et d'une solution méthanolique à 1 % de soude. La couleur se développe à 90°C pendant 15 min, en atmosphère saturée d'eau. L'intensité des taches colorées est mesurée sur un densitomètre (Photovolt Corp.).

b) Par chromatographie en phase gazeuse

La détermination a été effectuée suivant la méthode de CHAMBERS et CLAMP (1971) par Madeleine LEMONNIER (Centre de Recherches sur les Protéines, Faculté de Médecine, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris). Par méthanolyse et triméthysilylation les sucres sont transformés en glucosides o-méthylés pertriméthylsilylés.

C - DETERMINATION DES ACIDES SIALIQUES (MONTREUIL et SPIK, 1968)

a) Hydrolyse des liaisons "sialyl"

- L'hydrolyse chimique est effectuée avec de l'acide sulfurique 0,1N à 80°C pendant 1 heure. L'hydrolysate refroidi est amené à pH 6 par l'addition d'eau de baryte sous contrôle d'un pH-mètre. Le précipité formé est éliminé par centrifugation et lavé avec une solution aqueuse d'acide acétique à 1 %. Afin d'ouvrir les ponts lactone qui se seraient formés au cours de l'hydrolyse acide, l'hydrolysate est amené à pH 8,9 avec une solution diluée de carbonate de sodium et laissé pendant 30 à 60 minutes à la température du laboratoire.

- L'hydrolyse enzymatique est effectuée à 37°C pendant 24 heures dans un tampon acétate de sodium 0,2M à pH 5. La neuraminidase utilisée à la concentration de 0,2 unités/mg de protéines a été purifiée par Sigma à partir de *Clostridium perfringens*.

b) Purification sur échangeurs d'ions des acides sialiques

- Préparation des résines.

La forme acide de l'échangeur de cations (Dowex 50x8) est obtenue par le passage de 500 ml d'acide chlorhydrique 3N et un lavage à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne celui de l'eau distillée (environ 6).

La forme formiate de l'échangeur d'anions (Dowex 1x2) est obtenue par le passage successif de 1 litre de soude 3N, d'eau distillée jusqu'à ce que le liquide effluent soit neutre, d'acide formique concentré (3 fois le volume de la résine), d'eau distillée jusqu'à ce que le liquide effluent atteigne un pH de 6.

- Purification de l'hydrolysat

L'hydrolysat chimique ou enzymatique est passé successivement sur une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50x8 ; 200-400 mesh ; forme acide ; 0,9 x 10 cm), puis sur une colonne d'échangeurs d'anions (Dowex 1x2 ; 200-400 mesh ; forme formiate ; 0,9 x 10 cm). Les acides sialiques sont déplacés de l'échangeur d'anions par le passage de 50 ml d'acide formique 0,3N. L'éluat est lyophilisé et le résidu sec est repris par de l'eau distillée.

c) Dosages colorimétriques

La méthode de WARREN (1959) à l'acide périodique-acide thiobarbiturique a été utilisée en prenant comme standard l'acide neuraminique.

Parallèlement les dosages d'acides sialiques ont été effectués par une autre méthode au résorcinol-chlorhydrique (SVENNERHOLM, 1957).

d) Evaluation des acides sialiques par chromatographie en couche mince

Cette évaluation a été réalisée sur plaques HPTLC gel de silice 60 dans le système solvant propanol-eau (7:3) (SCHAUER et FAILLARD, 1968). La révélation des acides sialiques est effectuée à l'aide de deux réactifs différents :

- Le réactif à l'orcinol trichloracétique (BOHM et BAUMEISTER, 1955) qui révèle les acides sialiques en brun-violet,

- Le réactif à l'acide thiobarbiturique de WARREN (1960) avec lequel les acides sialiques donnent une coloration rose.

Une mucine de glandes submaxillaires de boeuf contenant 5 % d'acide sialique et la N-acétylneuraminyl-D-lactose ont été soumises au même traitement que nos préparations d'Eponges pour contrôle.

D - DETERMINATION DES UNITES MONO- ET DISACCHARIDIQUES LIEES AU COLLAGENE

Les échantillons sont hydrolysés 24 heures à 90°C dans de la soude 2N. Après refroidissement, les hydrolysats sont neutralisés avec de l'acide acétique et soumis à une électrophorèse haut voltage (50 V/cm) dans une solution tampon à pH 6,3 (pyridine-acide acétique-eau, 25:1:225 v/v/v) d'après MOCZAR et MOCZAR (1970). Après révélation des chromatogrammes dans un tampon ninhydrine, les taches correspondant à la lysine, l'hydroxylysine, l'hydroxylysyl-galactoside et l'hydroxylysylgalactosido-glucoside sont éluées dans 1,5 ml de méthanol et leur densité optique déterminée à 500 nm.

Les teneurs des collagènes étudiés en lysine et hydroxylysine libre et glycosylée obtenues par cette méthode électrophorétique ont généralement pu être confirmées par les résultats apportés par la détermination chromatographique des acides aminés de ces collagènes. Les valeurs données par les deux méthodes ont toujours été très comparables.

10 - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR LECTINES

A - SUR ConA-SEPHAROSE

(fourni par Pharmacia Fine Chemicals).

La colonne de chromatographie (1,5 x 30 cm) est convenablement lavée avec une solution saline tris acétate (20 mM) à pH 8,0 contenant du chlorure de calcium, du chlorure de magnésium, du chlorure de manganèse (chacun à la concentration de 1 mM) et 0,001 % d'acétate de phényl-mercure. Les glycoprotéines en solution sont dialysées contre ce tampon et environ 50 mg sont chargés sur la colonne. Les glycoprotéines ne présentant pas d'affinité pour la concanavoline A ne sont pas retenues et sont éluées avec le tampon tris acétate.

L'éluion des glycoprotéines liées à la ConA est obtenue en ajoutant au tampon indifféremment 0,25M d' α -méthylglucoside ou 0,25M d' α -méthylmannoside.

Les glycoprotéines très fortement liées à la ConA sont éluées avec un tampon borate 20 mM à pH 8,0 contenant 1 mM de CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 et 0,001 % d'acétate de phénylmercure. (KENNEDY et coll, 1973)

La récupération des glycoprotéines chargées sur la colonne de ConA Sepharose est à peu près totale.

Au cours d'une seconde chromatographie sur une colonne identique, chaque fraction a été éluée en un seul pic à la même position qu'au premier passage.

B - SUR WGA-SEPHAROSE

a) Couplage de la lectine au gel

Le Sepharose 4B CNBr et la lectine de germe de blé (WGA) ont été fournis par Pharmacia. Le gel (2 g) est gonflé et lavé dans HCl 10^{-3} M. La lectine (10 mg), dissoute dans un tampon NaHCO_3 0,1M contenant NaCl 0,5M est couplé avec le Sepharose 4B activé-CNBr pendant 2 heures à la température du laboratoire. Le matériel non couplé est éliminé par lavage et les groupes restant actifs sont bloqués avec l'éthanolamine 1M à pH 8,0 pendant 2 heures. Pour éliminer la WGA non absorbée par covalence, trois cycles de lavage sont effectués, chaque cycle consistant en un lavage à pH 4 (tampon acétate 0,1M contenant NaCl 1M) suivi par un lavage à pH 8 (tampon borate 0,1M contenant NaCl 1M).

b) Chromatographie sur colonne

Le WGA-Sepharose est coulé dans une colonne (1 x 17 cm) et lavé avec un tampon tris acétate 20 mM pH 8,0 contenant 0,001 % d'acétate de phénylmercure. Les fractions glycoprotéiniques sont dialysées contre ce tampon et 4 à 5 mg chargés sur la colonne. Les glycoprotéines non adsorbées sont entraînées avec le tampon tris acétate. Les glycoprotéines liées par la WGA sont éluées en ajoutant au tampon la N-acétyl-D-glucosamine 0,1M.

Comme avec la ConA, la récupération des glycoprotéines et la reproductibilité des chromatogrammes sont excellentes.

11 - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES POLYSACCHARIDES ANIONIQUES (glycosaminoglycannes des tissus de vertébrés).

A - DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PARTIE PROTEINIQUE

Le matériel en solution est dialysé contre un tampon tris-0,1M pH 8,5 contenant du CaCl_2 0,004M. La pronase est ajoutée par deux fois à un intervalle de 24 heures à la concentration de 10 μg par mg de protéines. La digestion est poursuivie pendant 48 heures à 56°C en présence de vapeurs de toluène obtenues en plongeant dans la solution un petit tube de verre contenant du toluène. La pronase est inactivée par chauffage (2 min à 100°C) et la digestion est poursuivie après avoir ajusté le pH à 7,8 en présence de trypsine (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) à 37°C pendant 36 heures. Après inactivation de l'enzyme par chauffage, la préparation est centrifugée et dialysée.



Cette étape a souvent été supprimée dans l'étude de la fraction polysaccharidique des éponges.

B - PRECIPITATION AU CHLORURE DE CETYL PYRIDINIUM (CPC)

Une solution à 1 % de CPC dans du NaCl (0,03 M) est ajoutée lentement sous agitation à la préparation dialysée. Les polysaccharides anioniques précipitent en formant des complexes avec le CPC qui sont centrifugés et dissous dans du Cl_2Mg 1,25M. Ils sont purifiés par précipitations avec de l'éthanol saturé en acétate de sodium (3 fois)

C - ELECTROPHORESE

Elle est effectuée sur des bandes d'acétate de cellulose (Cellogel SR Sebia) 2,5 x 17 cm dans un tampon acétate de zinc 0,15M pH 6,0 (90 min, 150 V) ou un tampon pyridine formate 0,1M pH 3,0 (60 min, 150 V) d'après GARDAIS et al. (1969).

Après l'électrophorèse, les bandes d'acétate de cellulose sont colorées pendant 5 minutes dans une solution de bleu d'Alcian 8.6X à 1 % dans un mélange acide acétique-eau-méthanol (1:4:5 v/v/v). La décoloration s'obtient par 3 ou 4 lavages successifs dans le même mélange acide acétique-eau-méthanol.

La transparence des bandes est acquise en les immergeant dans du méthanol pur pour les déshydrater (30 secondes), puis 60 secondes dans le mélange méthanol (87 ml) + acide acétique (12 ml) + glycérol (1 ml). Les bandes sont essorées et immédiatement chauffées à 70°C jusqu'à transparence complète.

D - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GLYCOSAMINOGLYCANNES

a) Digestion avec la chondroïtinase ABC

Les complexes glycamiques (25 à 100 µg) sont solubilisés dans 50 µl de tampon tris acétate pH 8,0 contenant 1,5 µmole d'albumine de sérum de boeuf et 0,1 unité de chondroïtinase ABC (YAMAGATA et coll., 1968) et incubés 1 heure à 37°C. Les blancs des mêmes mélanges sans enzyme sont obtenus dans les mêmes conditions d'incubation.

La réaction enzymatique est arrêtée par chauffage (1 minute à 100°C).

b) Digestion avec la hyaluronidase

La solution contenant 25 à 100 µg de complexes glycaniques est mélangée avec 50 µl d'un tampon acétate de sodium-chlorure de sodium (0,15M chacun et ajusté à pH 5,4 avec de l'acide chlorhydrique) contenant 0,07 unités d'hyaluronidase. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C et porté à l'ébullition 1 minute pour dénaturer l'enzyme.

E - SEPARATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES SUR UNE MICRO-COLONNE DE CELLULOSE (SVEJCAR et ROBERTSON, 1966)

Les complexes insolubles de glycosaminoglycannes (GAG) qui se forment sur une microcolonne de poudre de cellulose saturée en chlorure de cétyle-péridinium (CPC) sont dissociés ou dissous par des solvants spécifiques. Les GAG sortent de la colonne en fractions qui correspondent, dans l'ordre d'élution, au kératane-sulfate, hyaluronate, héparane sulfate, chondroïtine-4-sulfate, chondroïtine-6-sulfate, dermatane sulfate et héparine.

Solvants de fractionnement :

- (1) 1 % CPC
- (2) 1,75 g NaCl dissous dans 100 ml de CPC 0,05 %
- (3) 7,5 ml de MgCl₂ dilués à 100 ml avec du CPC 0,05 %
- (4) 40 ml de n-propanol, 20 ml de méthanol, 1,5 ml d'acide acétique et 0,5 g de CPC dissous dans 100 ml d'eau distillée

- (5) 18,8 ml de $MgCl_2$ 4M et 0,6 ml d'acide acétique dilué à 100 ml avec du CPC 0,05 %.
- (6) 18,8 ml de $MgCl_2$ 4M dilué à 100 ml avec du CPC 0,05 %
- (7) $MgCl_2$ 1,25M.

- o -

12 - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES PAR DIFFUSION ET ELECTROPHORESE

A - PREPARATION DE L'ANTISERUM

Les immunisations sont effectuées de la façon suivante : des lapins de 2 sexes d'un poids de l'ordre de 1,5 kg à 2 kg, de race "Himalaya", souche consanguine, sont maintenus à un régime synthétique ("Lapin entretien" des Usines d'Alimentation Rationnelle) et reçoivent de l'eau à volonté. L'antigène est administré par voie intradermique en plusieurs endroits sur le dos avec 1 mg de préparation glycoprotéinique sous forme d'émulsion avec l'adjuvant complet de Freund (v/v). Après quatre injections, une par semaine, la présence d'anticorps précipitants dans le sérum de lapin est testée par immunodiffusion en gels d'agarose 1 %. Généralement le test est positif et les lapins sont saignés à blanc.

B - DOUBLE DIFFUSION EN GEL D'AGAROSE d'après OUCHTERLONY (1967)

L'agarose est dissous à chaud à la concentration de 1 % dans un tampon barbital 0,05N à pH 8,6 (1,34 g barbital + 10,30 g de barbital Na pour 1 litre) contenant 0,2 % d'azide de sodium. La

solution chaude est répartie dans des boîtes de Pétri ou sur des plaques de verre. Après refroidissement des trous (4 mm de diamètre), régulièrement espacés, sont pratiqués dans le gel à l'aide d'une pièce métallique spéciale et 10 μ l d'antiserum ou 10 μ l d'antigène à la concentration de 5 mg/ml sont disposés dans les différents trous. Les lignes de précipitation antigène/anticorps se développent pendant 48 heures à la température du laboratoire.

Le lavage des gels s'effectue à plusieurs reprises avec une solution de NaCl (0,9 %) puis avec de l'eau distillée.

La déshydratation des gels placés sur des plaques de verre et recouverts d'une feuille de papier Whatman humide s'effectue à la température du laboratoire.

La coloration des lignes de précipitation s'obtient en plaçant pendant 10 minutes les plaques dans une solution colorante :

Bleu de Coomassie R250	5 g
Ethanol 96 %	450 ml
Acide acétique glacial	100 ml
Eau distillée	450 ml

La décoloration des gels est obtenue à l'aide de la solution suivante

Ethanol 96 %	450 ml
Acide acétique glacial	100 ml
Eau distillée	450 ml

C - IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE (d'après LAURELL, 1965)

Le principe consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel d'agarose suivie par une électrophorèse perpendiculaire à celle effectuée dans la première dimension mais dans un gel contenant des anticorps.

a) Première dimension

- L'agarose à la concentration de 1 % est solubilisé à chaud dans un tampon barbital recommandé par LAURELL (1965). La composition de ce tampon avec un pH de 8,6 et une concentration molaire de 0,075M est la suivante :

Barbital-Na	13,14 g
Barbital	2,07 g
Ca-Lactate	0,4 g
H ₂ O	1 l
NaN ₃	0,2 %

15 ml de la solution d'agarose chaude (> 50°C) sont déposés sur une plaque de verre (85 x 95 mm).

- Après gélification de l'agarose, 3 trous (4 mm de diamètre) sont faits à environ 2 cm du bord de la plaque de verre.
- 10 µl d'antigène à la concentration de 5 mg/ml sont déposés dans chaque trou.

- La plaque est placée dans un appareil à électrophorèse Multiphor LKB 247.
- L'électrophorèse est conduite à 10 V par cm pendant 90 minutes.

b) Seconde dimension :

- Les bords du gel d'agarose sont éliminés et le gel restant est divisé en trois morceaux contenant chacun un des trous de dépôt des échantillons. Chaque morceau est transféré sur une nouvelle plaque de verre.
- 12 ml d'agarose tamponné contenant 0,5 ml d'antisérum sont ajoutés sur la partie libre de la plaque
- Après solidification, les gels sont placés dans l'appareil à électrophorèse et celle-ci est développée à 2V par cm pendant 18 heures.
- Les gels sont lavés, séchés, colorés et décolorés comme nous venons de le décrire pour la méthode d'Ouchterlony.

D - IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE EN TANDEM (d'après KROLL, 1974).

Le principe basé sur l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle simultanée de deux ou trois antigènes, permet d'établir par rapport

à un antisérum, les relations d'identité qui existent entre ces antigènes.

Le mode opératoire est le même que celui qui est décrit au-dessus pour l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Simplement, un ou deux trous supplémentaires sont pratiqués dans le gel sur la ligne anodique à environ 1 cm du premier. Les différents échantillons antigéniques à comparer sont déposés dans les trous.

- o -

13 - MÉTHODE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

On réalise la réaction en deux temps :

- Dans le premier temps, on fait agir un sérum non marqué dont les anticorps se fixent sur l'antigène. On élimine l'excès de sérum.
- Dans un deuxième temps, on fait agir un conjugué fluorescent antiglobulines de l'espèce animale ayant fourni le sérum du premier temps. On élimine l'excès de conjugué.

A - COUPE ET FIXATION

Un morceau d'éponge congelée est coupé au cryostat à -20°C . Des coupes de 40 à 50 microns sont faites et fixées pendant 15 minutes dans la formaldéhyde à 4 % ainsi préparée :

4 g de paraformaldéhyde sont ajoutés à 10 ml d'eau distillée tiède. La solution est chauffée à 60-80°C en agitant constamment pendant 14 à 20 minutes. Pour éclaircir la solution, on ajoute 1 ou 2 gouttes de soude N. On obtient ainsi une solution stock de paraformaldéhyde à 40 %. Amenée à 8 %, 1 volume de cette solution est extemporanément mélangé à 1 volume de tampon cacodylate 0,4M.

B - PREPARATION DU CONJUGUE FLUORESCENT

a) Précipitation des globulines

Les globulines de l'immun-sérum de mouton anti-IgG de lapin sont précipitées à la température du laboratoire, par du sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Le précipité obtenu est purifié par deux nouvelles précipitations par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à la même concentration.

On transvase le précipité de globuline avec très peu d'eau dans un sac à dialyse. On met le boyau dans du PBS* que l'on renouvelera plusieurs fois pendant 48 heures.

Le dosage des protéines contenues dans la solution de globulines dialysées est effectué par mesure de l'adsorption à 280 nm. Une solution de γ -globulines humaines à 0,5 mg/ml est prise comme référence.

b) Combinaison globulines-isothiocyanate de tétraméthylrhodamine

Pour obtenir un conjugué renfermant 3 molécules de fluorochrome

* cf page 30

par molécule de protéine, on fait agir, sur les globulines en solution dans le PBS* à la concentration de 20 mg/ml, une quantité d'isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine égale à 1/100 de leur poids (soit 10 µg d'isothiocyanate par mg de protéine).

A la solution de globulines on ajoute un nombre de ml de HNaCO_3 M égale au nombre de mg de protéines x 0,002. On refroidit le mélange à 0°C.

L'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine étant peu soluble, on le dissout dans la diméthylformamide anhydre qui permet d'obtenir une solution contenant 5 mg d'isothiocyanate par ml. Cette solution est introduite lentement et sous agitation à la solution de globulines afin qu'il ne se forme aucun précipité.

On amène le mélange réactionnel à la température du laboratoire et on ajuste le pH à 9,25 par addition de Na_2CO_3 M.

On laisse à l'obscurité à la température du laboratoire pendant 3 à 4 heures.

c) Chromatographie du mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex G50

Le gel est gonflé dans une solution tamponnée pH 4 (PO_4 - 0,01M), coulée dans une colonne de verre (50 mm x 500 mm). Le conjugué isothiocyanate de tétraméthyl de rhodamine-globulines est purifié par passage sur cette colonne.

* cf page 30

d) Fractionnement du conjugué sur une colonne de cellulose DE 52

Les globulines marquées avec l'isothiocyanate sont fractionnées en fonction de leur degré de marquage sur une colonne de cellulose DE 52 en milieu tamponné phosphate 0,01M pH 7,4, dont la concentration en chlorure de sodium croît, par paliers, de 0,05M à 1M.

On mesure le volume de chaque effluent et on détermine sur une partie aliquote le rapport moléculaire fluorochrome/protéine.

Les globulines faiblement marquées, peu électronégatives, sont peu liées à la cellulose DE 52. Elles sont éluées par une faible concentration en NaCl. Les globulines fortement marquées, très électronégatives, sont très liées à l'échangeur d'ions. Elles ne sont que partiellement éluées par NaCl 1M.

e) Détermination du rapport fluorochrome/protéineDosage des globulines :

La densité optique de chaque conjugué est déterminée à 280 nm, soit d_o et, à 515 nm soit d'_o .

La quantité de protéines présentes dans les différents conjugués est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{globulines marquées (mg)} = \frac{d_o - (0,56 \times d'_o)}{1,4} \times n \times v$$

n = facteur de dilution de la solution du conjugué

v = volume en ml de la solution du conjugué.

Dosage du fluorochrome :

La densité de la solution est déterminée à 515 nm, soit d'_o .

Sachant que la densité optique d'une solution contenant 5 µg/ml de rhodamine combinée à des globulines est $d_o = 542$, on a :

$$\text{Rhodamine} = 5 \text{ } \mu\text{g} \times \frac{d'_o}{0,542} \times n \times v$$

n = fraction de dilution de la solution du conjugué

v = volume en ml de la solution du conjugué

Les chiffres obtenus ci-dessus pour la rhodamine et pour les globulines permettent de calculer la valeur du rapport pondéral µg/de rhodamine/mg de protéine.

Pour convertir la valeur du rapport pondéral en celle du rapport moléculaire, on multiplie le chiffre précédent par 0,36.

Nous avons obtenu deux fractions principales :

Rhod. 1 éluée par NaCl 0,2M contenant 2,8 mg/ml de globulines et 23 µg de rhodamine, ce qui donne un rapport molaire de 2,9.

Rhod. 2 éluée par NaCl 0,4M et contenant par ml 1,6 mg de globulines pour 25,8 µg de rhodamine. Le rapport molaire est 5,8.

Nous avons utilisé Rhod.1 dilué au 1/4 dans notre expérience d'immunofluorescence indirecte.

C - REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

1er temps

Le sérum anti-fraction B obtenu comme précédemment décrit, est dilué au 1/4 dans de l'eau physiologique tamponnée pH 7,2 (PBS)*

Une ou deux gouttes de sérum sont déposées sur la coupe placée sur une lame.

On laisse en contact pendant 1 heure en chambre humide.

On élimine le sérum et on lave plusieurs fois avec du PBS.

2ème temps

On dilue le conjugué anti-immunoglobuline de lapin marqué à l'isothiocyanate de rhodamine au 1/4 avec du PBS.

On laisse en contact pendant 1 heure en chambre humide et on lave soigneusement avec du PBS.

* PBS = NaCl pour analyse	8 g
$\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
Eau distillée q.s.	1 litre

La lame est essuyée et on dépose une goutte de glycérine tamponnée pH 7,6 sur la coupe et on couvre d'une lamelle. On examine au microscope.

Parallèlement à la réaction antigène-anticorps qui doit être spécifique, des réactions contrôles sont effectuées :

- avec un sérum de lapin normal
- avec l'antisérum anti-fraction B absorbé sur son antigène.

- o -

14 - MISE EN ÉVIDENCE SUR COUPE DE TISSU DE L'AFFINITÉ DES GLYCOPROTÉINES POUR LES LECTINES

La préparation et la fixation des coupes des éponges sont celles que nous avons employées pour l'immunofluorescence indirecte.

Le tampon de lavage est modifié afin de nous replacer dans des conditions comparables à celles que nous avons utilisées dans la chromatographie d'affinité pour les lectines des glycoprotéines d'éponges isolées et purifiées. Nous avons donc fait les lavages et les dilutions dans un tampon (TBS) 0,02M tris, HCl pH 7,8 contenant 0,9 % de NaCl, et du CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , chacun à la concentration de 1 mM.

Les coupes d'éponges sont incubées pendant 1 heure en chambre humide à la température du laboratoire avec trois lectines différentes : la Concanavaline A marquée à l'isothiocyanate de rhodamine

la PHA E-LS marquée à l'isothiocyanate de fluoresceine et la WGA marquée à l'isothiocyanate de rhodamine. Ces trois lectines marquées ont été fournies par Pharmacia Fine Chemicals.

Après lavage, les lames sont essuyées et une ou deux gouttes de glycérine tamponnée sont déposées sur les coupes qui sont recouvertes d'une lamelle.

On examine au microscope

- o -

15 - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Les études ont été effectuées par Robert GARRONE (Laboratoire d'Histologie, Université Claude Bernard, 43 Bd du 11 novembre 1918, Villeurbanne).

La fixation des échantillons est effectuée à 4°C avec 2 % de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,1M). Après post-fixation dans du tétroxyde d'osmium à 1 % et déshydratation dans des alcools éthyliques de titre croissant, l'inclusion est pratiquée dans le mélange Epon. Les coupes effectuées sur ultramicrotome ont été contrastées successivement par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

- o -

16 - DOSAGE DU SULFATE

L'estimation est effectuée avec du rhodizonate de sodium qui forme un composé coloré avec l'ion Ba^{++} . Lorsque du sulfate organique est présent dans la réaction, il se forme du $BaSO_4$ et l'intensité de la couleur diminue : la quantité de sulfate est calculée à partir de cette réduction.

Les dosages ont été faits d'après la méthode mise au point par TERIIO et HARTIALA (1974).

- o -

17 - DOSAGE DU FER

Le fer ferreux forme un complexe rouge avec la bipyridine-2,2' qui donne une coloration maximale à un pH voisin de la neutralité. Nous avons utilisé la formation de ce complexe pour effectuer à pH 7,0 le dosage du fer ferreux et du fer total après réduction du fer ferrique en présence de perhydrol (MOSS et MELLON, 1942).

- o -

18 - DOSAGE DES CENDRES

La teneur en cendres a été pratiquée dans un creuset en platine chauffé au rouge sombre sur un bec Mecker. Les échantillons ont été auparavant déshydratés jusqu'à point constant dans un dessiccateur contenant du P_2O_5 .

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN A.K., NEUBERGER A., et SHARON N., 1973. - The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, 131, 155.
- ANDERSON J.M., 1954. - Studies on the cardiac stomach of the Starfish *arterias FORBESI*. *Biol. Bull.*, 107, 157.
- ANDERSON J.C., 1976. - Glycoproteins of the connective tissue matrix. *Int. Res. Connect. Tissue Res.*, 7, 251.
- ANDERSON J.C., et JACKSON D.S., 1972. - The isolation of glycoprotein from bovine achilles tendon and their interaction with collagen. *Biochem. J.*, 127, 179.
- ANTONOPOULOS C.A., 1966. - Separation of glucosamine and galactosamine on the microgram scale and their quantitative determination. *Arkiv för Kemi.*, 25, 243.
- ARNON R., 1970. - The cysteine proteases : Papain. dans : "Methods in Enzymology"., PERLMAN G.E. et LORAND L., Ed., vol. XIX, p.244., Academic Press, New York.
- BAILEY A.J., 1968. - Intermediate labile intermolecular crosslinks in collagen fibers. *Biochem. Biophys. Acta.*, 160, 447.
- BAILEY A.J., 1971. - Comparative studies on the nature on the cross-link stabilizing the collagen fibers of invertebrates, cyclostomes and elasmobranchs., *FEBS Lett.*, 18, 154.
- BAILEY A.J. et PEACH C.M., 1968. - Isolation and structural identification of a labile intermolecular crosslink in collagen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33, 812.
- BAILEY A.J., PEACH C.M. et FOWLER L.J., 1970. - Chemistry of the collagen crosslinks. Isolation and characterization of two intermediate intermolecular crosslinks in collagen., *Biochem. J.*, 117, 819.
- BAKER J. et CATERSON B., 1977. - The purification and cyanogen bromide cleavage of the "link proteins" from cartilage proteoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 1.

- BAKER J.R. et CATERSON B., 1978. - The isolation of "link proteins" from bovine nasal cartilage. *Biochim. et Biophys. Acta*, 532, 249.
- BARNES M.J., CONSTABLE B.J., MORTON L.F. et ROYCE P.M., 1974. - Age related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen. *Biochem. J.*, 139, 461.
- BARNES M.J. et PARTRIDGE S.M., 1968. - The isolation and characterisation of glycoprotein from human thoracic aorta. *Biochem J.*, 109, 883.
- BARRETT A.J., 1970. - CATHEPSIN D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver., *Biochem. J.*, 117, 601.
- BENYA P., BERGER K., GOLDITCH M., et SCHNEIR M., 1973. - Recommendations concerning the use of Bacterial Collagenase for isolating collagen-associated molecules from tissues. *Anal. Biochem.*, 53, 313.
- BERG R.A. et PROCKOP D.J., 1973 a. - The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple helix of collagen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 115.
- BERG R.A. et PROCKOP D.J., 1973 b. - Affinity column purification of procollagen proline hydroxylase from chick embryos and further characterization of the enzyme., *J. Biol. Chem.*, 248, 1175.
- BERTRAND J.C. et VACELET J., 1971. - L'association entre Eponges Cornées et Bactéries., *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 273, 638.
- BHATNAGAR R.S. et LIU T.Z., 1973. - Mechanism of hydroxylation of proline. Abstracts of the Ninth International Congress of Biochemistry., Stockholm, Juillet 1-7 1973, p. 335.
- BITTER T. et MUIR H., 1962. - A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4, 330.
- BOCQUET J., PUJOL J.P., ROLLAND M., BOUILLON J. et COPPOIS G., 1972. - Absence de mucopolysaccharides acides dans la mésoglyce de *Rhizostoma pulmo* (Scyphoméduse). *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*. 274, 101.
- BOENISCH T. et ALPER C.A., 1970 a. - Isolation and properties of a glycine rich γ -glycoprotein of human serum. *Biochim. Biophys. Acta.*, 214. 135.

- BOENISCH T. et ALPER C.A., 1970 b. - Isolation and properties of a glycine-rich β -glycoprotein of human serum., *Biochim. Biophys. Acta.* 221, 529.
- BOHM P. et BAUMEISTER L., 1955. - Ueber die Isolierung der Methoxyneuraminsäure als Spaltprodukt des Serumeiweisses., *Hoppe-Seyl. Z.*, 300, 153.
- BONNET F., PERIN J.P., et JOLLES P., 1978. - Isolation and chemical characterization of two distinct "Link Proteins" from bovine nasal cartilage, proteoglycan complex. *Biochim. Biophys. Acta.*, 532, 242.
- BORNSTEIN P., 1967. - Comparative sequence studies of rat skin and tendon collagen. I. Evidence for incomplete hydroxylation of individual prolyl residues in the normal proteins. *Biochemistry.*, 6, 3082.
- BORNSTEIN P. et KANG A.H., 1970. - Comparative biochemical studies of collagen, dans : "Chemistry and Molecular Biology of the Inter-cellular Matrix", (E.A. BALAZS, Ed.), Vol. I., p.99, Academic Press, New York.
- BRAY G.A., 1960. - A simple efficient liquid scintillation method for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Analyt. Biochem.* 1, 279.
- BRIEN P., LEVI C., SARA M., TUZET O. et VACELET J., 1973. - Spongiaires. dans: "Traité de Zoologie", P.P. GRASSE Ed., 3, p. 716, Masson, Paris.
- BROWN R.A., SHUTTLEWORTH C.A., et WEISS J.B., 1978. - Three new α -chains of collagen from a non-basement membrane source. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 80 n°4, 866.
- BUCK C.A., FUHRER J.P., SOSLAU G. et WARREN L., 1974. - Membrane glycopeptides from subcellular fractions control and virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 249, 1541.
- BURGESON R.E., EL ADLI F.A., KAITILA I.J. et HOLLISTER D.W., 1976. - Fetal membrane collagens : identification of two new collagen alpha chains. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 73, 2579.
- BUTLER W.T. et CUNNINGHAM L.W., 1966. - Evidence for a linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropocollagen., *J. Biol. Chem.*, 241, 3882.
- BYERS P.H., CLICK E.M., HARPER E. et BORNSTEIN P., 1975. - Interchain disulfide bonds in procollagen are located in a large nontriple-helical COOH-terminal domain., *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 72, 3009.

- BYERS P.H., MCKENNEY K.H., LICHTENSTEIN J.R. et MARTIN G.R., 1974. - Preparation of type III procollagen and collagen from rat skin. *Biochemistry, U.S.A.*, 13 n° 25, 5243.
- CABEZAS J.A., 1973. - The type of naturally occurring sialic acids., *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 307.
- CARNES W.H., 1968. - Copper and connective tissue metabolism. *International Review of Connective Tissue Research*, 4, 197.
- CAULDWELL C., HENKART P., et HUMPHREYS T., 1973. - Physical properties of sponge aggregation factor : a unique proteoglycan complex. *Biochemistry*, 12, 3051.
- CHAMBERS R.E. et CLAMP J.R., 1971. - An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem. J.*, 125, 1009.
- CHANDRARAJAN J. et KLEIN L., 1975. - Purification of an acidic structural protein from rat skin using Triton X-100. *Preparative Biochem.*, 5, 385.
- CHIBNALL A.C., REES M.W. et WILLIAMS E.F., 1943. - The total nitrogen content of egg albumin and other proteins., *Biochem. J.*, 37, 354.
- CHRISTNER J.E., BROWN M.L., et DZIEWIATKOWSKI D.D., 1977. - Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. The role of the hyaluronic acid carboxyl groups., *Biochem. J.*, 167, 711.
- CHUNG E. et MILLER E.J., 1974. - Collagen polymorphism : characterization of molecules with the chain composition $[\alpha_1(\text{III})]_3$ in human tissues. *Science*, 183, 1200.
- CHUNG E., RHODES R.K. et MILLER E.J., 1976. - Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 1176.
- CHURCH R.L., TANZER M.L. et PFEIFFER S.E., 1973. - Collagen end procollagen production by a clonal line of Schwann cells., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 1943.
- CINTRON C., 1974. - Hydroxylysine glycosides in the collagen of normal and scarred rabbit corneas., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 288.

- CLARK C.C., et KEFALIDES N.A., 1978. - Localization and partial composition of the oligosaccharide units on the propeptide extensions of type I procollagen., J. Biol. Chem., 253, 47.
- CUMMINS C.S. et HARRIS H., 1958. - Studies on the cell-wall composition and taxonomy of actinomycetales and related groups., J. Gen. Microbiol., 18, 173.
- CUNNINGHAM L.W. et FORD J.D., 1968. - A comparison of glycopeptides derived from soluble and insoluble collagen., J. Biol. Chem., 243, 2390.
- DAVIES D.A.L., 1955. - The specific polysaccharides of some Gram-negative Bacteria., Biochem. J., 59, 696.
- DAVIDSON J.M., McENEANY L.S.G. et BORNSTEIN P., 1975. - Intermediates in the limited proteolytic conversion of procollagen to collagen. Biochemistry, 14, 5188.
- DAVIDSON M., McENEANY L. et BORNSTEIN P., 1977. - Intermediates in the conversion of procollagen to collagen. Evidence for stepwise limited proteolysis of the COOH-terminal peptide extensions. Eur. J. Biochem., 81, 349.
- DEHM P. et PROCKOP D.J., 1971. - Synthesis and extrusion of collagen by freshly-isolated cells from chick embryo tendon., Biochim. Biophys. Acta, 240, 358.
- DISCHE Z. et MURTY V.L.N., 1973. - Preparation and purification of a structural sialofucoglycoprotein from the bovin lens capsule., Exp. Eye Res., 16, 151.
- EASTOE J.E., 1968. - Composition of collagen and allied proteins. dans : "Treatise on collagen", G.N. Ramachandran Ed., vol.1., p.1, Acad. Press, London.
- ENGVALL E. et RUOSLAHTI E., 1977. - Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen., Int. J. Cancer, 20, 1.
- EPSTEIN E.H. Jr., 1974. - $[\alpha_1(\text{III})]_3$ human skin collagen, J. Biol. Chem., 249, 3225.
- EPSTEIN E.H., SCOTT R.D., MILLER E.J. et PIEZ K.A., 1971. - Isolation and characterization of the peptides derived from soluble human and Baboon skin collagen after cyanogen bromide cleavage., J; Biol. Chem., 246, 1718.

- EYRE D.R. et GLIMCHER M.J., 1971. - Comparative biochemistry of collagen cross-links : reducible bonds in invertebrate collagens., *Biochim. Biophys. Acta*, 243, 525.
- FESSLER L.I., MORRIS N.P. et FESSLER J.H., 1975. - Procollagen : biological scission of amino and carboxyl extension peptides., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72, 4905.
- FINDLAY J.B.C., 1974. - The receptor proteins for concanavalin A and *Lens culinaris* phytohemagglutinin in the membrane of the human erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, 249, 4398.
- FITCH S.M., et HARKNESS M.L.R., 1955. - Extraction of collagen from tissues., *Nature*, 176, 163.
- FITTON JACKSON S., 1968. - The Morphogenesis of collagen, dans : "Treatise on collagen" (RAMACHADRAN G.N. Ed.), vol. 2B, pp. 1, Academic Press, London.
- FRANCIS G. et THOMAS J., 1975. - Isolation and characterization of acidic structural glycoproteins in pulmonary tissues., *Biochem.J.*, 145, 299.
- FUJIMOTO D., 1968. - Isolation of collagens of high hydroxyproline, hydroxylysine and carbohydrate content from muscle layer of *Ascaris lumbricoides* and pig kidney., *Biochim. Biophys. Acta.*, 168, 537.
- FUJIMOTO D. et ITSOKA K., 1972. - Isolation of noncollagen protein associated with collagen from the muscle layer of *Ascaris lumbricoides*. *J. Biochem.*, 71, 1089.
- FUJIMOTO D. et PROCKOP D.J., 1969. - Protocollagen proline hydroxylase from *Ascaris lumbricoides*., *J. Biol. Chem.*, 244, 205.
- FUJIMOTO D., IKEUCHI T. et NOZAWA S., 1969. - Intermolecular disulfide cross-linkages in the collagen from the muscle layer of *Ascaris lumbricoides*., *Biochim. Biophys. Acta*, 188, 295.
- FURTHMAYR H., TIMPL R., STARK M., LAPIERE C.M. et KUHN K., 1972. - Chemical properties of the peptide extension in the pro- α 1 chain of dermatosparactic skin procollagen., *FEBS Letters*, 28, 247.
- GAHMBERG C.G. et HAKOMORI S., 1973. - Altered growth behaviour of malignant cells associated with changes in externally labelled glycoprotein and glycolipid. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)*, 70, 3329.

- GARDAIS A., PICARD J. et TARASSE C., 1969. - Micro-fractionnement et micro-dosage des glycosaminoglycans par électrophorèse sur bandes d'acétate gélatinisées., J. Chromat., 42, 396.
- GARRONNE R., 1969. - Collagène, Spongine et squelette minéral chez l'éponge *Haliclona rosea* (O.S.) Démosponge Haploscléride. J. Microscopie., 8, 581.
- GARRONNE R., 1978 a. - Phylogenesis of connective tissue. Morphological aspects and biosynthesis of sponge intercellular matrix., dans : "Frontiers of Matrix Biology" (ROBERT L. Ed.), Karger-Basel.
- GARRONNE R., 1978 b. - L'ultrastructure du tissu conjonctif des éponges peut-elle être utile à la systématique, dans "La biologie des spongiaires." Coll. Int. du C.N.R.S., Sous presse.
- GARRONNE R., HUC A. et JUNQUA S., 1975. - Fine structure and physicochemical studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. J. Ultrastruct. Res., 52, 261.
- GARRONNE R. et VACELET J., 1976. - Présence d'agrégats fibrillaires de type procollagène au cours de la genèse des fibres chez une *Verongia* (Démosponge). J. Microscopie Biol. Cell., 27, 11.
- GARRONNE R., VACELET J., PAVANS DE CECCATTY M., JUNQUA S., ROBERT L. et HUC A. 1973. - Une formation collagène particulière : les filaments des éponges cornées *Ircinia*. Etude ultrastructurale, physico-chimique et biochimique. J. Microscopie, 17, 241.
- GASIC G.J. et GALANTI N.L., 1966. - Proteins and disulfide groups in the aggregation of dissociated cells of sea sponges., Science, 151, 203.
- GOTTE L., GIRO M.G., VOLPIN D. et HORNE R.W., 1974. - The ultrastructural organisation of elastin., J. Ultrastruct. Res., 46, 23.
- GRANT M.E., FREEMAN I.L., SCHOFIELD J.D. et JACKSON D.S., 1969. - Variations in the carbohydrate content of human and bovine polymeric collagens from various tissues., Biochim. Biophys. Acta, 177, 682.
- GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1976. - The biosynthesis of procollagen. dans : "Essays in Biochemistry", CAMPBELL P.N. et ALBRIDGE W.N. Ed., p. 77, Academic Press, N.Y.
- GRANT M.E., KEFALIDES N.A. et PROCKOP D.J., 1972 a. - The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens. I. Delay between the synthesis of polypeptide chains and the secretion of collagen by matrix-free cells., J. Biol. Chem., 247, 3539.

- GRANT M.E., KEFALIDES N.A. et PROCKOP D.J., 1972 b. - The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens. II. Synthesis of a precursor form by matrix-free cells and a time-dependent conversion to α -chains in intact lens. *J. Biol. Chem.*, 247, 3545.
- GRANT M.E., SCHOFIELD J.D., KEFALIDES N.A. et PROCKOP D.J., 1973. - The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens. III. Intracellular formation of the triple helix and the formation of aggregates through disulfide bonds., *J. Biol. Chem.*, 248, 7432.
- GROSCHEL-STEWART U., HERMANN U. et SCHWALM H., 1973. - "Ground-substance" resembling amyloid extracted from the cervical portion of human cervix uteri., *Br. J. Exp. Path.*, 54, 192.
- GROSS J., 1963. - Comparative biochemistry of collagen, dans : "Comparative Biochemistry (FLORKIN et MASSON), vol. 5, pp. 307. Academic Press, New York.
- GROSS J., DUMSHA B. et GLAZER N., 1958. - Comparative biochemistry of collagen. Some amino acids and carbohydrates., *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 293.
- GROSS J., SOKAL Z. et ROUGVIE M., 1956. - Structural and chemical studies on the connective tissue of marine sponges., *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 227.
- GRYDER R.M., LAMON M. et ADAMS E., 1974. - Sequence position of 3-hydroxyproline in basement membrane collagen : isolation of 3-hydroxyprolyl-4-hydroxyproline from swine kidney. *J. Biol. Chem.*, 250, 2470.
- HARDINGHAM T.E. et MUIR H., 1972. - The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans, *Biochim. Biophys. Acta*, 279, 401.
- HARDINGHAM T.E. et MUIR H., 1973. - Binding of oligosaccharides of hyaluronic acid to proteoglycans. *Biochem. J.*, 135, 905.
- HARDINGHAM T.E. et MUIR H., 1974. - Hyaluronic acid and proteoglycan aggregation. *Biochem. J.*, 139, 565.
- HARDINGHAM T.E. et MUIR H., 1975. - Structure and stability of proteoglycan aggregates. *Ann. Rheum. Dis.*, 34, 26.
- HARWOOD R., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1973. - The subcellular location of interchain disulfide bond formation during procollagen biosynthesis by embryonic chick tendon cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 1188.

- HARWOOD R., MERRY A.H., WOOLLEY D.E., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1977. - The disulphide-bonded nature of procollagen and the role of the extension peptides in the assembly of the molecule., Biochem. J., 161, 405.
- HASCALL V.C. et HEINEGARD D., 1974 a. - Aggregation of proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid., J. Biol. Chem., 249, 4232.
- HASCALL V.C. et HEINEGARD D., 1974 b. - Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction., J. Biol. Chem., 249, 4242.
- HAY E.D., 1977. - Interaction between the cell surface and extracellular matrix in corneal development., dans : "Cell and tissue interaction" LASH J.W. et BURGER M.M. Ed., p. 115, Raven Press, N.Y.
- HENCKART P., HUMPHREYS S. et HUMPHREYS T., 1973. - Characterization of sponge aggregation factor. A unique proteoglycan complex., Biochemistry., 12, 3045.
- HERRING G.M. et KENT P.W., 1963. - Some studies on mucosubstance of bovine cortical bone., Biochem. J., 89, 405.
- HÖGLUND L., 1976. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides - V. Insecta., Comp. Biochem. Physiol., 53B, 9.
- HOPWOOD J.J. et ROBINSON H.C., 1974. - The structure and composition of cartilage keratan sulphate., Biochem. J., 141, 517.
- HUC A. et DE VOS L., 1972. - La nature collagène de la coque des gemmules des Eponges d'eau douce., C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 275, 1399.
- HUMPHREYS T., 1963. - Chemical and *in vitro* reconstruction of sponge cell adhesion. I. Isolation and functional demonstration of the components involved., Dev. Biol., 8, 27.
- HUNT S., 1970. - Polysaccharide-Protein complexes in invertebrates. Academic Press, New York.
- HYNES R.O., 1973. - Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and proteolysis., Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 70, 3170.

- HYNES R., 1976. - Cell surface proteins and malignant transformation.,
Biochim. Biophys. Acta, 458, 73.
- IRREVERRE F., MORITA K., ROBERTSON A.V. et WITKOP B., 1962. - Isolation and
synthesis of 3-Hydroxy-L-proline., Biochem. Biophys. Res. Commun.,
8, 453.
- IWAI K. et ANDO T., 1967. - N → O Acyl rearrangement, dans : "Methods in
Enzymology", C.H.W. HIRS Ed., Vol.11, p. 263, Acad. Press, New York.
- JAKUS M., 1962. - Further observations on the fine structure of the cornea.,
Invest. Ophthalm., 1, 202.
- JUNQUA S., FAYOLLE J. et ROBERT L., 1975. - Structural glycoproteins from
sponge intercellular matrix., Comp. Biochem. Physiol., 50 B, 305.
- JUNQUA S., FAYOLLE J. et ROBERT L., 1975. - Isolation and characterization
of structural glycoproteins from sponges., Prot. of the Biological
Fluids, 22nd Coll., H. PEETERS Ed., Pergamon Press (Oxford).
- JUNQUA S., ROBERT L., GARRONNE R., PAVANS DE CECCATTY M. et VACELET J., 1974. -
Biochemical and morphological studies on collagens of Horny sponges,
Ircinia filaments compared to Spongines., Connective Tis. Res.,
2, 193.
- JUNQUA S. et ROBERT L., 1977. - Fractionation of sponge structural glyco-
proteins by affinity chromatography on Lectins., dans : IVth
Int. Symp. on glycoconjugates, Woods Hall (Mass., USA), sous presse.
- JUNQUA S., LEMONNIER M., GARRONNE R., et ROBERT L., 1978. - Les Glycoconjugués
de la matrice intercellulaire de *Spongia officinalis* ., dans :
"Biologie des Spongiaires", Coll. Int. du C.N.R.S., Paris, sous presse.
- JUNQUA S., LEMONNIER M., GARRONNE R. et ROBERT L., 1979. - Isolation, fractiona-
tion by affinity chromatography on Lectins and partial characteri-
zation of sponge glycoconjugates. Sous presse.
- JUVA K., PROCKOP D.J., COOPER G.W. et LASH J., 1966. - Hydroxylation of
proline and the intracellular accumulation of a polypeptide pre-
cursor of collagen., Science, 152, 92.
- KADAR A., ROBERT B. et ROBERT L., 1973. - Etude biochimique et electromicros-
copique des microfibrilles du tissu conjonctif, Pathol. Biol.,
21, 80.

- KANG A.H., FARIS B. et FRANZBLAU C., 1970. - The *in vitro* formation of intermolecular crosslinks in chick skin collagen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 175.
- KATZMAN R.L., 1972. - "Structural glycoprotein" from *Metridium dianthus* connective tissue., *Life Sci.*, 11, 131.
- KATZMAN R.L., HALFORD M.H., REINHOLD V.N. et JEANLOZ R.W., 1972. - Isolation and structure determination of glucosylgalactosylhydroxylysine from sponge and sea anemone collagen., *Biochemistry*, 11, 1161.
- KATZMAN R.L. et JEANLOZ R.W., 1969. - Acid polysaccharides from invertebrate connective tissue : phylogenetic aspects., *Science*, 166, 758.
- KATZMAN R.L. et JEANLOZ R.W., 1970 a. - The carbohydrate chemistry of invertebrate connective tissue. dans : "Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix" (BALAZS Ed.), vol. 1., pp. 217, Academic Press, London.
- KATZMAN R.L. et JEANLOZ R.W., 1970 b. - Are acidic polysaccharides involved in collagen fibril formation or stabilization ? *Biochim. Biophys. Acta*, 229, 516.
- KATZMAN R.L. et KANG A.H., 1972. - The presence of fucose, mannose and glucosamine containing heteropolysaccharide in collagen from the sea anemone *Metridium dianthus*. *J. Biol. Chem.*, 247, 5486.
- KATZMAN R.L., LISOWSKA E. et JEANLOZ R.W., 1970. - Invertebrate connective tissue. Isolation of D-arabinose from sponge acidic polysaccharide. *Biochem. J.*, 119, 17.
- KEFALIDES N.A., 1971. - Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α -chains., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 226.
- KEFALIDES N.A., 1972. - The chemistry of antigenic components isolated from glomerular basement membrane., *Connect. Tissue. Res.*, 1, 3.
- KEFALIDES N.A., 1973. - Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 6, 63.
- KELLY R.E. et RICE R.V., 1967. - Adductin : a rubber-like protein from the internal triangular Hinge ligament of PECTEN. *Science*, 155, 208.

- KENNEDY J.F. et ROSEVEAR A., 1973. - An assessment of the fractionation of carbohydrates on concanavalin A-Sepharose 4B by affinity chromatography., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2041.
- KESKI-OJA J., MOSHER D.F. et VAHERI A., 1977. - Dimeric character of fibronectin, a major cell surface-associated glycoprotein., Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 699.
- KIMURA S. et MATSUURA F., 1974. - The chain compositions of several invertebrate collagens., J. Biochem., 75, 1231.
- KIVIRIKKO K.I. et PROCKOP D.J., 1967. - Hydroxylation of proline in synthetic polypeptides with purified procollagen hydroxylase., J. Biol. Chem. 242, 4007.
- KIVIRIKKO K.I. et RISTELI L., 1976. - Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological states., Medical Biology, 54, 159.
- KLEBE R.J., 1974. - Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. Nature (Lond.), 250, 248.
- KOHN L.D., ISERSKY C., ZUPNIK J., LENAERS A., LEE G. et LAPIERE C.M., 1974. - Calf tendon procollagen peptidase : its purification and endopeptidase mode of action. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 71, 40.
- KORNFELD R. et KORNFELD S., 1970. - The structure of a Phytohaemagglutinin receptor site from human erythrocytes, J. Biol. Chem., 245, 2536.
- KORNFELD-POULLAIN N. et ROBERT L., 1968. - Effets de différents solvants organiques sur la dégradation alcaline de l'élastine., Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 759.
- KOSHER R.A. et CHURCH R.L. 1975. - Stimulation of *in vitro* somite chondrogenesis by procollagen and collagen., Nature, 258, 327.
- KOSHER R.A. et LASH J.W., 1975. - Notochordal stimulation of *in vitro* somite chondrogenesis before and after enzymatic removal of perinotochordal materials., Dev. Biol., 42, 362.
- KROLL J., 1973. - Tandem-crosses immunoelectrophoresis., Scand. J. Immunology., 2, suppl. 1, 57.
- KRUSIUS T., 1976. - A simple method for the isolation of neutral glycopeptides by affinity chromatography., FEBS Letters, 66, 86.

- LAMPORT D.T.A., 1969. - The isolation and partial characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides obtained by enzymic degradation of primary cell walls., *Biochemistry*, 8, 1155.
- LANSING A.T., ROSENTHAL T.B., ALEX M. et DEMPSEY E.W., 1952. - The structure and characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy., *Am. Rec.*, 114, 555.
- LAPIERE C.M., LENAERS A. et KOHN L.D., 1971. - Procollagen peptidase : an enzyme excising the coordination peptides of procollagen., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 68, 3054.
- LAPIERE C.M., NUSGENS B., PIERARD G. et HERMANNNS J.F., 1975. - The involvement of procollagen in spatially oriented fibrogenesis, dans : "Dynamics of connective tissues macromolecules", (BURLEIGH M. et POOLE R. Ed.), pp. 30, North Holland, Amsterdam.
- LASH J.W. et VASAN N.S. 1977. - Tissue Interactions and extracellular matrix components., dans "Cell and tissue interactions" (LASH J.W. et BURGER M.M. Ed.), pp. 101, Raven Press, New York.
- LAURELL C.B., 1965. - Antigen-antibody crossed electrophoresis., *Anal. Biochem.*, 10, 358.
- LAURENT T.C. et KILLANDER J., 1964. - A theory of gel filtration and its experimental verification., *J. of Chromatography*, 14, 317.
- LAZARUS S. et BARRETT A.J., 1974. - Neutral proteinase of rabbitt skin : an enzyme capable of degrading skin protein and inducing an inflammatory response., *Biochim. Biophys. Acta.*, 350, 1.
- LAZARUS G.S. et DINGLE J.T., 1974. - Cathepsin D of rabbit skin : an immuno-enzymatic study., *J. Invest. Dermatol.*, 62, 61.
- LEE-OWN V. et ANDERSON J.C., 1975. - The isolation of collagen-associated molecules from bovine nasal cartilage., *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 145.
- LENDENFELD R. 1889. - dans : "A monograph of the Horny Sponges". Royal Soc. London.
- LEVI C., 1965. - La microscopie électronique et l'étude des Eponges., *Atti. Sem. Studi. Biol.*, 2, 3.

- LEVI C. et LEVI P., 1965. - Populations bactériennes dans les Eponges., J. Microscopie, 4, 151.
- LEVI C. et PORTE A., 1962. - Etude au microscope électronique de l'Eponge *Oscarella lobularis* Schmidt et de sa larve amphiblastula., Cah. Biol. Mar., 3, 307.
- LICHTENSTEIN J.R., BAUER E.A. et UITTO J., 1976. - Cleavage of human fibroblast type I procollagen by mammalian collagenase : demonstration of amino- and carboxy-terminal extension peptides., Biochem. Biophys. Res. Commun., 73, 665.
- LIENER T.E. et FRIEDENSON B., 1970. - The cystein proteases : ficin. dans : "Methods in enzymology" (PERLMAN G.E. et LORAND L. Ed.), vol. XIX, pp. 261., Academic Press, New York.
- Lloyd K.O., 1970. - The preparation of two insoluble forms of the phytohemagglutinin concanavalin A, and their interactions with polysaccharides and glycoproteins., Arch. Biochem. Biophys., 137, 460.
- LOCASCIO G., TIGIER H. et DEL C. BATTLE A., 1969. - Estimation of molecular weights of proteins by agarose gel filtration., J. Chromatography., 40, 453.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. - Protein measurement with the folin phenol reagent., J. Biol. Chem., 193, 265.
- MACLENNAN A.P., 1970. - Polysaccharides from sponges and their possible significance in cellular aggregation., Symp. Zool. Soc. Lond., 25, 299.
- MACLENNAN A.P., 1974. - The chemical bases of taxon-specific cellular reaggregation and "self"- "not-self" recognition in sponges., Arch. Biol. (Bruxelles), 85, 53.
- MAISEL H. et PERRY M.M., 1972. - Electron microscope observation on some structural proteins of the chick lens., Exp. Eye Res., 14, 7.
- MARCHALONIS J.J. et WELTMAN J.K., 1971. - Relatedness among proteins : a new method of estimation and its application to immunoglobulins. Comp. Biochem. Physiol., 38B, 609.
- MARGOLIASH E., SCHENCK J.R., HARGIE N.P., BUROKAS S., RICHTER W.R., BARLOW G.H., et MOSCONA A.A., 1965. - Characterization of specific cell aggregating materials from sponge cells., Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 383.

- MARKHAM R., 1942. - A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis., *Biochem. J.*, 36, 790.
- MARKS M.H., BEAR R.S. et BLAKE C.H., 1949. - X-ray diffraction evidence of collagen type protein fibers in the *Echinodermata*, *Coelenterata* and *Porifera*., *J. Exp. Zool.*, 111, 55.
- MATHEWS M.B., 1967. - Macromolecular evolution of connective tissue., *Biol. Rev.*, 42, 499.
- MATHEWS M.B. et CIFONELLI J.A. 1965. - Comparative biochemistry of kerato-sulfates, *J. of Biol. Chem.*, 240, 4140.
- MATHEWS M.B. et LOZAITYTE., 1958. - Sodium chondroitin sulphate protein complexes of cartilage., *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 158.
- McBRIDE O.W. et HARRINGTON W.F., 1967. - *Ascaris* cuticle collagen : on the disulfide cross-linkages and the molecular properties of the sub-units., *Biochemistry*, 6, 1484.
- MEIER S. et HAY E.D., 1975. - Control of corneal differentiation *in vitro* by extracellular matrix. Dans : "Extracellular matrix Influences on gene expression". SLAVKIN H.C. et GREULICH R.C. Ed., pp. 185, Academic Press, New York.
- MERRY A.H., HARWOOD R., WOOLLEY D.E., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1976. - Identification and partial characterization of the non-collagenous amino - and carboxyl-terminal extension peptides of cartilage procollagen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 83.
- MEYER K. et CHAFFEE E., 1941. - The mucopolysaccharides of skin., *J. Biol. Chem.*, 138, 491.
- MEYER K., HOFFMAN P. et LINKER A., 1958. - Mucopolysaccharides of costal cartilage., *Science*, 128, 896.
- MEYER K., LINKER A., DAVIDSON E.A. et WEISSMAN B., 1953. - The mucopolysaccharides of bovine cornea., *J. Biol. Chem.*, 205, 611.
- MILLER E.J., 1971. - Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical α chains., *Biochemistry*, 10, 1652.

- MILLER E.J. et LUNDE L.G., 1973. - Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the $\alpha 1(\text{II})$ chain of bovine and human cartilage collagen., *Biochemistry*, 12, 3153.
- MILLER E.J., MARTIN G.R., PIEZ K.A., et POWERS M.J., 1967. - Characterization of chick bone collagen and compositional changes associated with maturation., *J. Biol. Chem.*, 242, 5481.
- MILLER E.J. et ROBERTSON P.B., 1973. - The stability of collagen cross-links when derived from hydroxylysyl residues., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 432.
- MOCZAR M., 1968. - Mise en évidence d'une liaison aspartamidoglycosaminidique dans les glycoprotéines de structure de l'aorte., *F.E.B.S. Letters*, 1, 169.
- MOCZAR E. et MOCZAR M., 1970. - Micromethod for the determination of hydroxylysine and its glycosylated derivatives., *J. Chromatogr.*, 51, 277.
- MOCZAR E. et MOCZAR M., 1970. - Biochimie comparative des glycoprotéines de la cornée. *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 30, 121.
- MOCZAR M. et MOCZAR E., 1976. - Structural glycoprotein from squid (*Sepia officinalis*) skin., *Comp. Biochem. Physiol.*, 53B, 255.
- MOCZAR E., MOCZAR M., SCHILLINGER G., et ROBERT L., 1967. - A rapid micro-determination of neutral sugars and aminosugars in glycopeptides by thin-layer chromatography., *J. Chromatogr.*, 31, 561.
- MOCZAR M. et ROBERT L., 1970. - Extraction and fractionation of the media of thoracic aorta. Isolation and characterization of structural glycoproteins., *Atherosclerosis*, 11, 7.
- MOCZAR E., ROBERT L. et MOCZAR M., 1968. - Etudes sur les fractions glucidiques de la trame fibreuse insoluble du stroma cornéen, *Eur. J. Biochem.*, 6, 213.
- MOCZAR E., SEPULCHRE C. et MOCZAR M., 1975. - Structural glycoproteins from connective tissues. dans : "Protides of the Biological Fluids", H. PEETERS Ed., 22, 297., Pergamon Press, (Oxford/New York).
- MONTREUIL J., SPIK G., 1963. - Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux., *Monogr. Lab. Chim. Biol.*, Faculté des Sciences, Lille. 1.

- MONTREUIL J. et SPIK G., 1968. - Microdosage des glucides : Méthodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des glucides constituant les glycoprotéines (Oses neutres, Acides Sialiques, Acides Uroniques, Osamines). Monogr. Lab. Chim. Biol., Faculté des Sciences, Lille, 2.
- MORGAN P.H., JACOBS H.G., SEGREST J.P. et CUNNINGHAM L.W., 1970. - A comparative study of glycopeptides derived from selected vertebrate collagens : a possible role of the carbohydrate in fibril formation. J. Biol. Chem., 245, 5042.
- MORRISON P., EDSALL R. et MILLER S.G., 1948. - Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma., J. Am. Chem. Soc., 70, 3103.
- MOSCONA A.A., 1968 a. - Cell aggregation : properties of specific cell ligands and their role in the formation of multicellular systems., Dev. Biol., 18, 250.
- MOSCONA A.A., 1968 b. - Aggregation of sponge cells : cell-linking macromolecules and their role in the formation of multicellular systems., In Vitro, 3, 13.
- MOSESSON M.W., CHEN A.B. et HUSEBY R.M., 1975. - The cold insoluble globulin of human plasma : studies of its essential structural features. Biochem. Biophys. Acta., 386, 509.
- MOSHER D.F., 1975. - Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin stabilizing factor., J. Biol. Chem., 250, 6614.
- MOSS M.L., et MELLON M.G., 1942. - Colorimetric determination of iron with 2,2'-bipyridyl and with 2,2',2''-terpyridyl., Ind. Eng. Chem., 14, 862.
- MOSS B. et ROSENBLUM E.N., 1972. - Hydroxylapatite chromatography of protein - sodium dodecyl sulfate complexes. A new method for the separation of polypeptide subunits., J. Biol. Chem., 247, 5194.
- MUIR L.W., BORNSTEIN P. et ROSS R., 1976. - A presumptive subunit of elastic fiber microfibrils secreted by arterial smooth-muscle cells in culture., Eur. J. Biochem., 64, 105.
- MUIR H., 1977. - Structure and function of proteoglycans of cartilage and cell-matrix interactions. dans : "Cell and Tissue Interactions", LASH J.W. et BURGER M.M. Ed., pp. 87, Raven Press, New York.

- MULLER W.E.G., ARENDES J., KURELEC B., ZAHN R. et MULLER I., 1977. - Species-specific aggregation factor in Sponges: Sialyltransferase associated with aggregation factor., J. Biol. Chem., 252, 3836.
- MULLER W.E.G., MULLER I. et ZAHN R.K., 1974. - Two different aggregation principles in reaggregation process of dissociated sponge cells (*Geodia cydonium*). Experientia, 30, 899.
- MULLER W.E.G. et ZAHN R.K., 1973. - Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges., Exp. Cell Res., 80, 95.
- MYLLYLÄ R., RISTELL L. et KIVIRIKKO K.I., 1975. - Glucosylation of galactosyl-hydroxylysyl residues in collagen *in vitro* by collagen glucosyltransferase. Inhibition by triple-helical conformation of the substrate., Eur. J. Biochem., 58, 517.
- NAGATA Y. et BURGER M.M., 1974. - Wheat germ agglutinin . Molecular characteristics and specificity for sugar binding., J. Biol. Chem., 249, 3116.
- NEVO Z. et DORFMAN A., 1972. - Stimulation of chondromucoprotein synthesis in chondrocytes by extracellular chondromucoprotein., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2069.
- NORDWIG A., NOWACK H., et HIEBER-ROGALL E., 1973. - Sea anemone collagen : further evidence for the existence of only one alpha-chain type. J. Molec. Evol., 2, 175.
- NORDWIG A., ROGALL E. et HAYDUK U., 1970. - The isolation and characterization of collagen from three invertebrate tissues, dans : "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", BALAZS Ed., vol.1, pp. 27, (Acad. Press, New York).
- OGATA S., MURAMATSU T. et KOBATA A., 1975. - Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-Sepharose. J. Biochem., 78, 687.
- OLSEN B.R., GUZMAN N.A., ENGEL J., CONDIT C. et AASE S., 1977. - Purification and characterization of a peptide from the carboxy-terminal region of chick tendon procollagen type I., Biochemistry, 16, 3030.
- OUCHTERLONY O., 1967. - Immunodiffusion and immunoelectrophoresis dans : "Handbook of experimental immunology", WEIR D.M. Ed., pp. 655, (Blackwell Sci. Publi. Oxford and Edinburgh).

- PARTRIDGE S.M., 1968. - Elastin structure and biosynthesis. "Symposium on Fibrous proteins", CREWTER W.G. Ed., pp. 246, Butterworths, Aust.
- PARTRIDGE S.M., 1970. - Isolation and characterization of elastin., dans : "Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix", BALAZS E.A. Ed., vol. 1., pp. 593, Acad. Press, London.
- PEARLSTEIN E., 1976. - Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen., *Nature (Lond.)*, 262, 497.
- PETERKOFISKY B. et DIEGELMANN R., 1971. - Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins., *Biochemistry*, 10, 988.
- PHILIPSEN W.M.G.J. et BROEKHUYSE R.M., 1972. - Immunogenetic determinants in the eye related to corneal structural glycoprotein ("Keratoglycosaminoglycan")., *Ophthal. Res.*, 4, 51.
- PIEZ K.A., 1976. - Primary structure, dans "Biochemistry of collagen", RAMACHANDRAN G.N. et REDDI A.H. Ed., pp.1., Plenum Press, New York.
- PIEZ K.A., EIGNER E. et LEWIS M., 1963. - The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens., *Biochemistry*, 2, 58.
- PIEZ K.A. et GROSS J., 1959. - The amino acid composition and morphology of some invertebrate and vertebrate collagens., *Biochem. Biophys. Acta.*, 34, 24.
- PIEKKARAINEN, RANTANEN J., VASTAMAKI M., LAMPIARO K., KARI A. et KULONEN E., 1968, - On collagens of invertebrates with special reference to *Mytilus edulis*. *European J. Biochem.*, 4, 563.
- PINNELL S.R., FOX R. et KRANE S.M., 1971. - Human collagens : differences in glycosylated hydroxylysines in skin and bone., *Biochem. Biophys. Acta.*, 229, 119.
- PRIVAT J-P., DELMOTTE F. et MONSIGNY M., 1974. - Protein-sugar interactions. Association of β -(1 \rightarrow 4) linked N-Acetyl-D-Glucosamine oligomer derivatives with wheat germ agglutinin (lectin)., *FEBS Letters*, 46, 224.
- PROCKOP D.J., BERG R.A., KIVIRIKKO K.I. et UITTO J., 1976. - Intracellular steps in the biosynthesis of collagen, dans "Biochemistry of collagen" RAMACHANDRAN G.N. et REDDI A.H. Ed., pp. 163, Plenum Press, N.Y.

- RADHAKRISHNAMURTHY B., FISHKIN A.F., HUBBEL G.J. et BERENSON G.S., 1964. - Further studies of glycoproteins from a cardiovascular connective tissue., Arch. Biochem. Biophys., 104, 19.
- RAHEMTULLA F. et LOVTRUP S., 1974 a. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. I. Methods. Platyhelminthes., Comp. Biochem. Physiol. 49B, 631.
- RAHEMTULLA F. et LOVTRUP S., 1974 b. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. II. - Nematoda. Annelida, Comp. Biochem. Physiol., 49B, 639.
- RAHEMTULLA F. et LOVTRUP S., 1975 a. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides, III. - Oligochaeta and Hirudinea., Comp. Biochem. Physiol., 50B, 627.
- RAHEMTULLA F. et LOVTRUP S., 1975 b. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides, IV. - Bivalvia., Phylogenetic implications. Comp. Biochem. Physiol., 50B, 631.
- RAHEMTULLA F. et LOVTRUP S., 1976. - The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides, VI. - Crustacea., Comp. Biochem. Physiol., 53B, 15.
- RAJAMAKI A. et KULONEN E., 1971. - Purification of a structural glycoprotein from collagenase-digested experimental granuloma., Biochim. Biophys. Acta., 243, 398.
- RANDOUX A., CORNILLET-STOUPY J., DESANTI M. et BOREL J.P., 1976. - Isolement et caractérisation de deux subunités constitutives des glycoprotéines de structure du tissu sous-cutané de lapin., Biochim. Biophys. Acta, 446, 77.
- REID K.B.M., 1976. - Isolation, by partial pepsin digestion, of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement., Biochem. J., 155, 5.
- REYSS-BRION M. et SALAÜN J., 1971. - Sur la culture organotypique de cornées d'embryons de poulet., C.R. Acad. Sci. (Paris). 272, 1529.
- RISTELI J., TRYGGVASON K., et KIVIRIKKO K.I., 1977. - Prolyl 3-hydroxylase : Partial characterization of the enzyme from rat kidney cortex., Eur. J. Biochem., 73, 485.

- ROBERT L. et COMTE P. 1968. - Amino acid composition of structural glycoproteins., Life Sciences, 7, 493.
- ROBERT A.M., ROBERT B. et ROBERT L., 1970. - Chemical and physical properties of structural glycoproteins, dans : "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", BALAZS A. Ed., pp. 237, Academic Press, New York.
- ROBERT B. et ROBERT L., 1973. - Aging of connective tissues. General considerations. Dans : "Frontiers of Matrix Biology", vol.1. Aging of connective tissues. ROBERT & ROBERT Ed., p.1., Karger, Basel.
- ROBERT B., SZIGETI M., DEROUETTE J-C., ROBERT L., BOUISSOU H. et FABRE M-T., 1971. - Studies on the nature of the "microfibrillar" component of elastic fibers., Eur. J. Biochem., 21, 507.
- ROBERT L., DARREL R.W. et ROBERT B., 1970. - Immunologic properties of connective tissue glycoproteins. Dans : "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", BALAZS A. Ed., Vol.3., pp.1591. Academic Press, London.
- ROBERT L. and DISCHE Z., 1963. - Analysis of a sulfated sialoglucosamino - galactomannosidoglycane from corneal stroma., Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 209.
- ROBERT L., FAYOLLE J., DEROUETTE S. et ZABRISKIE J., 1972. - Homology of amino acid composition of structural glycoproteins, transplantation antigens, cell wall glycoproteins and Strptococcus A cell membrane. Transplant. Proc., 4, 415.
- ROBERT L., JUNQUA S. et MOCZAR M., 1976. - Structural glycoproteins of the Intercellular Matrix., Front. Matrix Biol., Vol.3, pp. 113, Karger, Basel.
- ROBERT L., et PARLEBAS J., 1965. - Biosynthèse *in vitro* des glycoprotéines de la cornée., Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1853.
- ROBERT L., REYSS-BRION M., JUNQUA S. et SALAUN J., 1969. - Composition chimique de la cornée de l'embryon de poulet et de poule adulte., C.R. Acad. Sci., Paris, 269, 491.
- ROBERT L. et ROBERT B., 1966. - Biochemical and immunochemical properties of a structural glycoprotein corneal stroma, keratoglycosamino-glycan (KGAG)., Dans : "Biochemistry of the eye", 20th Int. Cong. Ophthal., Munich. pp. 20, Karger, Basel.

- ROBERT L. et ROBERT B., 1967. - Structural glycoproteins of membranes and connective tissue : biochemical and immunopathological properties. Dans : "Protides of Biological Fluids" PEETERS H. Ed., 15, pp 143.
- ROBERT L., ROBERT M., MOCZAR M. et MOCZAR E., 1968. - Constituants macromoléculaires de la paroi artérielle. Antigénicité et rôle dans l'athérosclérose., Dans : "Role de la paroi artérielle dans l'athérogenèse", Coll. du CNRS, pp. 395.
- ROTH S., SHUR B.D. et DURR R., 1977. - A possible enzymatic basis for some cell recognition and migration phenomena in early embryogenesis., Dans : "Cell and tissue interactions", LASH J.W. et BURGER M.M. Ed., pp. 209, Raven Press, New York.
- ROSS R., et BENDITT E.P., 1965. - Wound healing and collagen formation. V. Quantitative³ electron microscope radioautographic observations of Proline H³ utilization by fibroblasts., J. Cell. Biol., 27, 83.
- ROSS R. et BORNSTEIN P., 1969. - The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components., J. Cell. Biol., 40, 366.
- RUOSLAHTI E., VAHERI A., KUUSELA P. et LINDER E., 1973. - Fibroblast surface antigen : a new serum protein., Biochem. Biophys. Acta., 322, 352.
- RUOSLAHTI E. et VAHERI A., 1974. - Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane., Nature (London), 248, 789.
- RUOSLAHTI E. et VAHERI A., 1975. - Intercation of soluble fibroblast surface (SF) antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma., J. Exp. Med., 141, 497.
- RYHANEN L., et KIVIRIKKO K.I., 1974. - Developmental changes in protocollagen lysyl hydroxylase activity in the chick embryo., Biochim. Biophys. Acta, 343, 121.
- SAGE E.H. et GRAY W.R., 1977. - Evolution of elastin structure. Dans : "Advances in experimental medicine and biology", SANDBERG L.B., GRAY W.R. et FRANZBLAU C. Ed., 79, 291, Plenum Press.
- SAKAKIBARA S., INOUE K., SKUDO K., KISHIDA Y., KOBAYASHI Y., et PROCKOP D.J., 1973. - Synthesis of (Pro-Pro-Gly)_n of defined molecular weights. Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline., Biochem. Biophys. Acta., 303, 198.

- SANDBERG L.B., 1976. - Elastin structure in health and disease., Int. Rev. Connect. Tissue Res., 7, 159.
- SARA M., 1971. - Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae)., Marine Biol., 11, 214.
- SCHUMACHER G.F.B. et SCHILL W.B., 1972. - Radial diffusion in gel for micro determination of enzymes. II. Plasminogen activator, elastase, non specific proteases., Anal. Biochem., 48, 9.
- SCHAUER R. et FAILLARD H., 1968. - Das Verhalten isomerer N,O-Diacetylneuraminsäure glykoside in submaxillarismucin von Pferd und Rind bei Einwirkung bakterieller Neuraminidase., Hoppe-Seyl. Z., 349, 961.
- SCHOFIELD J.D., FREEMAN L.L. et JACKSON D.S., 1971. - The isolation and amino acid and carbohydrate composition, of polymeric collagens prepared from various human tissues., Biochem.J., 124, 467.
- SCHOFIELD J.D., UITTO J. et PROCKOP D.J., 1974. - Formation of interchain Disulfide bonds and helical structure during biosynthesis of procollagen by embryonic tendon cells., Biochemistry, 13, 1801.
- SCHULTZ. 1967. - Cleavage at aspartic acid. dans : "Methods in enzymology", HIRS C.H.W. Ed., vol.II, pp.255, Academic Press, New York.
- SEAR C.H.J., GRANT M.E., ANDERSON J.C. et JACKSON D.S., 1975. - The incorporation of L-(1-³H) Fucose in non-collagenous glycoproteins secreted by human fibroblasts in culture., Biochem. Soc. Trans.3, 138.
- SEAR C.B.J., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1976. - Identification of a major extracellular non-collagenous glycoprotein synthesised by human skin fibroblasts in culture., Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 379.
- SEAR C.H.J., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1977. - Biosynthesis and release of glycoproteins by human skin fibroblasts in culture., Biochem.J., 168, 91.
- SEAR C.H.J., KEWLEY M.A., JONES C.J.P., GRANT M.E. et JACKSON D.S., 1978. - The identification of glycoproteins associated with elastic-tissue microfibrils., Biochem. J., 170, 715.
- SENO N., MEYER K., ANDERSON B. et HOFFMAN P., 1965. - Variations in kerato-sulfates., J. Biol. Chem., 240, 1005.

- SERAFINI-FRACASSINI A., FIELD J.M. et ARMITT C., 1975. - Characterization of the microfibrillar component of bovine ligamentum nuchae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 1146.
- SERAFINI-FRACASSINI A., FIELD M., RODGER G.W. et SPINA M., 1975. - Application of affinity chromatography to the purification of collagenase for the isolation of insoluble elastin., *Biochim. et Biophys. Acta.*, 386, 80.
- SHARON N. et LIS H., 1973. - The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins)., *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 541.
- SHIPP D.W. et BOWNESS M., 1975. - Insoluble non-collagenous cartilage glycoproteins with aggregating sub-units., *Biochim. et Biophys. Acta.*, 379, 282.
- SHORE R.E., 1972. - Axial filament of silicious sponge spicules, its organic components and synthesis., *Biol. Bull.*, 143, 689.
- SILMAN I.H. et KATCHALSKI E., 1966. - Water insoluble derivatives of enzymes, antigens and antibodies., *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 873.
- SMITH D.W., ABRAHAM P.A. et CARNES W.H., 1975. - Crosslinkage of salt-soluble elastin *in vitro*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 893.
- SMITH D.W., BROWN D.M. et CARNES W.H., 1972. - Preparation and properties of salt-soluble elastin., *J. Biol. Chem.*, 247, 2427.
- SMITH D.W., WEISSMAN N. et CARNES W.H., 1968. - Cardiovascular studies on copper-deficient swine. XII. Partial purification of a soluble protein resembling elastin., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 309.
- SO L.L. et GOLDSTEIN I.J., 1967. - Protein - carbohydrate interactions. IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide - concanavalin A interaction., *J. Biol. Chem.*, 242, 1617.
- SPIRO R.G., 1969. - Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens., *J. Biol. Chem.*, 244, 602.
- STARY Z., WARDI A.H., TURNER D.L. et ALLEN W.S., 1965. - Arabinose as a mucopolysaccharide component in human and animal brain tissue., *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 388.

- STEGEMANN H., 1958. - Mikrobestimmung von Hydroxyproline mit Chloramin T und p-Dimethylaminobenzaldehyd., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 311, 41.
- STEMBERGER A. et HÖRMANN H., 1976. - Affinity chromatography on immobilized fibrinogen and fibrin monomer, II. Behavior of cold insoluble globulin., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 357, 1003.
- STEMBERGER A. et NORDWIG A., 1974. - Invertebrate collagens : qualitative and quantitative studies on their carbohydrate moieties., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 355, 721.
- STOUPY J., VIEILLARD A., DESANTI M., BOREL J.P. et RANDOUX A., 1972. - Composition de certaines fractions de glycoprotéines de structure de l'hypoderme de lapin., C.R. Acad. Sci., Paris, 275, 2997.
- STRUDEL G., 1973. - Relationship between the chick periaxial metachromatic extracellular material and vertebral chondrogenesis., dans : "Biology of the fibroblast", KULONEN E. et PIKKARAINEN J. Ed., pp. 93, Academic Press, New York.
- SVEJCAR J. et ROBERTSON W.B., 1967. - Micro separation and determination of mammalian acidic glycosaminoglycans (mucopolysaccharides)., Anal. Biochem., 18, 333.
- SVENNERHOLM L., 1957. - Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method., Biochim. Biophys. Acta., 24, 604.
- SVENSSON S., HAMMARSTRÖM S. et KABAT E.A., 1970. - The effect of borate on polysaccharide-protein and antigen-antibody reactions and its use for the purification and fractionation of crossreacting antibodies. Immunochem., 7, 413.
- SZYMANOVICZ G., MERCIER O., RANDOUX A. et BOREL J.P., 1978. - A new method of preparation and some properties of 3-hydroxyproline., Biochimie. 60, 499.
- TANZER M.L., CHURCH R.L., YAEGER J.A., WAMPLER D.E. et PARK E.D., 1974. - Procollagen : intermediate forms containing several types of peptide chains and non-collagen peptide extensions at the NH₂ and COOH ends., Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 71, 3009.
- TANZER M.L., MECHANIC G. et GALLOP P.M., 1970. - Isolation of hydroxylysino-norleucine and its lactone from reconstituted collagen fibrils. Biochim. Biophys. Acta., 207, 548.

- TERIIO T.T. et HARTIALA K., 1971. - Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans., *Anal. Biochem.*, 41, 471.
- THINEY Y. et GARRONE R., 1970. - Association des mucopolysaccharides et des fibres de collagène dans le tissu conjonctif des Spongiaires. Dans : FAVARD, 7^e Congr. Int. Microsc. Elektron., Grenoble. Vol. 1., pp.589. SFME, Paris.
- THOMAS J., ELSDEN D.F. et PARTRIDGE S.M., 1963. - Partial structure of the two major degradation products from the crosslinkages in elastin. *Nature*, 200, 651.
- THORNHILL D.P., 1971. - Abductin-locus and spectral characteristics of a brown, fluorescent chromophore., *Biochemistry*, 13, 2644.
- TIMPL R., WICK G., FURTHMAYR H., LAPIERE C.M. et KUHN K., 1973. - Immunochemical properties of procollagen from dermatosparactic calves. *Eur. J. Biochem.*, 32, 584.
- TIMPL R., WOLFF I. et WEISER M., 1968. - A new class of structural proteins from connective tissue. *Biochim. Biophys. Acta.*, 168, 168.
- TIMPL R., WOLFF I. et WEISER M., 1969. - Acidic structural proteins of connective tissue. I. Solubilization and preliminary chemical characterization., *Biochim. Biophys. Acta*, 194, 112.
- TOLEDO O.M.S. et DIETRICH C.P., 1977. - Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals., *Biochim. Biophys. Acta*, 498, 114.
- TOWE K.M. et KUTZLER K., 1968. - Lepidocrocite iron mineralization in keratose sponge granules. *Science*, 162, 268.
- TRELSTAD R.L. et LAWLEY K.R., 1977. - Isolation and initial characterization on human basement membrane collagens., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 376.
- TRIFFIT J.T. et OWENS M., 1973. - Studies on bone matrix glycoproteins. Incorporation of 1-¹⁴C Glucosamine and plasma glycoprotein into rabbit cortical bone., *Biochem. J.*, 136, 125.
- TRYGGVASON K., RISTELI J. et KIVIRIKKO K.I., 1977. - Separation of prolyl 3-hydroxylase and 4-hydroxylase activities and the 4-hydroxyproline requirement for synthesis of 3-hydroxyproline., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 275.

- TURNER R.S. et BURGER M.M., 1973. - Involvement of a carbohydrate group in the active site for surface guided reassociation., *Nature*, 244, 509.
- TURNER R.S., WEINBAUM G., KUHNS W.J. et BURGER M.M., 1974. - The use of lectins in the analysis of sponge reaggregation., *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 85, 35.
- TUSZYNSKI G.P. et WARREN L., 1975. - Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins., *Analytical Biochem.*, 67, 55.
- UITTO J. et PROCKOP D.J., 1973. - Rate of helix formation by intracellular procollagen and protocollagen. Evidence for a role for disulfide bonds., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 904.
- UITTO J. et PROCKOP D.J., 1974. - Biosynthesis of cartilage procollagen. Influence of chain association and hydroxylation of prolyl residues on the folding of the polypeptides into the triple-helical conformation., *Biochemistry.*, 13, 4586.
- VACELET J., 1970. - Description de cellules à bactéries intranucléaires chez des Eponges *Verongia*. *J. Microscopie.*, 9, 333.
- VACELET J., 1971a.- Ultrastructure et formation des fibres de Spongine d'éponges cornées *Verongia*. *J. Microscopie.*, 10, 113.
- VACELET J., 1971 b. - Etude en microscopie électronique de l'association entre une Cyanophycée Chroococcale et une Eponge du genre *Verongia*. *J. Microscopie*, 12, 363.
- VACELET J., 1975. - Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia*. *J. Microscopie Biol. Cell.*, 23, 271.
- VAHERI A. et RUOSLAHTI E., 1974. - Disappearance of a major cell-type specific surface glycoprotein antigen (SF) after transformation of fibroblasts by Rous sarcoma virus., *Int. J. Cancer.*, 13, 579.
- VAHERI A. et RUOSLAHTI E., 1975. - Fibroblast surface antigen produced but not retained by virus-transformed human cells., *J. Exp. Med.*, 142, 530.
- VAHERI A., RUOSLAHTI E., WESTERMARK B. et PONTEN J., 1976. - A common cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts : loss in malignant cells., *J. Exp. Med.*, 143, 64.

- VAN DER EERDEN J.J.J.M. et BROEKHUYSE R.M., 1973 a. - Ocular antigens III : localization of immunogenic determinants of structural glycoproteins from lens capsule, corneal stroma and sclera in connective tissues of the eye., *Ophtal. Res.*, 5, 47.
- VAN DER EERDEN J.J.J.M. et BROEKHUYSE R.M., 1973 b. - Ocular antigens IV : a comparative study into the localization of immunogenic determinants of ocular structural glycoproteins in connective tissues of various organs., *Ophtal. Res.*, 5, 65.
- VIEILLARD A. et BOREL J.P., 1973. - La biosynthèse du collagène et sa pathologie., *Path. Biol.*, 21, 1023.
- VON DER MARK K. et BORNSTEIN P., 1973. - Characterization of the pro $\alpha 1$ chain of procollagen. Isolation of a sequence unique to the precursor chain., *J. Biol. Chem.* 248, 2285.
- VUUST J. et PIEZ K.A., 1972. - A kinetic study of collagen biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 247, 856.
- WAGH P.V. et ROBERTS B.I., 1972. - Purification and characterization of a glycoprotein from the intimal region of porcine aorta. *Biochemistry.* 11, 4222.
- WARREN L., 1959., The thiobarbituric acid assay of sialic acids., *J. Biol. Chem.* 234, 1971.
- WARREN L., 1960. - Thiobarbituric acid spray reagent for deoxy sugars and sialic acids., *Nature*, 186, 237.
- WARREN L., 1963. - The distribution of sialic acids in nature., *Comp. Biochem. Physiol.*, 10, 153.
- WEBER K. et KUTER D.J., 1971. - Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate., *J. Biol. Chem.*, 246, 4504.
- WEBER K. et OSBORN M., 1969. - The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis., *J. Biol. Chem.*, 244, 4406.
- WEIS-FOGH T., 1961. - Thermodynamic properties of Resilin, a rubberlike protein., *J. Mol. Biol.*, 3, 520.

- WERNER I. et ODIN L., 1952. - On the presence of sialic acid in certain glycoproteins and in gangliosides., *Acta Soc. Med. Upsalien.*, 57, 230.
- WILKINSON C.R., GARRONE R. et HERBAGE D., 1978. - *In vitro* digestion of insoluble sponge collagen by sponge symbiotic bacteria., Dans : 6th Coll. of the Fed. Eur. Connect. Tissue Clubs, pp. 385., (Ed. CNRS, Paris n° 287).
- WILSON H.V., 1907. - On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges., *J. Exp. Zool.*, 5, 245.
- WITKOP B., 1961. - Non enzymatic methods for the preferential and selective cleavage and modification of proteins., *Advances in Protein Chemistry*, 16, 221.
- WOESSNER J.F. Jr., 1961. - The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 440.
- WOESSNER J.F. Jr., 1973. - Purification of cathepsin D from cartilage and uterus and its action on the protein-polysaccharide complex of cartilage. *J. Biol. Chem.*, 248, 1634.
- WOLFF I., FUCHSWANS W., WEISER M., FURTHMAYR H. et TIMPL R., 1971. - Acidic structural proteins of connective tissue. Characterization of their heterogeneous nature., *Eur. J. Biochem.*, 20, 426.
- YAMAGATA T., SAITO H., HABUCHI O. et SUSUKI S., 1968. - Purification and properties of bacterial chondroitinases., *J. Biol. Chem.*, 243, 1523.
- YAMADA K.M. et WESTON J.A., 1974. - Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts., *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 71, 3492.

ooooooooo