

Etude biochimique des composés radiosulfatés
dans la préhypophyse de Cyprin (*Carassius auratus* L.)
après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$.

par MARC DEMINATTI, PIERRE DEGAND et RAYMOND HAVEZ.

Des recherches antérieures (1*) nous ont permis de démontrer l'abondance de groupements SO_4 non libres dans les cellules préhypophysaires PAS +, BA + (Bleu Alcian) des différentes espèces étudiées : Cobaye, Souris, deux poissons, *Carassius auratus* L. et *Mollienisia sphenops* C.V. (2*).

L'étude biochimique que nous rapportons ici a eu pour but de rechercher la nature du ou des substrats auxquels sont fixés ces groupements SO_4 . Nous avons retenu pour cette étude le Cyprin (*Carassius auratus* L.) car les cellules BA⁺ représentent approximativement la moitié du parenchyme préhypophysaire. Nous avons en plus la certitude que, chez ce poisson, la totalité du ^{35}S décelé dans la préhypophyse après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ se trouve sous forme $^{35}\text{SO}_4$ lié (3*, 4*).

Méthodes et Résultats. — Les hypophyses de 200 cyprins sont prélevées 24 h après l'injection de 100 μC de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. Après élimination de la *pars intermedia* et de la plus grande partie de la *pars nervosa*, les *pars distalis* recueillies sont lyophilisées. Du cartilage est également prélevé chez ces poissons injectés : ce matériel nous permet d'obtenir un produit de référence riche en chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate marqués au $^{35}\text{SO}_4$. Pour cette analyse, nous avons utilisé les substances de référence suivantes : chondroïtine-sulfate et les glycopeptides bronchiques de caractère sulfaté (5*, 6*). Les tissus prélevés sont soumis à l'hydrolyse papainique et trypsique suivie d'une centrifugation (7 000 t/mn).

ETUDE DU SURNAGEANT. — Le surnageant est soumis à différents types de traitement.

1. Traitement au Rivanol à pH = 1,5 pour précipiter la totalité des polysaccharides sulfatés présents (5*). Le précipité est dissous dans une solution de NaCl à 5 % puis précipité par 4 volumes d'éthanol. Cette préparation, avec du chondroïtine-sulfate comme entraîneur, est

(1*) M. Deminatti, *Path. et Biol.*, 1962, t. 10, p. 425.

(2*) M. Deminatti, *C. R. Soc. Biol.*, 1963, t. 157, p. 1979.

(3*) M. Deminatti, *C. R. Soc. Biol.*, 1962, t. 156, p. 1924.

(4*) M. Deminatti, *C. R. Acad. Sci.*, 1963, t. 256, p. 4987.

(5*) R. Havez, M. Deminatti, P. Roussel, P. Degand, A. Randoux et G. Biserte, *Clin. Chim. Acta*, 1967, t. 17, p. 463.

(6*) R. Havez, M. Deminatti, P. Roussel, P. Degand, A. Randoux et G. Biserte, *C. R. Acad. Sci.*, 1967, t. 264, p. 1527.

reprise dans de l'eau distillée et étudiée en électrophorèse sur papier (tampon pyridine - acide acétique pH = 3,9). La radioactivité est détectée par autoradiographie et le chondroïtine - sulfate est révélé par la coloration au bleu de toluidine. On caractérise sur l'électrophorégramme une seule zone de radioactivité de mobilité nettement inférieure à celle du chondroïtine - sulfate.

2. Fractionnement par chromatographie sur colonne de Biogel P 20 avec un entraîneur constitué de glycosamino-glycanes sulfatés d'origine bronchique humaine (5*) (poids moléculaire supérieur à 25.000)

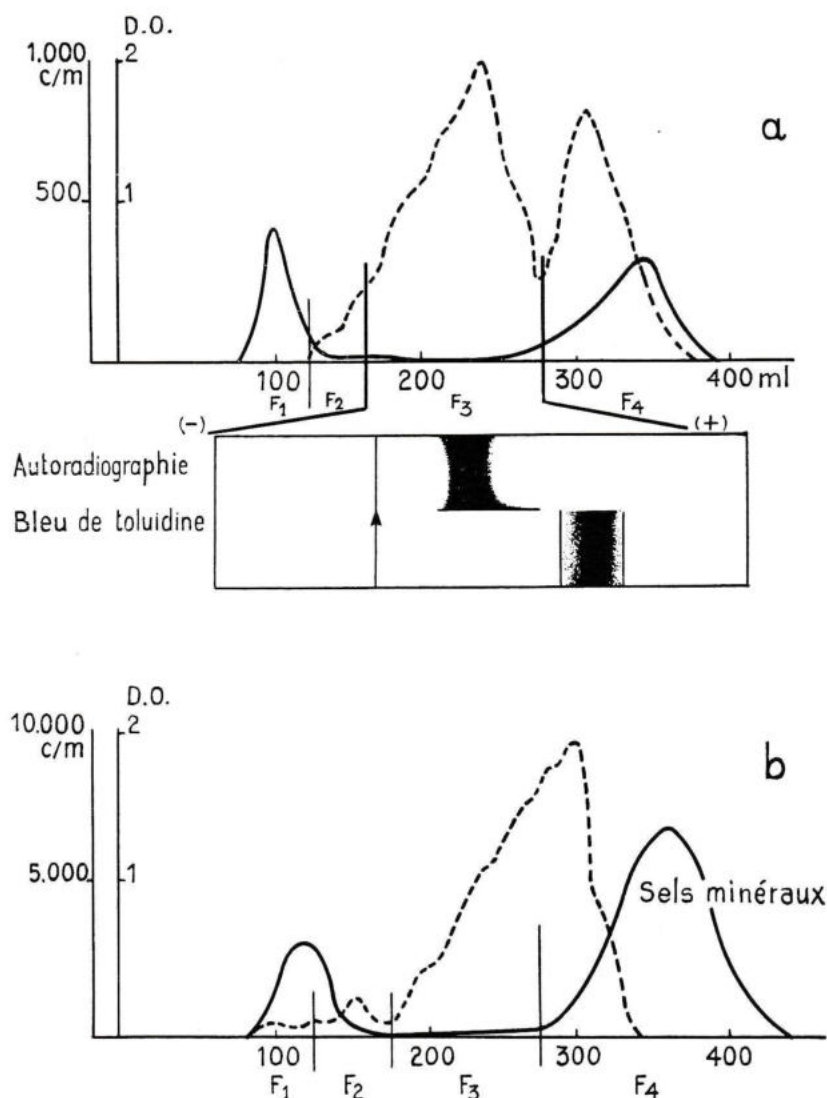


Fig. 1. — Etude comparative des chromatographies de gel-filtration sur Biogel — P 20 d'hydrolysats préhypophysaires et de cartilage de Cyprin.

a. Dans l'hydrolysat préhypophysaire, on caractérise deux fractions très radioactives : la fraction 3, riche en glucides combinés, a un poids moléculaire faible ; son étude électrophorétique et autoradiographique indique si elle a une mobilité plus lente que le chondroïtine-sulfate coloré au bleu de toluidine ; la fraction 4 correspond à des ions SO_4 libres, des oligopeptides, oligosaccharides et des sels minéraux.

b. Dans l'hydrolysat de cartilage, les mucopolysaccharides - peptides (chondroïtine - sulfate et kératine - sulfate) sont, comme ci-dessus, obtenus dans la fraction 3.

— 278 $m\mu$; - - - - - radioactivité.

et une préparation de chondroïtine - sulfate - peptides. Les fractions éluées par l'eau distillée sont identifiées par lecture des variations de densité optique à 278 nm, pour le repérage de fractions de nature glucidique et la mesure de la radioactivité est réalisée à l'aide de l'appareil Tri-Carb Packard. On obtient 4 fractions (fig. 1). La fraction correspond aux glycopeptides d'origine bronchique qui absorbent à 278 nm. Les chondroïtine-sulfate - peptides de tailles variables et inférieures à 25.000 sont éluées plus tardivement : ce sont les fractions 2 et 3. La fraction 4 correspond aux peptides et aux sels minéraux de l'hydrolysate. Deux pics de radioactivité sont obtenus, l'un (F_3) correspond à une fraction de poids moléculaire voisin de celle des chondroïtine - sulfate - peptides, l'autre (F_4) peut être identifié à un excès de radiosulfate libre.

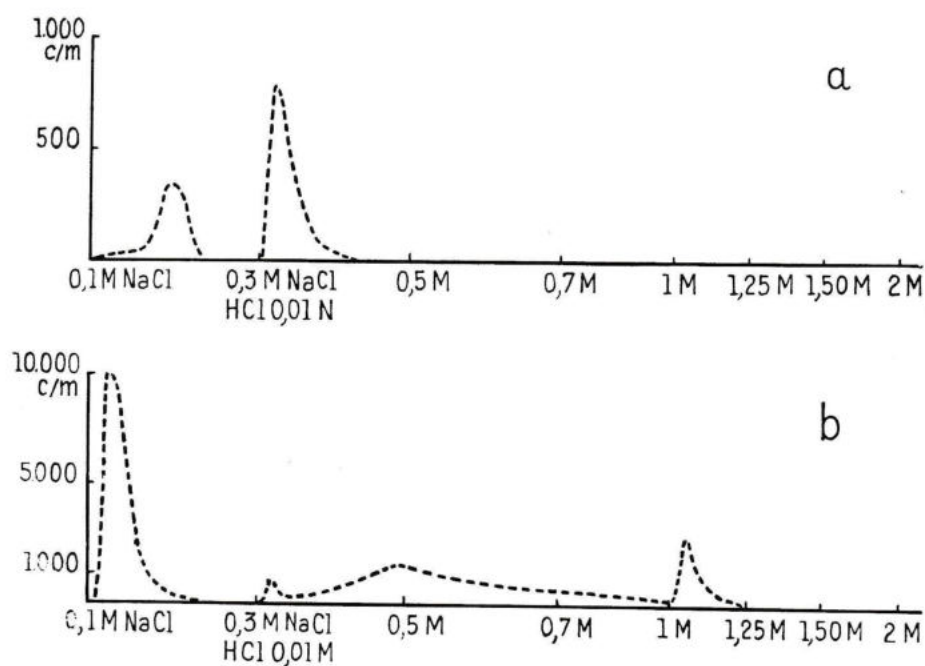


Fig. 2. — Etude comparative des chromatographies sur DEA - Sephadex A 25 d'hydrolysats préhypophysaires et de cartilage de Cyprin.

a. Hydrolysate préhypophysaire dont une fraction de caractère neutre très peu radioactive est éluée en 0,1 M NaCl. La fraction majeure radioactive est obtenue en 0,3 M NaCl et son comportement s'apparente à celui du kératane - sulfate témoin de l'hydrolysate du cartilage.

b. Dans l'hydrolysate de cartilage on trouve, en plus, des mucopolysaccharides sulfatés riches en groupements sulfates qui sont élués plus tardivement (chondroïtine - sulfate essentiellement).

----- radioactivité enregistrée sur appareil Tri-card Packard.

Les fractions obtenues sont lyophilisées et soumises séparément à une électrophorèse sur papier dans les conditions précédemment décrites. La radioactivité est détectée par autoradiographie et les bandes de papier sont colorées au bleu de toluidine. Dans la fraction 3, on observe une zone radioactive, très homogène, de mobilité électrophorétique inférieure à celle de l'entraîneur chondroïtine - sulfate - peptide témoin (fig. 3). Cette zone correspond à un glycopeptide sulfaté, de caractère moins acide que le chondroïtine - sulfate témoin.

Deux zones radioactives sont révélées par l'étude électrophorétique de la fraction 4 : une zone mineure de migration rapide qui correspond à du radiosulfate libre ; l'autre zone, de mobilité électrophorétique voisine de celle de la fraction 3, est plus diffuse. Elle s'identifie à un glycopeptide de poids moléculaire inférieur au précédent. L'addition d'une solution à 1 % de chlorure de cétypyridinium (CPC) en milieu NaCl 0,15 M (5*) à la fraction 3 précipite le chondroïtine-sulfate et entraîne la totalité de la radioactivité, ce qui confirme le caractère glycopeptidique de ces composants préhypophysaires riches en $^{35}\text{SO}_4$.

3. Fractionnement par chromatographie sur micro-colonne DEAE-Sephadex A 25 (fig. 2). — Le surnageant de l'hydrolysate est traité par 4 volumes d'éthanol. Le précipité est mis en solution dans 1 ml d'eau distillée et déposé sur une colonne de DEAE-Sephadex A 25 équilibrée par une solution de NaCl 0,1 M. L'élution de ce matériel déposé (précipité éthanolique additionné d'entraîneurs) est conduite en gradients discontinus avec des solutions HCl 0,01 N de molarité croissante en NaCl (0,1 M, 0,3 M, 0,7 M, 1,0 M). Une mesure de la radioactivité est pratiquée à l'aide de l'appareil Tri-Carb Packard sur les fractions ainsi éluées. Nos études (5*), réalisées sur diverses préparations de polysaccharides-peptides, nous ont permis de constater que le kératane-sulfate et les glycopeptides sulfatés des sécrétions bronchiques sont élués en présence de solution de concentration en NaCl de 0,3 M, les chondroïtines-sulfates avec des solutions de concentrations en NaCl de 0,7 M ou de 1,0 M, l'héparine avec des solutions de NaCl 1,5 M et 2,0 M.

Des préparations préhypophysaires ainsi traitées, nous avons pu éluer deux pics de radioactivité : l'un en HCl 0,01 N, NaCl 0,1 M, le second en HCl 0,01 N, NaCl 0,3 M (5*). Les glycopeptides sulfatés libérés par hydrolyse de la préhypophyse ont donc un comportement analogue à celui des glycosaminoglycanes sulfatés du type kératane-sulfate ou glycopeptides sulfatés des sécrétions muqueuses épithéliales (5*, 6*). Ces résultats confirment donc ceux de l'électrophorèse sur papier (tampon pH = 3,9).

ETUDE DU RÉSIDU D'HYDROLYSE. — Le résidu d'hydrolyse obtenu par centrifugation de l'hydrolysate est soumis à une première délipidation par l'acétone. L'extrait acétonique est étudié en chromatographie (solvant chloroforme/méthanol/eau : 65/25/4) sur couche mince de gel de silice qui permet de séparer les lipides par ordre de mobilité décroissante. L'autoradiographie du chromatogramme permet d'identifier trois composants radioactifs qui se localisent dans la région de Rf analogue à celui des sphingomyélines. La révélation à l'iode du chromatogramme montre la présence de trois fractions majeures non radioactives correspondant aux lipides neutres, acides gras libres et cérobroside et d'autres fractions correspondant aux cérobro-sulfatides, céphalines, lécithines et lysolécithines. Nous n'avons pu préciser la nature exacte des fractions radioactives.

Une seconde délipidation du résidu d'hydrolyse par le mélange chloroforme-méthanol (2:1) n'entraîne pas de radioactivité. Le résidu ainsi délipidé est soumis à une hydrolyse par la pronase. L'hydrolysate est déposé sur une colonne de Biogel P 20 avec du chondroïtine-sulfate comme entraîneur. Les fractions sont séparées, lyophilisées et étudiées

par électrophorèse en agarose à pH = 8,2. Les autoradiographies et la coloration au bleu de toluidine permettent de caractériser une fraction radioactive qui possède une mobilité identique à celle du chondroïtine - sulfate ajouté à l'hydrolysate.

Conclusions. — Dans la préhypophyse du Cyprin, 24 h après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, on note la présence de composants radioactifs de poids moléculaire inférieur à 20.000, libérés par l'hydrolyse trypsique et papaïnique, qui possèdent les caractéristiques de polysaccharide sulfaté ou de glycopeptide sulfaté et dont la mobilité électrophorétique est inférieure à celle du chondroïtine - sulfate en tampon pH = 3,9.

Après délipidation du résidu d'hydrolyse, une faible radioactivité peut être extraite, qui migre dans la région de Rf analogue à celle des shingomyélines.

Après une deuxième délipidation et hydrolyse pronasique, on libère du résidu de l'hydrolyse trypsique et papaïnique une quantité peu importante de polysaccharides sulfatés radioactifs dont la vitesse de migration en agarose (pH = 8,2) est identique à celle du chondroïtine-sulfate.

La présence de polysaccharides sulfatés ou de glycopeptides sulfatés est en accord avec l'étude histoautoradiographique et les propriétés histochimiques (PAS+, BA+) de ces cellules préhypophysaires.

(Département des Applications biologiques du Centre de Recherches nucléaires de Strasbourg - Cronembourg et Unités des Protéines de l'INSERM (n : 16) [Directeur : M. P. Boulanger], Faculté de Médecine, Lille).
