

50376
1979
78

Numéro d'ordre : 442

50376
1979
78

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

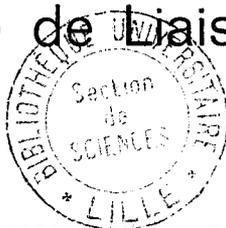
présentée à l'Université de LILLE I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

OPTION BIOCHIMIE

par

Francis LE GAILLARD

LA TRANSCORTINE HUMAINE :
Propriétés Physico-Chimiques
et Etude du Site de Liaison au Cortisol



présentée le 4 Janvier 1979 devant la Commission d'Examen

Jury : Président : M. J. MONTREUIL
Rapporteurs : M. M. DAUTREVAUX
Mlle G. SPIK
M. B. DESCOMPS
Examineurs : MM. G. BISERTE
A. CRASTES DE PAULET

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

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

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

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, L'EBERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

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

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mme MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

M^{lle} SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
M^{me} ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

*En semant les questions et en les retaillant,
on fait fructifier et foisonner le monde
en incertitudes et en querelles,
comme la terre se rend fertile
plus elle est profondément remuée.*

MONTAIGNE

(*Essais*)

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur M. DAUTREVAUX, dans le laboratoire de Biochimie Médicale (Professeur Paul BOULANGER) et le laboratoire de Biochimie Structurale (Professeur M. DAUTREVAUX) de la Faculté de Médecine de Lille. C'est avec regret que nous avons assisté, en 1977, au départ à la retraite de Monsieur le Professeur Paul BOULANGER. Sa vaste culture, son dynamisme et son sens de l'humour ont toujours provoqué mon admiration. Je suis heureux de lui exprimer mes remerciements pour l'accueil qu'il m'a toujours prodigué, et mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse. J'ai été très marqué par la clarté et le caractère attrayant de ses cours magistraux. Vous m'avez toujours accueilli avec bienveillance au cours des années de préparation à cette thèse. Veuillez trouver ici, l'expression de toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX m'a accueilli dans son laboratoire dès mes débuts dans la recherche. C'est avec lui que j'ai été formé à la biochimie des protéines, à la fois sur le plan théorique par la clarté et la rigueur de son enseignement, et sur le plan pratique par ses conseils et son intérêt permanents concernant l'évolution du travail de recherche. Vous n'avez cessé de me faire profiter de vos grandes connaissances et de votre esprit scientifique qui incite à une réflexion continue sur le but et les modalités de la recherche. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon sincère attachement.

A plusieurs reprises déjà, Mademoiselle le Professeur G. SPIK s'est trouvée parmi mes juges. Après vous avoir comptée parmi les examinateurs de mon D.E.A., je suis heureux de vous retrouver ici, en tant que Rapporteur de cette thèse qui en est le prolongement. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

C'est avec un grand plaisir que je remercie Monsieur le Professeur B. DESCOMPS d'avoir accepté la charge de Rapporteur. En tant que membre du Conseil Scientifique du L.A. - CNRS n° 268, vous aviez déjà eu l'occasion de venir de Montpellier pour juger notre travail. Vos conseils dans le domaine du marquage d'affinité ont été déterminants.

Monsieur le Professeur G. BISERTE a toujours suivi ce travail avec intérêt malgré ses nombreuses occupations. La richesse de ses connaissances, son esprit de synthèse et ses grandes qualités humaines m'ont beaucoup marqué. C'est pour moi, un grand honneur de faire partie de cette vaste équipe de biochimie dont vous coordonnez et conseillez les travaux. Veuillez trouver ici le témoignage de mon sincère attachement et de mon profond respect.

C'est avec gratitude que je remercie Monsieur le Professeur A. CRASTES DE PAULET d'avoir bien voulu venir juger cette thèse malgré sa lourde tâche de Directeur INSERM à Montpellier. Vos conseils lors du stage que j'ai effectué dans votre laboratoire puis lors du déroulement de mon travail, ont été déterminants.

Monsieur le Docteur A. RACADOT a été l'instigateur du programme de recherche sur la transcortine. Votre haute compétence en endocrinologie, votre disponibilité, ont été essentielles au démarrage de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de toute ma reconnaissance.

C'est auprès de Madame le Docteur N. RACADOT-LEROY que j'ai débuté comme attaché-assistant au laboratoire. Vos conseils et votre gentillesse m'ont souvent aidé lors des débuts difficiles. Vous m'avez appris à concilier la recherche et l'enseignement. Je suis heureux de vous exprimer toute ma reconnaissance.

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui ont contribué à ce travail : Monsieur le Docteur K.K. HAN (séquenceur automatique), Madame le Docteur M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE et Jean-Pierre AUBERT (dichroïsme circulaire), Pierre RUFFIN (ultra-centrifugation), Madame A. MORANDI (dactylographie de nombreux textes), Pascaline TOULOUSE et Françoise PECKRE (aide technique).

Que mes compagnons du labo. A (Viviane DUMUR et Jean-Marc PERINI), de l'ex-labo. A (Brigitte DEBUIRE) et des Récepteurs (Pierre FORMSTECHE et Patrick LUSTENBERGER) soient assurés de toute ma gratitude et de mon amitié.

A eux et à tous ceux qui font régner dans le laboratoire un climat de bonne humeur et de bonne entente, j'adresse mes plus vifs remerciements.

Les résultats inclus dans cette thèse ont fait l'objet
des publications et communications suivantes :

I — PUBLICATIONS

1. LE GAILLARD, F., RACADOT, A., RACADOT-LEROY, N.
et DAUTREVAUX, M. (1974)
Isolement de la Transcortine humaine par chromatographie d'affinité.
Biochimie, 56, 99-108.
2. LE GAILLARD, F., HAN, K.K. et DAUTREVAUX, M. (1975)
Caractérisation et propriétés physico-chimiques de la transcortine
humaine.
Biochimie, 57, 559-568.
3. LE GAILLARD, F., AUBERT, J.P., DAUTREVAUX, M. and
LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976)
Studies of human transcortin at different pH's : circular dichroism,
polymerization and binding affinity.
FEBS Letters, 64, 278-284.
4. LE GAILLARD, F. and DAUTREVAUX, M. (1977)
Affinity labelling of human transcortin.
Biochim. Biophys. Acta, 495, 312-323.
5. LE GAILLARD, F. and DAUTREVAUX, M. (1978)
The accessible cysteine residue of human transcortin : evidence
for oxidation of the sulphhydryl group.
FEBS Letters, 94, 63-67.

6. LE GAILLARD, F., RACADOT, A., AUBERT, J.P. and
DAUTREVAUX, M. (1978)
Evidence for essential histidine and tyrosine residues in human
transcortin.
à paraître.

II — COMMUNICATIONS

1. LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M.
Isolement de la transcortine humaine par chromatographie d'affinité.
Journées de chromatographie - Société Chimique de France, Paris -
24-25 Avril 1975.
2. LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M.
Marquage par affinité de la transcortine humaine à l'aide de 11 alpha-
bromo-acétoxyprogestérone.
Journées Biochimiques Franco-Belges, Lille, 24-26 Juin 1976.
3. LE GAILLARD, F.
Le site de liaison de la transcortine humaine : nitration d'un résidu
de tyrosine essentiel.
Forum des Jeunes - Villeneuve d'Ascq - 27-29 Juin 1978.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
<u>CHAPITRE I : REVUE GENERALE</u>	1
<u>I - INTERACTIONS PROTEINES - STEROIDES</u>	2
A/ IMPORTANCE DES INTERACTIONS PROTEINES-LIGANDS	2
B/ HISTORIQUE	3
C/ ANCIENNETE DANS LE MONDE VIVANT	4
1° Stéroïdes	
2° Protéines liant les stéroïdes	
3° Transcortine	
D/ LES PROTEINES LIANT SPECIFIQUEMENT LES STEROIDES DANS LES LIQUIDES EXTRA-CELLULAIRES CHEZ L'HOMME	6
1° Protéines du plasma sanguin	
2° Protéines "transcortin-like" dans les liquides biologiques autres que le sang	
<u>II - LA TRANSCORTINE</u>	8
A/ ROLE BIOLOGIQUE	8
1° Protection contre les enzymes du catabolisme	
2° Rôle de reconnaissance	
B/ ISOLEMENT DE LA TRANSCORTINE HUMAINE	12
1° Méthodes d'isolement classiques	
2° Méthodes d'isolement par chromatographie d'affinité	
C/ PROPRIETES GENERALES DE LA LIAISON TRANSCORTINE - STEROIDE	16
1° Caractéristiques d'une protéine liante spécifique	
2° Expression mathématique de la liaison	
3° Spécificité de la liaison transcortine humaine - stéroïde	
4° Facteurs de stabilité	

CHAPITRE II : ISOLEMENT DE LA TRASCORTINE 27

A - ISOLEMENT PAR LES METHODES CLASSIQUES 28

- 1° Relargage au sulfate d'ammonium
- 2° Chromatographie sur DEAE-cellulose
- 3° Adsorption sur hydroxyapatite en batche
- 4° Chromatographies sur hydroxyapatite en colonne

B - ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE 33

- 1° Résultats obtenus avec la méthode de ROSNER et BRADLOW
- 2° Préparation du HCAC - Sépharose
- 3° Chromatographie d'affinité
- 4° Chromatographie sur hydroxyapatite
- 5° Discussion

CHAPITRE III

CARACTERISATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 51

A - PARAMETRES PHYSIQUES DIVERS 53

- 1° Résultats
 - Constante de sédimentation
 - Volume spécifique partiel
 - Poids moléculaire
 - Coefficient d'extinction
 - Constante d'affinité
- 2° Discussion

B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EN OSES

ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX 60

- 1° Résultats
- 2° Discussion

C - POLYMERISATION	63
<hr/>	
1° Polymérisation spontanée	
2° Polymérisation provoquée	
3° Discussion	
D - STABILITE EN FONCTION DU TEMPS	68
<hr/>	
E - ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE	69
<hr/>	
Principe du dichroïsme circulaire	
1° Contribution du cortisol dans les spectres dichroïques de la transcortine	
2° Transcortine native et transcortine inactivée à 60° C	
a) Préparation des échantillons	
b) Spectre dichroïque entre 180 et 250 nm	
c) Spectre dichroïque entre 250 et 400 nm	
3° Etude en fonction du pH	
a) Activité et polymérisation	
b) Dichroïsme circulaire	
4° Conclusion	
CHAPITRE IV : ETUDE DU SITE DE LIAISON AU CORTISOL	81
<hr/>	
A - MARQUAGE D'AFFINITE	83
<hr/>	
1° Introduction	83
2° Résultats	86
a) Influence des réactifs des groupements thiol et de l'acide bromoacétique sur l'activité liante	
b) Influence d'une modification des stéroïdes au niveau des cycles A et B sur l'activité liante	
c) Marquage d'affinité avec les stéroïdes modifiés au niveau des cycles C et D	
d) Identification des acides aminés alkylés	
3° Discussion	101
a) Choix des conditions de marquage	
b) Région du site actif entourant les cycles A et B du noyau stéroïde	
c) Région du site actif entourant les cycles C et D du noyau stéroïde	

B - MARQUAGE A L'AIDE DE

REACTIFS SPECIFIQUES D'UN TYPE D'ACIDE AMINE

106

1° Cystéine	106
a) Introduction	
b) Résultats	
- Dosage des groupements thiol	
- Nature de l'agent bloquant le groupement sulfhydryl accessible	
- S-amino-éthylation du groupement sulfhydryl accessible	
c) Discussion	
2° Histidine et tyrosine essentiels	114
a) Résidu d'histidine essentiel	
- Inactivation de la transcortine par le pyrocarbonate d'éthyle	
- Confirmation de la modification de résidus His	
- Spécificité de la modification	
- Stœchiométrie de la réaction	
b) Résidu de tyrosine essentiel	
- Inactivation de la transcortine par le tétranitrométhane	
- Identification des acides aminés modifiés	
- Spécificité de la modification	
- Stœchiométrie de la réaction	
c) Discussion	

CONCLUSIONS

GENERALES

135

BIBLIOGRAPHIE

139

ABREVIATIONS UTILISEES

DCCI	: Dicyclohexylcarbodiimide
DEAE	: Diéthylaminoéthyl-
DTNB	: Acide 5-5' dithio-bis-nitrobenzoïque
DTT	: Dithiothreitol
HCAC	: Acide 11 β -hydroxy, 3-cétoandrostène, 17 β -carboxylique
PCMB	: Parachloromercuribenzoate de sodium
SDS	: Dodécylsulfate de sodium
-SH	: Groupement sulfhydryl
TNM	: Tétranitrométhane
Tris	: Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane

CHAPITRE I

REVUE GÉNÉRALE

I - INTERACTIONS PROTÉINES - STÉROÏDES

II - LA TRANSCORTINE

INTERACTIONS PROTÉINES — STÉROÏDES

A/ IMPORTANCE DES INTERACTIONS PROTÉINES — LIGANDS

Une des premières étapes de toute activité biologique spécifique nécessite une interaction entre des composés biologiquement actifs et une structure macromoléculaire complémentaire. Celle-ci peut être :

- Une protéine réceptrice spécifique localisée sur la paroi cellulaire ou à l'intérieur de la cellule (cytosol, membranes intracellulaires, mitochondries et microsomes).
- Une protéine enzymatique : le composé biologiquement actif sera susceptible d'induire un changement allostérique de conformation et la modification de l'activité enzymatique.
- Une protéine nucléaire (protéine non-histone, molécule répresseur de JACOB et MONOD) : l'interaction entraînera alors une influence positive ou négative sur l'expression d'un gène.

L'interaction des hormones ou autres composés biologiquement actifs avec des protéines-cibles est devenue un domaine du plus haut intérêt. Des études nombreuses sont ainsi consacrées aux interactions entre les hormones stéroïdes et les protéines cellulaires impliquées dans le mécanisme d'action. Cependant, ces protéines ne sont actuellement obtenues qu'en très faible quantité et sous forme partiellement purifiée. La connaissance de leurs

propriétés physico-chimiques ne peut donc être qu'approximative et se limite en général à la détermination du poids moléculaire et de la constante d'affinité pour l'hormone.

Les protéines du sérum sanguin sont d'un accès plus facile ; la sérum albumine, en particulier, est à l'origine de nos connaissances de base sur les interactions protéines—ligands. L'attention a ainsi été portée sur deux phénomènes intimement liés à la fonction des protéines sériques : celui du transport des ligands et celui de l'effet de la liaison sur l'activité biologique du ligand.

B/ HISTORIQUE

.....

La liaison entre un ligand et une protéine a sans doute été observée pour la première fois en 1903 : un anatomiste allemand, HEIDENHAIN (1), décrit la dialyse de colorants azoïques à travers une paroi en parchemin et montra que l'addition de sérum albumine inhibait cette dialyse. Il en déduisit qu'un complexe colorant—albumine s'était formé, lequel avait une taille trop importante pour dialyser. Une conséquence importante des liaisons protéine—ligand dans un organisme vivant était ainsi découverte : le ligand lié ne peut plus diffuser et sa répartition dans l'organisme doit suivre celle de la protéine transporteuse.

La nature de la liaison (adsorption physique réversible ou union chimique irréversible) a été l'objet de nombreux débats et la réversibilité de l'association protéine—ligand n'a pas été facilement admise. Le commentaire suivant (MATHEWS) (2) montre comment pouvaient parfois être ridiculisées certaines expériences, il concerne la réversibilité de l'inactivation de l'atropine par les protéines sériques (STORM VAN LEEUWEN et ZEIJDNER) (3) : " Les colloïdes, ces corps magiques, ont jeté un sort

à l'atropine ; ils l'ont transformée de telle façon que, pendant un certain temps, elle est devenue autre chose. Les auteurs expliquent le fait en l'appelant un cas d'adsorption ".

La liaison entre stéroïdes et protéines sériques a été montrée dès 1922 par LECOMTE DU NOUY (4), mais il s'agissait alors d'acides biliaires et non d'hormones. La première démonstration d'une liaison entre hormones stéroïdes et protéines sériques fut sans doute réalisée par BRUNELLI en 1935 (5) : l'œstrone ajoutée à du sérum ne dialyse pas à travers une membrane de collodion et se fixe sur une fraction précipitant à pH acide et nommée "globuline".

L'existence d'une protéine plasmatique liant spécifiquement les hormones glucocorticoïdes a été soupçonnée par DAUGHADAY, BREMER et HARNETT-COLLINS en 1956 (6) par des techniques de dialyse. Elle est démontrée en 1958 par électrophorèse à écoulement continu sur papier d'un sérum contenant de la corticostérone [^{14}C], DAUGHADAY et KOZAK (7) l'appellent "corticosteroïd binding globulin" (CBG). La même année, la présence d'une protéine ayant une affinité importante pour les hormones corticostéroïdes est montrée par SANDBERG et SLAUNWHITE (8), ils l'appellent "transcortin". La distinction entre cette protéine spécifique et la sérum albumine est confirmée par ultrafiltration (UPTON et BONDY) (9).

C/ ANCIENNETÉ DANS LE MONDE VIVANT

1°- Stéroïdes

Les stéroïdes sont universellement répandus dans le monde vivant ; ils sont, en effet, présents dans toutes les formes de vie, quel que soit le niveau phylogénétique. Les vertébrés sont tous capables de synthétiser

des hormones stéroïdes (OZON) (10), les invertébrés tels que : Arthropodes, Mollusques et Echinodermes, synthétisent des stéroïdes en C₁₈, C₁₉ et C₂₁ (LEHOUX et SANDOR) (11), (DE LONGCAMP et al.) (12), (THOMPSON et al.) (13). Des hormones stéroïdes en C₂₇ (Ecdysones) sont synthétisées par les Arthropodes (KARLSON et al.) (14). Les plantes synthétisent et métabolisent à la fois des stéroïdes type vertébrés et des stéroïdes spécifiques (SANDOR et al.) (15). Même les procaryotes possèdent leurs stéroïdes, et certaines espèces comme les Schizophytes peuvent métaboliser les stéroïdes type vertébrés (BLOUGH et TIFFANY) (16). Enfin on a retrouvé des traces de stéranes biogènes vieux de plus de deux milliards d'années (BURLINGAME et al.) (17).

2°- Protéines liant les stéroïdes

Des protéinoïdes ont été préparés dans des conditions prébiotiques simulées (SANDOR et SONEA) (18). L'un de ces protéinoïdes, riche en acides aspartique et glutamique, s'est montré capable de lier les stéroïdes ; il a, en particulier, un nombre fini de sites de liaison. Ces auteurs émettent l'hypothèse que les stéroïdes, par association avec un protéinoïde, auraient formé un complexe macromoléculaire informationnel servant de gène primitif dans la protocellule sans acides nucléiques. Une fois le code génétique apparu, les complexes stéroïde—protéine auraient évolué vers la fonction de régulateurs génétiques puis vers le système d'information—transmission connu actuellement.

3°- Transcortine

La présence de transcortine a été montrée chez plus de 130 espèces de vertébrés. Son activité (exprimée en μ g de cortisol lié à 4° C pour 100 ml de sérum) varie dans des proportions très importantes : 0,5 pour la lamproie à 110 pour l'iguane vert, en passant par 10 pour le cheval, 22 pour l'homme, etc ... Ces variations se retrouvent à l'intérieur même d'une classe zoologique puisque, par exemple, la capacité de liaison est de 1 chez

le pélican et 19 chez le pigeon, ou bien 3 chez la baleine et 92 chez l'écureuil (SEAL et DOE) (19).

Ces variations importantes de la capacité de liaison au cortisol reflètent vraisemblablement des concentrations différentes en transcortine. Celle-ci ou une protéine voisine semble donc présente chez toutes les espèces animales, quelle que soit l'ancienneté de la classe zoologique.

D/ LES PROTÉINES LIANT SPÉCIFIQUEMENT LES STÉROÏDES

DANS LES LIQUIDES EXTRA-CELLULAIRES CHEZ L'HOMME

Il est classiquement admis que, chez les mammifères, deux protéines se relaient pour transporter l'hormone stéroïde :

- Une protéine extra-cellulaire, dont le rôle sera détaillé dans le chapitre suivant, consacré à la transcortine.
- Une protéine intra-cellulaire (ou récepteur spécifique) présente uniquement dans les cellules où s'exerce l'action hormonale (cellules-cibles). Ce récepteur intra-cellulaire capte l'hormone dès qu'elle franchit la membrane plasmique et, après une modification structurale mal définie, appelée "activation", l'emmène dans le noyau. Un site spécifique de la chromatine (protéine non-histone) accueille alors le complexe hormone-récepteur et permet l'expression hormonale au niveau du DNA voisin (voir les revues générales de ROUSSEAU (20), O'MALLEY et SCHRADER (21), AGARWALL (22)).

1°- Protéines du plasma sanguin

Trois protéines liantes spécifiques (transcortine, SBP et ABG) sont connues dans le plasma sanguin de l'homme : la transcortine lie spécifiquement les hormones glucocorticoïdes et la progestérone, la SBP ("sex steroid binding protein") lie la testostérone et l'œstradiol (MERCIER-BODART, ALFSEN et BAULIEU (23), enfin l'ABG ("Aldosterone binding globulin") lie l'aldostérone (RICHARDSON, NOWACZYNSKI et GENEST) (24). Il est intéressant de remarquer qu'une autre protéine de transport, spécifique de la progestérone (PBP : "progesterone binding protein") est présente dans le plasma sanguin de cobaye mais pas dans le plasma humain (MILGROM, ATGER et BAULIEU) (25).

Parmi ces protéines, la transcortine est la plus anciennement et la mieux connue parce que, présente en concentration beaucoup plus importante que les autres, elle a pu être détectée puis isolée plus facilement.

2°- Protéines "transcortin-like" dans les liquides biologiques autres que le sang

Hormis le plasma sanguin, la transcortine, ou une protéine très voisine dite "transcortin-like", a été mise en évidence dans différents liquides biologiques extra-cellulaires. L'identification est réalisée généralement par des critères physico-chimiques (constante d'association aux stéroïdes, mobilité électrophorétique, taille moléculaire) et immunologiques.

Le lait humain contient ainsi une protéine "transcortin-like" (ROSNER et al.) (26), PAYNE et al.) (27) dont la concentration est maximum pendant la première semaine de lactation puis diminue pour atteindre une valeur stable dix jours après l'accouchement (ROSNER et al.) (26). Cette diminution est parallèle à celle du taux de transcortine sérique, lequel était 2 à 3 fois la valeur normale en fin de grossesse (RACADOT et al.) (28) ; la protéine "transcortin-like" du lait semble donc provenir d'un transfert à partir du plasma sanguin. Il n'est pas exclu que les rapports entre les deux protéines soient analogues à ceux existant entre la lactoferrine et la transferrine sérique, protéines liant toutes deux le fer.

La présence de protéine "transcortin-like" a aussi été montrée dans le colostrum humain et le lait de rate (PAYNE et al.) (27), dans le liquide amniotique humain (CHALLIS et BENNETT) (29). Dans ce dernier milieu, la concentration en protéine "transcortin-like" n'augmente cependant pas au cours de la grossesse et ne suit donc pas la concentration en transcortine sérique.

LA TRANSCORTINE

A/ [^] RÔLE BIOLOGIQUE

.....

Le rôle biologique de la transcortine et des autres protéines plasmatiques liant spécifiquement les stéroïdes semble double : d'une part la protéine protège l'hormone stéroïde circulante contre les enzymes du catabolisme (rôle passif), d'autre part elle interviendrait dans la spécificité du lieu d'action en dirigeant l'hormone vers les cellules-cibles (rôle actif). Etant donné la présence de protéine "transcortin-like" dans la cellule, certains auteurs pensent que l'hormone pourrait pénétrer dans la cellule, liée à son transporteur plasmatique ; celui-ci y jouerait un rôle régulateur vis-à-vis du récepteur spécifique.

1°- Protection contre les enzymes du catabolisme

La fraction libre du cortisol plasmatique est relativement faible (8 p. 100 du cortisol total) alors que 77 p. 100 du cortisol total sont liés

à la transcortine et 15 p. 100 liés à la sérum albumine (ROSENTHAL, SLAUNWHITE et SANDBERG) (30). La désialidation de la transcortine entraîne sa captation hépatique et donc une augmentation de la fraction libre du cortisol ; ceci s'accompagne d'une diminution de la demi-vie du cortisol (VAN BAELEN et MANNAERTS) (31).

2°- Rôle de reconnaissance

Ce deuxième rôle semble, en fait, multiple, il est suggéré par différents auteurs.

a) Sortie du complexe hormone-transporteur hors du capillaire sanguin
.....

KELLER, RICHARDSON et YATES (32), en 1969, montrent que la transcortine augmente la spécificité d'action de l'hormone : les signaux corticostéroïdes sont dirigés vers les organes ayant une perméabilité vasculaire à la protéine.

b) Reconnaissance des cellules-cibles par le complexe hormone-transporteur
.....
.....

Un résultat similaire est obtenu pour la protéine plasmatique liant les hormones sexuelles (SBP) ; le complexe hormone-transporteur serait, de plus, seul capable de "reconnaître" les cellules-cibles (MILGROM, ATGER et BAULIEU) (33), (PECK, BURGNER et CLARK) (34). Cette reconnaissance serait rendue possible grâce à une complémentarité stérique d'un site de reconnaissance sur la protéine de transport et d'un site accepteur sur la membrane des cellules-cibles. Elle permet l'accumulation d'hormone à la surface de ces cellules et donc une entrée massive dans le cytosol.

la thymidine (WERTHAMER, GOVINDARAJ et AMARAL) (51), il est tentant de penser que la transcortine est responsable de la persistance du cancer du sein (AMARAL et WERTHAMER) (47).

Le rôle de la transcortine cytosolique pourrait être de moduler l'interaction entre l'hormone et le récepteur (KOCH et al.) (41). Sa localisation peut être intra ou extra-cellulaire. La présence intra-cellulaire a été montrée par une technique d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques anti-transcortine sur une coupe de cellules : lymphocytes (WERTHAMER, SAMUELS et AMARAL) (46), tumeurs du sein (AMARAL et WERTHAMER) (47). Cependant une localisation à la surface des membranes plasmiques est envisagée par KOCH et al. (52) qui montrent l'adhérence de la protéine "transcortin-like" sur les membranes plasmiques des cellules pituitaires de rat.

d) "Transcortine" nucléaire

Sur des critères immunologiques et physico-chimiques, AMARAL et al. (53) montrent que les hépatocytes humains contiennent de la transcortine légèrement modifiée dans le noyau ; la localisation est démontrée par immunofluorescence. Ils montrent aussi que la transcortine sérique est capable d'interagir avec la chromatine : l'activité de la transcortine est inhibée après dialyse prolongée mais elle est restaurée par incubation avec de la chromatine.

L'expression hormonale sur la chromatine isolée ne se manifeste pas avec le cortisol seul mais l'addition de transcortine sérique purifiée entraîne la transcription de RNA (AMARAL et al.) (53). De même, à l'aide de la transcortine sérique que nous leur avons fournie, SAVART et DANIEL-LAMAZIERE (54) ont montré que l'action du cortisol sur un extrait chromatinien de thymus de veau ne se manifeste qu'en présence de transcortine. Celle-ci est donc capable de jouer un rôle biologique semblable à celui du récepteur cellulaire ; il est vraisemblable qu'elle intervient dans un système complexe de régulation hormonale mettant en jeu l'hormone, la transcortine, le récepteur et d'autres composants non identifiés de la chromatine et du cytosol.

B/ ISOLEMENT DE LA transcortine HUMAINE

1°- Méthodes d'isolement classiques

De la transcortine purifiée a été obtenue pour la première fois en 1962 par SEAL et DOE (55) à partir du sang de malades atteints de cancer de la prostate et traités au diéthylstilbœstrol. DOE et al. (56) avaient, en effet, observé que cet œstrogène administré à des sujets mâles provoque une augmentation du taux de cortisol lié ^(°), donc vraisemblablement de transcortine ; nous avons vu, précédemment, l'importance de cet effet dans les cancers du sein. Leur technique consiste essentiellement en une chromatographie d'échange d'ions sur D.E.A.E.-cellulose et plusieurs chromatographies d'adsorptions successives sur hydroxyapatite. Ils obtiennent une transcortine homogène en ultracentrifugation et en immunoélectrophorèse avec un rendement de 70 à 80 p. 100.

D'autres auteurs se sont attachés ensuite à améliorer les techniques mais la chromatographie d'échange ionique et les adsorptions sur hydroxyapatite restent la base essentielle du fractionnement.

La purification est terminée par plusieurs chromatographies successives de gel-filtration : SLAUNWHITE et al. (58) utilisent, pour cela, du Sephadex G75 alors que MULDOON et WESTPHAL (59) prennent du Sephadex G200. Afin de pouvoir traiter de plus grande quantités de sérum, ces derniers commençaient le fractionnement par un relargage au sulfate d'ammonium, tandis que LEBEAU et BAULIEU (60) utilisaient la fraction IV₄

(°) Cet effet des œstrogènes avait été aussi signalé un an plus tôt par SLAUNWHITE et SANDBERG (57).

obtenue par précipitation éthanolique de COHN. Le rendement en transcortine obtenu par MULDOON et WESTPHAL est beaucoup plus faible que celui publié par SEAL et DOE (30 p. 100) ; la transcortine obtenue est homogène en ultracentrifugation et en immunoélectrophorèse. La transcortine isolée par SLAUNWHITE et al. est homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide. La technique de MULDOON et WESTPHAL a été reprise par AKHREM et al. (61) sur une grande échelle, ces auteurs isolent ainsi des quantités de l'ordre de 5 à 10 μ moles (250 à 500 mg) de transcortine, pure en électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Comme nous pouvons le constater, la transcortine est obtenue avec des rendements divers mais toujours à l'état "pur", même à l'aide de la technique de SEAL et DOE qui est pourtant plus sommaire que les techniques suivantes. Nous verrons d'après les résultats que nous avons obtenus, que la pureté de la transcortine isolée par ces techniques est douteuse.

2°- Méthodes d'isolement par chromatographie d'affinité

En 1971, sont parues presque simultanément deux méthodes d'isolement de la transcortine humaine par chromatographie d'affinité : celle de ROSNER et BRADLOW (62) et celle de TRAPP, SEAL et DOE (63).

La méthode de TRAPP et al. nécessite la préparation d'un gel d'affinité très complexe (Figure 1 A) : un dérivé de cortisol à chaîne thio-(p.N-1 phényl)-succinamidique est couplé à du p.aminobenzoyl-Sepharose par l'intermédiaire d'hexane 1,6-N-1-aminobenzamide. La chaîne hexanique et le dérivé du cortisol sont fixés successivement sur le p.aminobenzoyl-Sepharose par l'intermédiaire d'une carbodiimide hydrosoluble. A cette complexité technique s'ajoute la nécessité de délipider le sérum avant la chromatographie, ce que les auteurs accomplissent par chromatographie sur D.E.A.E.-cellulose ; or, le volume de sérum qui peut être fractionné en une seule fois par cette méthode est assez limité : 200 ml avec une colonne de 500 mm x 50 mm (SEAL et DOE) (55).

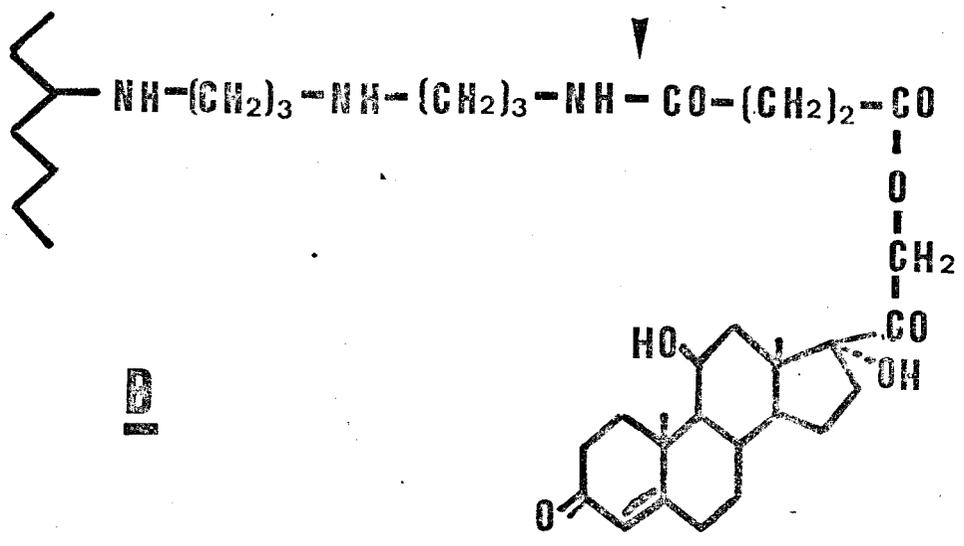
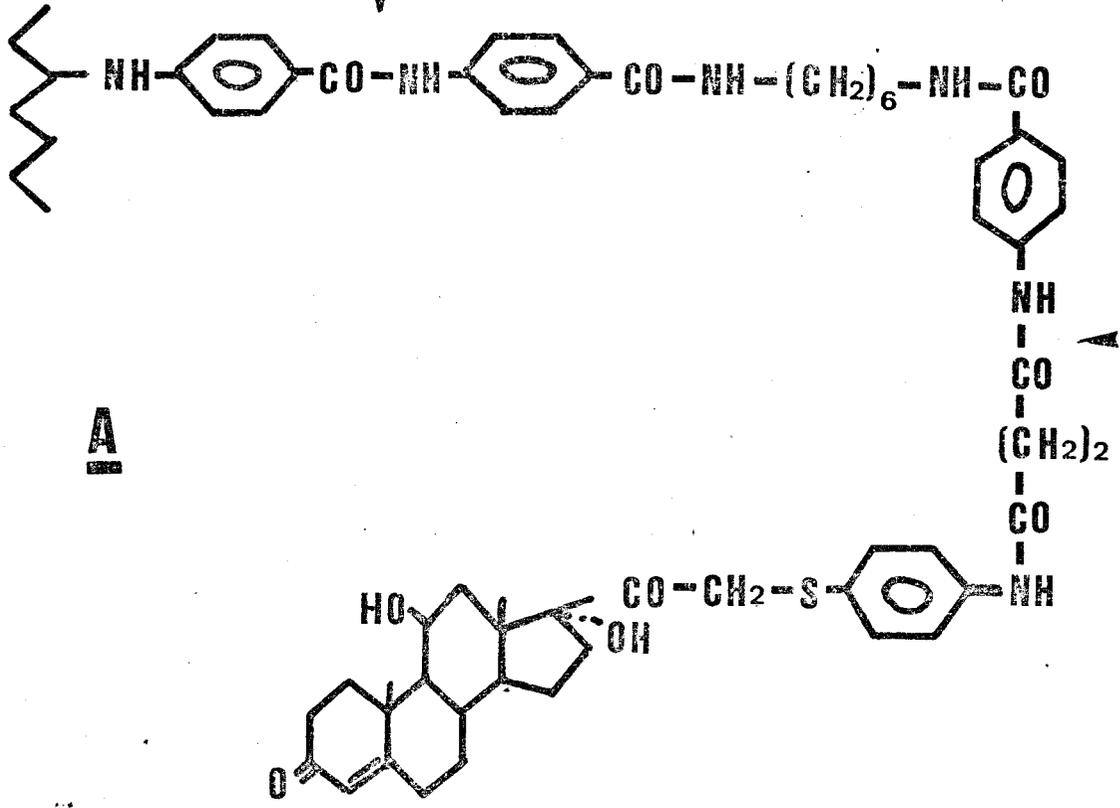


FIGURE 1

Gels d'affinité publiés en 1971 pour l'isolement de la transcortine humaine :

A : TRAPP, SEAL et DOE ('63)

B : ROSNER et BRADLOW ('62)

- Les flèches indiquent les lieux de couplage lors de la préparation du ligand-gel.



La méthode de ROSNER est beaucoup plus simple : le gel est préparé par couplage d'hémisuccinate de cortisol à du diaminopropyl-amino-Sepharose (Figure 1 B). Cependant, la présence d'une liaison ester rend ce gel d'affinité très instable.

La transcortine est adsorbée sur le ligand-gel, à 4° C, directement à partir du sérum (ROSNER) ou à partir de la fraction obtenue après D.E.A.E.-cellulose (TRAPP). Elle est éluée, après lavage, en colonne avec une solution tamponnée de cortisol à température ambiante.

TRAPP et al. montrent, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, la présence de sérum albumine, d'immunoglobulines et d'autres fractions de migration intermédiaire dans l'éluat contenant la transcortine. ROSNER et BRADLOW n'observent, par électrophorèse sur papier, que la présence d'immunoglobulines et de transcortine. Ils pensent que ces immunoglobulines sont capables de lier le cortisol et calculent même, pour ces protéines qu'ils identifient comme étant des immunoglobulines G, une constante d'association à 23° C de $0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (64). Ce pouvoir liant n'avait jamais été signalé auparavant et n'a pas été confirmé depuis 1971 ; les préparations commerciales d'immunoglobulines ne montrent pas d'affinité de liaison au cortisol.

Une étape de purification ultérieure par chromatographie sur hydroxyapatite est nécessaire. Cette étape permet d'obtenir la transcortine pure. ROSNER et BRADLOW obtiennent la transcortine pure avec un rendement de 58 p. 100 par rapport au sérum de départ. Cette dernière méthode présente cependant des inconvénients importants qui nous ont conduit à imaginer un gel d'affinité différent (LE GAILLARD, RACADOT, RACADOT-LEROY et DAUTREVAUX) (65) : voir le chapitre sur les travaux personnels.

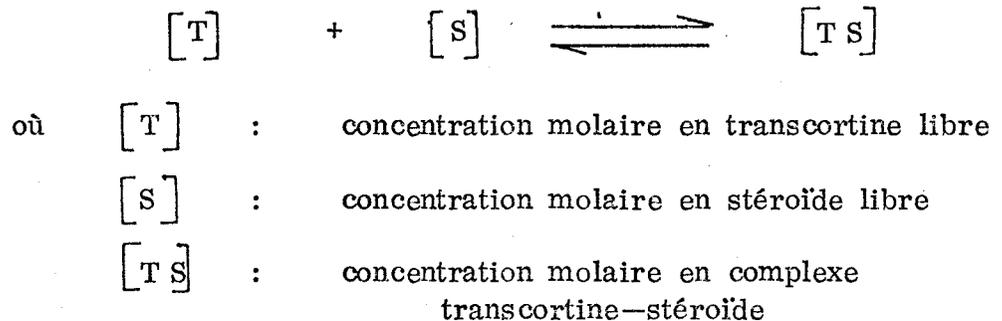
C/ PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DE LA LIAISON TRANCORTINE-STÉROÏDE

1°- Caractéristiques d'une protéine liante spécifique

La transcortine est une protéine liante spécifique des hormones glucocorticoïdes et de la progestérone ; elle est nettement différente d'autres protéines plasmatiques capables de lier les mêmes hormones mais de façon non spécifique. Les caractéristiques d'une protéine spécifique sont une affinité élevée et une capacité relativement faible (concentration plasmatique faible). A l'inverse, les protéines liantes non spécifiques (sérum-albumine et alpha 1-glycoprotéine acide) ont une affinité beaucoup plus faible (Tableau I).

2°- Expression mathématique de la liaison

La liaison transcortine-stéroïde est équimolaire (SEAL et DOE) (55), elle obéit à la loi d'action de masse et peut donc être exprimée ainsi :



La constante d'association est :

$$K_A = \frac{[TS]}{[T][S]} = \frac{1}{K_D}$$

(où K_D est la constante de dissociation)

TABLEAU I

Constantes d'affinité des protéines plasmatiques humaines

liant le cortisol et la progestérone :

Protéine	K _A à 4° C (M ⁻¹ x 10 ⁶)	
	cortisol	progestérone
sérum albumine	0,006 (a)	0,360 (g)
alpha 1-glycoprotéine acide	0,020 (b)	1,500 (g)
transcortine	150 — 790 (c, d, e, f, g)	700 (g)

- (a) : DAUGHADAY, BREMER et HARNETT-COLLINS (6)
 (b) : KERKAY et WESTPHAL (66)
 (c) : SEAL, U.S. et DOE, R.P. 1966 (19) : 500
 (d) : MULDOON, T.G. et WESTPHAL, U 1967 (59) : 520
 (e) : SCHNEIDER, S.L. et SLAUNWHITE, W.R. Jr.
 1971 (67) : 170
 (f) : LE GAILLARD, F., HAN, K.K. et DAUTREVAUX, M.
 1975 (68) : 150
 (g) : WESTPHAL, U. 1978 (69) : 790.

Généralement, les lettres $[B]$ ("Bound" = lié) et $[U]$ ("Unbound" = non lié) sont utilisées pour exprimer les concentrations en stéroïde lié $[TS]$ et non lié $[S]$, la relation précédente s'écrit alors :

$$K_A = \frac{[B]}{[T][U]} \quad (1)$$

Soit $[N]$, la concentration en sites de liaison.

Par définition :

$$[T] = [N] - [B] \quad (2)$$

Donc, d'après les équations (1) et (2) :

$$K_A = \frac{[B]}{([N] - [B])[U]} \quad (3)$$

$$[B] = K_A \cdot [U][N] - K_A \cdot [U][B]$$

$$[B] (1 + K_A [U]) = K_A \cdot [U][N]$$

Si on divise par K_A :

$$[B] (1/K_A + [U]) = [U][N]$$

$$\boxed{[B] = \frac{[U][N]}{1/K_A + [U]}} \quad (4)$$

Cette relation de $[B]$ en fonction de $[U]$ est une hyperbole équilatère avec $[B]$ asymptotique à $[N]$ (Figure 2).



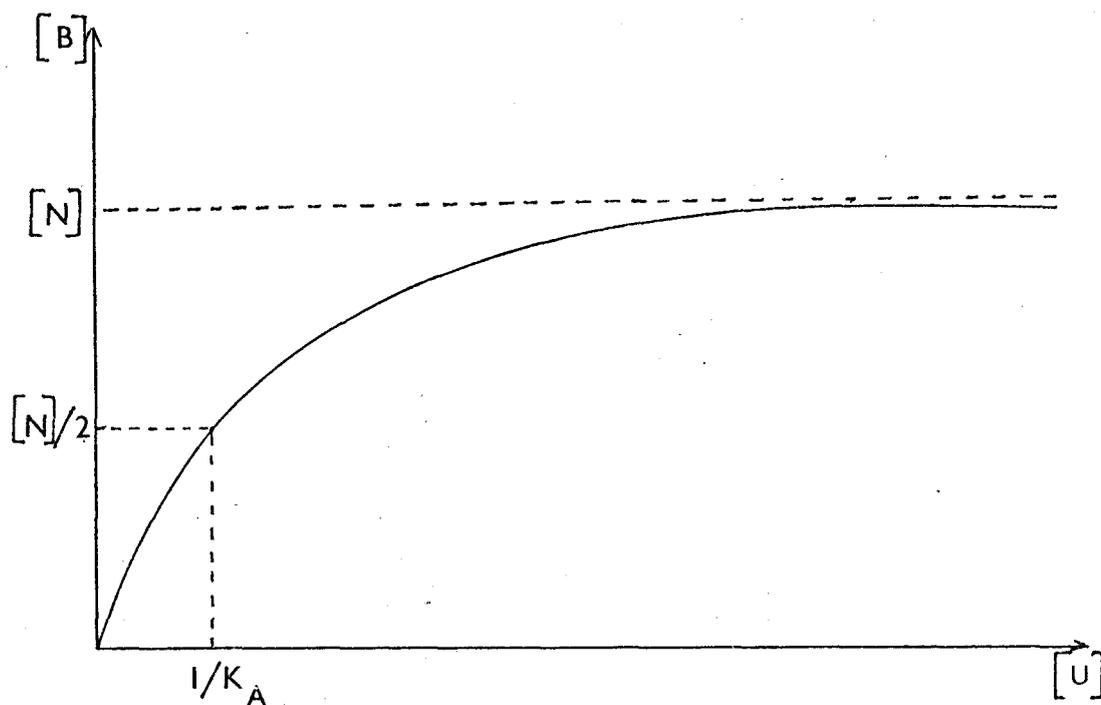


FIGURE 2

Si la relation (4) permet théoriquement de calculer la constante d'association K_A , il est cependant préférable d'utiliser d'autres représentations donnant une relation linéaire et non une hyperbole. Une des représentations les plus commodes et les plus largement utilisées est le diagramme de SCATCHARD (70), lequel pose B / U en fonction de B (Figure 3) :

$$\frac{[B]}{[U]} = K_A ([N] - [B]) \quad (5)$$

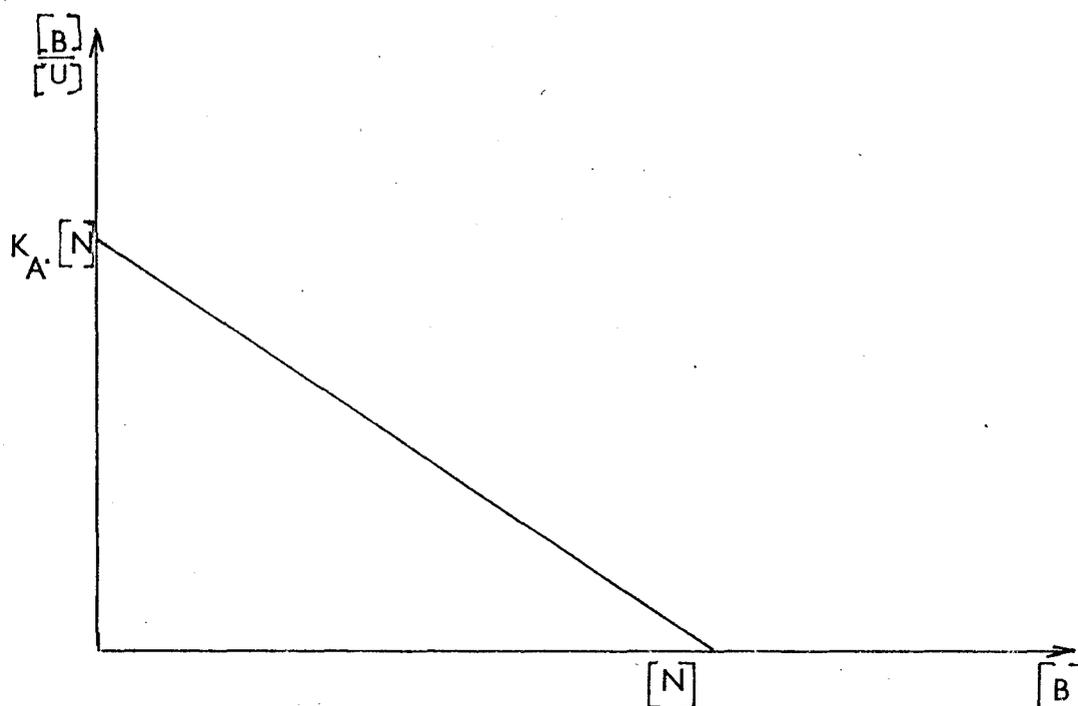


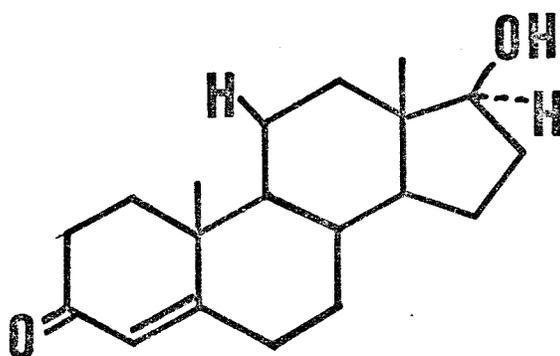
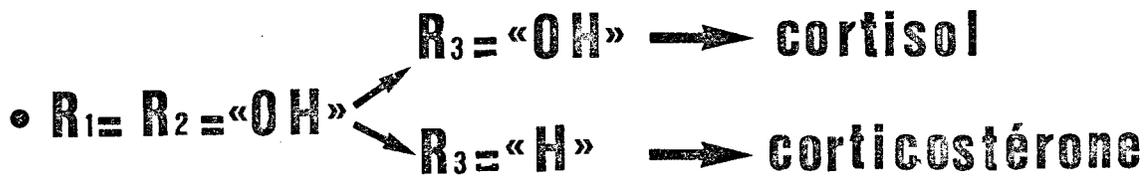
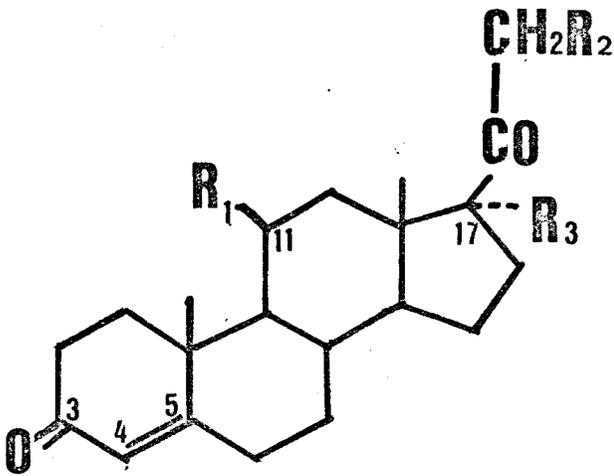
FIGURE 3

Une droite est obtenue si les sites de liaison sont équivalents et indépendants, ce qui est le cas d'une solution de transcortine pure.

3°- Spécificité de la liaison transcortine humaine — stéroïde

Trois hormones possèdent une grande affinité de liaison à la transcortine ; ce sont d'une part, les hormones glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone), d'autre part la progestérone qui a une grande parenté chimique avec les précédentes (Figure 4). Ces trois hormones ont en commun la structure prégnène-4, dione-3,20 et ne diffèrent que par le nombre de radicaux hydroxyle présents. L'importance du nombre et de la localisation des fonctions hydroxyle a été mise en valeur par DE MOOR et al. (71) et DAUGHADAY (7) qui observent la faculté qu'ont divers stéroïdes de déplacer le cortisol lié à la transcortine ; ainsi l'affinité de liaison augmente progressivement pour les dérivés suivants :





\longrightarrow testostérone



FIGURE 4 : Hormones stéroïdes capables de se lier à la transcortine ; la testostérone a une affinité beaucoup plus faible que les trois premières.

- (1) : Hydroxy-21, prégnène-4, dione-3,20 (11-désoxycorticostérone)
 (2) : Prégnène-4, dione-3,20 (progestérone)
 (3) : Dihydroxy-17 α , 21, prégnène-4, dione-3,20 (11-désoxycortisol)
 (4) : Hydroxy-17 α , prégnène-4, dione-3,20 (17 α hydroxyprogestérone)
 (5) : Trihydroxy-11 β , 17 α , 21, prégnène-4, dione-3,20 (cortisol)
 (6) : Dihydroxy-11 β , 21, prégnène-4, dione-3,20 (corticostérone)

Ces dérivés possèdent cependant tous une constante d'association élevée pour la transcortine (de l'ordre de 10^8 M^{-1}). Les effets des radicaux hydroxyles sont résumés dans le Tableau II ; ils ont été partiellement expliqués par EGER *et al.* qui ont étudié les modifications du spectre infra-rouge de stéroïdes à 21 carbones en présence d'un donneur de protons (le p.bromophénol) (EGER, GREINER et NORTON) (72). Le comportement de la fonction carbonyle en 20 dépend de son environnement : en l'absence d'hydroxyle en 17 et 21 (dérivé (2) du Tableau II), le carbonyle se comporte comme accepteur de protons. L'introduction d'un hydroxyle en 21 (dérivé 1) le rend, au contraire, donneur de proton, ce qui pourrait expliquer sa plus faible affinité. Un hydroxyle en 17 exalte le caractère accepteur de protons du carbonyle ; le dérivé (4), 17 α hydroxylé, a donc plus d'affinité alors que le dérivé (3) qui possède deux hydroxyles en 17 α et 21 ayant des actions opposées, se place logiquement entre les dérivés (2) et (4).

Les dérivés (5) et (6) correspondent respectivement aux dérivés 11 β hydroxylés des stéroïdes (3) et (1) ; le stéroïde (5) devrait donc avoir une affinité plus grande que le (6). En fait, leurs affinités sont très voisines sinon identiques ; il est vraisemblable que le rôle du carbonyle en 20 est ici masqué par la présence du 11 β hydroxyle. DAUGHADAY et KOZAK (7) ont, en effet, montré que la présence d'un hydroxyle en 11 augmente l'affinité s'il est en position β mais la diminue s'il est en position α .

Le carbonyle 20 et l'hydroxyle 11 β jouent donc un rôle dans la liaison à la transcortine. Ils ne sont cependant pas indispensables puisque

TABLEAU II

EFFET DU NOMBRE ET DE LA LOCALISATION
DES RADICAUX HYDROXYLES DE LA PREGNENE-4-DIONE 3,20
SUR L'AFFINITE DE LIAISON A LA TRASCORTINE

(Les numéros 1 à 6 correspondent à des dérivés
de la prégnène-4-dione 3,20 d'affinité croissante)

Dérivés de la prégnène dione par ordre d'affinité croissante	R ₁	R ₂	R ₃
	11 β	21	17 α
1	-	OH	-
2	-	-	-
3	-	OH	OH
4	-	-	OH
5	OH	OH	OH
6	OH	OH	-

D'après DE MOOR et al. (71) et DAUGHADAY (7)



la progestérone (sans hydroxyle en 11) a aussi une forte affinité ; la testostérone (sans carbonyle 20, Figure 4) a une affinité nettement plus faible mais est encore capable de se lier à la transcortine. Deux éléments sont indispensables à la liaison : une fonction cétone en 3 et une double liaison en 4,5.

La modification des substituants du carbone 21 dans les hormones glucocorticoïdes modifie peu l'affinité de liaison : le 21 désoxycortisol (DAUGHADAY et KOZAK) (7), le 21 déhydrocortisol (OHTSUKA et KOIDE) (73), les 21-esters de cortisol (TRAPP, SEAL et DOE) (63) ou de corticostérone (LEBEAU, BAULIEU et al.) (74) ont tous une forte affinité pour la transcortine.

La transcortine humaine ne lie pas ou très peu des stéroïdes glucocorticoïdes de synthèse comme le 9-fluorocortisol et la dexaméthasone (1,2-déhydro-9-fluoro-16 α -méthylcortisol) (SANDBERG et al.) (75), elle diffère en cela non seulement du récepteur cellulaire, mais aussi de certaines transcortines animales comme celle du chien (GILL et COOK) (76) et celle de la poule (COCHET et CHAMBAZ) (77) qui sont, elles, capables de lier la dexaméthasone.

4°- Facteurs de stabilité

a) Température

La transcortine présente un maximum d'affinité de liaison au cortisol à 4° C : l'affinité décroît avec l'augmentation de la température pour s'annuler à 45° C si la transcortine est purifiée, ou à 60° C si elle est dans son milieu naturel, le plasma (DE MOOR et al.) (71). Cette annulation est accompagnée d'une dénaturation irréversible de la protéine.

La constante d'association est ainsi 20 fois plus faible à 37° C qu'à 4° C (WESTPHAL) (78) ; (STROUPE et al.) (79).

b) pH
.. .. .

Un maximum d'affinité a été trouvé à pH 8 pour le cortisol (DE MOOR, STEENO et DECKX) (80) ; (LE GAILLARD et al.) (81) ; (CHAN et SLAUNWHITE) (82) et à pH 8,5 pour la progestérone (CHAN et SLAUNWHITE) (82). Une dénaturation irréversible est observée à pH inférieur ou égal à 5 (DAUGHADAY et MARIZ) (83) ; (LE GAILLARD et al.) (81) ; (CHAN et SLAUNWHITE) (82) et à pH supérieur ou égal à 9,8 (WESTPHAL) (84) ; (CHAN et SLAUNWHITE) (82) .

En milieu non tamponné, il y a une tendance vers une dénaturation irréversible (MULDOON et WESTPHAL) (59) .

RESULTATS PERSONNELS

CHAPITRE II

ISOLEMENT DE LA TRANCORTINE

A — ISOLEMENT PAR LES METHODES CLASSIQUES

B — ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Dans un premier temps, nous nous sommes attaché à fractionner du sérum selon les techniques classiques, puis, devant les difficultés rencontrées et le développement croissant des méthodes de chromatographie d'affinité, nous avons tenté d'isoler la transcortine d'après la méthode de ROSNER et BRADLOW (62). Cette méthode, bien que séduisante, ne nous a pas permis l'obtention de transcortine. Nous avons alors tenté d'en analyser les raisons, ce qui nous a conduit à imaginer une méthode de chromatographie d'affinité palliant les inconvénients des deux techniques citées dans le chapitre précédent.

A/ ISOLEMENT PAR LES METHODES CLASSIQUES

1°- Relargage au sulfate d'ammonium

Disposant de quantités appréciables de sérum ("pools" d'échantillons divers collectés dans un laboratoire de biologie clinique), nous avons appliqué le fractionnement au sulfate d'ammonium préconisé par MULDOON et WESTPHAL (59). Comme pour ces auteurs, les sérums que nous avons utilisés proviennent de sujets normaux quant à leur taux de transcortine alors que les autres auteurs partent de sérums de sujets traités au diéthylstilboestrol, ce qui augmente fortement le taux de transcortine sérique.

Trois classes de protéines sériques sont obtenues :

- 1 : Protéines précipitant à 40 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium surtout des immunoglobulines.

- 2 : Protéines précipitant à 63 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium : surtout de la sérum albumine. Cette fraction contient la transcortine.
- 3 : Protéines solubles à 63 p. 100 de saturation.

Les études électrophorétiques en gel de polyacrylamide et en immunoélectrophorèse de ces différentes fractions montrent que celles-ci restent très complexes et leur interprétation difficile.

Partant de 1,5 litre de sérum, soit environ 100 g de protéine, on récupère, dans la fraction 2 contenant la transcortine, 15,3 g de protéine.

2°- Chromatographie sur D.E.A.E. - cellulose

C'est une chromatographie d'échange d'ions. Les protéines sont fixées d'autant plus fortement que leur pH isoélectrique est bas. Leur élution est assurée par passage d'un tampon à pH décroissant et à molarité croissante.

Nous avons utilisé la technique en gradient discontinu de SOBER et PETERSON (85) appliquée par SEAL et DOE (55) à l'isolement de la transcortine.

La solution de protéines à déposer est mise en contact avec un mélange de cortisol froid pour saturer la transcortine à 4° C et de cortisol [^3H] pour la "marquer".

= Rendement

6,5 g de protéines sur les 15,3 g initiaux sont obtenus ; on élimine donc 58 p. 100 des protéines de départ.

= Détermination de l'activité spécifique

La radioactivité totale de la fraction lyophilisée est calculée, puis divisée par le poids de protéine lyophilisée, on détermine ainsi le nombre de CPM par mg de protéine. Cette activité spécifique augmentera avec la purification. Elle est ici d'environ 250 CPM/mg.

3°- Adsorption sur hydroxyapatite en batche

La propriété qu'a l'hydroxyapatite d'adsorber les protéines a été décrite par TISELIUS, HJERTEN et LEVIN en 1956 (86) : ces auteurs proposent un traitement du phosphate de calcium permettant une adsorption reproductible. C'est cette propriété que SEAL et DOE ont appliquée à l'isolement de la transcortine dès 1962 (55).

Selon ces derniers, ainsi que pour MULDOON et WESTPHAL (59) et ROSNER et BRADLOW (62), la transcortine présente la particularité de ne pas être adsorbée sur hydroxyapatite en tampon phosphate de pH 6, 8 et de très faible molarité (0,001 M).

= Rendement

Partant de 3,5 g de protéine, on obtient 400 à 500 mg de protéines, soit environ 13 p. 100. La radioactivité totale est, par contre, retrouvée à 85 p. 100.

= Enrichissement

L'activité spécifique passe de 260 à 1670 CPM/mg.

4°- Chromatographies sur hydroxyapatite en colonne

= Purification

Deux chromatographies successives sont réalisées dans deux colonnes de taille différente (I et II). La purification y est de 20 fois dans la colonne I, elle est donc plus importante que celle obtenue par SEAL et DOE (4 fois). MULDOON et WESTPHAL (59) obtiennent une purification de 42 fois après 4 chromatographies successives sur colonne d'hydroxyapatite.

Dans la colonne II, la purification est légèrement inférieure à 2 fois ; presque toute la protéine non radioactive est apparemment adsorbée puisqu'un seul pic protéique est obtenu. La coïncidence de ce pic avec le pic de radioactivité n'est cependant pas totale.

En immunoélectrophorèse, 2 arcs sont visibles (1 majeur et 1 mineur) sur l'éluat radioactif de la colonne I et celui de la colonne II. L'arc majeur correspondant à la transcortine d'après sa mobilité électrophorétique.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide, 2 zones sont visibles dès le passage sur la colonne I, la plus importante étant la transcortine (SLAUNWHITE et SANDBERG) (58). La bande mineure diminue après passage sur la colonne II.

= Rendement

Partant de 500 mg de protéines, nous en récupérons, après la colonne I, environ 30 mg, soit 6 p. 100. 90 p. 100 de la radioactivité y sont retrouvés.

Après passage dans la colonne II, 58 p. 100 des protéines déposées sont récupérées. Pratiquement, toute la radioactivité est retrouvée.

= Enrichissement

L'activité spécifique passe de 1670 à 24 200, puis à 41 000, ce qui correspond bien au pourcentage de protéines récupérées.

= Remarque

L'existence de la protéine souillant la transcortine après cette étape a été remarquée par SLAUNWHITE et SANDBERG (58) : ces auteurs recyclent leur préparation de protéines sur la même colonne d'hydroxyapatite jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 2 zones en gel de polyacrylamide (nous l'avons obtenu dès le premier passage, grâce sans doute, à la qualité différente de l'hydroxyapatite employée). Ils font les constatations suivantes :

- Cette deuxième zone constitue (malgré son aspect mineur) 50 p. 100 de protéines après le dernier recyclage.
- Cette protéine se colore donc faiblement avec l'Amidoschwarz (colorant employé pour sa révélation).

Ils l'éliminent par gel-filtration sur Sephadex G75.

5°- Conclusion

La transcortine obtenue est encore impure et nos tentatives de purification ultérieure par gel-filtration n'ont pas abouti, si ce n'est à une dénaturation de la transcortine. Même au stade de purification atteint, la transcortine se montre bien fragile et l'addition d'un réducteur (l'ascorbate de sodium) au tampon d'élution s'est révélée nécessaire lors de la dernière chromatographie.

Face aux maigres résultats obtenus par rapport à la méthodologie très longue mise en œuvre, nous avons porté nos espoirs vers la chromatographie d'affinité.

B/ ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

La chromatographie d'affinité est basée sur les propriétés biologiques spécifiques des substances à isoler. La plupart des macromolécules biologiques possèdent une région hautement spécialisée, destinée à une fonction unique : le site actif ; la fixation covalente, sur un support solide, d'une molécule complémentaire de ce site (ou ligand) permettra l'adsorption de la macromolécule au support. La technique d'isolement, basée sur cette adsorption bio-spécifique, fut appelée "chromatographie d'affinité" en 1968 par CUATRECASAS et al. (87) ; elle a fait l'objet d'une étude détaillée dans notre thèse de Doctorat en Pharmacie (LE GAILLARD) (88).

1°- Résultats obtenus avec la méthode de ROSNER et BRADLOW (62)

La technique de ROSNER consiste à coupler de l'hémisuccinate de cortisol à de l'amino-Sépharose. Le cortisol-Sépharose obtenu est mis en contact avec du sérum et en adsorbe la transcortine. Nous avons vainement tenté d'appliquer cette technique : de fait, après contact entre le sérum et le cortisol-Sépharose, on peut mettre en évidence par fluorimétrie des quantités très importantes de cortisol dans le sérum surnageant ; même après des lavages répétés du cortisol-Sépharose à l'aide de dioxanne et de diméthylformamide à 50 p. 100, nous retrouvons du cortisol dans le liquide surnageant.

Il semble que la liaison ester de l'hémisuccinate couplé à l'amino-Sépharose soit facilement hydrolysée dans le sérum. HUBENER et SCHMIDT (89) ont ainsi montré que les estérases du sérum sont capables d'hydrolyser

les esters des hormones stéroïdes ; ceux-ci sont notamment beaucoup plus labiles quand la fonction alcool est primaire et quand l'acide estérifiant a une longue chaîne (4 à 12 carbones), ce qui est le cas dans le couplage de l'hémisuccinate de cortisol à l'amino-Sépharose qui a pour conséquence d'allonger considérablement la chaîne acide estérifiant le cortisol. Lorsque du cortisol-Sépharose est conservé à 4° C dans une solution antiseptique d'azide de sodium à 0,02 p. 100, du cortisol apparaît dans le liquide surnageant : sa concentration augmente avec le temps, ce qui traduit une libération continue du cortisol, même en l'absence de sérum.

L'instabilité du cortisol-Sépharose de ROSNER nous a incité à rechercher un gel d'affinité sans liaison ester, mais de préparation moins complexe que le cortisol-Sépharose de TRAPP, SEAL et DOE (63), d'autant plus que ce dernier présente l'inconvénient de nécessiter un fractionnement préalable sur D.E.A.E.-cellulose.

2°- Préparation du HCAC^(c)-Sépharose

a) Principe

Le but étant d'obtenir un gel d'affinité stable, nous nous sommes orientés vers la préparation d'un stéroïde, analogue du cortisol, possédant une fonction carboxylique de manière à former une liaison amide stable avec un support aminé. Ce stéroïde ne doit pas porter de liaison ester comme l'hémisuccinate de cortisol.

Les substituants du carbone 21 des stéroïdes semblent avoir peu d'importance dans l'affinité de leur liaison avec la transcortine ; en effet, la progestérone (DE MOOR et al.) (71), le 21-désoxycortisol (DAUGHADAY) (90

(c)

HCAC : Acide 11 β -hydroxy-3-céto-4-androstène-17 β -carboxylique.

le 21-déhydrocortisol (OHTSUKA et KOIDE) (91), les esters de corticostérone (LEBEAU et al.) (74) et de cortisol (TRAPP et al.) (63) se lient tous fortement à la transcortine. Nous avons alors tenté de substituer un atome d'azote au carbone 21 lui-même. Cette opération a été réalisée après oxydation périodique de la corticostérone puis par couplage du produit obtenu (HCAC) à de l' amino-Sépharose (Figure 5).

b) La liaison HCAC - transcortine

L'affinité de la transcortine pour le HCAC a été étudiée par dialyse à l'équilibre. Des fioles Packard sont garnies par 15 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,4 contenant des antibiotiques^(°) et une dose traceuse de $37,5 \times 10^{-3}$ μ C de cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$, représentant $1,25 \times 10^{-6}$ μ Mole. D'autre part, 30 μ Moles de HCAC (10 mg) sont dissoutes dans 10 ml d'éthanol absolu, puis des dilutions sont préparées dans du tampon pour obtenir des concentrations successives de 300×10^{-3} , 30×10^{-3} , 3×10^{-3} , $0,3 \times 10^{-3}$ μ moles par ml. Des aliquots de 0,1 ml de ces dilutions sont ajoutées respectivement à 4 fioles. Dans une 5^{ème} fiole qui servira de témoin, on ajoute 0,1 ml de tampon seul. Chaque fiole reçoit ensuite un sac de dialyse en cellophane contenant 1 ml de solution à 33×10^{-6} μ moles de transcortine ($1,72 \text{ mg} \times 10^{-3}$ mg) et 72×10^{-6} μ moles de cortisol (26×10^{-3} μ g) par ml. Le tout est laissé sous agitation à 4° C pendant 48 heures, puis les radioactivités internes et externes aux sacs à dialyse sont mesurées. Chaque expérimentation est réalisée en double (Tableau III). Les résultats exprimés dans la Figure 6 montrent que le HCAC possède moins d'affinité pour la transcortine que le cortisol puisque, pour déplacer 50 p. 100 du cortisol lié, une quantité de HCAC environ 7 fois supérieure à celle du cortisol est nécessaire. Pour cette raison, le sérum devra être débarrassé de son cortisol endogène avant la chromatographie d'affinité. Ces résultats ne sont cependant qu'indicatifs, car la liaison de la fonction carboxylique du HCAC à l' amino-Sépharose modifie vraisemblablement cette affinité.

(°) Streptomycine : 0,02 mg par ml Pénicilline : 500 U. par ml.

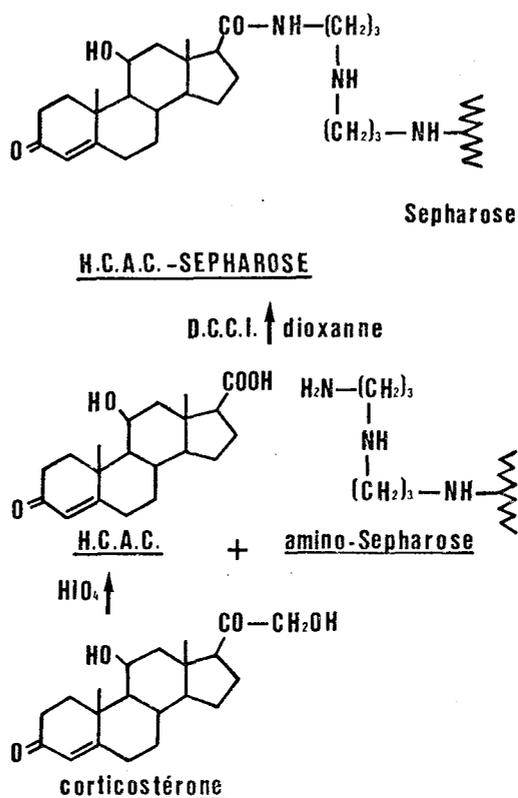


Fig. 5 — H.C.A.C.-Sephadex préparé par couplage de H.C.A.C. à de l'amino-Sephadex, par l'intermédiaire de dicyclohexylcarbodiimide, en milieu dioxanne.

L'H.C.A.C. est obtenu par oxydation périodique de la corticostérone. L'amino-Sephadex est obtenu par fixation de 3,3' diaminodipropylamine sur du Sephadex 4B activé par le bromure de cyanogène selon la technique de Cuatrecasas [23].

TABLEAU III

Pourcentage de cortisol déplacé d'une même solution de transcortine par des doses croissantes de H.C.A.C. Les mesures sont réalisées par dialyses à l'équilibre avec une concentration en cortisol ayant une activité spécifique de $0,9 \times 10^9$ C.P.M. par μ Mole.

H. C. A. C. ajouté (1×10^{-3} μ Mole)	Rapport $\frac{\text{H. C. A. C.}}{\text{cortisol}}$	CPM/ml intérieur du sac	CPM/ml extérieur du sac	Pourcentage de cortisol déplacé
0	0	14.460	3.250	0
0,03	0,41	12.845	3.600	17
0,30	4,1	10.630	3.630	36
3,00	41	6.180	3.960	80
30,00	410	4.175	4.145	100

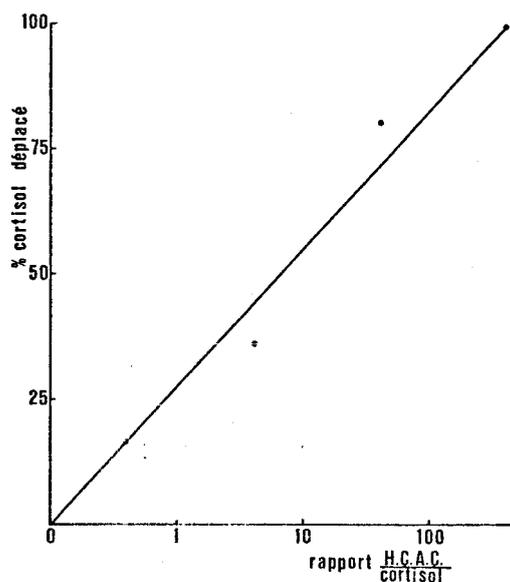


FIG. 6 — Pourcentages de cortisol déplacé par des doses croissantes de H.C.A.C. ajoutées à une solution de transcortine et de cortisol de concentration constante.

c) Couplage de l'HCAC à l'amino-Sépharose

Pour mesurer le taux de fixation de l'HCAC à l'amino-Sépharose, 2 m.moles de corticostérone sont ajoutées à 10 μ C de corticostérone $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$ (New England Nuclear 50 C/mMole) et oxydées selon la méthode détaillée au chapitre technique. 5 ml d'amino-Sépharose sont traités avec 0,5 mmole de l'HCAC tritié obtenu. Après lavage, la radioactivité du gel est mesurée : 0,5 ml et 1 ml de gel dilué au demi par de l'eau distillée sont comptés dans 15 ml de liquide scintillateur au dioxanne contenant 3,8 p. 100 (P/V) de Cab-0-Sil (Eastman). Parallèlement, sont comptés des témoins contenant du cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$ d'activité spécifique connue et les mêmes volumes de Sépharose. Après un nouveau cycle de fixation de l'HCAC, les mêmes dosages sont effectués. Le premier cycle fixe 0,5 μ mole de HCAC par ml de gel et 0,7 μ mole de HCAC supplémentaires sont couplées après le deuxième cycle.

Il peut sembler inutile d'effectuer deux cycles puis de diluer l'HCAC-Sépharose obtenu avec un volume égal de Sépharose. Cependant, le gel ainsi dilué présente moins d'adsorption non spécifique vis-à-vis des protéines.

3°- Chromatographie d'affinité

La technique utilisée est une variante de celle de ROSNER et BRADLOW (62) que nous avons adaptée aux propriétés particulières de notre ligand-Sépharose.

a) Adsorption de la transcortine sur le HCAC-Sépharose

4 litres de sérum sont dialysés pendant 48 heures contre 20 litres de NaCl 0,2 M qu'on change une fois après 24 heures. Il est ensuite débar-rassé des corticostéroïdes endogènes par addition de 20 g de charbon Norit

(Prolabo) et 2 g de Dextran T 70 (Pharmacia) par litre de sérum. Après incubation d'au moins 30 minutes à 37° C, le sérum est centrifugé 40 minutes à 3.000 tours/minute à 20° C, puis filtré sous vide sur un entonnoir Büchner garni de papier filtre Whatman 54 SFC.

Le sérum est ensuite ajouté à 200 ml de HCAC-Sépharose dilués avec 200 ml de Sépharose 4B. La suspension est agitée à la température du laboratoire pendant une heure puis à 4° C pendant 6 heures. Après adsorption, le sérum surnageant est décanté, puis le gel est lavé à 4° C dans un entonnoir Büchner à verre fritté n° 2 avec environ 200 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M-NaCl 0,2 M de pH 7,0. Il est ensuite transféré dans une colonne thermostatée à 4° C (5 cm x 30 cm). Le lavage y est poursuivi avec le même tampon jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm de l'effluent soit inférieure à 0,1 : environ 3 heures à un débit de 10 ml par minute (écoulement libre de la colonne).

L'adsorption de la transcortine sur le gel est mesurée en utilisant une propriété particulière de celle-ci : l'inactivation irréversible à 60° C décrite par DAUGHADAY et al. (92). Cette inactivation est d'autant plus grande que le taux de cortisol dans le milieu est faible (DOE, FERNANDEZ et SEAL) (93) ; ici elle est totale car le cortisol a été adsorbé sur charbon-dextran.

1 ml de sérum traité au charbon-dextran et 1 ml du sérum surnageant le gel sont dilués avec 4 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7,4. Une dialyse multiple à l'équilibre (DAUGHADAY) (94) ; (WESTPHAL et al.) (95) est réalisée : 8 sacs de dialyse (4 sacs en double exemplaire) contenant respectivement 1 ml de la dilution du sérum, 1 ml de la dilution du sérum surnageant et 1 ml des mêmes dilutions incubées 30 minutes à 60° C, sont plongés dans un même récipient. Celui-ci est rempli de 80 ml de tampon contenant 0,3 µg de cortisol et une dose traceuse de 0,2 µC de cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$ (30 C par mMole). Le tout est laissé sous agitation 48 heures à 4° C puis la radioactivité externe et les radioactivités internes sont mesurées (Tableau IV). Les valeurs correspondant au cortisol lié du sérum (c) et du surnageant (d) incubés à 60° C, sont dues aux protéines liantes autres que

TABLEAU IV

Résultats d'une dialyse multiple d'équilibre de 48 h à 4°C d'un sérum traité au charbon-dextran et du même sérum après contact avec le gel d'affinité (surnageant) avant et après incubation à 60°C.

Dilutions 1/3 de :	CPM/ml intérieur du sac	CPM/ml extérieur du sac	CPM/ml dus au cortisol lié total	CPM/ml dus au cortisol lié à la transcortine	Pourcentages de transcortine
Sérum	17.130	3.000	14.130 (a)	12.830 (A)	100
Surnageant	5.170	"	2.170 (b)	1.070 (B) 1.260 (B')	9,8
Sérum incubé à 60° C	4.300	"	1.300 (c)	—	—
Surnageant incubé à 60° C	4.100	"	1.100 (d)	—	—

4 sacs de 1 ml (en double exemplaire) sont dialysés ensemble contre 80 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,4 contenant 0,3 µg de cortisol de 0,2 µcuries de cortisol (1,2³H).

(A = a - c ; B = b - d ; B' = B · $\frac{c}{d}$).

la transcortine, sérum albumine presque exclusivement ; le rapport de ces chiffres donne le facteur de dilution dû au "volume mort" du gel. Les radioactivités données par le cortisol lié total du sérum (a) et du surnageant (b) doivent être diminuées des chiffres précédents pour obtenir les radioactivités correspondant uniquement au cortisol lié à la transcortine : $A = a - c$ et $B = b - d$; B qui représente le cortisol lié à la transcortine non adsorbée, est corrigé en le multipliant par le facteur de dilution : $B' = B \cdot \frac{c}{d}$. C'est cette dernière valeur (B') qui est retenue pour calculer le pourcentage de transcortine non adsorbée : $\frac{B'}{A} \times 100$ qui est ici de 9,8 p. 100 (Tableau IV).

b) Elution de la transcortine

.. .. .

= Technique

Après lavage, le gel est élué successivement par 1 volume de tampon phosphate de sodium 0,001 M de pH 7,0 (volume correspondant au volume du gel) destiné à éliminer le tampon de force ionique élevée précédent, puis par une solution de cortisol à 0,2 mg par ml dans le même tampon jusqu'à ce que le cortisol apparaisse dans l'effluent de la colonne. Le "volume mort" du cortisol est mesuré ; un volume égal de solution de cortisol à 0,2 mg par ml dans du tampon Tris 0,05 M - NaCl 0,1 M de pH 8,5 est alors passé, puis le bas de la colonne est fermé. Le gel est incubé 90 minutes à 25° C à l'aide d'une jaquette thermostatée, puis refroidi à 4° C pendant 15 heures. La transcortine est ensuite éluée à 4° C par passage d'un volume de la solution de cortisol tamponnée à pH 8,5 égal au volume du gel.

Le temps d'incubation à 25° C permet l'établissement d'un équilibre de la transcortine entre le HCAC-Sépharose et le cortisol en solution, ce dernier déplaçant la transcortine et permettant son élution.

Le gel est ensuite porté 90 minutes à 37° C puis élué par un volume de colonne de la solution de cortisol. Il est ensuite lavé abondamment par de l'eau distillée et conservé dans une solution d'azide de sodium à

0,02 p. 100, à 4° C. Les fractions obtenues à 4° C sont réunies, dialysées sous agitation, pendant 48 heures, contre 10 volumes de tampon phosphate de sodium 0,001 M de pH 6,8, puis lyophilisées.

= Résultats

La transcortine peut être éluée directement à 25° C, mais elle est alors nettement moins purifiée : la Figure 7 montre les éluions successives du gel à 4° C, 25° C et 37° C ; le pic important à 25° C souille la transcortine dans le cas d'une élution directe. Cette contamination est cependant partiellement compensée pendant la dialyse des fractions recueillies, puisque celle-ci provoque une précipitation abondante d'immunoglobulines (Figure 9 E).

La composition des pics a été étudiée par immunoélectrophorèse (Figure 9 C et D) et par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 8). Le pic obtenu à 4° C contient, outre la transcortine, beaucoup de protéines différentes migrant en électrophorèse de la zone γ à la sérumalbumine. L'arc de précipitation de la transcortine (Fig. 9 C et D) et la zone de migration en polyacrylamide (Figure 8 A) sont bien visibles. Le pic obtenu à 25° C ne contient que des immunoglobulines et de la sérumalbumine (Figure 8 B) ; le pic obtenu à 37° C, des immunoglobulines (Figure 8 C).

Le degré de purification atteint en une seule étape est très important : près de 1000 fois (Tableau V). Alors que la transcortine ne représentait dans le sérum qu'un peu plus de 0,5 p. 1000 des protéines totales, elle constitue environ un tiers des protéines éluées par chromatographie d'affinité. Le dosage de la transcortine par électroimmunodiffusion montre que, sur un fractionnement de 3860 ml de sérum, 105 mg de transcortine sont obtenus après chromatographie d'affinité alors que le sérum en contenait 154 mg : le rendement est de 69 p. 100. Cependant l'adsorption non spécifique de protéines sur le HCAC-Sépharose rend obligatoire une deuxième étape de purification par chromatographie sur hydroxyapatite.

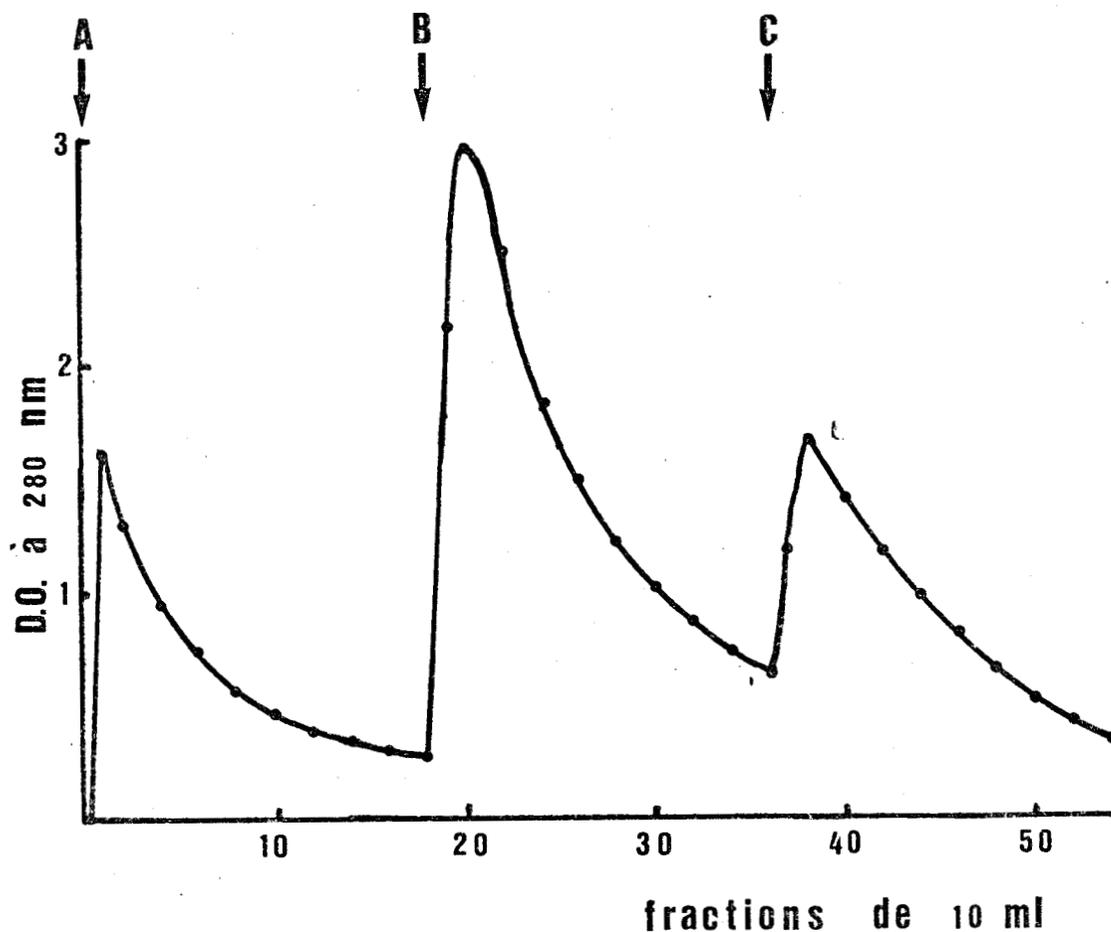


FIGURE 7

Courbe d'élution par chromatographie d'affinité (colonne 40 mm x 140 mm). L'élution est réalisée à trois températures différentes avec un tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M de pH 8,5 contenant 0,2 mg de cortisol par ml :

A : incubation 90 minutes à 25°C puis 15 heures à 4°C - Elution à 4°C

B : Incubation 90 minutes à 25°C et élution à 25°C

C : incubation 90 minutes à 37°C et élution à 37°C.

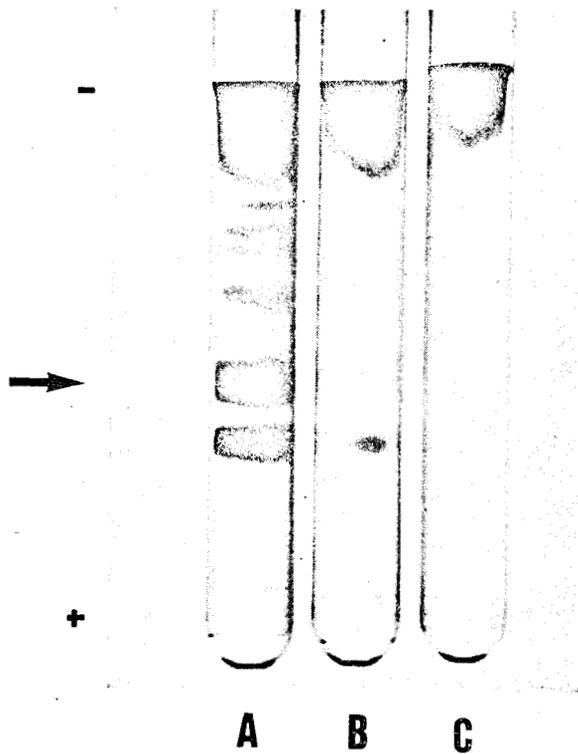


Fig. 8 — Electrophorèse en gel de polyacrylamide des pics obtenus par chromatographie d'affinité. La flèche montre la zone correspondant à la transcortine.

A : pic obtenu par élution à 4°C.
 B : pic obtenu par élution à 25°C.
 C : pic obtenu par élution à 37°C.

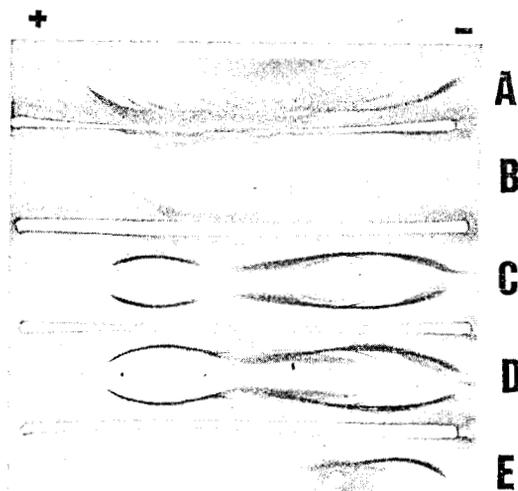


Fig. 9 — Immunoélectrophorèse des préparations isolées.

A : sérum de départ.
 B : transcortine pure obtenue après chromatographie sur hydroxyapatite.
 C : pic obtenu à 4°C par chromatographie d'affinité (fractions n°s 1 à 4).
 D : pic obtenu à 4°C par chromatographie d'affinité (fractions n°s 5 à 12).
 E : protéines précipitées pendant la dialyse du pic précédent — Immunsérum de Lapin anti-humain total Hyland.

TABLEAU V

RENDEMENT EN TRANSCORTINE A PARTIR DE 3860 ml
DE SERUM

ETAPE DE L'ISOLEMENT	TRANSCORTINE (mg)	PROTEINE (mg)
Sérum de départ	154	268 000
Eluat de la chromatographie d'affinité	105	340
Eluat de la chromatographie sur hydroxyapatite	79	79

A double-headed vertical arrow is positioned to the left of the 154 and 79 values.
 A double-headed vertical arrow is positioned between the 154 and 105 values, with "69 %" written below it.
 A double-headed vertical arrow is positioned between the 105 and 79 values, with "75 %" written below it.
 The value 79 is underlined.

. Fractionnement sur une colonne d'affinité contenant 200 ml de H.C.A.C.-Sepharose dilué avec 200 ml de Sepharose 4 B (50 mm x 200 mm).

- puis une colonne d'hydroxyapatite de 100 ml (25 x 250 mm).

. Le pourcentage inscrit sous le signe \updownarrow est le rendement entre les deux étapes fléchées.



4°- Chromatographie sur hydroxyapatite

a) Technique

.. .. .

La préparation lyophilisée est dissoute dans 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,001 M de pH 6,8, dialysée sous agitation pendant 15 heures contre 500 ml du même tampon, puis déposée sur une colonne d'hydroxyapatite (hydroxyapatite HTP - BIORAD) (50 mm x 25 mm) équilibrée dans le tampon phosphate 0,001 M de pH 6,8. L'élution est conduite à 4° C par des tampons phosphate de sodium de pH 6,8 et de molarité 0,001 M et 0,005 M (débit : 0,4 ml par min). L'hydroxyapatite est ensuite régénérée par un tampon phosphate de potassium 0,650 M de pH 6,8.

Le passage du tampon phosphate de sodium 0,001 M de pH 6,8 dans la colonne permet d'éliminer l'excès de cortisol encore présent dans la préparation lyophilisée ; la transcortine reste adsorbée, elle est éluée avec le tampon phosphate 0,005 M.

Suivant son utilisation ultérieure, la solution de transcortine est alors, soit concentrée sous pression d'azote à 4° C dans un appareil à micro-ultrafiltration AMICON équipée de membranes DIAFLO (type PM 10), soit dialysée dans un "beaker dialyzer" à fibres creuses de cellulose (DOW) contre un courant d'eau distillée de 40 ml/mn pendant 2 heures, puis lyophilisée.

b) Résultats

.. .. .

La transcortine obtenue est pure en immunoélectrophorèse (Figure 9 B) et en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 10). Le rendement à chaque étape de la préparation a été déterminé par dosage immunologique (RACADOT et al.) (28). Les résultats d'un fractionnement sont représentés dans le Tableau V. Par rapport au taux de transcortine sérique initial, le taux de récupération a été de 69 p. 100 après la chromato-

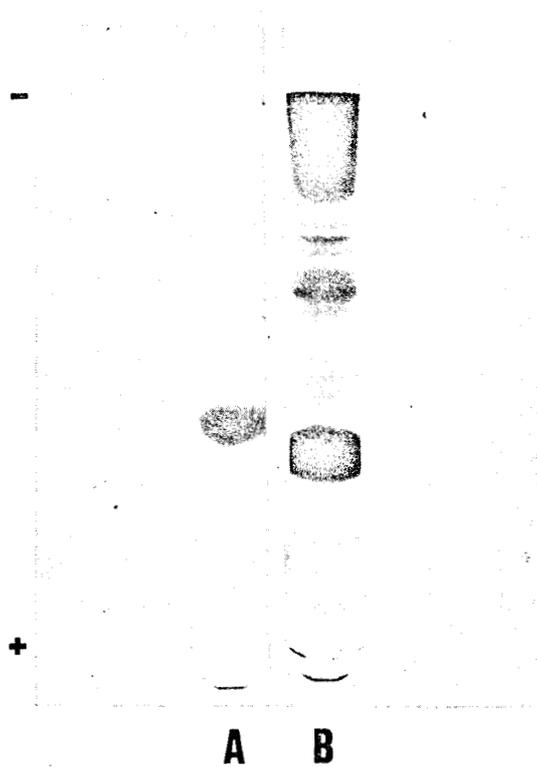


FIG. 10 — *Electrophorèse en gel de polyacrylamide de transcortine pure obtenue après chromatographie sur hydroxyapatite (A) et d'un sérum humain (B).*

graphie d'affinité et de 52 p. 100 après la chromatographie sur hydroxyapatite. La transcortine obtenue a conservé à ce stade toute son activité liante vis-à-vis du cortisol : le dosage du cortisol dans l'éluat 0,005 M montre, en effet, 6,7 μg de cortisol par mg de transcortine. Or, à l'état de saturation théorique, la transcortine lie 6,9 μg de cortisol par mg, chiffre qui correspond à 1 Mole de cortisol par Mole de transcortine.

5°- Discussion

Pour préparer notre ligand-Sépharose, il paraissait logique d'utiliser le cortisol plutôt que la corticostérone. Effectivement, nous avons commencé par oxyder le cortisol par l'acide periodique ; mais l'acide dihydroxy-11 β , 17 α céto-3 androstène-4-carboxylique-17 β obtenu (DCAC) se fixe avec un rendement 5 fois moindre que l'HCAC sur l' amino-Sépharose dans les mêmes conditions. Il semble que l'hydroxyle en 17 α réagisse avec la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) et soit ainsi responsable du faible rendement du couplage. ROSNER et BRADLOW (62) "activent" l'hémisuccinate de cortisol en le mettant en contact avec la DCCI en milieu dioxanne ; un précipité de dicyclohexylurée se forme et après filtration, l'ester "activé" est ajouté à l' amino-Sépharose en suspension dans le dioxanne pour permettre la réaction de couplage ; le mécanisme d'une telle "activation" n'est cependant pas expliqué par les auteurs. Il a été démontré que la DCCI peut induire la formation d'un anhydride entre deux molécules d'acide aminé ayant leurs fonctions amines bloquées ; cet anhydride permet un rendement plus élevé dans la synthèse peptidique en phase solide (HAGENMAIER et FRANK) (96). Mais si un tel anhydride se formait entre les fonctions carboxyliques libres de l'hémisuccinate, rien n'empêche théoriquement sa formation entre deux molécules de DCAC ou deux molécules de HCAC. Or, la DCCI entraîne un précipité de dicyclohexylurée avec l'hémisuccinate et avec le DCAC, mais pas avec l'HCAC. La seule différence structurale pouvant expliquer ce phénomène est l'absence d'hydroxyle en 17 α dans l'HCAC.

CUATRECASAS (97) a décrit le couplage de succinylœstradiol à de l' amino-Sépharose en milieu aqueux, à l'aide de carbodiimide hydro-soluble, mais cette technique s'est révélée inapplicable à notre cas particulier et ne permet pas la fixation sur l' amino-Sépharose, ni du DCAC, ni de l' HCAC.

La quantité de sérum à ajouter au HCAC-Sépharose a été déterminée expérimentalement de manière à obtenir une adsorption d'au moins 90 p. 100 de la transcortine totale. Elle peut cependant être augmentée si on se contente d'un pourcentage d'adsorption moindre ; celui-ci est encore de 81 p. 100 lorsque le volume de sérum est triplé.

L'élu-tion de la transcortine est réalisée avec des concentrations en ligands sensiblement identiques dans le gel et dans le tampon (0,5 μ Mole par ml) ; l'équilibre est pourtant déplacé vers le cortisol du tampon. Celui-ci est, en effet, plus accessible et il a, sans doute aussi, une affinité plus forte pour la transcortine que le HCAC-Sépharose.

Parmi les protéines récupérées après chromatographie d'affinité, ROSNER et BRADLOW (62) n'ont observé que la présence de transcortine et d'immunoglobulines par électrophorèse sur papier. TRAPP et al. (63) montrent, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, que leur gel avait retenu de la sérum albumine et d'autres fractions de migration intermédiaire. Nous avons trouvé un résultat similaire à celui de TRAPP, par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Dans leur cas comme dans le nôtre, la transcortine est obtenue pure après une chromatographie sur hydroxyapatite.

Le HCAC-Sépharose présente l'avantage d'être simple à préparer et d'être stable : il n'y a pas de libération de ligand donc pas de perte de transcortine. D'autre part, le HCAC-Sépharose se montre "inusable" à l'emploi ; de nouvelles préparations de gel d'affinité ne sont rendues nécessaires que par les pertes occasionnées lors du fractionnement : environ 200 ml toutes les 50 chromatographies de 4 litres de sérum.

La chromatographie d'affinité est une technique qui tend à remplacer et à compléter de plus en plus les méthodes de fractionnement classiques, grâce à sa simplicité et à son efficacité. Son application à l'isolement de la transcortine était très séduisante, étant donné la complexité et les résultats aléatoires de l'isolement classique. Le HCAC-Sépharose permet d'isoler rapidement des quantités appréciables de transcortine, ce qui nous a permis d'en préciser la composition, d'étudier sa structure et son mode de liaison avec les corticostéroïdes.

Notre technique a maintenant été utilisée avec succès par différentes équipes : BASSET, DEFAYE et CHAMBAZ (117), SAVART (à partir du sérum de veau — communication personnelle), KOCH et al. (à partir du plasma de rat) (42), en France ; STROUPE, HARDING, FORSTHOEFEL et WESTPHAL (79) aux U.S.A.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

- A — PARAMÈTRES PHYSIQUES DIVERS
- B — COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EN OSÉS
ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX
- C — POLYMERISATION
- D — STABILITÉ EN FONCTION DU TEMPS
- E — ÉTUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

Dès 1962, SEAL et DOE (55) (98) purifiaient la transcortine humaine et en définissaient les principaux paramètres physico-chimiques. Depuis, d'autres auteurs se sont attachés à la purifier davantage (SLAUNWHITE et al.) (58) ; (MULDOON et WESTPHAL) (59) ; (SCHNEIDER et SLAUNWHITE) (67), mais les divergences observées entre les compositions en acides aminés et en oses notamment, laissaient présager la présence d'impuretés dans la transcortine obtenue.

De fait, le premier isolement de transcortine sans doute réellement pure a été réalisé par ROSNER et BRADLOW en 1971 par utilisation de la chromatographie d'affinité (62). ROSNER donne peu de renseignements physico-chimiques (62) (64) sur la transcortine isolée, il apporte cependant des résultats originaux. Il démontre en particulier que la transcortine humaine contrairement aux résultats publiés antérieurement, a la propriété de se polymériser si on lui enlève son ligand naturel, le cortisol. Les autres transcortines animales isolées ont également toutes, la faculté de se polymériser (SCHNEIDER et SLAUNWHITE) (67) ; (CHADER et WESTPHAL) (99) ; (CHADER et al.) (100). ROSNER montre aussi que la transcortine qu'il a isolée diffère sensiblement dans sa composition en acides aminés de celles publiées auparavant.

En raison de ces divergences, il nous a paru essentiel de redéfinir l'ensemble des paramètres physico-chimiques et la composition de la transcortine humaine avant d'aborder toute étude de structure : à partir de la transcortine humaine isolée selon la technique de chromatographie d'affinité précédemment décrite, nous avons ainsi étudié ses principaux caractères physico-chimiques et abordé l'étude de sa structure covalente.

A/ PARAMETRES PHYSIQUES DIVERS

.....

1°- Résultats

Constante de sédimentation

.....

La constante de sédimentation a été mesurée à partir d'une solution de transcortine à 10 mg/ml dans un tampon phosphate de sodium 0,005 M - NaCl 0,15 M de pH 6,8 contenant de l'ascorbate de sodium 0,5 mM. Les expérimentations sont réalisées à une température de 4,5°C et à une vitesse de 59.780 tours par minute. Ramenée à une concentration nulle dans l'eau et à 20°C, nous avons déterminé une valeur de 3,66 S pour $S_{20}^{\circ, w}$, donc relativement proche de la valeur déterminée par MULDOON et WESTPHAL (59) qui ont obtenu pour $S_{20}^{\circ, w}$ la valeur de 3,79. La Figure 12 montre le pic de sédimentation à 10 mg/ml 36 minutes et 52 minutes après avoir atteint la vitesse maximum.

Volume spécifique partiel

.....

Le volume spécifique partiel (\bar{V}) est mesuré par pycnométrie à partir d'une solution de transcortine à 9 mg/ml dans un tampon Tris 0,05 M - NaCl 0,2 M, pH 8,0 (Figure 11) ; \bar{V} a été aussi calculé d'après la composition en acides aminés et en oses en appliquant la formule :

$$\bar{V} = \frac{\sum V_i P_i}{\sum P_i}$$

où : V_i : volumes spécifiques partiels des acides aminés et oses constitutifs de la transcortine

P_i : pourcentages respectifs en poids des acides aminés et oses constitutifs de la transcortine.

Les volumes spécifiques partiels des acides aminés étant empruntés à SCHACHMAN (105) et ceux des oses à GIBBONS (106). Les valeurs de \bar{V}

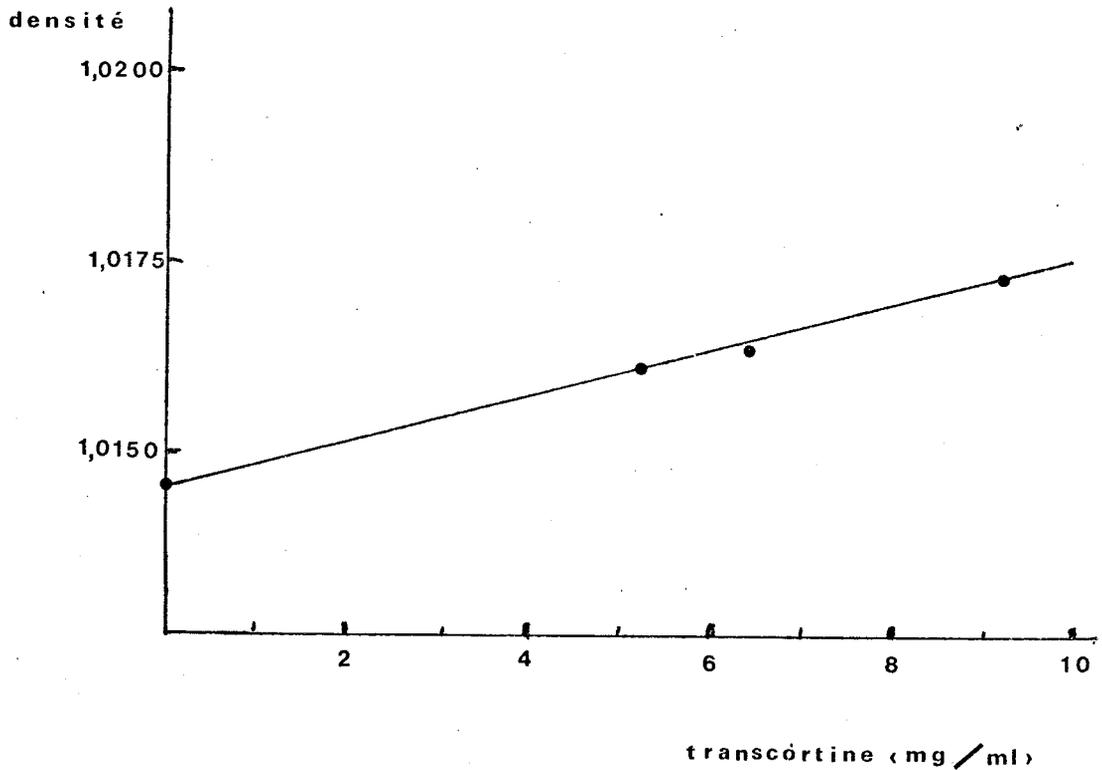


Figure 11 : Densité d'une solution de transcortine en fonction de sa concentration.

Une solution de transcortine à 9,075 mg/ml est préparée dans 2 ml de tampon Tris 0,05 M-NaCl 0,2 M de pH 8,0. Le volume spécifique partiel (\bar{V}) est déterminé par la pente de la droite obtenue $(1 - \bar{V} \rho_1)$ où ρ_1 est la densité du tampon utilisé.



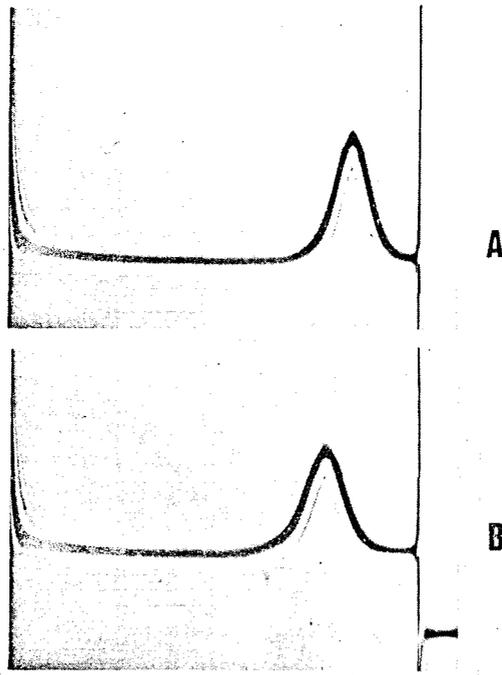


Fig. 12 — Pics d'ultracentrifugation obtenus à partir d'une solution de transcortine à 10 mg par ml dans un tampon phosphate de sodium 0,005 M - NaCl 0,15 M de pH 6,8 contenant de l'ascorbate de sodium 0,5 mM. L'ultracentrifugation est conduite à 4,5°C et à une vitesse de 59.780 tours par minute.

A : Pic obtenu 36 minutes après avoir atteint la vitesse maximum.

B : Pic obtenu 52 minutes après avoir atteint la vitesse maximum.

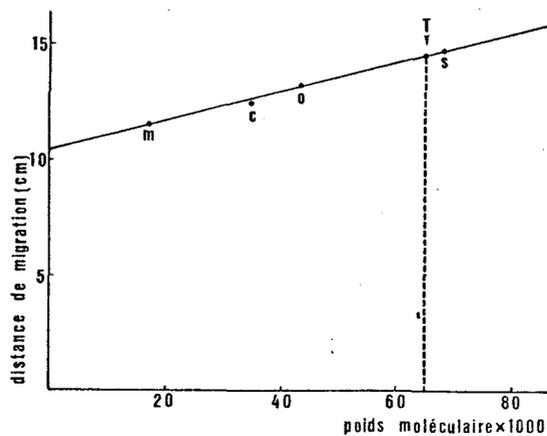


Fig. 13 — Distances de migration de différentes protéines sur couche mince de Sephadex G 75 superfine (0,75 mm d'épaisseur) en tampon Tris 0,05 M - KCl 0,1 M de pH 7,5 contenant 100 mg de cortisol par litre.

m : Myoglobine de porc : P.M. = 17.200
c : carboxypeptidase A de pancréas (Merck) : P.M. = 34.600

o : ovalbumine : P.M. = 43.000
s : sérumalbumine bovine : P.M. = 68.000

La transcortine (T) migre dans la zone de poids moléculaire 65.000.

sont respectivement égales à 0,680 et 0,701 ml par g. Une telle différence entre la valeur expérimentale et la valeur calculée est également observée par SPIRO (107) (108) dans le cas de la fétuine, glycoprotéine ayant une proportion glucidique proche de la transcortine.

Poids moléculaire

.. .. .

Le poids moléculaire est mesuré à partir des valeurs de S_{20}° , w , D_{20}° , w (MULDOON et WESTPHAL) (59) et \bar{V} égal à 0,701. On obtient ainsi 49.500 pour la valeur de M . Il a aussi été estimé par chromatographie en couche mince de Sephadex G75 superfine (Pharmacia) ayant une épaisseur de 0,75 mm sur une plaque de 20 x 40 cm. La migration de 8 heures est réalisée à l'aide d'un tampon Tris 0,05 M - KCl 0,1 M de pH 7,5 contenant 100 mg de cortisol par litre, ce dernier étant destiné à maintenir la saturation en stéroïde de la transcortine et donc d'éviter sa polymérisation. 10 μ l de la solution de transcortine et des solutions témoins de myoglobine de porc, de carboxypeptidase A pancréatique, d'ovalbumine et de sérum albumine bovine à 12 mg/ml sont déposés sur la même plaque. Après migration de 8 heures, le gel est recouvert d'une feuille de papier Whatman 1 et séché sous courant d'air chaud. La feuille de papier est ensuite colorée par le bleu de Coomassie. La Figure 13 montre les distances de migration de la transcortine et des diverses protéines témoins en fonction de leur poids moléculaire ; la transcortine qui ne présente qu'une seule tache a, selon ce diagramme, un poids moléculaire apparent de 65.000. La discordance avec la valeur trouvée par ultracentrifugation n'est pas surprenante ; GIBBONS (106) considère que la gel-filtration ne donne des résultats précis ($\pm 7\%$) que pour les holoprotéines ou glycoprotéines ayant une copule osidique inférieure à 10 p. 100 ; or, nous verrons que la transcortine a une teneur en ose de 27 p. 100.

Coefficient d'extinction

.. .. .

Le coefficient d'extinction est mesuré à l'aide d'une solution de transcortine à 1 mg/ml dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M de

pH 7,4. L'absorbance à 280 nm dans des cuves ayant 1 cm de trajet optique est de 0,707. Le rapport D.O. 280 : D.O. 260 est égal à 1,30. Pour ces déterminations, il est tenu compte des 11,90 % d'eau contenus dans la poudre lyophilisée.

Constante d'affinité

La détermination de la constante d'affinité pour le cortisol est délicate puisqu'il a été démontré que l'enlèvement du stéroïde par gel-filtration à 45°C du complexe transcortine—cortisol pur, provoque une inactivation irréversible de la transcortine (MULDOON et WESTPHAL) (59). Nous avons désaturé partiellement la transcortine par ultrafiltration sous azote à la température du laboratoire, à l'aide du dispositif AMICON ^(°). 5 ml d'un éluat de chromatographie d'affinité à 0,49 mg/ml de transcortine et 3,70 μ g/ml de cortisol sont concentrés à 1 ml en présence de D.T.T. 1 mM ; 6 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4 contenant du D.T.T. 1 mM sont ajoutés dans la cellule d'ultrafiltration et le mélange est à nouveau concentré à 1 ml. On recommence ainsi deux fois l'opération puis le volume est réajusté à 5 ml ; la concentration en transcortine est inchangée mais la solution ne contient plus que 1,04 μ g/ml de cortisol. Cette solution est diluée au cinquième puis 10 ml sont répartis en sacs de dialyse à raison d'un ml par sac. Chaque sac est plongé dans une fiole Packard emplie de 15 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4 contenant du D.T.T. 1 mM et une dose traceuse de 37,5 n.C de cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$ (30 Ci/mmole). Dans 8 de ces fioles, des quantités progressivement croissantes de cortisol sont ajoutées, en double exemplaire : 30, 50, 100 et 200 $\times 10^{-3}$ μ g.

Avant ultrafiltration, la transcortine contenait 7,5 μ g de cortisol par mg de glycoprotéine, c'est-à-dire que la saturation était complète puisque 1 mg de transcortine lie, à saturation 7 μ g de cortisol (1 mole/mole). Après

(°) La désaturation complète du cortisol sans inactiver la transcortine a été rendue possible ultérieurement par incubation du complexe transcortine—cortisol dans une suspension de charbon-dextran à 37°C. Voir p. 88 et appendice technique.

ultrafiltration, il reste 2,6 μg de cortisol par mg de transcortine, soit 34 p. 100. La pente de la droite obtenue sur le diagramme de SCATCHARD (Figure 14) donne une valeur pour la constante d'association à 4°C de $1,5 \times 10^8 \text{ L/M}$.

L'ensemble des paramètres mesurés est récapitulé dans le Tableau VI et comparé aux valeurs données antérieurement pour la transcortine isolée par des méthodes classiques.

2°- Discussion

Le poids moléculaire de 49.500 est un peu inférieur aux valeurs données précédemment (Tableau VI). Il serait encore plus bas si, au lieu d'utiliser le volume spécifique partiel calculé comme l'ont fait MULDOON et WESTPHAL (59), nous utilisons la valeur expérimentale déterminée par pycnométrie (0,680). Le poids moléculaire devient alors égal à 45.500, c'est-à-dire très proche de la valeur théorique calculée en 1962 par SEAL et DOE (55). Ceux-ci considéraient que 8 μg de cortisol étaient liés à 1 mg de leur transcortine purifiée, donc que 360 g (1 mole) de cortisol devaient être liés à 45.000 g de transcortine ; comme il y a un seul site de liaison par molécule, le poids moléculaire devait être égal à 45.000. La valeur de 65.000 trouvée par gel-filtration ne peut pas être considérée comme un chiffre sûr car les glycoprotéines se comportent souvent de façon anormale (WESTPHAL *et al.*) (95). CHADER *et al.* (100) montrent que la transcortine de lapin (29,2 % d'oses) a un poids moléculaire de 34.700 par équilibre de sédimentation alors que la gel-filtration sur Sephadex G 200 donne une valeur de 63.000 ; la différence est donc encore plus importante que celle observée avec la transcortine humaine.

La mesure de la constante d'affinité est délicate car même avec la technique de désaturation douce que nous avons employée pour dissocier partiellement le complexe transcortine-cortisol pur, la transcortine se dénature en grande partie. SCHNEIDER et SLAUNWHITE ont fait remarquer

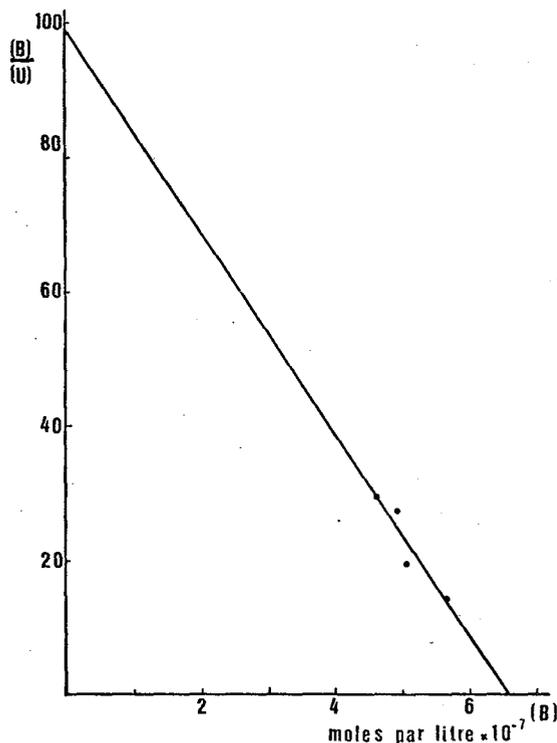


FIG. 14 — Diagramme de Scatchard obtenu par dialyse à l'équilibre à 4°C d'une solution de transcortine à 0,10 mg/ml dans du tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4 (voir le texte pour plus de détails).

TABLEAU VI

Propriétés physiques de la transcortine humaine.

Paramètres	Transcortine isolée par les méthodes classiques			Transcortine isolée par chromatographie d'affinité
	Seal et Doe (55) (19)	Slaunwhite et al. (58) Schneider et Slaunwhite (67)	Muldoon et Westphal (59)	Résultats personnels
$S_{20,w}$	3,0	4,1 (4) 3,16 (6)	—	
$S_{20,w}^0$	—	—	3,79	3,66
\bar{V}	—	0,718 ^d	0,708 ^d	{ 0,701 ^d 0,680 ^e
M	52600 ^a 45000 ^b	58500 ^a (4) 55700 ^a (6)	51700 ^c	49500 ^c
$E_{1\text{ cm}}^{1\% \text{ cont}}$ 280 nm	7,4	7,1	6,45	7,07
D.O.280/D.O.260	1,36	1,31	1,13	1,30
K d'assoc. 4°C (M ⁻¹)	5×10^8	$1,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$

(a) Valeur calculée d'après l'équilibre de sédimentation.

(b) Valeur calculée d'après le contenu en cortisol.

(c) Valeur calculée d'après la valeur de $S_{20,w}^0$.

(d) Valeur calculée d'après la composition en acides aminés et en oses.

(e) Valeur expérimentale mesurée par pycnométrie.



que la détermination de la Kassoc. pour un système capable d'agrégation ne peut être qu'une estimation de la valeur réelle (67). La valeur de la constante d'association déterminée sur la transcortine isolée par méthode classique, donc incapable de s'agréger, était donc peut-être plus facile à mesurer ; nos résultats sont cependant proches de ceux de SCHNEIDER et SLAUNWHITE.

B/ COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET EN OSES

ACIDES AMINÉS N- ET C- TERMINAUX

1°- Résultats

La composition en acides aminés est présentée dans le Tableau VII et comparée à celle donnée par les autres auteurs elle est en bon accord avec celle de ROSNER (64) qui est le seul à avoir fait ces déterminations sur la transcortine isolée par chromatographie d'affinité. Il n'a cependant pas effectué la composition en oses et nous ne pouvons donc comparer la nôtre qu'avec celle donnée par les autres auteurs (Tableau VII).

La chaîne polypeptidique possède une méthionine en position N-terminale ; celle-ci a été mise en évidence par identification du dansyl-amino-acide. L'identification des phénylthiohydantoïnes après passage au Séquenceur de 0,4 μ mole de transcortine native ou S-carboxyméthylée donne la séquence N-terminale suivante :

Met - Asp - Pro - Asn - Ala - Ala - Tyr - Val ...

ROSNER a publié une séquence N-terminale comportant le même nombre d'acides aminés, mais ses résultats diffèrent des nôtres par les deux premiers résidus pour lesquels il trouve : Arg - Glx ...

TABLEAU VII

Composition en acides aminés et en oses de la transcortine humaine
(en nombre de résidus par mole pour un poids moléculaire de 52 000).

Acides aminés	Transcortine isolée par les méthodes classiques			Transcortine isolée par chromatographie d'affinité	
	1962 d'après Seal et Doe(98)	1967 d'après Muldoon & Westphal(59)	1971 d'après Schneider & Staunwhite(67)	1972 Rosner (64)	Résultats personnels
Lys	14	15	15	15	15
His	12	9	8	10	9
Arg	23	10	11	10	9
Asp	35	32	42	32	33
Thr	24	22	25	19	19
Ser	29	27	31	25	24
Glu	47	38	34	27	30
Pro	34	22	18	9	9
Gly	33	19	25	18	16
Ala	35	23	29	22	17
1/2 Cys	1	2	2	*	2**
Val	23	26	26	20	23
Met	4	10	7	10	10
Ile	13	16	16	14	17
Leu	52	41	44	34	34
Tyr	8	10	9	8	9
Phe	19	20	21	17	18
Trp	5	3	3	*	3
Total	411	339	369	290*	295
Oses					
Gal			9	—	17
Man	15	33	9	—	16
Glc			3	—	2
Fuc	3	5	1		1
GlcNAc	6	21	16	—	19
NANA	7	7	6	—	10
Total : p. cent poids sec	13 p. cent	26 p. cent	18 p. cent	—	27 p. cent

(*) 1/2 Cys et Trp non comptés.

(**) Sous forme de cystéine.



L'hydrazinolyse ne permet pas d'identifier l'acide aminé C-terminal puisqu'aucun acide n'est décelable significativement. La carboxypeptidase A n'agit pas sur la S-aminoéthyltranscortine. Son action sur 100 nanomoles de S-aminoéthyltranscortine désialidée montre que la leucine et la valine sont libérées dans les proportions respectives suivantes : 30 et 25 nanomoles après 15 minutes, 35 et 30 nanomoles après 30 minutes, 40 et 40 nanomoles après 120 minutes. Il semble donc que la leucine soit en position C-terminale, suivie immédiatement d'un résidu de valine. La libération de seulement 40 nanomoles à partir de 100 nanomoles de transcortine est sans doute due à une désialidation incomplète.

2°- Discussion

La composition en acides aminés que nous avons déterminée est en bon accord avec celle de ROSNER (64). Elle confirme ainsi la différence importante du taux de proline entre la transcortine isolée par la méthode classique et celle isolée par chromatographie d'affinité. L'acidité de la transcortine montrée par électrofocalisation (VAN BAELEN et DE MOOR) (113) est confirmée par le taux élevé en acides aminés dicarboxyliques et des acides sialiques. La présence de glucose est peut-être due à une adsorption non spécifique sur la molécule de transcortine lors de son isolement ; le sérum avait, en effet, été traité par du charbon-dextran et il est possible qu'une partie de ce dextran se soit hydrolysée et adsorbée sur les protéines du sérum, en particulier sur la transcortine.

La présence d'un seul acide aminé N-terminal et d'un seul C-terminal la non-dissociation de la transcortine en milieu SDS font penser à l'existence d'une seule chaîne polypeptidique par molécule. La séquence N-terminale que nous avons déterminée est différente de celle de ROSNER pour les deux premiers acides aminés. Nous n'expliquons pas cette divergence mais sommes étonnés de la détermination par ROSNER d'un résidu Glx après dégradation d'Edman puisque l'identification des phénylthiohydantoïnes obtenues permet de différencier facilement Glu et Gln.

C/ POLYMERISATION

.....

1°- Polymérisation spontanée

La faculté de polymérisation de la transcortine apparaît importante : elle s'observe déjà après une conservation de 24 h à 4°C d'une solution de transcortine à 10 mg/ml obtenue par concentration du pic d'éluion sur hydroxyapatite (ultrafiltration sous pression d'azote, à 4°C, dans un appareil à micro-ultrafiltration AMICON équipé de membrane DIAFLO, type PM 10).

Pour limiter au maximum cette polymérisation, l'éluat de la chromatographie sur hydroxyapatite est additionné de solution d'acide ascorbique 5 mM tamponnée à pH 6,8 et de solution éthanolique de cortisol à 10 mg par ml pour obtenir des concentrations finales respectives de 0,5 mM et 70 μ g par ml. Il est ensuite ultrafiltré pour obtenir une concentration en transcortine de 10 mg par ml. L'acide ascorbique 0,5 mM est utilisé pour prévenir l'oxydation des groupements thiol de la transcortine, comme l'ont préconisé MULDOON et WESTPHAL (59). L'addition de cortisol permet d'éviter la dissociation du complexe transcortine-cortisol et donc la dénaturation irréversible de la transcortine (SLAUNWHITE et al.) (58) ; (MULDOON et WESTPHAL) (59) lors de l'ultrafiltration. La quantité de cortisol ajoutée est calculée de manière à avoir, après concentration, des quantités équimolaires de transcortine et de cortisol.

Déposée en électrophorèse le jour même de la chromatographie sur hydroxyapatite, la solution concentrée de transcortine (20 μ l) montre une seule zone de migration (Figure 15 B). Après conservation de 24 heures à 4°C et électrophorèse dans les mêmes conditions, une zone mineure de migration plus lente apparaît, elle correspond à la zone 2 sur la Figure 15 C.

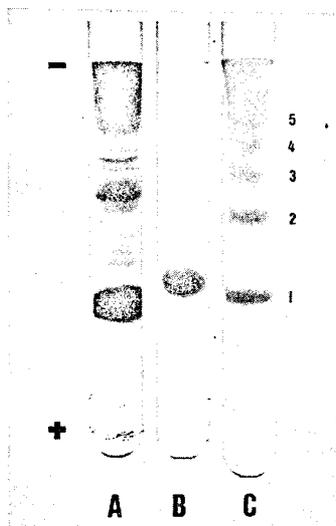


Fig. 15 — *Electrophorèse en gel de polyacrylamide de :*

A : *Sérum humain.*

B : *Transcortine native.*

C : *Transcortine polymérisée par chauffage 15 minutes à 60°C — le chiffre 1 indique la zone du monomère ; les chiffres 2 à 5 localisent les différentes zones de polymères.*

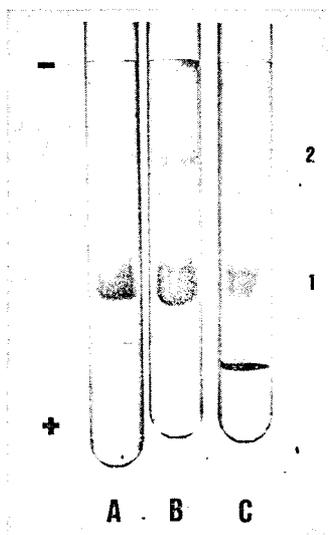


Fig. 16 — *Electrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. de :*

A : *Transcortine dénaturée et réduite par le D.T.T. 20 mM (électrophorèse en milieu D.T.T. 1 mM).*

B : *Transcortine dénaturée ; la zone 1 de migration rapide correspond au monomère.*

C : *S-carboxyméthyltranscortine.*

L'ultracentrifugation a été réalisée simultanément aux électrophorèses sur les mêmes solutions additionnées de chlorure de sodium pour obtenir une concentration 0,15 M. Les valeurs de $S_{20,w}$ calculées sont 3,18 le jour même et 4,45 après 24 heures ; un seul pic symétrique est obtenu dans les deux cas : il semble donc que l'apparente symétrie du pic de sédimentation ne prouve pas l'absence de formes polymériques ; c'est d'ailleurs ce qu'indiquent de façon générale SCHACHMAN (101) et COX (102) et ce qui a été observé pour la transcortine de lapin (CHADER et al.) (100).

2°- Polymérisation provoquée

a) Phénomène de polymérisation

.. .. .

Il a été démontré, depuis 1963, que la transcortine d'un sérum chauffé pendant 15 minutes à 60°C était inactivée irréversiblement (DAUGHADAY et al.) (92). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide d'une solution de transcortine pure ainsi traitée (5 mg/ml dans du tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,4), présente de nombreuses zones de migration (Figure 15 C). Une solution de transcortine native incubée 45 min. avec de l'urée désionisée 5 M, puis dialysée pour éliminer l'urée, donne la même image. L'ultracentrifugation de cette solution montre deux familles moléculaires très hétérogènes sous forme de deux pics mal séparés, asymétriques et très étalés de $S_{20,w} = 4,8$ et 8,6 S. Si l'incubation à 60°C est poursuivie pendant 1 heure, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide montre une diminution de la zone monomère (zone 1 de la Figure 15 C) au profit des zones polymères.

b) Dépolymérisation

.. .. .

Afin de dissocier les agrégats formés, une solution de transcortine dénaturée 15 min. à 60°C (3 mg/ml dans du tampon phosphate 0,05 M - pH 7,4) a été traitée par du SDS à 1 % deux minutes au bain-marie à 100°C, selon les recommandations de WEBER (103), puis déposée directement en gel

de polyacrylamide, le gel et le tampon d'électrophorèse contenant 0,1 % de SDS. 2 zones sont observables dont une majeure correspondant à la transcortine monomère (Figure 16 B). Traitée par du dithiothreitol (DTT) 20 mM en présence de SDS à 1 % pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité, la solution est à nouveau étudiée en gel de polyacrylamide (le gel et le tampon contenant du DTT 1 mM et du SDS à 0,1 %) : une seule zone correspondant à la transcortine monomère apparaît cette fois (Figure 16 A). La zone supérieure (zone de migration lente) dans la Figure 16 B représente donc un polymère obtenu par oxydation des groupements thiol et la formation de pont disulfure, alors que la zone inférieure est constituée de la forme monomère.

c) Rôle des résidus de cystéine

.. .. .

La formation de polymères par pont disulfure est confirmée par réduction de transcortine dénaturée, selon la méthode de KONIGSBERG (104) et carboxyméthylation (voir chapitre technique). La S-carboxyméthyl-transcortine obtenue migre en une zone unique au niveau du monomère par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Figure 16 C).

Les nombres de groupements thiol, dosés en milieu SDS 1 %, par mole de transcortine native et par mole de transcortine dénaturée à 60°C (voir chapitre technique) sont respectivement de 2 et 1,5 ^(°). La dénaturation entraîne donc l'oxydation de 25 % des résidus de cystéine. Ceci est à rapprocher de la lecture densitométrique des zones électrophorétiques de la Figure 16 B : les proportions des zones supérieure et inférieure sont respectivement de 21 % et 79 %.

Après inactivation à 60°C (15 min.) d'une solution de complexe

(°) A la suite d'un changement du mode de collecte du sérum (séjour plus long du sérum à température ambiante), une oxydation spontanée d'un des groupements thiol s'est révélée possible in situ dans le sérum (voir p. 106).

transcortine—cortisol 0,2 mM dans du tampon Tris 0,05 M -HCl, pH 8,0, du dithiothreitol a été ajouté pour avoir une concentration finale de 20 mM. L'incubation est réalisée à l'obscurité, 1 h à température ambiante en présence d'une quantité de cortisol 0,5 mM pour saturer les sites de liaison. Aucune réversion de l'inactivation n'est obtenue (les mesures d'activité sont réalisées selon la méthode au charbon-dextran décrite au chapitre technique). La formation de ponts disulfure n'est donc pas seule à expliquer l'irréversibilité de l'inactivation.

3°- Discussion

Selon les divers auteurs ayant utilisé les méthodes de fractionnement classiques, les transcortines de l'homme et du lapin (CHADER et WESTPHAL) (114) ne semblent pas se polymériser alors que les transcortines du cobaye (67) et du rat (99) se polymérisent si on les dissocie de leur complexe avec le stéroïde. La transcortine de rat présente la particularité de pouvoir se retransformer en monomère si on lui restitue une quantité équimolaire de corticostérone.

Ultérieurement, ROSNER pour la transcortine humaine (64) et CHADER et al. (100) pour la transcortine de lapin constataient leur aptitude à la polymérisation. On peut remarquer qu'il s'agit, cette fois, d'une transcortine humaine isolée par chromatographie d'affinité ; or, nous avons observé aussi cette différence de comportement de la transcortine suivant son mode d'isolement. Par les techniques classiques nous n'avons pas obtenu une transcortine humaine pure puisque au moins un contaminant était décelable par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par immunoélectrophorèse ; cette transcortine ne se polymérisait pas et il semble donc que la présence d'impuretés suffise à empêcher la polymérisation. Nous pouvons remarquer que si la transcortine polymérisée est inactive, il n'en est pas de même pour la sérumalbumine dont le dimère est toujours capable de lier la progestérone (WESTPHAL et HARDING) (115) ; le mode de liaison protéine—stéroïde y est sans doute très différent. La transcortine inactivée par chauffage 15 minutes

à 60°C est composée de nombreux polymères, cependant le monomère existe toujours (zone 1 de la Figure 1 c) et il est, lui aussi, inactif. Le fait qu'il y ait 25 % de cystéines oxydées sur les 2 résidus cystéines que comporte la molécule de transcortine native, laisse supposer la formation d'une mole de dimère ayant ses 4 thiols oxydés (2 ponts disulfure) pour un total de 8 moles de transcortine. Cette proportion correspond en poids de protéine, à un pourcentage du dimère sur la protéine totale de 25 %. Or, la zone électrophorétique supérieure de la Figure 2 B est estimée à 21 % de la transcortine totale déposée : il est donc vraisemblable que cette zone corresponde à un dimère comportant 2 ponts disulfure.

D/ STABILITÉ EN FONCTION DU TEMPS

.....

Des solutions de transcortine à 10 mg/ml ont été conservées durant un mois à 4°C. Leur activité par dialyse à l'équilibre et leur aspect électrophorétique en gel de polyacrylamide ont été étudiés après 1 jour, 3 jours, 11 jours et 30 jours. Trois solvants différents ont été comparés : le premier est constitué par du tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 6,8, le deuxième par le même tampon contenant du DTT 1 mM et le troisième est constitué par du chlorure de sodium 0,15 M.

Une dialyse multiple à l'équilibre est réalisée à partir de 15 μ l de ces solutions diluées avec 3 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4. Des sacs de dialyse en cellophane contenant 1 ml des solutions diluées sont plongés, en double exemplaire, dans 60 ml du même tampon contenant des antibiotiques ^(°) et une dose traceuse de 0,15 μ Ci de cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$. L'ensemble est laissé sous agitation 48 heures à 4°C puis

(°)

Streptomycine 0,02 mg/ml

Pénicilline G 500 U/ml

la radioactivité externe et les radioactivités internes sont mesurées. On constate une diminution du rapport cortisol lié [B] au cortisol libre [U] en fonction du temps, mais il n'y a pas de différence significative entre les trois types de solutions ; par contre, le rapport B/U diminue, pour les 3 solutions, de près de 50 % en 30 jours.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide, aucune différence n'est décelable entre les trois types de solvants. La zone 2 s'accroît peu en fonction du temps, tandis que les zones (3, 4, 5 ...) à peine décelables apparaissent dès le 11^{ème} jour dans les positions de la Figure 17 C. La zone 1 correspondant au monomère tend à devenir plus diffuse avec le temps, ce qui semble traduire la dénaturation de la molécule.

La lyophilisation, après une dialyse rapide (2 h dans un "beaker dialyzer" - voir le chapitre sur l'isolement), du pic élué sur hydroxyapatite, n'entraîne pas de dénaturation. Elle permet de conserver la transcortine sous forme active pendant un temps très long. Aucune perte d'activité n'a été observée après conservation de 3 mois à -70°C .

E/ ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

.....

Etant donné la faculté de polymérisation de la transcortine, il est intéressant d'observer si ce phénomène s'accompagne d'une variation de la structure secondaire. D'autre part, l'affinité de liaison de la transcortine pour le cortisol diminue de façon importante avec le pH, dans le sérum (revue générale), il nous a donc semblé utile de vérifier cette variation d'affinité avec une solution de transcortine pure et d'observer si elle est en rapport avec un changement de la structure secondaire et la faculté de polymérisation.

La structure secondaire a été étudiée par dichroïsme circulaire

en ne tenant compte que de la partie polypeptidique de la molécule de transcortine. Une étude sur l' α_1 -glycoprotéine acide du sérum humain a, en effet, montré que la contribution des chaînes glycaniques à l'activité optique est très faible et peut être négligée (AUBERT et LOUCHEUX-LEFEBVR (116). Or la transcortine ne contient que 27 % d'oses contre 40 % pour l' α_1 -glycoprotéine acide.

La polymérisation a été étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et l'activité par la méthode au charbon-dextran.

Principe du dichroïsme circulaire

1. Action d'un rayonnement UV

.....

Les rayonnements électromagnétiques, dans la zone de l'ultraviolet lointain (140 nm dans le vide) et proche (de 190 à 350 nm), provoquent, en raison de leur énergie, des transitions électroniques. Les molécules contenant des cycles aromatiques, des doubles liaisons conjuguées, des électrons n (hétéro-atomes) et π , plus mobiles que les électrons de liaison σ , fournissent des réponses qui sont les résultantes des comportements des résidus d'acides aminés et de leurs groupements.

Un rayonnement incident UV de longueur d'onde λ entre en compétition avec les vibrations électroniques des chromophores pour lesquels on peut déterminer une longueur d'onde moyenne λ_0 . Au fur et à mesure que λ se rapproche de λ_0 , cette compétition se marque par des effets optiques de plus en plus prononcés (dispersion optique rotatoire, effets Cotton, dichroïsme circulaire). Lorsque $\lambda = \lambda_0$, l'énergie reçue est égale à celle qui est requise pour une transition électronique. L'absorption et l'effet Cotton passent par un maximum, la courbe de dichroïsme circulaire par un point d'inflexion.

La rotation optique du rayonnement incident après passage dans un milieu optiquement actif est donnée par la loi de DRUDE :

$$R = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$$

où

R	est la rotation optique
A	est une constante
λ	est la longueur d'onde du rayonnement incident
λ_0	est la longueur d'onde propre de vibration moyenne des électrons du résidu d'acide aminé moyen.

Cette relation montre bien le changement de sens de la rotation lorsque λ tend vers λ_0 (effet Cotton) .

2. Dichroïsme circulaire

.....

Lorsque le rayon incident polarisé pénètre dans le milieu actif, il se décompose en 2 vecteurs (droit et gauche) qui cheminent l'un et l'autre dans des conditions qui dépendent de la longueur d'onde du rayonnement et du pouvoir d'absorption du milieu. Si la longueur d'onde est proche de la zone d'absorption, un décalage de parcours se manifeste entre les deux vecteurs qui cheminent avec des vitesses inégales. Ils sont inégalement absorbés. Ils se recombinent à la sortie du milieu en une vibration elliptique et non circulaire. La différence entre ces deux absorptions ($E_g - E_d$) caractérise le dichroïsme circulaire. Elle est traduite, en fonction de la longueur d'onde, par une courbe dite de dichroïsme circulaire.

Cette courbe est fonction de l'orientation statistique des groupes chromophores absorbants. Elle permet la diagnose des conformations α hélicoïdale et feuillet plissé β . Leur taux peut être calculé par la mesure de la surface délimitée par la courbe et l'axe des abscisses.

1°- Contribution du cortisol dans les spectres dichroïques de la transcortine

La Figure 17 A montre le spectre UV du cortisol en solution dans l'eau. Le spectre dichroïque correspondant (Figure 17 B) laisse apparaître quatre bandes dichroïques à 320, 290, 236 et 200 nm qui correspondent à des ellipticités respectives de 4×10^3 , $9,5 \times 10^3$, $33,5 \times 10^3$ et 25×10^3 deg. d mole⁻¹ cm².

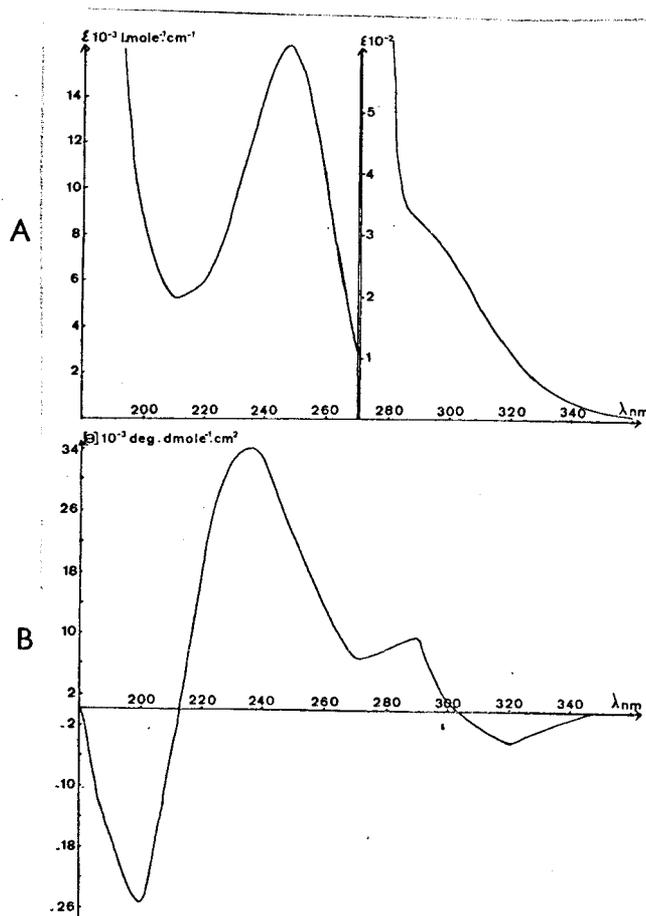


Figure 17

Spectres UV (A) et dichroïque (B) du cortisol en solution dans l'eau

Le spectre dichroïque du cortisol interfère donc avec celui de la liaison amide dans la zone 180 - 240 nm. Les ellipticités molaires du cortisol et du chromophore amide sont comparables mais le complexe transcortine-cortisol est dans un rapport molaire 1 : 1, c'est-à-dire que pour 1 mole de cortisol, il y a 295 acides aminés. La contribution du cortisol peut donc être négligée dans la région du spectre correspondant à la liaison amide.

2°- Transcortine native et transcortine inactivée à 60° C

La transcortine a été étudiée en dichroïsme circulaire sous forme native (complexe transcortine-cortisol) et inactivée à 60° C. Celle-ci est étudiée soit directement (mélange équimolaire transcortine + cortisol), soit après dialyse pour éliminer le cortisol (transcortine sans cortisol).

a) Préparation des échantillons

.. .. .

4 ml de solution de complexe natif transcortine-cortisol à 10 mg/ml dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M de pH 7,6 ont été divisés en deux fractions : l'une (de 1 ml) a été relyophilisée sans traitement préalable (complexe natif transcortine-cortisol), l'autre (de 3 ml) a été dénaturée par incubation à 60° C pendant 30 min. puis 1 ml a été lyophilisé (mélange équimolaire transcortine inactivée + cortisol) ; les 2 ml restant de la deuxième fraction ont été dialysés pendant 48 h contre 100 volumes d'eau distillée puis lyophilisés après avoir vérifié l'absence de cortisol (transcortine inactivée sans cortisol).

La mesure d'activité a été réalisée sur chaque échantillon par la méthode au charbon-dextran. Les échantillons lyophilisés sont dissous, pour étude en dichroïsme circulaire, dans une solution de fluorure de sodium 0,214 M à pH 7,9 ou 7,1.

b) Spectre dichroïque entre 180 et 250 nm

La Figure 18 montre les spectres correspondant à la transcortine native et à la transcortine inactivée ; les taux d'hélicité calculés y diffèrent sensiblement puisqu'ils sont respectivement de 35 % et 22 %. L'inactivation à 60°C s'accompagne donc, non seulement d'une polymérisation, mais aussi d'une diminution du taux d'hélicité.

c) Spectre dichroïque entre 250 et 400 nm

Dans cette région du spectre, les bandes dichroïques ont deux origines : les radicaux d'acides aminés aromatiques et le cortisol. Cette dernière origine est bien sûr exclue dans le cas de la transcortine inactivée sans cortisol.

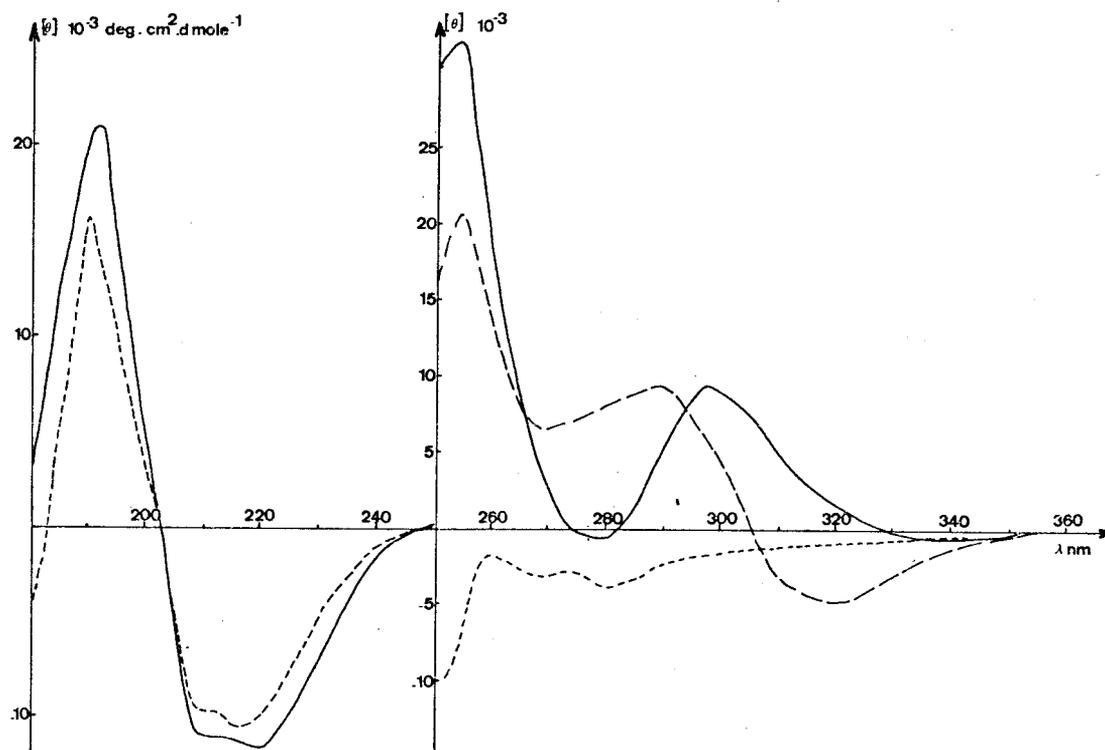


Figure 18 : Spectres dichroïques de la transcortine dans différentes conditions :

Complexe natif transcortine-cortisol (———)

Mélange équimolaire transcortine inactivée à 60°C + cortisol (- - - - -)

Transcortine inactivée à 60°C sans cortisol (.)

Les ellipticités, exprimées en degrés . cm² . décimole⁻¹, sont calculées en prenant comme poids du résidu moyen M = 115 pour la région du spectre correspondant à la liaison amide (180-250 nm) et M = 36135 (poids moléculaire de la copule polypeptidique) pour la région du spectre correspondant aux chromophores extrinsèques (250-360 nm).

Le spectre du mélange équimolaire (transcortine inactivée + cortisol) présente des analogies importantes avec celui du cortisol seul (bandes à 290 et 320 nm - Figure 17). Si on y soustrait le spectre de la transcortine inactivée sans cortisol (Figure 18), on retrouve exactement les positions des pics et les amplitudes des bandes dichroïques correspondant au cortisol seul. Le spectre du complexe natif transcortine-cortisol, par contre, présente des différences importantes par rapport à celui du cortisol (Figure 18) : la bande négative à 320 nm n'existe pas et le pic à 290 nm est déplacé à 297 nm ; un épaulement est, de plus, observable à 305 nm.

Il est possible que le pic à 297 nm du complexe natif transcortine-cortisol corresponde à celui observé à 290 nm pour le cortisol libre. Ce glissement de longueur d'onde pourrait être dû à une modification électronique entraînée par la liaison du cortisol à la protéine. L'épaulement détecté à 305 nm pourrait, lui, provenir d'un résidu de tryptophane impliqué dans le site de liaison au cortisol ; les bandes dichroïques dues à ces radicaux sont, en effet, généralement observées dans cette région du spectre.

3°- Etude en fonction du pH

a) Activité et polymérisation

.....

= Préparation des solutions de transcortine

5 mg de complexe natif transcortine-cortisol sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,4 ; ensuite 1 μ Ci de cortisol [$1,2 - ^3\text{H}$] (activité spécifique : 30 Ci/m mole) est ajouté. Le mélange est incubé 90 min. à 37°C pour atteindre l'équilibre entre la transcortine et le cortisol [^3H] . Il est alors divisé en cinq aliquots de 0,2 ml qui sont ajustées au pH désiré avec NaOH 1 M ou HCl 1 M ; la mesure est réalisée à l'aide de bandelettes de pH à grande sensibilité (0,2 unités pH - Merck).

Les différentes solutions sont utilisées immédiatement :

- 15 μ l de chaque solution sont déposés pour une électrophorèse en gel de polyacrylamide.
- 100 μ l sont dilués avec 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M amené au même pH, à 0°C, et additionnés de 0,5 ml de suspension de charbon-dextran au même pH et à 0°C pour mesurer le cortisol lié (voir le chapitre technique).

= Résultats et discussion

Sur les gels de polyacrylamide, une zone très faible, qui n'est pas visible sur la photo (Figure 19) apparaît progressivement au-dessus de la zone monomère quand le pH diminue de 8,0 à 5,0. A pH 4,0, cette zone augmente brutalement et 2 ou 3 nouvelles zones apparaissent au-dessus (Figure 19). L'aspect à pH 4 rappelle celui obtenu avec la transcortine inactivée par la température de 60°C ou par l'urée et est dû à une polymérisation.

Les mesures d'activité montrent que le maximum de capacité de liaison est obtenu à pH 8,0 et que cette capacité diminue lorsque le pH diminue (Tableau VIII). Par rapport à la capacité à pH 8,0, la perte d'activité est de 93 % à pH 4,0; l'inactivation, comme la polymérisation, est alors irréversible sauf si le pH est neutralisé dans les secondes qui suivent l'inactivation : quand l'échantillon à pH 4 (100 μ l) est dilué immédiatement avec 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4 et non avec le tampon de pH 4, l'inactivation n'est plus que de 52 %.

Il est intéressant de remarquer que le pH 4 correspond au point isoélectrique du complexe transcortine-cortisol [^3H]; celui-ci a été déterminé par VAN BAELEN et DE MOOR (113) en localisant la radioactivité après isoélectrofocalisation d'un sérum humain marqué avec du cortisol [^3H]. Or il est connu que les protéines sont souvent instables au voisinage de leur point isoélectrique. La transcortine a d'ailleurs tendance à précipiter lorsqu'elle est en solution à pH < 4 .

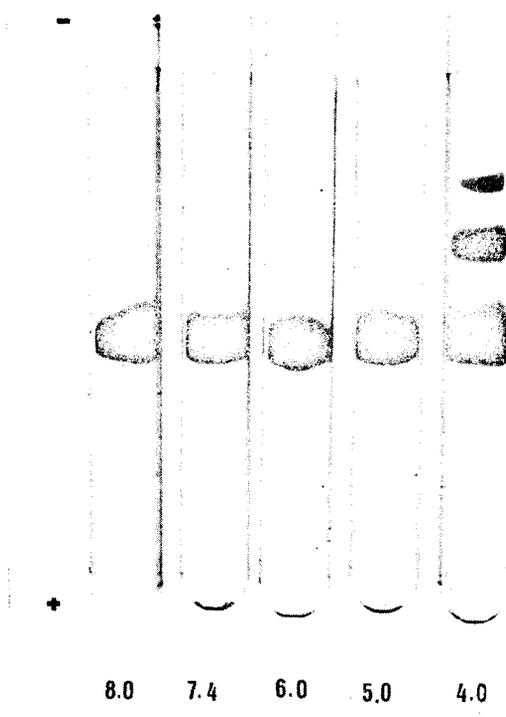


Figure 19 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la transcortine
(75 μ g) en solution à différents pH

TABLEAU VIII

Variations de la capacité de liaison de la transcortine avec le pH

pH	Cortisol lié , C P M	Pourcentage d'inhibition
8,0	12 773	0
7,4	11 563	9
6,0	11 543	10
5,0	8 881	31
4,0	909	93



b) Dichroïsme circulaire

.. .. .

Les spectres dichroïques ont été conduits dans une zone de pH allant de 7,9 à 4 (Figure 20). Les analyses des spectres en terme de structures en hélice α et feuillet plissé β sont données dans le Tableau IX. Le pourcentage de conformation β est nul pour les pH les plus élevés (7,9 - 7,2 et 6,5), il augmente en deçà de 6,5 rapidement puisqu'il est égal à 31 % pour le pH de 5,9. Cette augmentation correspond à une plus grande organisation de la structure protéique puisque, dans les mêmes conditions, le pourcentage d'hélices α diminue seulement de 5 %. En deçà de pH 5,9, le pourcentage de structure β reste approximativement constant alors que celui d'hélices α diminue.

Dans la zone de longueurs d'onde allant de 250 nm à 400 nm, les spectres sont parfaitement superposables pour les pH 7,9 - 7,2 et 6,5, ils correspondent à celui obtenu avec le complexe natif transcortine-cortisol de la Figure 18. Quand le pH diminue en deçà de 6,5, la forme du spectre varie. A pH 5, de nouvelles bandes apparaissent : les bandes positives à 305 et 315 nm sont peut-être dues à des transitions électroniques du tryptophane et celle à 325 nm au cortisol qui présente normalement une bande négative dans cette région.

4°- Conclusion

Les résultats obtenus peuvent être ainsi résumés :

- = L'inhibition de la capacité de liaison de la transcortine se produit essentiellement entre pH 5 et pH 4. C'est également dans cette étroite zone de pH que se produit une polymérisation.
- = Une réorganisation de la structure protéique avec apparition d'un grand pourcentage de structure β est observée lorsque le pH diminue en deçà

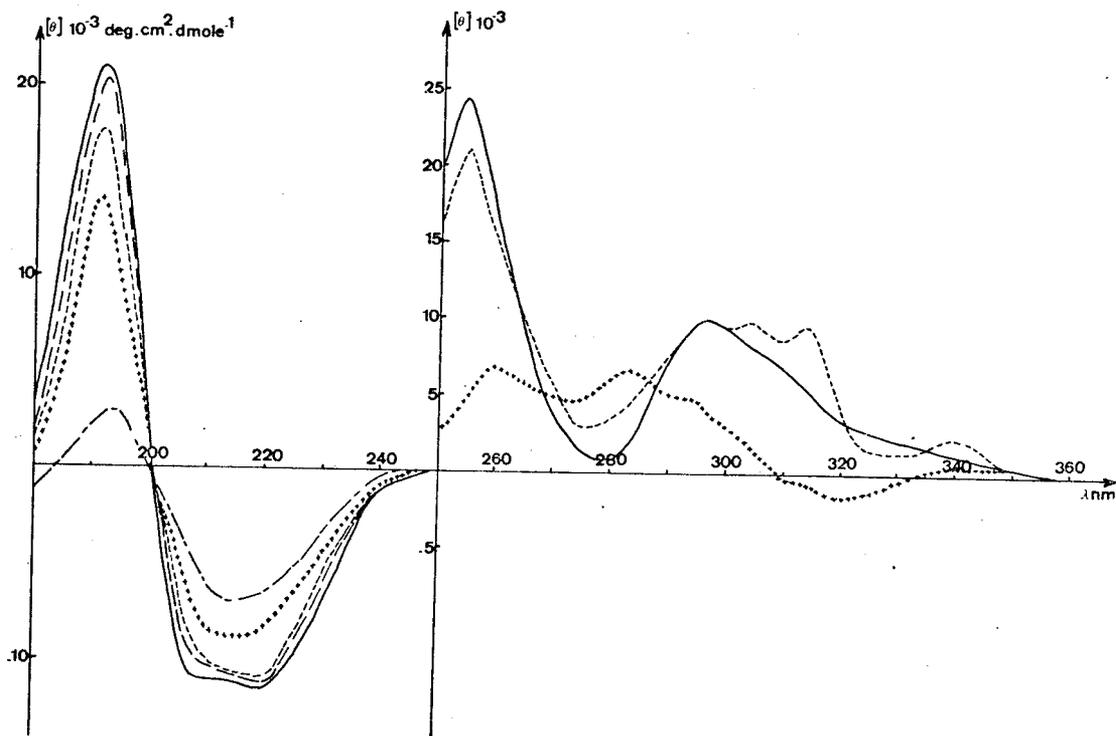


Figure 20 : Spectres dichroïques du complexe natif transcortine-cortisol à différents pH : pH 7,9 - 7,2 et 6,5 (—————) ; pH 5,9 (- - - -) ; pH 5 (- - - -) ; pH 4,5 (+ + + +) ; pH 4 (.). θ est exprimé comme dans la Figure 18.

TABLEAU IX

Structure secondaire de la transcortine à différents pH

pH	Pourcentage de structure hélicoïdale	Pourcentage de structure
7,9		
7,2	36	0
6,5		
5,9	31	31
5,0	28	32
4,5	18	35



de 6,5 . Elle se produit entre pH 6,5 et pH 5,9, donc dans une zone de pH où la transcortine n'est encore ni inactivée, ni polymérisée.

- = La baisse brutale d'activité à bas pH semble donc être en rapport avec la disparition d'une région hélicoïdale bien définie.

CHAPITRE IV

ETUDE DU SITE DE LIAISON AU CORTISOL

A — MARQUAGE D'AFFINITE

B — MARQUAGE A L'AIDE DE REACTIFS
SPECIFIQUES D'UN TYPE D'ACIDE AMINE

1° Cystéine

2° Histidine et tyrosine essentiels



Les propriétés de la liaison transcortine-stéroïde ont été abondamment étudiées depuis sa mise en évidence dans le sérum humain en 1956 par DAUGHADAY et al. (6). Cependant ces études ont été surtout réalisées sur le sérum lui-même et non sur la transcortine isolée (voir la revue générale). Parmi les travaux utilisant la transcortine isolée figurent, en particulier, la mesure de la constante d'association à différentes températures et un essai de désialidation réalisé par MULDOON et WESTPHAL (59) ; ceux-ci montrent que l'enlèvement des acides sialiques ne modifie pas significativement l'affinité de liaison de la transcortine.

Plus récemment, une corrélation entre la capacité de liaison au cortisol, la structure secondaire et la faculté de polymérisation a été recherchée lorsque le pH varie et lors de l'inactivation par la chaleur (LE GAILLARD et al.) (81). Les effets du pH et de la température ont aussi été étudiés sur la liaison au cortisol et à la progestérone par des méthodes à l'équilibre (CHAN et SLAUNWHITE) (82) ; (STROUPE et al.) (79) et des méthodes cinétiques (STROUPE et al.) (79).

Aucune étude directe pour mettre en évidence les acides aminés impliqués dans la liaison au cortisol n'avait cependant été réalisée. Après notre travail sur les propriétés physico-chimiques de la transcortine, en particulier celles de la liaison transcortine-cortisol, il nous a donc semblé logique de le poursuivre en étudiant plus particulièrement le site de liaison.

Nous avons employé deux méthodes de principe différent mais complémentaires :

L'une, le marquage d'affinité, permet l'étude spécifique du site actif d'une enzyme en utilisant un analogue du substrat. Sur celui-ci est greffé un groupement fonctionnel réactif capable de réagir avec un acide aminé nucléophile, dans le site actif, en formant une liaison covalente. Le marquage d'affinité est donc bien spécifique du site actif ; il ne permet pas

de s'assurer du rôle essentiel de l'acide aminé mais permet sa localisation dans une région définie du site : celle accessible au groupement réactif greffé sur la molécule de substrat.

L'autre méthode consiste à utiliser un réactif spécifique d'un type d'acide aminé, ce réactif modifiera de préférence les acides aminés les plus accessibles ou situés dans un environnement favorable à leur réactivité ; c'est souvent le cas des acides aminés du site actif d'une enzyme. Cependant d'autres acides aminés du même type, s'ils sont présents à la surface de la protéine, peuvent aussi être modifiés, il faudra alors choisir des conditions de réaction défavorables de manière à ne modifier que le ou les acides aminés les plus réactifs, la grande réactivité étant souvent une des caractéristiques d'un acide aminé essentiel. Etant donné le faible encombrement stérique généralement apporté par les réactifs spécifiques, toute perte d'activité à la suite de la modification chimique d'une enzyme pourra faire suspecter la réaction avec un acide aminé essentiel.

A/ MARQUAGE D'AFFINITE

.....

1°- Introduction

Le marquage d'affinité a été utilisé avec succès à l'aide de marqueurs stéroïdiens sur trois stéroïde-déshydrogénases. Deux ont été étudiées par CRASTES DE PAULET, DESCOMPS et leur équipe à Montpellier : la 17 β -œstradiol-déshydrogénase du placenta humain avec des dérivés iodo acétoxy- de l'œstrone (PONS et al.) (118-120) ; la 3 α -hydroxy-stéroïde-déshydrogénase de "Pseudomonas Testosteroni" avec le 12 α -iodo-acétoxy 5 β -prégnane 3,20 -dione et le 17 β -bromoacétoxy 5 α -androstane

3-one (BATTAIS et al.) (121). La troisième enzyme, la 20 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase de "Streptomyces Hydrogenans", a été étudiée par WARREN et son équipe, aux U.S.A., avec des dérivés bromoacétoxy- de la progestérone (SWEET et al.) (122) ; (ARIAS et al.) (123) ; STRICKLER et al.) (124) et un dérivé bromoacétylaminé de la progestérone (SWEET et al.) (125).

Nous avons appliqué le marquage d'affinité à la transcortine, en utilisant des hydroxystéroïdes estérifiés par l'acide bromoacétique $[2 - {}^{14}\text{C}]$. (LE GAILLARD et DAUTREVAUX) (131). Le bromoacétoxy-stéroïde $[{}^{14}\text{C}]$ obtenu est ajouté en excès à une solution de complexe transcortine-cortisol $[{}^3\text{H}]$. Il déplacera d'autant plus rapidement le cortisol lié que son affinité pour la transcortine sera grande ; la réaction se fait en deux étapes (Fig. 21 A) — la première est réversible, elle correspond au déplacement du cortisol, — la deuxième est irréversible, elle correspond à la formation d'une liaison covalente avec départ de HBr.

Après adsorption des stéroïdes libres sur charbon-dextran, la détermination des radioactivités liées $[{}^{14}\text{C}]$ et $[{}^3\text{H}]$ permet de suivre la cinétique de la réaction. Le cortisol $[{}^3\text{H}]$ diminue alors que le stéroïde alkylant $[{}^{14}\text{C}]$ augmente, la somme des deux reste constante lorsque le marquage est spécifique. La proportion de stéroïde lié covalentiellement est déterminée par mesure de la radioactivité liée après inactivation de la transcortine à 60°C. L'acide aminé modifié peut être identifié sous forme de carboxyméthyl-amino-acide radioactif après hydrolyse totale par HCl 5,6 N.

Plusieurs stéroïdes bromoacétylés ont été préparés selon la méthode de BUZAS et al. (126) modifiée par PONS et al. (120) (127) à partir de stéroïdes hydroxylés à des positions diverses sur le noyau androstène (Figure 21 B). Il a été démontré que les esters obtenus sont stables dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 7,0 pendant 24 heures. Dans ces conditions, ils sont capables d'alkyler seulement la cystéine, la méthionine et l'histidine (SWEET et al.) (122) ; (ARIAS et al.) (123).

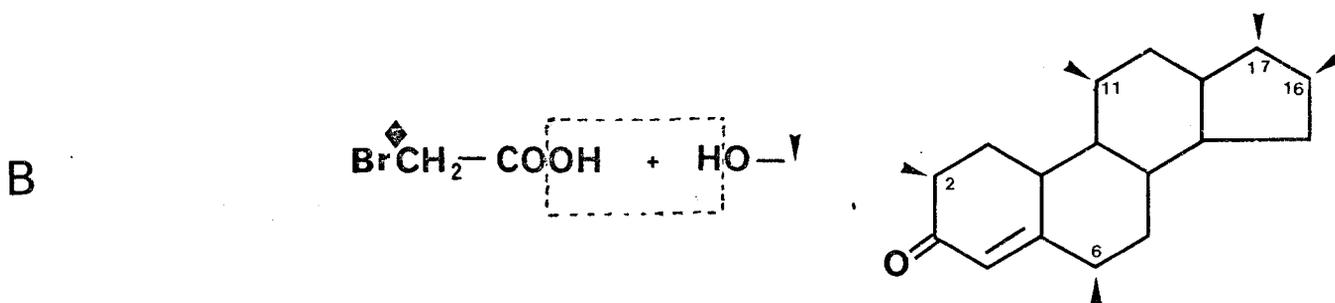
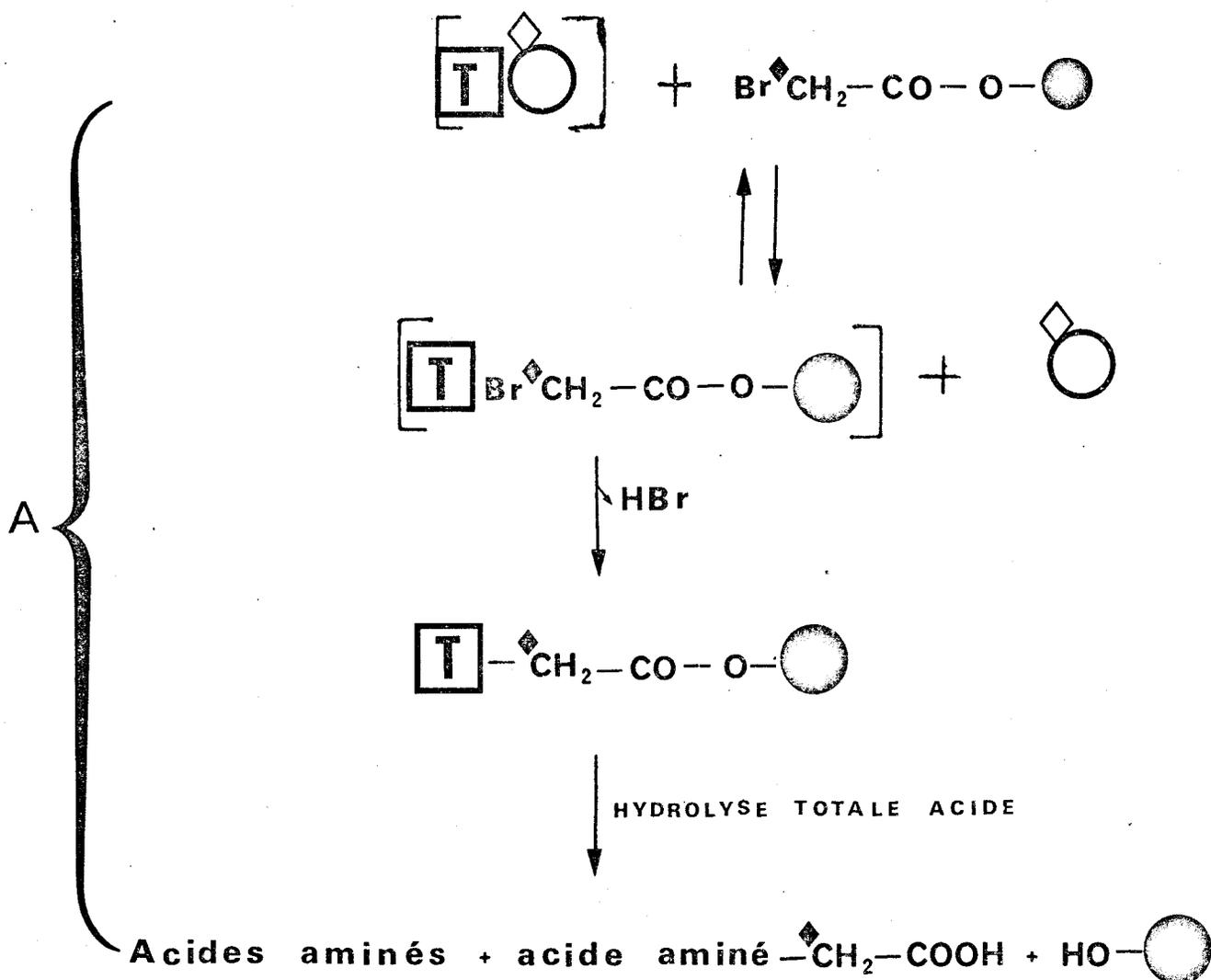


Figure 21 A: Mécanisme de marquage d'affinité de la transcortine (T) en présence de cortisol [3H] (○) par un bromoacétoxy [^{14}C] (◆) stéroïde (●)

B : Différentes positions (▼) du radical hydroxyle (▼-OH) sur le noyau stéroïde, ayant été utilisées pour la préparation de bromoacétoxy-stéroïdes.

2°- Résultats (LE GAILLARD et DAUTREVAUX) (131)

a) Influence des réactifs des groupements thiol et de l'acide bromo-
acétique sur l'activité liante

Les groupements thiol sont très réactifs, ils sont donc susceptibles d'interférer dans n'importe quel marquage si la molécule de transcortine en possède à sa surface. Or la transcortine contient 2 résidus cystéine par molécule, tous deux sous forme réduite. Les deux groupements thiol ont été déterminés sur de la transcortine traitée par le dodécylsulfate de sodium (SDS) à 2 % de manière à déplier la chaîne polypeptidique (voir le chapitre précédent). Pour déterminer la réactivité de ces groupements thiol quand la chaîne polypeptidique est dans sa conformation native, le dosage a été réalisé sur de la transcortine native non traitée : aucun groupement thiol n'est alors détectable, il semble donc que les deux groupements thiol sont masqués dans la transcortine native ^(°).

L'action possible, sur l'affinité de liaison, de réactifs modifiant les groupements thiol a été étudiée en ajoutant, à une solution de complexe transcortine-cortisol [³H], les réactifs suivants : l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque, le parachloromercuribenzoate de sodium ou l'acide bromo-acétique. L'action de ce dernier réactif est importante puisque le marquage d'affinité est réalisé avec des hydroxystéroïdes bromoacétylés.

L'acide dithio-bis-nitrobenzoïque a été ajouté à une solution de complexe transcortine-cortisol [³H] (2,5 Ci/mole) 10×10^{-6} M dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 8, de manière à avoir un rapport molaire réactif / protéine égal à 40 ; l'incubation est réalisée 20 heures à température ambiante. Le parachloromercuribenzoate a été ajouté à une

^(°) Il a été démontré ultérieurement qu'un seul groupement thiol est inaccessible, l'autre est oxydé (oxydation se produisant apparemment dans le sérum, durant la collecte dans les laboratoires d'analyses (voir p.106))

solution identique mais à pH 7, le rapport molaire réactif / protéine est égal à 2 ; l'incubation est réalisée pendant 4 h. Le traitement par l'acide bromoacétique a été réalisé dans les conditions du marquage d'affinité : incubation 2 h à 37° C avec une solution de complexe transcortine-cortisol $[^3\text{H}]$ 5×10^{-6} M dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7 mais le rapport molaire réactif / protéine utilisé est beaucoup plus élevé (100 au lieu de 4).

La mesure de la radioactivité liée, par la méthode au charbon-dextran, ne permet de déceler aucune diminution de la capacité de liaison au cortisol après traitement par ces trois réactifs. Deux renseignements importants sont donc obtenus : d'une part, la protection des groupements thiol de la transcortine est inutile avant de procéder à un marquage ; d'autre part, si l'addition d'un stéroïde bromoacétylé entraîne une diminution du cortisol lié à la transcortine, il est vraisemblable qu'il s'agit d'un déplacement spécifique puisque l'acide bromoacétique seul, est sans action.

b) Influence d'une modification des stéroïdes au niveau des cycles A et B

 sur l'activité liante

α) 2- et 6- hydroxydérivés de la progestérone

L'affinité des 2 α - et 6 β hydroxy-progestérones pour la transcortine a été déterminée avant bromoacétylation ; elle a été comparée à celles de la progestérone et de la 11 α -hydroxyprogestérone qui sont connues comme étant des compétiteurs du cortisol. 20 μl de la solution éthanolique de stéroïde 5×10^{-4} M ont été ajoutés à 1 ml de solution de complexe transcortine-cortisol $[^3\text{H}]$ (2,5 Ci/mole). Un témoin est réalisé avec 20 μl d'éthanol ajoutés à la même quantité de complexe transcortine-cortisol $[^3\text{H}]$. Après incubation 2 h à 37° C, le cortisol lié est mesuré par la méthode au charbon-dextran. Les pourcentages de cortisol déplacé par les 2 α -, 6 β -, 11 α -hydroxyprogestérones et progestérone sont respectivement : 0 - 20 - 35 et 43 %.

Comme la 6 β -hydroxyprogestérone déplace le cortisol, elle peut

être considérée comme un marqueur d'affinité potentiel après bromo-acétylation. Au contraire, la 2 α -hydroxyprogesterone ne déplace pas le cortisol, elle ne peut donc pas être utilisée pour le marquage d'affinité.

(β) Marquage avec les 6 α - et 6 β -bromo acétoxy-
 $[2 - {}^{14}\text{C}]$ progestérones

5 mg (10^{-7} mole) de complexe transcortine-cortisol ont été dissous dans 20 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M - NaCl 0,2 M, pH 7 contenant 10^{-6} Ci de cortisol $[1,2 \text{ }^3\text{H}]$ (30 Ci/m mole). La solution est incubée à 37°C pendant 90 min. pour permettre au cortisol $[{}^3\text{H}]$ de s'équilibrer avec la transcortine, elle est ensuite divisée en 2 portions de 10 ml : à une portion est ajouté 0,1 ml de solution éthanolique de 6-bromoacétoxy $[{}^{14}\text{C}]$ progestérone 2 mM de manière à obtenir un rapport molaire stéroïde alkylant / complexe transcortine-cortisol de 4 ; à l'autre portion, tenant lieu de blanc, 0,1 ml d'éthanol absolu est ajouté. Les deux portions sont incubées à 37°C puis des aliquots de 1 ml sont prélevés à des temps différents compris entre 0 et 24 h pour mesurer les stéroïdes liés totaux (cortisol $[{}^3\text{H}]$ et 6-bromo-acétoxy $[{}^{14}\text{C}]$ progestérone) par la méthode au charbon-dextran.

Ni la 6 α -, ni la 6 β -bromo acétoxyprogesterone n'est capable de déplacer le cortisol de la transcortine dans ces conditions. D'autres conditions de réaction ont été essayées : un pH plus élevé (8 au lieu de 7), des rapports molaires 6-bromoacétoxy progestérone / cortisol plus importants (6 à 40 au lieu de 4) et la réaction sur de la transcortine libre au lieu du complexe transcortine-cortisol.

Pour ce dernier essai, la transcortine libre a été obtenue par la méthode au charbon-dextran utilisée pour les mesures d'activité mais la température d'incubation est de 37°C au lieu de 0°C. Une telle augmentation de la température s'est révélée efficace pour enlever 90 à 95 % du cortisol lié à la transcortine sans inactivation. Dans toutes ces conditions, la transcortine garde la même capacité de liaison au cortisol bien qu'il

y ait adsorption de 6 - bromoacétoxy progestérone. La 6 α - et la 6 β - bromoacétoxy progestérone ne permettent donc pas un marquage spécifique de la transcortine.

c) Marquage d'affinité avec les stéroïdes modifiés au niveau des cycles C et D

α) 11 α -bromoacétoxy [$^2 - ^{14}C$] progestérone

Quand le complexe transcortine-cortisol [3H] est incubé avec la 11 α -bromoacétoxy [^{14}C] progestérone dans les conditions initialement décrites pour la 6-bromoacétoxy progestérone (rapport molaire stéroïde alkylant / transcortine = 4 ; pH = 7 ; 37° C), il apparaît une diminution du cortisol lié et une augmentation de la 11 α -bromoacétoxy progestérone en fonction du temps (Tableau X) : la 11 α -bromoacétoxyprogestérone est donc capable de déplacer le cortisol lié à la transcortine. La libération du cortisol n'est pas due à une dénaturation de la transcortine puisqu'un blanc sans 11 α -bromoacétoxyprogestérone ne montre pas de diminution détectable de l'activité pendant 24 h à 37° C.

La quantité totale de stéroïdes liés (cortisol + 11 α -bromoacétoxy-progestérone) reste constante pendant les 7 premières heures avec une valeur moyenne de 0,86 mole de stéroïde par mole de transcortine (Figure 22). La raison pour laquelle il n'est pas retrouvé exactement 1 mole de stéroïde par mole de transcortine est probablement due aux erreurs expérimentales et à la présence d'une petite quantité de transcortine dénaturée.

Si l'incubation avec la 11 α -bromoacétoxyprogestérone est poursuivie au-delà de 7 h, la quantité totale de stéroïdes liés augmente légèrement : 1,06 mole après 24 h. Ceci reflète probablement une adsorption non spécifique à la surface de la protéine, à l'extérieur du site de liaison, lorsque le temps de réaction est trop long. Nous avons considéré que le temps de 7 h est optimum.

TABLEAU X : CINÉTIQUE DU DÉPLACEMENT DU CORTISOL LIÉ À LA TRANSCORTINE PAR LES STÉROÏDES ALKYLANT (°)

Temps de Réaction	11 α -Bromoacétoxyprogestérone		17 β -Bromoacétyltestostérone		16 α -Bromoacétoxyprogestérone	
	Cortisol lié	Analogue hormonal lié	Cortisol lié	Analogue hormonal lié	Cortisol lié	Analogue hormonal lié
0 min	0,86	0	0,95	0	0,95	0
15 min	0,55	0,34 (0.10)	0,68	0,24 (0.15)	0,36	0,56 (0.42)
30 min	-	-	0,58	0,39 (0.25)	0,05	0,91 (0.69)
1 h	0,44	0,43 (0.24)	0,42	0,52 (0.28)	0,04	0,94 (0.78)
2 h	0,37	0,49 (0.32)	0,31	0,67 (0.37)	-	-
3 h	0,31	0,56 (0,37)	0,33	0,86 (0,45)	0	0,98 (0,80)
5 h	0,22	0,60 (0,41)	-	-	0	1,02 (0,82)
7 h	0,19	0,65 (0,43)	0,33	0,96 (0,60)	-	-
24 h	0,10	0,96 (0,69)	0,32	1,40 (0,92)	0	1,42 (1,10)

(°) Les résultats sont exprimés sous forme de rapport molaire stéroïde lié/transcortine. Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à l'analogue hormonal lié covalentiellement. Après 7 h pour la 11 α -bromoacétoxyprogestérone, 2 h pour la 17 β -bromoacétyltestostérone et 5 h pour la 16 α -bromoacétoxyprogestérone, la somme des stéroïdes liés (cortisol + stéroïde alkylant) augmente : l'excès est dû à une adsorption non spécifique sur la transcortine.



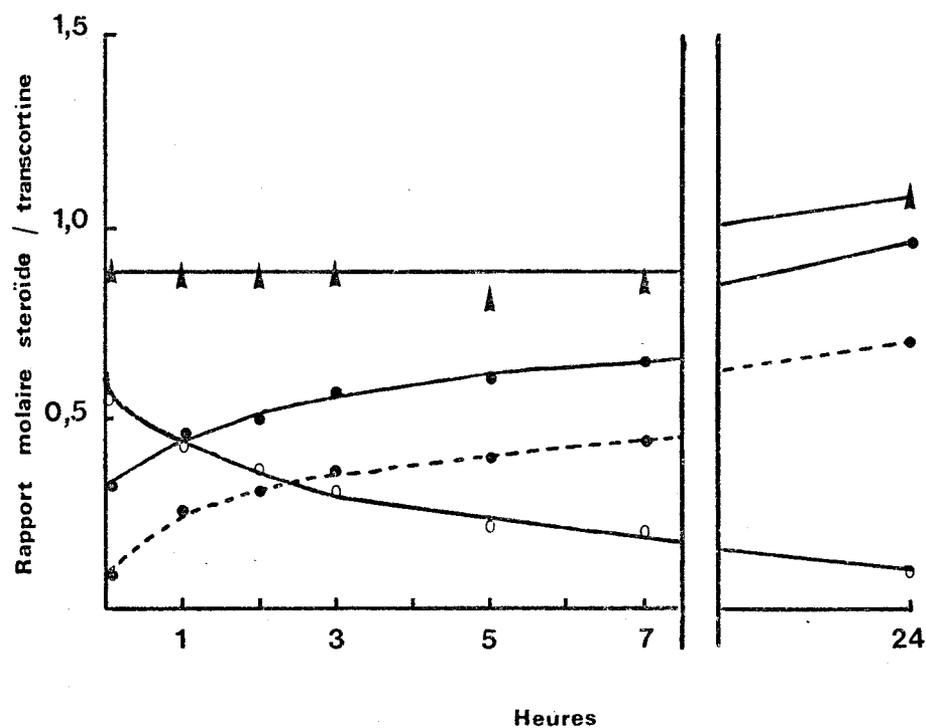
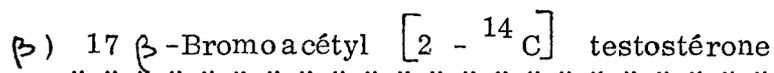


Figure 22 : Cinétique du marquage d'affinité du complexe transcortine-cortisol ($5 \times 10^{-6}M$) avec la 11 α -bromoacétoxyprogesterone ($20 \times 10^{-6}M$) à pH 7.

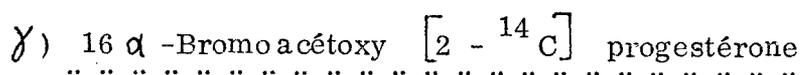
Le cortisol lié (○ — ○) diminue en fonction du temps alors que la 11 α -bromoacétoxyprogesterone liée (● — ●) augmente. La quantité totale de stéroïdes liés (▲ — ▲) reste constante pendant les 7 premières heures, puis elle augmente ; un marquage spécifique est donc obtenu pendant les 7 premières heures. La 11 α -bromoacétoxyprogesterone liée covalentiellement est indiquée en pointillé (• — — — •).

Pendant ce temps de 7 h , le déplacement du cortisol et l'incorporation de 11 α -bromoacétoxy progestérone sont stœchiométriques : l'incorporation d'une mole d'analogue hormonal correspond à la libération d'une mole de cortisol. La transcortine libère 78 p. 100 de son cortisol lié après 7 h de réaction et une mole est alkylée par 0,43 mole d'analogue hormonal (environ 66 p. 100 de la 11 α -bromoacétoxy progestérone liée) (Tableau X).



Dans les mêmes conditions, la 17 β -bromoacétyl testostérone déplace une quantité plus faible de cortisol après 24 h que ne l'avait fait la 11 α -bromoacétoxyprogestérone ; cependant la vitesse de déplacement est un peu plus importante : le pourcentage de cortisol déplacé atteint un plateau à 68 p. 100 après 2 h d'incubation avec la 17 β -bromoacétyl-testostérone alors qu'avec la 11 α -bromoacétoxyprogestérone ce pourcentage n'est que de 58 p. 100 mais il continue à augmenter jusqu'à 88 p. 100 au bout de 24 h .

La quantité totale de stéroïdes liés (cortisol + 17 β -bromoacétyl-testostérone) reste constante pendant les 2 premières heures avec une valeur moyenne de 0,95 mole de stéroïde par mole mais elle augmente ensuite avec le temps : 1,29 mole après 7 h et 1,72 mole après 24 h (Figure 23). Un marquage non spécifique se produit probablement lorsque le temps de réaction est prolongé au-delà de 2 h. Nous avons donc considéré que le temps de 2 h est optimum. Au bout de ce temps, le pourcentage de cortisol déplacé atteint un plateau à 68 p. 100 et la transcortine est alkylée par l'analogue hormonal dans une proportion de 0,37 mole par mole de transcortine (environ 56 p. 100 de la 17 β -bromoacétyltestostérone liée) (Tableau X).



La 16 α -bromoacétoxy progestérone est le meilleur ligand compé-

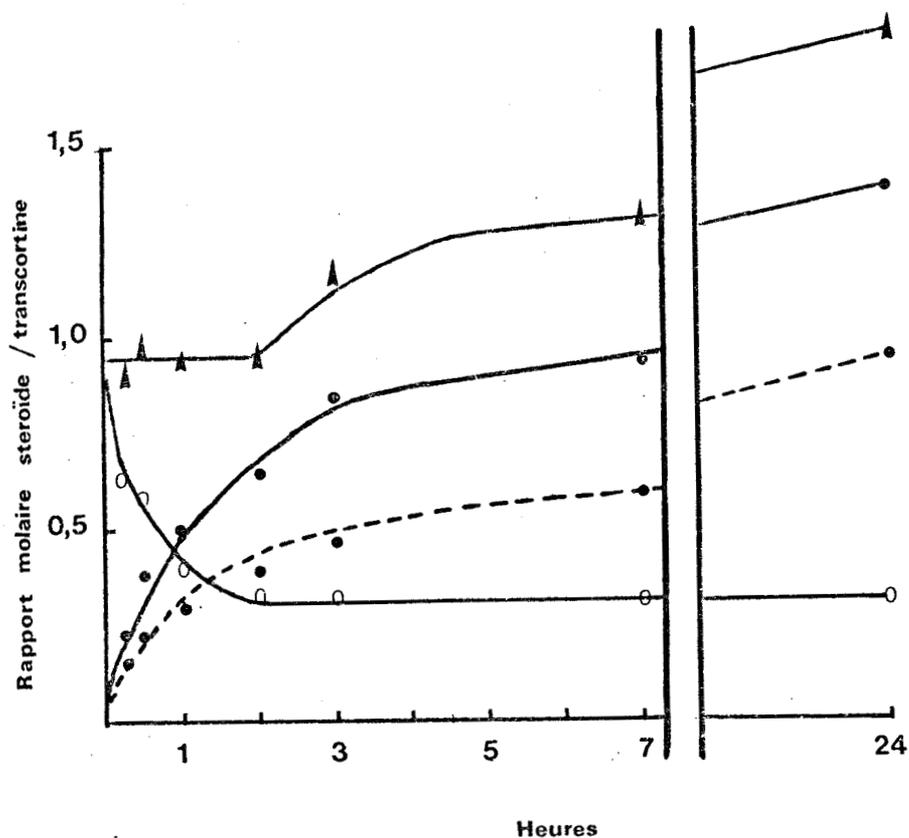


Figure 23 : Cinétique du marquage d'affinité du complexe transcortine-cortisol ($5 \times 10^{-6} M$) avec la 17 β -bromoacétyltestostérone ($20 \times 10^{-6} M$) à pH 7.

Le cortisol lié (○—○) diminue en fonction du temps alors que la 17 β -bromoacétyltestostérone liée augmente (●—●). La quantité totale de stéroïdes liés (▲—▲) reste constante pendant les deux premières heures, puis elle augmente ; un marquage spécifique est donc obtenu pendant les deux premières heures. La 17 β -bromoacétyltestostérone liée covalentiellement est indiquée en pointillé (•----•).

-titif utilisé dans cette étude. Dans les conditions employées pour les analogues hormonaux précédents, la 16 α -bromoacétoxyprogesterone déplace complètement le cortisol lié en 30 min. Ce déplacement est accompagné d'une incorporation stoechiométrique de 16 α -bromoacétoxyprogesterone.

La quantité d'analogue hormonal lié reste constante pendant les 5 premières heures (environ 1 mole par mole de transcortine) mais augmente ensuite : 1,42 mole après 24 h (Figure 24). Le pourcentage de stéroïde lié covalentiellement est supérieur à celui obtenu avec les deux précédents analogues hormonaux : 80 p. 100 (Tableau X). Le marquage est donc très rapide et semble spécifique pendant les 5 premières heures. La 16 α -bromoacétoxyprogesterone est donc un stéroïde alkylant qui possède une affinité élevée et une forte réactivité envers la transcortine.

d) Identification des acides aminés alkylés

L'hydrolyse totale acide de la transcortine marquée entraîne la coupure de la liaison ester entre le stéroïde et la transcortine. Cependant un groupement carboxyméthyl $[2 - ^{14}\text{C}]$ reste greffé sur l'acide aminé modifié. Cet acide aminé carboxyméthylé $[^{14}\text{C}]$ peut être identifié par sa radioactivité lors de l'analyse de l'hydrolysats total.

α) Alkylation dans le site actif par la 11 α -bromo- acétoxy $[2 - ^{14}\text{C}]$ progesterone

Quand l'hydrolysats total acide de la transcortine inactivée à 78 p. 100 est déposé sur un analyseur d'acides aminés, le diagramme d'élution montre 3 pics radioactifs. Les deux premiers sont élués avant l'acide aspartique et le troisième est situé entre la proline et le glycofolle (Figure 25). Ce troisième pic semble correspondre à la S-carboxyméthyl-homocystéine, le principal produit détectable à la ninhydrine dans les hydrolysats acides de S-carboxyméthylméthionine (GUNDLACH *et al.*) (128) (Figure 26). Dans ce cas, les deux premiers pics pourraient être les

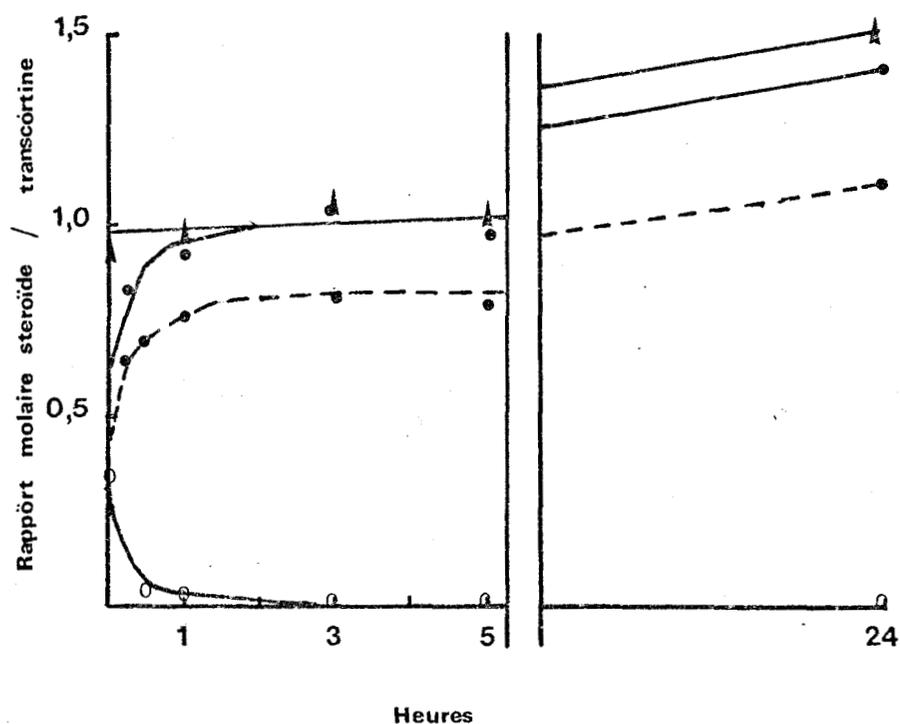


Figure 24 : Cinétique du marquage d'affinité du complexe transcortine-cortisol ($5 \times 10^{-6} M$) avec la 16 α -bromoacétoxyprogesterone ($20 \times 10^{-6} M$) à pH 7.

Le cortisol lié (o—o) diminue rapidement en fonction du temps et est complètement déplacé en 30 min alors que la 16 α -bromoacétoxyprogesterone liée augmente (•—•). La quantité totale de stéroïdes liés (▲—▲) reste constante pendant les 5 premières heures, puis elle augmente ; un marquage spécifique est donc rapidement obtenu en 30 min, il reste spécifique pendant 5 heures. La 16 α -bromoacétoxyprogesterone liée covalentiellement est indiquée en pointillé (•---•).



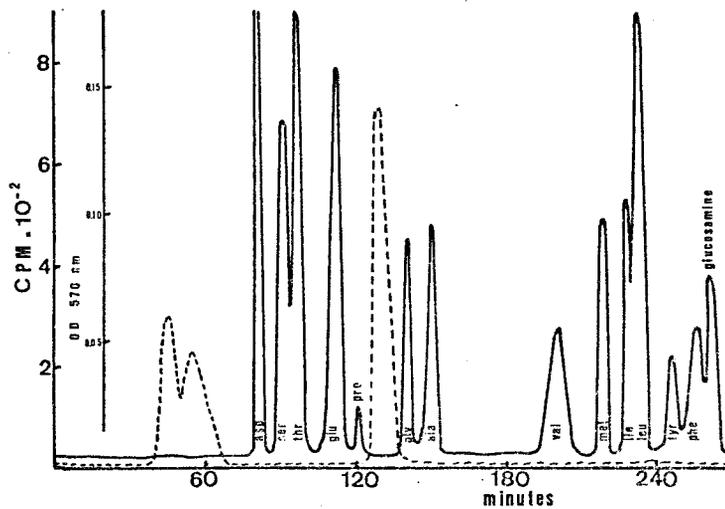
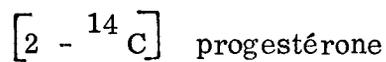


Figure 25 - Diagramme d'élution de l'hydrolysat total acide de transcortine après un marquage de 7 h avec la 11 α -bromoacétoxy-



Le profil de radioactivité (-----) est identique à celui obtenu avec les produits de dégradation d'un hydrolysat acide de bromure de S-carboxyméthyl [14 C] méthionine. Deux pics radioactifs sont ninhydrine-négatifs et sont élués avant l'acide aspartique (acide glycollique et acide S-méthylthioglycollique). Un troisième pic est élué entre la proline et le glycofolle, il a été identifié comme étant de la S-carboxyméthylhomocystéine.



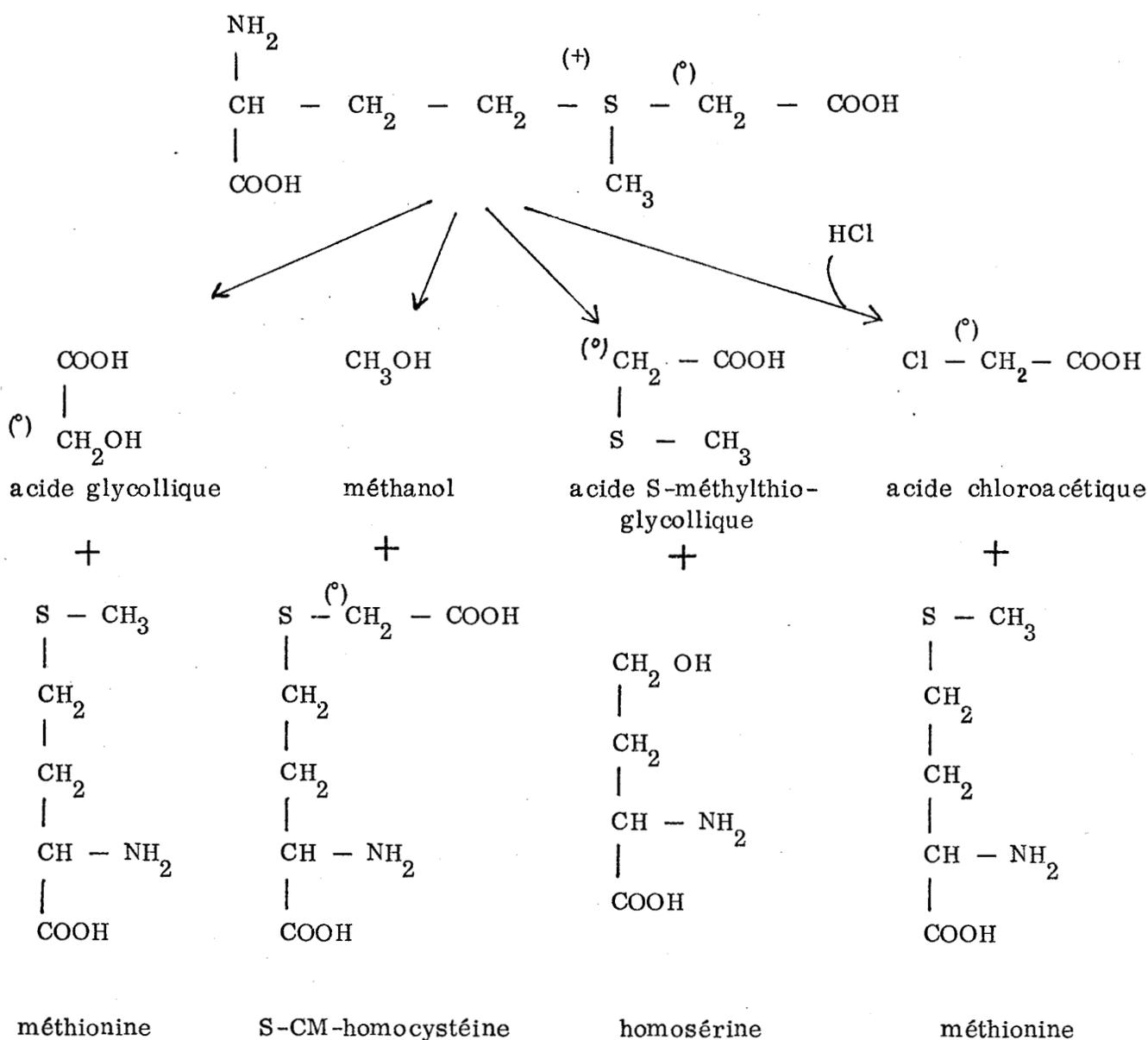


Figure 26 - Décomposition de la S-carboxyméthylméthionine dans les conditions d'hydrolyse totale acide des protéines

(HCl 5,6 N à 110° C pendant 24 heures sous vide)

L'atome de carbone isotopique provenant de l'acide bromoacétique $[2 - {}^{14}\text{C}]$ est indiqué par un astérisque $(*)$ (d'après GOREN, GLICK et BARNARD) (129).

autres produits de dégradation décrits par GOREN *et al.* (129), lesquels sont ninhydrine-négatifs : l'acide glycollique [^{14}C] et l'acide S-méthyl thioglycollique [^{14}C]. Un autre produit de dégradation, l'acide chloroacétique [^{14}C] est normalement élué juste devant l'acide glycollique. Dans nos conditions, ce composé, qui a la particularité d'être sublimable, est perdu car l'hydrolysate acide est lyophilisé avant l'analyse des acides aminés.

Le diagramme d'éluion des produits obtenus par hydrolyse acide de la S-carboxyméthyl [$2 - ^{14}\text{C}$] méthionine montre 3 pics radioactifs qui sont élués aux mêmes positions que l'hydrolysate de transcortine marquée ; seul le troisième pic est ninhydrine-positif. Dans les deux cas, le troisième pic radioactif est obtenu en proportion plus élevée si 0,05 p. 100 de 2-mercaptoéthanol est ajouté dans l'acide chlorhydrique 5,6 N avant l'hydrolyse. Une telle addition de 2-mercaptoéthanol a été recommandée pour obtenir un meilleur rendement de la méthionine après hydrolyse totale acide (KEUTMANN et POTTS) (130).

Ces résultats suggèrent donc qu'un seul acide aminé a été modifié dans le site de liaison par la 11 α -bromoacétoxyprogesterone : un résidu de méthionine.

) Alkylation dans le site actif par la 17 β -bromo-

 acétyl [$2 - ^{14}\text{C}$] -testostérone

Après hydrolyse totale acide de la transcortine inactivée à 68 p. 100 (temps de marquage de 2 h), 5 pics radioactifs sont obtenus sur le diagramme d'éluion (A - B - C - D et E) (Figure 27).

Le pic principal (E), qui est élué immédiatement après l'alanine, se superpose à un témoin interne de 3-carboxyméthyl histidine froide ; il contient 56 p. 100 de la radioactivité éluée.

Le pic C (4,5 p. 100) coïncide avec un témoin interne de 1-carboxyméthylhistidine froide (entre l'acide glutamique et la proline).

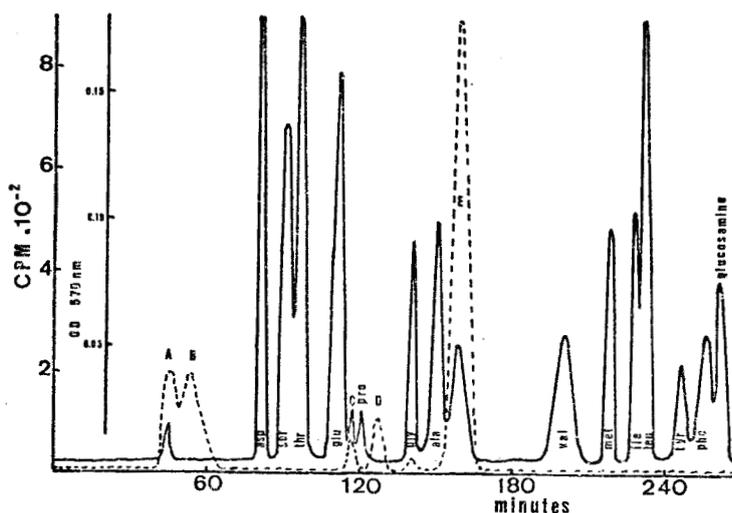


Figure 27 - Diagramme d'élution de l'hydrolysat total acide de transcortine après un marquage de 2 h avec la 17 β -bromoacétyl

$[2 \text{ } ^{14} \text{ C}]$ testostérone.

Un mélange de dicarboxyméthyl histidine, 1-carboxyméthylhistidine et 3-carboxyméthylhistidine froids est ajouté à l'hydrolysat de la solution de transcortine marquée, avant l'analyse. Cinq pics radioactifs sont obtenus (-----). Les deux premiers pics sont élués aux positions de l'acide glycollique (A) et de l'acide S-méthylthioglycollique (B) mais le pic A coïncide aussi avec la dicarboxyméthylhistidine ajoutée. Le pic C se superpose à la 1-carboxyméthylhistidine. Le pic D est élué à la position de la S-carboxyméthylhomocystéine et le pic E se superpose à la 3-carboxyméthylhistidine.

Le pic A (21 p. 100), le pic B (11,5 p. 100) et le pic D (7 p. 100) sont élués aux mêmes positions que les produits de dégradation de la S-carboxyméthylméthionine décrits précédemment ; ce sont donc respectivement l'acide glycollique $[^{14}\text{C}]$, l'acide S-méthyl $[^{14}\text{C}]$ thio-glycollique et la S-carboxyméthyl $[^{14}\text{C}]$ homocystéine. Comme le pic A recouvre le témoin interne de dicarboxyméthylhistidine froide, il est impossible d'exclure la présence éventuelle de dicarboxyméthylhistidine $[^{14}\text{C}]$ dans l'hydrolysat de transcortine marquée. Cependant, sa proportion ne pourrait pas dépasser la moitié de la radioactivité contenue dans le pic A, soit 10 p. 100.

Deux acides aminés différents ont donc été modifiés par la 17 β -bromoacétyltestostérone : un résidu d'histidine sur lequel le stéroïde alkylant a réagi essentiellement avec l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole et un résidu de méthionine. 60 à 70 p. 100 de la radioactivité élue est liée à l'histidine mais cette proportion ne représente pas la stoechiométrie exacte du marquage car certains produits de dégradation ninhydrine-négatifs de la S-carboxyméthylméthionine sont volatils (GOREN et al.) (129). Nous avons constaté, à partir de transcortine marquée par la 11 α -bromoacétoxy $[^{14}\text{C}]$ progestérone, qu'environ 30 p. 100 de la radioactivité est perdue pendant la lyophilisation de l'hydrolysat acide précédant l'analyse des acides aminés. La radioactivité liée à l'histidine est donc surestimée par rapport à celle liée à la méthionine.

La 17 β -bromoacétyltestostérone est donc capable de modifier deux résidus d'acides aminés, dans des proportions identiques, à l'intérieur du site de liaison : pour une molécule de transcortine, l'acide aminé modifié est soit la méthionine, soit l'histidine. Ce dernier est alkylé presque exclusivement au niveau de l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole.

) Alkylation dans le site actif par la 16 α -bromo-
 acétoxy $[2 - {}^{14}\text{C}]$ progestérone

L'hydrolyse totale acide de la transcortine inactivée par un marquage de 30 min. ne montre qu'un seul pic radioactif sur le diagramme d'élution (Figure 28). Ce pic chevauche partiellement la proline et se superpose au témoin interne de 1-carboxyméthylhistidine froide.

La 16 α -bromoacétoxyprogestérone alkyle donc, dans le site de liaison, un résidu d'histidine au niveau de l'atome d'azote en position 1 du noyau imidazole.

3° - Discussion

a) Choix des conditions de marquage

Les résultats du marquage de la transcortine par les bromo-acétoxystéroïdes varient de façon importante avec le pH et la concentration en stéroïde alkylant. A un pH plus élevé (8), la réactivité plus grande des acides aminés nucléophiles entraîne un couplage de stéroïde à l'extérieur du site actif. De même, un rapport molaire élevé stéroïde alkylant / transcortine entraîne un marquage non spécifique. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi pour réaliser les cinétiques de marquage, un pH égal à 7 et un rapport molaire bromoacétoxystéroïde / transcortine égal à 4.

b) Région du site actif entourant les cycles A et B du noyau stéroïde

L'hormone stéroïde semble être orientée dans le site de liaison de la transcortine, le cycle A étant dirigé vers l'intérieur et le cycle D dirigé vers l'extérieur. Cette orientation est suggérée par l'étude en résonance paramagnétique électronique du complexe transcortine - dérivé nitrosylé du cortisol (BASSET et al.) (117). Les stéroïdes substitués sur

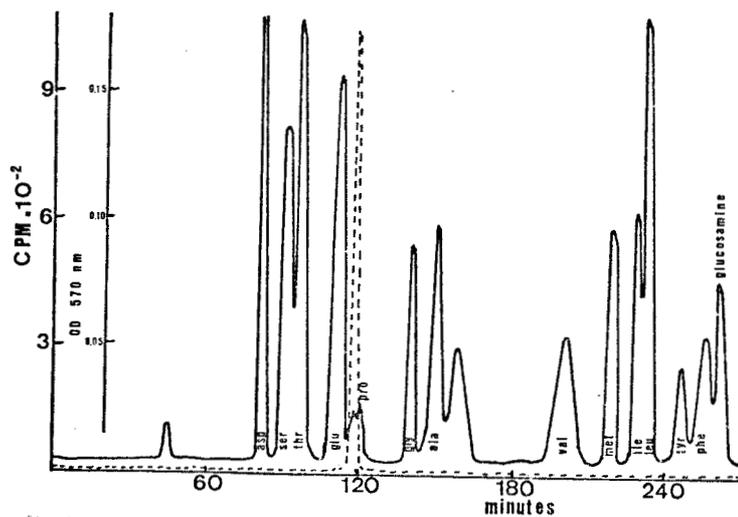


Figure 28 - Diagramme d'éluion de l'hydrolysat total acide
 de transcortine après un marquage de 30 min. avec la 16 α -
 bromoacétoxy [2 - 14 C] progestérone

Un mélange de dicarboxyméthylhistidine, 1-carboxyléthylhistidine et 3-carboxyméthyl histidine froids est ajouté à la solution de transcortine marquée, avant l'analyse. Un seul pic radioactif (-----) est obtenu. Il se superpose à la 1-carboxyméthylhistidine ajoutée.



le cycle A ou B ne nous ont pas permis un marquage spécifique : la 2 α -hydroxyprogesterone ne se lie pas à la transcortine ; les 6 α - et 6 β -hydroxyprogestérones se lient mais leurs dérivés bromoacétylés ne se lient plus. Le 9-fluorocortisol et la dexaméthasone (1,2 - déhydro - 9 - fluoro - 16 α - méthylcortisol) ont une affinité négligeable pour la transcortine (SANDBERG et al.) (75) ; nous avons montré que la dexaméthasone est incapable de déplacer le cortisol lié pendant une incubation de 90 min. à 37° C avec un rapport molaire dexaméthasone / cortisol égal à 100.

Ces résultats suggèrent que la région du site actif entourant les cycles A et B du noyau stéroïde est très étroite. Cette région ne laisse pénétrer le stéroïde que si les cycles A et B ne portent pas de substituants trop encombrants.

La 6 β -bromoprogesterone a permis à KHAN et ROSNER (132) de modifier spécifiquement un résidu de cystéine dans le site de liaison de la transcortine. Ce stéroïde alkylant a un encombrement stérique proche de celui de la 6 β -hydroxyprogesterone, il est donc normal qu'il puisse pénétrer dans le site de liaison alors que la 6 β -bromoacétoxyprogesterone, elle, présentait un encombrement stérique trop important. La 6 β -bromoprogesterone avait été utilisée précédemment par CHIN et WARREN (133) qui avaient aussi identifié un résidu de cystéine dans le site actif de la 20 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de "Streptomyces Hydrogenans". Ce type de marqueur, bien que moins encombrant, présente deux inconvénients importants : D'une part, il possède un groupement réactif fixe alors que celui du dérivé bromoacétylé est mobile, ce qui permet une probabilité de rencontre plus grande avec un acide aminé susceptible de réagir. D'autre part, il n'est capable de modifier qu'un seul type d'acide aminé, la cystéine, et son identification, sous forme de complexe covalent stéroïde - cystéine, est délicate ; elle est réalisée par chromatographie en couche mince (CHIN et WARREN) (133).

c) Région du site actif entourant les cycles C et D du noyau stéroïde

Le cortisol porte un groupement hydroxyl en position 11 β ; or l'affinité de la transcortine pour le stéroïde diminue si le 11 β -hydroxyl est supprimé ; elle diminue encore si le 11 β -hydroxyl est substitué par un 11 α -hydroxyl (DAUGHADAY et KOZAK) (134). Ces différences d'affinité peuvent s'expliquer si une liaison hydrogène existe entre le groupement 11 β -OH et l'atome de soufre d'un résidu de méthionine. Cette liaison hydrogène est impossible avec le 11 - désoxycortisol et la présence d'un groupement 11 α -OH pourrait avoir un effet de répulsion.

Le groupement carbonyle en position 20 est considéré comme un accepteur de proton. Ce caractère accepteur varie selon la présence ou l'absence de groupements hydroxyl en position 17 et 21 mais l'affinité du stéroïde pour la transcortine est maximum quand le caractère accepteur est élevé (EGER et al.) (72). Une liaison hydrogène semble possible entre ce groupement carbonyle et le noyau imidazole du résidu d'histidine modifié par la 17 β -bromoacétyltestostérone et la 16 α -bromoacétoxyprogestérone. Les modèles moléculaires montrent que ces deux stéroïdes alkylants peuvent réagir avec le même résidu d'histidine, le premier au niveau de l'azote 3 ou de l'azote 1, le second au niveau de l'azote 1 seulement (Figure 29 B et C), ce qui est compatible avec nos résultats. Il est de plus probable que le résidu de méthionine modifié par la 17 β -bromoacétyltestostérone est le même que celui modifié par la 11 α -bromoacétoxyprogestérone. Ceci est stériquement possible comme le montrent les modèles moléculaires (Figure 29 A) mais doit être confirmé par la séquence peptidique de cette région.

Nos résultats concernant la région du site actif autour des cycles C et D peuvent être comparés à ceux obtenus par marquage d'affinité de la 20 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de "Streptomyces Hydrogenans" puisque sa spécificité de liaison est proche de celle de la transcortine. Avec la 11 α -bromoacétoxyprogestérone, ARIAS, WARREN et al. (123) modifient un résidu de méthionine ; le 21-iodoacétate de cortisone, la 16 α -

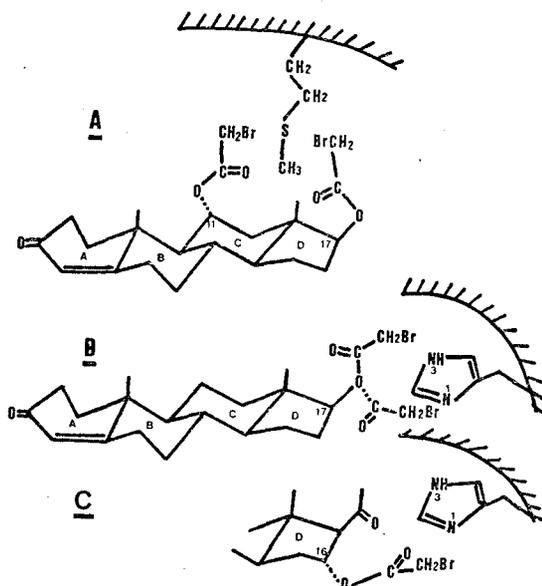


Figure 29 - Modèle présumé de l'action des stéroïdes 11- ,

16- et 17- bromoacétylés dans le site de liaison de

la transcortine.

La 11 α -bromoacétoxy progestérone et la 17 β -bromoacétyl testostérone peuvent modifier le même résidu de méthionine (A). La 17 β -bromoacétyltestostérone peut aussi modifier un résidu histidine au niveau de l'azote 3 ou 1 du noyau imidazole (B). La 16 α -bromoacétoxyprogestérone peut modifier le même résidu histidine mais seulement au niveau de l'azote 1 du noyau imidazole.

bromoacétoxyprogestérone et la 21-bromoacétylamino progestérone ont permis la modification d'un résidu d'histidine sous forme de dicarboxyméthylhistidine (GANGULY et WARREN) (135) ; (SWEET, WARREN et al.) (122 - 125). La région du site de liaison autour des positions 11 et 17 du noyau stéroïde comprend les mêmes résidus d'acide aminé réactif. Pour expliquer la formation de dicarboxyméthylhistidine, SWEET et al. (122) suggèrent que le résidu d'histidine est situé entre le site de liaison au stéroïde et le site de liaison au coenzyme. Cette position permettrait au stéroïde alkylant de réagir avec le résidu histidine à partir des deux sites. Cette possibilité expliquerait pourquoi nous n'obtenons que de la monocarboxyméthylhistidine avec la transcortine.

B/ MARQUAGE A L'AIDE DE REACTIFS SPECIFIQUES

.....

D'UN TYPE D'ACIDE AMINE

.....

1°- Cystéine (LE GAILLARD et DAUTREVAUX) (144)

a) Introduction

La chaîne polypeptidique de la transcortine contient deux résidus de cystéine mais pas de pont disulfure ; cependant, l'inactivation par la chaleur ou les acides entraîne une agrégation et la formation de dimère par pont disulfure (voir le chapitre III).

Dans la conformation native, seul un des deux groupements thiol réagit avec le parachloromercuribenzoate de sodium (PCMB) (MULDOON et WESTPHAL) (59) ou avec l'acide 5,5'- dithiobis 2 - nitrobenzoïque (DTNB)

(KHAN et ROSNER) (132). Ceci est en désaccord avec nos observations puisque nous n'avons pas détecté de groupement thiol sur la transcortine native (libre ou liée au cortisol) (chapitre IV - A - 2°).

Ce désaccord apparent est important à expliquer car il est essentiel dans l'étude du site de liaison au cortisol. En effet, KHAN et ROSNER (132) ont observé la modification du résidu de cystéine accessible par marquage d'affinité avec la 6 β -bromoprogesterone ; ce résidu semble donc présent dans le site de liaison.

b) Résultats

α) Dosage des groupements thiol

.....

Le nombre de groupements thiol présents dans la transcortine a été mesuré dans différentes conditions ; les résultats sont montrés dans le Tableau XI. Aucun groupement sulfhydryl n'est détecté sur la transcortine native (libre ou liée au cortisol) mais 1 groupement -SH par mole est titrable en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 2 %. La réduction de la transcortine par le dithiothreitol (DTT) 5 mM dans des conditions natives entraîne une augmentation du nombre de -SH sans qu'il y ait variation de l'activité de liaison au cortisol (mesure de l'activité par le charbon-dextran) : 1 groupement -SH par mole est titrable dans des conditions natives, 2 groupements -SH par mole le sont en présence de SDS à 2 %. Le dosage dans le chlorhydrate de guanidine 6 M donne des résultats semblables à celui réalisé dans le SDS à 2 %.

Comme la transcortine contient 2 résidus de cystéine par mole, on peut déduire qu'un résidu est masqué et qu'une dénaturation est nécessaire pour titrer son groupement -SH. Le second résidu est accessible dans les conditions natives mais son groupement -SH est bloqué et ne peut être dosé qu'après réduction.

Tableau XI

Titration des groupements thiol de la transcortine

Conditions	Groupements -SH / mole de transcortine	
	non réduite	réduite par le DTT 5 mM
Native	0 ^{a, b}	0,88 ^a
SDS 2 %	0,91 ^a - 1,15 ^b	1,79 ^a

a : Titration par le DTNB.

b : Titration par le PCMB.

La réduction avec le DTT a été conduite dans du tampon Tris - HCl 0,1 M, de pH 8, pendant 1 h à l'obscurité. La solution (1 ml) est ensuite dessalée par passage dans une colonne de Bio-gel P-6 (0,8 x 18 cm) équilibrée avec le même tampon. Les fractions correspondant au pic protéique sont réunies et concentrées à 1 ml sous azote à 4° C dans un appareil à micro-ultrafiltration AMICON équipé d'une membrane DIAFLO, type PM 10. La titration des groupements -SH est décrite dans le chapitre technique.

Chaque chiffre représente la valeur moyenne de 4 dosages avec des préparations différentes de transcortine.

β) Nature de l'agent bloquant le groupement sulfhydryl

à accessible

Différents métaux divalents ont été dosés dans une solution de transcortine 0,02 mM en tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,4 ; les dosages sont réalisés avec un spectrophotomètre d'absorption atomique (I L 151). Le mercure, le fer et le zinc n'ont pu être détectés ; des traces de plomb et de cuivre ont été dosées : 0,09 et 0,08 atomes par mole de transcortine respectivement, mais ces quantités sont insuffisantes pour expliquer le blocage de 1 groupement -SH par mole.

Une autre possibilité recherchée est la formation de ponts disulfures dans le plasma sanguin hémolysé entre la transcortine et un peptide à thiol (tel que le glutathion) ou la cystéine libre. Pour cette recherche, 2×10^{-7} moles de transcortine sont réduites dans 1 ml de tampon volatil (bicarbonate d'ammonium 0,2 M à pH 8) avec le 2 - mercaptoéthanol à 1 % sous azote, à l'obscurité pendant 16 h. La solution est ensuite dessalée par passage à travers une colonne de Bio-gel P-6 (0,8 x 18 cm) équilibrée avec un tampon bicarbonate d'ammonium 0,02 M à pH 8 et les fractions correspondant aux sels sont lyophilisées puis examinées avec un analyseur d'acides aminés. Aucun acide aminé n'est détecté ni avant, ni après hydrolyse acide totale bien que le groupement -SH accessible soit effectivement régénéré.

La présence simultanée d'acide cystéique et de demi-cystine est observable dans l'hydrolysat total acide de transcortine non réduite : 0,86 et 0,77 résidus par mole respectivement. La présence d'acide cystéique dans la transcortine native ne peut cependant pas être envisagée puisque ce degré d'oxydation n'est pas réversible par le DTT ; cependant la présence d'acide cystéinyl sulfénique (-SOH) ou sulfonique (-SO₂H) semble possible puisque ces dérivés peuvent être réduits sous forme de cystéine (LITTLE et O'BRIEN) (136). Il a été montré que les acides sulféniques, à la différence des ponts disulfures, peuvent être réduits en thiols par l'arsénite de sodium, un réducteur très faible (PARKER et ALLISON) (137) ; (LITTLE et O'BRIEN) (138). Les effets de l'arsénite et d'un autre réducteur faible, l'ascorbate de sodium, ont donc été étudiés.

La réduction est réalisée sur 1 ml de solution de transcortine 0,04 mM dans du tampon Tris - HCl 0,1 M à pH 8,1 contenant de l'EDTA disodique 0,001 M avec le réducteur en concentration 0,2 M pendant 60 min. à l'obscurité à 30° C. 0,1 ml de solution est prélevé en double exemplaire pour mesurer l'activité de liaison, la solution restante est dessalée pour titrer les groupements -SH selon la technique indiquée sous le Tableau XI. Les deux réducteurs se sont montrés capables de régénérer le groupement -SH accessible (Tableau XII).

γ) S-aminoéthylation du groupement sulfhydryl accessible

La S-aminoéthylation a été réalisée dans des conditions natives avec l'éthylène-imine (RAFTERY et COLE) (139). Une solution de transcortine libre 0,04 mM dans du tampon Tris - HCl 1 M à pH 8,5 contenant de l'EDTA disodique 0,001 M, est réduite par le DTT 10 mM à l'obscurité pendant 1 h ; la solution est ensuite divisée en 3 portions de 1 ml. La première est agitée avec l'éthylène-imine pendant 2 h (6 additions de 10 μ l à des intervalles de 10 min. pendant 1 h). A la seconde portion du cortisol [^3H] (40 Ci/mole) est ajouté pour avoir une concentration finale de 0,05 mM avant la réaction avec l'éthylène-imine. La troisième portion sert de témoin, elle n'est pas traitée. L'activité de liaison est mesurée par le charbon-dextran sur des aliquots de 0,1 ml et les groupements -SH sont dosés après dessalage selon la technique indiquée sous le Tableau XI.

La mesure directe de la S-aminoéthyl cystéine par analyse des acides aminés n'a pas pu être réalisée. En effet, la S-aminoéthyl cystéine est éluée dans les chromatogrammes d'acides aminés dans un espace étroit entre la lysine et l'histidine ; or ceux-ci sont présents dans un hydrolysate acide de transcortine en quantité stœchiométriquement 15 fois et 9 fois plus élevée. Une détermination indirecte de la modification des groupements -SH peut cependant être obtenue par titration des groupements thiol avant et après aminoéthylation.

Tableau XII

Effet des réducteurs et de l'aminoéthylation

dans des conditions natives

sur le contenu en groupements thiol de la transcortine

Réducteurs	Groupements - SH / mole de transcortine (dosage en présence de SDS à 2 %)	
	avant amino éthylation	après amino éthylation
0	0,85	-
Dithiothreitol 0,01 M	1,78	0,87 ^a 0,91 ^b
Arsénite 0,20 M	1,67	-
Ascorbate 0,20 M	1,81	-

a : aminoéthylation de la transcortine libre.

b : aminoéthylation de la transcortine en présence d'un léger excès de cortisol.



Bien que 2 groupements -SH par mole soient dosés dans une solution de transcortine réduite en présence de SDS à 2 %, un seul groupement -SH est détecté après aminoéthylation dans des conditions natives. Les résultats sont identiques pour la transcortine libre ou liée au cortisol (Tableau XII). Comme aucun groupement -SH n'est détectable en absence de SDS, le groupement thiol restant après aminoéthylation correspond au résidu de cystéine masqué, lequel ne peut pas réagir avec l'éthylène-imine. La S-aminoéthylation de la transcortine dans des conditions natives permet donc la modification sélective du résidu de cystéine accessible. Cette modification n'entraîne aucune perte de l'activité de liaison.

c) Discussion

Le rôle des groupements sulfhydryl dans les protéines est souvent reconnu comme important dans les processus enzymatiques ou les énergies d'association. Très souvent deux catégories de groupements sulfhydryl sont présentes : ceux accessibles aux réactifs habituels des thiols et ceux qui sont masqués. Pour ces derniers groupements, une dénaturation de la chaîne protéique est nécessaire pour les rendre réactifs. Les différentes causes possibles du masquage d'un groupement sulfhydryl dans une protéine ont été récemment passés en revue (WESTHAUS et POHL) (140) : 1.- séquestration dans une région hydrophobe. 2.- encombrement stérique local. 3.- liaison hydrogène avec des résidus d'acide aminé voisins. 4.- liaison covalente sous forme de thiazolidine. La première cause, la séquestration dans des régions hydrophobes, est apparue comme la plus courante.

Un des deux groupements sulfhydryl de la transcortine est masqué dans la conformation native. Nous avons montré que l'autre groupement sulfhydryl, s'il est effectivement porté par un résidu de cystéine accessible, est cependant bloqué ; il semble être oxydé sous forme d'acide sulfénique stabilisé.

L'acide de FRIES (141) (acide anthraquinone-1-sulfénique) et deux autres composés voisins (BRUCE et al.) (142) (143) sont les seuls acides sulféniques isolés avec succès. Il a été proposé que la stabilité de ces acides sulféniques particuliers est probablement due à des liaisons hydrogènes ou à d'autres interactions fortes entre l'atome de soufre oxydé et le groupement 9,10 quinone aromatique (BRUCE et al.) (143). Les acides sulféniques aliphatiques ne peuvent pas être ainsi stabilisés et ne peuvent donc pas être isolés. La stabilité du dérivé sulfénique dans la transcortine est sans doute permise par son environnement stérique et chimique.

La présence d'acide cystéinyl-sulfénique a été décrite dans la glycéraldéhyde 3 -phosphate déshydrogénase et il est suggéré que l'oxydation se produit lors de l'isolement (PARKER et ALLISON) (137). Elle a été aussi suggérée dans la papaine (LITTLE et O'BRIEN) (138). L'oxydation du résidu de cystéine accessible de la transcortine que nous isolons peut se produire durant la collection des échantillons biologiques de sérum. En effet, le "pool" de sérum, souvent hémolysé, est généralement conservé à température ambiante 2 jours et à 4° C pendant 1 semaine pour la collection, avant d'être congelé à - 20° C. Il s'agit là, en effet, de la seule différence technique apportée par rapport aux premiers temps où nous isolions la transcortine : les sérums étaient alors congelés immédiatement et si le dosage des groupements -SH n'avait pas été fait sur la transcortine native, nous dosions cependant 2 groupements -SH par mole en milieu SDS à 2 % et sans réduction préalable (chapitre III).

Il est important de connaître le rôle éventuel de ce résidu de cystéine accessible et oxydé. Trois acides aminés ont été identifiés dans différentes régions du site de liaison par marquage d'affinité : nous en avons suggéré deux (histidine et méthionine) ; le troisième acide aminé est le résidu de cystéine accessible qui est localisé près de l'atome de carbone 6 du cortisol par KHAN et ROSNER (132). Nous avons cependant montré que ce résidu n'est pas essentiel pour la liaison au cortisol et d'ailleurs KHAN et ROSNER avaient, eux aussi, montré que le PCMB n'inactive pas la transcortine. De plus le degré d'ionisation des résidus de cystéine n'est pas capable d'affecter la vitesse de dissociation des complexes transcortine-stéroïde à l'inverse de celui des résidus d'histidine et arginine (STROUPE et al.) (79).

Ces observations suggèrent que le résidu de cystéine accessible est localisé dans le site de liaison entre la "poche" du cortisol et l'extérieur de la molécule de manière à être accessible des deux côtés.

2°- Histidine et tyrosine essentiels

La présence d'un résidu d'histidine dans le site de liaison a été précédemment démontrée par marquage d'affinité, il est donc utile de savoir si la transcortine possède un ou plusieurs résidus d'histidine essentiels à son activité. La présence de tyrosine proche du site de liaison est suggérée par l'étude en spectre U.V. différentiel (AUBERT et LE GAILLARD - résultats non publiés). Nous avons donc modifié la transcortine à l'aide de deux réactifs spécifiques : le pyrocarbonate d'éthyle pour l'histidine et le tétranitrométhane pour la tyrosine. Leur mode d'action est décrit dans la Figure 30.

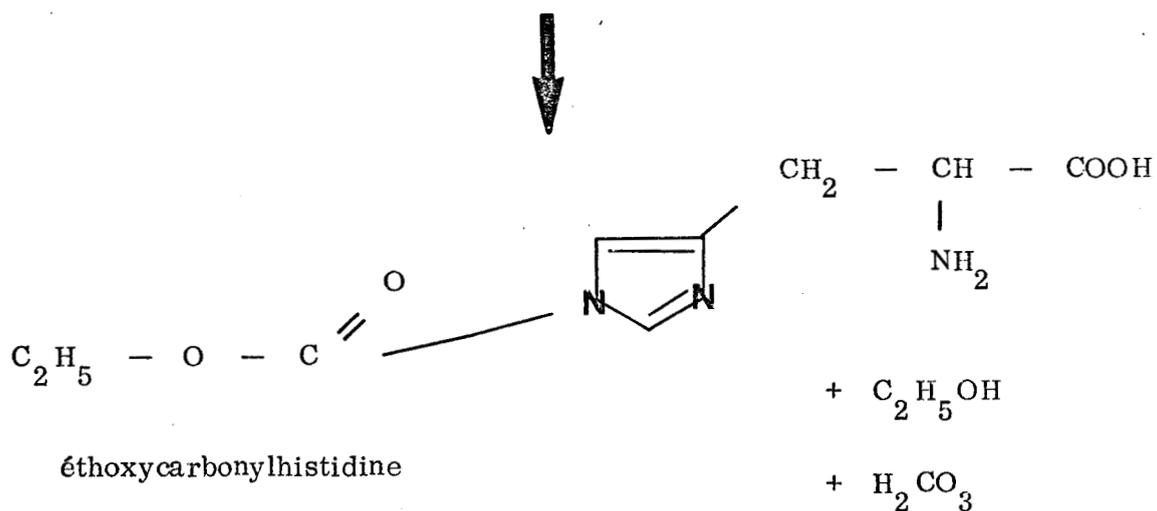
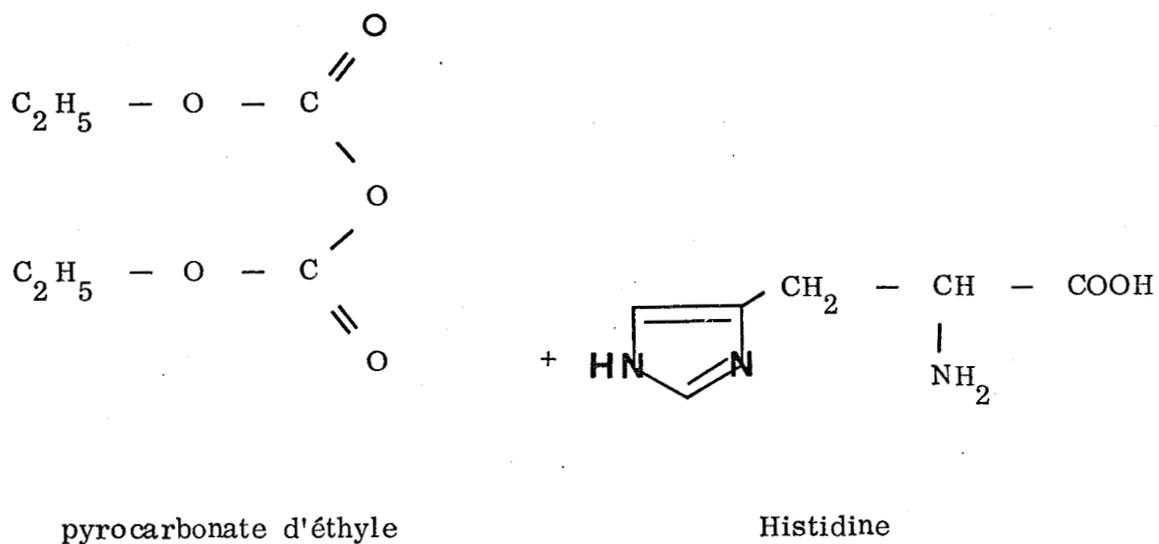
a) Résidu d'histidine essentiel

La transcortine contient 9 résidus d'histidine par mole

α) Inactivation de la transcortine par le pyrocarbonate d'éthyle

L'activité de la transcortine est inhibée par des concentrations relativement faibles en pyrocarbonate d'éthyle (Figure 31). Le temps d'incubation avec le réactif est limité à 20 min. car la réaction avec les résidus d'histidine ne se poursuit pas au-delà, comme le montre la Figure 32 : une augmentation de la densité optique à 240 nm exprimant la modification des résidus histidyl (OVADI et al.) (145) se stabilise après 20 min. Le temps de réaction est donc court, ce qui peut être dû à l'hydrolyse rapide du pyrocarbonate d'éthyle en éthanol et acide carbonique (PRADEL et KASSAB) (147).

A



B

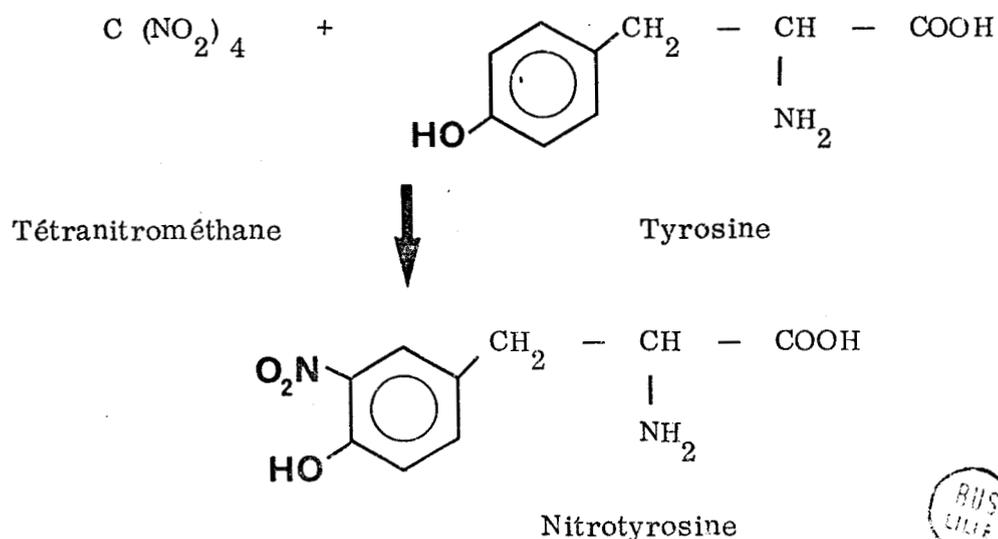


Figure 30 - Mode d'action du pyrocarbonate d'éthyle (OVADI *et al.*) (145)
 et du tétranitrométhane (SOKOLOVSKI *et al.*) (146)

RUS
LILIF

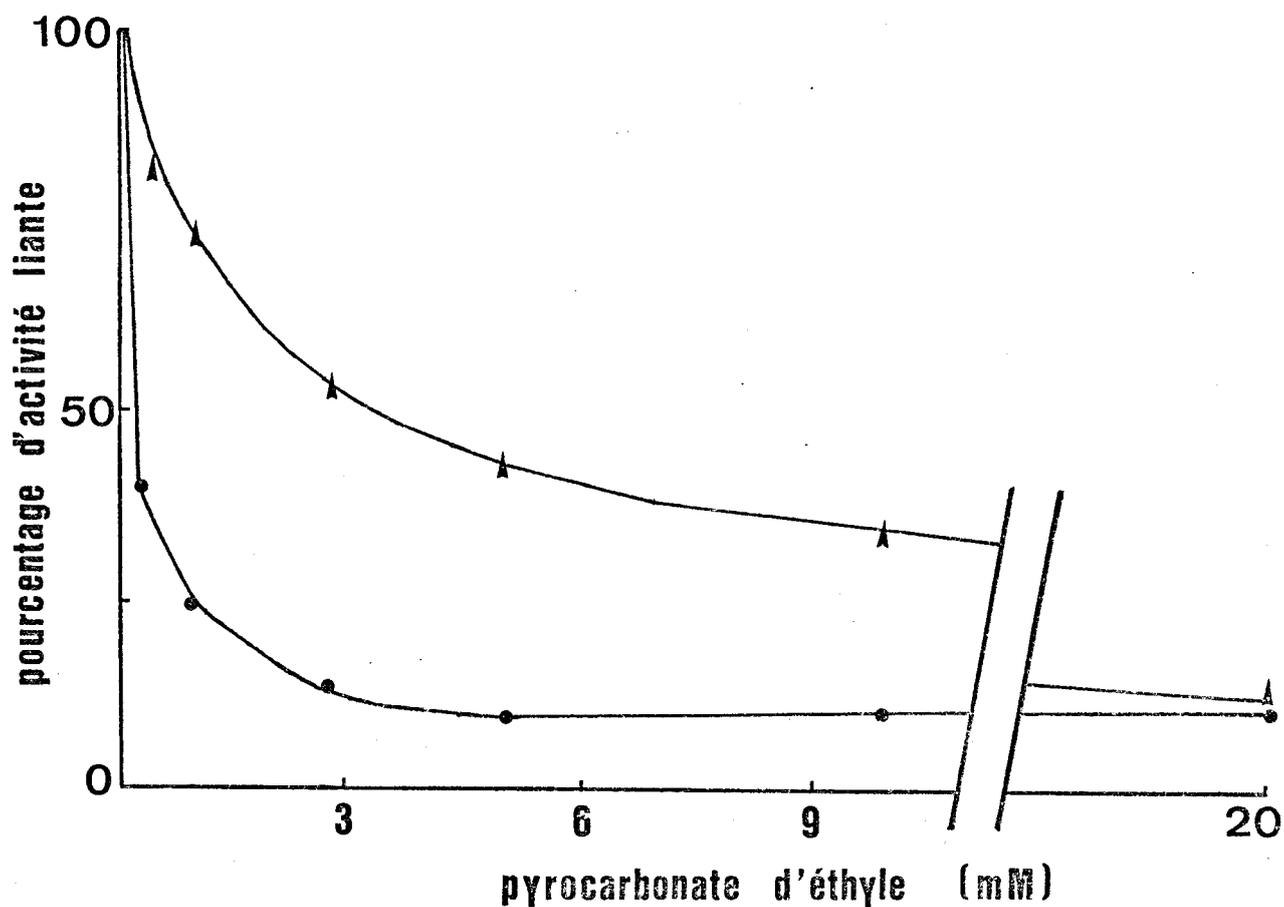


Figure 31 : Inactivation de la transcortine par des concentrations croissantes en pyrocarbonate d'éthyle.

La transcortine (0,02 mM) est incubée avec différentes concentrations de pyrocarbonate pendant 20 min. L'activité exprimée en pourcentage de cortisol lié est représentée en fonction de la concentration en réactif. L'activité est mesurée par dialyse multiple à l'équilibre (▲—▲) et par le charbon-dextran (•—•). Les techniques sont décrites au Chapitre technique.

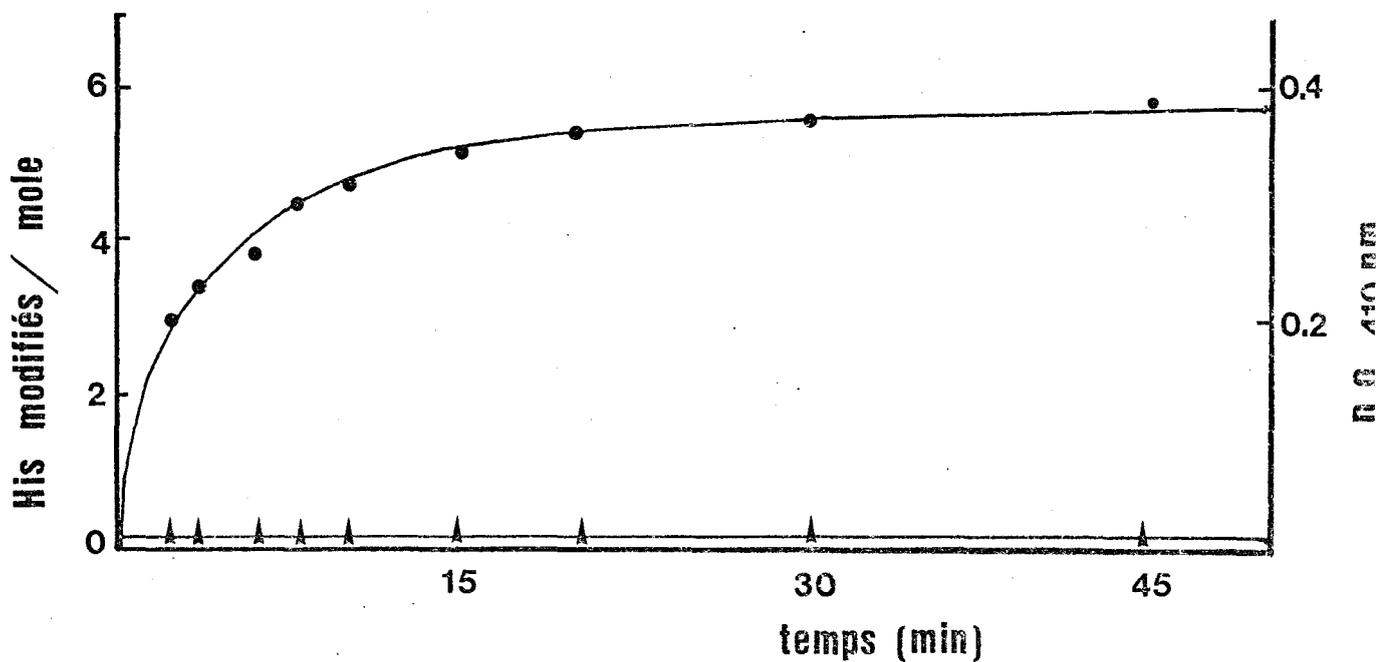


Figure 32 : Cinétique de la modification des résidus His

La transcortine (0,02 mM) est incubée avec du pyrocarbonate d'éthyle 1 mM. L'absorption différentielle à 240 nm (●—●) et 288 nm (▲—▲) est suivie en fonction du temps et le nombre de résidus histidyl modifiés (●—●) est calculé d'après le coefficient d'extinction molaire de $3.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 240 nm (OVADI et al. - 145)

Une discordance importante apparaît entre les deux méthodes utilisées pour déterminer l'activité liante : l'inactivation observée est inférieure avec la méthode par dialyse à l'équilibre, à la méthode au charbon-dextran, sauf pour la concentration en réactif la plus élevée (Figure 31). Cette différence peut être expliquée par le temps très long nécessaire pour une dialyse à l'équilibre (72 h à pH 7,4 à 4° C) (voir le chapitre technique) ; ce temps peut entraîner une hydrolyse partielle des liaisons éthoxycarbonyl-histidine et donc une régénération progressive de l'activité liante au cours de la dialyse. L'instabilité à pH neutre de la liaison N-éthoxycarbonyl-imidazole a, en effet, été montrée par MELCHIOR et FAHRNEY (148).

β) Confirmation de la modification de résidus histidyl

Bien que la réaction du pyrocarbonate d'éthyle avec les protéines soit relativement spécifique pour les résidus histidyl à pH 6,1 (PRADEL et KASSAB) (147), d'autres acides aminés peuvent être aussi modifiés dans un milieu neutre ou légèrement alcalin (MELCHIOR et al.) (148) ; (LARROUQUERE) (149) ; (MÜHLRAD et al.) (150) ; (BURSTEIN et al.) (151). L'identification du ou des résidus d'acide aminé dont la modification entraîne une perte d'activité, doit donc être vérifiée. Après modification par le pyrocarbonate d'éthyle, le spectre d'absorption différentielle entre 230 nm et 320 nm est suivi avant et après traitement par l'hydroxylamine.

La modification des résidus histidyl doit entraîner une augmentation de l'absorbance à 240 nm et la modification de résidus tyrosyl, une diminution de l'absorbance à 280 nm (MÜHLRAD et al.) (150) ou 288 nm (THOME-BEAU et al.) (152). La Figure 32 montre que la densité optique à 240 nm augmente alors que la densité optique à 288 nm ne varie pas. Les résidus tyrosyl ne sont donc pas modifiés ; ils ne le sont pas non plus si une concentration élevée en réactif est utilisée (20 mM).

L'activité liante plus élevée observée après dialyse à l'équilibre de l'éthoxycarbonyl-transcortine a suggéré l'implication de l'histidine dans la

liaison puisque la liaison éthoxycarbonyl-histidine est instable. Le traitement par l'hydroxylamine devrait le confirmer puisque l'hydroxylamine coupe la liaison éthoxycarbonyl-histidine mais ne coupe pas la liaison éthoxycarbonyl-lysine plus stable (MELCHIOR et FAHRNEY) (148). Après traitement de la transcortine inactivée par de faibles concentrations en pyrocarbonate, une restauration complète de l'activité d'origine est observée (Tableau XIII). Cette restauration est accompagnée de la disparition de l'absorbance à 240 nm et donc de la coupure des liaisons éthoxycarbonyl-histidine. L'inactivation de la transcortine par le pyrocarbonate d'éthyle semble donc bien due à la modification d'un ou plusieurs résidus histidyl.

Quand des concentrations élevées en pyrocarbonate d'éthyle sont utilisées (5 mM et 10 mM - Tableau XIII), l'hydroxylamine n'entraîne qu'une restauration partielle de l'activité d'origine. Les activités recouvrées sont identiques à celles des solutions dialysées, elles suggèrent une inactivation irréversible induite par une autre réaction que l'éthoxycarbonylation de l'histidine.

γ) Spécificité de la modification

La réactivation de la transcortine modifiée après incubation avec l'hydroxylamine laisse prévoir qu'il n'y a pas eu de dénaturation de la transcortine. L'absence de dénaturation est confirmée par dichroïsme circulaire et électrophorèse en gel de polyacrylamide. Aucune zone de polymère n'est détectable après électrophorèse en gel de polyacrylamide de l'éthoxycarbonyl-transcortine, même si une concentration élevée en réactif est utilisée (10 mM); l'inactivation irréversible obtenue avec cette forte concentration ne peut donc pas être expliquée par une polymérisation comme cela avait été observé pour la ribonucléase (WOLF et al.) (153). Aucun changement de la structure secondaire n'a été détecté par dichroïsme circulaire, même pour la transcortine incubée avec du pyrocarbonate 20 mM; l'inactivation irréversible observée avec les concentrations élevées en réactif ne semble donc pas due à une dénaturation.

Tableau XIII

 Réactivation de l'éthoxycarbonyl-transcortine par l'hydroxylamine

 ou pendant la dialyse à l'équilibre

La transcortine (0,02 mM) est incubée, dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, à pH 6,1, aux différentes concentrations en pyrocarbonate d'éthyle, à température ambiante, pendant 20 min.

Pour la réactivation par NH_2OH , du cortisol [^3H] (40 Ci/mole) est ajouté à un aliquot de 0,2 ml de chaque solution de manière à avoir une concentration finale égale à 0,025 mM ; la solution est ensuite diluée 5 fois avec NH_2OH 1 M dans du tampon Tris - HCl 0,1 M à pH 7,0, incubée 1 h à température ambiante, puis l'activité est mesurée par le charbon-dextran.

Pour la dialyse, du cortisol est ajouté à une aliquote de 0,3 ml de chaque échantillon de manière à avoir une concentration finale de 0,025 mM ; la solution est ensuite diluée 10 fois avec le tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 7,4, puis une dialyse multiple à l'équilibre est réalisée.

Pyrocarbonate	Activité liante pour le cortisol		
	Témoin	NH_2OH 1 M	Dialyse de 72 h
d'éthyle			
0	100	100	100
1	24	100	70
2	16	100	59
5	10	43	42
10	9	34	33

L'inactivation de la transcortine par dénaturation semble exclue mais ceci n'implique pas obligatoirement qu'un ou plusieurs résidus histidyl sont présents dans le site de liaison. Cependant, quand une enzyme est protégée par son substrat contre l'inactivation, il est vraisemblable que les résidus d'acides aminés protégés de la modification sont situés à l'intérieur ou près du site actif. Si la transcortine est incubée avec le pyrocarbonate d'éthyle en présence de cortisol, la perte d'activité est plus faible. L'effet protecteur du cortisol est proportionnel à la quantité ajoutée jusqu'à ce que le rapport molaire cortisol / transcortine atteigne une valeur égale à 1 ; il reste ensuite constant (Figure 33). Le dosage des résidus histidyl modifiés n'a pas été réalisé lorsque du cortisol est présent car celui-ci absorbe davantage la lumière U.V. à 240 nm que l'éthoxycarbonyl-histidine.

§) Stoechiométrie de la réaction

Le nombre de résidus histidyl impliqués dans la liaison au cortisol a pu être déterminé en utilisant de très faibles concentrations en pyrocarbonate d'éthyle : de 0,01 à 0,50 mM ce qui correspond à des rapports molaires réactif / transcortine allant de 0,5 à 25. Pour chaque concentration en réactif, la quantité de résidus histidyl modifiés est mise en relation avec l'activité liante résiduelle (Figure 34). La baisse de l'activité liante se produit selon 2 pentes principales qui correspondent vraisemblablement à des réactivités différentes de résidus histidyl. La première pente (- 66,90), qui correspond à la plus grande réactivité, doit être corrigée car les résidus histidyl de plus faible réactivité, qui donnent la seconde pente (- 24,95), induisent une sous-estimation de la première. L'addition des deux pentes (- 66,90 - 24,95 = - 91,85), visualisée en pointillé dans la Figure 34, indique qu'une inhibition complète de l'activité liante au cortisol est obtenue pour la modification d'un seul résidu histidyl par mole de transcortine.

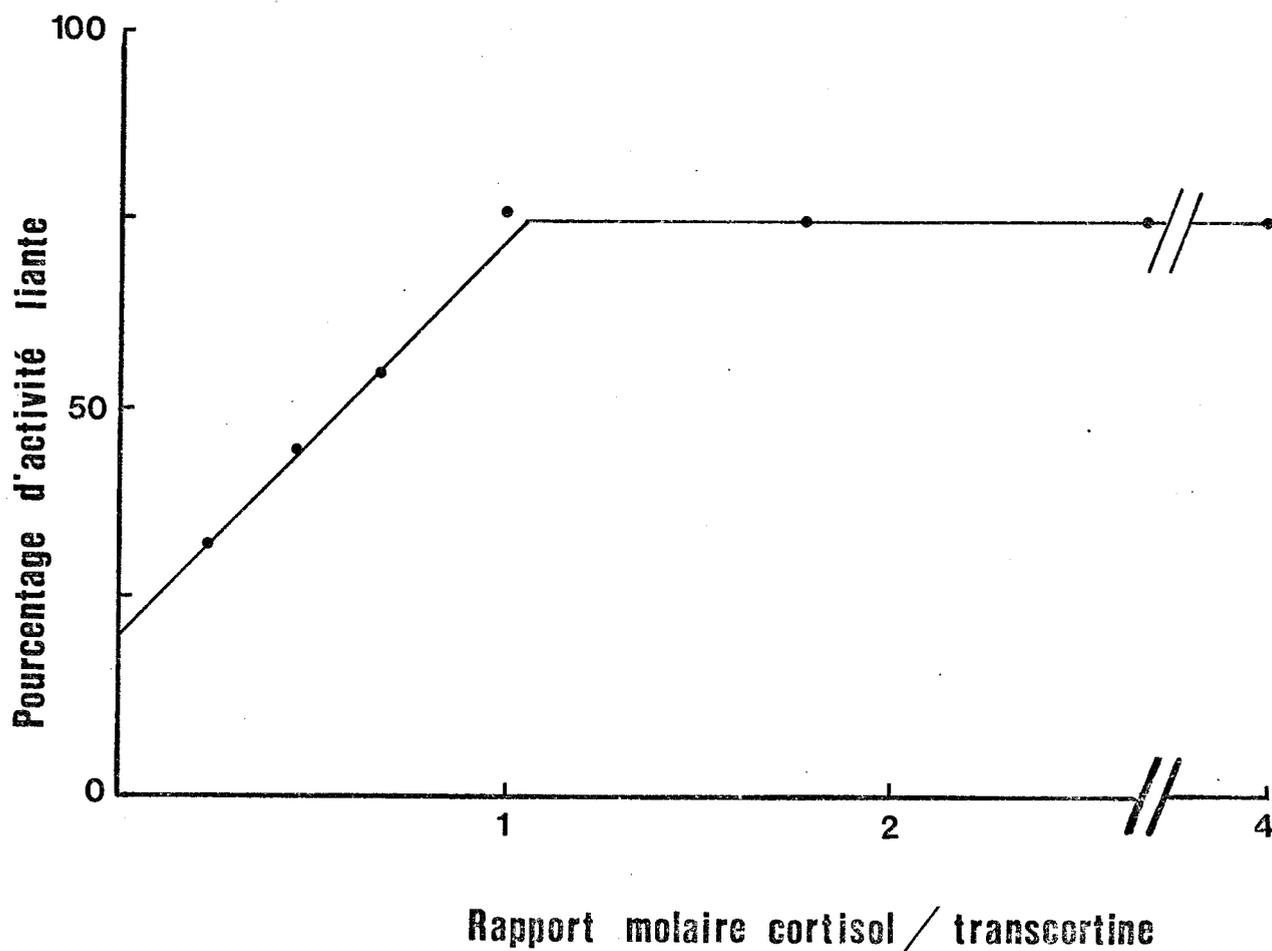


Figure 33 : Protection par le cortisol contre l'action du pyrocarbonate d'éthyle sur la transcortine.

La transcortine (0,02 mM) est traitée par le pyrocarbonate d'éthyle 1 mM après avoir ajouté différentes quantités de cortisol [^3H] (10 Ci/mole). Après 20 minutes de réaction à température ambiante, du cortisol [^3H] (10 Ci/mole) est ajouté de manière à obtenir la même concentration en cortisol dans chaque solution. L'activité liante est ensuite déterminée par la méthode au charbon-dextran.

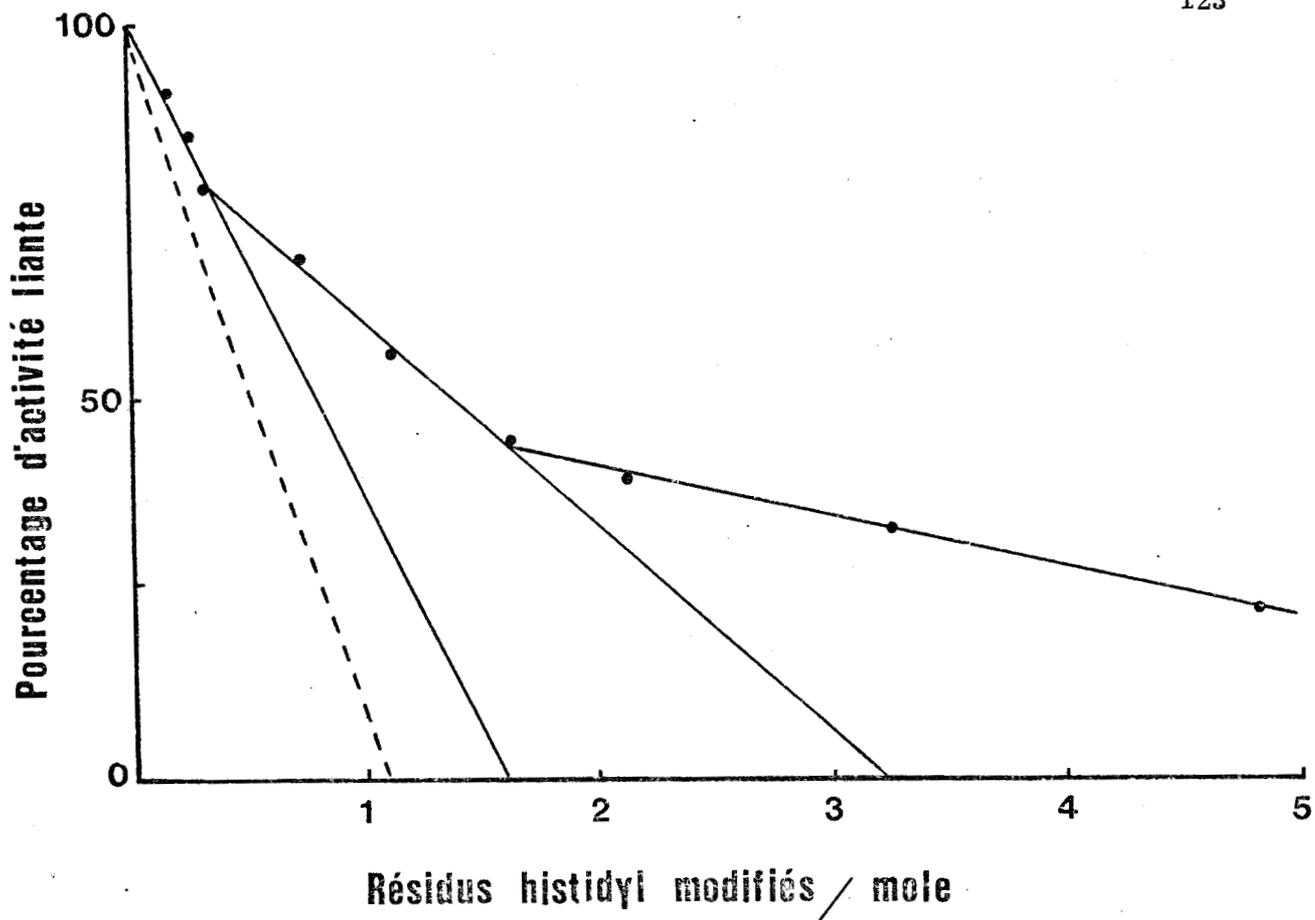


Figure 34 : Diminution de l'activité liante au cortisol de la transcortine en fonction du nombre de résidus éthoxycarbonylhistidyl.

La transcortine (0,02 mM) est traitée avec différentes concentrations en pyrocarbonate d'éthyle (rapport molaire réactif/transcortine = 0 à 25). La première pente (- 66,90) est obtenue avec des rapports molaires de 0 à 2 ; la deuxième pente (- 24,95) avec des rapports molaires de 2 à 7 et la troisième (négligeable) avec des rapports molaires de 7 à 25. L'addition des 2 premières pentes (- 66,90 + - 24,95 = -91,85) indique que l'inhibition complète de l'activité liante au cortisol est obtenue par la modification de 1 résidu histidyl par mole de transcortine (-----). L'activité est mesurée par le charbon-dextran et le contenu en éthoxycarbonylhistidine est déterminé par analyse spectrale différentielle.



b) Résidu de tyrosine essentiel

La transcortine contient 9 résidus de tyrosine par mole.

α) Inactivation de la transcortine par le tétranitrométhane

La cinétique de réaction du tétranitrométhane (2 mM) avec la transcortine (0,02 mM) à deux pHs différents est montrée sur la Figure 35. Une baisse d'environ 50 p. 100 de l'activité d'origine est observée après 1 h de réaction, elle n'est pas beaucoup plus importante quand la réaction est conduite à pH 8 plutôt qu'à pH 6. Comme aucune diminution d'activité n'est plus observée après un temps de réaction de 2 h, ce temps a été retenu pour étudier l'inactivation en fonction de la concentration en tétranitrométhane. La transcortine est en solution 0,04 mM à pH 6 et les rapports molaires réactif / transcortine varient de 0 à 100 (0 à 4 mM) : le pourcentage d'activité résiduelle atteint un plateau (à environ 50 %) dès que le rapport molaire réactif / transcortine devient supérieur ou égal à 20 (concentration réactif 0,8 mM) (Figure 36). A la différence de ce qui a été observé lors de la modification par le pyrocarbonate d'éthyle, aucune discordance n'est apparue entre les deux méthodes utilisées pour la mesure d'activité : l'adsorption au charbon-dextran et la dialyse multiple à l'équilibre.

Les vitesses d'inactivation sont très proches à pH 8 et à pH 6 (Figure 35) ; elles diffèrent, en cela, des vitesses de réaction du tétranitrométhane avec des peptides modèles à tyrosine (SOKOLOVSKY, RIORDAN et VALLEE) (146). Dans ces peptides, le tétranitrométhane modifie les résidus tyrosyl et oxyde les groupements sulfhydryl à pH 8 mais seuls les groupements sulfhydryl sont modifiés à pH 6. SOKOLOVSKY, RIORDAN et VALLEE ont donc pensé que cette dépendance du pH pouvait être mise à profit pour différencier les deux types de résidus. En fait, la réactivité des résidus d'acide aminé dans une protéine est très liée à l'environnement stérique et chimique de ces résidus, elle diffère donc souvent de celle des acides aminés d'un peptide. Ainsi la modification des résidus tyrosyl de l'aspartate-amino-transférase par le tétranitrométhane est indépendante du pH entre 6 et 9

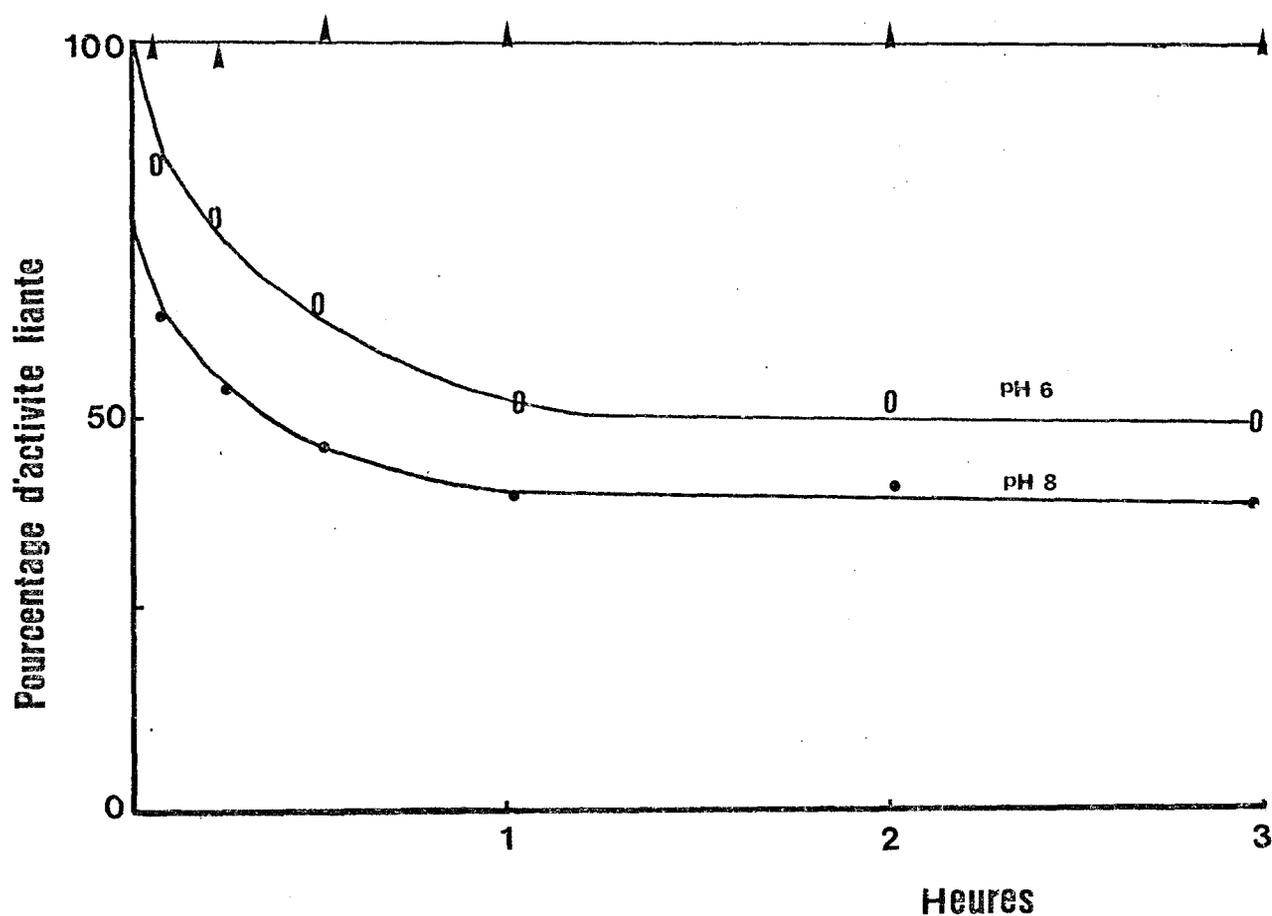
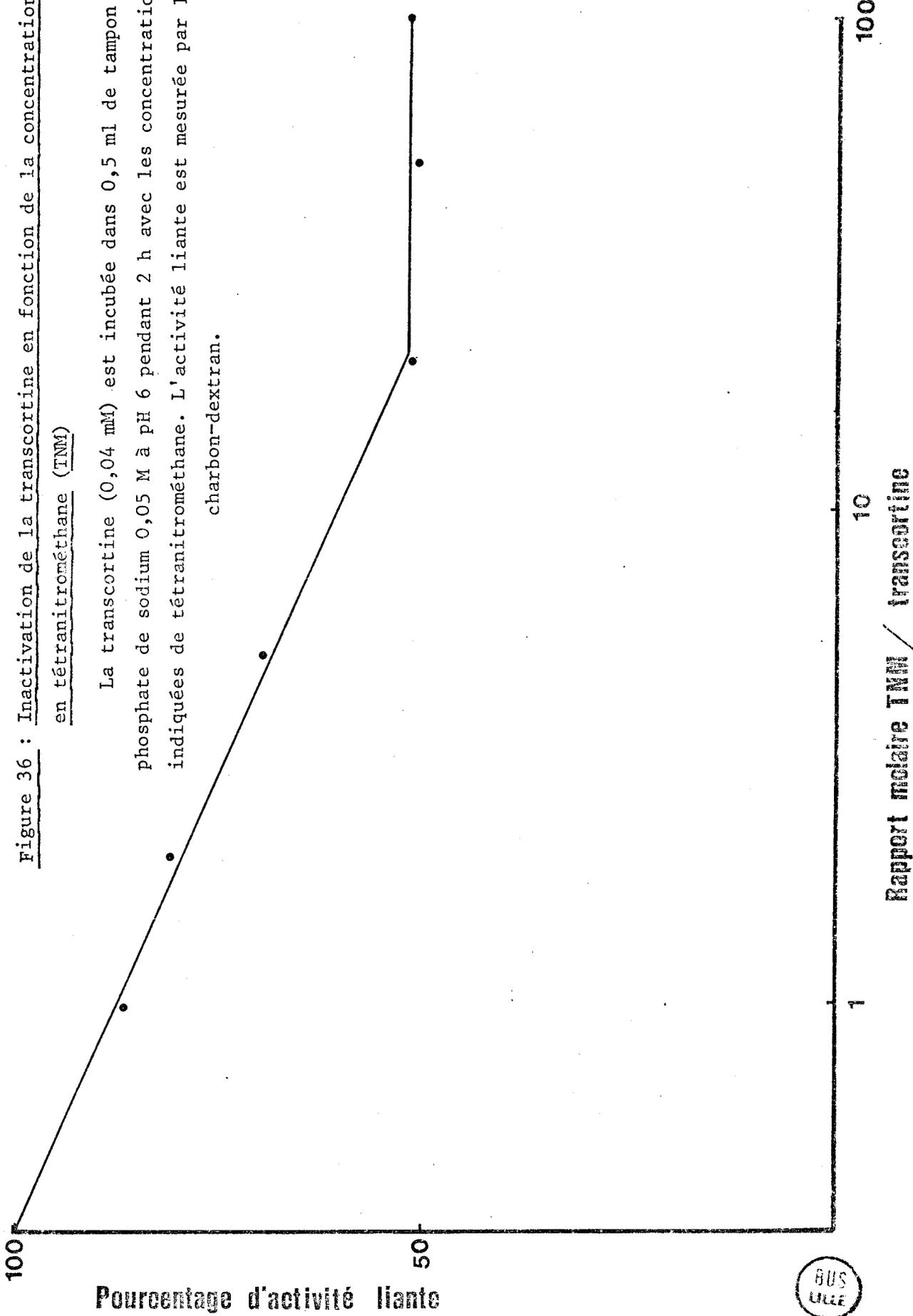


Figure 35 : Cinétique de l'inactivation de la transcortine par le tétranitrométhane.

La transcortine (0,02 mM) est incubée avec le tétranitrométhane (2 mM) dans 2 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8 (●—●) et dans 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6 contenant du cortisol [^3H] (40 Ci/mole) 0,025 mM (▲—▲) ou sans cortisol (○—○). L'activité liante est mesurée par le charbon-dextran.

Figure 36 : Inactivation de la transcortine en fonction de la concentration en tétranitrométhane (TNM)

La transcortine (0,04 mM) est incubée dans 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6 pendant 2 h avec les concentrations indiquées de tétranitrométhane. L'activité liante est mesurée par le charbon-dextran.



(CHRISTEN et RIORDAN) (154). Il est donc important d'identifier, dans la transcortine modifiée, le ou les résidus d'acide aminé dont la modification entraîne une perte d'activité.

β) Identification des acides aminés modifiés

De manière à diminuer la réactivité des acides aminés non-essentiels, la modification est réalisée à pH 6. Après incubation avec le tétranitrométhane, des résidus tyrosyl et cystéinyl sont modifiés mais aucune perte d'activité ne se produit si la réaction est conduite en présence de cortisol en léger excès stoechiométrique sur la transcortine (rapport molaire = 1,25) (Tableau XIV). Le nombre de groupements -SH oxydés par mole est le même dans la transcortine active (protégée par le cortisol) et dans la transcortine inactivée à 53 p. 100 ; par contre le nombre de résidus nitrotyrosyl est supérieur dans la transcortine inactivée. L'inactivation à 53 p. 100 ne peut donc pas être la conséquence de l'oxydation des groupements sulfhydryl mais une corrélation entre cette inactivation et la modification de 0,4 résidu tyrosyl par mole peut être envisagée (Tableau XIV).

γ) Spécificité de la modification

Comme le montrent la Figure 35 et le Tableau XIV, aucune perte d'activité n'est observée quand le tétranitrométhane est ajouté à la transcortine en présence d'un léger excès stoechiométrique de cortisol (rapport molaire cortisol / protéine = 1,25). Cette forte protection induite par le cortisol peut expliquer pourquoi l'inactivation de la transcortine est toujours incomplète. La transcortine n'est, en effet, jamais obtenue totalement libre de cortisol par le charbon-dextran à 37° C (voir Appendice technique) : environ 5 p. 100 des sites de liaisons restent occupés. Le cortisol résiduel peut protéger les sites de liaison dans une proportion supérieure à celle du rapport molaire cortisol résiduel / transcortine. Ceci est possible si on admet que le cortisol résiduel s'échange continuellement d'une molécule de transcortine à une autre ; de fait, la vitesse de dissociation du complexe transcortine-

Tableau XIV

Réaction de la transcortine avec le tétranitrométhane en la présence

et en l'absence de cortisol : acides aminés modifiés

La transcortine (0,04 mM) dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6 est incubée avec le tétranitrométhane 2 mM en la présence ou en l'absence de cortisol [^3H] (40 Ci/mole) 0,05 mM. La réaction est arrêtée après 2 h par addition de dithiothreitol 10 mM. Les résidus nitrotyrosyl et les groupements -SH sont dosés après dessalage sur Bio-gel P 6. L'activité liante est mesurée par le charbon-dextran. Les détails techniques sont décrits dans l'Appendice technique.

	Pourcentage d'inactivation	Résidus nitrotyrosyl / mole de transcortine	Groupements -SH oxydés / mole de transcortine
(T) Témoin	0	0	0
(A) Incubation avec TNM	53	0,9	0,4
(B) Incubation avec TNM + cortisol ^3H	0	0,5	0,4
(A) - (B)	53	0,4	0

T N M : tétranitrométhane.

cortisol, déterminée par STROUPE et al. (79), est élevée (0,03 sec.⁻¹ à 20°C et à pH 7,4), elle est de plus, très pH-dépendante en deçà de pH 7 : la vitesse de dissociation est ainsi 3 à 4 fois plus rapide à pH 6 qu'à pH 7,4 .

Le dichroïsme circulaire et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ne montrent pas d'altérations structurales dans la transcortine modifiée. Les spectres de dichroïsme de la transcortine inactivée et de la transcortine native sont identiques. Une seule zone est observée après électrophorèse en gel de polyacrylamide de la transcortine modifiée ; cette zone a une migration identique à celle de la transcortine native.

§) Stoechiométrie de la réaction

Une corrélation semble exister entre la perte d'activité et la nitration d'un résidu tyrosyl (Tableau XIV), cette corrélation a été confirmée en conduisant la réaction avec des concentrations faibles en tétranitrométhane : 0,02 à 0,80 mM lesquelles correspondent à des rapports molaires réactif / transcortine de 0,5 à 20. A la différence de la modification par le pyrocarbonate, l'excès de réactif et ses sous-produits doivent être éliminés avant le dosage de la nitrotyrosine par analyse spectrale : un dessalage est réalisé sur des fractions de 1 ml dans une petite colonne de Bio-gel P 6 ; le pic protéique élué est ensuite concentré à 1 ml par ultrafiltration. Comme ces étapes entraînent une perte de protéine, une concentration plus élevée en transcortine est utilisée pour la modification (0,04 mM alors qu'une concentration de 0,02 mM était utilisée avec le pyrocarbonate d'éthyle).

Pour chaque concentration en tétranitrométhane, la quantité de résidus nitrotyrosyl est mise en relation avec le pourcentage d'activité résiduelle (Figure 37) : deux pentes sont obtenues mais, à la différence des pentes observées avec la modification par le pyrocarbonate, la deuxième pente est trop faible pour interférer avec la première. Une perte complète d'activité correspond donc, comme le montre la Figure 37, à la nitration d'un seul résidu tyrosyl par molécule de transcortine.

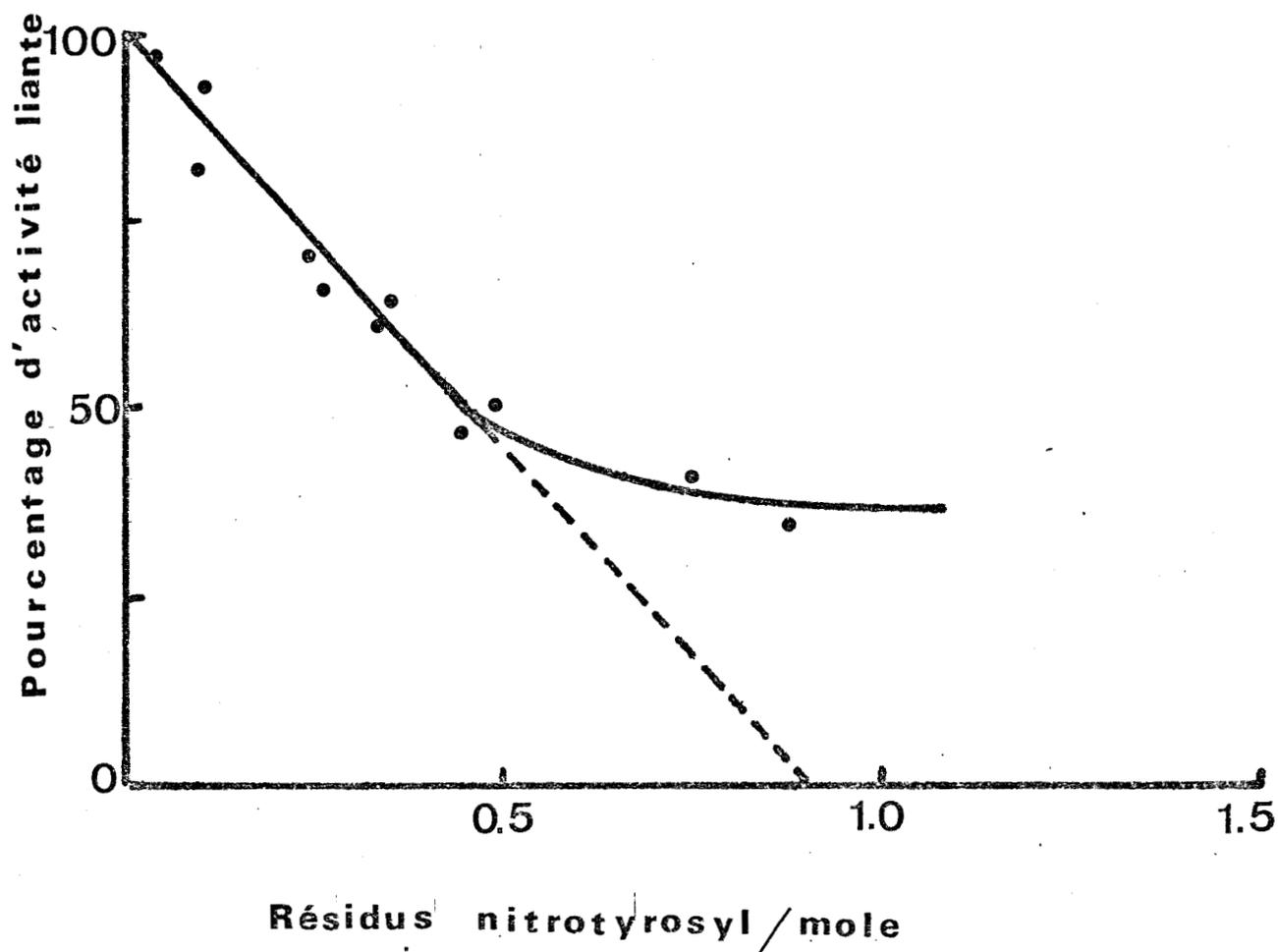


Figure 37 : Diminution de l'activité liante au cortisol de la tyrosine en fonction du nombre de résidus nitrotyrosyl.

La transcortine (0,04 mM) a été nitrée avec des concentrations croissantes en tétranitrométhane (rapport molaire réactif/protéine = 0 à 20) dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6. L'activité est mesurée par le charbon-dextran et le contenu en résidus nitrotyrosyl est déterminé par analyse spectrale différentielle.

c) Discussion

Les études sur la spécificité de réaction du pyrocarbonate d'éthyle avec les acides aminés à un pH inférieur à 7 ont montré que les résidus histidyl essentiels sont susceptibles d'être modifiés préférentiellement (PRADEL et KASSAB) (147) ; (THOME-BEAU et al.) (152) ; (HOLBROOK et INGRAM) (155). Un travail récent a démontré, en utilisant du pyrocarbonate d'éthyle [^{14}C], que les faibles concentrations en réactif n'acylent ni les acides aminés libres autres que les dérivés imidazole, ni les résidus d'acide aminé autres que l'histidine (CHOONG et al.) (156). Nous avons montré que le pyrocarbonate d'éthyle inactive la transcortine en acylant un seul résidu histidyl par mole. De plus, le traitement de l'éthoxycarbonyl-transcortine par l'hydroxylamine supprime complètement la bande à 240 nm du spectre différentiel et restaure l'activité liante ; cette régénération exclut la modification d'un groupement aminé essentiel (MELCHIOR et FAHRNEY) (148). Cependant l'irréversibilité de l'inactivation par des concentrations élevées en pyrocarbonate (5 mM - 10 mM) suggère qu'une réaction différente apparaît dans ce cas. Ce ne peut pas être une modification de résidus tyrosyl car aucune bande spectrale n'est observée dans la région d'absorption allant de 260 à 300 nm, mais il peut se produire une modification de groupements ξ -aminés ou un clivage de BAMBERGER du noyau imidazole ; un tel clivage a été démontré sur l'histidine libre (LOSEMORE et PRATT) (157) et suggéré dans différentes protéines (LOSEMORE et PRATT) (157) ; (ROGERS et al.) (158) ; (Mc TIGUE et VAN ETTEN) (159).

En accord avec la spécificité connue du tétranitrométhane (SOKOLOVSKY et al.) (146), celui-ci a modifié des résidus tyrosyl et cystéinyl dans la transcortine. Cependant l'inactivation ne peut pas être due à l'oxydation de groupements sulfhydryl car la quantité de résidus cystéine oxydés est la même dans la transcortine inactivée et la transcortine protégée par le cortisol ; de plus, nous avons montré précédemment que le résidu de cystéine accessible de la transcortine semble partiellement

oxydé sous forme d'acide sulfénique et n'est pas un acide aminé essentiel pour la liaison au cortisol. A la différence des peptides modèles à tyrosine, la nitration est efficace à un pH acide (pH 6) ; une telle indépendance du pH a été observée aussi avec l'aspartate aminotransférase (CHRISTEN et RIORDAN) (154). La perte complète d'activité correspond à la nitration d'un seul résidu tyrosyl par mole de transcortine.

Les deux modifications chimiques réalisées n'ont pas provoqué de réticulation de la protéine ; de plus, aucune altération de la structure secondaire n'a pu être détectée par dichroïsme circulaire. Le cortisol protège la transcortine contre l'inactivation : la protection est totale contre le tétranitrométhane et d'environ 75 p. 100 contre le pyrocarbonate d'éthyle. Cette protection suggère fortement que les deux acides aminés essentiels sont situés à l'intérieur du site de liaison bien que d'autres possibilités puissent être envisagées : si la liaison d'un ligand entraîne un changement conformationnel de la protéine, il est possible que l'inactivation biologique par modification chimique ait lieu même si le résidu d'acide aminé essentiel n'est pas dans le site actif. La modification chimique de cet acide aminé essentiel causera alors l'inactivation, soit en gênant le changement conformationnel induit par le ligand, soit en provoquant lui-même un changement conformationnel. De telles interprétations ont été suggérées pour le résidu tyrosyl essentiel de l'ATPase mitochondriale (FERGUSON et al.) (160) ; et le résidu histidyl essentiel de la luciférase (COUSINEAU et MEIGHEN) (161).

L'étude de l'activité liante de la transcortine en fonction du pH a montré un point d'inflexion pour un pH d'environ 6,5 (VAN BAELEN et al.) (162). L'implication d'un résidu histidyl ($pK = 6,5$) dans la liaison au cortisol a été envisagée après étude de la vitesse de dissociation transcortine-stéroïde en fonction du pH (STROUPE et al.) (79) et la présence d'un résidu histidyl dans le site de liaison a été précédemment démontrée par marquage d'affinité. Le résidu histidyl essentiel que nous avons mis en évidence corrobore donc l'observation de STROUPE et al. et suggère qu'il s'agit du résidu histidyl que nous avons précédemment localisé près du groupement

20-cétonique du cortisol par marquage d'affinité. Nous ne pouvons cependant pas affirmer que c'est le même résidu puisque le marquage d'affinité ne prouve pas le rôle essentiel de l'acide aminé modifié.

Le résidu de tyrosine essentiel, s'il est présent à l'intérieur du site, pourrait se localiser dans la région profonde, non explorée par le marquage d'affinité, et interagir avec le groupement $\Delta 4 - 3$ cétonique du cortisol (groupement indispensable à la liaison transcortine-stéroïde (Figure 38). Cette hypothèse (tyrosine profondément enfouie et histine plus extérieure) expliquerait les différences d'action du tétranitrométhane (Tyr) et du pyrocarbonate d'éthyle (His) : le cortisol protège complètement contre le tétranitrométhane (activité de 100 p. 100) alors qu'il ne reste que 75 p. 100 d'activité après action du pyrocarbonate. La même différence d'activité est observée lors de l'action de ces réactifs sur la transcortine libre (ne contenant plus que 5 à 10 p. 100 du cortisol initial) puisque les activités résiduelles après action du tétranitrométhane et du pyrocarbonate sont respectivement de 40 p. 100 et 15 p. 100.

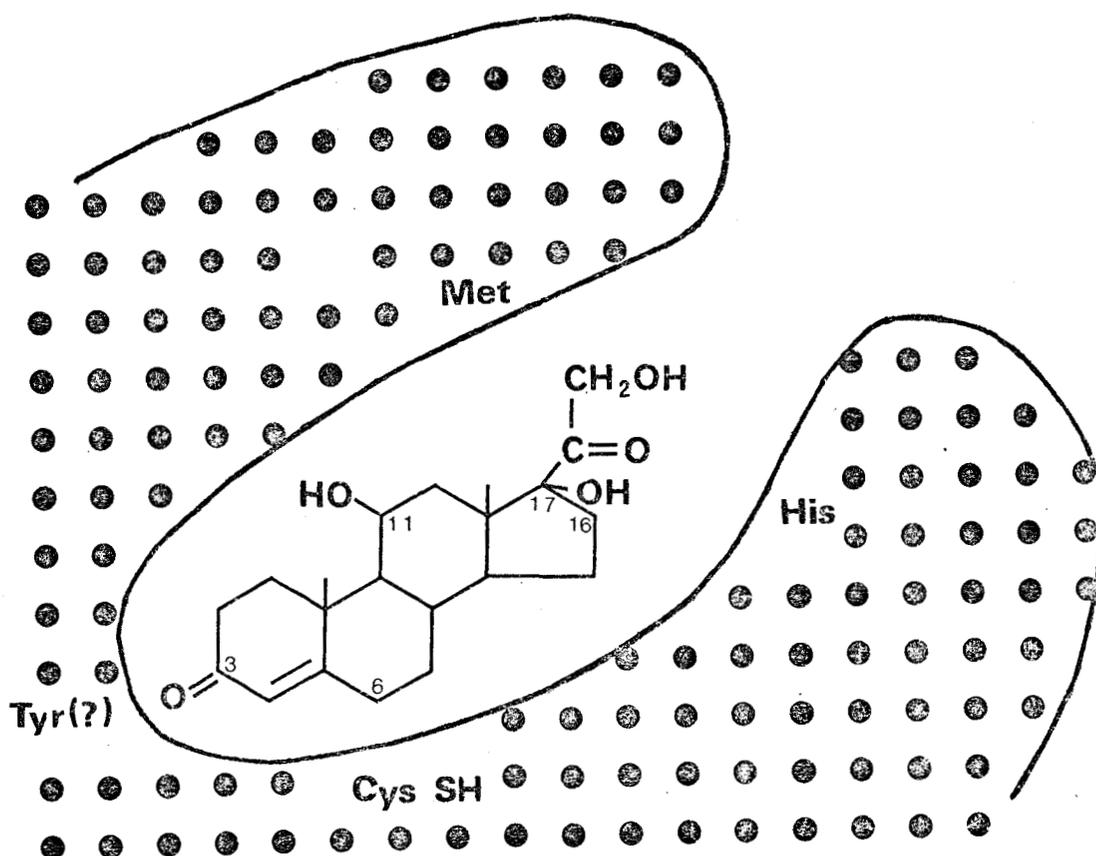


Figure 38 : Localisation présumée des résidus d'acides aminés identifiés dans le site de liaison de la transcortine.

Trois résidus ont été localisés par marquage d'affinité : Met et His (résultats personnels), Cys SH (KHAN et ROSNER - 132). Ce dernier n'est cependant pas essentiel pour la liaison au cortisol. Deux résidus essentiels ont été déterminés par modification chimique spécifique : Tyr et His. La différence de protection par le cortisol de ces deux acides aminés suggère que la tyrosine est située profondément dans le site alors que l'histidine est plus accessible.

CONCLUSIONS GENERALES

Pour étudier le mécanisme d'action des hormones stéroïdes, plusieurs voies sont envisageables. Il était normal pour un laboratoire de structure protéique d'étudier les protéines de transport des stéroïdes ; ces protéines ont un rôle essentiel dans leur mode d'action (voir la revue générale) mais leurs propriétés sont encore très peu connues. Nous avons choisi la protéine qui semblait la plus apte à être isolée en quantité suffisante pour son étude : la transcortine.

La mise au point d'une méthode originale d'isolement, efficace et rapide (chromatographie d'affinité), a été décisive dans notre travail. Disposant dès lors de quantités relativement importantes de transcortine pure et active, nous avons pu en déterminer les divers paramètres physico-chimiques, la composition en acides aminés et en oses, et la séquence N-terminale. Ces déterminations ont montré les discordances existant entre la transcortine isolée par les méthodes classiques et celle isolée par chromatographie d'affinité. Seule cette dernière méthode permet l'obtention de transcortine réellement pure et active.

Nos résultats concernant la composition ne peuvent être comparés qu'avec ceux de ROSNER (62) (64) qui est le seul à avoir fait ces déterminations sur de la transcortine isolée par chromatographie d'affinité. Les compositions en acides aminés sont en bon accord ; ROSNER n'a pas déterminé la composition en oses ; quant à la séquence N-terminale, nous n'avons pu réaliser, comme ROSNER, plus de 8 cycles de dégradation sur un séquenceur automatique. Nous avons retrouvé la même séquence sauf, curieusement, pour les deux premiers acides aminés, c'est-à-dire normalement les plus faciles à identifier.

L'étude de la structure secondaire et de la polymérisation, celle du site de liaison au cortisol, n'avaient jamais été entreprises au préalable. Elles nous ont permis de préciser les caractéristiques de la partie protéique

de la molécule (73 p. 100). La transcortine est ainsi apparue comme une protéine capable de se polymériser très facilement dès qu'elle n'est plus dans un milieu favorable : température $\geq 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} < 5$. Cette polymérisation s'accompagne d'un changement important de la structure secondaire (diminution des hélices α et apparition de structure β) et d'une inactivation irréversible. Cette dernière semble correspondre à la disparition d'une région bien précise en hélice α et non à l'apparition de structure β .

L'étude du site de liaison par marquage d'affinité a permis de localiser deux résidus d'acide aminé dans le site de liaison :

- = un résidu de méthionine qui pourrait avoir une liaison hydrogène avec le groupement 11 β -hydroxyle du cortisol à moins qu'il n'ait des interactions hydrophobes avec les groupements méthyl 18 et 19.
- = un résidu d'histidine qui permet vraisemblablement une liaison hydrogène avec la fonction 20-cétonique du cortisol.

L'utilisation de réactifs spécifiques d'un type d'acide aminé a permis de montrer :

- = le caractère non essentiel du résidu de cystéine accessible bien que celui-ci ait été localisé au niveau de l'atome de carbone 6 du cortisol par KHAN et ROSNER à l'aide du marquage d'affinité (132).
- = le caractère essentiel d'un résidu d'histidine et d'un résidu de tyrosine. Ce dernier est totalement protégé par le cortisol, il semble donc situé profondément dans le site. On peut supposer qu'il ait des interactions avec la fonction $\Delta - 4 - 3$ cétonique du cortisol qui est connue comme absolument indispensable à la liaison. Cette région semble de plus, elle aussi, située profondément à l'intérieur du site alors que l'extrémité opposée (chaîne latérale en position 17) est tournée vers l'extérieur (BASSET et al.) (117) ; elle est également très étroite

puisque nous n'avons pas pu substituer sur les cycles A et B de groupements encombrants sans supprimer l'affinité de liaison.

La mise en évidence d'acides aminés impliqués dans la liaison au cortisol est une première étape dans l'étude du site de liaison ; il sera, en effet, nécessaire de compléter ces déterminations en étudiant la structure covalente des peptides contenant les acides aminés identifiés. Ceux-ci peuvent être obtenus par coupure chimique ou enzymatique de la transcortine modifiée. Les peptides marqués sont ensuite identifiés par leur radioactivité dans le cas du marquage d'affinité ou par leur zone d'absorption caractéristique à 428 nm dans le cas d'une nitration.

°°

L'étude de la structure du site de liaison s'inscrit dans celle de la molécule entière qui est actuellement commencée : structure primaire et structure tertiaire après cristallisation. Seule la connaissance de la structure complète permettra de connaître avec précision les interactions de l'hormone stéroïde avec son transporteur spécifique. A cet égard, la transcortine est un excellent modèle dont l'étude devrait faciliter une investigation ultérieure du mode de liaison de l'hormone au récepteur cellulaire. Celui-ci ne pourra, en effet, être isolé qu'en quantité beaucoup plus faible.

BIBLIOGRAPHIE

Les numéros entre parenthèses indiquent l'ordre d'apparition dans le texte.

AGARWALL, M.K. (1978)

FEBS Letters, 85, 1-8. (22)

AKHREM, A.A., SVIRIDOV, O.V., KUKUSHKINA, I.I., MARTSEV, S.P. et
CHASHCHIN, V.L. (1976)

Vesti Akad. Navuk (BSSR) Ser. Khim Navuk, 6, 79-81 (61)

AMARAL, L., LIN, K., SAMUELS, A.J. et WERTHAMER, S. (1974)

Biochim. Biophys. Acta, 362, 332-345 (53)

AMARAL, L., SAMUELS, A.J. et WERTHAMER, S. (1971)

Experientia, 27, 511-512 (35)

AMARAL, L. et WERTHAMER, S. (1976)

Nature, 262, 589-590 (47)

ARIAS, F., SWEET, F. et WARREN, J.C. (1973)

J. Biol. Chem., 248, 5641-5647 (123)

AUBERT, J.P. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976)

Arch. Biochem. Biophys., 175, 400-409. (116)

BARGETZI, J.P., SAMPATH KUMAR, K.S.V., COX, D.J., WALSH, K.A. et
NEURATH, H. (1963)

Biochemistry, 2, 1468-1474 (110)

BASSET, M., DEFAYE, G. et CHAMBAZ, E.M. (1975)

FEBS Letters, 60, 364-368 (117)

BATTAIS, E., TEROUANNE, B., NICOLAS, J.C., DESCOMPS, B. et
CRASTES DE PAULET, A. (1977)

Biochimie, 59, 909-917 (121)

BEATO, M. et FEIGELSON, P. (1972)

J. Biol. Chem., 247, 7890-7896 (39)

- BLOUGH, H.A. et TIFFANY, J.M. (1973)
Adv. Lipid Res., 11, 267-339 (10)
- BRUCE, T.C. et MARKIN, J. (1957)
J. Am. Chem. Soc., 79, 3150-3153 (142)
- BRUCE, T.C. et SAYIGH, A.B. (1959)
J. Am. Chem. Soc., 81, 3416-3420 (143)
- BRUNELLI, B. (1934)
Arch. Int. Pharmacodyn., 49, 262 (5)
- BURLINGAME, A.L., HAUG, P., BELSKY, T. et CALVIN, M. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1406 (17)
- BURSTEIN, Y., WALSH, K.A. et NEURATH, H. (1974)
Biochemistry, 13, 205-210.
- BUZAS, A., CANAC, F., EGNELL, C. et FREON, P. (1965)
C.R. Acad. Sci. (Paris) 260, 2249 (126)
- CASTELLINO, F.J. et BARKER, R. (1968)
Biochemistry, 7, 2207-2217 (111)
- CHADER, G.J., RUST, N., BURTON, R.M. et WESTPHAL, U. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 6581-6588 (100)
- CHADER, G.J. et WESTPHAL, U. (1968)
Biochemistry, 7, 4272-4282 (99)
- CHADER, G.J. et WESTPHAL, U. (1968)
J. Biol. Chem., 243, 928-939 (114)
- CHALLIS, J.R.G. et BENNETT, M. (1977)
Am. J. Obstet. Gynecol., 129, 655-661 (29)
- CHAN, D.W. et SLAUNWHITE, W.R. Jr. (1977)
Arch. Biochem. Biophys., 182, 437-442 (82)

- CHIN, C.C. et WARREN, J.C. (1972)
Biochemistry, 11, 2720-2726 (133)
- CHOONG, Y.S., SHEPERD, M.G. et SULLIVAN, P.A. (1977)
Biochem. J., 165, 385-393 (156)
- CHRISTEN, P. et RIORDAN, J.F. (1970)
Biochemistry, 9, 3025-3034 (154)
- COCHET, C. et CHAMBAZ, E.M. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 444, 240-251 (40)
- COCHET, C. et CHAMBAZ, E.M. (1976)
Comp. Biochem. Physiol., 53B, 73-76 (77)
- COX, D.J. (1971)
Arch. Biochem. Biophys., 146, 181-195 (102)
- CUATRECASAS, P. (1970)
J. Biol. Chem., 245, 3059-3065 (97)
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. et ANFINSEN, C.B. (1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 636-643 (87)
- DAUGHADAY, W.H. (1958)
J. Clin. Invest., 37, 511-516 (90)
- DAUGHADAY, W.H. (1959)
Physiol. Rev., 39, 885-902 (94)
- DAUGHADAY, W.H., ADLER, R.E., MARIZ, I.K. et RAZINSKI, D.C. (1962)
J. Clin. Endocr., 22, 704-710 (92)
- DAUGHADAY, W.H., BREMER, R. et HARNETT-COLLINS, C. (1956)
J. Clin. Invest., 35, 1428-1433 (6)
- DAUGHADAY, W.H. et KOZAK, I. (1958)
J. Clin. Invest., 37, 519-523 (7)

- DAUGHADAY, W.H. et KOZAK, I. (1958)
J. Clin. Invest., 37, 511-518 (134)
- DAUGHADAY, W.H. et MARIZ, I.K. (1961)
Metabolism, 10, 936-950 (83)
- DAYHOFF, M.O. et ECK, R.V. (1968)
"Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biomedical
Research Foundation, Silver Spring, Maryland (109)
- DE LONGCHAMP, D., LUBET, P. et DROSDOWSKY, M. (1974)
Gen. Comp. Endocrinol., 82, 116-127 (12)
- DE MOOR, P., STEENO, O. et DECKX, R. (1963)
Acta Endocrin., 44, 107-118 (80)
- DE MOOR, P., HEIRWEGH, K., HEREMANS, J. et DECLERCK-RASKIN, M. (1962)
J. Clin. Invest., 41, 816-827 (71)
- DOE, R.P., FERNANDEZ, R. et SEAL, U.S. (1964)
J. Clin. Endocrin., 24, 1029-1039 (93)
- DOE, R.P., ZINNEMAN, H.H., FLINK, E.B. et ULSTROM, R.A. (1960)
J. Clin. Endocrin. Metab., 20, 1484-1492 (56)
- EGER, C.H., GREINER, M.J. et NORTON, D.A. (1971)
Steroids, 18, 231-249 (72)
- FELDMAN, D., FUNDER, J.W. et EDELMAN, I.S. (1973)
Endocrinology, 92, 1429-1441 (45)
- FERGUSON, S.J., LLOYD, W.J., LYONS, M.H. et RADD, G.K. (1975)
Europ. J. Biochem., 54, 117-126 (160)
- FRIES, K. (1912)
Ber., 45, 2965 (141)
- GANGULY, M. et WARREN, J.C. (1971)
J. Biol. Chem., 246, 3646-3652 (135)
- GIBBONS, R.A. (1972)
in "Glycoproteins" (GOTTSCHALK, A., éd.)
Part A, pp. 31-140, Elsevier, Amsterdam, London and New-York (106)

- GILL, G.V. et COOK, D.B. (1975)
Clin. Chim. Acta, 63, 231-233 (76)
- GOREN, J.H., GLICK, D.M. et BARNARD, E.A. (1968)
Arch. Biochem. Biophys., 126, 607-623 (129)
- GUIDOLLET, J. et LOUISOT, P. (1969)
Acta Endocrinol., 62, 468-476 (50)
- GUNLACH, H.G., MOORE, S. et STEIN, W.H. (1959)
J. Biol. Chem., 234, 1761-1764 (128)
- HAGENMAIER, H. et FRANK, H. (1972)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 1973-1976 (96)
- HEIDENHAIN, M. (1903)
Arch. Ges. Physiol., 96, 440 (1)
- HOLBROOK, J.J. et INGRAM, V.A. (1973)
Biochem. J., 131, 729-738 (155)
- HUBENER, H.J. et SCHMIDT, J.G.H. (1954)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 296, 246-256 (89)
- KARLSON, P., KOOLMAN, J. et HOFFMANN, J.A. (1975)
Ann. Zool., 15, suppl. 1, 49-59 (14)
- KELLER, N., RICHARDSON, U.I. et YATES, F.E. (1969)
Endocrinology, 84, 49-62 (32)
- KERKAY, J. et WESTPHAL, U. (1968)
Biochim. Biophys. Acta, 170, 324-333 (66)
- KEUTMANN, H.T. et POTTS, Jr. T.T. (1969)
Anal. Biochem., 29, 175-185 (130)
- KHAN, M.S. et ROSNER, W. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 1895-1900 (132)
- KOBLINSKY, M., BEATO, M., KALIMI, M. et FEIGELSON, P. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 7897-7904 (37)
- KOCH, B., LUTZ, B., BRIAUD, B. et MIALHE, C. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 444, 497-507 (41)
- KOCH, B., LUTZ-BUCHER, B., BRIAUD, B. et MIALHE, C. (1977)
J. Endocr., 73, 399 (52)

- KOCH, B., LUTZ-BUCHER, B., BRIAUD, B. et MIALHE, C. (1978)
Hormon. Metab. Res., 10, 174 (42)
- KONIGSBERG, W. (1972)
Methods Enzymol., 25B, 185-188 (104)
- LARROUQUERE, J. (1964)
Bull. Soc. Chim. Fr., 1543 (149)
- LEBEAU, M.C. et BAULIEU, E.E. (1970)
J. Clin. Endocr., 30, 166-173 (60)
- LEBEAU, M.C., MERCIER-BODART, C., OLDS, J., BOURQUIN, D., BRECZY, T.,
RAYNAUD, J.P. et BAULIEU, E.E. (1969)
Ann. Endocrin., 30, 183-197 (74)
- LECOMTE DU NOUY, P. (1922)
J. Exp. Med., 36, 115 (4)
- LE GAILLARD, F. (1975)
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie - LILLE (88)
- LE GAILLARD, F., AUBERT, J.P., DAUTREVAUX, M. et LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H.
(1976)
FEBS Letters, 64, 278-284 (81)
- LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 495, 312-323 (131)
- LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1978)
FEBS Letters, 94, 63-67 (144)
- LE GAILLARD, F., HAN, K.K. et DAUTREVAUX, M. (1975)
Biochimie, 57, 559-568 (68)
- LE GAILLARD, F., RACADOT, A., RACADOT-LEROY, N. et DAUTREVAUX, M. (1974)
Biochimie, 56, 99-108 (65)
- LE HOUX, J.G. et SANDOR, T. (1970)
Steroids, 16, 141-171 (11)
- LITTLE, C. et O'BRIEN, P.J. (1967)
Arch. Biochem. Biophys., 122, 406-410 (136)

- LITTLE, C. et O'BRIEN, P.J. (1969)
Eur. J. Biochem., 10, 533-538 (138)
- LITWACK, G., FILLER, R., ROSENFELD, S.A., LICHTASH, N., WISHMAN, C.A.
et SINGER, S. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 7481-7486 (38)
- LOOSEMORE, M.J. et PRATT, R.F. (1976)
FEBS Letters, 72, 155-158 (157)
- MATHEWS, A.P. (1921)
Absorption Physiol. Rev., 1, 553 (2)
- Mc TIGUE, J.J. et VAN ETTEN, R.L. (1978)
Biochim. Biophys. Acta, 523, 407-421 (159)
- MERCIER-BODARD, C., ALFENSEN, A. et BAULIEU, E.E. (1970)
Acta Endocrinol., supplt n° 147, 204-224 (23)
- MILGROM, E., ATGER, M. et BAULIEU, E.E. (1970)
Nature, 228, 1205-1206 (25)
- MILGROM, E., ATGER, M. et BAULIEU, E.E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 320, 267-283 (33)
- MILGROM, E. et BAULIEU, E.E. (1970)
Endocrinology, 87, 276-287 (43)
- MELCHIOR, W.B. et FAHRNEY, D. (1970)
Biochemistry, 9, 251-258 (148)
- MÜHLRAD, A., HEGYI, G. et TOTH, G. (1967)
Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung., 2, 19-29 (150)
- MULDOON, T.G. et WESTPHAL, U. (1967)
J. Biol. Chem., 242, 5636-5643 (59)
- OHTSUKA, E. et KOIDE, S.S. (1968)
Endocrinology, 83, 999-1003 (73, 91)

- O'MALLEY, B.W. et SCHRADER, W.T. (1976)
Scientific American, 234 (n° 2) 32-43 (21)
- OVADI, J., LIBOR, S. et ELODI, P. (1967)
Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung., 2, 455-458 (145)
- OZON, R. (1972)
in "Steroids in Nonmammalian Vertebrates"
(IDLER, P.R., éd.), pp. 329-414, Academic Press, New-York and
London (10)
- PARKER, D.J. et ALLISON, W.S. (1969)
J. Biol. Chem., 244, 180-189 (137)
- PAYNE, D.W., PENG, L.H., PEARLMAN, W.H. et TALBERT, L.M. (1976)
J. Biol. Chem., 251, 5272-5279 (27)
- PECK, E.J., BURGNER, J. et CLARK, J.H. (1973)
Biochemistry, 12, 4596-4603 (34)
- PONS, M. (1975)
Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences, Montpellier (127)
- PONS, M., NICOLAS, J.C., BOUSSIOUX, A.M., DESCOMPS, B. et CRASTES de
PAULET, A. (1973)
FEBS Letters, 31, 256-260 (118)
- PONS, M., NICOLAS, J.C., BOUSSIOUX, A.M., DESCOMPS, B. et CRASTES de
PAULET, A. (1973)
FEBS Letters, 36, 23-26 (119)
- PONS, M., NICOLAS, J.C., BOUSSIOUX, A.M., DESCOMPS, B. et CRASTES de
PAULET, A. (1976)
Europ. J. Biochem., 68, 385-394 (120)
- PRADEL, L.A. et KASSAB, R. (1968)
Biochim. Biophys. Acta, 167, 317-325 (147)

- RACADOT, A., RACADOT-LEROY, N., LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1976)
Clin. Chim. Acta, 66, 171-180 (28)
- RAFTERY, M.A. et COLE, R.D. (1966)
J. Biol. Chem., 241, 3457-3461 (139)
- RAO, M.L., RAO, G.S., HOLLER, M., BREUER, M., SCHATTENBERG, P.J. et
STEIN, W.D. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 573-584 (36)
- RICHARDSON, K.S.C., NOWACZYNSKI, W. et GENEST, J. (1977)
J. Steroid Biochem., 8, 951-957 (24)
- ROGERS, T.B., GOLD, R.A. et FREENEY, R.F. (1977)
Biochemistry, 16, 2299-2305 (158)
- ROSENTHAL, H.E., PAUL, M.A. et SANDBERG, A.A. (1974)
J. Steroid. Biochem., 5, 219-225 (44)
- ROSENTHAL, H.E., SLAUNWHITE, W.R. et SANDBERG, A.A. (1969)
Endocrinology, 85, 825-830 (30)
- ROSNER; W. (1972)
J. Steroid. Biochem., 3, 531-542 (64)
- ROSNER, W., BEERS, P.C., AWAN, T. et KHAN, M.S. (1976)
J. Clin. Endocrin. Metab., 42, 1064-1073 (26)
- ROSNER, W. et BRADLOW, H.L. (1971)
J. Clin. Endocrinol., 33, 193-198 (62)
- ROUSSEAU, G.G. (1975)
J. Steroid Biochem., 6, 75-89 (20)
- SANDBERG, A.A., ROSENTHAL, H. et SCHNEIDER, S.L. (1966)
in "Steroid Dynamics" (PINCUS, G., NAKAO, T. et TAIT, J.F., éds.)
Academic Press, New-York (75)

- SANDBERG, A.A. et SLAUNWHITE, W.R. Jr (1958)
J. Clin. Invest., 37, 928 (8)
- SANDOR, T. et SONEA, S. (1975)
Biochem. Soc. Trans., 3, 1157-1159 (18)
- SANDOR, T., SONEA, S. et MEHDI, A.Z. (1975)
Am. Zool., 15, suppl. 1, 227-253 (15)
- SAVART, M. et DANIEL-LAMAZIERE, J.M. (1975)
C.R. Acad. Sci. (Paris), 281D, 1517-1520 (54)
- SCATCHARD, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660-672 (70)
- SCHACHMAN, H.K. (1957)
Methods Enzymol., 4, 32-103 (105)
- SCHACHMAN, H.K. (1959)
in "Ultracentrifugation in Biochemistry", Academic Press, New-York (101)
- SCHNEIDER, S.L. et SLAUNWHITE, W.R., Jr (1971)
Biochemistry, 10, 2086-2093 (67)
- SEAL, U.S. et DOE, R.P. (1962)
J. Biol. Chem., 237, 3136-3140 (55)
- SEAL, U.S. et DOE, R.P. (1962)
Cancer Chemotherapy Rept., 16, 329-334 (98)
- SEAL, U.S. et DOE, R.P. (1966)
in "Steroid Dynamics" (PINCUS, G., NAKAO, T. et TAIT, J.F., éds.) p. 63,
Academic Press, New-York (19)
- SHELLABARGER, C.J., STONE, J.P. et HOLTZMAN, S. (1976)
Cancer Res., 36, 1019-1022 (48)

- SLAUNWHITE, W.R., Jr. et SANDBERG, A.A. (1959)
J. Clin. Invest., 38, 384-391 (57)
- SLAUNWHITE, W.R., Jr., SCHNEIDER, S., WISSLER, F.C. et SANDBERG, A.A.
(1966)
Biochemistry, 5, 3527-3532 (58)
- SOBER, H.A. et PETERSON, E.A. (1958)
Féd. Proc., 17, 1116-1126 (85)
- SOKOLOVSKY, M., RIORDAN, J.F. et VALLEE, B.L. (1966)
Biochemistry, 5, 3582-3589 (146)
- SPIRO, R.G. (1960)
J. Biol. Chem., 235, 2860-2869 (107)
- SPIRO, M.J. et SPIRO, R.G. (1962)
J. Biol. Chem., 237, 1507-1510 (108)
- STORM VAN LEEUWEN, W. et ZEIJDNER, J. (1920)
J. Pharmacol. Exp. Ther., 17, 121 (3)
- STRICKLER, R.C., SWEET, F. et WARREN, J.C. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 7656-7662 (124)
- STRONG, L.C. et WILLIAMS, W.L. (1941)
Cancer Res., 1, 886-891 (49)
- STROUPE, S.D., HARDING, G.B., FORSTHOEFEL, M.W. et WESTPHAL, U. (1978)
Biochemistry, 17, 177-182 (79)
- SWEET, F., ARIAS, F. et WARREN, J.C. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 3424-3433 (122)
- SWEET, F., STRICKLER, R.C. et WARREN, J.C. (1978)
J. Biol. Chem., 253, 1385-1392 (125)
- TANFORD, C., KAWAHARA, K. et LAPANJE, S.J. (1967)
J. Am. Chem. Soc., 89, 729-736 (112)
- THOME-BEAU, F., THI-LAN, L., OLOMUCKI, A. et THOAI, N.v. (1971)
Eur. J. Biochem., 19, 270-275 (152)

- THOMPSON, M.J., KAPLANIS, J.N., ROBBINS, W.E. et SVOBODA, J.A. (1973)
Adv. Lipid. Res., 11, 219-265 (13)
- TISELIUS, A., HJERTEN, S. et LEVIN, Ö (1956)
Arch. Biochem. Biophys., 65, 132-155 (86)
- TRAPP, G.A., SEAL, U.S. et DOE, R.P. (1971)
Steroids, 18, 421-432 (63)
- UPTON, G.V. et BONDY, P.K. (1958)
Arch. Biochem. Biophys., 78, 197-205 (9)
- VAN BAELEN, H., BECK, M. et DE MOOR, P. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 2699-2703 (162)
- VAN BAELEN, H. et DE MOOR, P. (1972)
J. Steroid Biochem., 3, 321-323 (113)
- VAN BAELEN, H. et MANNAERTS, G. (1974)
Arch. Biochem. Biophys., 163, 53-56 (31)
- WEBER, K., PRINGLE, J.R. et OSBORN, M. (1972)
Methods Enzymol., 26C, 3-27 (103)
- WERTHAMER, S., GOVINDARAJ, S. et AMARAL, S. (1976)
J. Clin. Invest., 57, 1000-1008 (51)
- WERTHAMER, S., SAMUELS, A.J. et AMARAL, L. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 6398-6407 (46)
- WESTHAUS, P.A. et POHL, H.A. (1978)
J. Theor. Biol., 70, 157-169 (140)
- WESTPHAL, U. (1967)
Arch. Biochem. Biophys., 118, 556-567 (78)
- WESTPHAL, U. (1969)
Methods Enzymol., 15, 761-796 (84)

WESTPHAL, U. (1978)

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 431-447 (69)

WESTPHAL, U., ASHLEY, B.D. et SELDEN, G.L. (1961)

Arch. Biochem. Biophys., 92, 441-448 (95)

WESTPHAL, U. et HARDING, G.B. (1973)

Biochim. Biophys. Acta, 310, 518-527 (115)

WOLF, B., LESNAW, J.A. et REICHMANN, M.E. (1970)

Eur. J. Biochem., 13, 519-525 (153)

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

	<u>Page</u>
I - SOLEMENT DE LA TRASCORTINE	T/ 2

A/ Préparation du HCAC - Sépharose	T/ 2
B/ Chromatographies	T/ 6
II - CONTROLES DE PURETE	T/ 13

A/ Electrophorèse en gel de polyacrylamide	T/ 13
B/ Immunoélectrophorèse	T/ 16
III - METHODES DE DOSAGE	T/ 18

A/ Cortisol	T/ 18
B/ Transcortine	T/ 19
	par gel-filtration
	par immunoélectrodifusion
IV - MESURES D'ACTIVITE	T/ 22

A/ Dialyse à l'équilibre	T/ 22
B/ Méthode au charbon-dextran	T/ 24
V - COMPOSITION	T/ 28

A/ Composition en acides aminés	T/ 28
	Hydrolyse acide totale
	Dosage du tryptophanne
	Dosage des groupements sulfhydryl
B/ Composition en oses	T/ 31
	Osés neutres et osamines
	Acides sialiques

	<u>Page</u>
VI - ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX	T/ 33

A/ Séquence N-terminale	T/ 33
S-carboxyméthylation	
Acide aminé N-terminal (dansylation)	
Séquence N-terminale	
B/ Acide aminé C-terminal	T/ 38
S-aminoéthylation	
Désialidation	
Hydrolyse par la carboxypeptidase A	
VII - ETUDE EN DICHROÏSME CIRCULAIRE	T/ 40

Spectres entre 180 et 240 nm	
Spectres entre 240 et 400 nm	
VIII - MARQUAGE D'AFFINITE	T/ 42

A/ Préparation des bromoacétoxystéroïdes	T/ 42
B/ Analyse des carboxyméthylaminoacides	T/ 44
IX - MODIFICATIONS CHIMIQUES PAR LE PYROCARBONATE D'ETHYLE	

ET PAR LE TETRANITROMETHANE	T/ 46

A/ Préparation de la transcortine libre	T/ 46
B/ Dialyse multiple à l'équilibre	T/ 47
C/ Modification par le pyrocarbonate d'éthyle	T/ 48
D/ Modification par le tétranitrométhane	T/ 49
X - TECHNIQUES DIVERSES	T/ 51

A/ Traitement de l'éther (élimination des peroxydes)	T/ 51
B/ Préparation de l'acide mono iodo acétique	T/ 51
C/ Désionisation de l'urée 8 M	T/ 53

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau désionisée puis distillée
avec une résistance de quartz

I/ ISOLEMENT DE LA TRANSCORTINE

A — PREPARATION DU HCAC - SEPHAROSE

1° Oxydation periodique de la corticostérone

(d'après MASON, HOEHN, Mc KENZIE et KENDALL) (1)

a) Matériel et réactifs

- Evaporateur rotatif BÜSCHI
- Corticostérone Stéraloïds, Merck, ou IKAPHARM
- Ethanol absolu
- Ether redistillé sur chlorure stanneux ou NORMAPUR (Prolabo)
- Acide periodique 0,025 M

Acide periodique p.a. Merck 2,85 g

Eau distillée qsp 500 ml

à préparer extemporanément

- Acide sulfurique 5 N

Acide sulfurique R.P. Prolabo 137 ml (d = 1,83)

Eau distillée qsp 1000 ml

- Soude 0,01 M

Soude en pastilles R.P. Prolabo 0,8 g

Eau distillée qsp 2000 ml

b) Technique

12 mmoles (4,15 g) de corticostérone sont dissoutes dans 960 ml
d'éthanol absolu par agitation magnétique dans un erlen de 2 litres.

- Ajouter successivement, sous agitation :

570 ml d'acide periodique 0,025 M

18 ml d'acide sulfurique 5 N

360 ml d'eau distillée

- Laisser 15 heures sous agitation à température ambiante

- Evaporer par fraction de 500 ml sous vide, dans un ballon à l'évaporateur rotatif, à 40°C. Arrêter l'évaporation quand il ne reste plus que 50 ml environ dans le ballon.

Le précipité formé est recueilli dans un entonnoir à verre fritté n° 2 et lavé par quelques ml d'eau distillée. Il est ensuite séché 15 heures au dessiccateur sous vide en présence de soude.

La poudre sèche est redissoute dans 1500 ml d'éther en chauffant légèrement sur un agitateur magnétique chauffant. Puis la solution étherée est extraite par 3 fois 500 ml de soude 0,01 M.

Les phases sodiques recueillies sont acidifiées immédiatement par addition, sous agitation, de 5 ml d'HCl 1 M pour chaque extrait sodique de 500 ml (le stéroïde est instable en solution alcaline).

Le précipité formé est recueilli sur l'entonnoir à verre fritté n° 2, lavé par quelques ml d'eau distillée et séché.

= Remarque

Pour obtenir le HCAC tritié, l'oxydation periodique a été conduite de la même manière, mais sur 2 mmoles de corticostérone froide additionnée de 20 μ curies de corticostérone [^3H]

2° Préparation du diaminodipropylamino-Sépharose

(CUATRE CASAS) (2)

a) Réactifs

- NaOH 10 M :

NaOH (pastilles) Normapur Prolabo	400 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

- Glaçons d'eau distillée, et eau distillée refroidie à 4°C.

- Solution de diaminodipropylamine 2 M :

Dans un bécher, mettre :

- 3,3', diaminodipropylamine (Fluka) 52,5 g
- Eau distillée # 100 ml
- HCl 6 N qsp pH 10 (# 75 ml)

Refroidir, puis transférer dans une fiole jaugée de 200 ml

Ajouter ensuite, en rinçant le bécher :

- eau distillée qsp 200 ml

Cette solution est à préparer le jour de l'emploi.

- Trinitrobenzène sulfonate de sodium 0,1 M

- Acide trinitrobenzène sulfonique, 3 H₂O (Eastman) 0,35 g
- Soude 0,1 M qsp 10 ml

- Solution saturée d'acide borique

b) Technique

Activation

.. .. .

- Sous une hotte bien ventilée, mettre dans un bécher en pyrex de 1000 ml :
 - 200 ml de Sepharose 4 B (Pharmacia) bien lavé à l'eau distillée et décanté
 - 200 ml d'eau distillée.
- Plonger, dans la suspension, l'électrode d'un pH-mètre et un thermomètre, puis mettre sous agitation magnétique.
- Ajouter 50 g de bromure de cyanogène (Eastman ou Pierce) finement pulvérisé, puis amener immédiatement le pH à 11 en ajoutant de la soude 10 M.
- Maintenir :
 - le pH à cette valeur par addition de soude 10 M
 - la température à environ 20° C par addition de glaçons d'eau distillée.

La réaction est complète en 8 à 12 minutes (la fin est indiquée par l'arrêt de la production des protons, donc de l'acidification).

Couplage de l'amine

.. .. .

Transférer la suspension dans un entonnoir à verre fritté n° 2 posé sur une fiole à vide de 5 litres et ajouter immédiatement une grande quantité de glaçons d'eau distillée pour amener la température à 0° C. Laver avec 2 à 3 litres d'eau distillée refroidie à 4° C en aspirant avec une trompe à eau.

Après avoir éliminé l'eau de lavage par succion sous vide, le bas de l'entonnoir est bouché avec un bouchon en caoutchouc puis la solution de diaminodipropylamine est ajoutée. La suspension est agitée avec une baguette de verre puis transférée dans un bécher. Elle est ensuite laissée sous agitation douce à 4° C pendant 16 heures. Le gel est lavé sur un entonnoir à verre fritté par environ 10 litres d'eau distillée puis est conservé dans l'azide de sodium à 0,02 p. 100 à 4° C.

= Remarques

- Le lavage du Sepharose activé et l'addition de l'amine doivent être réalisés très rapidement (moins de 90 secondes) car les fonctions activées sont instables.
- Il est préférable de conserver l'amino-Sepharose obtenu environ 1 mois à 4° C avant son utilisation pour le couplage du ligand car il a été remarqué que certaines liaisons plus instables se coupent spontanément pendant le premier mois.

Vérification du couplage

.. .. .

Environ 0,2 ml de Sepharose témoin et 0,2 ml d'amino-Sepharose sont additionnés séparément de 1 ml de solution saturée de borate de sodium et 3 gouttes de solution de trinitrobenzène sulfonate de sodium 0,1 M. La suspension est agitée puis laissée à température ambiante pendant 2 heures.

La solution surnageante est aspirée à la trompe à vide puis le gel est lavé par additions et aspirations successives d'eau distillée. Le Sepharose témoin est blanc alors que l'amino-Sepharose a une coloration orange.

3° Couplage du HCAC au diaminodipropylamino-Sepharose

 (LE GAILLARD, RACADOT, RACADOT-LEROY, DAUTREVAUX (3)

- 200 ml d'amino-Sepharose sont lavés dans un entonnoir à verre fritté par environ 2 litres de dioxanne (p.a. Merck).
- 20 m moles de HCAC (6,64 g) sont dissoutes dans 240 ml de dioxanne anhydre, puis la solution est ajoutée au gel dans un bécher de 600 ml.
- 20 m moles de DCCI (4,1 g) Merck sont dissoutes dans 10 ml de dioxanne anhydre, puis ajoutées goutte à goutte à la suspension sous agitation douce. L'agitation est poursuivie, à température ambiante pendant 24 heures.

Le gel est ensuite lavé dans un entonnoir à verre fritté par successivement 1 litre de dioxanne, 2 litres de méthanol, 1 litre de dioxanne.

Un recyclage est effectué dans les mêmes conditions avec 20 m moles de HCAC et 20 m moles de DCCI, puis le gel est lavé successivement par 2 litres de dioxanne et 2 litres de méthanol dans un entonnoir à verre fritté.

Après équilibration du gel avec du diméthylformamide à 50 p. 100 (pur, Prolabo), le lavage est poursuivi en colonne pendant 48 heures avec 10 litres de diméthylformamide à 50 p. 100. Le gel est enfin lavé avec 10 litres d'eau distillée dans l'entonnoir à verre fritté puis conservé à 4°C dans l'azide de sodium à 0,02 p. 100.

B - CHROMATOGRAPHIES

 (LE GAILLARD, RACADOT, RACADOT-LEROY et DAUTREVAUX) (3)

A - MATERIEL et REACTIFS

- =====
- Spectrophotomètre VARIAN-TECHTRON, modèle 635.
 - Centrifugeuse JOUAN K95 à température réglable.

- Enceinte réfrigérée mini RE (GILSON) garni d'un collecteur mini-escargot MTDC et d'un absorptiomètre à 280 nm à enregistreur (GILSON).
- "Beaker dialyzer" DOW de 100 ml (BIO-RAD).
- Colonnes à chromatographies :
 - . Chromatographie d'affinité : colonne (5 x 30 cm) munie d'une jaquette.
 - . Chromatographie sur hydroxyapatite : colonne 2,5 x 28 cm.
- Hydroxyapatite HTP (BIO-RAD).
- Bain-marie à circulation d'eau COLORA.
- L'eau utilisée pour la préparation des réactifs a été désionisée, puis distillée.
- Chlorure de sodium 2 M

- NaCl (p.a. Prolabo)		585 g
- Eau distillée	qsp	5000 ml

- Chlorure de sodium 0,2 M

- NaCl 2 M		1 litre
- Eau distillée	qsp	10 litres

Dans un bidon jaugé à 10 litres. Préparer 20 litres et conserver à 4° C.

- Tampon phosphate de sodium 0,05 M - NaCl 0,2 M de pH 7,0

= Tampon de lavage

. Solution de phosphate monosodique 0,05 M - NaCl 0,2 M

NaH ₂ PO ₄ , 1 H ₂ O (p.a. Merck)		6,9 g
NaCl (p.a. Prolabo)		11,7 g
Eau distillée	qsp	1000 ml

. Solution de phosphate disodique 0,05 M - NaCl 0,2 M

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O (p.a. Merck)		35,8 g
NaCl (p.a. Prolabo)		23,4 g
Eau distillée	qsp	2000 ml

. Tampon

Solution de phosphate disodique	2000 ml
Solution de phosphate monosodique	
	qsp pH 7,0 (# 800 ml)

Refroidir à 4° C.

- Tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 6,8

. Solution de Na_2HPO_4 , 12 H_2O - 0,005 M : 3,58 g p. 2 litres

. Solution de NaH_2PO_4 , 1 H_2O - 0,005 M : 1,38 g p. 2 litres

Tampon :

Solution de Na_2HPO_4 2000 ml

Solution de NaH_2PO_4 qsp pH 6,8 (# 1800 ml)

Refroidir à 4°C.

- Tampon phosphate de sodium 0,001 M de pH 6,8 = Tampon d'équilibration

Tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH ⁽¹⁾6,8 1 litre

Eau distillée qsp 5 litres

Dans une fiole jaugée à 5 litres

Refroidir à 4°C.

- Solution de cortisol dans le tampon phosphate 0,001 M =

Tampon d'équilibration (2)

Solution de cortisol (Steraloids) à 10 mg/ml
dans l'éthanol absolu 20 ml

Tampon phosphate 0,001 M qsp 1000 ml

Refroidir à 4°C.

- Solution de cortisol dans le tampon Tris-HCl 0,05 M-NaCl 0,1 M de
pH 8,5 = tampon d'élution

Dans un bécher de 600 ml :

Tris (p.a. Merck) 6,0 g

NaCl (p.a. Prolabo) 5,85 g

Solution de cortisol à 10 mg/ml 20 ml

Eau distillée environ 500 ml

Dissoudre, puis ajouter :

HCl 1 M qsp pH 8,5 (# 15 ml)

Transférer dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter
au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Laisser à température ambiante.

(Cette solution doit être renouvelée toutes les semaines).

- Tampon phosphate de potassium 0,65 M de pH 6,8

Solution de K_2HPO_4 (p.a. Prolabo) 0,65 M (113 g/l)
1000 ml

Solution de KH_2PO_4 (p.a. Prolabo) 0,65 M (88 g/l)
qsp pH 6,8 (# 670 ml)

Conserver à 4°C.

- Chlorure de calcium 2 M

Chlorure de calcium 2 H_2O (p.a. Merck) 294 g
Eau distillée qsp 1000 ml

B - TECHNIQUES

1° Chromatographie d'affinité

= Remarque : Les manipulations sont décrites pour chaque jour de la semaine, telles qu'elles sont réalisées en routine.

a) Adsorption
.. .. .Jeudi (étape supprimée si l'on part de sérum)

- Décongeler environ 4 litres de plasma au bain-marie à 37° C, puis mesurer le volume exact.
- Ajouter 7 ml de chlorure de calcium 2 M par litre de plasma et laisser 1 heure à 37° C, puis une nuit à 4° C.

Vendredi

- Centrifuger le plasma gélifié obtenu dans des pots de 1 litre, à 3500 tours/minute, avec la centrifugeuse JOUAN K 95 à 4° C (ou décongeler 4 litres de sérum).
- Préparer 6 sacs de dialyse NOJAX 40, d'environ 1 mètre de long et le faire tremper dans un peu de NaCl 0,2 M pendant 15 minutes.
- Le sérum est réparti dans les sacs de dialyse, puis ceux-ci sont plongés dans deux seaux contenant chacun environ 10 litres de NaCl 0,2 M à 4° C.

Samedi

- Renouveler le NaCl 0,2 M.

Lundi

- La colonne contenant un mélange de 200 ml de HCAC-Sepharose et 200 ml de Sepharose 4 B (5 x 30 cm) est mise à température ambiante et lavée avec environ 1 litre de NaCl 0,2 M.
- Mesurer exactement le volume de sérum dialysé et le porter au bain-marie à 37° C dans un bécher de 5 litres. Une fois la température atteinte (après environ 2 heures), ajouter par litre de sérum :
 - 20 g de charbon Norit (Prolabo)
 - 10 ml de solution de dextran T 70 (Pharmacia) à 0,2 g par ml dans du NaCl 0,2 M.
- La suspension est incubée au moins 30 minutes à 37° C, en agitant de temps en temps. Puis le charbon est éliminé par centrifugation 40 minutes à 3500 tours/minute, à 20° C et par filtration du surnageant dans un entonnoir à verre fritté garni de deux feuilles de papier filtre Whatman n° 1.

- Le gel d'affinité est transféré dans un bécher de 5 litres, la colonne est lavée avec un peu de sérum centrifugé et filtré. 2 ml de sérum sont mis de côté pour en doser la transcortine, puis la totalité restante est ajoutée au gel. La suspension est agitée avec une baguette de verre, puis laissée 1 heure à température ambiante. La colonne, lavée et rincée à l'eau distillée, est remise dans l'enceinte réfrigérée à 4° C.
- Le bécher est ensuite mis dans un seau de glace, puis la suspension agitée doucement pendant 6 heures en chambre froide à 4° C (agitateur rotatif branché par l'intermédiaire d'une minuterie COUPATAN).

b) Lavage et désorption

.. .. .

Mardi

- Après décantation, environ 2 litres de sérum surnageant sont éliminés (un aliquot de 2 ml est conservé pour le dosage de la transcortine) puis le reste de la suspension est passé sur un entonnoir à verre fritté, en chambre froide. Le gel est ensuite lavé dans l'entonnoir par environ 200 ml de tampon de lavage, puis transféré dans la colonne (sortie de colonne ouverte) où il est lavé par environ 2 litres de tampon au débit maximum de la colonne (la D.O. à 280 nm de l'effluent doit être $< 0,2$ après lavage).
- Le débit de l'effluent est ensuite réduit à 6 ml par minute à l'aide d'une pompe péristaltique et le gel est équilibré en milieu de faible force ionique par passage de 350 ml de tampon phosphate 0,001 M. La solution de cortisol dans le même tampon est alors introduite et passée dans le gel jusqu'à ce que le cortisol soit détecté dans l'effluent par son absorbance à 250 nm. Le volume passé est noté et correspond au "volume mort-cortisol" de la colonne. Celui-ci varie peu dans les chromatographies ultérieures (environ 250 ml).
- La sortie de colonne est alors fermée. La colonne est sortie de l'enceinte réfrigérée et thermostatée à 25° C. Un "volume mort-cortisol" de tampon d'élution (solution de cortisol dans le tampon Tris) est passé à travers le gel, puis la sortie de colonne est à nouveau fermée et le gel est incubé à 25° C, 1 heure, puis la colonne est remise dans l'enceinte réfrigérée pour la nuit.

c) Elution

.. .. .

Mercredi

- La sortie de colonne est branchée sur une pompe péristaltique réglée à 4 ml par minute et à un collecteur de fractions (fractions de 3 minutes). Dès que le tampon surnageant le gel dans la colonne a pénétré à l'intérieur du gel, du tampon frais est ajouté, puis le réservoir de

b) Chromatographie

.. .. .

Les éluats lyophilisés de 2 chromatographies d'affinité sont réunis et repris dans le minimum de tampon phosphate 0,001 M (# 2 ml). La solution est transférée, à l'aide d'une pipette Pasteur dans un sac de dialyse (10 mm x 400 mm). Le flacon est rincé par plusieurs fois 2 ml de tampon pour recueillir au maximum 10 ml de solution dans le sac (les protéines non dissoutes ne sont constituées que d'immunoglobulines). Le contenu du sac est dialysé, sous agitation à 4°C, pendant 15 heures, contre 2 litres de tampon phosphate 0,001 M. Il est ensuite centrifugé à 4°C, à 3.000 tours par minute, pendant 10 minutes et déposé sur la colonne d'hydroxyapatite.

Des fractions de 8 ml en 20 minutes sont recueillies. Après 3 heures, le tampon phosphate 0,001 M est remplacé par du tampon 0,005 M. Après passage du pic de transcortine, les protéines adsorbées sont éluées avec le tampon phosphate de potassium 0,65 M puis l'hydroxyapatite est rééquilibrée par passage de tampon phosphate de sodium 0,001 M, 15 heures.

Le pic de transcortine (fractions éluées avec le tampon phosphate 0,005 M) est dialysé dans un "beaker dialyzer" (DOW) pendant 2 heures contre un courant d'eau distillée de 40 ml par minute à 4°C.

La solution dialysée est congelée immédiatement et lyophilisée.

= Remarque :

A ce stade, la transcortine lyophilisée contiendra 10 à 30 p.100 de sels minéraux. Il n'est cependant pas souhaitable de prolonger la dialyse car la transcortine se dénature irréversiblement en milieu non tamponné, donc en l'absence de sels minéraux.

La quantité de transcortine dans l'éluat de la chromatographie est mesurée d'après son coefficient d'extinction :

$$E \begin{array}{l} 1 \text{ mg/ml} \\ 1 \text{ cm} \\ 280 \text{ nm} \end{array} = 0,70.$$

La différence entre la quantité ainsi mesurée et le poids de poudre lyophilisée permet de connaître le pourcentage d'eau + sels minéraux dans le produit lyophilisé.

Nous avons observé des différences de qualité selon les lots d'hydroxyapatite, certains lots n'adsorbant que partiellement ou pas du tout la transcortine en tampon phosphate 0,001 M. Ceci confirme les remarques faites dans le chapitre des résultats mais n'entraîne aucune conséquence sur la pureté de la transcortine obtenue.

II/ CONTRÔLES DE PURETÉ

A - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

a) Principe

Par polymérisation d'acrylamide, on obtient un gel transparent permettant d'associer à une migration électrophorétique normale un tamisage moléculaire, fonction de la taille des pores du gel et donc du pourcentage d'acrylamide employé.

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode de DAVIS (4) et la coloration des gels selon VESTERBERG (5).

b) Matériel et réactifs

- Appareil Dix Electrophoresis CANALCO modèle 12, JARRE et JACQUIN.
- Gel à 7,5 % d'acrylamide séparant les protéines ayant un poids moléculaire de 10.000 à 1.000.000.

Il s'obtient par mélange de 2 solutions (A) et (B)

Solution (A)	
Solution (B)	8 ml

Solution (A) (à préparer extemporanément) :

Solution (a)	2 ml
Solution (b)	4 ml
Eau distillée	2 ml

Solution (a)

- HCl N	12 ml
- Tris (trishydroxyméthylaminométhane)	9,725 g
- TEMED (N, N, N', N' tétraméthylènediamine)	0,115 ml
- Eau distillée	qsp 25 ml

Mélanger - dissoudre et filtrer. Conserver au réfrigérateur, à l'obscurité.

Solution (b)

- Acrylamide	15 g
- Bis (N, N méthylène bis acrylamide)	0,4 g
- Eau distillée	qsp 50 ml

Mélanger - Dissoudre et filtrer. Conserver au réfrigérateur, à l'obscurité.

Solution (B) (à préparer extemporanément) :

Persulfate d'ammonium	0,014 g
Eau distillée	10 ml

- Tampon d'électrode pH 8,3

- Tris	12,0 g
- Glycine	57,6 g
- Eau distillée	qsp 2000 ml

- Colorant : bleu de Coomassie (GURR) à 0,1 p. 100

- Bleu de Coomassie (GURR) Brillant R	0,1 g
- Acide trichloracétique à 50 p. 100	25 ml
- Méthanol	25 ml
- Eau distillée	50 ml

- Décolorant

- Acide acétique pur	80 ml
- Méthanol	250 ml
- Eau distillée	650 ml

c) Technique

α) Préparation des tubes de gel et dépôt

A 8 ml de solution (A), ajouter 8 ml de solution (B).

- Aspirer le mélange avec une seringue.
- Laisser couler doucement dans le fond du tube en agitant légèrement de manière à éviter la formation de bulles d'air.
- Ajouter une goutte d'eau à la surface (en évitant les remous) pour empêcher le contact avec l'air.

- Laisser se polymériser (30 minutes) : la ligne de réfraction entre l'eau et le gel va disparaître, une seconde ligne apparaît environ 3 mm en dessous lorsque le gel se prend en masse.
- Aspirer l'eau de la surface des tubes avec un tortillon de papier filtre.
- Déposer 10 à 40 μ l (ou 1 goutte à la pipette Pasteur) d'une solution protéique à 10 mg/ml.
- Fixer cette solution par environ 5 mg de Sephadex G200 et recouvrir doucement de tampon.

β) Migration électrophorétique

- Verser environ 500 ml de tampon dans la cuve inférieure.
- Fixer les tubes dans la cuve supérieure de manière à ce qu'ils soient tous au même niveau.
- Mettre une goutte de tampon à la partie inférieure de chaque tube (pour éviter l'emprisonnement de bulles d'air à cet endroit) et placer la cuve supérieure. Le bas de chaque tube doit plonger dans le tampon.
- Ajouter doucement le tampon dans la cuve supérieure (à l'aide d'une pipette).
- Etablir un courant de 5 mA par tube pendant 75 minutes (dépôt du côté anodique).

γ) Révélation des gels

- Injecter de l'eau entre le gel et les parois du tube à l'aide d'une seringue : le gel se décolle des parois.
- Le plonger dans le colorant 30 minutes à 60° C.
- Décolorer dans des tubes à essais contenant environ 20 ml de décolorant par gel.

δ) Electrophorèse en milieu dodécylsulfate de sodium (SDS)

- Le tampon d'électrophorèse Tris-Gly est additionné de SDS (SERVA) et de DTT pour avoir des concentrations finales respectives de 0,1 p. 100 et 1 mM. Le gel d'acrylamide comporte des concentrations identiques en ajoutant le SDS et le DTT dans la solution B : 0,2 p. 100 et 2 mM respectivement. Après addition à la solution A, ces concentrations seront divisées par deux.
- Avant la coloration, chaque gel est lavé dans 15 ml de mélange fixateur : acide trichloracétique - méthanol - eau (1 : 2 : 6, P/V/V) pendant 24 h en changeant le fixateur après 8 h.
- Après coloration, les pourcentages relatifs des zones colorées sont appréciées par lecture densitométrique sur un intégrateur Cellomatic (SEBIA).

B - IMMUNOELECTROPHORESE SUR SYSTEME HYLAND

Ce système s'est révélé, à l'usage, plus résolutif que la technique classique sur lames de microscope. Il se compose principalement des éléments suivants :

- une cuve à électrophorèse,
- mèches éponge,
- écrans protecteurs de plastique pour les électrodes,
- électrodes à feuille de métal (à jeter après chaque électrophorèse),
- plaques de gélose pré-découpées (emboîtées) (à conserver entre 2° C et 8° C,
- antisérum de cheval lyophilisé,
- grands tubes capillaires pour l'application des antisérums,
- capillaires de précision pour l'application des échantillons,
- tampon véronal concentré, force ionique 0,075, pH 8,6 :
 - . contient de l'azide de sodium comme agent de conservation,
 - . doit être dilué à une force ionique de 0,020 avant d'être utilisé.
- colorant traceur au bleu de bromophénol (solution aqueuse saturée).

Technique

α) Migration électrophorétique

Placer les deux électrodes à feuille de métal dans les compartiments extérieurs de la cuve.

Rincer les mèches éponge dans l'eau et exprimer à fond l'excès d'humidité pour éviter toute dilution de tampon. Puis placer une mèche éponge dans chacun des compartiments latéraux, l'axe le plus compressible (non poreux) vertical.

Mettre en place un écran protecteur de plastique entre chaque éponge et l'électrode correspondante.

Diluer le tampon :

- Tampon concentré	19 ml
- Eau distillée	52 ml

(On obtient ainsi un tampon de pH 8,6 et de force ionique 0,020).

Répartir le tampon dilué, dans les deux éponges.

Déposer les solutions de protéine et ajouter dans l'un des dépôts du bleu de bromophénol dans la proportion de 1 partie pour 20 parties de solution de protéine. Le bleu de bromophénol indiquera la progression de l'électrophorèse.

Après dépôt, retourner la plaque et la poser sur les éponges.

Mettre un courant de 80 volts pendant environ 70 minutes.

β) Immunodiffusion

La gélose, dans les fentes longitudinales prédécoupées, est enlevée à l'aide d'une trompe à vide, puis les fentes sont emplies avec 0,1 ml d'immunsérum. La plaque est mise dans une enceinte close et on laisse la diffusion s'effectuer pendant 24 heures à température ambiante.

Les protéines solubles sont ensuite éliminées par trempage de la plaque de gélose dans une solution de NaCl à 8,5 p. 1000 pendant au moins 10 heures. La solution de NaCl est renouvelée plusieurs fois.

La gélose est décollée de son support de plastique puis déposée sur une plaque de verre pour être séchée à l'air libre sous une feuille de papier filtre.

La coloration est effectuée par trempage 10 minutes dans une solution de Vert de Lissamine à 1 p. 100 dans l'acide acétique à 10 p. 100. On décolore ensuite dans l'acide acétique à 10 p. 100.

III/ METHODES DE DOSAGE

* * * * *

A - CORTISOL (Méthode de DE MOOR, RASKIN et STEENO) (6)

modifiée par RACADOT, COMBES et LINQUETTE (7)

a) Matériel et réactifs

- Spectrofluorimètre à prisme JOBIN et YVON (type Béarn).
- Dichlorométhane, pour analyses (Merck).
- Soude, approximativement 0,1 M (4 g/l) pour analyses (Prolabo).
- Sulfate de sodium anhydre, pour analyses (Prolabo).
- Réactif de fluorescence (réactif de PETERSON)
Acide sulfurique, pour analyses (Merck) / Ethanol absolu (Merck) (7/3, V/V)
- Cortisol (Steraloids).

b) Technique

2 ml de sérum ou de solution protéique sont extraits par 25 ml de dichlorométhane dans un tube à centrifuger conique à bouchon rodé.

L'extrait est lavé par 1 ml de NaOH 0,1 M puis, après élimination de la phase aqueuse, l'extrait est déshydraté par addition de sulfate de sodium anhydre.

La réaction de fluorescence est provoquée par addition de 3 ml de réactif de PETERSON et est appréciée à 525 nm sous une excitation de 475 nm.

Le traitement parallèle d'un témoin à 20 μ g de cortisol pour 100 ml permet de calculer les concentrations des échantillons dosés.

B - TRANSCORTINE

1°- Par gel-filtration (méthode de DE MOOR et al.) (8)

 modifiée par RACADOT, TROUVE, BISERTE et LINQUETTE (9)

a) Matériel et réactifs

-
- Colonne à chromatographie de 1,5 cm x 35 cm
 - Sephadex G50 coarse (Pharmacia)
 - NaCl 0,15 M
 - Cortisol (Steraloids)

b) Technique

 Colonne de Sephadex G50

10 g de Sephadex G50 sont mis à gonfler dans environ 250 ml de NaCl 0,15 M. Après élimination des fines particules par aspiration à la trompe à vide du NaCl 0,15 M surnageant (opération recommencée deux fois après remise en suspension du gel dans un nouveau volume de NaCl 0,15 M), la suspension est versée dans la colonne à l'aide d'un entonnoir.

Le gel est tassé en laissant s'écouler la solution de NaCl. La hauteur de gel, après tassement, est amenée à 24 cm.

Saturation de la transcortine par du cortisol

Une quantité de cortisol est ajoutée au sérum de façon à obtenir environ 50 μ g de cortisol pour 100 ml de sérum.

En pratique 0,15 ml de solution éthanolique de cortisol à 10 μ g par ml est évaporé à sec dans un tube puis 3 ml de sérum sont ajoutés au résidu. On laisse le mélange en contact pendant 15 minutes avant de pratiquer la séparation chromatographique.

Chromatographie

2 ml du mélange sérum-cortisol sont déposés en haut de la colonne de Sephadex. L'élution est réalisée à l'aide de NaCl 0,15 M. Les fractions recueillies ont un volume qui représente le tiers du volume mort de la colonne, soit 4,5 ml dans les conditions utilisées.

Les fractions F1, F2, F3 représentent le volume mort de la colonne. Les fractions F4 et F5 qui contiennent les protéines plasmatiques sont mélangées et conservées en vue du dosage de la transcortine. La fraction F6 est également conservée.

La colonne est ensuite lavée par 250 à 300 ml de NaCl 0,15 M afin d'éluer tout le cortisol résiduel (cortisol libre qui passe dans les fractions F8 à F16).

Dosage du cortisol lié à la transcortine

Le dosage du cortisol est conduit comme précédemment mais sur un volume plus important (F4 + F5 = 9 ml). L'étalon de cortisol doit être extrait dans un même volume de solution.

2°- Par électro-immunodiffusion

(Méthode de RACADOT, RACADOT-LEROY, LE GAILLARD et

DAUTREVAUX (10)

a) Réactifs

Tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,025

Véronal sodé p.a. Prolabo	20,6 g
Véronal acide p.a. Prolabo	4,0 g
Eau distillée	q sp 5000 ml.

Agarose à 2 p. 100 dans le tampon véronal

Colorant

Bleu de Coomassie brillant R (GURR)	5 g
Ethanol à 96 p. 100	450 ml
Acide acétique pur (Prolabo)	100 ml
Eau distillée	450 ml

Décolorant

Ethanol à 96 p. 100	450 ml
Acide acétique	100 ml
Eau distillée	450 ml

Immunsérum spécifique antitranscortine humaine

préparé chez le lapin selon la méthode de VAITUKAITIS, ROBBINS et NIESCHLAG (11).

b) Technique

10 ml d'agarose à 2 p. 100 sont liquéfiés dans un bain-marie bouillant, puis, après avoir été amenés à 50°C, ils sont mélangés à 15 ml de tampon véronal chauffé à 50°C et contenant 150 (dilution à 0,6 p. 100) ou 450 μ l (dilution à 1,8 p. 100) d'immunsérum selon le lot. Le mélange est coulé sur une plaque de verre (200 x 96 mm), rigoureusement horizontale, elle-même chauffée pour éviter une solidification trop rapide de l'agarose.

Après refroidissement, des trous sont creusés dans l'agarose par aspiration (diamètre des trous : 2 mm, distance minimale entre chaque trou : 7 mm, distance entre les trous et le bord anodique de la plaque : 15 mm).

A l'aide d'une microseringue, 5 μ l des échantillons à doser et de solution de transcortine à concentration connue (10 à 100 mg/l) sont déposés sur la plaque.

La migration est effectuée pendant 3 heures, à 4°C, sous une tension de 100 volts (environ 10 volts par cm), l'ampérage se situant entre 40 et 50 mA.

L'excès d'anticorps de l'agarose est éliminé en plongeant la plaque

pendant une nuit dans une solution de NaCl à 8,5 p. 1000. Après séchage, la plaque est colorée (10 à 15 minutes) avec la solution de bleu de Coomassie, puis le fond de la plaque est décoloré.

Chaque hauteur des arcs de précipitation est mesurée à 0,5 mm près entre leur sommet et le bord supérieur du dépôt. Les hauteurs des arcs correspondant aux solutions étalons servent à l'établissement d'une courbe.

IV/ MESURES D'ACTIVITE

.....

A - DIALYSE A L'EQUILIBRE

1° Principe

La dialyse à l'équilibre est une technique introduite en 1957 par DAUGHADAY (12). Bien que longue, elle est encore actuellement la méthode la plus précise pour mesurer à la fois les quantités de stéroïde libre et de stéroïde lié dans une solution.

En plaçant dans un sac de cellophane, une solution de transcortine ou du sérum contenant un stéroïde en équilibre entre sa forme libre et ses formes liées, la fraction non liée peut diffuser librement dans le liquide placé à l'extérieur du sac, alors que la fraction liée sera retenue à l'intérieur. Après le délai requis pour l'établissement d'un nouvel équilibre, la concentration du stéroïde libre, dans le liquide à l'extérieur du sac, sera égale à la concentration du stéroïde libre, en équilibre avec les fractions liées, à l'intérieur du sac.

2° Matériel et réactifs

-
- Spectrophotomètre à scintillation liquide à 3 canaux INTER-TECHNIQUE^(°)
 - Fioles Packard de 20 ml en verre ou en matière plastique
 - Disques aimantés (diamètre 10 mm) JARRE JACQUIN
 - Tube de dialyse en cellulose (8/100 feet # 10 mm de diamètre)
UNION-CARBIDE
 - Tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 7,4 :

. Phosphate disodique 0,05 M :

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O, p.a. (Merck)	17,9 g
Azide de sodium (Merck)	0,2 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

. Phosphate monosodique 0,05 M :

Na H ₂ PO ₄ , H ₂ O, p.a. (Merck)	6,9 g
Azide de sodium (Merck)	0,2 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

- Solution de phosphate disodique 1000 ml
- Solution de phosphate monosodique qsp pH 7,4 (# 200 ml)
- Cortisol [1,2 ³H] 30 Ci/mM
New England Nuclear, Amersham
- Cortisol (Steraloids)
- Scintillateur au dioxanne

PPO : 2,5 diphényloxazole	10 g
POPOP : 1,4 - bis / 2 - (5 phényloxazolyl) benzene	0,5 g
Naphtalène	50 g
Dioxanne / 2 - éthoxyéthanol (5 : 1, V/V)	qsp 1000 ml

3° Technique

a) Lavage des sacs de dialyse

Les sacs de dialyse (environ 20 cm de long) sont mis à tremper dans le tampon pendant 24 h.

(°) Laboratoire de Biophysique du C.H.U. de Lille (Prof. A. VERGNES)

b) Dialyse
- - - - -

Nous avons utilisé le matériel préconisé par LEBEAU et BAULIEU (communication personnelle).

Dans une fiole Packard en verre, mettre 15 ml de tampon contenant 2,5 nCi de cortisol [^3H] par ml.

Mettre, dans le sac de dialyse, 1 ml de solution de transcortine ou de sérum dilué au cinquième avec le tampon phosphate.

Laisser dialyser pendant 48 h ou 72 h (sous agitation avec les disques aimantés) à 4°C. Chaque échantillon est dialysé en double exemplaire. La radioactivité est ensuite mesurée sur 0,5 ml de la solution intérieure et 0,5 ml de la solution extérieure.

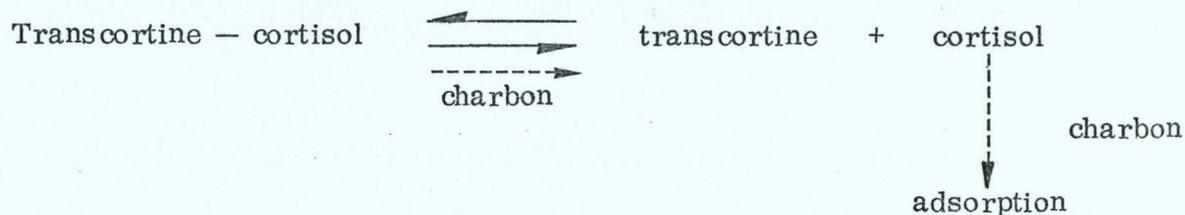
B - METHODE AU CHARBON-DEXTRAN
- - - - -1° Principe

Le charbon est largement utilisé comme adsorbant des petites molécules organiques. Pour adsorber les stéroïdes d'une solution protéique, il est souvent associé au dextran qui entre en compétition avec les protéines au niveau des sites d'adsorption du charbon : le dextran évite donc l'adsorption des protéines.

L'association charbon-dextran a ainsi été utilisée pour adsorber les stéroïdes du sérum (MURPHY) (13). Nous avons utilisé cette propriété du charbon pour mesurer l'activité liante de la transcortine (LE GAILLARD et DAUTREVAUX) (14). Le principe de la méthodologie est le suivant : à 0°C, l'affinité de la transcortine pour le cortisol est maximum et la vitesse de dissociation est minimum (voir la revue générale), la fraction libre du cortisol sera donc adsorbée par le charbon alors que la fraction liée à la transcortine restera en solution.

Cependant, comme le complexe transcortine-cortisol est toujours en équilibre avec une fraction libre, le charbon, en adsorbant le cortisol

libre, déplacera l'équilibre :



La quantité de cortisol ainsi déplacée sera d'autant plus importante que le temps de contact avec le charbon sera long. Une extrapolation au temps d'incubation 0 est donc nécessaire pour connaître la quantité de stéroïde lié vraie (voir technique, paragraphe c).

2° Matériel et réactifs

- Spectromètre à scintillation liquide à 3 canaux INTER-TECHNIQUE,
- Fioles des comptages de 20 ml en plastique (jetées après usage),
- Tubes à hémolyse en plastique transparent (jetés après usage),
- Suspension de charbon-dextran :

Charbon végétal Norit (Prolabo)	0,50 g
Dextran T 70 (Pharmacia)	0,05 g
Tampon utilisé pour la solution de transcortine (voir les chapitres Résultats)	qsp 50 ml

Conserver au réfrigérateur et renouveler toutes les semaines.

- Cortisol (Steraloids),
- Solution de cortisol $[1,2 \text{ } ^3\text{H}]$ 0,5 mM (40 Ci/mole) :

. A préparer extemporanément

Solution de cortisol 0,5 mM :

solution de cortisol à 10 mg/ml dans l'éthanol absolu	1,8 ml
eau distillée	qsp 100 ml

Conserver au réfrigérateur et renouveler tous les 15 jours.

. Dans un tube à hémolyse en pyrex, introduire 400 μ l de solution

de cortisol $[^3\text{H}]$ (30 Ci/mmole) (New England Nuclear)
à 5 $\mu\text{Ci/ml}$ dans le mélange benzène/éthanol (9 : 1, V/V).
Evaporer sous azote puis ajouter au résidu sec, 100 μl de
la solution de cortisol 0,5 mM. Agiter.

- Scintillateur au dioxanne (voir la technique précédente).

3° Technique

a) A partir du complexe transcortine - stéroïdes radio-actifs (cas du marquage d'affinité)

1 ml de solution de transcortine dans un tube à hémolyse est refroidi à 0°C, dans la glace fondante, pendant 5 minutes. 1 ml de suspension de charbon-dextran à 0°C est ensuite ajouté en agitant. Après 30 min. d'incubation à 0°C, le mélange est centrifugé à 2.000 x g, 10 min. à 2°C, puis 0,5 ml du surnageant est compté avec 10 ml de scintillateur au dioxanne.

Lors des marquages d'affinité, 1 ml de ce surnageant est incubé à 60°C pendant 30 min. pour inactiver la transcortine. 1 ml de suspension de charbon-dextran est ensuite ajouté puis le mélange est laissé 30 min. à température ambiante et centrifugé. 0,5 ml du surnageant est compté : la radioactivité résiduelle est due uniquement au stéroïde lié de façon covalente.

Sachant les quantités de stéroïdes $[^3\text{H}]$ et $[^{14}\text{C}]$, et la radioactivité en CPM de la solution de transcortine + stéroïdes, avant l'addition de charbon-dextran, les activités spécifiques du stéroïde $[^3\text{H}]$ et du stéroïde $[^{14}\text{C}]$ sont calculées en CPM / n mole. Elles permettent donc de connaître la quantité de stéroïde lié après adsorption au charbon-dextran.

b) A partir de la transcortine libre

La transcortine est obtenue libre à 95 p. 100 environ lorsque la technique au charbon-dextran ci-dessus est réalisée à 37°C au lieu de 0°C. Cette libération du site ne s'accompagne d'aucune dénaturation si la solution de transcortine obtenue est utilisée dans les 24 heures et si elle n'est pas lyophilisée.

Les mesures sont réalisées sur des aliquots de 0,1 ml en double exemplaire.

0,1 ml de solution de transcortine (0,02 mM - 0,04 mM) dans le tampon correspondant à la modification chimique choisie, est additionné de 5 - 10 μ l de solution de cortisol [^3H] 0,5 mM (40 Ci/mole) de manière à obtenir une concentration molaire finale légèrement supérieure à celle de la transcortine (0,025 mM - 0,050 mM) ; la solution est refroidie à 0°C dans la glace fondante pendant 3 min. puis additionnée, en agitant, de 0,1 ml de suspension de charbon-dextran à 0°C. Après une incubation de 30 min. à 0°C, le mélange est centrifugé à 2.000 x g, 10 min. à 2°C. 0,1 ml du surnageant est compté avec 10 ml de scintillateur au dioxanne.

c) Correction de la mesure du cortisol lié

Une cinétique d'adsorption au charbon-dextran à 0°C réalisée sur un temps total de 60 min. a permis, par extrapolation au temps 0, de déterminer le pourcentage de cortisol lié perdu après 30 min. : celui-ci est de 17 p. 100. Toutes les déterminations du cortisol lié par la technique au charbon-dextran ci-dessus sont donc majorées de

$$\frac{17 \times 100}{100 - 17} = 20,5 \text{ p. } 100$$

pour tenir compte de la perte en cortisol lié pendant l'incubation avec le charbon-dextran.

V/ C O M P O S I T I O N

.....

A - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

1° Hydrolyse acide totale

Après avoir complètement dessalé la transcortine par dialyse, la solution est lyophilisée. Le pourcentage d'humidité est déterminé par pesée de la poudre avant et après chauffage à 60° C dans un dessiccateur sous vide pendant 24 h.

2 mg environ de transcortine, pesés avec une précision de $\pm 1 \mu\text{g}$, sont hydrolysés à 110° C dans un tube scellé sous vide contenant 2 ml de HCl 5,6 N Merck (p.a.) et 3 gouttes de solution de phénol à 5 p. 100 dans l'eau. Deux hydrolyses sont réalisées, l'une de 24 h, l'autre de 72 h. Trois analyses pour chaque temps sont conduites au moyen d'un analyseur d'acides aminés JEOL type 5 AH. Chaque composition est exprimée en mMoles d'acide aminé par mg de protéine.

Les valeurs retenues sont celles de l'hydrolyse de 72 h pour la valine et l'isoleucine, celles extrapolées au temps d'hydrolyse 0 pour la thréonine, la serine et la tyrosine, la moyenne des valeurs obtenues aux deux temps d'hydrolyse pour tous les autres acides aminés.

2° Dosage du tryptophanne par la méthode de SPIES et

CHAMBERS (15)

Cette technique est basée sur la réaction du tryptophanne avec le

P-diméthylaminobenzaldéhyde (P. DMAB) en solution acide pour former une coloration bleue-violette après oxydation par le nitrite de sodium.

On mélange dans un tube conique branché : 30 mg de P. DMAB, 9 ml de H_2SO_4 concentré et la solution à doser dans 1 ml de soude 1 N. Le dosage est réalisé en double exemplaire avec deux quantités différentes de transcortine : 4 mg dans l'un et 5 mg dans l'autre, pesés avec précision. Le mélange est gardé à 25°C pendant 1 h à l'obscurité. 0,1 ml d'une solution de nitrite de sodium à 0,04 p. 100 (p/V) préparée extemporanément, est ajouté pour développer la coloration. Après une incubation de 30 min., la densité optique est lue à 595 nm par rapport à un blanc sans protéine.

Une courbe étalon est tracée en utilisant une gamme de concentrations connues en tryptophane (de 0,1 à 1 mM).

3° Dosage de groupements thiol

a) Par l'acide dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB)

(méthode de ELLMAN) (16) (adaptée par LE GAILLARD et DAUTREVAUX) (17)

La titration de la transcortine libre ou liée au cortisol avec le DTNB est réalisée dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8,0, contenant de l'EDTA disodique 0,001 M. La solution de transcortine 0,02 mM (1 mg/ml) avec ou sans dénaturant, est incubée avec 35 μ l de DTNB (4 mg/ml dans le même tampon) dans un volume de 1 ml pendant 15 min. La densité optique à 412 nm est lue contre un blanc transcortine seule et un blanc réactif.

Quand du chlorhydrate de guanidine 6 M est inclus dans le mélange d'incubation, une préincubation de 60 min. à 50°C est réalisée avant l'addition de DTNB. Quand du dodécylsulfate de sodium (SDS) à 2 % est utilisé comme dénaturant, la solution de transcortine est portée au bain-marie à ébullition pendant 3 min. avant l'addition de DTNB.

Un coefficient d'extinction molaire de $13.600 M^{-1} cm^{-1}$ est utilisé

pour calculer le nombre de groupements sulfhydryl en absence de SDS (ELLMAN) (16). Ce coefficient est corrigé quand la réaction est conduite en présence de SDS à 2 % : nous avons en effet observé que la titration est linéaire avec le chlorhydrate de cystéine dans les concentrations usuelles ($0 - 10^{-4}$ M) mais l'absorption molaire est plus faible ; nous avons déterminé un coefficient égal à $12.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ qui est en bon accord avec la valeur calculée par WANG et VOLINI (18) en présence de détergents : $12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b) Par le p. chloromercuribenzoate de sodium (PCMB)

(RIORDAN et VALLEE) (19)

Solution de PCMB 1 mM :

PCMB (SCHUCHARDT)	20 mg
NaOH 0,1 M	2 ml
Dissoudre en chauffant légèrement (37° C)	
Tampon phosphate de sodium 0,05 M	
pH 7,0	qsp
	50 ml

La titration de la transcortine libre avec le PCMB est réalisée dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 7,0, avec ou sans SDS à 2 %. 1 ml de solution de transcortine 0,04 mM (2 mg/ml) est additionné de 10 μ l de solution de PCMB puis la densité optique à 250 nm est lue contre un blanc protéine seule. Des portions de 10 μ l de solution de PCMB sont ajoutées jusqu'au moment où la densité optique à 250 nm n'augmente plus.

Un coefficient d'extinction molaire de $7600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (RIORDAN et VALLEE) (19) est utilisé pour calculer le nombre de groupements sulfhydryl.

La titration du complexe transcortine-cortisol n'a pas été réalisée car le cortisol a une absorbance molaire élevée qui interfère avec le dosage à 250 nm (ξ à 258 nm = $15.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (WESTPHAL) (20).

B - COMPOSITION EN OSES

1° Oses neutres et osamines

Les oses neutres et les osamines sont dosés par chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés selon la méthode de REINHOLD (21) dans un appareil PERKIN-ELMER. Les oses sont libérés de la transcortine par méthanolyse ; celle-ci est précédée d'une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique pour le dosage des osamines.

Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique

Dans un tube bouché en Pyrex : 1,2 mg de transcortine est dissous dans 500 μ l d'acide trifluoroacétique 2 N, portés 2 h à 100° C, puis l'hydrolysate est séché à 40° C sous azote.

Comme l'hydrolyse entraîne une désacétylation partielle des N-acétylosamines, le résidu sec est réacétylé par addition de 100 μ l de pyridine + 100 μ l d'anhydride acétique à température ambiante. On sèche tout de suite à 40° C sous azote.

Méthanolyse

1,2 mg de transcortine ou le résidu sec précédent est incubé avec 500 μ l de méthanol-HCl pendant 16 h à 65° C puis le contenu du tube est séché à 40° C sous azote.

Comme précédemment, il est nécessaire de réacétyler les osamines par 100 μ l de pyridine + 100 μ l d'anhydride acétique. On sèche tout de suite, à nouveau à 40° C sous azote. Cette réacétylation se produit aussi au niveau des fonctions hydroxyle, il est donc important de dé-O-acétyler. Cette opération est réalisée par incubation avec 500 μ l de méthanol-NH₃ pendant 1 h à 65° C. Le tube est ensuite séché à 40° C sous azote.

Silylation

- - - - -

Le résidu sec est traité par 100 μ l de mélange (hexaméthyl-
disilane + triméthylsilane) pendant 1 h à température ambiante, puis
le contenu du tube est séché sous azote, à température ambiante car
les oses sont maintenant volatils. Le résidu est extrait par 100 μ l d'heptane
(30 min. à température ambiante) puis un aliquot de 1 à 2 μ l est injecté
dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse.

Un étalon inositol est traité de la même façon que la transcortine
et permet le dosage.

2° Acides sialiques

Les acides sialiques sont dosés selon la technique de AMINOFF (22).

a) Hydrolyse
.. .. .

Dans un tube en Pyrex, fermé : 2 mg de transcortine sont dissous
dans 0,2 ml d'eau distillée et additionnés de 0,2 ml de H_2SO_4 0,2 M. La
solution est incubée 30 min. à 80° C.

b) Dosage
.. .. .

Après refroidissement, 0,2 ml de solution d'acide periodique 0,05 M
à pH 1,2 (dans H_2SO_4 0,1 M) est ajouté puis le mélange est incubé 30 min.
à 37° C. L'acide periodique en excès est réduit par addition de 0,25 ml
d'arsénite de sodium à 2 % dans HCl 0,5 M (conservé à 4° C) et de 1,6 ml
de solution d'acide 2-thiobarbiturique 0,1 M ajustée à pH 9 avec NaOH
(conservation 1 mois à 4° C, à l'obscurité). Le mélange est porté au bain-
marie à 100° C pendant 7 minutes et demie puis refroidi dans un bain de
glace fondante.

Une extraction est ensuite effectuée par 4 ml de butanol acide
(butanol contenant 5 p. 100 de HCl 12 M -V/V-). Après centrifugation, la

densité optique de la phase butanolique est lue à 549 nm contre un blanc butanol. Une courbe étalon est réalisée avec des dilutions croissantes d'une solution à 100 μ g d'acide N-acétyl neuraminique par ml. Le dosage est fait en double exemplaire.

VI/ ACIDES AMINES N- et C- TERMINAUX

La séquence N-terminale a été réalisée sur la transcortine native ou S-carboxyméthylée. L'acide aminé C-terminal a été déterminé par action de la carboxypeptidase A sur de la transcortine S-aminoéthylée puis désialidée de manière à favoriser l'action enzymatique.

A - SEQUENCE N-TERMINALE

1° S-carboxyméthylation

La transcortine est réduite en milieu dénaturant par le dithiothreitol (DTT) selon la technique de KONIGSBERG (23), puis carboxyméthylée.

50 mg de transcortine sont dissous dans 2,5 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M à pH 8,1 contenant du chlorhydrate de guanidine 6 M et de l'EDTA disodique 0,002 M. La solution est incubée 30 min. à 50°C, puis agitée à l'obscurité avec 7,7 mg de DTT (qsp 20 mM) pendant 4 h à 50°C.

Refroidir puis ajouter, en agitant, 0,25 ml de solution d'acide monoiodoacétique^(°) 1 M (dans NaOH 1 M). Le mélange est agité 90 min. à

(°) L'acide monoiodoacétique doit se présenter sous forme de paillettes blanches et être conservé à l'obscurité. Une coloration jaune serait due à une décomposition, il faut le rejeter. La préparation est décrite au chapitre X.

l'obscurité à température ambiante. Puis la solution est dialysée sous agitation pendant 48 h contre 2 l d'eau distillée qui est changée 2 fois par jour, elle est ensuite lyophilisée.

2° Acide aminé N-terminal

a) Dansylation selon la technique de NARITA (24)

.....

Dans un tube Pyrex bouché : 0,5 mg de transcortine (10 n moles) est dissous dans 0,5 ml d'urée 8 M fraîchement désionisée contenant NaHCO_3 0,5 M. A cette solution est ajouté 0,5 ml de solution de chlorure de dansyl (20 mg/ml dans l'acétone). Le mélange est laissé 15 h à l'obscurité, à température ambiante, puis il est dialysé 72 h, sous agitation contre 1 l d'eau distillée changée 2 fois par 24 h.

b) Hydrolyse de la dansyl-transcortine

.....

Le volume de la solution dialysée est mesuré exactement et transféré dans un tube à hydrolyse (35 cm x 1,5 cm), 1 volume identique de HCl 12 N est ajouté puis le tube est scellé. Après hydrolyse à 110°C pendant 15 h, l'hydrolysate est séché sous vide à 60°C puis repris par un mélange acétone - acide acétique (3 : 2) pour identification.

c) Identification

.....

L'identification est réalisée par chromatographie sur plaque de polyamide 10 cm x 10 cm (SCHLEICHER et SCHULL, type F 1700) dans les systèmes solvants de WOODS et WANG (25):

• 1^{ère} dimension : acide formique / eau (100 : 1,5)

• 2^{ème} dimension :

 | 1^{ère} migration : benzène / acide acétique (9 : 1)

 | 2^{ème} migration : acétate d'éthyle / méthanol / acide acétique (20 : 1 : 1).

L'identité du dansyl amino-acide de la protéine est déterminée par sa position après chromatographie, elle est confirmée par incorporation dans l'hydrolysat de dansyl-protéine d'un témoin interne de dansyl amino-acide.

3° Séquence N-terminale (Technique de HAN et al.) (26)

a) Dégradation

.. .. .

La dégradation récurrente d'Edman a été réalisée au séquenceur SOCOSI (type PS 100) sur 20 mg (0,4 μ mole) de transcortine native et de transcortine S-carboxyméthylée.

Le couplage avec le phénylthiocyanate, en solution à 5 p. 100 dans l'heptane, est réalisé dans un tampon quadrol 1 M à pH 9 pendant 30 min. Après extraction des thiourées et de l'excès de réactif par le benzène puis l'acétate d'éthyle, la réaction de clivage est conduite dans l'acide heptafluorobutyrique pendant 3 min. Les thiazolinones obtenues sont extraites deux fois par le chlorobutane et recueillies dans un collecteur de fractions.

b) Traitement des thiazolinones

.. .. .

Les thiazolinones, récupérées dans le collecteur de fractions, sont séchées sous azote, puis reprises par 200 μ l d'HCl 1 N ; la conversion a lieu à 80° C pendant 10 min. On extrait 3 fois par 700 μ l d'acétate d'éthyle (PIERCE), puis les phases organiques sont réunies et séchées sous azote ; on reprend le résidu par 20 μ l d'acétate d'éthyle et on identifie les phénylthiohydantoïnes (PTH-aminoacides) par chromatographie sur couche mince de silica gel. L'acétate d'éthyle est conservé sur acide ascorbique (1 g/l) et l' HCl N contient 0,3 ml d'éthylmercaptan par litre.

La phase aqueuse obtenue après extraction à l'acétate d'éthyle est conservée pour identifier éventuellement les PTH-amino acides hydrosolubles.

c) Identification des PTH-amino-acides

L'identification est réalisée par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de silica-gel de 0,25 mm d'épaisseur (plaques 20 cm x 20 cm Merck F 254) à l'aide des systèmes solvants d'EDMAN et SJOQUIST (27) modifiés par HAN et al. (26).

. Traitement des solvants - - - - -

Xylène :

Le xylène (CARLO ERBA, R.P.) est agité pendant 30 min. avec H_2SO_4 concentré (100 ml pour 1 litre de xylène). On procède ainsi à 3 extractions successives puis la phase organique est lavée avec de l'eau distillée. Elle est ensuite séchée sur des pastilles de potasse pendant au moins une nuit, et distillée (point d'ébullition = $139^\circ C$).

Acétate de butyle :

L'acétate de butyle (CARLO ERBA, R.P.E.) est distillé (point d'ébullition = $126^\circ C$).

Acide propionique :

L'acide propionique est distillé à reflux pendant 4 h, en présence de CrO_3 (10 g pour 800 ml d'acide), puis filtré et distillé (point d'ébullition = $140^\circ C$).

. Chromatographie

Les cuves à chromatographie sont tapissées intérieurement de papier filtre Whatman n° 1 imprégné de solvant, elles ne sont employées que 24 h après leur préparation.

Système solvant D

La plaque de silica-gel est, au préalable, trempée horizontalement, pendant un temps très court (quelques secondes), dans un mélange formamide / acétone (3 : 7 - V/V) préparé extemporanément. Elle est séchée entre plusieurs feuilles de papier filtre, puis laissée à l'air ambiant pendant 30 min.

Les solutions de PTH-aminoacides dans l'acétate de butyle (témoins à 2 mg/ml) sont déposées en très petite quantité à la fois (1 μ l) car la tache de dépôt a une forte tendance à diffuser.

Le solvant utilisé est le xylène.

Système solvant E

100 ml de mélange acétate de butyle / eau (97 : 3 - V/V) est laissé reposer une nuit après avoir été agité 30 min. dans une ampoule à décanter.

La phase acétate de butyle est récupérée et on y ajoute 3 ml d'acide propionique et 4 ml de formamide.

Système solvant H

Le solvant est composé d'un mélange de 120 ml de dichloro-éthane (Fluka) et de 28 ml d'acide acétique (Fluka).

La cuve contenant ce solvant est placée dans une enceinte en polystyrène expansé de façon à obtenir une température stable.

La durée de migration dans chaque système est de 1 heure environ. Les plaques sont ensuite séchées à l'étuve à 110°C pendant 10 à 15 min. puis observées en lumière U.V. à 254 nm. Pour vérifier une identification douteuse, la plaque est trempée dans une solution à 0,2 p. 100 de ninhydrine dans l'acétone, et séchée à l'étuve à 110°C pendant 5 à 10 min. de façon à faire apparaître les colorations spécifiques de certains acides aminés. La plaque peut être trempée une deuxième fois dans une solution à 0,1 p. 100 de nitrate de cuivre dans l'éthanol, puis séchée 3 min. à 110°C.

Certains acides aminés changent de coloration ; les PTH Gly, Lys, Asp et Met deviennent rouges, les PTH Val et Glu roses et les PTH Phe, Tyr et Thr jaunes.

B - ACIDE AMINE C-TERMINAL

L'acide aminé C-terminal a été déterminé par action de la carboxypeptidase A de pancréas (Merck) sur la S-aminoéthyltranscortine désialidée.

1° S-amino éthylation

La transcortine a été S-amino éthyliée en milieu urée 8 M selon la technique de COLE (28).

100 mg de transcortine sont dissous dans 10 ml d'urée 8 M fraîchement désionisée. La solution est mise à barboter sous azote pendant 2 min. puis sont ajoutés successivement : 0,5 ml d'EDTA disodique à 2 mg/ml + 3 ml de tampon Tris-HCl 3 M à pH 8,6 + 0,1 ml de 2-mercaptoéthanol. Le mélange est laissé sous atmosphère d'azote pendant 5 heures, en agitant à température ambiante et à l'obscurité.

Trois additions successives de 0,2 ml d'éthylène-imine (Pierce) sont réalisées sous agitation à 10 min. d'intervalle. Le blocage des groupes sulfhydryl est vérifié par dépôt d'une goutte de la solution sur une feuille de papier Whatman n° 1 et trempage de la feuille dans le réactif au nitroprussiate ^(°). Si une coloration violette apparaît, il est nécessaire de prolonger l'action de l'éthylène imine en rajoutant éventuellement.

La solution est ensuite dialysée sous agitation pendant 48 h contre 5 litres d'eau distillée qui est changée 2 fois par jour, elle est alors lyophilisée.

(°)

Nitroprussiate de sodium	0,25 g
H ₂ SO ₄ 10 %	1 ml
NH ₄ OH concentré	2 ml
Méthanol	qsp 25 ml
à préparer extemporanément.	

2° Désialidation

30 mg de S-amino éthyl transcortine sont dissous dans 3 ml de tampon acétate de N-éthylmorpholine 0,2 M à pH 6. La solution est additionnée de 0,15 ml de solution de neuraminidase à 10 U/ml (Merck) puis agitée à 37°C pendant 24 h.

3° Hydrolyse par la carboxypeptidase A

L'hydrolyse par la carboxypeptidase A est réalisée selon la technique de AMBLER (29).

a) Préparation de la solution de carboxypeptidase A

.....

La solution de carboxypeptidase A est préparée en dissolvant 0,1 ml de suspension de carboxypeptidase A de pancréas à 50 mg/ml (Merck) dans 0,9 ml de solution de chlorure de lithium à 10 p. 100 dans le tampon acétate de N-éthylmorpholine 0,2 M à pH 8,5. Le mélange est laissé une nuit à 4°C avant utilisation. On obtient ainsi une solution de carboxypeptidase A à 5 mg/ml soit approximativement 140 μ M.

b) Hydrolyse et identification des acides aminés libérés

.....

25 mg de S-amino éthyl transcortine désialidée (environ 0,5 μ mole) sont dissous dans 5 ml de tampon acétate de N-éthylmorpholine 0,2 M à pH 8,5. La solution est additionnée de 50 μ l de solution de nor-leucine 10 mM dans l'eau distillée qui servira d'étalon interne pour doser les acides aminés libérés.

Le mélange est porté, sous agitation, à 37°C, 10 min., puis 1 ml est prélevé (= blanc non hydrolysé). Aux 4 ml restants sont ajoutés 70 μ l de solution de carboxypeptidase A de manière à avoir un rapport molaire

enzyme/substrat d'environ 1/40^{ème}. Le mélange est laissé sous agitation à 37°C. Des aliquots de 1 ml sont prélevés aux temps 15 min., 30 min., 60 min. et 120 min. L'hydrolyse est arrêtée chaque fois par une addition immédiate de 0,4 ml d'acide acétique glacial.

Comme la protéine précipite après addition de l'acide acétique, le mélange est centrifugé puis le surnageant est recueilli dans un tube à hémolyse en Pyrex. Le culot est lavé une fois avec 0,2 ml de mélange tampon acétate de N-éthylmorpholine / acide acétique (10 : 4 - V/V) et centrifugé à nouveau : ce deuxième surnageant de lavage est ajouté au premier puis le mélange est évaporé sous vide avant analyse sur l'analyseur d'acides aminés.

VII/ ETUDE EN DICHROÏSME CIRCULAIRE

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été conduites à l'aide d'un dichrographe JOBIN et YVON R.J. Mark III. La température est maintenue à 23°C et les spectres sont enregistrés entre 180 et 400 nm.

1° Spectres entre 180 et 240 nm

L'ellipticité molaire (θ) est calculée, pour la région du spectre correspondant au chromophore amide (entre 180 et 240 nm), d'après la concentration en résidus d'acides aminés. Le poids moyen d'un résidu, déterminé d'après la composition de la copule polypeptidique, est égal à 115. Etant donné la faible concentration en N-acétyl glucosamine de la transcortine, la contribution des chaînes osidiques au spectre dichroïque a été négligée.

Les spectres expérimentaux obtenus ont été convertis en courbes

gaussiennes à l'aide d'un convertisseur de courbes "DU PONT CURVE" ^(°). On obtient ainsi des maxima négatifs à 205, 214 et 222 nm. Le contenu en hélices α est apprécié à partir de la transition $n \longrightarrow \pi$ au niveau de la bande centrée à 222 nm et en prenant la valeur de -30.620 comme étalon pour l'hélice. La quantité de structure β est appréciée de façon similaire au niveau de la bande à 214 nm et en prenant la valeur de -7.040 comme étalon pour la forme β . Les valeurs des étalons sont déterminées pour le dichrographe utilisé dans la région du spectre 180-250 nm, à partir de six protéines (FREYSSINET) (30) d'après la méthode de CHEN et al.) (31).

2° Spectres entre 240 et 400 nm

Pour cette partie du spectre, l'ellipticité molaire est calculée d'après un poids moléculaire présumé de 36.135. Ce poids moléculaire correspond à la copule polypeptique si l'on prend en considération le poids moléculaire de la glycoprotéine entière (49.500) et le pourcentage de constituants osidiques (27 p. 100).

(°)

Professeur LEROY, Strasbourg.

VIII/ MARQUAGE D'AFFINITE

.....

Tous les stéroïdes : 2 α -, 6 α -, 6 β -, 11 α et 16 α -hydroxyprogestérones, testostérone, dexaméthasone et cortisol sont obtenus chez STERALOIDS (TOUZARD et MATIGNON).

A - PRÉPARATION DES BROMO ACETOXY STÉROÏDES

1° 11 α -Bromo acétoxy $[2 - {}^{14}\text{C}]$ progestérone

La 11 α -hydroxyprogestérone a été estérifiée par l'acide bromoacétique $[2 - {}^{14}\text{C}]$ selon la méthode de BUZAS et al. (26) modifiée par PONS et al. (réf. 27 et communication personnelle).

a) Estérification

.....

90 mg (0,275 mmole) de 11 α -hydroxyprogestérone sont dissous dans 2 ml de tétrahydrofuranne (Merck) contenant 35 mg (0,250 mmole) d'acide bromoacétique $[2 - {}^{14}\text{C}]$ (1 Ci/mole) ^(°). La solution est refroidie à -20°C avant d'ajouter 55 mg (0,275 mmole) de dicyclohexylcarbodiimide (Merck) et 18 μl de pyridine, en agitant. Le mélange est alors conservé 4 h à 4°C en agitant de temps en temps.

Dès les 5 premières minutes, un précipité blanc, cristallin

(°) Dans une ampoule de 1 mCi d'acide bromoacétique $[2 - {}^{14}\text{C}]$ (51 Ci/mole) (Radiochemical Center, Amersham) sont ajoutés 4 ml de solution d'acide bromoacétique (Merck) 0,25 M dans le tétrahydrofuranne. Cette solution est diluée au demi avec le tétrahydrofuranne, avant l'emploi.

(dicyclohexylurée) apparaît puis s'accumule en fonction du temps. Le progrès de la réaction est suivi par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince en plaque de silica-gel (20 x 20) ^(°) contenant un indicateur fluorescent (Merck F 254) dans le système solvant chloroforme / acétone (9 : 1, V/V). L'ester bromoacétique [¹⁴C] peut être identifié sous forme d'une tache radioactive fluorescente qui migre plus rapidement que la tache fluorescente non radioactive de la 11 α -hydroxyprogestérone de départ. Les chromatogrammes successifs montrent que la tache du produit de départ diminue alors que l'autre augmente en fonction du temps. Un équilibre est atteint après un temps de réaction de 3 à 4 heures.

b) Purification

.. .. .

Le mélange est ensuite filtré sur laine de verre et évaporé sous pression réduite. Le résidu sec est alors dissous dans 2 ml de chloroforme puis la solution obtenue est chromatographiée dans une colonne (1 x 20 cm) contenant du silica-gel 60 (Merck) équilibré dans le chloroforme. Les fractions éluées (5 ml/3 min.) sont repérées par chromatographie sur couche mince dans le système précédent : des aliquots de 5 μ l de chaque fraction sont déposés à des intervalles de 1 cm ; la migration n'est réalisée que si une tache fluorescente est observable au point de dépôt. Les fractions contenant le bromoacétate [¹⁴C] sont réunies et évaporées à 37° C sous pression réduite. Le résidu huileux est cristallisé par addition de quelques gouttes d'éther et d'éthanol absolu. 67 mg de produit pur sont obtenus. Les Rf du bromoacétate et du stéroïde de départ sont respectivement égaux à 0,49 et 0,11 dans le système solvant chloroforme / acétone (9 : 1, V/V).

(°)

L'utilisation de couches minces sur support en feuille d'aluminium permet de découper une plaque 20 x 20 cm en 4 plaques 5 x 20 cm, ce qui est plus pratique lorsque l'on n'a qu'un dépôt à faire. Le dépôt est de 1 à 2 μ l.

2° 6 α -, 6 β - et 16 α -Bromoacétoxy $[2 - {}^{14}\text{C}]$ progestérone

La méthode utilisée est identique mais le coût élevé des hydroxy-stéroïdes a nécessité la préparation d'une quantité plus faible de bromoacétate. L'estérification est conduite sur une quantité de 20 mg (0,06 mmole) dissous dans 1 ml de tétrahydrofuranne. Tous les autres composants sont réduits dans les mêmes proportions que le stéroïde sauf la pyridine dont la concentration est proportionnelle au volume réactionnel, soit ici 9 μ l pour 1 ml. Les Rf des 3 bromoacétates obtenus sont identiques : 0,55 et ceux des 3 stéroïdes de départ ont une valeur égale à 0,11 .

3° 17 β -Bromoacétyl $[2 - {}^{14}\text{C}]$ testostérone

Ce dérivé est obtenu à partir de 80 mg (0,275 mmole) de testostérone dissous dans 2 ml de tétrahydrofuranne selon la méthode décrite pour la 11 α -bromoacétoxyprogestérone. 55 mg de produit pur, cristallisé, ont été obtenus. Le Rf de bromoacétate et celui de la testostérone sont respectivement égaux à 0,61 et 0,32.

B - ANALYSE DES CARBOXYMETHYLAMINO-ACIDES

1° Transcortine marquée

Après marquage d'affinité, la solution de transcortine est traitée par le charbon-dextran pour éliminer les stéroïdes libres, puis elle est dessalée par dialyse 48 h sous agitation à 4° C contre 100 volumes d'eau distillée changée deux fois par jour. La solution dialysée est lyophilisée.

L'hydrolyse totale acide du produit lyophilisé (1 ou 2 mg) est réalisée en tube scellé sous vide à 110° C pendant 24 h. L'hydrolysate est déposé sur

l'analyseur d'acides aminés. La fraction de l'effluent de colonne colorée par la ninhydrine est collectée et la radioactivité est mesurée sur des aliquots de 1 ml.

2° Préparation de la S-carboxyméthyl $[2 - ^{14}\text{C}]$ méthionine

La S-carboxyméthyl $[2 - ^{14}\text{C}]$ méthionine a été préparée selon la méthode de GOREN et al. (34).

Dans un tube à hémolyse en Pyrex, 24 μl de la solution d'acide bromoacétique $[2 - ^{14}\text{C}]$ 0,25 M (1 Ci/mole) dans le tétrahydrofurane sont évaporés sous azote. Au résidu sec obtenu (6 μmoles d'acide bromoacétique $[^{14}\text{C}]$), on ajoute 200 μl de solution de DL-méthionine 10 mM (1,5 mg/ml) dans un tampon acétate de sodium 0,03 M à pH 5,6. La solution est incubée à 37° C pendant 3 h puis congelée à - 20° C jusqu'à utilisation.

L'obtention de S-carboxyméthylméthionine est vérifiée sur l'analyseur d'acides aminés (élution entre Asp et Thr). La position d'élution des produits de dégradation après hydrolyse totale acide de 24 h est déterminée d'après la radioactivité de l'effluent de colonne et, pour la S-carboxyméthylhomocystéine, d'après la radioactivité et la coloration à la ninhydrine.

3° Préparation des dérivés carboxyméthylés de l'histidine

Les trois dérivés carboxyméthylés de la L-histidine ont été préparés selon la méthode de GUNDLACH et al. (35).

100 mg de α -N-acétylhistidine et 400 mg d'acide iodoacétique ^(°) sont dissous dans 25 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à environ 6-7 avec quelques gouttes de NaOH 10 M puis la solution est incubée 20 h à 37° C et congelée à - 20° C jusqu'à utilisation.

(°) Préparation décrite au chapitre X.

Les produits obtenus sont analysés, après hydrolyse totale acide de 24 h. L'hydrolysate de 100 μ l de la solution ci-dessus est analysé soit seul, soit après mélange avec l'hydrolysate de transcortine marquée. La dicarboxyméthylhistidine est éluée avant Asp, la 1-carboxyméthylhistidine chevauche partiellement la proline et la 3-carboxyméthylhistidine est éluée entre l'alanine et la valine.

IX/ MODIFICATIONS CHIMIQUES PAR LE PYROCARBONATE D'ETHYLE

ET PAR LE TETRANITROMETHANE

A - PREPARATION DE LA TRANSCORTINE LIBRE

Les modifications chimiques ont été conduites sur la transcortine libre. Celle-ci est préparée extemporanément dans le tampon utilisé pour la modification : à un volume de solution de complexe transcortine-cortisol 0,04 - 0,08 mM (2-4 mg/ml) est ajouté un volume égal de suspension de charbon-dextran ^(^o) dans le même tampon. Après 30 min. d'incubation à 37° C, le mélange est centrifugé à 2.000 x g, 10 min., puis le surnageant est filtré sur papier Whatman 1 si des particules de charbon étaient restées en solution. Environ 95 p. 100 du cortisol est ainsi libéré de la transcortine sans qu'il y ait de dénaturation.

(^o) décrite dans le chapitre IV (mesures d'activité).

B - DIALYSE MULTIPLE A L'EQUILIBRE

1° Principe

La dialyse multiple à l'équilibre (DAUGHADAY) (36) ; (WESTPHAL et al.) (37) est une variante de la dialyse simple décrite dans le chapitre IV (mesures d'activité). A la différence de la dialyse simple, les solutions de protéine à étudier ne sont pas dialysées dans des flacons séparés mais ensemble, dans un seul flacon. Les différentes solutions de protéines peuvent ainsi être comparées directement entre elles.

2° Technique

Le matériel et les réactifs utilisés sont identiques à ceux décrits précédemment pour la dialyse simple. De même, les boudins de dialyse sont lavés 24 h avant utilisation.

0,1 ml (en double exemplaire) des solutions de transcortine (0,02 mM - 0,04 mM) dans le tampon utilisé pour la modification chimique est dilué avec 1 ml de tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4 . Des aliquots de 1 ml des solutions ainsi obtenues sont dialysés ensemble contre 10 volumes de tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4 contenant du cortisol en léger excès stœchiométrique sur la transcortine (rapport molaire = 1,25), 2,5 nCi/ml de cortisol [^3H] (30 Ci/mmole) et 0,02 p. 100 d'azide de sodium comme agent antibactérien. La dialyse est poursuivie pendant 72 h à 4° C avec une agitation magnétique continue. Après dialyse, un volume de 0,5 ml des compartiments internes et de la solution externe est compté avec 10 ml de scintillateur au dioxanne.

C - MODIFICATION PAR LE PYROCARBONATE D'ETHYLE

1° Modification chimique

L'éthoxycarbonylation de la transcortine est conduite à une concentration 0,02 mM (1 mg/ml) dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6,1, à température ambiante.

Le pyrocarbonate d'éthyle (CARLO ERBA) est utilisé en solution préparée extemporanément dans l'éthanol absolu. La concentration de la solution est choisie de manière à ce que la concentration finale en éthanol dans le mélange réactionnel soit inférieure ou égale à 2 p. 100 .

Le pourcentage d'inhibition est mesuré en comparant la transcortine modifiée à un témoin traité de la même façon mais sans pyrocarbonate.

2° Dosage des histidines modifiées

Le nombre d'éthoxycarbonylhistidines est mesuré par spectrophotométrie différentielle, en prenant un coefficient d'absorption molaire égal à $3.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 240 nm (OVADI *et al.*) (38) . Cette mesure n'est valable que si le rapport molaire réactif / histidine est inférieur à 20 (ROOSEMONT) (39), ce qui est le cas dans nos expérimentations. Les spectres d'absorption sont enregistrés de 230 à 320 nm avec une expansion d'échelle de 0,1 ou 0,25 unité de densité optique (Spectrophotomètre VARIAN TECHTRON 635 ou BECKMAN 25).

D - MODIFICATION PAR LE TETRANITROMETHANE

1° Modification chimique

La modification de la transcortine est conduite à une concentration 0,02 ou 0,04 mM (1 ou 2 mg/ml) dans un tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8 ou dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6, à température ambiante.

Comme le pyrocarbonate, le tétranitrométhane (SCHUCHARDT) est utilisé en solution préparée extemporanément dans l'éthanol absolu et sa concentration est choisie de manière à ce que la concentration finale en éthanol dans le mélange réactionnel soit inférieure ou égale à 2 p. 100.

La réaction est arrêtée par addition de 0,1 ml de dithiothreitol 100 mM pour 1 ml de mélange réactionnel. Après incubation 1 h à l'obscurité, le pourcentage d'inhibition est mesuré en comparant la transcortine modifiée à un témoin traité de la même façon mais sans tétranitrométhane.

2° Dosages des nitrotyrosines et des groupements sulfhydryl

Des aliquots de 1 ml des solutions modifiées sont dessalés dans des colonnes de Bio-gel P-6 (0,8 x 18 cm) équilibrées avec du tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8 (des pipettes graduées de 10 ml garnies de laine de verre tiennent lieu de colonnes). Les fractions de 1,2 ml/10 min. sont collectées ; celles correspondant au pic protéique sont réunies puis le volume est concentré à 1 ml sous pression d'azote à 4°C dans un appareil à micro-ultrafiltration AMICON équipé d'une membrane DIAFLO type PM 10.

Le nombre de nitrotyrosines est mesuré par spectrophotométrie différentielle, en prenant un coefficient d'absorption molaire égal à $4.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 428 nm (SOKOLOVSKY et al.) (40). Les spectres d'absorption sont enregistrés de 300 à 500 nm avec une expansion d'échelle de 0,1 ou 0,25

unité de densité optique. Comme le dessalage et l'ultrafiltration ont entraîné une perte en protéine, la concentration en transcortine diffère un peu entre les diverses solutions. Les spectres sont donc enregistrés en lisant les solutions contre le tampon Tris à pH 8, puis les densités optiques à 428 sont ramenées à une concentration 0,02 mM en transcortine (D.O. = 0,70 à 280 nm ^(°)). La valeur du témoin non nitré est alors déduite des autres valeurs. La présence de 3-nitrotyrosine est vérifiée par analyse des acides aminés de l'hydrolysat total acide de la protéine nitrée.

Le dosage des groupements sulfhydryl est réalisé, après l'analyse spectrale, par le DTNB selon la méthode précédemment décrite (chapitre V). Le contenu de la cuve de spectrophotomètre (1 ml) est auparavant additionné de 0,1 ml de solution de SDS à 20 p. 100 dans l'eau distillée et porté au bain-marie à 100° C, 3 min.

(°) solution 0,02 mM = 1 mg/ml. Voir le chapitre III des résultats (Propriétés physico-chimiques).

X/ TECHNIQUES DIVERSES

.. .. .

A - TRAITEMENT DE L'ETHER (ELIMINATION DES PEROXYDES)

2 litres d'éther éthylique technique sont distillés à reflux, pendant 30 min., en présence de chlorure stanneux (50 g/l). Après refroidissement, l'éther est lavé, dans une ampoule à décanter, avec 200 ml de solution de Na_2CO_3 à 20 % puis 5 fois avec le même volume d'eau distillée. Il est ensuite filtré sur papier Whatman 1 et distillé sur FeSO_4 (point d'ébullition = 34°C). Il est conservé sur FeSO_4 anhydre à 4°C et à l'obscurité.

B - PREPARATION DE L'ACIDE MONO IODO ACETIQUE

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 litre, verser 250 ml d'eau distillée, 47 g d'acide monochloracétique (Prolabo) (0,5 mole) et 90 g d'iodure de potassium (Prolabo) (\neq 0,55 mole).

Porter au bain-marie entre 50°C et 60°C en agitant au début pour dissoudre et laisser incuber pendant 3 h. La solution devient rouge (la température ne doit pas dépasser 60°C pour éviter une trop grande libération d'iode).

Refroidir sous un courant d'eau froide puis extraire 5 fois par 100 ml d'éther éthylique sans peroxydes. Les fractions étherées sont réunies dans un ballon et l'éther est évaporé en majeure partie par distillation. Dès que la température atteint 60°C , arrêter la distillation et refroidir le liquide restant (\neq 50 ml).

Celui-ci est alors transvasé dans une ampoule à décanter en rinçant le ballon avec un peu d'eau distillée. 100 ml d'eau distillée environ sont ajoutés dans l'ampoule puis on extrait 5 fois par 100 ml de benzène en laissant bien décanter chaque fois (Cette opération a pour but d'éliminer les sels minéraux qui auraient pu être extraits par l'éther). Les extraits benzéniques sont réunis dans un ballon puis évaporés par distillation comme précédemment. Dès que la température atteint 85 - 90° C, arrêter la distillation et terminer l'évaporation sous vide partiel au bain-marie à 60° C (dans une fiole à vide avec une entrée d'air).

Une masse solide est obtenue, elle est reprise par le minimum de toluène, à 70° C, puis la solution (\neq 30 ml) est versée dans un cristalliseur. Le flacon est rincé avec quelques ml de toluène qui sont ajoutés au cristalliseur. Celui-ci est porté à 4° C : une prise en masse se fait en 15 min.

La masse est désagrégée puis filtrée sur verre fritté n° 2, à 4° C. Le cristalliseur est rincé avec quelques ml de toluène froid et on essore soigneusement en pressant avec un agitateur à bout plat (On obtient ainsi des paillettes de couleur rouge). Le produit essoré est repris dans 15 ml de toluène que l'on chauffe à 70° C jusqu'à dissolution complète puis la solution est versée dans un cristalliseur ; on la laisse refroidir à température ambiante jusqu'à cristallisation complète puis on refroidit 5 min. à 4° C.

Le produit est à nouveau désagrégé et filtré sur verre fritté n° 2. On essore soigneusement en pressant et on laisse sécher sur le filtre avec circulation d'air, 15 min. On obtient ainsi, après désagrégation, de fines paillettes brillantes, légèrement rosées. Celles-ci sont étendues en fine couche sur une plaque de verre et laissées sécher à l'air une nuit. Le produit final est blanc.

Note : Lors des distillations, les distillats peuvent être colorés en rose. Cela provient de l'entraînement de l'iode qui a pu se former et est sans importance.

C - DESIONISATION DE L'UREE 8 M

Les solutions d'urée 8 M doivent être désionisées avant l'emploi : l'urée se décompose, en effet, spontanément pour donner des ions cyanate. Ceux-ci sont adsorbés à l'aide de résine Bio-rad AG 11 A 8.

La résine est lavée à l'eau distillée sur verre fritté puis est mise à sédimenter dans une éprouvette avec de l'eau distillée.

A 100 ml d'urée 8 M, on ajoute 7 ml de résine lavée et sédimentée. Le mélange est laissé sous agitation 24 h, puis filtré sur verre fritté.

—

BIBLIOGRAPHIE

DE L'APPENDICE TECHNIQUE

Les numéros entre parenthèses correspondent à l'ordre d'apparition dans le texte.

- AMBLER, R.P. (1972)
Methods Enzymol., 25B, 143-154 (29)
- AMINOFF, D. (1961)
Biochem. J., 81, 384-392 (22)
- BUZAS, A., CANAC, F., EGNELL, C. et FREON, P. (1965)
C.R. Acad. Sci. (Paris) 260, 2249 (32)
- CHEN, Y.H., YANG, J.T. et CHAU, K.H. (1974)
Biochemistry, 13, 3350-3359 (31)
- COLE, R.D. (1967)
Methods Enzymol., 11, 315-317 (28)
- CUATRECASAS, P. (1970)
J. Biol. Chem., 245, 3059-3065 (2)
- DAUGHADAY, W.H. (1957)
J. Clin. Invest., 36, 881 (12)
- DAUGHADAY, W.H. (1959)
Physiol. Rev., 39, 885-902 (36)
- DAVIS, B.J. (1964)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427 (4)
- DE MOOR, P., HEIRWEGH, K., HEREMANS, J. et DECLERCK-RASKIN, M. (1962)
J. Clin. Invest., 41, 816-827 (8)
- DE MOOR, P., RASKIN, M. et STEENO, O. (1960)
Ann. Endocrin., 21, 479-494 (6)
- EDMAN, P. et SJOQUIST, J. (1956)
Acta Chem. Scand., 10, 1507-1509 (27)
- ELLMAN, G.L. (1959)
Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77 (16)

- FREYSSINET, J.M. (1975)
D.E.A. de Sciences - Lille (30)
- GOREN, H.J., GLICK, D.M. et BARNARD, E.A. (1968)
Arch. Biochem. Biophys., 126, 607-623 (34)
- GUNDLACH, H.G., STEIN, W.H. et MOORE, S. (1959)
J. Biol. Chem., 234, 1754-1760 (35)
- HAN, K.K., PLANCHON, B., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (1973)
Ann. Pharm. Franç., 31, 623-632 (26)
- KONIGSBERG, W. (1972)
Methods Enzymol., 25B, 185-188 (23)
- LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 495, 312-323 (14)
- LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1978)
FEBS Letters, 94, 63-67 (17)
- LE GAILLARD, F., RACADOT, A., RACADOT-LEROY, N. et DAUTREVAUX, M. (1974)
Biochimie, 56, 99-108 (3)
- MASON, H.L., HOEHN, W.M., Mc KENZIE, B.F. et KENDALL, E.C. (1937)
J. Biol. Chem., 120, 719-741 (1)
- MURPHY, B.E.P. (1967)
J. Clin. Endocrin., 27, 973-990 (13)
- NARITA, K. (1970)
in "Protein Sequence Determination" éd. by NEEDLEMAN, S.B., pp. 47 (24)
- OVADI, J., LIBOR, S. et ELODI, P. (1967)
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 2, 455-458 (38)
- PONS, M., NICOLAS, J.C., BOUSSIOUX, A.M., DESCOMPS, B. et CRASTES de
PAULET, A. (1976)
Eur. J. Biochem., 68, 385-394 (33)
- RACADOT, A., COMBES, J. et LINQUETTE, M. (1967)
Lille Médical, 12, 1373-1381 (7)

- RACADOT, A., RACADOT-LEROY, N., LE GAILLARD, F. et DAUTREVAUX, M. (1976)
Clin. Chim. Acta, 66, 171-180 (10)
- RACADOT, A., TROUVE, M., BISERTE, G. et LINQUETTE, M. (1969)
Ann. Biol. Clin., 27, 181-188 (9)
- REINHOLD, V.N. (1972)
Methods Enzymol., 25, 244-249 (21)
- RIORDAN, J.F. et VALLEE, B.L. (1972)
Methods Enzymol., 25B, 449-456 (19)
- ROOSEMONT, J.L. (1978)
Anal. Biochem., 88, 314-320 (39)
- SOKOLOVSKY, M., RIORDAN, J.F. et VALLEE, B.L. (1966)
Biochemistry, 5, 3582-3589 (40)
- SPIES, J.R. et CHAMBERS, D.C. (1949)
Anal. Chem., 21, 1240 (15)
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. et ROSS, G.T. (1971)
J. Clin. Endocrin., 33, 988-991 (11)
- VESTERBERG, O. (1971)
Biochim. Biophys. Acta, 243, 345-348 (5)
- WANG, S. et VOLINI, M. (1968)
J. Biol. Chem., 243, 5465-5470 (18)
- WESTPHAL, U. (1971)
in "Steroid-Protein Interactions;" p. 137 - Springer-Verlag,
Berlin, Heidelberg, New-York (20)
- WESTPHAL, U., ASHLEY, B.D. et SELDEN, G.L. (1961)
Arch. Biochem. Biophys., 92, 441-448 (37)
- WOODS, K.R. et WANG, K.T. (1967)
Biochim. Biophys. Acta, 133, 369-370 (25)