

CHROM. 8256

ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE DES GLYCOSAMINOGLYCANES-PEPTIDES

APPLICATION AU FRACTIONNEMENT DES GLYCOSAMINOGLYCANES-PEPTIDES DE LA PAROI ARTÉRIELLE

B. HERMELIN, E. DEUDON, A. BRUEL-GROLEAS et J. PICARD

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Saint Antoine, 27 Rue de Chaligny, 75571 Paris Cedex 12 (France)

(Reçu le 30 décembre 1974; manuscrit modifié reçu le 13 février 1975)

SUMMARY

Preparative electrophoresis of peptidic glycosaminoglycans. Application to the fractionation of peptidic glycosaminoglycans of arterial wall

A new procedure for the fractionation of glycosaminoglycans by electrophoresis on Pevikon has been described. Mixtures of glycosaminoglycans were fractionated by preparative electrophoresis on Pevikon in pyridine formate or glycine-HCl buffers. By this procedure, 200 mg of a mixture of hyaluronic acid, heparan sulphate, dermatan sulphate and chondroitin sulphate isolated from arterial wall could be successfully separated without loss of material. The purified fractions were analysed by enzymatic and chemical procedures. The molar ratios of uronic acid to hexosamine and of sulphate to hexosamine and the amino acid content of each glycosaminoglycan have been determined. The peptidic content (less than 1%) is represented by five amino acids, *viz.* serine, glycine, alanine, aspartic acid, and glutamic acid.

INTRODUCTION

De nombreuses méthodes analytiques permettent de caractériser les différents glycosaminoglycans mais la préparation de ces substances à l'état pur se révèle souvent laborieuse. Des méthodes préparatives ont été préalablement envisagées par fractionnement sur colonne de cellulose¹, ECTEOLA-cellulose^{2,3,21} et DEAE-cellulose^{4,5}. Ces méthodes ont été décrites avec succès pour l'isolement des glycosaminoglycans de cartilage, tissu ne renfermant que deux types différents de glycosaminoglycans. Ces méthodes sont difficiles à utiliser dans le cas de tissus se distinguant par une grande variété dans leur composition en glycosaminoglycans. L'abondance des fractions obtenues ne permet pas d'obtenir avec un bon rendement des glycosaminoglycans à l'état pur.

Pour ces raisons, nous nous sommes proposés de décrire une méthode de fractionnement électrophorétique permettant d'obtenir avec un rendement satisfaisant des glycosaminoglycanes à partir de mélanges complexes tels que la paroi artérielle en renferme. En outre, dans toutes les méthodes de fractionnement décrites, les différents glycosaminoglycanes présents dans les fractions étaient identifiés par des méthodes souvent peu spécifiques et les déterminations des rapports hexosamines/acides uroniques ne pouvaient constituer des critères de pureté satisfaisants. Dans le présent travail, au cours du fractionnement nous avons eu recours à des tests enzymatiques spécifiques pour l'identification de nos produits.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des glycosaminoglycanes-peptides

Les artères aortes de porc sont prélevées, lavées dans une solution de NaCl à 0.9%. Les différentes tuniques (média-intima, adventice) sont séparées. Les tissus finement coupés sont délipidés à $+4^{\circ}$ par lavage dans trois bains d'acétone. Les glycosaminoglycanes-peptides sont obtenus après digestion protéolytique de la poudre acétonique par la pronase: 1 g pour 100 g de tissu sec en 0.1 M Tris-0.004 M CaCl_2 (pH 8.5) à 56° .

La digestion s'effectue pendant 96 h; l'enzyme est renouvelé toutes les 24 h. Ce temps d'hydrolyse a été retenu après une étude cinétique systématique de la dégradation des protéoglycanes par la pronase.

Après inactivation de l'enzyme par la chaleur, le milieu de protéolyse est centrifugé puis dialysé contre de l'eau courante et de l'eau distillée. Les glycosaminoglycanes-peptides sont ensuite précipités par le chlorure de cétyle-pyridinium à la concentration finale de 1% en 0.03 M NaCl. Le précipité est solubilisé en 1.25 M NaCl-0.3% CPC. Les glycosaminoglycanes-peptides sont alors précipités par trois volumes d'éthanol pendant une nuit à $+4^{\circ}$ en présence d'acétate de sodium à 5%.

Séparation des glycosaminoglycanes-peptides

Dans un but préparatif, les glycosaminoglycanes-peptides sont fractionnés par électrophorèse sur un copolymère de chlorure de polyvinyle et d'acétate de polyvinyle (Pévikon).

Préparation du support électrophorétique

Le Pévikon est mis en suspension dans de l'eau distillée préalablement chauffée à 50° . Après décantation, le surnageant est prélevé par aspiration. L'opération est renouvelée plusieurs fois de manière à assurer une granulation homogène. Après la dernière décantation, le Pévikon étalé sur plusieurs épaisseurs de papier filtre est séché à l'étuve à 37° . Le Pévikon séché est mis en suspension dans le tampon quelques heures avant l'utilisation. Après décantation, l'excès de tampon est prélevé par aspiration. Le Pévikon est alors étalé sur la plaque réfrigérée d'un appareil d'électrophorèse à haut voltage de type Pherograph.

Le support électrophorétique ainsi constitué mesure 350 mm de long sur 150 mm de large et 15 mm d'épaisseur. Une gouttière de 50 mm de long sur 10 mm de large et 10 mm d'épaisseur est creusée à 100 mm de l'extrémité cathodique de la plaque. Dans cette gouttière est déposée la solution de glycosaminoglycanes à

séparer préalablement reprise par du Pévikon sec. Latéralement et dans le prolongement de cette gouttière sont également creusées deux gouttières annexes de 10 mm de long sur 10 mm de large et 10 mm d'épaisseur destinées à recevoir les glycosaminoglycanes marqueurs préparés selon le protocole décrit ci-dessous.

Préparation des marqueurs colorés

La migration électrophorétique est conduite en présence de marqueurs colorés. Dans le cas présent ce seront des glycosaminoglycanes d'aorte préparés selon la méthode de Dudman et Bishop⁶. À cette fin 10–20 mg de glycosaminoglycanes totaux isolés de paroi artérielle sont colorés par le rouge procion (I.C.I., Macclesfield, Grande Bretagne) soumis à une gel filtration sur Sephadex G-25 pour éliminer l'excès de colorant et les sels, comme cela a été décrit par ailleurs⁷. Les glycosaminoglycanes ainsi colorés sont concentrés. Leur mobilité électrophorétique reste inchangée après coloration.

Modalités de l'électrophorèse

L'électrophorèse est effectuée à 0° sous une différence de potentiel de 600 V pendant 5 h dans les systèmes tampons suivants: glycolle-HCl, 0.05 M, pH 2.0; acétate de baryum, 0.015 M, pH 7.0; formate de pyridine, 0.05 M, pH 2.3. Le dépôt de glycosaminoglycanes totaux est compris entre 50 et 100 mg. La présence de marqueurs colorés déposés latéralement permet de suivre aisément la migration.

Après migration, la plaque de Pévikon est découpée par zones de 1 cm de largeur. Les glycosaminoglycanes sont élués par de l'eau distillée. Le Pévikon est alors éliminé par filtration sur verre fritté. Les solutions aqueuses de glycosaminoglycanes sont alors évaporées à sec et pour chacune d'entre elles des contrôles analytiques sont effectués.

Identification des glycosaminoglycanes

L'identification des glycosaminoglycanes et le contrôle de leur pureté s'effectuent par des analyses électrophorétiques associés à des tests enzymatiques par des mucopolysaccharidases spécifiques —hyaluronidase et chondroïtinase— selon la technique précédemment décrite^{8,9}.

Hydrolyse par l'hyaluronidase

Elle s'effectue dans les conditions expérimentales décrites par Thunell¹⁰. L'incubation a lieu en présence d'hyaluronidase (Sigma, St. Louis, Mo., États Unis; Type I) dans 80 μ l d'une solution tampon de MacIlvaine à pH 7 contenant entre 20 et 50 μ g de glycosaminoglycanes à identifier. L'hydrolyse est effectuée à 37° pendant 2 h; un tube témoin ne contenant pas l'enzyme est incubé dans les mêmes conditions.

Hydrolyse par les chondroïtinases

La digestion par ces enzymes est réalisée dans les conditions expérimentales décrites par Yamagata *et al.*¹¹. Le milieu d'incubation est constitué par 10 μ l d'une solution de tampon Tris enrichi à pH 8.0 à laquelle sont ajoutés 25–60 μ g de glycosaminoglycanes, et 0.1 unité de chondroïtinase. L'incubation, dont le volume final ne dépasse pas 100 μ l, est réalisée à 37° pendant 30 min. Un tube témoin sans enzyme est incubé dans les mêmes conditions.

Analyse des constituants glucidiques et peptidiques

Constituants glucidiques. Les concentrations en hexosamines, acides uroniques et sulfates sont déterminées pour chacun des glycosaminoglycanes-peptides. Les acides uroniques sont dosés par la méthode au carbazol de Dische¹². Les hexosamines sont dosées après une hydrolyse réalisée en 4 *N* HCl, 4 h à 100° selon la méthode modifiée d'Elson et Morgan¹³. Les sulfates sont dosés après une hydrolyse réalisée en 4 *N* HCl, 4 h à 100° selon la méthode de Terho et Hartiala¹⁴.

Constituants peptidiques. Les amino acides sont dosés après une hydrolyse acide en 6 *N* HCl, 100° durant 24 h, sur un analyseur Beckman Unichrom selon la technique de Devenyi¹⁵.

Détermination des masses moléculaires

Les masses moléculaires des différents glycosaminoglycanes ont été déterminées selon la méthode de Mathews et Decker¹⁶. L'électrophorèse a été réalisée dans un gel de polyacrylamide à 5% en tampon 0.05 *M* phosphate à pH 8.0 pendant 4 h, 5 mA par gel. Des glycosaminoglycanes-peptides de masses moléculaires connues, généreusement donnés par Mathews et Decker, sont pris comme référence.

Après électrophorèse, les gels sont colorés par une solution aqueuse au bleu d'Alcian 0.5% (w/v) contenant 3% (v/v) d'acide acétique pendant 1 h. La décoloration s'effectue pendant 15 h dans une solution d'acide acétique à 7% (v/v).

RÉSULTATS

Profil d'éluion des glycosaminoglycanes d'aorte sur Pévikon

La séparation des glycosaminoglycanes, effectuée par électrophorèse préparative sur Pévikon dans les différents systèmes tampons, donne par ordre de mobilité croissante: l'acide hyaluronique, l'héparane sulfate, le dermatane sulfate puis les chondroïtines sulfates A et C, dont les mobilités relatives par rapport au chondroïtine sulfate sont respectivement 0.19, 0.53 et 0.75.

La Fig. 1 représente le profil d'éluion des différents glycosaminoglycanes-peptides de la média de paroi artérielle de porc. Une seule électrophorèse préparative réalisée en tampon glycolle-HCl nous permet de séparer les trois principaux glycosaminoglycanes de la média.

Le dermatane sulfate étant présent à l'état de traces dans la média aortique de porc, il est préférable de s'adresser à l'adventice pour préparer ce glycosaminoglycane avec de bons rendements. La Fig. 2 montre l'obtention du dermatane sulfate à partir d'un mélange de glycosaminoglycanes d'adventice.

Contrôle de la pureté des fractions

Les différentes fractions isolées après électrophorèse préparative ont été systématiquement soumises à des contrôles enzymatiques et à des analyses chimiques. Pour contrôler leur pureté, ces fractions ont été mises en présence des diverses mucopolysaccharidases: chondroïtinase AC, chondroïtinase ABC et hyaluronidase. Des électrophorèses analytiques sur cellogel ont été pratiquées avant et après l'action des enzymes sur ces fractions. La Fig. 3 montre les résultats de cette étude.

Des fractions pures ne renfermant qu'un seul glycosaminoglycane sont obtenues avec des rendements satisfaisants. Le Tableau I montre qu'après une électro-

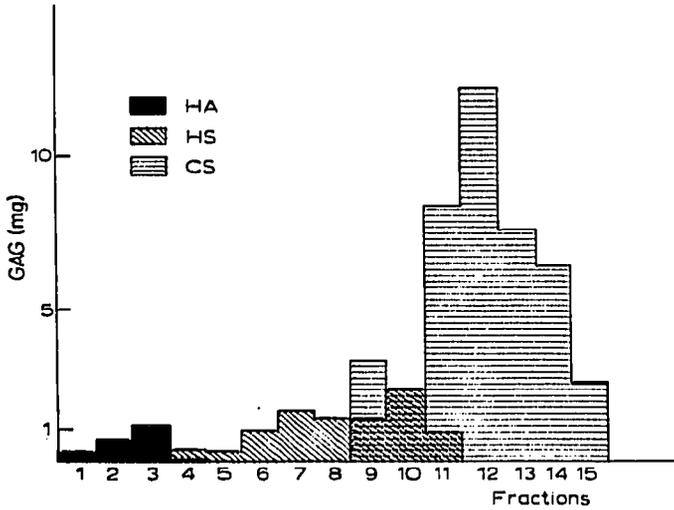


Fig. 1. Profil d'éluion des glycosaminoglycanes (GAG) de média d'aorte de porc sur Pévikon. HA = Acide hyaluronique; HS = héparane sulfate; CS = chondroïtine sulfate.

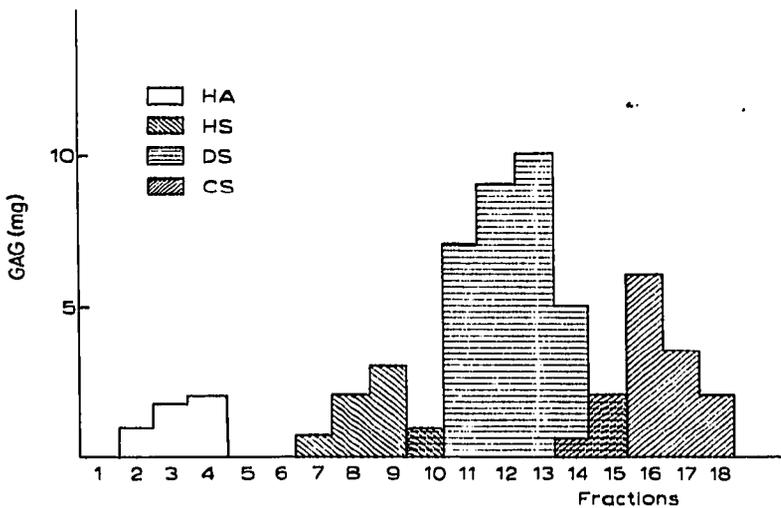


Fig. 2. Profil d'éluion des glycosaminoglycanes (GAG) d'adventice d'aorte de porc sur Pévikon. HA = Acide hyaluronique; HS = héparane sulfate; DS = dermatane sulfate; CS = chondroïtine sulfate.

phorèse préparative les glycosaminoglycanes-peptides sont récupérés avec un rendement qui peut atteindre 90%. Plus de 60% de chacun des glycosaminoglycanes est obtenu à l'état pur.

Caractéristiques chimiques des glycosaminoglycanes

Pour chaque type de glycosaminoglycane répondant aux critères de pureté électrophorétique et enzymatique décrits précédemment, les principales caractéristiques chimiques de composition ont été précisées.

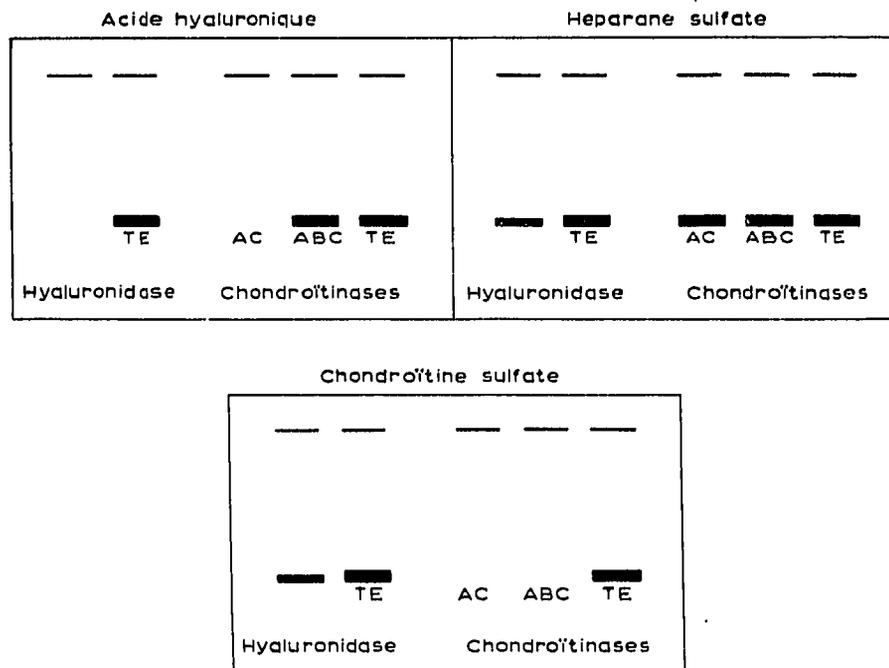


Fig. 3. Electrophorèses sur cellogel des glycosaminoglycannes d'aorte de porc séparés sur Pévikon après action des mucopolysaccharidases.

TABLEAU I

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE PRÉPARATIF DES GLYCOSAMINOGLYCANNES DE MÉDIA AORTIQUE DE PORC

(I) Proportions relatives des différents glycosaminoglycannes exprimées en mg pour 100 mg d'un mélange. (II) Récupération des glycosaminoglycannes après électrophorèse sur Pévikon; (a) en mg pour 100 mg du mélange, (b) rendement relatif (%) à chaque glycosaminoglycane. (III) Quantité de glycosaminoglycannes obtenus à l'état pur: (a) en mg pour 100 mg du mélange, (b) rendement relatif (%) à chaque glycosaminoglycane.

Glycosaminoglycane	I		II		III	
	a	b	a	b	a	b
Acide hyaluronique	5	4.6	92	4	87	
Héparane sulfate	21	17	81	8	47	
Chondroïtine sulfate	74	70	94.5	42	67	

Composition en hexosamine, acide uronique et sulfate des chaînes de glycane.

La composition en acide uronique, hexosamine et sulfate figure sur le Tableau II. Les résultats indiquent que les rapports molaires acide uronique/hexosamine sont tous voisins de l'unité. Seul l'héparane sulfate présente un rapport plus élevé égal à 1.5 en accord avec des déterminations récentes¹⁷. Le rapport molaire sulfate/hexosamine est voisin de l'unité pour l'héparane sulfate et le chondroïtine sulfate. Il est légèrement plus faible pour le dermatane sulfate.

TABLEAU II

COMPOSITION EN HEXOSAMINE, ACIDE URONIQUE ET SULFATE DES DIFFÉRENTS GLYCOSAMINOGLYCANES ISOLÉS DE L'ARTÈRE AORTE DE PORC APRÈS SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE SUR PÉVIKON

<i>Glycosaminoglycane</i>		<i>Hexosamine</i>	<i>Acide uronique*</i>	<i>Sulfate*</i>	<i>Hexosamine**</i>	
					<i>Glc N</i>	<i>Gal N</i>
<i>Artère aorte</i>	<i>Cartilage</i>					
Acide hyaluronique		1	1,05	0	95,4	4,6
Héparane sulfate		1	1,50	0,93	97,4	2,6
Dermatane sulfate		1	1,07	0,70	2,0	98,0
Chondroïtine sulfate		1	0,87	0,98	2,0	98,0
	Chondroïtine sulfate	1	1,09	0,94	2,4	97,6

* Les résultats sont exprimés en mole pour une mole d'hexosamine.

** Proportions relatives des deux hexosamines après identification et dosage à l'auto analyseur Beckman. Les résultats sont exprimés en moles pour 100 moles du mélange des deux hexosamines.

L'hexosamine de l'acide hyaluronique et de l'héparane sulfate est représentée à plus de 98 % par la glucosamine. La galactosamine caractérise le chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate.

Composition en acides aminés. La composition en acides aminés est indiquée sur le Tableau III. Elle reste très voisine quelque soit le type de glycosaminoglycane considéré. Elle est caractérisée par une forte proportion en glyco-colle (un acide aminé sur 3 ou 4), en sérine (un acide aminé sur 5), en acide aspartique, acide glutamique et alanine (un acide aminé sur 10). Il n'y a pas d'acides aminés soufrés, et en général peu d'acides aminés basiques et aromatiques. Toutefois l'acide hyaluronique et l'héparane sulfate renferment une lysine pour dix acides aminés et le chondroïtine sulfate contient une phénylalanine pour six acides aminés.

Sur le Tableau III figure, à titre de comparaison, les compositions en acides aminés des chondroïtines sulfates de cartilage de porc et de rat préparés au laboratoire par la même méthode de fractionnement. La composition en acides aminés des glycosaminoglycanes varie peu selon la nature et l'origine tissulaire du glycosaminoglycane.

Peu de variations importantes sont notées en fonction de l'espèce, la composition en acides aminés des chondroïtines sulfates de cartilage de porc et de rat étant très voisines (voir Tableau III). Pour tous ces glycosaminoglycanes-peptides, l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique, le glyco-colle et l'alanine représentant près de 80 % des résidus d'acides aminés.

Néanmoins, le contenu peptidique de ces glycosaminoglycanes reste faible; pour 100 moles d'hexosamine, l'héparane sulfate et le dermatane sulfate renferment 5 moles d'acides aminés et le chondroïtine sulfate 2.

Ces résultats montrent la présence dans l'acide hyaluronique d'un résidu peptidique dont la composition est proche de celle des autres résidus peptidiques des différents glycosaminoglycanes-peptides. Ces résultats sont en accord avec la présence d'un hyaluronate protéine dans le tissu conjonctif¹⁸.

Détermination des masses moléculaires

L'analyse des glycosaminoglycanes préalablement séparés par électrophorèse

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES DIFFÉRENTS GLYCOSAMINOGLYCANES ISOLÉS DE L'ARTÈRE AORTE DE PORC ET DES CHONDROÏTINES SULFATES DE CARTILAGE DE PORC ET DE RAT APRÈS SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE SUR PÉVIKON

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus.

Acide aminé	Glycosaminoglycane d'artère aorte de porc				Chondroïtine sulfate de cartilage	
	Acide hyaluronique	Héparane sulfate	Dermatane sulfate	Chondroïtine sulfate	Porc	Rat
Asp	11.0	10.9	6.1	8.5	5.1	6.9
Thr	6.4	6.1	3.1	5.6	2.8	4.5
Ser	12.9	17.3	15.0	20.5	43.0	40.2
Glu	10.3	13.2	10.0	10.1	9.5	8.2
Pro	5.3	—	5.5	—	6.0	6.1
Gly	23.4	26.4	28.3	30.0	18.4	18.0
Ala	9.6	10.5	11.5	8.6	4.0	4.6
Val	6.5	5.2	3.2	—	—	—
Leu	3.8	3.6	2.5	—	4.5	4.8
Phe	—	—	7.3	14.0	4.5	4.7
Lys	10.8	10.5	1.8	3.0	2.5	2.0

préparative a été complétée par la détermination de leurs masses moléculaires qui figurent sur le Tableau IV. On voit que la masse moléculaire du chondroïtine sulfate de média artérielle est deux fois supérieure à la masse moléculaire du chondroïtine sulfate de cartilage préparée par la même méthode. La masse moléculaire de l'acide hyaluronique, supérieure à 90,000, ne peut être déterminée avec précision.

TABLEAU IV

MASSES MOLÉCULAIRES DES GLYCOSAMINOGLYCANES ISOLÉS D'ARTÈRE AORTE DE PORC ET DE CARTILAGE DE PORC ET DE RAT

Glycosaminoglycane	Masse moléculaire (daltons)
Héparane sulfate média	38,000
Dermatane sulfate adventice	16,000
Chondroïtine sulfate média	25,000
Chondroïtine sulfate cartilage (porc)	13,000
Chondroïtine sulfate cartilage (rat)	11,000

DISCUSSION

La présence de mélanges de glycosaminoglycanes dans le tissu conjonctif rend difficile la séparation de ces macromolécules. Si ces difficultés ont été surmontées d'un point de vue analytique⁶, peu de méthodes préparatives apparaissent satisfaisantes. C'est ainsi que les méthodes chromatographiques sur DEAE-cellulose^{4,5} ou sur colonne d'ECTEOLA-cellulose^{2,3} ne présentent une bonne résolution que pour des quantités de produit n'excédant pas 5 mg. La méthode chromatographique sur colonne de CPC-cellulose proposée par Thunell *et al.*¹ a été appliquée à la séparation d'un mélange ren-

fermant 100 mg de glycosaminoglycanes aortiques¹⁹. Dans ces conditions, il est impossible d'obtenir à l'état pur l'héparane sulfate malgré l'importance quantitative de ce composé au niveau de la paroi artérielle.

La méthode proposée par électrophorèse préparative sur Pévikon présente l'avantage d'obtenir une séparation de tous les constituants d'un mélange de 200 mg de glycosaminoglycanes de paroi artérielle. Elle présente en outre une résolution et un rendement satisfaisants. Elle offre les mêmes avantages lorsqu'elle est appliquée à la séparation d'un mélange de glycosaminoglycanes n'excédant pas 10 mg.

Une seule électrophorèse préparative nous permet d'obtenir à l'état pur les quatre types de glycosaminoglycanes présents au niveau de la paroi artérielle. L'application de cette méthode à des fractionnements de glycosaminoglycanes provenant d'autres formations conjonctives nécessite des vérifications préalables. En effet la densité de charges anioniques d'un glycosaminoglycane peut subir des variations selon l'origine tissulaire du composé. Cette méthode d'exécution aisée est rapide et reproductible. L'identification et le contrôle de la pureté de nos produits ont été facilités par l'emploi de l'analyse électrophorétique sur cellogel associé à des tests enzymatiques et à des déterminations chimiques.

L'étude des principales caractéristiques chimiques des glycosaminoglycanes ainsi isolés, en particulier les rapports molaires acide uronique/hexosamine et sulfate/hexosamine, est en accord avec les données structurales proposées par différents auteurs²⁰.

Le résidu peptidique de tous ces glycosaminoglycanes est principalement représenté par cinq acides aminés: acide aspartique, sérine, acide glutamique, glyco-colle et à l'alanine totalisant à eux seuls 80% des résidus d'acides aminés. Les proportions élevées de ces acides aminés retrouvées par ailleurs par d'autres auteurs²²⁻²⁴ plaident en faveur d'une séquence, Glu-Gly-Ser-Gly^{25,26}, envisagée au voisinage de la liaison O-glycosidique.

Nos résultats mettent aussi en évidence la présence d'un hyaluronate peptide dont l'existence dans les tissus conjonctifs n'a été que récemment évoquée¹⁸.

Bien que la détermination des masses moléculaires des glycosaminoglycanes ne puisse être déterminée avec précision, comme dans le cas des protéines, Mathews a montré que les méthodes habituellement utilisées dans l'étude des masses moléculaires des glycosaminoglycanes (gel filtration, électrophorèse en gel de polyacrylamide) donnent des résultats concordants. Ces méthodes ont été discutées dans un précédent travail dans le cas de diverses mucines⁷.

Les résultats que nous nous avons obtenus sont en accord avec les estimations habituelles des masses moléculaires des glycosaminoglycanes. Il faut remarquer en outre, que la masse moléculaire de l'acide hyaluronique est, comme usuellement, beaucoup plus élevée que celle des autres glycosaminoglycanes.

Les données analytiques rassemblées dans ce travail sont en faveur de la pureté des produits obtenus et justifient l'utilisation de cette méthode électrophorétique dont les avantages ont été rappelés.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été subventionné par la D.G.R.S.T. (Contrats No. 71.7.2720.01 et 74.7.0272) et par l'I.N.S.E.R.M. (Contrat No. 72.2424.7).

RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode de fractionnement est proposée pour préparer les différents glycosaminoglycanes par électrophorèse sur Pévikon. Par cette méthode, 200 mg d'un mélange de glycosaminoglycanes contenant de l'acide hyaluronique, de l'héparane sulfate, du dermatane sulfate et du chondroïtine sulfate peuvent être séparés avec une résolution et un rendement satisfaisants. La pureté de chacune des fractions a été contrôlée par des procédés chimiques et enzymatiques. Les rapports molaires acide uronique/hexosamine, sulfate/hexosamine et le contenu en acides aminés ont été déterminés. Le résidu peptidique inférieur à 1 % est représenté par cinq acides aminés principaux: la sérine, le glycocolle, l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. Thunell, C. A. Antonopoulos et S. Gardell, *J. Atheroscler. Res.*, 7 (1967) 283.
- 2 C. A. Antonopoulos, L. A. Fransson, D. Heinegard et S. Gardell, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 158.
- 3 N. R. Ringertz et P. Reichard, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 1467.
- 4 A. Hallén, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 83.
- 5 M. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 346.
- 6 W. C. Dudman et C. T. Bishop, *Can. J. Chem.*, 46 (1968) 3079.
- 7 J. Picard, A. Paul Gardais et M. Vedel, *Biochim. Biophys. Acta*, 320 (1973) 427.
- 8 A. Gardais, J. Picard et C. Tarasse, *J. Chromatogr.* 42 (1969) 396.
- 9 A. Gardais, J. Picard et B. Hermelin, *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 44 (1973) 507.
- 10 S. Thunell, *Acta Univ. Lund., Sect. 2*, No. 9 (1967) 1.
- 11 T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi et S. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1523.
- 12 Z. Dische, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 189.
- 13 L. A. Elson et W. T. J. Morgan, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1824.
- 14 T. T. Terho et K. Hartiala, *Biochim. Biophys. Acta*, 304 (1973) 591.
- 15 T. Devenyi, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 3 (1968) 429.
- 16 M. B. Mathews et L. Decker, *Biochim. Biophys. Acta*, 244 (1971) 30.
- 17 R. L. Taylor, J. E. Shively et J. A. Cifonelli, *Biochemistry*, 12 (1973) 3643.
- 18 D. A. Swann, *Biochim. Biophys. Acta*, 160 (1968) 96.
- 19 Y. Tanaka et I. Gore, *J. Chromatogr.*, 23 (1966) 254.
- 20 K. Meyer, *Amer. J. Med.*, 47 (1969) 664.
- 21 T. C. Laurent, *Ark. Kemi*, 11 (1957) 487.
- 22 H. Habuchi, T. Yamagata, H. Iwata et S. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 6019.
- 23 S. Pal, S. Dogange et M. Schubert, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4261.
- 24 P. Hoffman, A. Linker et K. Meyer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 435.
- 25 N. Katsura et E. A. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta*, 121 (1966) 120.
- 26 R. D. Marshall, *Annu. Rev. Biochem.*, 41 (1972) 673.