

Isolement et Caractérisation de l'Ostéocalcine Equine

CARSTANJEN B.¹, WATTIEZ R.², AMORY H.¹, LEPAGE O.M.³, REMY B.⁴

1. Département de Médecine Interne des Equides, des Ruminants et des Porcs, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B 42, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.
2. Service de Chimie Biologique, Faculté de Sciences, Université de Mons, Hainaut, Av. Maistriau 21, 7000 Mons, Belgique.
3. Département Hippique, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Av. Bourgelat 83, 69280 Marcy l'Etoile, France.
4. Département de Physiologie de la Reproduction, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B 41, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Dr Vét Benoit Remy
E-mail: bremy@ulg.ac.be

Cette étude est supportée par le fond spécial de recherche équine Equine Research Funds, Belgique.

RESUME : L'ostéocalcine, protéine osseuse contenant de l'acide gamma-carboxyglutamique, a été isolée jusqu'à homogénéité pour la première fois dans l'espèce équine. Après déminéralisation acide et extraction acide, l'ostéocalcine a été purifiée par chromatographie en phase greffée par chaîne apolaire en C₁₈, chromatographie de filtration sur gel et chromatographie échangeuse d'ions. La séquence en acides aminés de l'ostéocalcine équine a été déterminée, elle correspond à YLDHWLGA(HYP) APYPDPL(GLA) PRR(GLA)VC(GLA)LNPDCDELAD HIGFQEAYRRFYGPV. La masse moléculaire et le point isoélectrique de la protéine ont été calculés de manière théorique à partir de la séquence transcrite, ils correspondent respectivement à 5,732 kDa et à 4,45. La protéine contient 3 résidus acides gamma-carboxyglutamiques en position 17, 21 et 24. La séquence révèle également la présence de hydroxyproline en position 9 et de cystéine en positions 23 et 29. L'homologie de séquence avec l'ostéocalcine bovine (98 %), ovine (96 %) et humaine (94 %) est élevée.

INTRODUCTION

L'ostéocalcine (OC) (Delmas et The committee of scientific advisors of the international osteoporosis foundation, 2001), connue également sous le nom de *bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla) containing protein* est l'une des protéines de type non collagène les plus abondantes de la matrice osseuse (Hauschka *et al.*, 1975; Price *et al.*, 1976a). La synthèse de cette protéine est réalisée essentiellement par les ostéoblastes matures (Camarda *et al.*, 1987). Les odontoblastes (Camarda *et al.*, 1987) et les chondrocytes hypertrophiques (Neugebauer *et al.*, 1995) n'en synthétisent qu'une faible quantité. Sa biosynthèse nécessite trois vitamines : la 1,25-dihydroxyvitamine D₃, la vitamine C et la vitamine K (Hauschka *et al.*, 1989). La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ stimule directement la transcription du gène de l'OC (Price et Baukol, 1980). Après la traduction de l'ARNm en protéine,

celle-ci subit encore deux modifications. La proline située en position 9 est hydroxylée en hydroxyproline (Hauschka *et al.*, 1989) et les résidus acides glutamiques en position 17, 21 et 24 sont gamma-carboxylés (Hauschka et Reid, 1978). Ces deux modifications dépendent respectivement de la vitamine C et de la vitamine K. L'OC nouvellement synthétisée possédant une forte capacité à lier l'hydroxyapatite (Hauschka et Carr, 1982) est ainsi rapidement incorporée à la matrice osseuse extracellulaire. Cependant, une faible quantité d'OC nouvellement synthétisée est libérée dans la circulation sanguine et subit une dégradation hépatique (Farrugia et Melick, 1986) et une élimination rénale (Price *et al.*, 1981). Dans la circulation sanguine et dans l'urine, se retrouvent à la fois des molécules intactes et des fragments de différentes tailles d'OC (Gundberg et Weinstein, 1986; Taylor *et al.*, 1990; Garnero *et al.*, 1994). De plus, au cours de la résorption osseuse, des

fragments d'OC pourraient également être libérés dans la circulation sanguine (Chen *et al.*, 1996; Baumgrass *et al.*, 1997).

L'OC constitue une des protéines non collagène les plus abondantes de la matrice osseuse des mammifères, des oiseaux, des amphibiens et des poissons osseux (classe des ostéichthyens), ce qui suggère un rôle important de l'OC dans la formation de la matrice osseuse. La structure et la séquence du gène de l'OC sont similaires chez les diverses espèces (Yoon *et al.*, 1988). Toutefois, le génome de la souris contient un *cluster* d'OC, lequel est composé de 3 gènes (Rahman *et al.*, 1993; Desbois *et al.*, 1994; Ducy *et al.*, 1996). Les gènes 1 et 2 (OC1 et OC2) de l'OC sont exprimés au niveau du tissu osseux, tandis que le gène 3 de l'OC, aussi appelé *OC Related Gene* (ORG) est transcrit au niveau du rein (Desbois *et al.*, 1994). Par mutation dirigée du gène de l'OC, il est possible de produire

des souris transgéniques déficientes en OC. Ces animaux présentent une augmentation progressive de l'épaisseur de l'os cortical et de l'os trabéculaire sans changement du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, ainsi qu'une résistance mécanique osseuse accrue. Ceci est sans effet sur les paramètres de résorption osseuse (Ducy *et al.*, 1996). L'OC est donc reconnue comme un indicateur de l'activité ostéoblastique et est acceptée comme marqueur du remaniement osseux (Risteli et Risteli, 1993; Ducy *et al.*, 1996). Les souris transgéniques déficientes en OC montrent une différence dans la taille et dans la perfection des cristaux formés dans l'os cortical (Boskey *et al.*, 1998). D'après ces observations, l'OC semble jouer un rôle supplémentaire mais non clairement défini dans la régulation du remaniement osseux où il pourrait agir comme signal pour le remodelage osseux (Boskey *et al.*, 1998).

L'OC de diverses espèces a été séquencée (Price *et al.*, 1976b; 1977; Linde *et al.*, 1980; Poser *et al.*, 1980; Carr *et al.*, 1981; Otawara *et al.*, 1981; Hauschka *et al.*, 1982; Shimomura *et al.*, 1984; Celeste *et al.*, 1986; Cancela *et al.*, 1995). Selon les espèces étudiées, elle contient 46 à 50 acides aminés (masse moléculaire 5,2 - 5,9 kDa). La propriété de l'OC de se lier aux molécules d'hydroxyapatite semble pouvoir être attribuée à 2 ou 3 résidus d'acides gamma-carboxyglutamiques en position 17, 21 et 24 (Poser et Price, 1979).

Le but de l'étude est de purifier l'OC équine afin de caractériser cette protéine d'un point de vue biochimique et de la comparer aux OC déjà décrites chez d'autres espèces animales. Ceci est indispensable pour permettre une meilleure compréhension du métabolisme osseux chez le cheval.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La purification de l'OC équine a été réalisée en utilisant le protocole - légèrement modifié- de Colombo et collaborateurs (1993). L'utilisation d'une trousse de dosage de l'OC bovine (OC DSL-6900; DSL, Webster, TX, USA) nous a permis de repérer l'OC équine au cours des différentes étapes de la purification. Cette trousse utilise l'OC bovine comme standard et traceur radioactif.

L'antisérum fourni est dirigé contre l'OC bovine.

Préparation de la poudre d'os et extraction acide des protéines solubles

Des os longs (métacarpiens, métatarsiens, radius, fémur, tibia et humérus) sont prélevés sur un cadavre de poulin endéans l'heure de la mort et sont débarrassés des tissus mous adhérents et du périoste. Les diaphyses sont immédiatement découpées en tranches d'une épaisseur de 5 mm à l'aide d'une scie d'anatomie. La moelle osseuse est éliminée et les tranches d'os sont lavées à l'eau déminéralisée à + 4°C, puis congelées à - 80°C (dans un délai d'une heure). Le tissu osseux congelé est broyé au moyen d'un broyeur à percussion Fitzpatrick (Fitzpatrick Company Europe, Sint Niklaas, Belgium). Cette opération est répétée trois fois. Entre chaque cycle de broyage, et afin d'éviter tout échauffement dû aux frictions, la poudre d'os est refroidie à l'azote liquide. La taille finale des particules osseuses est inférieure à 0,84 mm. La poudre d'os ainsi obtenue est stockée à - 80°C.

La suite du protocole se déroule à + 4°C. Cent grammes de poudre d'os sont déshydratés dans 250 ml d'acétone durant 20 minutes. La poudre est lavée 4 fois avec 340 ml de tampon Tris-HCl (20 mM, pH 8) (Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane; Merck, Darmstadt, Allemagne), auquel est ajouté une antiprotéase (phénylméthylsulfonyl fluorure 0,6 mM (PMSF); Sigma, Steinheim; Allemagne) et 2 fois avec 340 ml d'eau distillée contenant 30 µM de PMSF. Chaque lavage est réalisé sous agitation durant 30 minutes. Les solutions obtenues sont centrifugées à 1500 g pendant 15 minutes. Le culot final est récupéré, congelé puis lyophilisé.

Quarante grammes de la poudre lyophilisée sont déminéralisés pendant 4 heures avec 320 ml d'une solution d'acide formique à 20% (HCOOH; Merck, Darmstadt, Allemagne) contenant 30 µM de PMSF (8 ml de solution par g de poudre d'os). De l'acide trifluoroacétique (TFA) (Riedel de Haen AG, Seize, Allemagne) est ajouté (1%, V/V). Après une heure d'incubation, la solution est centrifugée à 40000 g durant 60 minutes. Le surnageant constitue

l'extrait 1 tandis que le culot est remis en suspension et déminéralisé une seconde fois avec 50 ml d'une solution d'acide formique à 20%, TFA 1%. Après agitation, ce mélange est centrifugé à 40000 g durant 60 minutes. Le surnageant ainsi obtenu constitue l'extrait 2, le culot est écarté. Les deux extraits sont remis ensemble.

Chromatographie de type phase greffée par chaîne apolaire C₁₈

Les protéines extraites sont séparées par passage sur une colonne classique de type phase greffée par chaîne apolaire en C₁₈ (Sep-Pak C₁₈; Waters Corporation, Milford, USA). La colonne est d'abord lavée avec 20 ml de méthanol pour analyse (Merck, Darmstadt, Allemagne), puis avec 20 ml d'une solution de TFA à 0,1%. Vingt millilitres d'extrait sont chargés à raison de 3 ml/min. Les protéines sont éluées avec les solutions suivantes: 20 ml de H₂O, TFA 0,1% (10 ml/min); 20 ml de H₂O, CH₃OH 30%, TFA 0,1% (10 ml/min) et 5 ml de H₂O, CH₃OH 80%, TFA 0,1% (3 ml/min). Seule la dernière fraction, contenant l'OC est conservée pour la suite de la purification. Un microlitre et demi de PMSF 287 mM est ajouté à la solution. Celle-ci est ensuite ajustée à pH 8,0 avec une solution de Tris 2 M, concentrée sous un flux d'azote, centrifugée et chargée sur colonne de chromatographie de filtration sur gel.

Chromatographie de filtration sur gel

La solution obtenue après passage sur la colonne Sep-Pak C₁₈ est chargée en 3 fois sur une colonne FPLC de type chromatographie de filtration sur gel (superdex 75 HiLoad 16/60; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) préalablement équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. La colonne est éluée avec le même tampon à un débit de 0,5 ml/min. La densité optique de l'éluat est mesurée à 280 nm. L'éluat est récupéré par fractions de 1 ml. Seules les fractions les plus riches en OC sont poolées avant d'être chargées sur une chromatographie échangeuse d'ions.

Chromatographie échangeuse d'ions

La dernière étape de purification de l'OC est réalisée par passage sur une colonne FPLC de type chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) équilibrée en tampon Tris-HCl 100mM, pH 8,0. La solution est chargée à un débit de 1 ml/min. Les protéines sont ensuite éluées au même débit, d'abord en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, ensuite selon un gradient linéaire de NaCl de 0 M à 0,75 M. L'éluat est collecté par fraction de 1 ml. La densité optique à 280 nm est mesurée pour chaque fraction. Les fractions les plus riches en OC sont alors mises ensemble avant d'être dialysées contre du tampon bicarbonate d'ammonium 5 mM pH 8,0 et lyophilisées. La poudre ainsi obtenue a été utilisée pour le séquençage de l'OC.

Dosages protéiques et radioimmunologiques

La détermination de la quantité totale de protéines obtenue après chaque étape de purification est mesurée selon la technique décrite par Lowry et collaborateurs (1951), en utilisant la BSA (Fraction V Fatty Acid Free; Sigma, St Louis, Missouri, USA).

Les concentrations relatives en OC obtenues après chacune des étapes sont mesurées par dosage radioimmunologique en utilisant la trousse OC DSL-6900 (DSL, Webster, TX, USA). Nous parlerons de concentrations relatives étant donné la nature différente de la référence (OC bovine) et du produit à doser (OC équine), l'antisérum (antisérum anti-OC bovine) utilisé dans la trousse possédant probablement une affinité différente pour ces deux molécules.

Caractérisation biochimique

Analyse sur gel d'électrophorèse

Un gel d'électrophorèse monodimensionnel SDS-PAGE Tris-Tricine (16,5%) est réalisé en présence de mercaptoéthanol (5%) essentiellement comme décrit par Laemmli (1974). Vingt microgrammes de la fraction purifiée sont chargés sur l'électrophorèse ainsi que les standards de masse moléculaire suivants: Triosephosphate isomérase (26,625 kDa), Myoglobine (16,950 kDa),

α -Lactalbumine (14,437 kDa), Aprotine, (6,512 kDa) et Insuline chaîne b (3,496 kDa) (Polypeptide SDS-Page Molecular Weight Standards Bio-Rad, Richmond, CA USA). Une différence de 100 volts est appliquée sur le gel durant 90 minutes. Après électrophorèse, le gel est placé dans une solution de fixation (méthanol, acide acétique, eau distillée; (40:10:50)) durant 30 minutes. Les protéines et les peptides sont ensuite visualisés après coloration au bleu de Coomassie G-250 (0,025% P:V dans une solution d'acide acétique - eau (10:90)) et décoloration de 4 heures dans une solution d'acide acétique - eau (10:90).

Analyse de la séquence en acides aminés

L'analyse de la séquence de la partie NH₂-terminale est déterminée par dégradation automatisée d'Edman sur 10 picomoles d'OC purifiée à l'aide d'un séquenceur Beckman LF 3400 D protéine-peptide équipé en ligne d'un système de microgradient HPLC modèle 126 Gold et d'un détecteur à diodes modèle 168 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Les échantillons sont séquencés selon la procédure standard numéro 4 du séquenceur Beckman. Les dérivés phénylthiohydantoïnes sont identifiés quantitativement par HPLC phase inverse sur une colonne ODS spherogel micro PTH (dimension des particules 3 μ m; dimension de la colonne 2 x 150 mm; Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Tous les réactifs utilisés proviennent de chez Beckman.

L'analyse de la séquence complète en acides aminés a pu être réalisée après traitement *in situ* de la protéine à la trypsine. Après leur purification par HPLC en phase inversée, chaque fragment est séquencé selon la même procédure décrite précédemment.

Tous les fragments tryptiques ont été également analysés sans leur séparation préalable par HPLC en phase inverse.

La séquence obtenue est comparée aux séquences protéiques reprises dans les banques de données EMBL et SWISSPROT. La comparaison est réalisée grâce à l'utilisation des programmes de recherche T-FASTA et FASTA.

RÉSULTATS

Préparation de la poudre d'os et extraction acide des protéines solubles

A partir de 100 g de poudre d'os obtenue après broyage, 79,7 g ont pu être récupérés après les étapes préliminaires de lavage (acétone; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; H₂O) et de lyophilisation. L'extraction en milieu acide de 40 g de lyophilisat a permis d'extraire 519,62 mg de protéines (Tableau I).

Chromatographie

Grâce à la chromatographie de type en phase greffée par chaîne apolaire C₁₈, 93,4% de l'OC extraite est récupérée tout en permettant de purifier cette protéine 7,4 fois. La figure 1 montre le profil d'éluion de la colonne superdex 75. Les fractions 83 à 92 se sont révélées les plus immunoréactives. La moitié de la quantité d'OC chargée est située dans les fractions centrales du pic avec un facteur de purification égal à 1,7. Lors de son passage sur colonne Mono Q et dans les conditions utilisées, l'OC est fortement liée au gel. Elle est décrochée par du tampon de molarité en NaCl égale ou supérieure à 0,3 M. Le profil d'éluion de cette chromatographie est représentée à la figure 2. Le tableau I reprend les quantités d'OC récupérées après chaque étape de purification, le facteur de purification de chaque

Tableau I : Rendements obtenus lors de la purification d'ostéocalcine (OC) équine.

Étapes	Protéines totales (mg) ⁽¹⁾	OC totale (mg) ⁽²⁾	Facteur de purification	Rendement total (%)
Extraction acide	519,62	18,5-	-	100
Sep-Pak C ₁₈	65,64	17,28	7,4	93,4
Superdex 75	19,09	8,66	1,7	46,8
Mono Q	8,55	6,34	1,63	34,3

(1) Déterminé selon la méthode de Lowry en utilisant la BSA (Fraction V) comme référence (Lowry et al., 1951).

(2) Déterminé par RIA hétérologue (trousse de dosage de l'OC bovine).

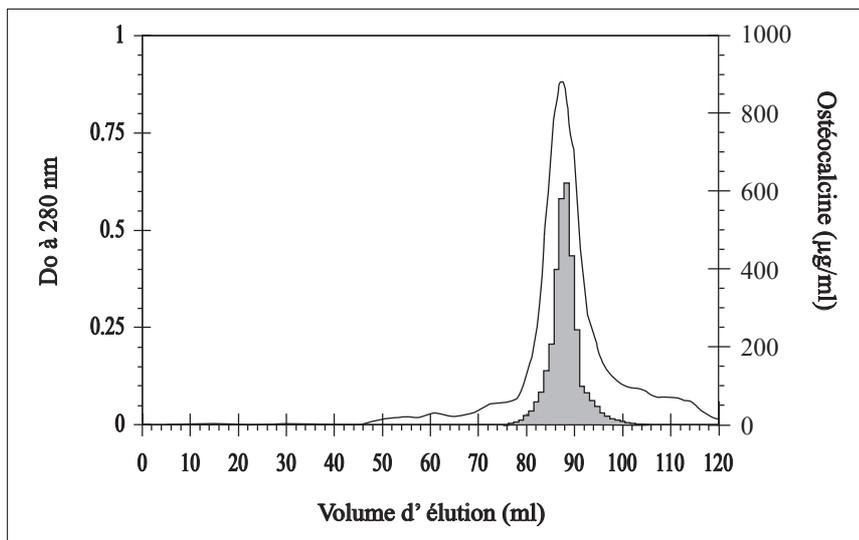


Figure 1 : Profil d'éluion de la chromatographie FPLC de filtration sur gel (superdex 75 HiLoad 16/60) après chargement de la fraction 80 % méthanol de la chromatographie en phase greffée par chaîne apolaire en C18 (Sep-Pak C18). Les protéines sont éluées avec du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. La surface grise indique la concentration relative en ostéocalcine.

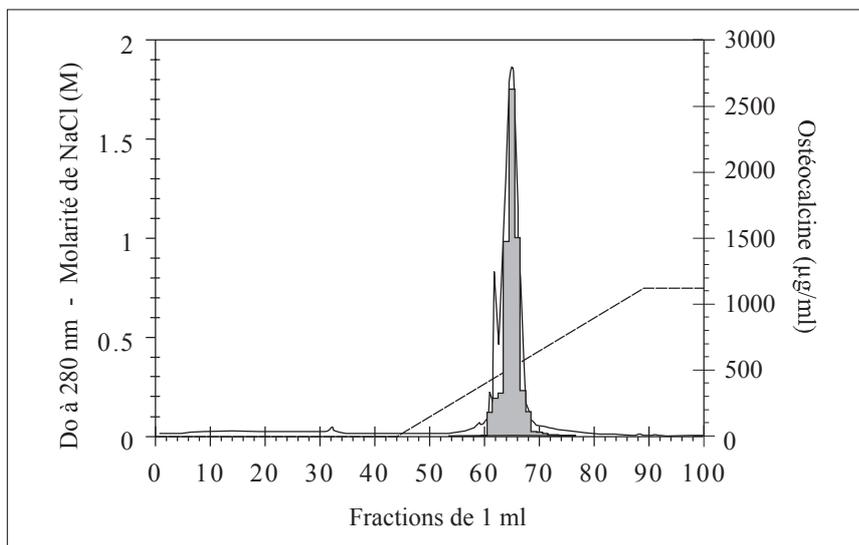


Figure 2 : Profil d'éluion de la chromatographie FPLC de type échangeuse d'ions (Mono Q 5/5) équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Le gradient linéaire de NaCl est représenté par la ligne interrompue. La surface grise indique la concentration relative en ostéocalcine.

Figure 3 : Séquence en acides aminés de l'ostéocalcine équine.

a.					
1	11	31			
YLDHWLGA(HYP)A PYPDPL(GLA)PRR (GLA)VC(GLA)					
b.					
1	11	21	31	41	49
YLDHWLGA					
(GLA)VC(GLA)LNPDCD ELADHIGFQE AYRRFY					
FYGPV					

a. Séquence de la partie NH₂ terminale déterminée à partir de la protéine purifiée.

b. Séquence des 3 peptides tryptiques analysés.

Les chiffres reprennent le numéro de chaque acide aminé. La numérotation débute par l'acide aminé NH₂ terminal.

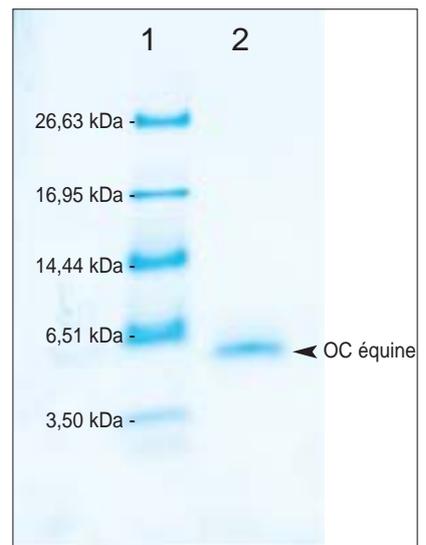
étape ainsi que les rendements totaux.

Séquençage

L'analyse microsequentielle N-terminale directe de l'OC purifiée montre une seule séquence N-terminale dont 24 résidus ont pu être identifiés (figure 3a). Aucune autre séquence N-terminale ne semble présente. La séquence de l'OC purifiée a pu être complétée par analyse de ces fragments tryptiques purifiés ou non par HPLC en phase inversée. Celles-ci sont reprises dans la figure 3b. D'après analyse directe par dégradation automatique d'Edman, la pureté de l'OC purifiée est de l'ordre de 98 %, ce qui est en concordance avec ce que l'on observe après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (figure 4). En effet, l'OC purifiée est caractérisée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide par une seule bande protéique de masse moléculaire relative de 6,025 kDa. La masse moléculaire de l'OC équine, calculée sur base de la séquence en acides aminés, est de 5,732 kDa, le point isoélectrique (pI) est de 4,45. Le code d'accès de l'OC équine est P83005 (SWISSPROT).

Le pourcentage d'identité a été calculé en comparant la séquence de l'OC équine avec celle d'autres

Figure 4 : Electrophorèse monodimensionnelle Tri-Tricine SDS-PAGE (16,5 %).



Ligne 1: Standard de masse moléculaire (Triosephosphate isomérase, 26,625 kDa; Myoglobine, 16,950 kDa; a-Lactalbumine, 14,437 kDa; Aprotine, 6,512 kDa; Insuline chaîne b, 3,496 kDa). Ligne 2: Ostéocalcine équine obtenue après passage sur la colonne de chromatographie échangeuse d'ions (Mono Q; fractions 63 à 67). Vingt microgrammes de la préparation ont été chargés.

Figure 5 : Structure primaire d'ostéocalcine de différentes espèces.

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	Espèce
	Y	L D H W L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P R R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Cheval (1)
	Y	L D H W L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Vache (2)
	Y	L D P G L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Chèvre (3)
	Y	L D P G L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P R R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Mouton (4)
	Y	L D H G L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P R R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G I A						Porc (3)
	Y	L Y Q W L G A (P)	V P Y P D P L (E)	P R R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Humaine (5)
	Y	L Y Q W L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Macaque (6)
	Y	L D S G L G A (P)	V P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	V C (GLA)	L N P N C D E L A D H I G F Q E A Y Q R F Y G P V						Chien (7)
	Y	L A P G L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	I C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q D A Y R R F Y G T V						Chat (8)
	Y	L N N G L G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P H R (GLA)	V C (GLA)	L N P N C D E L A D H I G F Q D A Y K R I Y G T T V						Rat (9)
(GLU)	L	I N G Q G A (HYP)	A P Y P D P L (GLA)	P K R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D Q V G L Q D A Y Q R F Y G P V						Lapin (10)
	Y	L Y Q T L G F (HYP)	A P Y P D P Q (E)	N K R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F S E A Y R R F Y G T A						Kangourou (3)
	S	F A V G S S Y	G A A P D P L (GLA)	A Q R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Emeu (11)
	S	Y G N N V G Q	G A A V G S P L (GLA)	S Q R (GLA)	V C (GLA)	L N P D C D E L A D H I G F Q E A Y R R F Y G P V						Xénope (12)
		A T R A G	D L T P L Q L (GLA)	S L R (GLA)	V C (GLA)	L N V S C D E M A D T A G I V A A Y I A Y Y G P I Q F						Espadon (13)
		A A G	Q L S L T Q L (GLA)	S L R (GLA)	V C (GLA)	L N L A C E H M M D T E G I I A A Y T A Y Y G P I P Y						Sardine (12)
		A A G	E L T L T Q L (GLA)	S L R (GLA)	V C (GLA)	A N L A C E D M M D A Q G I I A A Y T A Y Y G P I P Y						Perche (14)

(1)Equine (cette étude), (2)bovine (Price *et al.*, 1976b), (3)caprine, porcine (Huq *et al.*, 1984), (4)ovine (Mende *et al.*, 1984), (5)humaine (Poser *et al.*, 1980), (6)macaque (Hauschka *et al.*, 1982), (7)canine (Colombo *et al.*, 1993), (8)chat (Shimomura *et al.*, 1984), (9)rat (Pan et Price, 1985), (10)lapin (Virdi *et al.*, 1991), (3)kangourou (Huq *et al.*, 1984), (11)emeu (Huq *et al.*, 1987), (12)xénope (Cancela *et al.*, 1995), (13)espadon (Price *et al.*, 1977), (12)sardine (Cancela *et al.*, 1995), (14)perche (Nishimoto *et al.*, 1992). Les positions des résidus acide gamma-carboxylglutamique sont indiquées par GLA; les positions des résidus hydroxyproline sont indiquées par HYP. Les structures primaires débutent par l'acide aminé NH₂ terminal.

espèces. Il est de 98 %, 96 %, 94 % et 88 % entre l'OC équine et l'OC bovine, ovine, humaine et de chien respectivement (figure 5).

DISCUSSION

L'isolement de l'OC a été réalisé selon la méthode décrite par Colombo et collaborateurs (1993). Cette méthode a cependant été légèrement modifiée quant au choix des colonnes de chromatographie.

Une étape importante de l'isolement de l'OC est la préparation et la pulvérisation de l'os. Le tissu osseux doit être nettoyé et coupé en fines lamelles à une température inférieure à + 4°C. Les tranches de tissu osseux sont pulvérisées à l'aide d'un broyeur à percussion. Lors de cette étape, il est important d'éviter toute élévation de la température due à la friction; ceci est rendu possible par l'utilisation d'azote liquide. La taille des particules de poudre d'os ainsi obtenues qui influence directement le niveau d'extraction et le rendement final en OC est inférieure à 0,84 mm. La poudre d'os est ensuite lavée abondamment, initialement avec de l'acétone, puis avec du tampon Tris-HCl et enfin avec de l'eau. Le but de cette étape est de minimiser la contamination en lipides et en protéines avant déminéralisation. Afin de garantir une conservation optimale, la poudre d'os est lyophilisée et stockée à - 80°C.

L'OC est fortement liée à l'hydroxy-

apatite, celle-ci peut être libérée de la phase minérale de l'os pulvérisé par utilisation de différents acides organiques ou minéraux ou d'une solution neutre d'EDTA (Price *et al.*, 1976a). La déminéralisation acide est préférée à cette dernière (Poser *et al.*, 1980; Catherwood *et al.*, 1985), qui, très lente, requiert des périodes de dialyse de 2 à 10 jours pour éliminer les complexes Ca²⁺/EDTA (Hauschka *et al.*, 1982; Gundberg *et al.*, 1984). L'extraction rapide en milieu acide (pH < 3) et à basse température (T < +4°C) permet de limiter l'action d'éventuelles enzymes protéolytiques.

L'utilisation d'une colonne de type phase greffée par chaîne apolaire C18 est employée pour la purification de l'OC canine (Colombo *et al.*, 1993). En ce qui concerne l'OC équine, l'utilisation de cette colonne constitue une méthode rapide et hautement reproductible pour éliminer rapidement l'acide formique, les ions de calcium et de phosphate et pour concentrer l'échantillon, tout en purifiant 7,4 fois l'OC avec un rendement très élevé (94,3 %). La solution obtenue est rapidement concentrée (moins de 6 heures) sous un flux d'azote et chargée telle quelle sur une colonne superdex 75. Celle-ci est éluée dans le même tampon que la colonne finale. Aucune dialyse ou étape de concentration n'est requise entre ces deux étapes. Après passage sur colonne Mono Q, l'OC est dialysée

durant 24 heures avant d'être lyophilisée. En résumé, seulement 72 heures sont nécessaires pour la purification de l'OC.

A partir de 30 g de poudre d'os canine, Colombo et collaborateurs (1993) ont récupéré 10,4 mg d'OC pure, soit 0,35 mg d'OC/g de poudre d'os lyophilisée. Selon un schéma similaire, nous avons obtenu 0,16 mg d'OC équine par g de poudre d'os lyophilisée. Ces résultats montrent des variations dans le taux de récupération de l'OC après purification, qui peuvent être expliquées par la procédure de purification, la technique de préparation de l'os, l'espèce, l'âge et la localisation anatomique de l'os ou par l'utilisation d'un dosage hétérologue.

La séquence de l'OC équine possède beaucoup de traits communs avec celles des autres espèces (figure 3). Elle est composée de 49 acides aminés et est caractérisée par une masse moléculaire théorique, calculée d'après la séquence traduite et avant modification posttraductionnelle, de 5,732 kDa et un pI de 4,45. Comme la majorité des OC des autres mammifères, elle possède deux cystéines en position 23 et 29, une hydroxyproline en position 9 et trois acides glutamiques carboxylés en position 17, 21 et 24. Les deux cystéines, nécessaires à la structure tridimensionnelle de la molécule, et les trois acides glutamiques, impliqués dans la liaison à l'hydroxyapatite (Hauschka et Carr, 1982), se retrouvent de manière

constante non seulement chez tous les mammifères mais également chez les oiseaux (émeu et poulet), les amphibiens et les poissons osseux (Cancela *et al.*, 1995). Seul chez l'homme (Poser *et al.*, 1980), et le kangourou (Huq *et al.*, 1984), la 17-glutamine n'est pas complètement gamma-carboxylée. L'hydroxyproline en position 9 est présente exclusivement chez les mammifères à l'exception du chien (Colombo *et al.*, 1993) et de l'homme (Poser *et al.*, 1980) chez lesquels cet acide aminé n'est pas hydroxylé, et chez la souris où il est remplacé par une sérine. L'absence d'hydroxylation au niveau de cette proline serait due à la présence en position 10 d'une valine (Poser *et al.*, 1980). La valine provoquerait une modification stérique du site normalement reconnu par l'hydrolase de l'ostéoblaste, lequel pourrait être défini par la séquence -x-Pro-y qui pourrait être l'alanine et non la valine (Colombo *et al.*, 1993).

L'homologie de séquence de l'OC est plus importante pour la partie centrale de la protéine. C'est dans cette partie que se situent les sites de liaison au Ca^{2+} (Hauschka et Carr, 1982). La séquence de l'OC équine est très similaire à celle de l'OC bovine (Price *et al.*, 1976b) et ovine (Mende *et al.*, 1984) qui présentent respectivement une modification en position 19 (vache) et 4 et 5 (mouton). Un point de mutation pourrait être à l'origine de cette différence (Shimomura *et al.*, 1984). Cette étude confirme encore que l'OC montre une forte conservation de sa structure au cours de l'évolution (Hauschka *et al.*, 1989).

Les antisérums dirigés contre l'OC bovine présentent une réaction croisée vis à vis de l'OC équine (Patterson-Allen *et al.*, 1982). Les trousseaux de dosages de l'OC bovine permettent donc de mesurer les concentrations d'OC sérique chez le cheval. Cette quantification est relative car l'affinité pour l'OC bovine est probablement différente de celle pour l'OC équine. De plus, à ce jour, aucune étude n'a permis de déterminer les formes d'OC reconnues par l'antisérum anti-OC bovine; protéine intacte – fragments divers d'OC équine. La détermination de la séquence primaire en acides aminés devrait permettre la synthèse et la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des fragments spécifiques de cette protéine. Ceci est indispensable pour l'étude du métabolisme osseux. Les dosages combinés de l'OC intacte, de divers fragments de cette molécule, et de marqueurs osseux biochimiques supplémentaires, devrait permettre de mieux comprendre et évaluer les phénomènes de formation, résorption et remaniement osseux. La séquence complète en acides aminés devrait permettre un meilleur suivi de la physiologie, de la pathologie et des facteurs thérapeutiques sur le métabolisme osseux tout en améliorant l'interprétation clinique des variations de l'OC équine (Mäenpää *et al.*, 1988). Elle devrait également fournir les informations nécessaires pour la fabrication de sondes ADN spécifiques pour le gène codant pour l'OC équine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la compagnie "Fitzpatrick Europe", Sint Niklaas, Belgique, pour leur aide dans la procédure de broyage de l'os.

SUMMARY

Equine bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein - also called osteocalcin - has been isolated for the first time till homogeneity. After acid demineralisation and acid extraction, the purification procedure was based on reverse phase chromatography, gel filtration and ion exchange chromatography. The amino acid sequence of the primary structure has been determined to be YLDHWLGA(HYP)APYPDPL(GLA)PRR(GLA)VC(GLA)LNPDCDELADHIGFQEAYRRFYGPV. The protein has a calculated molecular weight of 5,732 kDa and a calculated isoelectric point of 4,45. It contains 49 amino acids, from which 3 are gamma-carboxyglutamic acid residues at position 17, 21 and 24 and has a fully hydroxylated proline in position 9 and cysteine in position 23 and 29. Equine osteocalcin shows a strong homology with bovine (98%), ovine (96%) and human (94%) osteocalcin.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUMGRASS R., WILLIAMSON M.K., PRICE P.A. Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin B, D, L, H, and S. *J. Bone Miner. Res.*, 1997, **12**, 447-455.
- BOSKEY A.L., GADALETA S., GUNDBERG C., DOTY S.B., DUCY P., KARSENTY G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bone of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 1998, **23**, 187-196.
- CAMARDA A.J., BUTLER W.T., FINKELMAN R.D., NANCI A. Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcif. Tissue Int.*, 1987, **40**, 349-355.
- CANCELA M.L., WILLIAMSON M.K., PRICE P.A. Amino-acid sequence of bone Gla protein from the African clawed toad *Xenopus laevis* and the fish *Sparus aurata*. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1995, **46**, 419-423.
- CARR S.A., HAUSCHKA P.V., BIEMANN K. Gas chromatographic mass spectrometric sequence determination of osteocalcin, a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from chicken bone. *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 9944-9950.
- CATHERWOOD B.D., MARCUS R., MADVIG P., CHEUNG A.K. Determinants of bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein in plasma of healthy aging subjects. *Bone*, 1985, **6**, 9-13.
- CELESTE A.J., ROSEN V., BUECKER J.L., KRIZ R., WANG E.A., WOSNEY J.M. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J.*, 1986, **5**, 1885-1890.
- CHEN J.T., HOSODA K., HASUMI K., OGATA E., SHIRAKI M. Serum N-terminal osteocalcin is a good indicator for estimating responders to hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, **11**, 1784-1792.
- COLOMBO G., FANTI P., YAO C., MALLUCHE H.H. Isolation and complete amino acid sequence of osteocalcin from canine bone. *J. Bone Miner. Res.*, 1993, **8**, 733-743.
- DELMAS P.D., THE COMMITTEE OF SCIENTIFIC ADVISORS OF THE INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. Bone Marker Nomenclature. *Bone*, 2001, **28**, 575-576.
- DESBOIS C., HOGUE D.A., KARSENTY G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 1183-1190.
- DUCY P., DESBOIS C., BOYCE B., PINERO G., STORY B., DUNSTAN C., SMITH E., BONADIO J., GOLDSTEIN S., GUNDBERG C., BRADLEY A., KARSENTY G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 1996, **382**, 448-452.
- FARRUGIA W., MELIK R.A. Metabolism of osteocalcin. *Calcif. Tiss. Int.*, 1986, **39**, 234-238.
- GARNERO P., GRIMAUX M., SEGUIN P., DELMAS P.D. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **9**, 255-264.
- GUNDBERG C.M., HAUSCHKA P.V., LIAN J.B., GALLOP P.M. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods Enzymol.*, 1984, **107**, 516-544.
- GUNDBERG C.M., WEINSTEIN R.S. Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum. *J. Clin. Invest.*, 1986, **77**, 1762-1767.
- HAUSCHKA P.V., LIAN J.B., GALLOP P.M. Direct identification of the calcium-binding amino-acid gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**, 3925-3929.
- HAUSCHKA P.V., REID M.L. Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 9063-9068.
- HAUSCHKA P.V., CARR S.A. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*, 1982, **21**, 2538-2547.
- HAUSCHKA P.V., CARR S.A., BIEMANN K. Primary structure of monkey osteocalcin. *Biochemistry*, 1982, **21**, 638-642.
- HAUSCHKA P.V., LIAN J.B., COLE D.E., GUNDBERG C.M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.*, 1989, **69**, 990-1047.
- HUQ N.L., TEH L.C., CHRISTIE D.L., CHAPMAN G.E. The amino acid sequences of goat, pig and wallaby osteocalcins. *Biochem. Int.*, 1984, **8**, 521-527.
- HUQ N.L., TSENG A., CHAPMAN G.E. The amino acid sequence of emu osteocalcin: gas phase sequencing of Gla-containing proteins. *Biochem. Int.*, 1987, **15**, 271-277.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- LINDE A., BHOWN M., BUTLER W.T. Non collagenous proteins of dentin. A re-examination of proteins from rat incisor dentin utilizing techniques to avoid artefacts. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 5931-5942.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- MÄENPÄÄ P.E., PIRSKANEN A., KOSKINEN E. Biochemical indicators of bone formation in foals after transfer from pasture to stables for winter months. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1990-1992.
- MENDE L.M., HUQ N.L., MATTHEWS H.R., CHAPMAN G.E. Primary structure of osteocalcin from ovine bone. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1984, **24**, 297-302.

- NEUGEBAUER B.M., MOORE M.A., BROESS M., GERSTENFELD L.C., HAUSCHKA P.V. Characterization of structural sequences in the chicken osteocalcin gene: expression of osteocalcin by maturing osteoblasts and by hypertrophic chondrocytes in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 1995, **10**, 157-163.
- NISHIMOTO S.K., ARAKI N., ROBINSON F.D., WAITE J.H. Discovery of bone gamma carboxyglutamic acid protein in mineralized scales. The abundance and structure of Lepomis macrochirus bone gamma-carboxyglutamic acid protein. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 11600-11605.
- OTAWARA Y., HOSOYA N., MORIUCHI S., KASAI H., OKUYAMA T. The NH₂-terminal amino acid sequence of a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from rat femur cortical bone. *Biomed. Res.*, 1981, **2**, 442-446.
- PAN L.C., PRICE P.A. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 6109-6113.
- PATTERSON-ALLEN P., BRAUTIGAM C.E., GRINDELAND R.E., ASLING C.W., CALLAHAN P.X. A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Anal. Biochem.*, 1982, **120**, 1-7.
- POSER J.W., ESCH F.S., LING N.C., PRICE P.A. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 8685-8691.
- POSER J.W., PRICE P.A. A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone. *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 431-436.
- PRICE P.A., OTSUKA A.A., POSER J.W., KRISTAPONIS J., RAMAN N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976a, **73**, 1447-1451.
- PRICE P.A., POSER J.W., RAMAN N. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976b, **73**, 3374-3375.
- PRICE P.A., OTSUKA A.S., POSER J.W. Comparison of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins from bovine and swordfish bone: primary structure and Ca²⁺ binding. In: Wasserman R.H., Corradino R.A., Carafoli E., Kretsiger R.H., MacLennan D.H., Siegel F.L. Calcium binding proteins and calcium function. Elsevier: Amsterdam, 1977, 333-337.
- PRICE P.A., BAUKOL S.A. 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 11660-11663.
- PRICE P.A., WILLIAMSON M.K., LOTHINGER J.W. Origin of a vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 12760-12766.
- RAHMAN S., OBERDORF A., MONTECINO M., TANHAUSER S.M., LIAN J.B., STEIN G.S., LAIPIS P.J., STEIN J.L. Multiple copies of bone specific osteocalcin gene in mouse and rat. *Endocrinology*, 1993, **133**, 3050-3053.
- RISTELI L., RISTELI J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann. Med.*, 1993, **25**, 385-393.
- SHIMOMURA H., KANAI Y., SANADA K. Primary structure of cat osteocalcin. *J. Biochem.*, 1984, **96**, 405-411.
- TAYLOR A.K., LINKHART S., MOHAN S., CHRISTENSON R.A., SINGER F., BAYLINK D.J. Multiple osteocalcin fragments in human urine and serum as detected by a midmolecule osteocalcin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol.*, 1990, **70**, 467-472.
- VIRDI A.S., WILLIS A.C., HAUSCHKA P.V., TRIFFIT J.T. Primary amino acid sequence of rabbit osteocalcin. *Biochem. Soc. Trans.*, 1991, **19**, S373.
- YOON K., RUTLEDGE S.J.C., BUENAGA R.F., RODAN G.A. Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry*, 1988, **27**, 8521-8526.