

REPUBLIQUE-ALGERIENNE-DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.

Ministere de l'Enseignement Superieur.

Universite des Sciences et de la Technologie  
"Houari Boumediene" - Alger-

71 F.  
A seul  
ex

M0021/86A

**THESE DE MAGISTER**  
**EN BIOCHIMIE.**

Presentée par :

M<sup>me</sup> BELKHODJA Razika.  
Née SAFFIDINE.

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

Sujet :

**GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE**  
**DE L'ADN ET DES PROTEINES:**  
**APPLICATION A L'ANTITHROMBINE III.**

Soutenu en Avril 1986 devant le Jury :

President :

M<sup>r</sup> L. HADJI

Rapporteur :

M<sup>r</sup> B. TAYEBI

Examineurs :

M<sup>rs</sup> R. KRISHNAMOORTY-

M. BENABADJI-

C. BELDJORD-

1002186

**-REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE-**

Ministere de L'Enseignement Superieur.

Universite Des Sciences Et De La Technologie

Houari Boumediene -ALGER-

**T H E S E D E M A G I S T E R  
E N B I O C H I M I E .**

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

**Presentee par:**

Mme BELKHODJA Razika  
Nee SAFFIDINE.

**SUJET:**

**GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE  
DE L'ADN ET DES PROTEINES :  
APPLICATION A L'ANTITHROMBINE III.**

**Soutenue en AVRIL 1986 devant le Jury:**

**President:**

Mr L. HADJI - Professeur a L'U.S.T.H.B - ALGER.  
Rapporteur:

Mr B. TAYEBI - Professeur a L'U.S.T.H.B - ALGER.  
Examineurs:

Mrs R. KRISHNAMOORTY - Docteur Es Sciences - I.N.S.E.R.M-PARIS.

M.BENABADJI - Professeur a L'I.N.E.S.S.M - ALGER.

C.BELDJORD - Docent - a L'I.N.E.S.S.M - ALGER

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

A Mon Mari,

A Mon fils,

A Ma Famille,

A Mes Ami(e)s.



REMERCIEMENTS :  
\*\*\*\*\*

- Mes vifs remerciements vont à Monsieur HADJI pour avoir honoré ce travail, en acceptant de présider le Jury.
- Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à Monsieur TAYEBI qui m'a soutenue pendant les moments les plus difficiles, par ses encouragements, son aide et sa compréhension.
- Mes remerciements les plus sincères vont également à Monsieur J. ELION, Maître de conférence de l'université Xavier Bichat (Paris) de m'avoir acceptée dans son laboratoire et de m'avoir initiée à la recherche avec beaucoup de patience et d'efficacité.
- Monsieur R. KRISNAMORTHY, Docteur Es-Sciences, INSERM Paris qui m'a non seulement assistée et suivie dans l'élaboration de la 2ème partie de ce travail mais aussi à accepté de bien vouloir lire le manuscrit et m'éclairer de ses suggestions et ses critiques.
- Monsieur M. BENABADJI, Professeur à l'INESSM d'Alger et Monsieur C. BELDJORD, Docteur à l'INESSM d'Alger qui ont accepté de faire partie du jury .
- A l'équipe du laboratoire de Biochimie B de l'hôpital Bichat (Paris) et particulièrement à R. DUCROCQ pour son aide appréciable.
- A Mademoiselle C. LAPOUMEROLIE pour son aide appréciable.
- J'exprime mon amitié à toute l'équipe de Biochimie de l'USTHB et je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont aidée et soutenue de leur amitié particulièrement Madame F. LARABA.
- Je remercie Messieurs R. NIAL et K. RACHEDI qui se sont chargés de la transcription du manuscrit.



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

HORS TEXTE  
\*\*\*\*\*

ABREVIATIONS UTILISEES  
DANS LE TEXTE :

ADN	: ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
ARG	: ARGININE
ARNm	: ACIDE RIBONUCLEIQUE DE TRANSFERT
AT III	: ANTITHROMBINE III
BOC LYS	: N $\alpha$ TERT-BUTOXYCARBONYLLYSINE
DEAE	: DIETHYLAMINO-ETHYL
2,3 DPG	: ACIDE 2-3 DIPHOSPHOGLYCERIQUE
EDTA	: ETHYLENE DIAMINE TETRACETATE
F	: FRUCTOSE
F6P	: FRUCTOSE 6 PHOSPHATE
F16DP	: FRUCTOSE 1-6 DIPHOSPHATE
G ou GLU	: GLUCOSE
G6P	: GLUCOSE 6 PHOSPHATE
GAL	: GALACTOSE
Hb	: HEMOGLOBINE
HEPES	: ACIDE N-2 HYDROXY-ETHYL PIPERAZINE N'-2 ETHANE SULFONIQUE
Kd	: KILO DALTON
Kb	: KILO BASE
LDL	: LIPOPROTEINE DE FAIBLE DENSITE
LYS	: LYSINE
PEG 6000	: POLYETHYLENE GLYCOL 6000
PH	: PH ISOELECTRIQUE
PM	: POIDS MOLECULAIRE
SDS	: DODECYL-SULFATE DE SODIUM
TEMED	: N,N' TETRAMETHYLENE DIAMINE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

TABLE DES MATIERES  
\*\*\*\*\*



INTRODUCTION :  
\*\*\*\*\*

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

PAGE

1. MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES.....	1
1.1. MODIFICATIONS ENZYMATIQUES.....	1
1.2. MODIFICATIONS NON ENZYMATIQUES.....	3
2. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE.....	3
2.1. MECANISME DE LA GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE.....	4
2.2. MODELE DE L'HEMOGLOBINE.....	6
2.3. VIEILLISSEMENT MOLECULAIRE ET CELLULAIRE.....	6
2.4. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE ET COMPLICATIONS.....	9
TARDIVES DU DIABETES	
2.4.1. GLOBULE ROUGE.....	10
2.4.2. PROTEINES PLASMATIQUES.....	10
2.4.3. CRISTALLINE.....	11
2.4.4. MEMBRANES BASALES.....	11
2.4.5. PROTEINES BASIQUES DE LA MYELINE.....	11
2.5. LES PROTEINES DE LA COAGULATION.....	12
2.6. L'ANTITHROMBINE III.....	12
2.6.1. HISTORIQUE.....	12
2.6.2. STRUCTURE DE L'ANTITHROMBINE III.....	13
2.6.3. ROLE DE L'ANTITHROMBINE III.....	13
2.6.4. MECANISME D'ACTION.....	13
2.7. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE DE L'ADN.....	15
2.8. BUT DU TRAVAIL.....	16

MATERIEL ET METHODES  
\*\*\*\*\*

1. MATERIEL.....	18
1.1. PLASMA.....	18
1.2. PRODUITS CHIMIQUES.....	18
2. METHODES.....	19
2.1. PURIFICATION DE L'ANTITHROMBINE III.....	19
2.1.1. ADSORPTION SUR SEL DE BARIUM.....	19
2.1.2. PRECIPITATION PAR LE SULFATE DE DEXTRAN.....	19
2.1.3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR HEPARINE.....	21
AGAROSE.....	21
2.1.4. CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS.....	21
2.2. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES.....	21
2.2.1. ELECTROPHORESE SUR GE DE POLYCRYLAMIDE.....	21
EN SDS.....	21
2.2.2. FOCALISATION ISOELECTRIQUE.....	22
2.2.3. IMMUNOELECTROPHORESE SELON LAURELL.....	22
(ROCKET IMMUNOELECTROPHORESE).....	22
2.2.4. CROSSED IMMUNOELECTROPHORESE.....	23
2.2.5. IMMUNODIFFUSION RADIALE.....	23

2.3. CHROMATOGRAPHIE SUR PHENYL BORONATE	24
2.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'ANTITHROMBINE III	25
2.5. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE IN VITRO	26
2.6. DOSAGE COLORIMETRIQUE DES SUCRES LIES NON ENZYMATIQUEMENT	26
2.7. GLYCOSYLATION IN VITRO DE L'ADN	27

RESULTATS :  
 \*\*\*\*\*

1. PURIFICATION DE L'ANTITHROMBINE III	31
2. ACTION DES SPERMINES SUR L'ANTITHROMBINE III	41
3. GLYCOSYLATION IN VITRO DE L'ANTITHROMBINE III	45
3.1. ACTIVITE DE L'ANTITHROMBINE III	45
3.2. ISOELECTROFOCALISATION	50
4. GLYCOSYLATION IN VITRO DE L'ANTITHROMBINE III	53
5. GLYCOSYLATION IN VITRO DE L'ADN (PBR 322)	56
DISCUSSION ET CONCLUSION	62
BIBIographie	66

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

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



Dans les tissus vivants, la plupart des réactions chimiques se fait sous contrôle enzymatique strict. Les régulations métaboliques dans l'organisme se traduisent essentiellement par des modifications d'activité enzymatique. Bien qu'un tel mécanisme régulateur puisse exister, minimisant ainsi les réactions chimiques secondaires, on ne peut ignorer l'existence de modifications non enzymatiques potentiellement délétères et ceci même dans des conditions physiologiques. De telles modifications, quand elles surviennent sur des macromolécules, peuvent avoir des conséquences, selon la durée de vie des macromolécules : quant il s'agit des macromolécules dont la durée de vie est courte (exemple : enzymes inductibles) la conséquence fonctionnelle est immédiate, alors que les modifications des macromolécules de longue durée de vie ou n'ayant pas de " turn over " telles que le collagène, la chitine et éventuellement l'ADN des cellules ne subissant plus de division (stationnaires) pourraient aboutir à une accumulation des molécules modifiées durant la vie. Une telle accumulation peut contribuer au vieillissement moléculaire et cellulaire. Dans certaines situations pathologiques, ces modifications peuvent être accentuées par des dérèglements métaboliques accélérant ainsi le processus de vieillissement.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une de ces modifications : la glycosylation non enzymatique. Cette glycosylation non enzymatique minime à l'état physiologique, se trouve augmentée lors du diabète sucré par suite de l'hyperglycémie.

## INTRODUCTION :

Les protéines possèdent des fonctions spécifiques dues à leur structure, elle même précisée par l'information génétique contenue dans l'ADN. Vu leur rôle fondamental dans l'établissement de la structure et dans le fonctionnement cellulaire, les modifications subies par ces protéines, ont fait l'objet de nombreux travaux depuis plusieurs années. C'est ainsi qu'on parle :

- De polymorphisme génétique ou " mutations " quand il s'agit de modifications génétiquement déterminées.
- De modifications post traductionnelles quand celles-ci surviennent après l'étape de la traduction.

## 1 . MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES :

Par définition, une modification post traductionnelle est un processus chimique ou enzymatique qui modifie la protéine après la traduction prise dans son sens le plus strict c'est à dire la reconnaissance du triplet de l'ARNm par l'anticodon de l'ARNt.

Ces modifications post traductionnelles de nature très variée ont été passées en revue par Uy et Wold (1978). Elles peuvent résulter de processus enzymatiques ou non enzymatiques.

- Les modifications s'effectuant sous la dépendance d'enzymes spécifiques sont indispensables à l'expression de la fonction de certaines protéines et correspondent donc à une étape de maturation protéique.
- Les modifications spontanées, dites non enzymatiques s'accompagnent souvent d'altérations fonctionnelles. Bien que leur rôle biologique ne soit pas encore connu, elles sont considérées comme responsables du vieillissement moléculaire

### 1.1. MODIFICATIONS ENZYMATIQUES

La plupart des modifications enzymatiques sont associées à la biosynthèse des protéines et à leur maturation.

De nombreux exemples peuvent être cités en commençant par les protéolyses partielles : ainsi les protéines secrétées perdent leur peptide signal (Blodel et Coll 1971). L'insuline, synthétisée sous forme d'une chaîne polypeptidique (pro insuline inactive), est activée par l'excision d'un peptide central (peptide connecteur) pour aboutir à une molécule mature à deux chaînes (A et B). De même de nombreux zymogènes, (trypsinogène, chymotrypsinogène, prothrombine etc...) sont transformés en leur enzyme respective: tryprine, chymotrypsine, thrombine par protéolyse limitée.



La maturation peut également correspondre à la modification de certains résidus d'acides aminés spécifiques. Plus de 140 dérivés d'acides aminés différents ont ainsi été décrits (Wold 1981); on peut citer :

- L'hydroxylation des lysines et des prolines dans le collagène,
- La carboxylation de certains acides glutamiques par exemple : les acides  $\gamma$  carboxyglutamiques dans la prothrombine et dans les facteurs IX, X et VII faisant apparaître dans ces molécules des sites de fixation pour  $Ca^{2+}$  (Nelstuen et Coll 1974), qui est essentiel pour l'interaction de ces facteurs de coagulation avec les phospholipides. En absence de vitamine K (le facteur indispensable à la carboxylation) ces protéines sont incapables d'interagir avec les phospholipides faisant apparaître un syndrome hémorragique.

Une étape importante de maturation de certaines protéines correspond à la glycosylation enzymatique. La maturation de ces glycoprotéines s'effectue par la fixation de chaînes glucidiques assez longues sur les groupements latéraux de résidus asparagine, sérine ou thréonine (Hughes, R.C 1983). Généralement ces composés glucidiques représentent environ 5% de la totalité de la molécule, dans certains cas, ce taux peut atteindre 60% comme dans le cas de la glycophorine A dont le poids moléculaire est de 45 KD pour 131 acides aminés (Hughes, R.C 1983). Dans les glycoprotéines membranaires le rôle des greffons glucidiques est primordial puisqu'ils interviennent dans les interactions cellulaires ou comme déterminants antigéniques (certains groupes sanguins) Pour les glycoprotéines plasmatiques, ils pourraient jouer un rôle de solubilisation, transport et un rôle protecteur en augmentant leur demi-vie. Nous citerons un dernier exemple de modifications post traductionnelle enzymatique : Il s'agit de la phosphorylation des protéines qui est impliquée dans la modulation de l'activité de nombreuses enzymes et dans la régulation de certaines voies métaboliques. Ainsi la phosphorylation enzymatique de la phosphorylase b inactive, la transforme en phosphorylase a active en ouvrant la voie de la glycogénolyse (Fletterick, R.J. 1980).

Ainsi les enzymes ont évolué en biocatalyseurs intervenant dans des conditions adaptées de température, de PH et de concentration de substrat dans l'organisme et surtout avec une extrême spécificité.

Toutes ces modifications ont un trait commun; déterminées génétiquement, elles sont nécessaires et utiles à l'organisme, et elles représentent évidemment une adaptation physiologique et une facilitation des processus biologiques.



## 1.2. MODIFICATIONS NON ENZYMATIQUES :

A l'inverse de tous les cas précédemment cités, d'autres modifications se produisent spontanément sans intervention enzymatique, sous la seule contrainte de conditions physiques inhabituelles. Au moins, quatre circonstances favorisent une telle modification (le plus souvent une condensation) tels que : l'élévation de la température, le pH, les conditions chimiques et les conditions thermodynamiques favorables. Elles peuvent correspondre soit à la modification d'un acide aminé de la chaîne polypeptidique elle-même (désamidation, oxydation des groupements SH), soit à la fixation directe de petites molécules sur la protéine. La glycosylation non enzymatique fait partie de ce dernier groupe. Elle s'accompagne dans certains cas bien précis et discutés plus loin (Hémoglobine, cristalline), d'une altération fonctionnelle de la protéine. D'une façon générale ces modifications non enzymatiques induisent une acidification des protéines. Dice et Coll (1975) ont pu établir une relation entre le point isoélectrique (P<sub>Hi</sub>) d'une protéine et sa vitesse de dégradation, celle-ci étant d'autant plus grande que le P<sub>Hi</sub> est plus bas. L'ensemble de ces considérations semble donc indiquer un lien entre les modifications post traductionnelles non enzymatiques et le vieillissement moléculaire.

Dans ce cadre général nous nous sommes particulièrement intéressés à la glycosylation non enzymatique des protéines du fait que celle-ci est très augmentée au cours du diabète, et que sa participation a été proposée pour expliquer le développement des complications tardives de cette maladie.

## 2. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE :

La fixation non enzymatique des sucres sur les protéines est un phénomène général, reconnu de longue date, in vitro, comme étant responsable du brunissement du lait lors de son traitement industriel (Hodge, J.E 1953). Un phénomène comparable in vitro, n'a été mis en évidence que récemment par l'observation de Rahbar (1968) montrant l'augmentation d'une fraction glycosylée de l'hémoglobine chez les diabétiques. C'est par l'étude de cette fraction qu'a pu être défini un modèle général pour l'osylation non enzymatique des protéines.



## 2.1. MECANISME DE LA GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE :

A la recherche d'un modèle simplifié concernant le brunissement, Maillard a décrit en 1911 à Alger le phénomène général d'une interation entre un sucre réducteur et un acide aminé et, disait-il dans son compte rendu, fait à l'académie des sciences le 2 décembre 1912 :

" les conséquences de ces faits me paraissent aussi nombreuses qu'intéressantes dans divers domaines de la science : non seulement en physiologie et en pathologies humaines mais aussi en physiologie végétale, en agronomie, en géologie ..."

Les différentes étapes de la glycosylation non enzymatique consistent d'abord en une condensation entre un groupement aldéhydique et une amine non ionisée avec élimination d'une molécule d'eau pour donner un alcool iminé appelé couramment base de Schiff ou aldimine (Gottschalk A 1972). Cette première étape qui est réversible, est réalisée à partir de la forme trace dite ouverte de l'ose. Cependant cette forme imine est beaucoup moins stable que la forme amine correspondante. Une plus grande stabilité de la cétone dans la forme cétoamine par rapport à la somme des énergies de liaison de la forme aldimine dirige l'évolution ultérieure du produit de condensation.

Cette seconde étape est irréversible tant pour des raisons de stabilité tautomérique que par suite de la cyclisation stabilisante qui survient sitôt après (schéma 1). Le modèle proposé dans le schéma 1 provient de plusieurs études. Bunn et Coll (1975) en analysant les sucres liés à l'hémoglobine A1C, après hydrolyse acide, trouvent un mélange de glucose et de mannose et proposent ainsi la formation de cétoamine après le réarrangement d'Amadori. Le modèle est confirmé par les travaux de Koenig et Coll (1977) qui par comparaison avec des dérivés de synthèse et par spectrométrie de masse, ont identifié le groupe stabilisé comme sous forme 1 désoxy - 2 cétonique. Enfin Fischer et Winterhalter (1981) montrent que le fructose est cyclisé en forme pyranne par formation d'un pont oxydique entre les carbones 2 et 6 (schéma 1). Ce modèle est encore débattu. Krishnamorthy et Coll considèrent que ce modèle est incomplet. Bien que le réarrangement d'Amadori pourrait expliquer la présence de glucose et de mannose dans l'hydrolysate de protéines glycosylées telles que l'albumine et l'hémoglobine amène ces auteurs à formuler l'hypothèse que le réarrangement d'Amadori est suivi d'autres réarrangements complexes, faisant intervenir divers dérivés énoliques.

Cette hypothèse est importante à considérer car ces intermédiaires, extrêmement instables et très réactifs, pourraient servir de promoteurs à la polymérisation des protéines (schéma 2) en l'absence de tout éclaircissement sur les étapes impliquées dans la polymérisation, la proposition de Pongor et Coll (1984) est intéressante à noter (schéma 3)

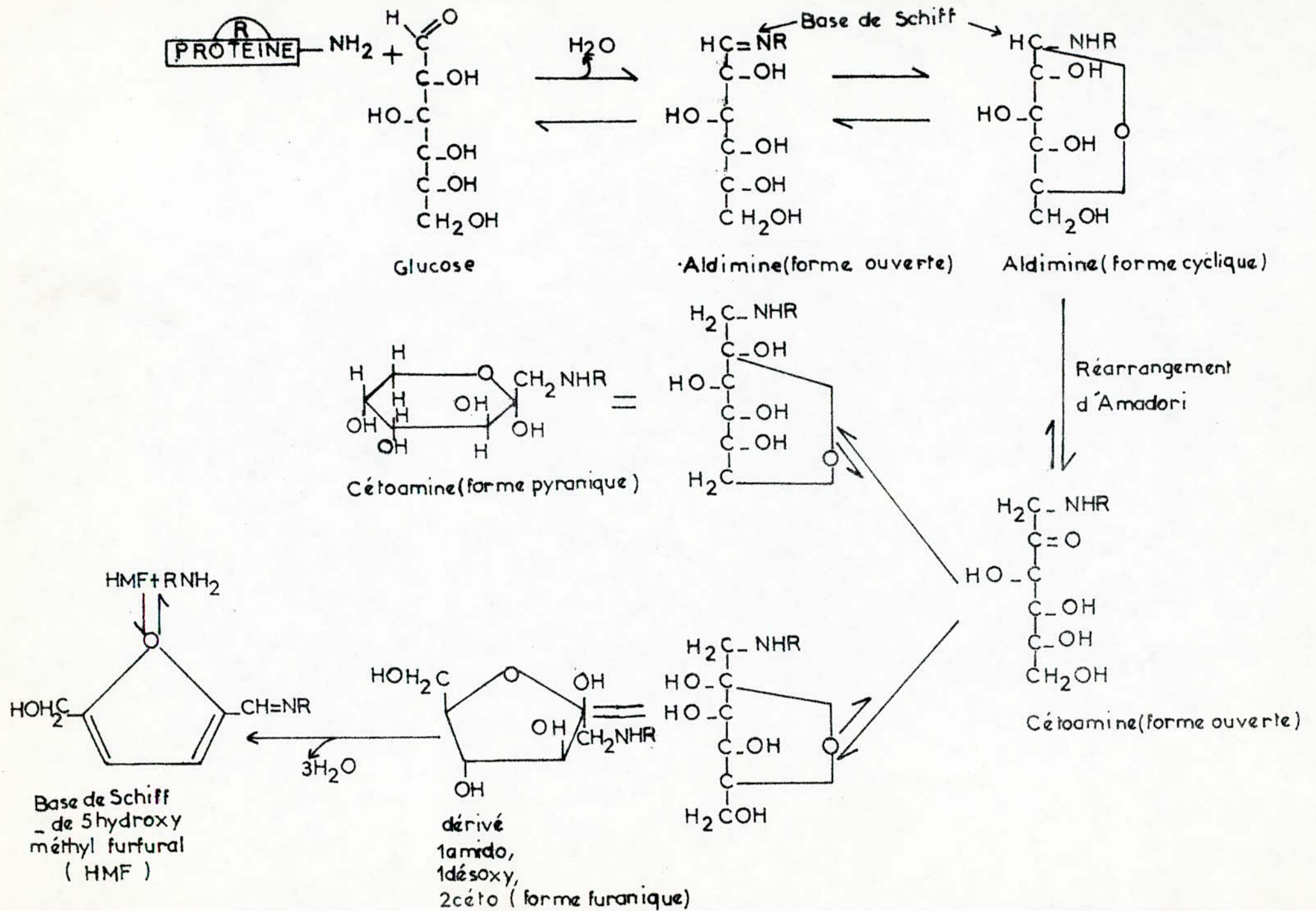


Schéma 1: Mécanisme de la glycosylation non-enzymatique des protéines.



## 2.2. MODELE DE L'HEMOGLOBINE :

En 1955 Kunkel décrit l'existence des fractions mineures de l'hémoglobine par électrophorèse en gel d'amidon. En 1958 Allen confirme l'existence de telles fractions par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Il établit une terminologie qui restera en vigueur avec des modifications subtiles.

En 1961 Schneck et Schroeder établissent la corrélation entre les fractions isolées par Kunkel et celles isolées par Allen.

En 1961 Rosa, par marquage radioactif, montre la relation précurseur produit entre HbA et HbA1. En 1962, il révèle qu'une modification des chaînes  $\beta$  est en cause dans la formation de l'HbA1C à partir de l'HbA. En 1966 Holmquist montre que dans l'HbA1c le groupement NH<sub>2</sub> terminal de la chaîne  $\beta$  est bloqué par un groupement inconnu. En 1968 Bookchin précise que l'agent bloquant le début de la chaîne  $\beta$  est une molécule d'hexose. En 1976 Bunn et Coll émettent l'hypothèse de l'existence d'une condensation entre glucose et le groupement NH<sub>2</sub> terminal de la chaîne  $\beta$ . En 1977 Koenig et Coll confirment la réactivité spontanée entre le carbonyle aldéhydique et la fonction amine sans assistance enzymatique et montre que le groupement fixé est le 1 desoxy (N Valyl) fructose. L'interaction entre l'HbA et le glucose pour donner l'HbA1c étant confirmée ou est revenu rétrospectivement sur l'étude de Rahbar dans les années 1968 qui avait démontré une augmentation absolue de l'HbA1c chez les sujets diabétiques. De nombreuses méthodologies et des études fondamentales sur la glycosylation non enzymatique des protéines furent entreprises.

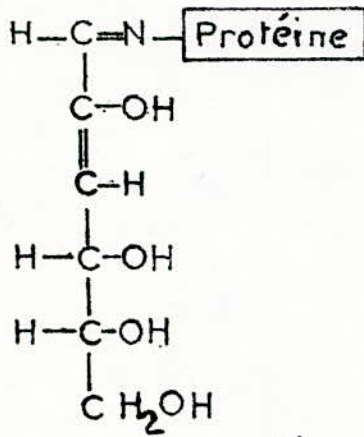
Il est maintenant clairement établi que le pourcentage de protéine glycosylée est le reflet de la valeur intégrée de la glycémie sur une période correspondant à la durée de vie de la protéine ou de la cellule concernée c'est ainsi que le dosage des fractions glycosylées de l'Hb est largement utilisé pour apprécier l'équilibre du diabète (Lois Jovanovic, M.D 1981 la preuve directe d'une glycosylation non enzymatique a également été apportée par les protéines sériques (albumine, apolipoprotéine B), les protéines de la membrane du globule rouge, la cristalline, les protéines de la membrane basale des glomérules, le collagène et les protéines basiques de la myéline.

## 2.3. VIEILLISSEMENT MOLECULAIRE ET CELLULAIRE :

A l'heure actuelle, deux théories sont avancées pour expliquer le vieillissement moléculaire et cellulaire :

Le premier concerne le matériel génétique lui même, alors que le deuxième concerne les produits phénotypiques de ce matériel génétique.

L'ADN des cellules ne subissant plus de division (stationnaires) et plusieurs protéines dont la durée de vie est longue, peuvent subir des modifications non enzymatique entraînant l'accumulation des produits qui pourraient affecter la viabilité de ces molécules dans leur structure et dans leur fonction.



et

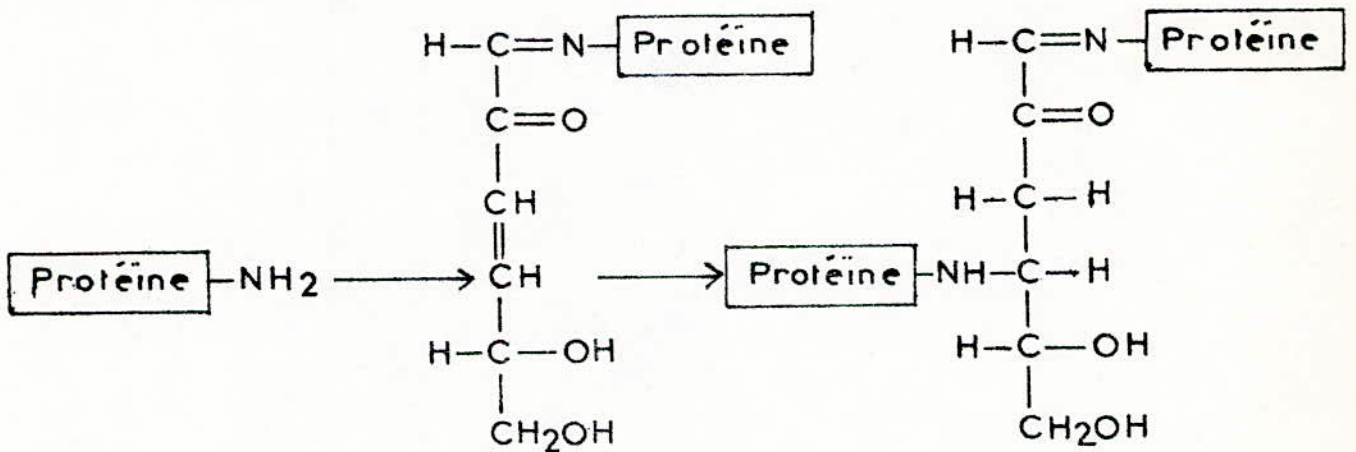


Schéma 2: Hypothèse de réarrangements ultérieurs  
(Réaction de Maillard)

(conséquence: polymérisation des protéines  
glycosylées)



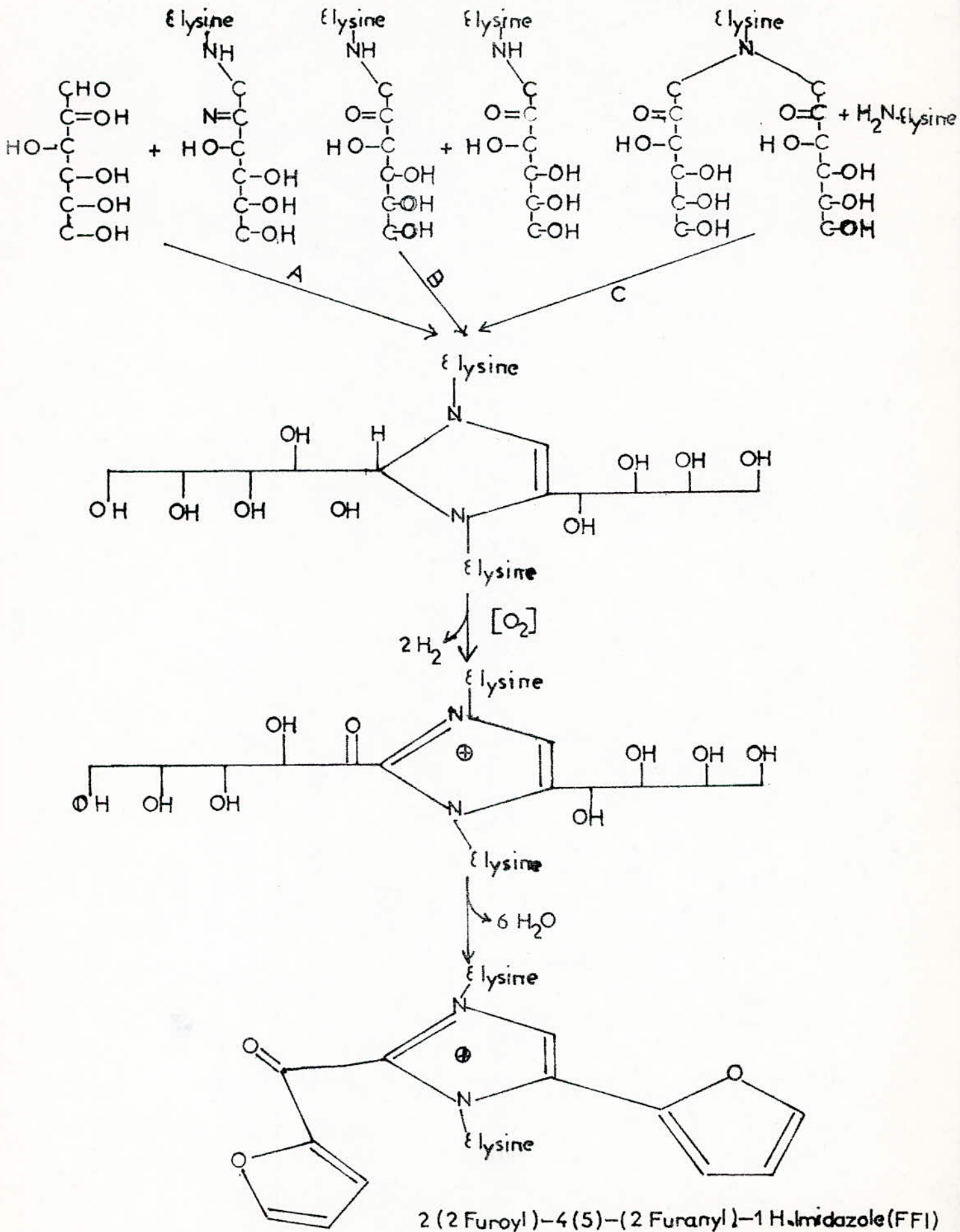


Schéma 3 : Possibilités de polymérisation des protéines glycosylées.



En ce qui concerne l'ADN, une telle accumulation progressive des modifications, peut surcharger le système de réparation, d'où apparition de lésions génétiques non corrigées. En appui à cette hypothèse, plusieurs exemples ont été cités : augmentation de tumorigénèse et de l'aberration chromosomique au cours du vieillissement, capacité replicative fortement diminuée de fibroblastes prélevés de sujets âgés et probabilité élevée de naissance des enfants anormaux chez les femmes âgées, les deux derniers cas étant exacerbés au cours du diabète.

Par ailleurs chez les diabétiques les tissus insulino-indépendants pour la pénétration du glucose (cornée, membrane basale des artères, des nerfs et des tissus conjonctifs) subissent également des modifications. C'est ainsi qu'on note une apparition plus précoce que chez un sujet normal de la cataracte et de l'athérosclérose.

Etant donné le lien direct entre le degré de glycosylation non enzymatique des protéines et la glycémie, il est légitime de penser que la glycosylation non enzymatique des protéines pourrait contribuer au développement des complications tardives du diabète.

Toutefois la glycosylation non enzymatique de l'ADN génomique chez les sujets normaux et diabétiques n'a pas été étudiée jusqu'à présent car il n'existe pas à l'heure actuelle une méthodologie permettant d'aborder ce problème.

#### 2.4. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE ET COMPLICATIONS TARDIVES DU DIABETE :

Malgré les progrès considérables réalisés dans la thérapeutique du diabète, ceux-ci n'ont pas permis la prévention des complications tardives oculaires, rénales, neurologiques et artérielles. L'hypothèse d'une hypoxie tissulaire relative a été avancée pour expliquer le développement de nombreuses complications (Brownlee, M et Coll 1981).

Un certain nombre d'anomalies hématologiques responsables de cette hypoxie pourrait résulter de la glycosylation non enzymatique des globules rouges et des protéines plasmatiques. Par ailleurs et surtout, depuis la description de l'hémoglobine glycosylée, la glycosylation non enzymatique a été mise en évidence dans de nombreux autres tissus insulino indépendants, siège des lésions tardives. Dans ces tissus, la glycosylation des protéines à taux de renouvellement lent pourrait jouer un rôle dans la pathogénie des complications du diabète. Cette hypothèse est étayée par les observations cliniques, indiquant en fait qu'une hyperglycémie subclinique, plutôt que le déficit en insuline lui-même, pourrait être le facteur principal des complications à long terme.

L'évidence la plus directe concerne les conséquences de la glycosylation non enzymatique de la cristalline.



#### 2.4.1. GLOBULE ROUGE :

Certaines anomalies des globules rouges chez les sujets diabétiques constituent des facteurs prédisposants à une hypoxie tissulaire. Il s'agit d'une augmentation de leur affinité pour l'oxygène.

L'HbA1c présente une affinité pour l'oxygène légèrement plus élevée que celle de l'HbA0 et une sensibilité réduite au 2,3 DPG (Mc Donald, M.J et Coll 1979). Ce dernier s'explique probablement par la glycosylation de la valine N terminale des chaînes  $\beta$  située dans la poche de fixation du 2,3 DPG. In vivo le 2,3 DPG, joue un rôle majeur de régulateur en diminuant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et par là même il facilite la libération d'oxygène aux tissus. Même en présence de fortes concentrations de 2,3 DPG, les hémoglobines glycosylées sont encore saturées à 50% en oxygène à des pressions partielles pour lesquelles l'HbA0 a déjà libéré la plupart de son oxygène. Chez les diabétiques, où un déficit relatif en 2,3 DPG peut coexister avec un taux élevé d'hémoglobines glycosylées, il est possible qu'il existe une diminution de la libération d'oxygène au niveau des tissus spécifiques.

#### 2.4.2. PROTEINES PLASMATIQUES :

Les protéines plasmatiques, qui sont pour la plupart glycosylées enzymatiquement, peuvent subir ultérieurement une glycosylation non enzymatique selon un mécanisme analogue à celui décrit pour l'hémoglobine (Mc Farland, K.F 1979). L'albumine glycosylée a pu être isolée et sa glycosylation a été étudiée in vitro (Day, J.F 1979). Ces protéines sont augmentées chez les diabétiques. La glycosylation protège contre la dégradation et il est possible qu'il en résulte des perturbations du schéma normal de dégradation des protéines plasmatiques. Sa participation a été évoquée dans l'apparition d'autres anomalies prédisposant à l'hypoxie tissulaire telles que l'augmentation de la viscosité sanguine, l'état d'hypercoagulabilité et l'augmentation de la fibrinolyse observée chez les sujets diabétiques (Brownlee, M 1981). Pour certaines glycoprotéines, la partie sucrée joue un rôle important dans la fonction; par exemple, les sucres fixés au facteur de Von Willebrand ont une participation majeure dans son interaction avec les plaquettes (Brownlee, M 1981). Un excès de glycosylation de telles protéines pourrait éventuellement conduire à une augmentation de leur activité biologique et dans le cas du facteur de Von Willebrand, participer aux anomalies de la fonction plaquettaire observée dans le diabète. Parmi les protéines plasmatiques glycosylées non enzymatiquement, il faut citer l'apolipoprotéine B des lipoprotéines de faible densité (LDL) du fait de leur participation probable au développement de l'artériosclérose chez les sujets diabétiques (Schleicher, E et Coll 1981) (Witzlum, J.L et Coll 1982).

La fixation des sucres sur des lysines pourrait diminuer la susceptibilité des LDL à la dégradation, mais surtout modifier leur pénétration dans les cellules. Il a été en effet démontré que la modification chimique des lysines par acétylation entraînait une modification de la liaison des LDL avec leur récepteur spécifique. Il en résulte une augmentation de la pénétration intracellulaire des LDL et une accumulation de cholestérol dans les cellules, ceci par l'intermédiaire de récepteurs différents de ceux spécifiques des LDL natives.



#### 2.4.3. CRISTALLINE :

Une des observations les plus convaincantes de la participation de la glycosylation non enzymatique dans la pathogenie des complications du diabète a été la démonstration de l'effet de la glycosylation sur les protéines majeures du cristallin, les cristallines (Stevens, V.J et Coll 1978) (Lee, J.H et Coll 1984).

L'incubation de cristalline en présence de glucose (ou de galactose) conduit à une agrégation et à une précipitation de celle-ci. Les polymères de haut poids moléculaire formés sont très semblables à ceux isolés du cristallin de sujets atteints de cataracte diabétique. Cette polymérisation peut en partie s'expliquer par une augmentation de la susceptibilité à l'oxydation des groupements thiols induite par la glycosylation aboutissant à la formation de ponts disulfures entre les monomères de cristalline. Elle est en effet partiellement réversible en présence d'agents réducteurs exogènes ou endogènes. La partie des polymères non réductible ainsi que les pigments brun jaune formés dans la cataracte diabétique pourraient traduire des réarrangements ultérieurs des sucres fixés, comme dans le brunissement du lait. La cataracte observée dans la galactosémie congénitale résulte probablement d'un mécanisme identique.

#### 2.4.4. MEMBRANES BASALES :

La microangiopathie diabétique atteignant préférentiellement la rétine et le rein, se traduit au départ par une augmentation de la perméabilité capillaire. Ultérieurement, la sévérité de l'atteinte rénale est en corrélation avec un épaississement de la membrane basale, conduisant à une occlusion capillaire progressive. Des protéines plasmatiques (albumine, fibrine) s'accumulent au niveau des membranes basales et contribuent à leur épaississement. La glycosylation non enzymatique en augmentant leur résistance à la dégradation protéolytique, pourrait accroître cette accumulation. La présence des sucres liés de façon non enzymatique a été démontrée sur les protéines des membranes basales de glomérule de rats diabétiques (Cohen, M.P et Coll 1980). Ces sucres peuvent être liés au collagène des membrane basale et/ou à des protéines plasmatiques qui s'y sont accumulées. L'épaississement de la membranes basales a été rapporté chez des animaux non diabétiques induit par la perfusion de protéines plasmatiques glycosylées (Cohen, M.P et Coll 1980) (Brownlee et Coll 1981) (Trueb, B et Coll 1984).

#### 2.4.5. PROTEINES BASIQUES DE LA MYELINE :

Les premières anomalies observées au cours de la neuropathie diabétique sont des altérations de la membrane internodale de myéline. L'existence d'une glycosylation non enzymatique des protéines basiques de la myéline a été rapportée (Brownlee, M. 1981) Sa participation à la pathogenie de la neuropathie diabétique n'a pas été établie.



## 2.5. LES PROTEINES DE LA COAGULATION :

Des anomalies de l'hémostase et de la coagulation ont été décrites chez les sujets diabétiques et pourraient participer à l'apparition de la microangiopathie obstructive (Brownlee, M et Coll 1981). De nombreux travaux ont été consacrés aux anomalies de la fonction plaquettaire dans le diabète. La démonstration d'une diminution de la durée de vie du fibrinogène est en faveur d'un état d'hypercoagulabilité. Cette anomalie est rapidement corrigée par le retour de la glycémie à la normale (Jones R.I et Coll 1979).

Il a été démontré que la glycosylation in vitro du fibrinogène réduisait sa susceptibilité à la dégradation par la plasmine (Brownlee M-1983). Cependant, l'héparine normalise la durée de vie du fibrinogène chez les sujets hyperglycémiques suggérant fortement la participation de la thrombine, des facteurs XI, X, IX et de l'antithrombine III.

Les protéines plasmatiques impliquées dans les mécanismes de la coagulation subissent le phénomène général de la glycosylation non enzymatique, facteur potentiel d'altérations fonctionnelles. Dans le diabète, l'augmentation de la fraction glycolysée de ces protéines pourrait être impliquée dans les anomalies de la coagulation observée chez les sujets atteints.

L'antithrombine III a été choisie comme modèle d'étude du fait de son rôle important dans la régulation des mécanismes de la coagulation et des conséquences connues de son déficit.

Le blocage des groupements  $\epsilon$  aminés des lysines de l'AT III par des sucres, pourrait entraîner un retentissement fonctionnel important, puisque des lysines sont impliquées dans le site de reconnaissance de l'héparine. Une telle éventualité pourrait rendre compte de l'absence de parallélisme entre dosage biologique et dosage immunologique de l'antithrombine III telle qu'elle a été rapportée chez les sujets diabétiques (Gandolfo G.M et Coll 1980).

## 2.6. L'ANTITHROMBINE III :

### 2.6.1. HISTORIQUE :

L'existence d'une activité inhibitrice de la thrombine a été soupçonnée, et attribuée à une protéine appelée l'antithrombine, déjà en 1913 par Weymouth. Au moyen d'une analyse plus fine Fell et Coll (1954) ont décrit six protéines différentes possédant cette activité antithrombinique. Des travaux ultérieurs ont montré qu'en fait seulement deux protéases avaient une activité antithrombinique et que ces deux protéines étaient dues à une microhétérogénéité d'une seule protéine : l'antithrombine III. Ainsi il a été établi que l'antithrombine III était le principal inhibiteur de la thrombine (Heimburger 1967; Abildgaard 1968, Rosenberg et Damus 1973; Miller-Anderson et Coll 1974).

Dés lors et vu son pouvoir inhibiteur sur d'autres protéases de la coagulation (XIIa, XIa, Xa, IXa) l'antithrombine III est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation.



### 2.6.2. STRUCTURE DE L'ANTITHROMBINE III :

L'isolement de l'antithrombine III a été réalisé par des techniques classiques de purification des protéines telles que l'électrophorèse, la filtration moléculaire (Heimburger 1967 et Abildgaard 1968) et plus récemment par chromatographie d'affinité sur heparine agarose (Miller Anderson et Coll 1974).

L'antithrombine III humaine, synthétisée dans l'hépatocyte est une glycoprotéine (Kurachi et Coll 1976) d'une seule chaîne polypeptidique de masse moléculaire 64000 (Abildgaard 1967). Elle est composée de 432 acides aminés dont la séquence a été entièrement déterminée non seulement au niveau protéique (Peterson et Coll 1979) et également par la séquence nucléotidique de son cDNA (Prochownick 1983). Elle comporte 3 ponts disulfures et 4 chaînes oligosaccharidiques résultant de la glycosylation enzymatique de la protéine et représentant 10% de la protéine (Danishefsky et Coll 1978; Franzen, L.E et Coll 1980) sa demi-vie, est de 2,8 jours chez le sujet normal.

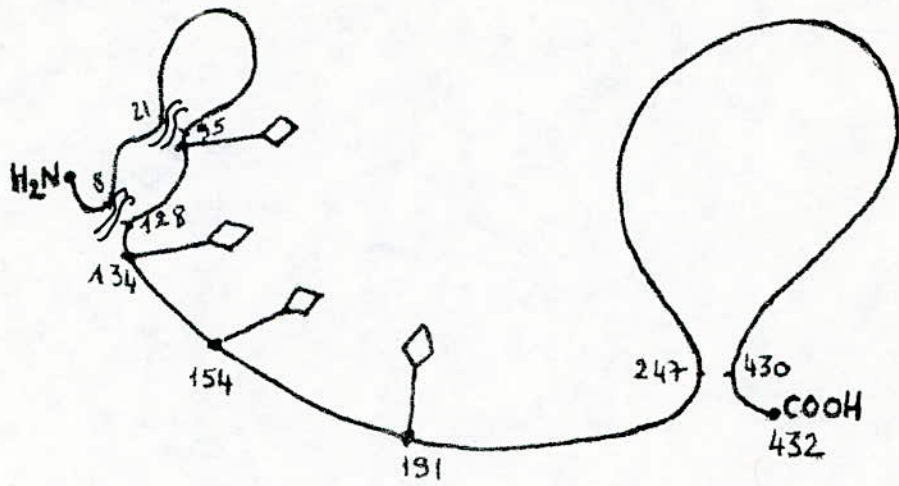
### 2.6.3. ROLE DE L'ANTITHROMBINE III :

Elle agit essentiellement sur la thrombine (Abildgaard 1968) qu'elle neutralise progressivement et la vitesse de la réaction est accélérée par l'héparine (Damus, P.S et Coll 1973; Bjork, I et Coll 1982). Elle représente 90% du pouvoir d'inhibition de la coagulation dans le plasma (Bick, R.L 1982). Elle inhibe également la majorité des autres enzymes de la coagulation Xa (Biggs et Coll 1970), IXa (Rosenberg J.S 1975), XIa (Kurachi et Coll 1976), XIIa (Stead et Coll 1976) et Kallikreine (Burrouves et Coll 1975) et d'autres enzymes comme la plasmine et la trypsine (Abildgaard 1968). La vitesse d'inhibition est variable selon l'enzyme concerné : La thrombine et le facteur Xa sont inactivés rapidement avec respectivement une demi vie de 37 et 90 secondes (Odegard et Coll 1977) alors que les facteurs IXa, XIa et XIIa sont inactivés très lentement avec des demi vies de l'ordre de 10 à 25 minutes (Osterud et Coll 1976 Rosenberg et Coll 1975, Stead et Coll 1976).

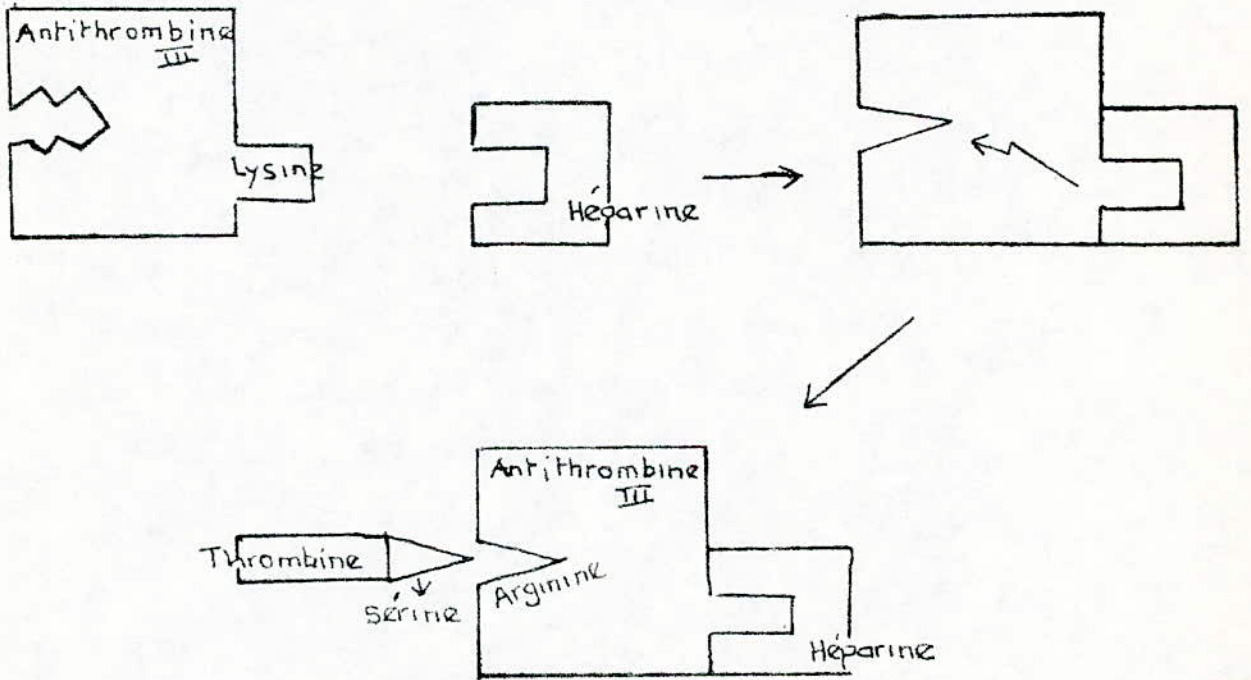
### 2.6.4. MECANISME D'ACTION :

Le mécanisme d'action de l'inhibition des sérines protéases de la coagulation par l'antithrombine III est le même quelle que soit l'enzyme concerné. L'antithrombine III forme avec la thrombine un complexe protéine-protéine qui résulte de l'interaction entre un site réactif de l'antithrombine III situé dans la région carboxyle terminale au niveau Arg 393 et ser 394 et le centre actif sérine de la thrombine (Rosenberg et Damus 1973). Vu la grande stabilité de cette interaction le site actif de la thrombine n'est plus disponible pour exercer son activité protéasique d'où inhibition de la thrombine (Owen W.G 1975 et Longas M.O et Coll 1980).





Molécule d'antithrombine III.



Mécanisme d'action de l'héparine sur l'antithrombine III.

La formation du complexe est lente et progressive, sa vitesse augmente en présence d'héparine (1000 fois) (Rosenberg et Danus 1973)(Griffith, M.J. 1982). L'héparine se fixe sur l'antithrombine III essentiellement par des interactions ioniques. Les charges négatives des groupements carboxyliques et sulfoniques de l'héparine interagissent avec les groupements lysyl et arginyl (situés dans la boucle amino terminale) de l'antithrombine III.

L'accélération de l'interaction thrombine-antithrombine III en présence d'héparine est attribuée à un changement de conformation de l'antithrombine III induite par l'héparine qui rendrait les zones d'interaction plus accessibles. (Machovich, R. et Coll 1975). Malgré sa grande stabilité, le complexe thrombine-antithrombine III peut néanmoins se dissocier. Il libère alors l'enzyme (thrombine) sous forme active et l'antithrombine III sous forme modifiée de même taille que l'antithrombine III native mais composée de deux chaînes polypeptidiques unies par un pont disulfure. Sa production est due à la scission par l'enzyme (thrombine ou autres) de la liaison Arg 393 et ser 394 de l'AT III.

L'AT III a perdu sa capacité d'inhiber la thrombine et possède une affinité pour l'héparine plus faible que l'AT III intacte (Fish, W.W et Coll 1979; Danielson, A et Coll 1983; Bjork et Coll 1982; Griffith, M.J. et Coll 1981).

## 2.7. GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE DE L'ADN :

Une glycosylation non enzymatique de l'ADN pourrait se concevoir s'il y avait accessibilité du glucose aux groupements aminés des bases; or une telle éventualité ne peut à priori se concevoir du fait de l'organisation de l'ADN en double hélice et de l'interaction ADN-protéines. Mais nous savons que, dans une cellule différenciée, certains gènes précis s'expriment et ont une structure chromatiniennne dite ouverte, donc accessible à diverses nucléases simples brins spécifiques. Il est tentant, dès lors de penser que ces régions, sensibles à la nucléase permettraient une glycosylation non enzymatique de leur groupement NH<sub>2</sub>. L'étude concernant l'accessibilité des nucléases a montré l'existence de régions localisées, fonctionnelles, ouvertes où les deux brins sont dépariés à cause des torsions tensionnelles dues à l'interaction ADN-protéines. Cet état entraîne une spécialisation fonctionnelle de la cellule au cours de la différenciation. Ainsi les gènes de globine sont plus accessibles à la nucléase dans les érythroblastes que dans les lymphocytes. Par ailleurs plusieurs exemples sont cités dans une revue récente (Harold Weintraub 1979) Donc a priori il est paradoxal de noter qu'une glycosylation non enzymatique ne puisse se produire que dans les régions fonctionnelles .

Nous savons par ailleurs qu'au cours du diabète les processus du vieillissement moléculaire et cellulaire sont exacerbés. Alors pour certains, le vieillissement est causé par les modifications post traductionnelles des protéines pour d'autres il est dû à une "erreur catastrophe", avec diminution des fonctions de la cellule qui s'ajoute à une accumulation progressive de matériel génétique lésé.



Il est cependant probable que des modifications de l'ADN se produisent également. C'est ainsi que Bucala R et Coll (1984) ont étudié la glycosylation non enzymatique de l'ADN simple brin d'un virus (phage F1). Vu la complexité structurale et fonctionnelle de l'ADN du génome humain, ces auteurs démontrent clairement que les groupements aminés des bases peuvent être glycosylés in vitro et que cette glycosylation est suivie d'une linéarisation. De plus ils notent une diminution de l'activité biologique du phage (mesurée par l'efficacité de la transfection) bien avant la linéarisation et que cette diminution est proportionnelle au nombre des molécules de sucres fixés et également pour une concentration donnée de sucre, à la durée de contact. Cependant ces résultats doivent être accueillis avec prudence vu les différences entre l'ADN du génome humain et l'ADN simple brin des virus.

La littérature nous montre l'existence d'un épisode bactérien avec replication autonome, le plasmide PBR 322 et dont le DNA est à double brin dans une structure voisine de celle de la chromatine et possédant des régions sensibles à l'action des nucléases. Intégrées à un génome d'eucaryote ces régions fonctionnelles continuent à être transcrites (H. Weintraub 1983). L'activité de ce plasmide est facile à déterminer du fait de sa sensibilité aux antibiotiques ou par la transformation d'une bactérie hôte. Vu son organisation génomique proche de celle du ADN humain, il constitue donc un modèle d'étude plus approprié que celui de Bucala et Coll. Nous avons préféré pour cela étudier la glycosylation non enzymatique de l'ADN du PBR 322 pour pouvoir éventuellement le rapporter au génome humain.

## 2.8. BUT DU TRAVAIL :

Le but de notre travail est d'étudier la glycosylation non enzymatique des protéines impliquées dans le phénomène de la coagulation. Ce travail s'intègre dans le cadre général de l'étude des modifications post traductionnelles des protéines abordée dans notre laboratoire tant sur le plan fondamental pour approfondir nos connaissances sur le vieillissement moléculaire et cellulaire que sur le plan appliqué en particulier dans le diabète. Au cours de cette maladie, on note en effet une accélération du vieillissement moléculaire et cellulaire.

L'antithrombine III a été choisie comme modèle d'étude du fait de son rôle important dans la régulation des mécanismes de la coagulation intravasculaire et des conséquences connues de son déficit. Le blocage des groupements  $\epsilon$ NH<sub>2</sub> des lysines de l'AT III par des sucres pourrait entraîner d'une manière progressive et cumulative un retentissement fonctionnel important puisque des lysines sont impliquées dans les interactions avec la thrombine d'une part et l'héparine d'autre part.

Par ailleurs, il nous a paru important d'étudier la glycosylation non enzymatique au niveau de l'ADN.

Des études antérieures ayant portées sur de l'ADN simple brin, nous avons choisi d'étudier les modifications de l'ADN double brin qui est plus en rapport avec la situation physiologique.

MATERIELS ET METHODES  
\*\*\*\*\*



## 1. MATERIEL :

### 1.1. PLASMA :

Le sang est prélevé sur des sujets normaux et diabétiques provenant de l'hôpital Bichat (Paris).

### 1.2. PRODUITS CHIMIQUES :

- Sigma. chemical company (St Louis USA)  
STI, glucose, glucose 6P, galactose, fructose 6P, 2 deoxyglucose, 2 deoxyglucose 6P, 2 deoxyglucose, galactose 6P, fructose 1,6 DP, PEG6000, Spermine.

- LKB (Bromma Suède)  
Acrylamide, N,N' méthylène Bis acrylamide, PAGE PLATE (4-6,5)  
bleu de coomassie R 250, bleu de coomassie G 250, agarose L

- IBF (Villeneuve la Garenne France)  
Héparine ultragel A4R

- Diagnostica stago (Asnières France)  
Kit stachrom AT III.

- PIERCE  
Coffrets glycogel B phenyl bonorate agarose.

- Behring Werke (Marburg W. Germany)  
Antisérum anti antithrombine III.

- Laboratoire Kabi Diagnostica (Stockholm, Suède)  
Substrat synthétique S 2238.

- Boehringer Mannheim Biochemica  
Plasme PBR 322

- Spectrum médical industries (Los Angeles USA)  
Tubes de dialyse spectrapor.

La thrombine humaine nous a été aimablement fournie par B Leboniec dans notre laboratoire de biochimie B Hôpital Bichat Paris.

## 2. METHODES :

### 2.1. PURIFICATION DE L'ANTITHROMBINE III :

Le sang total de sujets normaux est prélevé sur le citrate de sodium (0,13M). Après centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 15 minutes et à 4°C, le plasma est récupéré et un inhibiteur des proteases (soya bean trypsin inhibitor ou STI) est ajouté à une concentration finale de 0,1 mg/ml.

La purification comporte plusieurs étapes :

#### 2.1.1. ABSORPTION SUR SEL DE BARIUM :

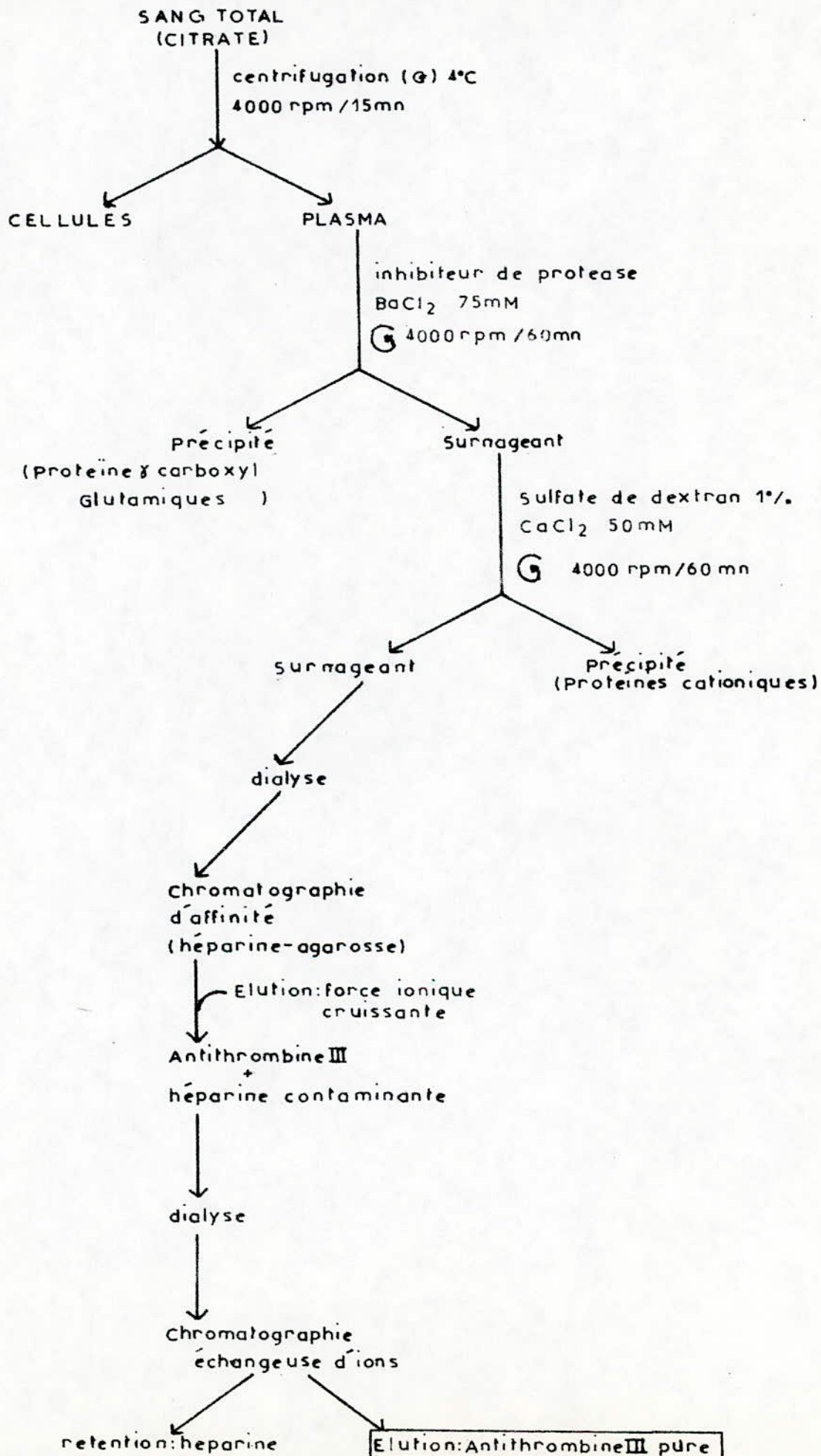
Cette étape permet d'éliminer les protéines plasmatiques qui contiennent de l'acide  $\gamma$  carboxyglutamique, représentées principalement par les protéines vitamines K dépendantes, faisant partie des protéines de la coagulation. C'est ainsi que le plasma est ajouté doucement pendant 30 minutes, à 75 mM de concentration finale. Ensuite la suspension est centrifugée 60 minutes à 4000 tours/minutes à 4°C (centrifugeuse type Jouan K 110 N).

#### 2.1.2. PRECIPITATION PAR LE SULFATE DE DEXTRAN :

Après élimination des protéines précipitées par le chlorure de barium, le surnageant est traité par le sulfate de dextran et le chlorure de calcium respectivement à une concentration finale 1% et 50mM. Ce mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes et ensuite centrifugé à 4000 tours/minutes pendant une heure à 4°C. Dans cette étape, la majeure partie des protéines cationiques est précipitée et le surnageant est ainsi enrichi en antithrombine III.



### PURIFICATION DE L'ANTITHROMBINE III



2.1.3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE  
SUR HEPARINE AGAROSE :

Le surnageant enrichi en antithrombine III est dialysé contre le tampon initial de la chromatographie (tris 0,05M, citrate trisodique 0,01M, NaCl 0,15 M PH 7,5) ensuite chromatographié sur une colonne d'héparine agarose A4R (1,5X15 cm) (Miller Anderson et Coll 1974). Dans ces conditions initiales seules les protéines ayant une affinité pour l'héparine sont fixées, on applique ensuite, un gradient linéaire de force ionique (0,15M - 1,7 M NaCl, débit 25 ml/heure). Après analyse fonctionnelle de l'antithrombine III purifiée par cette étape une chromatographie d'échange d'ions a été effectuée pour éliminer l'héparine contaminante relarguée par la colonne d'affinité.

2.1.4. CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS :

La fraction d'antithrombine III provenant de la chromatographie d'affinité est dialysée contre un tampon tris 0,02M, NaCl 0,15M PH 7,5, concentrée par le système amicon KM2 et ensuite chromatographiée sur une colonne de DEAE séphadex A50 équilibrée avec le meme tampon. Dans ces conditions isocratiques l'héparine est retenue et l'antithrombine III est éluée. Les chromatographies sont réalisées à 4°C. L'absorption à 280 nm des éluats de colonne, est suivie à l'aide d'un détecteur Gilson. La quantité d'antithrombine III est déterminée en utilisant un coefficient d'extinction molaire  $\sum_{280}^{1\%} = 6,1$  (Miller Anderson et Coll 1974).

2.2. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES :

2.2.1. ELECTROPHORESE SUR GEL  
DE POLYACRYLAMIDE EN SDS :

La pureté de l'antithrombine III et la cinétique de formation du complexe antithrombine III- thrombine ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel de résolution d'acrylamide (T=15%, C=3,3%) en présence de 0,4% de SDS dans un tampon tris 0,375M PH 8,6 (technique de Laemmli 1970). Le gel dit de concentration (2,5 cm de hauteur) est un gel d'acrylamide dont le T=3% et C=3,3% .



L'échantillon à analyser est repris dans un tampon tris 0,625M PH 6,8 contenant du SDS à 1%, du glycérol à 30% et du bleu de bromophénol à 0,005%, il est ensuite porté à 95°C pendant 5 minutes dans un bain marie et déposé sur le gel dans un appareil à électrophorèse vertical conçu au laboratoire. La migration est réalisée dans un tampon tris 0,025M PH 8,3 contenant de la glycine 0,19M et du SDS à 0,1% PH 8,3.

Les électrophorèses sont conduites sous une intensité de 10 ma, et une tension de 20 volts pendant 14 heures. Le front de migration est repéré grâce au bleu de bromophénol. Les gels sont ensuite colorés par une solution de bleu de coomassie R 250 à 2,5%, du méthanol à 40% et de l'acide acétique à 10% et décolorés dans cette même solution en absence de colorant.

### 2.2.2. FOCALISATION ISOELECTRIQUE :

Elle est réalisée sur gel de polyacrylamide LKB (T=5%, C=3%) avec un gradient de PH compris entre 4 et 6,5 (LKB 1804 E03) et une concentration d'ampholines 2,2% W/V. Les électrolytes sont la β-alanine 0,1M pour la cathode et l'acide glutamique 0,1M dans l'acide phosphorique 0,5M pour l'anode.

L'IEF est réalisée sous une tension de 2000 volts maximum et une puissance constante de 25 Watts, la température étant maintenue à 10°C à l'aide d'un cryostat LKB (modèle 2209). Une préfocalisation de 30 minutes est nécessaire pour établir le gradient des PH les échantillons (25 à 30 ug) sont ensuite déposés sur le gel, après 2 heures de migration le gel est plongé dans une solution de bleu de coomassie G 250 "Fast stain" (Blakesley et BOEZI, 1977) pendant une nuit. La coloration s'intensifie en immergeant le gel dans l'eau; le gel est ensuite transféré dans une solution de préservation (30% ethanol, 10% glycérol, 10% acide acétique).

### 2.2.3. IMMUNOELECTROPHORESE SELON

LAURELL (1966) (ROCKET  
IMMUNOELECTROPHORESE) :

L'immunoélectrophorèse est faite sur des plaques de verre (18,5x8 cm) sur lesquelles on coule de l'agarose (L) à une concentration finale de 1,36% dans un tampon veronal 0,03M PH 8,5 contenant des anticorps anti antithrombine III à 4% vol/vol de titre 0,38g/l (clotinum antitrombine III Behring Werke).

L'épaisseur du gel est de 1,5mm les anticorps sont ajoutés avant de couler le gel dès que la température de l'agarose atteint 56°C. Après refroidissement de la plaque, des puits de 3,5 mm de diamètre sont creusés permettant le dépôt de 5 µl de plasma la migration est faite à 10°C pendant 4 heures 30 minutes sous une tension de 5 volts/cm et une intensité de 20 mA, dans un appareil à électrophorèse horizontale LKB, modèle 2117.

Les plaques sont ensuite lavées par du NaCl 0,15M pendant 48 heures puis mises dans l'eau distillée pendant 2 heures. Après séchage de la plaque, on pratique une coloration par du bleu de coomassie R 250 à 2,5% dans un mélange méthanol, acide acétique et eau (5/1/4 volume/volume).

La décoloration est réalisée avec le même mélange en absence de bleu de coomassie.



2.2.4. IMMUNOELECTROPHORESE  
BIDIMENSIONNELLE SELON  
LAURELL (CROSSED  
IMMUNOELECTROPHORESE):

On pratique dans un premier temps une focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide LKB (1804 102) avec un gradient de pH compris entre 4 et 6,5 selon les instructions du fournisseur LKB (1804 Eo3). Les échantillons sont déposés sur le gel; après 2 heures 30 minutes de migration, sous une tension de 2000 volts, une puissance constante de 25 watts, la bande de migration est découpée et déposée sur un gel d'agarose.

Dans un deuxième temps, on pratique une électrophorèse sur gel d'agarose; un volume d'agarose à 1% dans un tampon véronal à 0,05M pH 8,6 est chauffé à 30°C dans un bain marie; on laisse refroidir le gel jusqu'à 56°C et on y ajoute l'antisérum antithrombine III à 3% (clotinum antithrombine III). Le gel est ensuite coulé sur le côté hydrophile d'une feuille en plastique (8X10cm) type LKB (1850-101).

La bande de migration obtenue par focalisation isoélectrique est découpée puis déposée sur le gel d'agarose du côté cathodique, placé dans un appareil à électrophorèse horizontale LKB, modèle 2117. La migration dure 4 heures à 4°C sous une tension de 5 volts/cm et une intensité de 20 mA.

Le gel d'agarose est ensuite lavé pendant 24 heures avec NaCl 0,15M et mis dans l'eau pendant 2 heures, après séchage il est coloré avec du bleu de coomassie R 250 à 2,5 % dans 40% éthanol, 10% acide acétique puis décoloré dans la même solution en absence de colorant.

2.2.5. IMMUNODIFFUSION RADIALE :

Nous avons utilisé les plaques Nor-Partigen antithrombine III (Behring institut Marburg W Germany).

Ces plaques contiennent une couche de gel agar et l'antisérum spécifique de l'antithrombine III.

5  $\mu$ l de plasma sont déposés par puits. On laisse diffuser à la température ambiante pendant 18 heures; on mesure ensuite le diamètre des anneaux de précipitation autour des puits : la concentration en antithrombine III est proportionnelle au carré du diamètre des anneaux de précipitation.

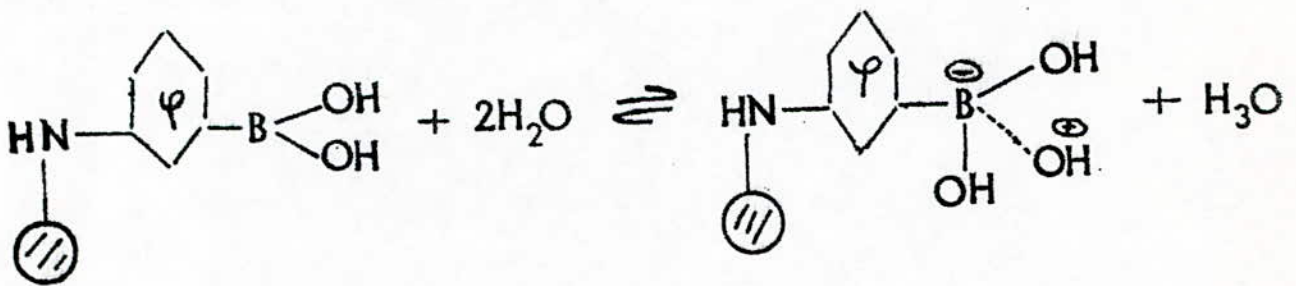


2.3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE  
SUR PHENYL BORONATE :

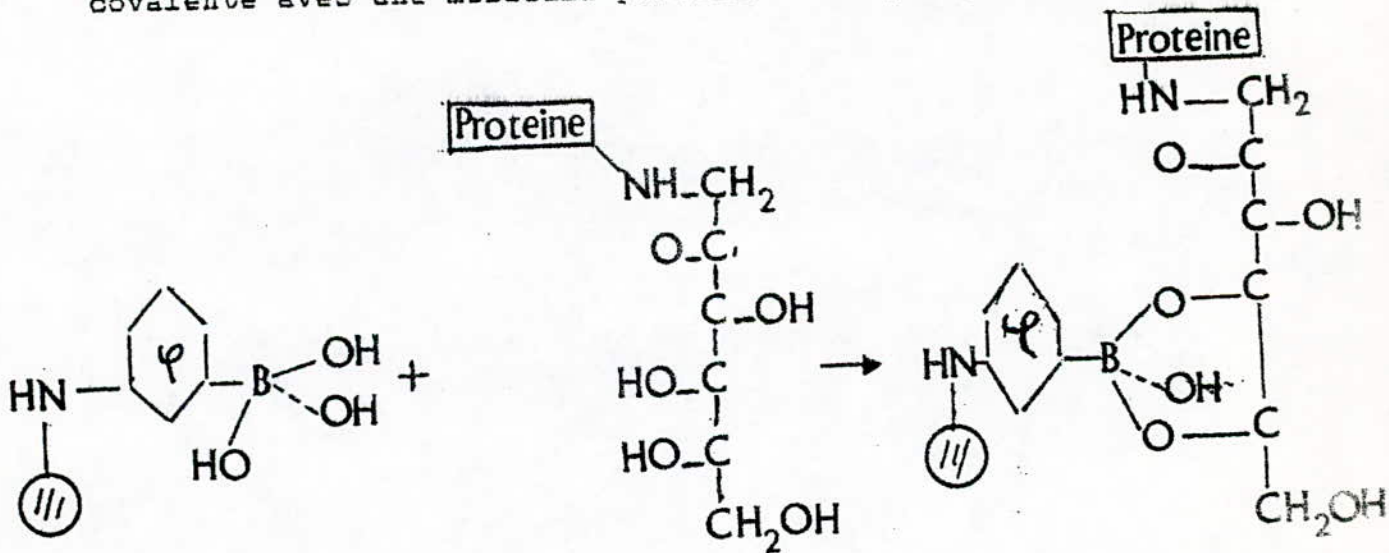
La chromatographie d'affinité sur phényl boronate immobilisée sur agarose retient spécifiquement les groupements cis-diol des protéines glycosylées.

PRINCIPE :

A PH alcalin compris entre 7 et 9 la boronate est tétravalent et adopte une forme tétraédrique trihydroxylée.



Cette forme particulière est capable de former une liaison covalente avec une molécule porteuse d'un groupement cis-diol



Cependant la molécule liée peut être séparée du boronate par un tampon acide ou par compétition avec un autre sucre présentant un groupement cis-diol (exemple le sorbitol).

REALISATION PRATIQUE :

Nous avons utilisé les Kit pièce glyccogel B test Kit. L'acide borique est lié de façon covalente à l'agarose (6%) par l'intermédiaire d'un bras maminophényl. Les colonnes sont équilibrées dans un tampon acétate d'ammonium 0,25M PH 8,5 contenant du chlorure de magnesium 0,02M et de l'azide de sodium 0,02% . Le plasma glycosylé est déposé directement sur la colonne.

Dans un premier temps les protéines non fixées au ligand sont éluées par simple gravité dans le même tampon acétate d'ammonium 0,25M, PH 8,5.

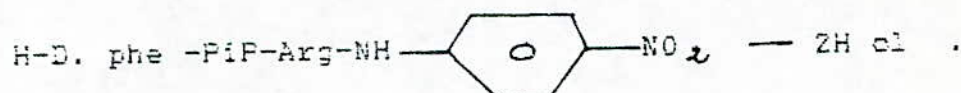
Dans un deuxième temps les protéines liées au phényl bonorate sont éluées par un tampon citraté 0,2M PH 4,65.

Les pourcentage de fractions liées sont déterminées par mesure de la densité optique de l'éluat à 280 nm.

2.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE  
BIOLOGIQUE DE  
L'ANTITHROMBINE III :

L'activité biologique est déterminée par la méthode amidolytique (odegard O.R 1975) utilisant les substrats synthétiques chromogènes.

S 2238 : H.D. phenylalanyl-L- pipe-colyyl L arginine-p-nitroamilide



CBS 3447 : 2AC- OH- HD CHG-But. Arg-p.NA

PRINCIPE :

La méthode amidolytique est utilisée pour doser la thrombine résiduelle dans les expériences d'interaction de la thrombine avec l'antithrombine III.

L'antithrombine III exerce une action antithrombinique immédiate en présence d'héparine. Ainsi l'addition d'une quantité déterminée et en excès de trombine, d'héparine à du plasma ou à une solution d'antithrombine III entraîne la formation immédiate du complexe antithrombine-thrombine. La thrombine résiduelle non inhibée par l'antithrombine III agit sur le substrat synthétique en détachant la para-nitroanilide qui absorbe à 405 nm. (spectrophotomètre type JY 201 Jolin Yvon).



DOSAGE DE L'ACTIVITE EN PRESENCE  
ET EN ABSENCE D'HEPARINE :

Il est effectué selon la technique préconisée par diagnostica stago en utilisant les coffrets stachrom AT III. L'incubation de 40  $\mu$ l de thrombine, 0,28 nkat avec 400  $\mu$ l de plasma dilué au 1/40<sup>e</sup> (équivalent de 3  $\mu$ g d'AT III) est réalisée pendant 2 minutes à 37°C dans 400  $\mu$ l de tampon tris 0,01M PH 8,7, NaCl 0,1M, PEG 6000 à 0,1% contenant 3 U I d'héparine/ml. Après addition de 30  $\mu$ l de substrat synthétique S2238 (à 2 mM), la cinétique de l'activité thrombique est déterminée à 405 nm. En absence d'héparine le même dosage est effectué mais :

- Le plasma est défibriné dans un bain marie à 56°C pendant 1 min et ensuite centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes
- Le tampon ne contient pas d'héparine
- Le temps d'incubation à 37°C est de 20 minutes.

2.5. GLYCOSYLATION IN VITRO  
DE L' AT III :

Les incubations sont réalisées avec un plasma de sujet normal dont une fraction est congelée à 20°C (temoin) et 3 autres incubées pendant 8 jours à 37°C en présence de glucose (50mM, 200mM) et en absence de glucose.

D'autres incubations sont effectuées sur l'antithrombine III est incubé à 37°C dans un tampon EDTA 0,01M PH8 à différents temps 4 heures, 8 heures, 16 heures et 8 jours et à différentes concentrations de glucose (100, 200, 400mM). La gentamycine à 0,01% est ajoutée au milieu d'incubation pour éviter la polifération bactérienne.

2.6. DOSAGE COLORIMETRIQUE DES  
SUCRE LIES NON  
ENZYMATIQUEMENT :

Les sucres liés aux protéines par une liaison cétoamine sont mesurés selon la technique de Keeny et Bassette modifiée (1959): 3ml d'une solution protéique (20 à 40 mg/ml dans de l'eau) sont traités avec 0,5 ml d'acide phosphorique 15M à 100° C pendant 30 minutes dans des tubes en verre fermés.

Les échantillons sont ensuite refroidis dans la glace et les protéines précipitées en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique à 400g/l. 1 ml du surnageant contenant les dérivés 5 hydroxy méthyl furfural des oses hydrolysés, est incubé pendant 4 heures à 40°C en présence de 1 ml d'acide thioarbiturique 0,03M dans l'acide trichloracétique à 200 g/l. L'absorption est mesurée à 442 nm. Une solution d'hydroxyméthyl furfural 60  $\mu$ mole/l est utilisée comme standard.

## 2.7. GLYCOSYLATION IN VITRO

### DE L'ADN :

Une solution contenant 250 ng d'ADN est incubée à 37°C pendant 112 heures en présence de différents sucres (glucose, 2 déoxyglucose, galactose, galactose 6P, glucose 6P, fructose, fructose 6P fructose 1.6 DP à une concentration de 250 mM dans un tampon Hepes 50mM, EDTA 0,5 mM PH9. Toutes les solutions sont stérilisées par passage sur un filtre Millex (millipore).

### TECHNIQUES UTILISEES :

#### ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE :

L'Électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à une concentration 1% dans le tampon tris 40mM acétate de sodium 25mM, EDTA 0,2mM PH 8,3 sous une tension constante 15 volts. Les échantillons d'ADN sont déposés sur gel avec 1/20 du volume de colorant (bleu de bromophénol 0,25%) Après migration, l'ADN est révélé en plongeant le gel dans le tampon contenant du bromure d'éthidium à une concentration finale de 1  $\mu$ g/ml. Après rinçage à l'eau distillée les gels sont photographiés sous excitation en lumière ultraviolette.

#### TRANSFERT DU GEL SUR MEMBRANE DE NYLON :

Les différentes formes d'ADN séparées sur le gel d'agarose sont dénaturées dans une solution dite de transfert (NaOH 0,4M, NaClO<sub>2</sub> 0,6M) pendant 30 minutes à température ambiante et à faible agitation. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de nylon (gene screen plus) pendant 16 heures. Les membranes sont lavées dans une solution de neutralisation (tris 0,5M NaCl 1M PH 7,5) puis incubées pendant 30 minutes sous agitation dans la même solution et séchées à la température ambiante pendant 60 minutes.

Le DNA fixé à la membrane est ensuite hybridé à des sondes spécifiques marquées au 32 p puis autoradiographié.



PREHYBRIDATION :

-----  
Cette étape est effectuée pour diminuer la fixation non spécifique de la sonde radioactive.  
La membrane est immergée dans une solution contenant du NaCl 1M, tris 50 mM, SDS 1% PH 7,5 pendant 2 heures à 65°C.

PREPARATION DE LA SONDE (NICK TRANSLATION)

-----  
200 ng de DNA (FER 322) sont incubée en présence d'un tampon contenant les nucléotides A, T, G et C marqué du 32 p à une concentration finale de 50mM (C marqué à une activité spécifique de 800 Ci/mmoles), DNase et DNA polymérisé l'incubation dure 2 heures à 14°C. Pour séparer les nucléotides libres de l'ADN marqué, on pratique une filtration sur une colonne de séphadex G 6100 dans une solution de SSC (0,45M, citrate de sodium 0,045M). L'activité spécifique de l'ADN marqué est de  $7,35 \cdot 10^7$  Cpm/ $\mu$ g.

HYBRIDATION :

-----  
Les membranes de nylon sont mis dans des sacs plastiques scellables, on y ajoute le tampon de préhybridation, la sonde marquée et le ESDNA. Après avoir chassé l'air au maximum, le sac est scellé.  
L'incubation dure 20 heures à 65°C.

1ER. LAVAGE :

-----  
La membrane est retirée du sac et immergée dans 200 ml d'une solution de SSC (NaCl 0,45M; citrate de sodium 0,045M) de Denhardt's (Ficcoll 0,14 mM polyvinylpyrrolidone 0,22 mM, BSA 0,15mM) et de SDS 0,1%

2EME. LAVAGE :

-----  
La membrane est lavée pendant 30 minutes à 65°C dans 600 ml de solution de lavage.

3EME LAVAGE :

-----  
La membrane est lavée dans 2 fois 600ml de la solution de lavage pendant 1 heure chaque fois et à 65°C.

Les 2 derniers lavages de stringence sont effectués dans 250 ml d'une solution de NaCl 15mM, de citrate de sodium, 1,5mM et SDS à 0,1% pendant 15 minutes à 65°C, les membranes sont mises dans des sacs scellés gardées à température ambiante et après 45 minutes elle sont prêtes pour l'autoradiographie.



## AMPLIFICATION DE PLASMIDE PBR 322

---

### PRINCIPE :

---

Le plasmide PBR 322 est amplifié et purifié à partir d'une souche bactérienne C 800 précédemment transformé par ce plasmide. La souche bactérienne est inoculée dans un milieu de culture approprié. Quand cette culture est en phase exponentielle de croissance, on ajoute du chloramphénicol qui bloque la multiplication bactérienne sans arrêter la replication de l'ADN des plasmides. Chaque bactérie contient ainsi plusieurs copies du plasmide initial. Les bactéries sont alors lysées et le plasmide est récupéré après purification de l'ADN bactérien et des débris cellulaires.

### Téchnique:

---

Une colonie bactérienne est inoculée dans 10 ml de milieu de culture L (Difco-tryptone 10 g/l, Difco bacto yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l glucose 1 g/l) avec l'antibiotique adéquat et le milieu est incubé durant la nuit à 37°C. Le lendemain 1 ml de la culture est inoculé dans 200 ml de milieu L, et incubé à 37°C. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la D.O. à 600 nm. Quand celle-ci atteint environ 0,6 unités de D.O., le chloramphénicol est ajouté à une concentration de 170 µg/ml. La culture est laissée à 37°C, sous agitation, durant la nuit. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 6000 rpm, pendant 15 minutes, à 4°C. Elles sont resuspendues dans du tampon TE froid (Tris 10 mM pH 8,0/1 mM EDTA) et culotées par une autre centrifugation. Elles sont resuspendues dans 7 ml de la solution 25% sucrose, Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Successivement sont ajoutées:

- du lysozyme fraîchement préparé (1,2 ml de la 10 mg/ml), 10 minute à 4°C.

- La solution de lyse (11,5 ml de tampon Triton 0,1%/EDTA 62,5 mM/Tris 5 mM pH 8,0).

L'ensemble est laissé 15 minutes dans la glace, sous agitation. L'éclaircissement de la solution est indicateur d'une bonne lyse. Les débris bactériens sont alors centrifugés, à 12.000 rpm, pendant 60 minutes.

- Purification du DNA plasmidique par gradient de chlorure de césium : Après l'avoir amené à un volume de 20 ml, on ajoute au surnageant 0,85 g/ml de CsCl et 500 µg/ml de bromure d'éthidium. La centrifugation est effectuée à 38000 rpm, pendant 48 heures à 15°C, en rotor 60Ti. Après visualisation sous ultra-violet, la bande de DNA correspondant au plasmide est prélevée à l'aide d'une seringue. Le DNA est extrait avec un volume égal d'isobutanol jusqu'à élimination du bromure d'éthidium. La phase aqueuse contenant le DNA plasmidique est dialysée en présence de tampon TE pour éliminer le CsCl.

Le DNA est ensuite extrait au phénol puis au chloroforme, et précipité par l'éthanol froid (2,5 volumes, -20°C) après addition de CH<sub>3</sub>COONa 3M (0,1 volume). Un traitement à la RNase (100 µg/ml) à 37°C pendant 15 minutes et un traitement à la protéinase K (100 µg/ml) en présence du SDS 0,5% à 56°C pendant 30 minutes, sont réalisés. Après extractions au phénol et au chloroforme, l'ADN plasmidique est précipité dans l'éthanol.



R E S U L T A T S  
\*\*\*\*\*

RESULTATS :

1. PURIFICATION DE  
L'ANTITHROMBINE III :

La fraction d'antithrombine III issue de plasma humain citraté est soumise à une chromatographie d'affinité sur héparine agarose (ce plasma subit au préalable une adsorption des protéines plasmatiques contenant de l'acide  $\gamma$  carboxyglutamique et une précipitation des protéines cationiques par le sulfate de dextran ). Une élution à l'équilibre avec le tampon initial de la colonne (tris 0,05 M, NaCl 0,15M citrate trisosidique 0,01M PH 7,5 avec un débit de 25 ml/heure) permet d'éliminer les fractions n'ayant pas d'affinité pour l'héparine. L'antithrombine III est éluee à l'aide d'un gradient continu NaCl de 0,15M à 1,7M (Fig 1). Les protéines contaminantes ayant une faible affinité pour l'héparine sont éluées dans le premier pic (0,375 M NaCl), le deuxième pic (0,9 M NaCl) représentant la fraction d'antithrombine III; cette fraction est homogène en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et elle présente une seule bande de PM 64000 (fig 2 et 3) pour trois quantités d'antithrombine III utilisées (7  $\mu$ g) - (15  $\mu$ g) - (25  $\mu$ g).

L'activité antithrombinique vis à vis de la thrombine est déterminée. Nous n'observons aucune différence d'inhibition de la thrombine en présence ou en absence d'héparine (fig 4) l'élimination de l'héparine contaminant la préparation de l'antithrombine III est nécessaire au moins pour 3 raisons :

- Pouvoir étudier et discriminer le degré d'inhibition de l'activité thrombinique héparine dépendante et héparine indépendante par l'antithrombine III glycosylée.
- Enlever l'effet putatif d'inhibition de glycosylation par l'héparine.
- Eliminer l'effet direct de l'héparine sur la thrombine.

A cet effet nous réalisons une chromatographie sur DEAE séphadex A50 qui permet d'éliminer l'héparine retenu sur la colonne tandis que l'antithrombine III est éluee par le tampon tris 0,02M NaCl 0,15M PH 7,5 le rendement de purification de l'AT III est de 21% . La préparation d'AT III est mise en évidence par l'activité inhibitrice de la thrombine en absence et en présence d'héparine exogène ajoutée 2% d'activité thrombinique résiduelle sont obtenues après 2 minutes d'incubation en présence d'héparine et 30 minutes d'incubation en absence d'héparine. L'inhibition totale de la thrombine par l'antithrombine III héparine dépendante est obtenue après 10 minutes d'incubation (fig 5).



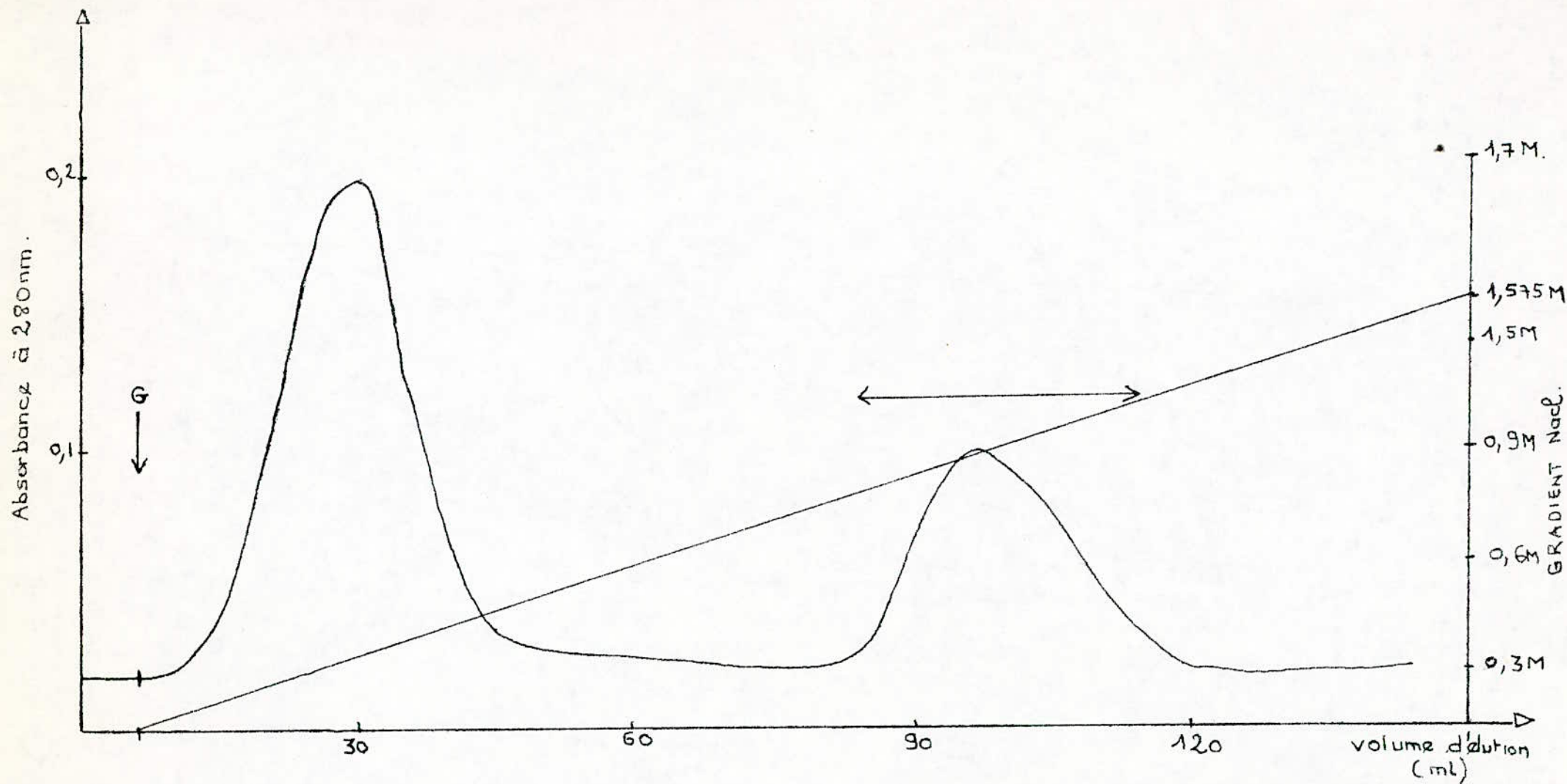


figure 1 / : chromatographie d'affinité sur colonne héparine agarose (1,5 x 15cm)

tampon initial de la colonne tris 0,05M, NaCl 0,15M, citrate tris sodique 0,01M PH 7,5

débit : 25 ml/heure.

G  
↓ : gradient de force ionique 0,15M - 1,7M NaCl.

↔ : antithrombine III.

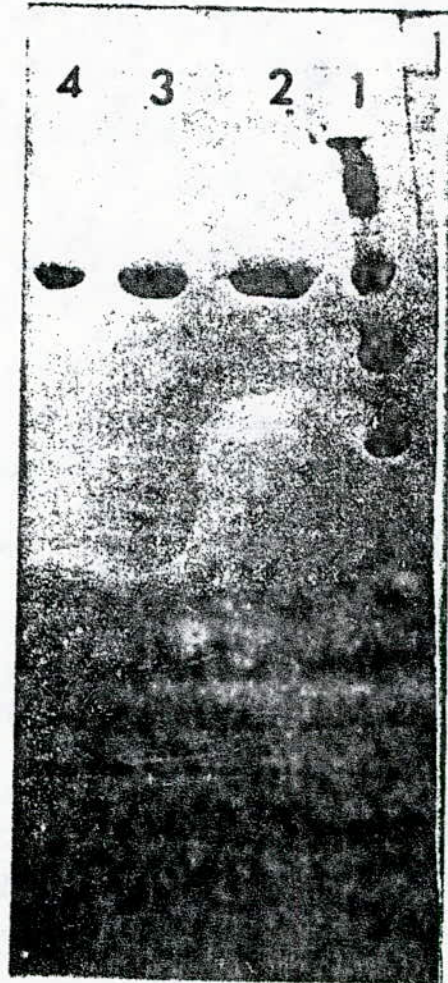


Figure 2 /Electrophorese sur gel de polyacrylamide  
en presence de SDS.

- 1- marqueurs de masse moleculaire
- 2- antithrombine III (25 $\mu$ g)
- 3- antithrombine III (15 $\mu$ g)
- 4- antithrombine III ( 7 $\mu$ g)



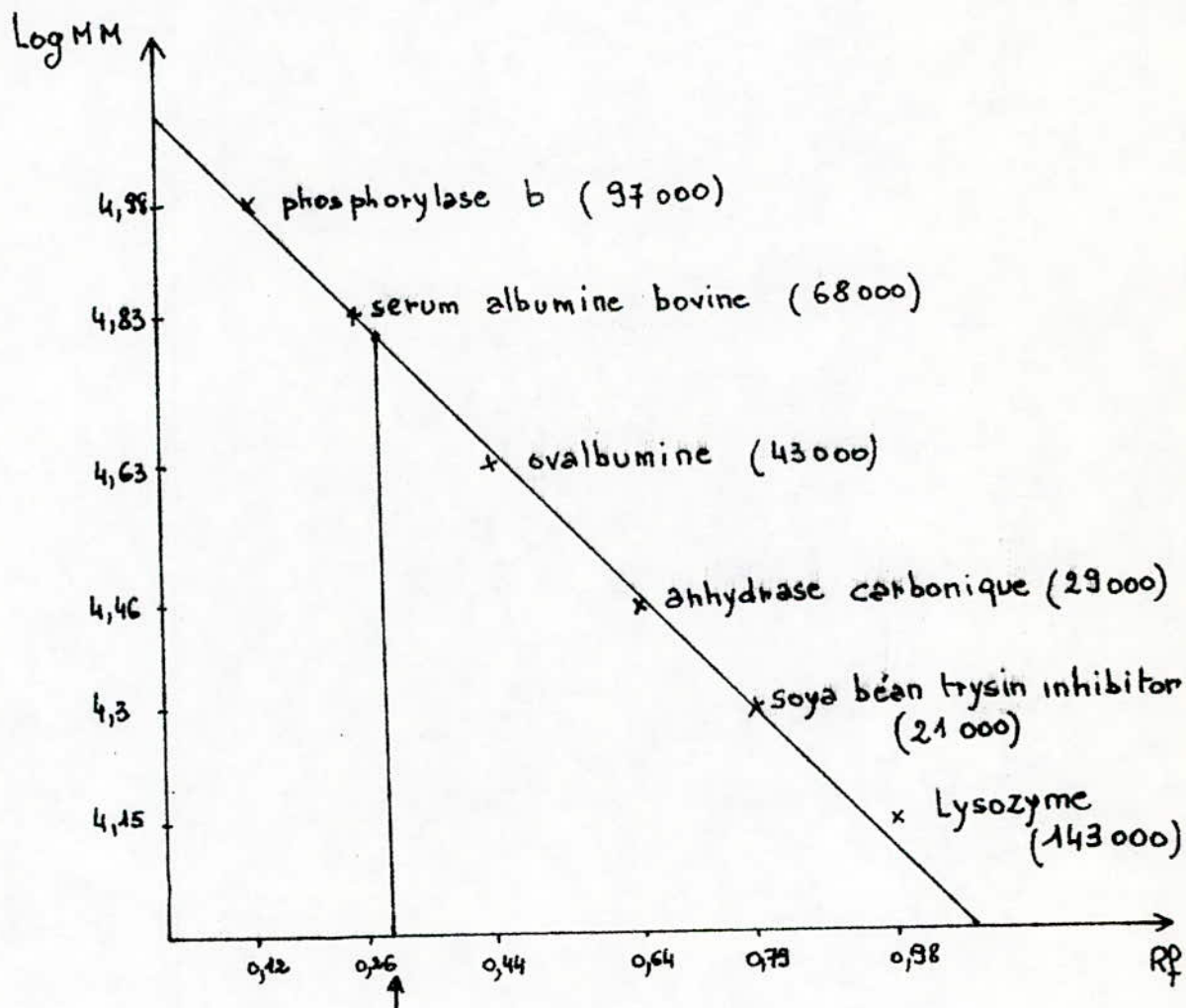


Figure 3/ : détermination de la masse molaire de l'ATIII par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Rf: distance parcourue par la protéine/  
distance parcourue par le bleu de bromophénol.

↑ : migration de l'ATIII.

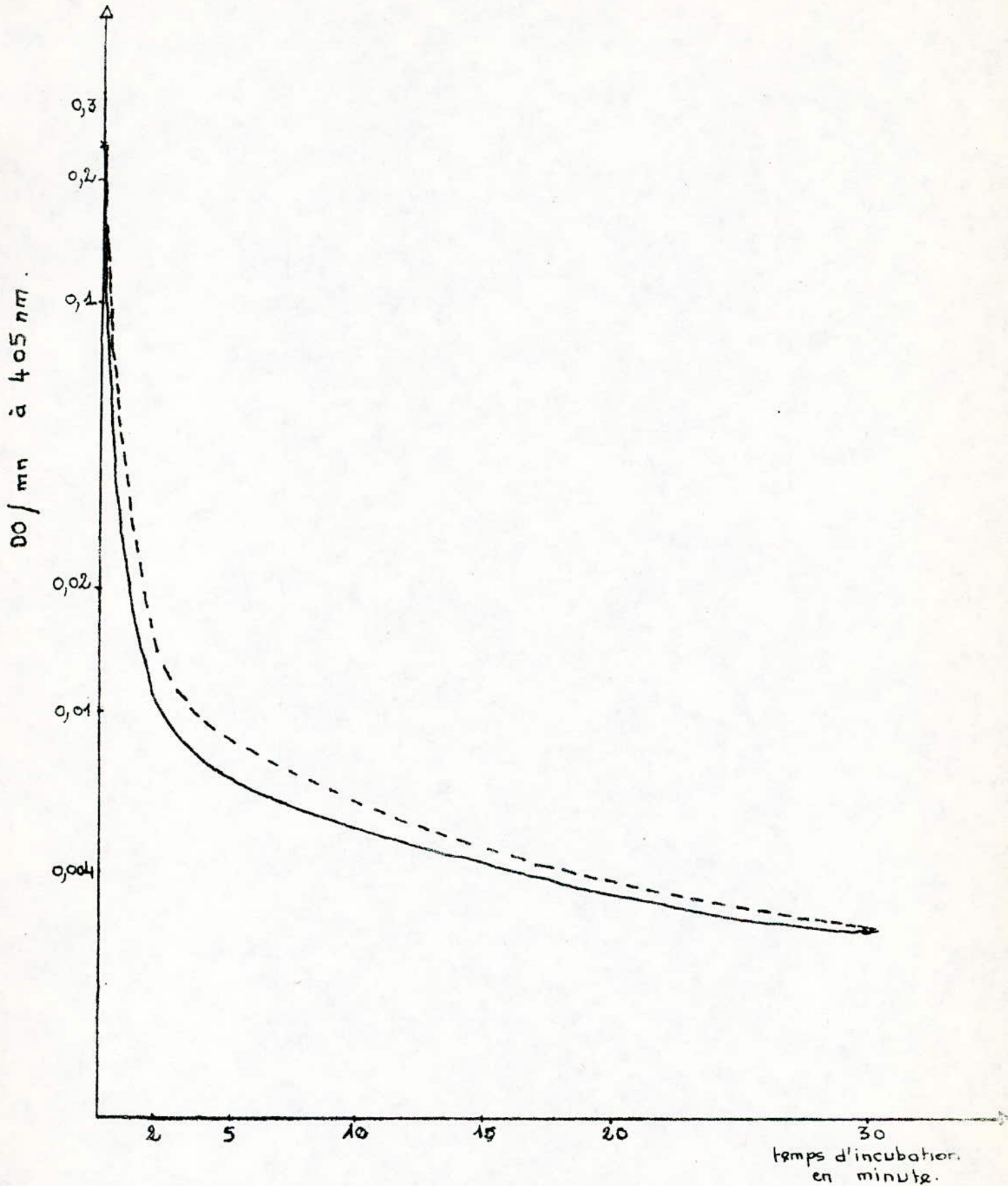


Figure 4/ Action de l'antithrombine III (après purification sur colonne d'heparine agarose) sur la thrombine.

- en présence d'heparine.
- - - en absence d'heparine.



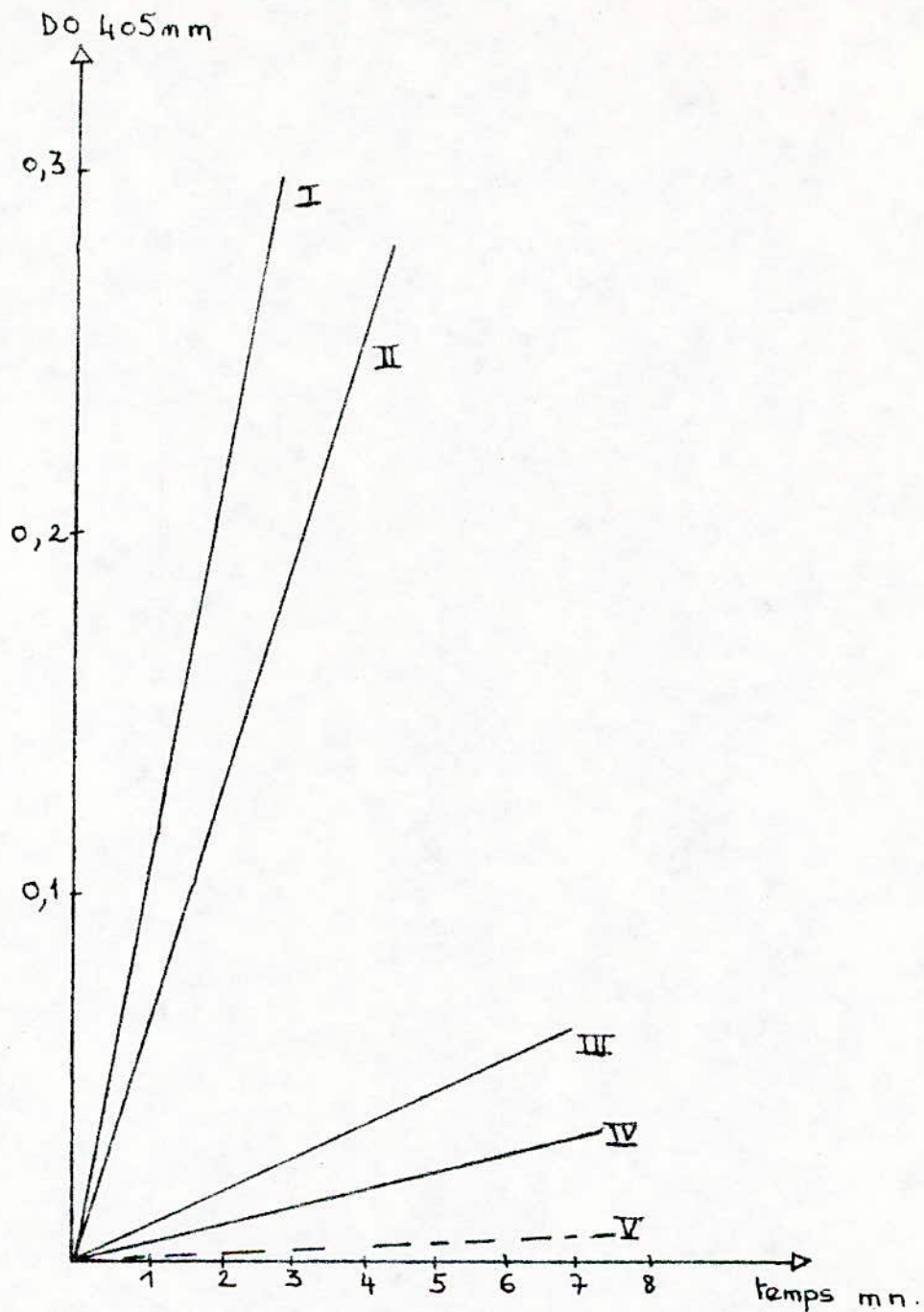


figure 5/ Action de l'antithrombine III sur la thrombine avec substrat synthétique 652238.

- I : Thrombine.
- II : Thrombine + Anti thrombine III (incubation 2 minutes)
- III : Thrombine + Anti thrombine III ( 20 minutes )
- IV : Thrombine + Anti thrombine III + heparine ( 2 minutes)
- V : Thrombine + Anti thrombine III + heparine ( 10 minutes)

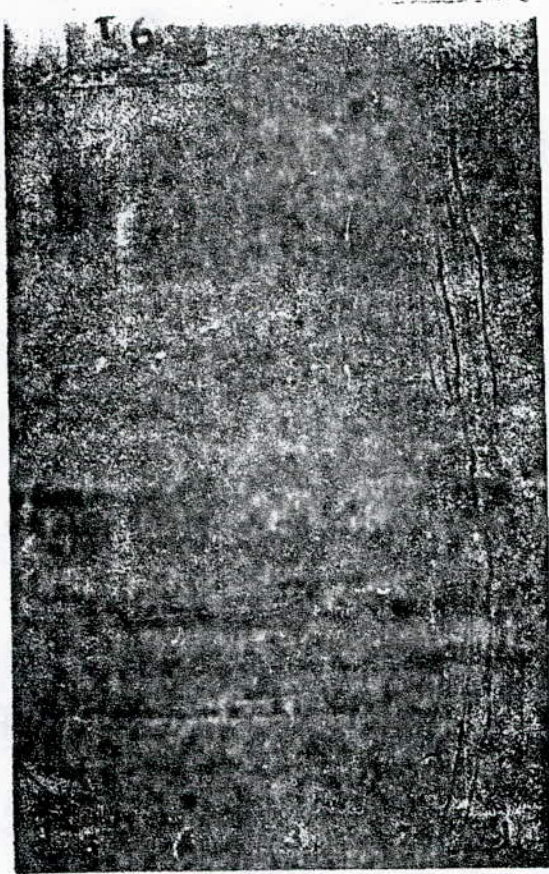


Figure 6 / Electroisofocalisation de l'antithrombine III  
sur gel LKB gradient (4-6,5)

- 1- antithrombine III : 16 $\mu$ g
- 2- antithrombine III : 20 $\mu$ g
- 3- antithrombine III : 25 $\mu$ g
- 4- antithrombine III : 30 $\mu$ g
- 5- antithrombine III : 41 $\mu$ g



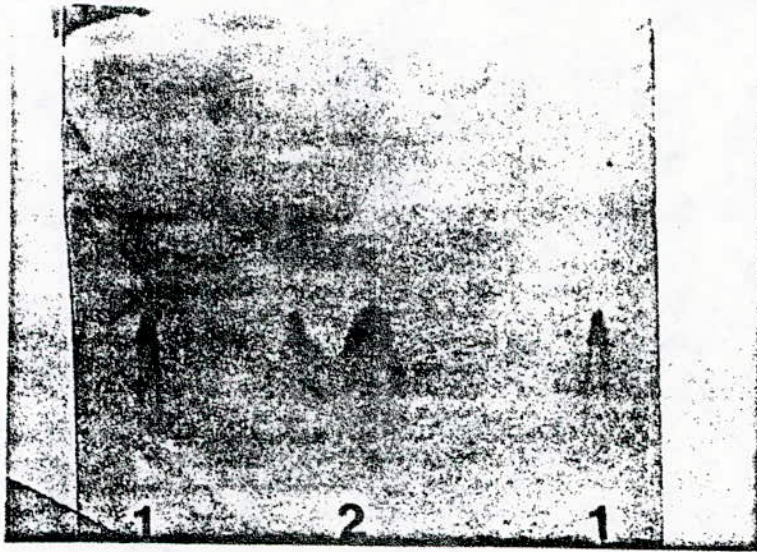
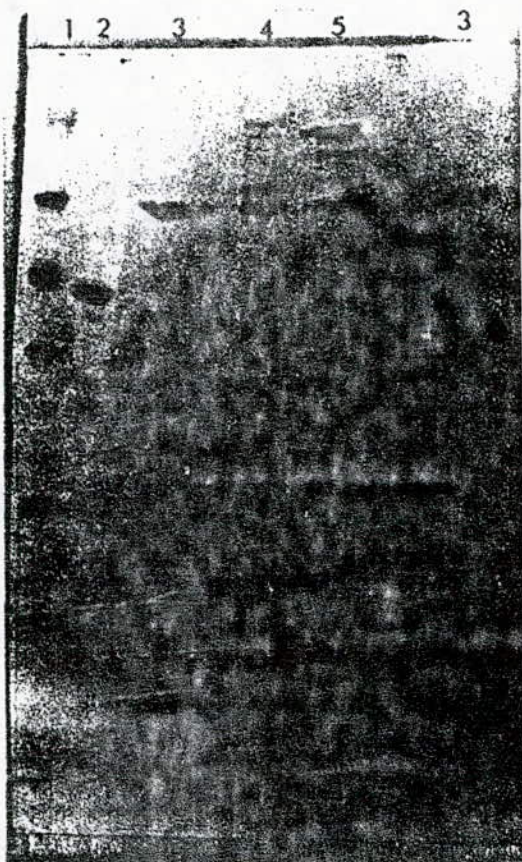


Figure 7 / Immunoelectrophorese de l'antithrombine III

- 1- Rocket immunoelectrophorese (plasma)
- 2-Crossed immunoelectrofocalisation de  
l'AT III purifiee par chromatographie  
d'affinite.



**Figure 8 / Electrophorese sur gel de polyacrylamide  
-----  
en presence de SDS.**

1-marqueurs de masse moleculaire

2-antithrombine III ( 12 $\mu$ g )

3-Thrombine ( 9 $\mu$ g )

4-complexes thrombine-antithrombine III  
incubation 20 minutes a 37°C.

5-complexes thrombines antithrombine III  
incubation 90 minutes a 37°C.



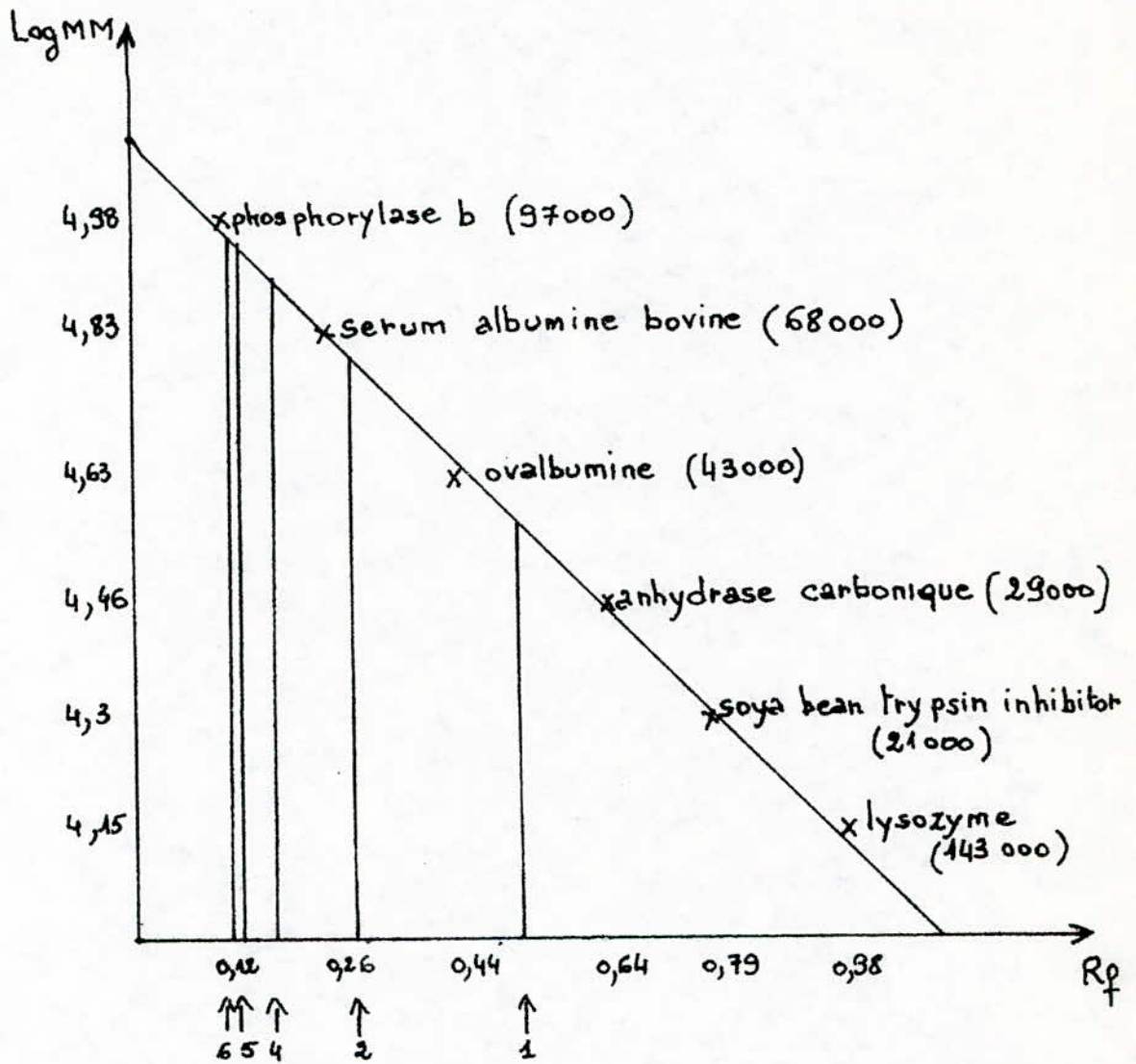


Figure 8'/: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS du complexe Thrombine . AT III.

$R_f$ : distance parcourue par la protéine / distance parcourue par le bleu de bromophénol.

1 : migration de la thrombine

2 : migration de l'AT III.

4-5-6 : complexes thrombine - AT III.

Pour confirmer la pureté et l'homogénéité de l'antithrombine III nous l'avons soumise aux tests électrophorèse, électroisofocalisation, immunoelectrophorèse. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS qui nous révèle une seule bande de PM 64000.

L'antithrombine III étant une glycoprotéine, la technique de séparation suivant la charge peut donner une microhétérogénéité. C'est ainsi que la focalisation isoelectrique sur gel LKB gradient (4-6,5) nous révèle une microhétérogénéité avec 6 bandes de PHi compris entre 4,5 et 5,5 dont 2 bandes majeures de PHi 5,1 et 5,3. (fig 6). Cette microhétérogénéité est confirmée par l'immunoelectrophorèse bidimensionnelle (en présence d'antisérum anti antithrombine III) présentant deux pics majeurs. (fig 7).

Les cinétiques de formation du complexe antithrombine III-thrombine suivies par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS mettent en évidence différentes bandes correspondants probablement au complexe (antithrombine III-thrombine PM 94000) et complexe probablement dégradé (PM 90000 et PM 80000).

## 2. ACTION DES SPERMINES ----- SUR L'ANTITHROMBINE III : -----

Dans le but de séparer l'héparine contaminant l'antithrombine III issue de la chromatographie d'affinité, nous nous sommes intéressées à l'étude des spermines. Nous avons étudié leur action sur l'antithrombine III mais sur un plasma total (ce plasma utilisé comme source d'AT III). L'activité inhibitrice de la thrombine par l'antithrombine III en présence d'un substrat chromogène S 2238, de spermine a été suivie à 405 nm. Le pourcentage d'activité thrombinique et antithrombinique héparine dépendante et héparine indépendante a été déterminé (tableau I) Nous observons une inhibition de 69% de l'activité thrombinique en présence de plasma et en absence d'héparine soit 31% d'activité thrombinique résiduelle. Cette activité augmente de 23% quand on ajoute 1mM de spermine au milieu d'incubation. Une augmentation de 40% est obtenue avec 3 mM de spermine et toute l'activité thrombinique est restituée avec 5 mM de spermine (fig 9). En présence d'héparine (tableau II), l'action de la spermine (10mM) sur l'inhibition de l'activité antithrombinique est immédiate au bout de 2 minutes. Au bout de 10 minutes nous observons une restitution de 34% de l'activité antithrombinique.

La spermine n'a pas d'action sur la thrombine ni sur le substrat synthétique S 2238. Nos résultats semblent montrer que la spermine inhibe l'activité antithrombinique de la manière suivante : L'action inhibitrice de la spermine (10mM) est immédiate au bout de 2 minutes en présence d'héparine, ce qui implique que l'interaction antithrombine-héparine n'ait pu avoir lieu, la spermine ayant interagit fortement avec l'héparine par des ponts salins.



Temps d'incubation.	% Activité thrombinique.		% Activité antithrombinique.	
	10 mn.	20 mn.	10 mn.	20 mn.
IIa.	100	100	0	0
Spermine.	0	0	0	0
IIa + spermine.	100	100	0	0
IIa + plasma.	31	26	69	74
IIa + plasma + Spermine (1mM)	51	42	46	58
IIa + plasma + Spermine (3mM)	71	62	29	38
IIa + plasma + spermine (5mM)	100	100	0	0

Tableau I. Action de la spermine sur l'antithrombine III  
 (dosage de l'activité amidolytique sur  
 le S2238 héparine indépendant).

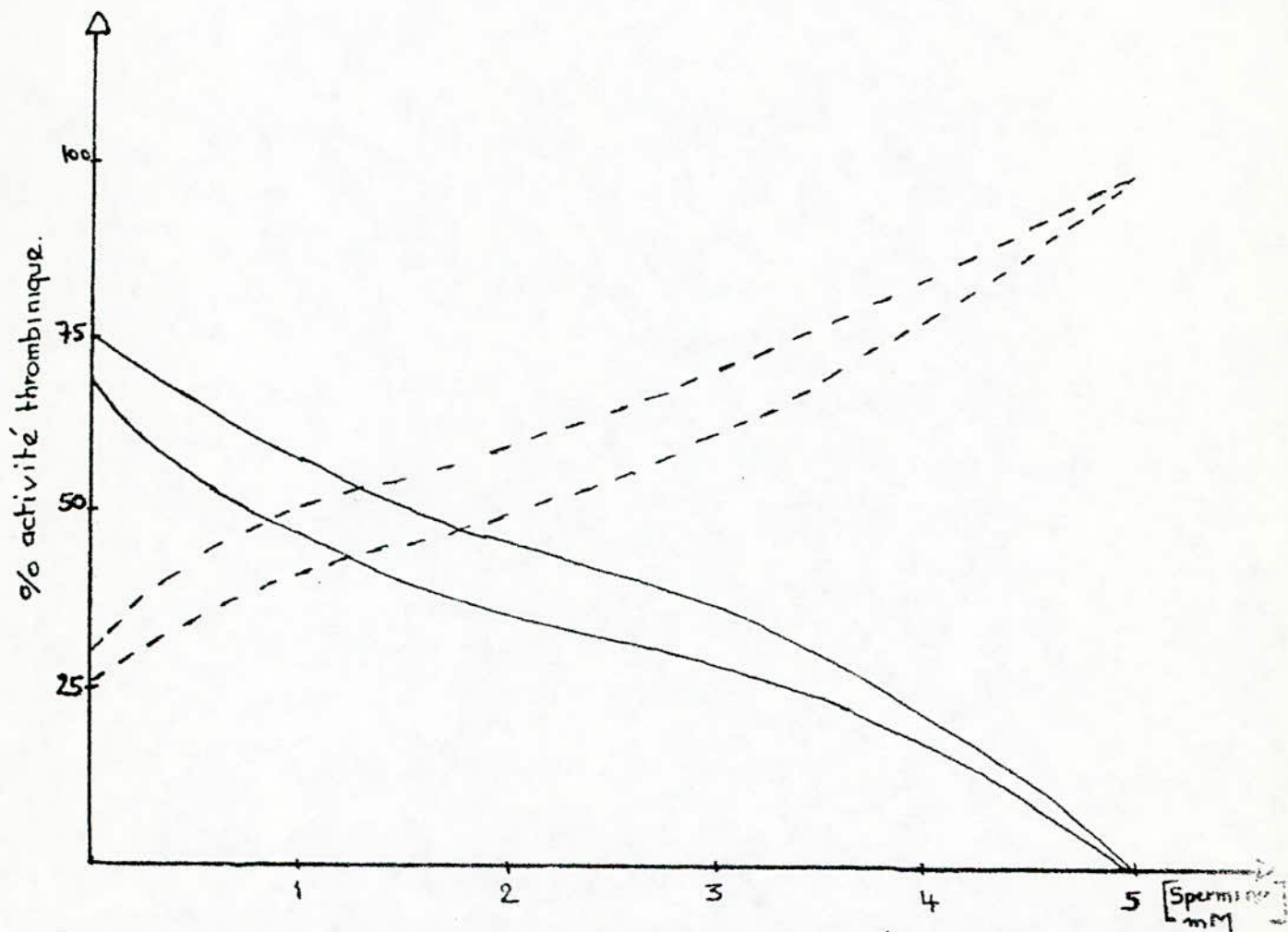


Figure 9 / Action de la spermine sur l'antithrombine III (héparine indépendante)

--- % activité antithrombinique.  
— % activité thrombinique.



Temps incubation.	% activité thrombinique.		% activité antithrombinique.	
	2 mn.	10 mn.	2 mn.	10 mn.
IIa.	100		0	
Plasma.	0		0	
IIa + plasma.	3	0	97	0
IIa + plasma + Spermine 10mM	100	66	0	34

Tableau II. Action de la spermine sur l'antithrombine III  
 (dosage de l'activité amidolytique sur  
 le S<sub>2238</sub> héparine dépendant).

Au cours de l'incubation (10 minutes) le complexe héparine spermine paraît se dissocier (34 % d'activité antithrombinique restituée). La spermine agit sur l'antithrombine III même en absence d'héparine exogène donc elle peut inhiber la fixation sur l'antithrombine III des molécules "héparine like" (dermatane sulfate et héparane sulfate) présentes dans le plasma et possédant une activité analogue à celle de l'héparine (héparine like).

### 3. GLYCOSYLATION IN VITRO ----- DE L'ANTITHROMBINE III : -----

#### 3.1. ACTIVITE DE L'ANTITHROMBINE III : -----

Les conditions d'incubation de départ sont déterminées pour une quantité d'antithrombine III n'inhibant pas totalement la thrombine : 85% d'inhibition antithrombinique pour ne pas être en excès d'antithrombine III. L'antithrombine III incubée à 37°C sans glucose présente la même activité que l'antithrombine III non incubée et cela en présence ou en absence d'héparine (tableau III) Donc l'incubation à 37°C ne dénature pas l'antithrombine III. L'étude de l'activité antithrombinique en absence d'héparine donne les résultats suivants :

- Après 4 heures d'incubation et avec 100mM de glucose cette activité n'est pas modifiée, elle diminue de 10% avec 200mM de glucose et de 15% avec 400 mM de glucose.
- Après 8 heures d'incubation, une diminution de cette activité est observée avec 100 mM de glucose; cette diminution est de 25% avec 400 mM de glucose.
- Après 16 heures d'incubation l'inhibition maximale d'environ 50% est atteinte avec une concentration de 100mM de glucose. L'influence de la concentration en glucose n'est pas observée.
- Après 6 jours d'incubation, une diminution de l'activité est observée à partir d'une concentration de 100 mM en glucose avec une concentration de 400 mM de glucose l'antithrombine III glycosylée est totalement inactivée (tableau IV).

L'étude de l'activité antithrombinique en présence d'héparine donne les résultats suivants : (tableau III) :

- Après 4 heures, 8 heures et 16 heures d'incubation, en présence de 100 mM, 200 mM, 400 mM de glucose l'antithrombine III présente la même activité que l'antithrombine III normale.



Temps d'incubation de l'antithrombine III	% Activité Thrombinique.			% Activité Inhibitrice antithrombinique.		
	4 heures.	8 heures.	16 heures.	4 heures.	8 heures.	16 heures.
IIa.	100.	100.	100.	0.	0.	0.
IIa + ATIII. (NI)	15.	15.	15.	85.	85.	85.
IIa + ATIII. (I/0 mM Glu)	15.	15.	15.	85.	85.	85.
IIa + ATIII. (I/100 mM Glu)	15.	18.	45.	85.	82.	55.
IIa + ATIII (I/200 mM Glu)	25.	27.	45.	75.	73.	55.
IIa + ATIII (I/400 mM Glu)	30.	40.	45.	70.	60.	55.

Tableau III : Action de l'antithrombine III glycosylée et non glycosylée sur l'activité de la thrombine en absence d'heparine.  
 Temps d'incubation (IIa + ATIII) = 20 minutes. température = 37°C.  
 NI = non incubé. ; I = incubé.

Temps d'incubation de l'antithrombine III	% Activité thrombinique.		% Activité inhibitrice antithrom- binique	
	6 Jours.		6 Jours.	
	Sans héparine.	Avec héparine.	Sans héparine.	Avec héparine.
IIa	100	100	0	0
IIa + AT <sub>III</sub> (NI)	6	2	94	98
IIa + AT <sub>III</sub> (I/0mM Gbe)	9	2,6	91	97,4
IIa + AT <sub>III</sub> (I/100mM Gbe)	20	7,3	80	92,7
IIa + AT <sub>III</sub> (I/200mM Gbe)	61	8,6	39	91,4
IIa + AT <sub>III</sub> (I/400mM Gbe)	100	20	0	80

Tableau IV. Action de l'AT<sub>III</sub> glycosylé et non glycosylé  
sur l'activité thrombinique.

Temps d'incubation II<sub>0</sub>+AT<sub>III</sub> = 20'

" " II<sub>a</sub>+AT<sub>III</sub>+héparine = 2'

Température = 37°C



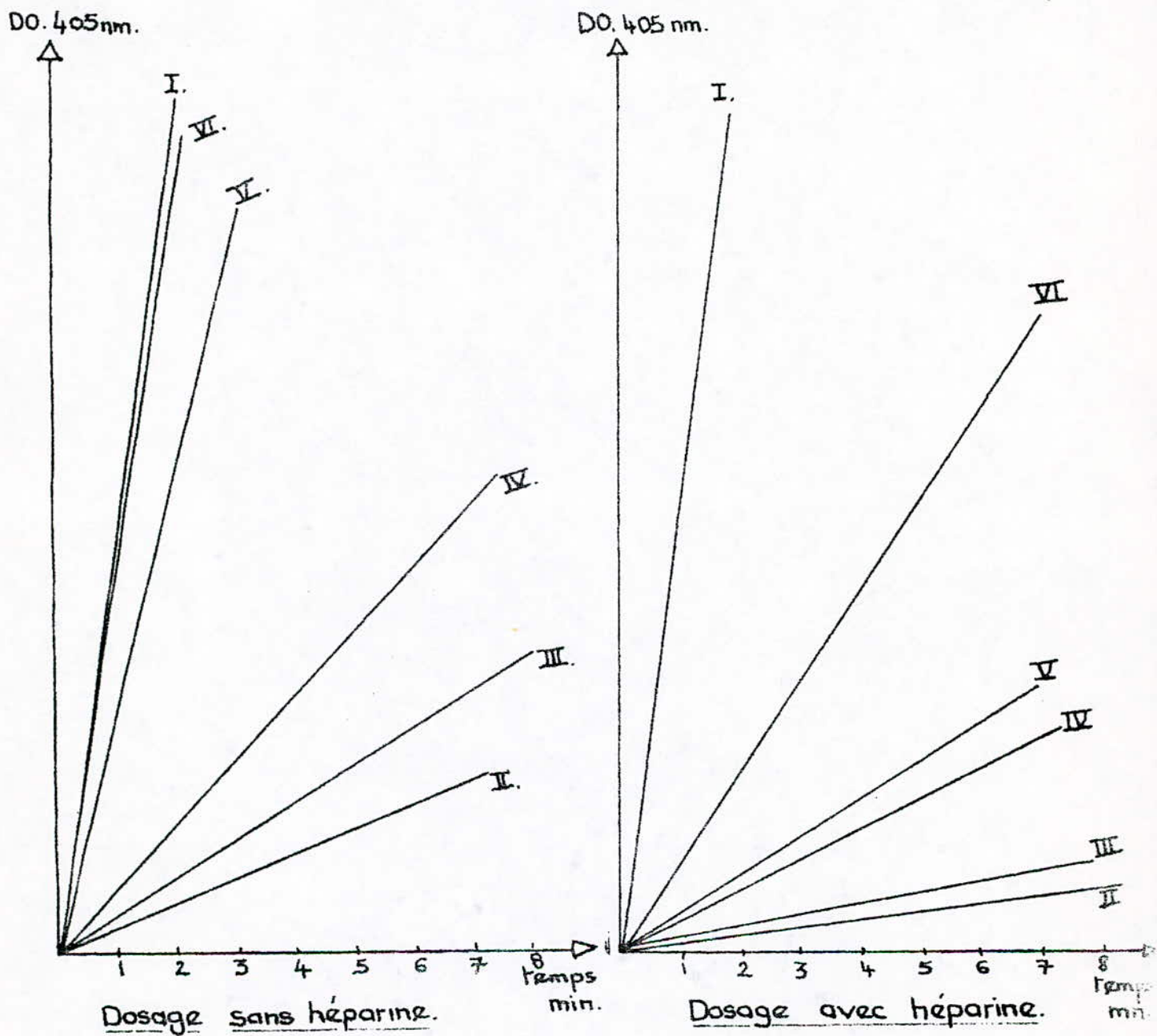


Figure 10. / Activité de l'antithrombine III glycosylée sur la thrombine

Antithrombine III incubée avec glucose pendant 6 jours à 37°C.

- I : thrombine.
- II : thrombine + antithrombine III non incubée.
- III : thrombine + antithrombine III incubée sans glucose.
- IV : thrombine + antithrombine III incubée avec glucose (100mM).
- V : thrombine + antithrombine III incubée avec glucose (200mM).
- VI : thrombine + antithrombine III incubée avec glucose (400mM).

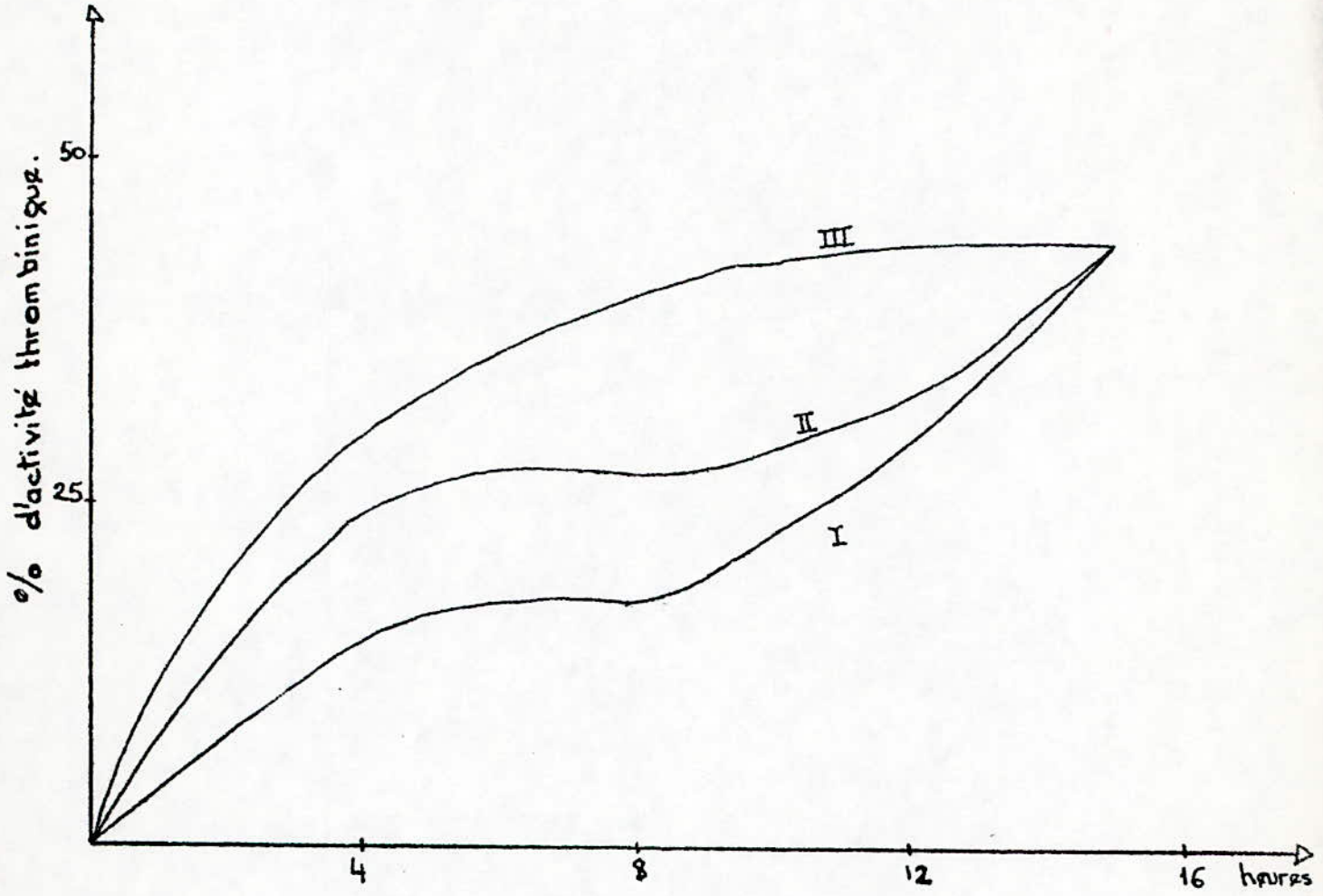


Figure 11 / Incubation de l'AT<sub>III</sub> en présence de glucose :

- I 100 mM Glucose.
- II 200 mM "
- III 400 mM "



- Après 6 jours d'incubation jusqu'à 80% de l'activité antithrombinique est récupérée avec une concentration de 400 mM de glucose (tableau IV) ceci s'explique par le fait que l'héparine a pu se fixer (fig 10) sur l'antithrombine III glycosylée et induire un changement de conformation et faire disparaître l'encombrement stérique. Sachant qu'après une monoglycosylation les groupements NH<sub>2</sub> des lysines peuvent se protoner, il est évident qu'une macromolécule telle que l'héparine peut réagir avec ces sites mais plus lentement qu'avec l'antithrombine III normale. En absence d'héparine le degré d'inhibition de l'activité antithrombinique dépend de la concentration en glucose et de la durée de contact protéine-glucose. La figure 11 donne les pourcentages d'activités thrombiniques en fonction de la concentration en glucose. Ce pourcentage reflète les valeurs moyennes intégrées des modifications d'activités :

- Une proportionnalité entre la vitesse d'activité thrombinique et la concentration en glucose est observée dans une première phase ceci est dû probablement à l'accessibilité des lysines de l'antithrombine III et à son inhibition par la glycosylation.

- Entre 4 heures et 8 heures d'incubation nous notons une 2ème phase stationnaire ce qui semble correspondre à une interaction glucose-protéine retardée par un accès difficile des lysines ou une modification ionique de ces mêmes lysines.

- La 3ème phase montre que la vitesse d'activité thrombinique est augmentée après 16 heures d'incubation. Un excès de sucre est donc en faveur d'un encombrement stérique des sites de l'antithrombine III.

### 3.2. ISOELECTROFOCALISATION :

La figure 12 et 13 montre que le comportement en focalisation isoelectrique de l'antithrombine III incubée sans glucose et en présence de glucose pendant 16 heures n'est pas modifié. Ce qui implique que la glycosylation de l'antithrombine III n'a pas induit de modification de charge. Les lysines peuvent se protoner après une monoglycosylation, ceci confirme l'effet de l'héparine qui peut restituer 80% de l'activité antithrombinique. Néanmoins nous remarquons un déplacement des bandes vers l'anode après 6 jours d'incubation. Cet effet est dû probablement à une biglycosylation des lysines modifiant ainsi la charge de l'antithrombine III.

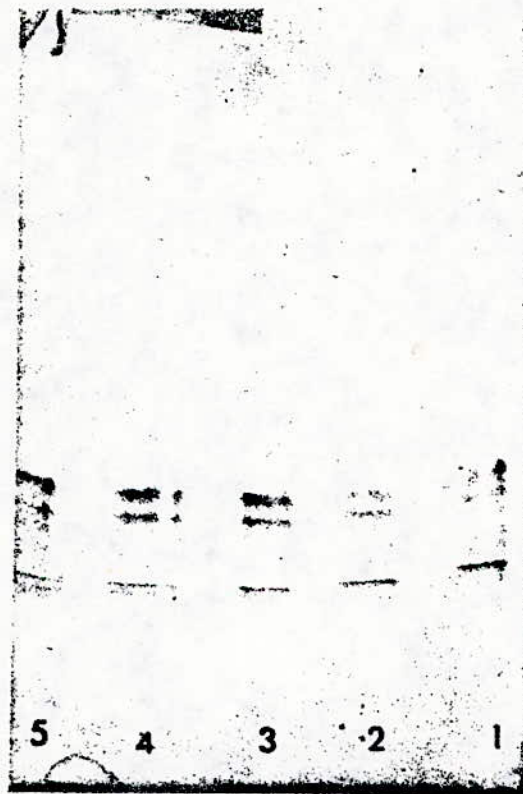


Figure 12/Electroisofocalisation de l'antithrombine III  
incubée pendant 16 heures à 37°C.

- 1-antithrombine III non incubée
- 2-antithrombine III incubée sans glucose
- 3-antithrombine III incubée 100mM glucose
- 4-antithrombine III incubée 200mM glucose
- 5-antithrombine III incubée 400mM glucose





Figure 13 / Electroisofocalisation de l'antithrombine III  
incubée pendant 6 jours à 37°C.

- 1-antithrombine III non incubée
- 2-antithrombine III incubée sans glucose.
- 3-antithrombine III incubée 100mM glucose.
- 4-antithrombine III incubée 200mM glucose.
- 5-antithrombine III incubée 400mM glucose.

#### 4. GLYCOSYLATION IN VIVO DE L'ANTITHROMBINE III :

Les protéines plasmatiques sont soumises à une chromatographie d'affinité sur phényl boronate agarose. Les fractions non liées sont éliminées par un tampon acétate d'ammonium 0,25M PH 8,5 alors que les fractions liées en phényl boronate sont éluées par un tampon acide le citrate de sodium 0,2M PH 4,65. Ces fractions sont désalées sur minicolonnes PD 10 et soumises à une immunoelectrophorèse selon Laurell. La figure 14 montre que l'antithrombine III peut être détectée dans la fraction liée au phényl boronate à partir de plasma de sujets diabétiques (puits 3 et 4) alors qu'il n'en est pas de même chez le sujet témoin normal (puits 7). Cette fraction d'antithrombine III retenu sur phényl boronate augmente nettement après incubation d'un plasma témoin pendant 8 jours à 37°C en présence de glucose à des concentrations de 50 mM et de 200 mM (puits 8 et 9). L'antithrombine III présente dans les fractions liées au phényl boronate a été déterminée par immunodiffusion radiale chez 4 sujets diabétiques. Les résultats sont rapportés dans le tableau V en comparaison avec le pourcentage des protéines plasmatiques totales liées au phényl boronate, le taux d'HbA1C et le degré de glycosylation non enzymatique des protéines plasmatiques totales, apprécié par la mesure colorimétrique des sucres liés aux protéines par une liaison cétoamine. Les résultats montrent :

- L'existence d'un parallélisme entre le taux des protéines liées au phényl boronate (et de l'AT III) et celui des sucres mesuré par colorimétrie.
- Que l'incubation d'un plasma en présence de glucose augmente la glycosylation des protéines plasmatiques et la fraction retenue sur phényl boronate. De même la fraction d'antithrombine III liée au phényl boronate augmente après incubation.
- Que l'AT III liée au phényl boronate mise en évidence dans le plasma de sujets diabétiques reflète bien l'augmentation de la fraction glycosylée de cette protéine chez ces malades.
- Que la réactivité immunologique du plasma incubé en présence de glucose n'est pas modifiée (puits 10, 11, 12) alors que les sucres liés aux protéines passent de 1,77 à 6,38 nmole HMF/mg de protéines et la fraction liée au phényl boronate de 33,5 à 62,4% (puits 7, 8, 9). Ainsi la glycosylation non enzymatique n'affecte pas les propriétés immunologiques. Ces résultats ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire du Docteur J. Elion à l'hôpital Bichat et a fait l'objet d'une publication : Ducrocq.R, Bachour.S, Belkhodja.R, Berriche S, Elion.J (1985).



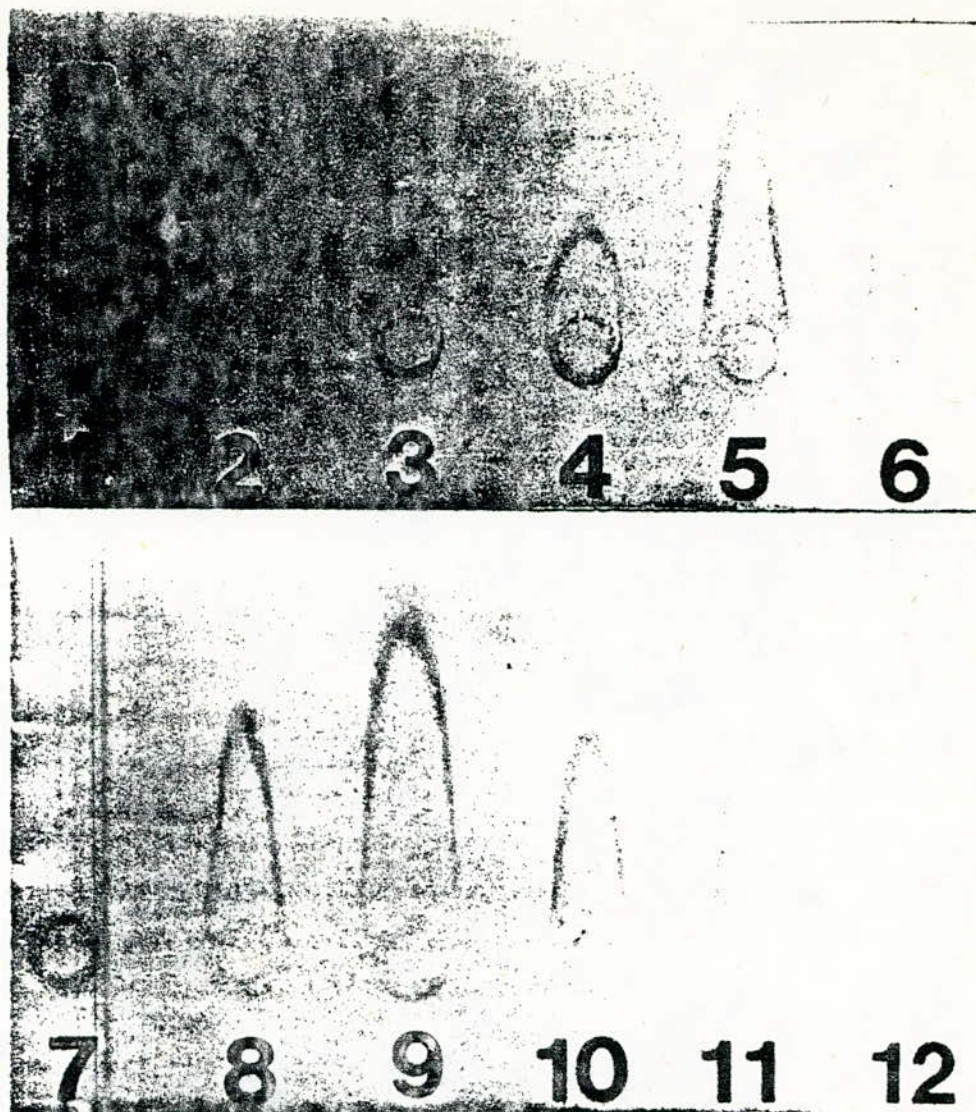


Figure 14 / Mise en évidence de l'antithrombine III

dans la fraction liée au phénylboronate agarose.

- 1- plasma contrôle
- 2- plasma contrôle dilué au 1/2
- 3-6 plasmas de sujets diabétiques :
  - 3-4 fractions liées au phénylboronate de 2 sujets
  - 5-6 plasmas totaux des 2 mêmes sujets.
- 7-12 incubation des plasmas normaux en présence de glucose pendant 8 jours à 37°C:
  - 7-9 fractions liées au phényl-boronate.
  - 10-12 plasmas totaux.
  - 7 et 10 témoins.
  - 8 et 11 incubation avec 50mM de glucose.
  - 9 et 12 incubation avec 200mM de glucose.

	HbA <sub>1c</sub> %	Protéines plasmatiques glycosylées (méthode colorimétrique) nmol HMF/mg Protéine	Fractions liées au phénylboronate	
			Protéines plasmatiques %	AT III (immunodiffusion radiale) %
Plasma témoin	5.1	1.77	6.1	non détectable
Plasma témoin incubé avec :				
- 50 mmol/l de glucose		3.52	33.5	33.8
- 200 mmol/l de glucose		6.38	62.4	64.2
Plasmas de sujets diabétiques :				
1	9.3	2.30	11.3	11.1
2	7.8	2.52	11.9	13.6
3	13.8	2.76	16.0	14.0
4	17.1	3.25	17.5	13.6



5. GLYCOSYLATION IN VITRO  
-----  
DE L'ADN (PBR 322) :  
-----

L'ADN est incubé dans le tampon HEPES 50 mM, EDTA 0,5 mM PH 8 pendant 112 heures à 37°C, en présence de différents sucres de concentration 250 mM, 500 mM, 1M.

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans tampon tris 40mM, acetate de sodium 25 mM, EDTA 0,2 mM PH 8,3 suivie d'une coloration au bromure d'ethidium 10 mg/ml permet de séparer les différentes formes d'ADN : forme nickée, linéaire, supercoil. Le tableau VI et la figure 15 montrent les résultats de l'incubation de l'ADN en présence des différents sucres et son action sur l'activité Nicking, sur la linéarisation et le brunissement de l'ADN.

L'ADN incubé sans sucre pendant 112 heures à 37°C ne montre aucune activité Nicking, linéarisation ou brunissement, ce qui indique que l'incubation à 37°C ne modifie pas la forme supercoil de l'ADN.

La réactivité du glucose, deoxyglucose, galactose et deoxygalactose sur l'ADN n'est pas suivie d'effets de Nicking, de linéarisation ou de brunissement. la présence de bloc-lys dans le milieu d'incubation entraîne un effet de brunissement (incubation en présence de glu, gal), mais cet effet n'a pu se produire avec les sucres deoxyglucose et deoxygalactose qui ne permettent pas de réarrangement d'Amadori : d'où l'importance du réarrangement d'Amadori dans les réactions de brunissement.

La réactivité du glucose 6p. est suivi d'un effet Nicking et d'un réarrangement d'Amadori menant au brunissement que ce soit en présence ou en absence de boc-lys.

Nous remarquons une réactivité plus importante du Galactose 6P, fructose, fructose 6P et fructose 16DP donc plus efficace dans l'effet Nicking et la linéarisation (forme linéaire correspond à la bande 4,3 Kb en électrophorèse sur gel d'agarose) entraînant la dégradation de l'ADN et une intense activité de brunissement. L'importance de la réactivité des groupements carbonyles des sucres est liée à l'activité Nicking et à la linéarisation par contre le réarrangement d'Amadori n'y est pas impliqué (cas du 2 déxyglucose G6P).

La polymerisation est d'autant plus importante en présence de sucres efficaces dans l'effet Nicking et dans la linéarisation et elle est proportionnelle aux concentrations élevées de ces sucres (figure 16 et 17).

La présence de groupements aminés libres dans le milieu d'incubation (Boc-lys) accentue le phénomène de brunissement.

Les mesures de brunissement à partir de spectres différentiels montre un maximum d'absorption compris entre 350 et 370 nm (figure 18).



## 5. GLYCOSYLATION IN VITRO

---

### DE L'ADN (PBR 322) :

---

L'ADN est incubé dans le tampon HEPES 50 mM, EDTA 0,5 mM PH 8 pendant 112 heures à 37°C, en présence de différents sucres de concentration 250 mM, 500 mM, 1M.

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans tampon tris 40mM, acetate de sodium 25 mM, EDTA 0,2 mM PH 8,3 suivie d'une coloration au bromure d'ethidium 10 mg/ml permet de séparer les différentes formes d'ADN : forme nickée, linéaire, supercoil. Le tableau VI et la figure 15 montrent les résultats de l'incubation de l'ADN en présence des différents sucres et son action sur l'activité Nicking, sur la linéarisation et le brunissement de l'ADN.

L'ADN incubé sans sucre pendant 112 heures à 37°C ne montre aucune activité Nicking, linéarisation ou brunissement, ce qui indique que l'incubation à 37°C ne modifie pas la forme supercoil de l'ADN.

La réactivité du glucose, deoxyglucose, galactose et deoxygalactose sur l'ADN n'est pas suivie d'effets de Nicking, de linéarisation ou de brunissement. la présence de bloc-lys dans le milieu d'incubation entraîne un effet de brunissement (incubation en présence de glu, gal), mais cet effet n'a pu se produire avec les sucres deoxyglucose et deoxygalactose qui ne permettent pas de réarrangement d'Amadori : d'où l'importance du réarrangement d'Amadori dans les réactions de brunissement.

La réactivité du glucose 6p. est suivi d'un effet Nicking et d'un réarrangement d'Amadori menant au brunissement que ce soit en présence ou en absence de boc-lys.

Nous remarquons une réactivité plus importante du Galactose 6P, fructose, fructose 6P et fructose 16DP donc plus efficace dans l'effet Nicking et la linéarisation (forme linéaire correspond à la bande 4,3 Kb en électrophorèse sur gel d'agarose) entraînant la dégradation de l'ADN et une intense activité de brunissement. L'importance de la réactivité des groupements carbonyles des sucres est liée à l'activité Nicking et à la linéarisation par contre le réarrangement d'Amadori n'y est pas impliqué (cas du 2 déxyglucose G6P).

La polymerisation est d'autant plus importante en présence de sucres efficaces dans l'effet Nicking et dans la linéarisation et elle est proportionnelle aux concentrations élevées de ces sucres (figure 16 et 17).

La présence de groupements aminés libres dans le milieu d'incubation (Boc-lys) accentue le phénomène de brunissement.

Les mesures de brunissement à partir de spectres différentiels montre un maximum d'absorption <sup>entre</sup> 350 et 370 nm (figure 18).



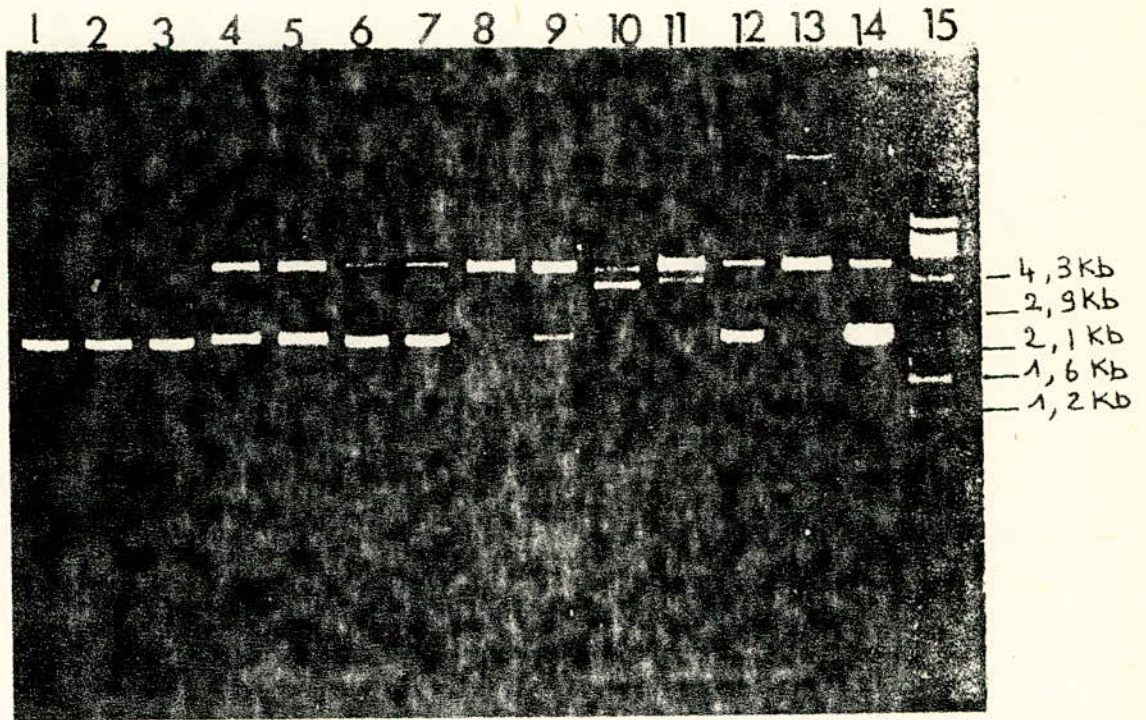


Figure 15 / Electrophorese sur gel d'agarose a 1%

ADN incube pendant 112 heures a 37°C  
en presence de sucres de concentration  
250mM coloration au bromure d'ethidium .

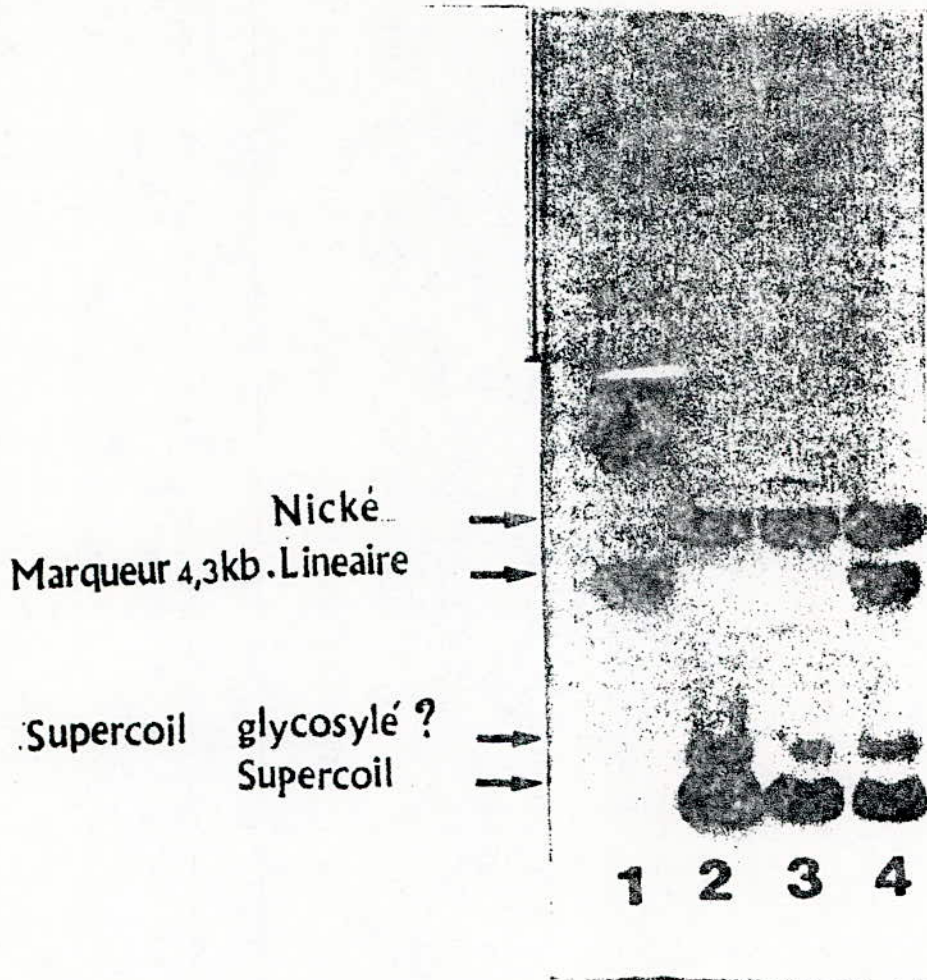
- 1- ADN incubé sans sucre.
- 2- " " glucose.
- 3- " " 2 deoxyglucose.
- 4- " " glucose 6P.
- 5- " " 2 deoxyglucose 6P.
- 6- " " galactose .
- 7- " " 2 deoxygalactose .
- 8- " " galactose 6P.
- 9- " " fructose .
- 10- " " fructose 6P.
- 11- " " fructose 1-6DP.
- 12- " " galactose + Boc lys 5mM.
- 13- " " galactose 6P +Boc lys 5mM.
- 14- ~~---~~ ~~---~~ ADN non incubé.
- 15- ~~---~~ ~~---~~ Marqueur de taille.



Figure 16 / Electrophorèse sur gel d'agarose a 1%  
ADN incubée en présence de fructose 6P  
a 37°C, pendant 112 heures coloration au  
bromure d'ethidium.

- 1- Marqueurs de taille.
- 2- ADN + fructose 6P 100mM.
- 3- ADN + fructose 6P 250mM.
- 4- ADN + fructose 6P 500mM.





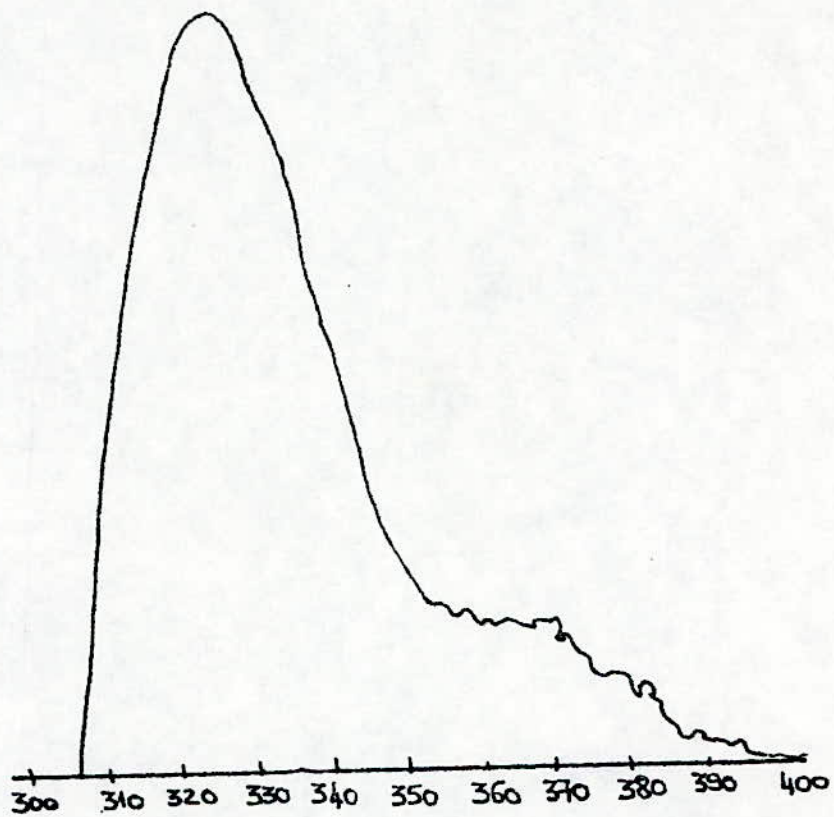
**Figure 17 /** Autoradiographie de l'ADN incubé en présence de fructose 6P pendant 112 heures a 37°C.

- 1- Marqueur de taille.
- 2- ADN + fructose 6P 100mM.
- 3- ADN + fructose 6P 250mM.
- 4- ADN + fructose 6P 500mM.

	Sans sucr.	G.	2deoxy G.	G6P.	2deoxy G6P.	Gal.	2deoxy Gal.	Gal6P.	F.	F6P.	F6P 0,5M.	F16DP 1M.	F16DP
<b>Sucré + Tampon.</b>													
Activité Nicking	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
// Linéarisation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
// Brunissement	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sucré + Tampon + PBR.</b>													
Activité Nicking	-	-	-	++	++	-	-	++++	+++	++++	++++	++++	++++
// Linéarisation	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++++	dégradation		++
// Brunissement	-	-	-	+	-	-	-	++	+	++++	exces.		++
<b>Sucré + Tampon. + boctys.</b>													
ativ. Brunissement.	-	+	-	+	-	+	-	+	+	++	+++	++++	+
<b>Sucré + tampon. + PBR + boctys.</b>													
Activité Nicking.	-	-	-	++	++	-	-	++++	+++	++++	++++	++++	++++
// Linéarisation	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++++	dégradation		++
// Brunissement.	-	+	-	++++	-	+	-	++++	++++	formation de résine Maillard (polymère)			++++

Tableau VI. Glycosylation non enzymatique de l'ADN.





Spectre de l'ADN incubé.

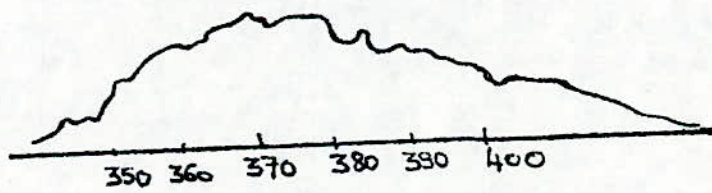


Figure 15. / Spectre différentiel de l'ADN incubé.

DISCUSSION ET CONCLUSION  
\*\*\*\*\*



## GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE DE L'ANTITHROMBINE III :

Nous avons utilisé la chromatographie sur phénylboronate agarose pour démontrer l'augmentation de la fraction glycosylée in vivo de l'AT III chez les sujets diabétiques. Ceci vient compléter les résultats de Brownlee et Coll (1984).

Par ailleurs nos résultats démontrent clairement que l'antithrombine III est glycosylable in vitro et que cette glycosylation entraîne éventuellement une perturbation d'interaction avec la thrombine. En d'autres termes et plus précisément l'antithrombine III glycosylée voit sa capacité d'inhibition diminuer de 50%. La totalité de la capacité d'antithrombine III pour inhiber la thrombine peut être restituée par l'héparine. Au niveau moléculaire on sait que quelques lysines critiques interviennent dans l'interaction entre l'antithrombine III et l'héparine et cette interaction est rapide donc ces lysines sont accessibles donc potentiellement glycosylable. Malgré cette situation favorable pour la glycosylation, l'héparine arrive à interagir avec l'antithrombine III. L'explication la plus probable qu'on peut donner à l'heure actuelle de l'expérimentation de glycosylation in vitro, est qu'une monoglycosylation des groupements  $\leq$  NH<sub>2</sub> de lysine permet encore une ionisation de ce groupement permettant encore une interaction (pont salin) possible entre l'héparine et l'antithrombine III. Un excès de glycosylation (400 mM pendant 6 Jours) ne restitue que 80% de l'efficacité d'héparine. Ceci est dû à une biglycosylation qui ne permet plus une interaction ionique entre héparine et antithrombine III.

Certaines observations rapportées dans la littérature sont importante et intéressantes à comparer avec nos résultats : la persistance d'une hyperglycémie augmente la vitesse de disparition du fibrinogène (Brownlee, M et Coll 1983)(Jones, R.L et coll 1979). Cette vitesse peut être normalisée par deux abordés différents :

- . Normalisation de la glycémie
- . Traitement par l'héparine

alors que les anti-aggrégats étaient inefficaces. L'effet du glucose sur la disparition du fibrinogène combiné à la normalisation par l'héparine nous permet de penser que l'antithrombine III pourrait être impliquée par sa glycosylation dans ce phénomène.

Par ailleurs le dosage d'antithrombine par la mesure de son activité et les méthodes immunologiques aboutissait à des résultats discordants :

- . Une activité biologique abaissée
- . Un taux d'antithrombine III normal par méthode immunologique.



Ce qui renforce notre idée qu'il ya déficit fonctionnel de l'antithrombine III et non sa disparition accélérée ou sa production diminuée.

Etant donné les conditions drastiques expérimentales, on peut critiquer qu'il ya exagération de la situation physiologique... Néanmoins il faut se rappeler que l'antithrombine III contribue à 90% d'activité d'inhibition de coagulation . En plus, d'inhiber la thrombine, elle inhibe également les facteurs XIIa, XIa, Xa et IXa dans le système de cascade de coagulation.

Etant donné l'amplification du système de cascade, la répercution de la glycosylation non enzymatique de l'antithrombine III pourrait être plus importante à l'état physiologique. Nous n'avons considéré qu'un aspect de la coagulation qui se trouve exagéré au cours du diabète.

La glycosylation non enzymatique pourrait affecter d'autres protéines, d'autres phénomènes peuvent concourir également à augmenter la coagulation intravasculaire chez le sujet diabétique . Par exemple il est important à noter que chez le diabète la fibrine est glycosylée et que la vitesse de dégradation par la plasmine est diminuée (Brownlee et Coll 1983) qui peut accentuer le dépôt de fibrine sur les parois vasculaires. Par ailleurs on doit noter que le taux de substances physiologiques ressemblant à l'héparine est diminué chez le diabétique (Brown, D.M et Coll 1982).

L'ensemble de tous ces aspects incrimine la glycosylation non enzymatique des protéines de la coagulation comme étant un des facteurs déterminant de l'hypercoagulabilité chez les diabétiques. La persistance d'un état hyperglycémique au cours du diabète entraîne un effet progressif et cumulatif du phénomène de glycosylation non enzymatique et expliquerait en partie les complications tardives du diabète.

La signification biologique ou pathologique de la spermine dans l'inhibition de l'activité antithrombinique n'est pas clairement élucidée dans ce travail. Cependant on peut se permettre de faire une hypothèse basée sur les diverses observations. Par exemple dans la drépanocytose et certaines maladies; anémies hémolytiques chroniques (Crosby W.H et Coll 1950; Mahmood A et Coll 1967; Gilman W.I et Coll 1973) la tendance thrombotique est très élevée. quant on sait que les réticulocytes et les globules rouges sont des sources de polyamines et que leur lyse intracapillaire pourrait provoquer une libération intense de polyamines, hypercoagulabilité intravasculaire localisée n'est pas à exclure.



GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE

-----  
DE L'ADN :  
-----

Nos résultats démontrent que les groupements aminés des bases peuvent être glycosylés in vitro donc l'accessibilité des bases est possible malgré l'organisation en double hélice et "supercoil" du plasmide PBR 322.

Ceci vient compléter les résultats de Bucala et Coll 1984 qui ont étudié la glycosylation de l'ADN simple brin.

La glycosylation du plasmide est suivie d'une linéarisation. Ainsi les sucres agissent comme des agents alkylants labilisant les liaisons glycosidiques entre les purines et le désoxyribose .

Nous notons également l'importance du réarrangement d'amadori dans le brunissement. La polymérisation in vitro est possible et se trouve augmentée en présence de concentration élevée de sucres efficaces dans la fixation, dans le Nicking et la linéarisation (cas du fructose 6P - galactose 6P - fructose 1-6 DP).

Ceci peut induire des altérations structurales et biologiques de l'ADN pouvant mener à l'accumulation de lésions génétiques quand on pense que certains de ces sucres constituent des métabolites intracellulaires.

La présence de groupements aminés libres dans la cellule peut également contribuer à l'altération de l'ADN par brunissement non enzymatique comme le suggèrent nos résultats d'incubation d'ADN en présence de Boc Lys.

Au total toutes nos observations ajoutées à ceux de Brownlee et Bucala fournissent des arguments pour penser que la glycosylation non enzymatique pourrait jouer un rôle dans l'accumulation pathologique de produits chez les sujets diabétiques pouvant affecter la viabilité des molécules (protéines, ADN) dans leur structure et dans leur fonction.

B I B L I O G R A P H I E  
\*\*\*\*\*



ABILDGAARD.V (1967)  
SCAND.J. CLIN. LAB. INVEST 19, 190-195

ABILDGAARD.V (1968)  
SCAND.J. CLIN. LAB. INVEST 21, 89-91

ABILDGAARD V, LIE M, ODEGARD O.R, (1977)  
THROMB. RES. 11, 549-553.

ALLEN D.W, BALOG J. (1958)  
J. AMER. CHEM. SOC. 80, 1628

BICK RL. (1982)  
THROMB. HAEMOST. 6, 276-287

BIGGS R, DENSON K.E.W., AKMAN N., BORRETT R, MADDEN M. (1970)  
BR.J. HAEMATOL. 19, 287-305

BJORK I, FISH WW. (1982)  
J. BIOL. CHEM 257, 16, 2487-2488

BJORK I, LARM O., LINDAHL U, NORDLINGK, RIQUELME M.E. (1982)  
FEBS. LETTERS 148, 1, 96-100

BLAKESLEY R.W., BOEZI J.A. (1977)  
ANAL. BIOCHEM 82, 580-582

BLODEL G., SABATINI D.D (1971)  
BIOMEMBRANES. VOL 2 MANSON, D.A, ED (1971)  
PLENUM PRESS, NEW-YORK 138-195

BOOKCHIN R.M, GALLOP P.M (1968)  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM 32, 86.

BROWN D.M., KLEIN D.J., MICHAEL A.F., CEGEMA T.R (1982)  
DIABETES. 31, 418-425

BROWNLEE M, CERAMI A (1981)  
ANN. REV. BIOCHEM 50 396-432

BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A. (1983)  
DIABETES. 32, 680-684

BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A. (1984)  
DIABETES 33, 532-535

BUCCALA R., MODEL P., CERAMI A; (1984)  
PROD. NATL. ACAD. SCI 81, 105-109

BUNN H.F., HARREY D.N., KENNETH H., GABBAY P.M. (1975)  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 67, 103-109

BURROWS C.E., HABAL. F.M., MOVAT H.Z. (1975)  
THROMB. RES. 7, 175-183.

COHEN M.P., URDANIVA E., SURMA M., WU V.Y (1980)  
BIOCHEM BIOPHYS. RES. COMMUN. 95, 765-769

DAMUS P.S., HICKS M., ROSENBERG R.D. (1973)  
NATURE 246

CROSBY W.H, DAMESHEK W. (1950)  
BLOOD. S, 822-842

DANIELSON A., BJORK I. (1983)  
BIOCHEM. J. 213, 345-352

DANISHEFSKY I. ZWEDEN A., SLOMIANY B.L. (1979)  
J. BIOL CHEM. 252, 1, 32-37

DAY J.F., THORPE S.R., BAYNES J.W (1979)  
J. BIOL. CHEM. 254, 595-597

DICE J.F., GOLDBERG A.L. (1975)  
PROC. NATL. ACAD. SCI 72, 3893-3897

DUROCO R. BACHOUR H., BELKHODJA R., BERRICHE S., ELION J. (1985)  
CLIN. CHEM. 31, 2, 328-329 .

FELL C., IVANOVIC N., JOHNSON S.A., SEEGER W.H. (1954)  
PROC. SOC EXP. BIOL.MED. 85, 199

FISHER R.W., WINTERHALTER K.H (1981)  
FEBS LETTERS. 135, 145-147

FISH W.W., ORRE K., BJORK I. (1973)  
EUR.J. BIOCHEM. 101, 39-44

FLETTERICK R.J., MADSEN N.B. (1980)  
ANN. REV. BIOCHEM.49, 31-61

FRANSEN L.E., SVENSON S. (1980)  
J. BIOL CHEM 255, 11, 5090-5093

GAMBOLFO G.M., DE ANGELIS A., TORESSI M.V. (1980)  
HAEMOSTASIS 9, 15-19



GILMAN W.I., MAC DONGALL L.G., JUDISCH J.M. (1973)  
CLIN. PEDIAT, 12, 600-602

GOTTSCHALK A. (1972)  
GLYCOPROTEIN (A GOTTSCHALK, ED), PART A, 141-157  
AM.ELSEVIER, NEW.YORK

GRIFFITH M.J (1982)  
J. BIOL. CHEM 257, 18, 7360-7365

GRIFFITH M.J , LUNDBLAD R.L. (1981)  
BIOCHEMISTRY 20, 105-110

HEIMBURGER N. (1967)  
1ST. INTERN.SYMP. ON TISSUE FACTORS IN THE  
HOMEOSTASIS OF THE COAGULATION FIBRINOLYSIS SYSTEM FLORENCE.

HODGE J.E (1953)  
AGR. FOOD. CHEM. 1, 928-943

HOLMQUIST W.R., SCHROEDER W.A. (1966)  
BIOCHEMISTRY. 5, 2489

HUGHES R.C. (1983)  
GLYCOPROTEINS 11-35. CHAPMAN AND ALL LONDON

JONES R.L., PETERSON C.M. (1979)  
J. CLIN. INVEST. 63, 485-493

JOVANOVIC M.D., PETERSON M.D. (1981)  
AM J. MED. 70, 331-332

KEENEY M., BASSETTE R. (1959)  
J.DAIRY. SCI 42, 945-960

KOENIG R.J., CERAMI A. (1977)  
J.BIOL. CHEM. 252, 2992-2997

KUNKEL H.G., WALLENUS G. (1955)  
SCIENCE. 122-282

KURACHI K., FUGIKAWA K., SCHEMER G., DAVIE E.W. (1976)  
BIOCHEMISTRY 15, 368-373

LAEMMLI U.K. (1970)  
NATURE 227, 680-685

LAURELL C.B (1966)  
ANAL. BIOCHEM. 15, 45-52

LEE J.H., SHIN D.K. 1984  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN 123, 2, 883-892

LONGAS M.O., FINLAY T.H. (1980)  
BIOCHEM. J. 189, 481-485

MC DONALD M.J., BLEICHMANN, BUNK H.F., NOBEL R.W. (1979)  
J. BIOL. CHEM. 254, 702-707

MC FARLAND K.F., CATALANO E.W., DAY J.F., THORPE E.R.,  
BAYNES J.W. (1979)  
DIABETES 28, 1011-1013

MACHOVICH R., BLASKO G., PALOS L.A. (1975)  
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 379, 193-200

MAILLARD L.C. (1912)  
COMPTE RENDU DE L'ACADEMIE DES SCIENCES PARIS. 154, 66-68.

MAHMOOD A., MAC INTOSH D.M., SHARPE A.G. (1967)  
BRIT. MED. J. 3, 653-654

MILLER. ANDERSON M., BORG H., ANDERSON L.O. (1974)  
THROMB. RES 5, 439-452

MELSTUEN G., ZYTKOWICZ T.H., HOWARD J.E. (1974)  
J. BIOL. CHEM. 249, 8347-8350

OEDGARD O.R. 1975  
THROMB. RES 7, 351

OEDGARD O.R., ABILDGAARD U., LIE M., MILLER ANDERSON M. (1977)  
THROMB. RES. 11, 205-211

OSTERUD B., MILLER ANDERSON M., ABILDGAARD U., PRYDZ H (1976)  
THROMB. HAEMOSTAS. 35, 295-304

OWEN W.G. (1975)  
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 405, 380-387

PETERSON T.E., DUDEK. WOJCIECHOWSKA G., SOTTRUP-JENSEN L.,  
MAGNUSSON S. (1979)  
THE PHYSIOLOGICAL INHIBITORS OF BLOOD COAGULATION AND  
FIBRINOLYSIS.  
COLLEM D., WIMAN B., VERSTRAETE EDS 43-45  
ELSEVIER, NORTH HOLLAND AMSTERDAM.

PONGOR S. ULRICH P.C, BENSCATH F.A., CERAMI A. (1984)  
PROD. NATL. ACAD. SCI 81, 2684-2688

PROCHOWNIK E.V., MARKHAM R.F., ORKIN S.H. (1983)  
J. BIOL. CHEM. 258, 13, 839-8394

RAHBAR S. (1968)  
CLIN. CHIM. ACTA. 22, 296-298



SCHLEICHER E., DEUFEL J. WIELAND O.H. (1961)  
FEBS. LETTERS. 228, 1-4

SCHNEK A.C., SCHROEDER W.A. (1961)  
J. AMER. CHEM. SOC. 83, 1472-1478

ROSA J., DREYFUS J.C. (1961)  
BULL. SOC. CHEM. BIOL. 43, 555-559

ROSA J., LABIE D. (1962)  
NATURE. 196, 639-645

ROSENBERG R.D. DAMUS P.S. (1973)  
J. BIOL. CHEM. 248, 19, 6490-6505

ROSENBERG N., MC KENNA P.W., ROSENBERG R.D. (1975)  
J. BIOL CHEM. 250, 8883-8888

STEAD W., KAPLAN A.P, ROSENBERG R.D. (1976)  
J. BIOL. CHEM. 251, 6481-6488

STEVENS V.J., ROUZER C.A., MONNIER V.M., LERAMI A. (1978)  
PROD NATL. ACAD. SCI. 75, 6, 2918-2922

TRUEB B. FLUCKIGER R., WINTERHALTER K.H. (1984)  
COLLAGEN. REL. RES. 4, 239-251

UY R., WOLD F. 1977  
SCIENCE. 198, 890-896

WEINTRAUB H., SERIES 79  
HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER SEATTLE, WASHINGTON.  
THE HARVEY LECTURES P. 217-245

WEINTRAUB H. (1983)  
CELL 32, 1191-1203

WEYMOUTH F.W. (1913)  
AMER. J. PHYSIOL. 32, 266-285

WITZLUM J.L., MAHONEY H.M., BRANKS M.J., FISHER M., ELAM R.,  
STEINBERG D. (1984)  
DIABETES 31, 283-290

WOLD F. (1981)  
ANN. REV. BIOCHEM. 50, 783-814