

50376
1974
13

N° d'ordre : 294

50376
1974
13

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR
ES-SCIENCES PHYSIQUES

Par

Jacques DESCAMPS

PROCÉDÉS DE FRACTIONNEMENT DES PROTÉIDES DU LAIT DE FEMME

ÉTUDE PARTICULIÈRE DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DES IMMUNO-GLOBULINES DE TYPE A (IgA)



PRÉSENTÉ LE 14 FÉVRIER 1974, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J.	MONTREUIL	Président
	J. E. COURTOIS	Rapporteur
	G. BISERTE	Examineur
M ^{lle} G.	SPIK	Examineur



030 026101 2

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, sous la direction du Professeur J. MONTREUIL.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, PARREAU

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON,
CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY,
P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René	Professeur de Biologie Marine, Directeur de l'Institut de Biologie Maritime et Régionale de Wimereux
------------------	---

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysicologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Indus- trielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales

M. DEPRETIN René	Biologie Marine
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Électricité- Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie (Amiens)
Me LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Me SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMBE Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique

M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOSCO Denis	Mathématiques
M. BRIDOUX Michel	Chimie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COLLON Jean	I.E.E.A.
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées

M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DREUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémy	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HERMAN Maurice	Physique
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
Me LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Me MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie
M. FERRON Pierre	Chimie
M. PENNIZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique

Me RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique
M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie
Me ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION

1

GENERALITES

1. - LES GLUCIDES LIBRES DU LAIT DE FEMME

5

2. - LES PROTEIDES DU LAIT DE FEMME

9

I - PROTEIDES SERIQUES

11

A - INHIBITEUR DE L'HEMAGGLUTINATION PROVOQUEE PAR LES VIRUS

13

B - LA SERUM-ALBUMINE

13

C - LES GLOBULINES IMMUNES

14

1 - Immunoglobulines G

16

2 - Immunoglobulines M

16

II - PROTEIDES D'ORIGINE MAMMAIRE

17

A - LES IMMUNOGLOBULINES A

17

B - LA LACTOTRANSFERRINE

25

1 - Mise en évidence du fer conjugué dans le lait de
Femme

25

2 - Procédés de préparation de la lactotransferrine

25

3 - Fixation du fer sur la lactotransferrine	26
4 - Propriétés physiques et chimiques de la lactotransferrine	27
5 - Données sur la structure de la lactotransferrine humaine	27
a - Structure du glycanne	31
b - Structure de la chaîne peptidique	31
c - Nature et nombre des liaisons glycanne-protide dans la lactotransferrine humaine	32
6 - Propriétés biologiques de la lactotransferrine	32
 C - <u>LES CASEINES</u>	 33
1 - Les caséines bovines	34
2 - Les caséines humaines	36
 D - <u>LA LACTALBUMINE</u>	 41
 E - <u>ENZYMES</u>	 43
1 - Lysosyme	43
2 - Autres enzymes du lait maternel	45
 F - <u>LA β - LACTOGLOBULINE</u>	 45
 G - <u>LES GLYCOPEPTIDES</u>	 46
 3. - <u>CONCLUSIONS</u>	 52
 <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	 53

1. - <u>GENERALITES</u>	54
I - <u>INTRODUCTION</u>	54
II - <u>LE RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM</u>	55
2. - <u>DIFFERENTS PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DU LAIT PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM</u>	56
I - <u>METHODE DE MONTREUIL et coll.</u>	56
II - <u>MODIFICATIONS DU PROCEDE DE MONTREUIL</u>	56
A - <u>NATURE DES MODIFICATIONS</u>	56
B - <u>CONDUITE DU FRACTIONNEMENT</u>	58
III - <u>AUTRES METHODES</u>	60
A - <u>METHODE DE GOT</u>	60
B - <u>METHODE DE MUH</u>	60
3. - <u>METHODES D'ANALYSE DES PRECIPITES</u>	63
I - <u>ANALYSE CHIMIQUE</u>	63
A - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES GLUCIDES</u>	63
1 - Composition centésimale en glucides	63
2 - Composition molaire en glucides	64
B - <u>DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL</u>	64
C - <u>DOSAGE DU PHOSPHORE</u>	64

II - <u>ANALYSE ELECTROPHORETIQUE</u>	64
A - <u>NATURE DES SUPPORTS, DES SYSTEMES-TAMPON ET CONDITIONS D'ELECTROPHORESE</u>	64
1 - Electrophorèse sur papier	64
2 - Electrophorèse en gélose	64
3 - Electrophorèse en gel d'amidon	65
4 - Electrophorèse sur acétate de cellulose	65
5 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide	65
B - <u>REVELATIONS DES ELECTROPHOREGRAMMES</u>	65
1 - Glycoprotéides	66
2 - Lipoprotéides	66
3 - Mucopolysaccharides acides	66
III - <u>ANALYSE IMMUNOLOGIQUE</u>	66
A - <u>IMMUNOELECTROPHORESE</u>	66
B - <u>PREPARATION DES IMMUNSERUMS</u>	66
4. - <u>RESULTATS DU FRACTIONNEMENT</u>	67
I - <u>RENDEMENT</u>	67
II - <u>IMPORTANCE DE LA SATURATION EN FER</u>	67
III - <u>COMPOSITION DES PRECIPITES</u>	69
A - <u>COMPOSITION CHIMIQUE</u>	69
B - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE</u>	71

IV - <u>CONCLUSIONS</u>	77
5. - <u>METHODES DE FRACTIONNEMENT RAPIDE</u>	77
I - <u>FRACTIONNEMENT DE TYPE I</u>	78
II - <u>FRACTIONNEMENT DE TYPE II</u>	78
III - <u>FRACTIONNEMENT DE TYPE III</u>	78
IV - <u>RESULTATS</u>	81
V - <u>CONCLUSIONS</u>	81
6. - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	85

SOUS-FRACTIONNEMENT DES PRECIPITES OBTENUS PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM
--

1. - <u>INTRODUCTION</u>	88
2. - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	88
I - <u>PREPARATION DES COLONNES</u>	88
II - <u>CHROMATOGRAPHIE DES PRECIPITES</u>	89
III - <u>METHODES D'ANALYSE</u>	90
3. - <u>ETUDE DES PRECIPITES</u>	90
I - <u>PRECIPITE P₁</u>	90
A - <u>ISOLEMENT D'UN PROTEIDE PRECIPITANT A TEMPERATURE AMBIANTE</u>	90
B - <u>ETUDE DE LA FRACTION SOLUBLE A TEMPERATURE AMBIANTE</u>	91
II - <u>PRECIPITE P₂</u>	91

A - <u>PRECIPITATION DE L'α-LACTALBUMINE A SON POINT ISOELECTRIQUE</u>	91
B - <u>FILTRATION SUR GEL</u>	93
III - <u>PRECIPITE P₃</u>	93
IV - <u>PRECIPITE P₄</u>	96
A - <u>PRECIPITE P₄ DU FRACTIONNEMENT DE BASE</u>	96
B - <u>PRECIPITE P₄ DU FRACTIONNEMENT RAPIDE</u>	99
V - <u>PRECIPITE P₆</u>	99
VI - <u>PRECIPITE P₇</u>	101
VII - <u>PRECIPITE P₈</u>	101
VIII - <u>PRECIPITE P₉</u>	104
IX - <u>PRECIPITE P₁₀</u>	104
4. - <u>FILTRATION DIRECTE SUR GEL DE SEPHADEX G-150 DU LACTO-SERUM</u>	107
5. - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	111
ISOLEMENT ET COMPOSITION GLYCANNIQUE DES PRINCIPAUX GLYCOPROTEIDES DU LAIT MATERNEL	
1. - <u>INTRODUCTION</u>	117
2. - <u>ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	117
I - <u>PREPARATION</u>	117

A - <u>APPLICATION DE LA METHODE DE MONTREUIL ET COLL.</u>	II7
I - Principe	II7
2 - Mode opératoire	II7
a - préparation de la résine	II8
b - Passage à la forme "citrate" de la résine	II8
c - Passage à la forme "acide" de la résine	II8
d - Préparation des colonnes de chromatographie	II8
e - Technique chromatographique	II9
3 - Résultats	II9
4 - Conclusions	I22
B - <u>MODIFICATIONS DE LA METHODE DE MONTREUIL ET COLL</u>	I22
I - Chromatographie sur DEAE-Cellulose	I22
a - Principe	I22
b - Mode opératoire	I23
c - Résultats	I23
d - Modifications de la méthode de GROVES	I27
2 - Chromatographie directe du précipité P7 sur DEAE-cellulose	I28
3 - Conclusions	I28
C - <u>METHODE ORIGINALE DE PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	I28
I - Chromatographie sur CM-Cellulose	I29
a - Principe	I29
b - Mode opératoire	I29
I) Préparation de la CM-cellulose	I29
2) Préparation des colonnes	I29
3) Chromatographie	I29
c - Résultats	I30
2 - Chromatographie de tamisage moléculaire	I30
a - Principe	I30
b - Matériel et Méthodes	I33
c - Résultats	I33
I) Chromatographie	I33
2) Identification	I33
3) Critères de pureté	I33
α - Electrophorèse de zone	I33
β - Ultracentrifugation	I36

D - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	158
II - <u>ISOLEMENT DE L'α_1-ANTITRYPSINE SERIQUE</u>	159
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	161
B - <u>RESULTATS</u>	161
C - <u>CONCLUSIONS</u>	163
4. - <u>ETUDE DES IgA</u>	163
I - <u>PURIFICATION DES IgA</u>	165
A - <u>PURIFICATION SUR ECHANGEURS D'IONS</u>	165
1 - Application de la méthode de MONTREUIL et coll.	165
a - Principe	165
b - Matériel et méthodes	165
c - Résultats	165
d - Conclusions	166
2 - Chromatographie sur CM-Sephadex	166
a - Principe	166
b - Matériel et méthodes	166
c - Résultats	168
d - Conclusions	168
3 - Chromatographie sur DEAE-cellulose et DEAE-Sephadex	168
a - DEAE-cellulose	168
1) Principe	168
2) Matériel et méthodes	168
3) Résultats	170

b - DEAE-Sephadex	170
1) Principe	170
2) Matériel et méthodes	170
3) Résultats	172
4) Conclusions	172
 B - <u>PURIFICATION PAR FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX</u>	172
1 - Matériel et méthodes	172
2 - Résultats	174
3 - Conclusions	179
 II - <u>ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES IgA LACTEES HUMAINES</u>	179
A - <u>PRINCIPE</u>	179
B - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	179
1 - Electrophorèse de zone et immuno-électrophorèse	180
2 - Ultracentrifugation	180
3 - Analyse des glucides	180
4 - Analyse des acides aminés	180
5 - Identification des acides aminés N-terminaux	180
C - <u>RESULTATS</u>	181
1 - Immuno-électrophorèse	181
2 - Electrophorèse de zone	181
3 - Ultracentrifugation	181
4 - Composition en glucides	181

5 - Composition en acides aminés et identification des acides aminés N-terminaux	186
III - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	189
ETUDE STRUCTURALE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DES IgA	191
1. - <u>INTRODUCTION</u>	191
2. - <u>DESCRIPTION DES METHODES</u>	191
I - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	191
A - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE</u>	191
1 - Principe	192
2 - Mode opératoire	192
B - <u>PURIFICATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	192
1 - Principe	192
2 - Mode opératoire	192
a - Purification sur échangeurs d'ions	192
b - Purification par chromatographie sur Sephadex	193
II - <u>COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRES DES GLYCOPEPTIDES</u>	193
III - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPEPTIDES ET DES GLYCANNES</u>	193
A - <u>PROCEDE CHIMIQUE</u>	193
1 - Principe	193

2 - Mode opératoire	194
B - <u>FILTRATION SUR BIOGEL</u>	194
1 - Principe	194
2 - Mode opératoire	195
IV - <u>DETERMINATION DE L'ATTACHE GLUCIDE-PROTIDE</u>	195
A - <u>IDENTIFICATION DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES</u>	195
1 - Amidation des glycopeptides	195
a - Principe	195
b - Mode opératoire	195
1) Estérification	195
2) Amidation	196
2 - Action de la soude et réduction par le borohydrure de sodium	196
a - Principe	196
b - Mode opératoire	196
3 - Action de la soude et réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide	198
a - Principe	198
b - Mode opératoire	198
4 - Fractionnement des composés libérés par action de la soude	200
5 - Dosage des substances réduites	200
a - Galactosaminitol	200
b - "Dehydro-amino-acides"	200
B - <u>IDENTIFICATION DES LIAISONS DE LA N-(β-ASPARTYL)-GLUCOSA-MINYLAMINE</u>	201

3. - RESULTATS

I - <u>ISOLEMENT ET ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE</u>	201
II - <u>ACTION DE LA SOUDE SUR LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE ET MISE EN EVIDENCE DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES</u>	203
III - <u>FRACTIONNEMENT ET ETUDE DES PRODUITS DE L'ACTION DE LA SOUDE</u>	203
A - <u>ETUDE DES PEPTIDES</u>	207
B - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES</u>	207
C - <u>ETUDE DES GLYCANNES LIBERES PAR LA SOUDE</u>	209
IV - <u>COMPARAISON DES GLYCANNES A LIAISONS ALCALI-STABLES ET ALCALI-LABILES</u>	209
V - <u>MISE EN EVIDENCE DES LIAISONS DE TYPE N-(β-ASPARTYL)-GLUCOSAMINYLAMINE</u>	211
VI - <u>COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES A LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES</u>	212

4. - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	212
---------------------------------------	-----

CONCLUSIONS GENERALES

216

BIBLIOGRAPHIE

224

GENERALITES

- 1 - Les glucides libres du lait de Femme
- 2 - Les protéides du lait de Femme

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

Le lait est la nourriture exclusive du jeune Mammifère. Quelle que soit l'espèce qui le sécrète, le lait est toujours constitué par une solution saline de glucides, de protides et de lipides. Le "lait" sans spécification, désigne la sécrétion lactée de la Vache, mais chaque espèce sécrète un type de lait particulier dont les éléments constitutants diffèrent quantitativement d'une espèce à l'autre comme le montre le tableau I (p. 2).

Le lait constitue un substrat intéressant pour se livrer à diverses spéculations. Solution de protéines, il a toujours été étudié d'une manière intensive par les biochimistes qui s'intéressaient aux propriétés et à la structure des protéines. MULDER, pionnier de la biochimie des protéines, qui donna à celles-ci leur nom, décrivit en 1838 une des premières méthodes de préparation de la caséine.

L'école lilloise de biochimie fondée par Michel POLONOVSKI, entreprit dès 1927 des recherches sur les glucides libres et conjugués du lait de Vache.

Le côté spéculatif ayant longtemps prévalu, le lait de Vache étant un substrat abondant, de nombreux résultats s'accumulèrent sur les constituants de cette sécrétion.

Actuellement, les recherches tendent à préciser les différences qui existent entre le lait de Vache et le lait de Femme. Elles revêtent une importance particulière du point de vue de la maternisation du lait de Vache.

La composition glucidique du lait de Vache est très différente de celle du lait de Femme, en particulier, ce dernier renferme des quantités importantes d'oligosaccharides libres qui ont été groupés

T A B L E A U I

Composition (en grammes par litre) des laits de différents
Mammifères selon DAVIES (1)

Espèce	Glucides	Protides	Lipides	Cendres
Femme	63	21	37	2,1
Vache	41	36	31	7,2
Anesse	58	-	13	-
Brebis	43	49	69	8
Chèvre	39	37	44	8
Jument	60	20	13	5,1



par POLONOVSKI et LESPAGNOL sous le vocable de "gynolactose". Les travaux de POLONOVSKI et de MONTREUIL d'une part, de KUHN d'autre part, ont permis d'élucider la structure chimique de la plupart de ces oligosaccharides libres dont le métabolisme et le rôle demeuraient cependant très mal connus. Aussi la découverte, en 1956, par MONTREUIL et HOLLEMAN (2) d'un glycoprotéide du lait de Femme de composition en oses et en osamines se rapprochant de celle des oligosaccharides du lait, permettait de poser en hypothèse qu'il existait une relation métabolique entre oligosaccharides et glycoprotéides (MONTREUIL)(3). Les travaux de MONTREUIL et MULLET (4), sur l'étude des variations des constituants glucidiques du lait de Femme au cours de la lactation ont déjà montré que le taux de lactose, faible dans les laits colostraux croît progressivement et se stabilise vers le 5ème ou le 6ème jour, et que, au contraire, le taux des oligosaccharides et celui des glycoprotéides totaux de l'adialysable du lait, décroît pendant la même période. Ces résultats étaient donc en faveur d'une relation métabolique entre les glycoprotéides et les oligosaccharides du lait de Femme.

Nous nous sommes proposé de rechercher dans le lait de Femme, d'isoler et d'étudier les propriétés physico-chimiques et la structure des glycoprotéides possédant la même composition que les oligosaccharides (galactose, glucose, fucose, N-acétyl glucosamine, acide sialique).

Nos activités de recherche se sont développées dans les directions suivantes :

- 1) Fractionnement du lactosérum par le sulfate d'ammonium et étude physico-chimique systématique des différentes fractions obtenues, en vue d'éprouver le fondement de l'hypothèse énoncée plus haut.
- 2) Etude des différentes fractions en chromatographie de gel-filtration.
- 3) Isolement et étude physico-chimique et structurale de différents glycoprotides :

a - Lactotransferrine avec la collaboration de Mademoiselle SPIK (Notre contribution s'est limitée à la recherche de nouveaux pro-

cedés de préparation).

b - Immunoglobulines A (IgA)

c - Glycopeptides (en collaboration avec GRIMMONPREZ).

4) Etude des oligosaccharides adialysables, poursuivie et développée par GRIMMONPREZ (Thèse de Doctorat d'Etat).

Nous exposerons en premier lieu l'état actuel de nos connaissances sur les oligosaccharides et les protéides du lait de Femme. Nous décrirons ensuite, nos recherches personnelles et les résultats que nous avons obtenus.

1 - LES GLUCIDES LIBRES DU LAIT DE FEMME (⌘)
--

Comme dans tous les laits de Mammifères, on trouve dans le lait de Femme du lactose à la concentration de 60 à 65 g/litre de lait "parfait". Dans le lait de Femme, le lactose est accompagné par de nombreux oligosaccharides dont l'existence a été démontrée par M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL.

Nous exposerons brièvement les connaissances actuelles sur la composition et la structure de ces oligosaccharides.

Les premières études furent effectuées par POLONOVSKI et LESPAGNOL qui tentèrent d'isoler la substance glucidique lévogyre qui accompagne le lactose. Ils appelèrent cette substance "gynolactose" mais mirent ensuite en doute son homogénéité (5) en concluant "qu'il existait à côté du gynolactose d'autres produits glucidiques beaucoup moins réducteurs encore".

Les recherches furent reprises simultanément par KUHN et par MONTREUIL, favorisées par l'emploi de la technique de chromatographie sur papier. Ces auteurs démontrèrent que le "gynolactose" est un mélange complexe de nombreux oligosaccharides, constitués en proportions variables, de galactose, de glucose, de fucose, de N-acétylglucosamine et parfois d'acide N-acétylneuraminique.

Leur composition molaire est précisée dans le tableau II (p. 6)

D'après leur composition chimique, les oligosaccharides du "gynolactose" peuvent être divisés en deux groupes :

- 1°) Oligosaccharides neutres dépourvus d'acide N-acétylneuraminique.
- 2°) Oligosaccharides acides contenant de l'acide N-acétylneuraminique.

(⌘) Voir les revues générales de KUHN (6), MONTREUIL (7), SEGARD (8), GRIMMONPREZ (9).

T A B L E A U I I

Composition molaire des polysaccharides du lait de Femme.

Nomenclature de MONTREUIL	Nomenclature de KUHN	Composition molaire				
		Gal	Glc	Fuc	GlcNAc	ANAN
1	Lactose	1	1	-	-	-
2A	2'-fucosido-lactose	1	1	1	-	-
2B	3 -fucosido-lactose	1	1	1	-	-
5	Lacto-difuco-tétraose	1	1	2	-	-
6	Lacto-N-tétraose	2	1	-	1	-
7	Lacto-N-néotétraose	2	1	-	1	-
8	Lacto-N-fucopentaose I	2	1	1	1	-
9	Lacto-N-fucopentaose II	2	1	1	1	-
10	Lacto-N-difucohexaose II	2	1	2	1	-
11	Lacto-N-difucohexaose I	2	1	2	1	-
12		3	1	2	1	-
13		3	1	3	2	-
14		4	1	4	2 ou 3	-
	3 ^l -lactaminylactose	1	1	-	-	1
	6'-lactaminylactose	1	1	-	-	1
	x-lactaminyl-lacto-N-tétraose (Pentaose a)	2	1	-	1	1
	y-lactaminyl-lacto-N-tétraose (Pentaose b)	2	1	-	1	1
	x-lactaminyl-lacto-N-néotétraose (Pentaose c)	2	1	-	1	1



Gal : galactose

Fuc : fucose

Glc : glucose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

ANAN : acide N-acétylneuraminique

La structure de ces oligosaccharides a été déterminée grâce aux recherches de KUHN et de MONTREUIL.

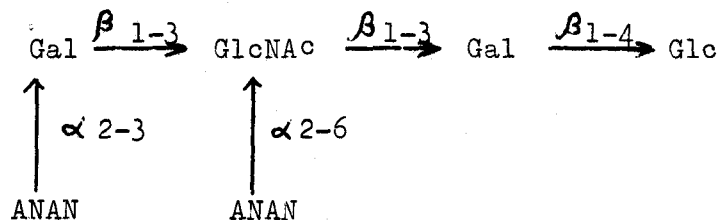
D'autres travaux ont ensuite été effectués :

1) HYTTEN et al. (10), MALPRESS et HYTTEN (11)(12), MALPRESS et MORRISSON (13) ont isolé du lait de Femme - outre un fucosido lactose, le lacto-N-tétraose, un lacto-N-fucopentaose et un lacto-N-difuco-hexaose - 5 polysaccharides supérieurs. Ils considèrent ces composés comme des polymères du lacto-N-tétraose sur lesquels se fixent parfois une ou deux molécules de fucose.

2) Poursuivant nos travaux sur les polysaccharides adialysables du lait de Femme, GRIMMONPREZ isola 6 nouveaux oligosaccharides en utilisant l'électrophorèse préparative sur papier (GRIMMONPREZ (14), GRIMMONPREZ et MONTREUIL (15)(16)).

Ces oligosaccharides s'apparentent aux glucides du "gynolactose" : ils sont lévogyres ; leur composition en oses est celle des oligosaccharides du lait de Femme décrits antérieurement par KUHN et par MONTREUIL ; ils possèdent tous un résidu de glucose en position terminale réductrice.

La structure complète de l'un d'eux : le dilactaminyl-lacto-N-tétraose a été déterminée (GRIMMONPREZ et al. (17)(18)). Le schéma de structure est le suivant :



3) NICOLAÏ et ZILLIKEN (19) ont obtenu 6 nouveaux polysaccharides acides par chromatographie sur des colonnes de DEAE-Sephadex et de Sephadex G-50. Ils en ont déterminé la composition molaire et le poids moléculaire qui varie de 5000 à 7.500. Ces polysaccharides semblent être des hexamères du lacto-N-tétraose substitués à des degrés divers par du fucose et de l'acide N-acétylneuraminique, ces deux monosaccharides variant en proportions inverses.

D'une manière générale, tous les oligosaccharides du "gynolactose" sont - soit des produits de substitution du lacto-N-tétraose ou du lacto-N-néotétraose par du fucose ou de l'acide N-acétylneuraminique - soit des produits de polymérisation des mêmes oligosaccharides, ces produits pouvant eux-mêmes être substitués par du fucose et (ou) par de l'acide N-acétylneuraminique.

Les structures des différents oligosaccharides libres présents dans le lait de Femme ayant été précisées, il se pose le problème de leur rôle et de leur origine métabolique. Le premier point a été longuement développé dans une revue générale récente de GRIMMONPREZ (20). Pour le second, MONTREUIL émet l'hypothèse que le "gynolactose" pouvait représenter un ensemble de produits du métabolisme intermédiaire de certains glycoprotéides du lait de Femme.

La présence de glycoprotéides dans le lait de Femme a d'abord été démontrée par l'électrophorèse sur papier. Elle fut confirmée par la mise en évidence de glucides dans la fraction macromoléculaire du lait de Femme (galactose, glucose, mannose, fucose, osamines, acide N-acétylneuraminique), puis par l'isolement, par MONTREUIL et HOLLEMAN (21) d'un glycoprotéide, le "gynolactomucoïde I", dont la composition en oses était très voisine de celle des oligosaccharides supérieurs du "gynolactose". D'où l'hypothèse d'une relation métabolique entre ce dernier et certains glycoprotéides à l'isolement desquels se sont attachés depuis plusieurs années MONTREUIL et ses collaborateurs.

Leur but était de caractériser, par des voies physico-chimiques, des glycoprotéides dont la fraction glycanique serait relativement riche en fucose, serait dépourvue de mannose et renfermerait du galactose et du glucose. C'est à ce travail que nous nous sommes attaché. Avant de décrire les résultats auxquels nous sommes parvenus, nous ferons le point sur les protéides du lait de Femme qui renferment le plus souvent des glucides conjugués.

2. - LES PROTEIDES DU LAIT DE FEMME

Dans ce chapitre, nous résumerons les connaissances actuelles sur les propriétés physico-chimiques des protéides du lait de Femme en faisant ressortir celles des glycoprotéides.

Il nous a paru préférable de considérer tous les protéides sans exclure d'emblée ceux qui ne renferment pas de glucides, afin que cette étude puisse refléter l'unité dynamique de la sécrétion lactée.

Dans certains cas, comme celui de la caséine de Femme, où les connaissances sont par trop fragmentaires, nous établirons une comparaison étroite avec les homologues d'origine bovine.

La présence de glycoprotéides dans le lait de Femme a été démontrée pour la première fois par FERRANTE (22), en 1953, puis par CANTARUTTI (23), par l'application de la méthode colorimétrique de dosage des hexoses de WINZLER. Elle fut confirmée, en 1955, par l'identification et le dosage des oses constituant les glycoprotéides totaux : oses (galactose, glucose, mannose, fucose)(10:2:2:3), osamines (glucosamine et galactosamine), acide sialique (acide N-acétylneuraminique), MONTREUIL (23a), puis par l'analyse électrophorétique sur papier ou en gélose (CUTROENO et al. (24)(25), MONTREUIL et MULLET (26)).

L'application des méthodes de dosages colorimétriques des glucides totaux a permis de déterminer le taux des oses glycoprotéidiques du lait (Tableau III, p. 10) et de montrer que la teneur en mucides des lait laits de Femme se modifiait considérablement au cours de la lactation. Les laits colostraux sont, en effet, très riches en glycoprotéides dont le taux diminue progressivement et devient stable à partir du 7ème ou du 8ème jour après l'accouchement. Ces modifications quantitatives des lactomucoides s'accompagnent de profondes modifications qualitatives. Les variations des rapports oses/acide sialique et oses/osamines sont, à cet égard, très démonstratives (Tableau III, p.10)(MONTREUIL et MULLET)(27). Elles s'expliquent par des changements dans les proportions relatives de mucoides possédant des compositions bien distinctes : par exemple, l'analyse électrophorétique du lait de Femme montre une disparition progressive des globulines immunes (globulines gamma A) dont les laits colostraux sont très riches et

T A B L E A U I I I

Variations de la teneur en glucides glycoprotéidiques d'un lait de Femme au cours de la lactation (MONTREUIL et MULLET) (28).

LAIT DE FEMME					
Jours après l'accouchement	Oses "neutres"	Osamines	Acide sialique	Oses neutres	Oses neutres
				Acide sialique	Osamines
1	8,87	3,5	1,42	6,24	2,53
2	4,14	1,5	0,58	7,01	2,74
4	1,53	0,89	0,35	4,38	1,71
7	1,19	0,66	0,30	3,94	1,80
10	1,21	0,63	0,33	3,63	1,91
30	1,12	0,60	0,30	3,70	1,87



une augmentation relative des glycoprotéides, plus riches en acide sialique.

L'application de l'immuno-électrophorèse à l'étude des constituants des laits permet de distinguer deux classes bien distinctes de protéides : les uns sont d'origine sérique, les autres sont synthétisés dans les glandes mammaires.

I - PROTEIDES SERIQUES

Dans les premières études sur le lait la caséine était considérée comme la seule protéine caractéristique du lait. Les autres protéines, moins abondantes et possédant des propriétés similaires à celles des globulines et albumines du sérum étaient assimilées aux protéines sériques et furent rarement étudiées (SØRENSEN et SØRENSEN, 1939 (29)).

Les premières études immunologiques ont montré qu'il existait une relation entre les protéines sériques et lactées humaines. Différents procédés ont été utilisés : réaction de précipitation avec un immunsérum antiprotéides lactés (MORO)(30), techniques d'anaphylaxie (THOMSEN)(31) et de fixation du complément (BAUER)(32), immunoélectrophorèse (du PAN et al. (33)).

L'avènement de l'immuno-électrophorèse permit de mettre en évidence un grand nombre de composants antigéniques dans le lait humain et d'en préciser l'origine sérique ou mammaire.

A partir de 1958, se succédèrent un grand nombre de travaux appliquant au lait maternel les méthodes d'immuno-diffusion et en particulier l'immuno-électrophorèse (GUGLER et al. (34); JOHANSSON (35); SKVARI, et REJNEK (36); FERRI et TUTIYA (37); GUGLER et von MURALT (38); HANSON (39)(40); HANSON et JOHANSSON (41); KARTE (42); SCHWICK et al.(43); FILIPE da SILVA et MONTEIRO (44); TECH-HUIDOBRO (45); HANSON (46); REJNEK (47); VIVELL (48); HANSON (49)(50); von MURALT et al.(51); ABELLI (52); HANSON et JOHANSSON (53); von MURALT (54)). C'est ainsi qu'au moins 30 composants antigéniques furent démontrés dans le colostrum humain (HANSON (55); von MURALT (56)) et 15 dans le lait stabilisé (HANSON (57); WADSWORTH et HANSON (58)), comme le montre le tableau IV (p. 12) emprunté à HANSON (59). Parmi ces composants, 18 sont apparentés aux protéines sériques (HANSON (60)(61), von MURALT (62)) et 13 sont

T A B L E A U I V

Relations antigéniques entre le lait et le plasma humains obtenues
par des techniques d'immunodiffusion (HANSON)(63)

Protéides sériques	Précolostrum	Colostrum	Lait stabilisé
Préalbumine	+	+	+
Albumine	+	+	+
Orosomucoïde	+	+	+
α_1 -globuline (3,5S)	+	+	+
α_2 -macroglobuline	-	-	-
α_2 ou β -lipoprotéine	+	+	(+)
Céruleoplasmine	+	+	(+)
Haptoglobuline	-	+	+
Transferrine	+	+	+
Fibrinogène	+	+	-
β_{2A} -globuline	+	+	+
β_{2M} -globuline	+	+	(+)
γ -globuline	+	+	+

+ Présence indiquée par réaction d'identité

(+) Présence indiquée par déviation de la ligne de précipitation en immuno-électrophorèse comparative.

|+| Indique une identité partielle avec la protéine sérique.



spécifiques de la glande mammaire. Il faut noter que les techniques utilisées par les auteurs cités ci-dessus sont d'une très haute sensibilité, comme la méthode d'immuno-électrophorèse comparative de WADSWORTH et HANSON (64) et qu'elles permettent de détecter des quantités de protéines parfois inférieures à 0,01 mg/ml.

La nécessité d'utiliser de telles techniques pour mettre en évidence les protéines sériques, prouve que celles-ci se trouvent à l'état de traces dans le colostrum et surtout dans le lait stabilisé.

Trois d'entre elles retiendront néanmoins notre attention : la sérum albumine et les immunoglobulines qui sont relativement abondantes dans le lait humain, et la substance capable d'inhiber l'agglutination des hématies sous l'action du virus de l'Influenza.

A - INHIBITEUR DE L'HEMAGGLUTINATION PROVOQUEE PAR LES VIRUS

Le virus de l'Influenza qui provoque une hémagglutination est inhibé par un protéide qui se trouve dans de nombreuses sécrétions muqueuses et dans le sérum de la plupart des espèces de vertébrés. Cet inhibiteur réagit immunologiquement avec un immunosérum anti- α_2 -macroglobuline bien que l'on n'ait pas caractérisé d' α_2 -macroglobuline dans le colostrum. Sa concentration s'élève fortement le jour qui précède l'accouchement et se maintient à un niveau élevé pendant 1 à 2 jours. L'inhibiteur colostrale de l'hémagglutination provoquée par le virus de l'Influenza aurait un coefficient de sédimentation de 14,5 S, serait constitué par un monomère d' α_2 -macroglobuline lié à 4 chaînes de sécrétion et agirait par son acide N-acétylneuraminique (SHORTRIDGE (65)).

B - LA SERUM ALBUMINE

La sérum albumine fut mise en évidence dans le lait humain par LUNSFORD et DEUTSCH en 1957 (66) et isolée pour la première fois par JOHANSSON en 1958 (67). Cette protéine est immunologiquement identique à la sérum albumine sérique (HANSON (68)) bien que sa mobilité électrophorétique en milieu alcalin soit légèrement plus anodique que cette dernière.

Le taux de sérumalbumine du lait maternel varie au cours de la lactation. Il est de 2,5 g par litre de colostrum, passe à 600-200 mg/litre dans le lait de 3 à 7 jours après l'accouchement et diminue encore légèrement dans le lait stabilisé (GUGLER et MURALT (69); KARTE (70); (SCHWICK et al. (71)).

La sérumalbumine n'est pas un glycoprotéide. Néanmoins elle a tendance à s'associer à différentes substances et en particulier aux IgA (BALLIEUX et IMHOF (72); MANNIK (73)). De telles associations n'ont pas été caractérisées dans le lait maternel.

C - LES GLOBULINES IMMUNES

Les globulines immunes sont très abondantes dans la sécrétion lactée humaine et surtout dans le colostrum (4 à 5 g/100 ml selon NORDBRING (74) dans le premier colostrum). Elles le sont encore nettement plus dans les colostrums de Vache et de Truie qui renferment respectivement 115 g (HEYNDRICKX et al. (75)) et 120 g (PORTER (76)) de globulines immunes par litre de premier colostrum. Chez ces espèces, le placenta possède une structure épithélio-choriale à 7 couches qui le rend très peu perméable aux anticorps (SCHNEIDER et SZATHMARY (77); RATNER, JACKSON et GRUEHL (78)). De ce fait, le colostrum est d'une importance vitale pour le Veau et le Porcelet qui acquièrent leurs anticorps sériques après ingestion de colostrum, comme cela a été démontré pour la première fois chez le Veau par HOWE (79).

Le phénomène est totalement inverse dans l'espèce humaine, les primates et les rongeurs, où le nouveau-né possède dès sa naissance une immunité passive très importante du fait de la perméabilité placentaire élevée. Les globulines immunes colostrales, moins abondantes, ne passent pas dans le sang du nouveau-né mais portent cependant des activités anticorps bien définies (Tableau V, p. 15) (Voir les revues générales de PAUPE et MEYER (80) et de CHERON (81)).

Les relations entre les immunoglobulines du lait et du sérum humain furent mises en évidence par de nombreux auteurs. LUNDSFORD et DEUTSCH (82) montrèrent, en 1957, que les immunoglobulines du lait humain sont antigéniquement apparentées, mais non identiques, aux γ_2 -globulines sériques. Puis, un grand nombre de travaux montrèrent

T A B L E A U V

Anticorps présents dans le colostrum et dans le lait de Femme
(d'après PAUPE et MEYER)(83).

Anticorps	Références
Antitoxine tétanique	DEBRE <u>et al.</u> , 1930 (84) LEMETEYER <u>et al.</u> , 1950 (85)
Antitoxine diphtérique	LEMETAYER <u>et al.</u> , 1948, 1950 (86) LIEBLING <u>et SCHMITZ</u> , 1943 (87) <u>von GENDERSEN</u> , 1934 (88) SUGG, 1935 (89) VIGNES <u>et al.</u> , 1948 (90) ARNON <u>et al.</u> , 1959 (91)
Antistreptolysines	MALMNAS <u>et al.</u> , 1951 (92) NORDBRING, 1957 (93)
Antistaphylolysines	VIGNES <u>et al.</u> , 1948 (94) NORDBRING, 1957 (95) DOBIAS <u>et al.</u> , 1957 (96)
Anticorps coquelucheux	ADAMS <u>et al.</u> , 1947 (97)
Anticorps typhiques O et H	LECLAINCHE, 1927 (98) TIMMERMAN, 1931 (99) CASTAIGNE, 1897 (100) SCHUBERT <u>et GRUNBERG</u> , 1949 (101)
Agglutinines dysentériques	WONG <u>et WONG</u> , 1970, (102)
Anticorps colibacillaires	ABRAHAM, 1929 (103) TOOMEY, 1934 (104) SCHNEIDER <u>et PAPP</u> , 1938 (105) MALMNAS <u>et al.</u> , 1951 (106) ARNON <u>et al.</u> , 1959 (107) HODES, 1964 (108) SUSSMAN, 1961 (109) ADINOLFI <u>et al.</u> , 1966 (110)
Anticorps grippaux	HUMMELER, 1953 (111)
Anticorps poliomyélitiques	SABIN, 1950 (112) PINTER, 1953 (113) GONZAGA <u>et al.</u> , 1963 (114) HODES <u>et al.</u> , 1962, 1964 (115)(116) MICHAELS, 1965 (117)
Anticorps anticoxsachie B ₅	HODES, 1964 (118)
Anticorps ourliens	HUMMELER, 1953 (119)
Anticorps vaccinaux	WEISS, 1939 (120)



les relations antigéniques entre les immunoglobulines du lait et du sérum à l'aide des techniques d'immunodiffusion GUGLER et al. (121); SKVARIL et REJNEK (122); FILIPE da SILVA et MONTEIRO (123)(124); FERRI et TUTIYA (125); GUGLER et von MURALT (126); HANSON (127, 128); HANSON et JOHANSSON (129); KARTE (130); SCHWICK et al. (131); TECH-HUIDOBRO (132); HANSON (133); MONTREUIL et al. (134); REJNEK et al. (135); HANSON (136)(137); von MURALT et al. (138); HANSON et BERGGÅRD (139); HANSON et JOHANSSON (140); von MURALT (141)).

La plupart de ces auteurs montrèrent que les IgA sont les immunoglobulines prépondérantes du colostrum et du lait stabilisé. En outre, HANSON (142), démontra que les IgA du lait possédaient un déterminant supplémentaire par rapport à leurs homologues sériques.

Comme on admet généralement qu'elles sont formées dans la glande mammaire, nous traiterons de cette classe d'anticorps dans le chapitre des protéines d'origine mammaire.

Par contre, les autres classes d'anticorps représentées dans le lait maternel sont antigéniquement identiques aux protéines sériques correspondantes.

1) Immunoglobulines G

La quantité de protéines apparentées aux IgG trouvée dans le colostrum et le lait humain est tout à fait minime quand on la compare à celle des IgA. En effet, SCHWICK et al. (143) estiment le taux d'IgG à 36 mg/100 ml dans le colostrum au cours des 3 à 8 jours qui suivent l'accouchement et de 9 mg/100 ml jusqu'à la fin du 1er mois.

2) Immunoglobulines M

Une protéine correspondant aux IgM sériques a été mise en évidence dans le colostrum (GUGLER et al. (144); HANSON (145); TECH-HUIDOBRO (146) et VIVELL (147)). Elle fut également mise en évidence dans le lait stabilisé par HANSON (148). Une étude plus récente montre que, comme pour les IgG, les quantités d'IgM présentes dans la sécrétion lactée sont faibles par rapport à celles des IgA. Elles sont de 159 mg/100 ml dans le premier colostrum et de 9 mg/100 ml dans le colostrum de 4 jours (AMMANN et STIEHM (149)).

La plupart des protéines sériques décelées dans le lait maternel sont des glycoprotéides. Nous précisons pour les besoins de notre future démonstration que tous les glycoprotéides sériques caractérisés ici renferment en proportions variables du galactose, du manose, parfois du fucose et de l'acide N-acétylneuraminique. Nous avons rassemblé dans le tableau VI (p. 18) la composition en glucides des glycoprotéides présents dans le lait de Femme.

En conclusion, il apparaît que les protéines sériques de la sécrétion lactée maternelle existent en très faibles proportions, sauf la sérumalbumine et les immunoglobulines G et M, qui sont néanmoins peu abondantes par rapport aux IgA antigéniquement rattachées aux protéides d'origine mammaire.

II - PROTEIDES D'ORIGINE MAMMAIRE

A - LES IMMUNOGLOBULINES A

La démonstration de la synthèse totale des IgA lactées dans les glandes mammaires n'a pas encore été apportée. Néanmoins, la mise en évidence par HANSON en 1961 de déterminants spécifiques du lait dans ces IgA, justifie au moins en partie leur classement parmi les protéides d'origine mammaire.

La majorité des anticorps présents dans le précolostrum, le colostrum et le lait de Femme stabilisé, appartient à la classe des IgA.

Sur les 4 à 5 g de globulines immunes pour 100 ml de premier colostrum (NORDBRING)(150), 90 p.100 sont des IgA et des IgM (GUGLER et MURALT)(151). La concentration de ces dernières mesurée par AMMANN et STIEMM (152) au même stade de la lactation, en utilisant la technique de diffusion radiale, est de 159 mg/100 ml. Les mêmes auteurs, utilisant les mêmes techniques, estiment le taux d'IgA dans le premier colostrum à 1735 mg/100 ml.

Les concentrations obtenues pour les IgA du lait par double diffusion radiale sont probablement trop faibles, du fait qu'un témoin IgA 7S a été utilisé comme étalon. En dépit de ces divergences,

T A B L E A U VI

Composition en glucides de quelques glycoprotéides sériques

	Comportement électrophorétique	Composition centésimale				Acide sialique	Composition molaire (Σ) en oses neutres
		Hexoses	Fucose	Osamines			
Globulines immunes							
IgG	γ	1,1	0,2	1,3	0,3	Gal, Man, Fuc (5:7:3)	
IgM	δ	5,4	0,7	4,4	1,3	Gal, Man, Fuc	
IgA	β ₂	3,2	0,22	2,9	1,8	Gal, Man, Fuc	
Fibrinogène		3,2	-	1,0	0,8	Gal, Man	
β _{1A} -Globuline	β ₁	1,7	0,15	0,55	0,42		
Transferrine	β ₁	2,4	0,07	2,0	1,4	Gal, Man (1:1)	
Céruleoplasmine	α ₂	3,0	0,18	2,4	2,4	Gal, Man, Fuc (10:5:1)	
Haptoglobines	α ₂	7,8	0,2	5,3	5,3	Gal, Man, Fuc (18:18:1)	
α ₂ -lipoprotéine	α ₂	0,5	-	0,35	0,2		
Orosomucoïde	α ₁	14,7	0,7	13,9	12,1	Gal, Man, Fuc (20:15:3)	
α ₁ -Globuline (3,5 S)	α ₁	5,6	0,3	4,5	3,4		
Préalbumine P ₁	Préalbumine	0,4	-	0,1	-	Gal	

(Σ) Gal : galactose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

nous retiendrons que le colostrum humain renferme 2 à 4 g/100 ml d'IgA.

Les IgA lactées ont été isolées pour la première fois par MONTREUIL et al. (153) qui utilisèrent le fractionnement du lait par le sulfate d'ammonium et la chromatographie sur Amberlite XE 64 des fractions enrichies en IgA. Nous décrirons les techniques utilisées et les résultats obtenus par ces auteurs avec nos travaux personnels, car ils ont été à l'origine de nos recherches sur les IgA.

Après avoir fait le point des connaissances sur les IgA du lait humain au moment où nous avons commencé nos recherches, nous résumerons rapidement les principales études qui furent réalisées conjointement sur ce type d'IgA et qui représentent le contexte de nos travaux personnels. Nous verrons que les études sont peu orientées sur la copule glucidique. Nous y reviendrons d'une manière plus complète dans la discussion de nos résultats, afin de réaliser, si possible, une mise au point sur l'ensemble de nos connaissances actuelles sur les IgA du lait de Femme. (Voir aussi les revues générales de TOMASI et BIENENSTOCK (154) et de HANSON et JOHANSSON (155)).

Après la mise en évidence de la prédominance des IgA parmi les anticorps du lait maternel on découvrit qu'il en était de même pour de nombreuses sécrétions : la salive (TOMASI et ZIGELBAUM)(156), les larmes et les sécrétions gastro-intestinales (CHODIRKER et TOMASI) (157), les sécrétions bronchiques (KEIMOWITZ)(158) et les sécrétions nasales (REMINGTON et al.)(159). La présence d'un déterminant spécifique dans les IgA du lait de Femme, montrée par HANSON en 1961, fut confirmée par TOMASI et al. (160) en 1965 qui démontra que si 90 p.100 des IgA sériques sont sous forme de molécules 7S, la majeure partie des IgA du colostrum et de la salive sont sous la forme 11S. SOUTH et al. (161) émirent l'hypothèse que la structure spécifique des IgA du lait et de la salive était due à une protéine liée aux IgA dans la glande sécrétrice.

Ces auteurs proposèrent d'appeler cette protéine "Transport Piece" pour indiquer son rôle possible dans le transport sélectif des IgA dans la salive, le lait et les autres sécrétions. Cependant puisque cette protéine appelée par HAVAZ et al. (162) chaîne α_s est commune à la plupart des sécrétions et spécifique de celles-ci, le terme "Secretory Piece" fut proposé. Il est maintenant officiellement remplacé par celui

de "Secretary component". Pour plus de commodité nous l'appellerons "Chaîne de sécrétion".

La taille des polymères IgA - Chaîne de sécrétion, et le mode de liaison entre ces deux constituants furent étudiés par de nombreux auteurs. HONG et al. (163) proposèrent une structure constituée d'un trimère d'IgA sériques associé d'une manière non covalente à une chaîne de sécrétion.

Puis HAVÉZ (164), HANSON et JOHANSSON (165), TOMASI et CZERWINSKI (166) montrèrent que seule une fraction de chaîne de sécrétion peut être dissociée des IgA colostrales par différents agents dénaturants : acide propionique, acide acétique, guanidine - HCl ou SDS. TOMASI et CZERWINSKI (167) établirent que les IgA de sécrétion sont constituées d'un dimère d'IgA sérique associé à la chaîne de sécrétion ; la masse moléculaire de l'ensemble étant de 390.000 daltons.

Les études en microscopie électronique, réalisées par SVEHAG et BLOTH (168) révélèrent une structure en Υ , suggérant que la molécule d'IgA de sécrétion est formée de 2 unités IgA 7S superposées, insérant une chaîne de sécrétion.

Les IgA de sécrétion possèdent une résistance plus élevée que les autres immunoglobulines, IgA sériques incluses, vis-à-vis des enzymes protéolytiques et des agents de réduction. Elles sont également plus résistantes à pH acide CEDERBLAD et al. (169), KENNY et al. (170); TOMASI et CZERWINSKI (171). La stabilité de la molécule d'IgA de sécrétion peut être attribuée à la présence de la chaîne de sécrétion.

La chaîne de sécrétion fut isolée par TOMASI et CZERWINSKI (172) qui lui attribuèrent une masse moléculaire de 58.000 daltons et un taux de glucides de 9,5 p.100. (NEWCOMB et al. (173), BRANDTZAEG (174), van MUNSTER et al. (175) et KOBAYASHI (176) trouvèrent une masse moléculaire de l'ordre de 75.000.

La chaîne de sécrétion fut également mise en évidence sous forme libre, tout d'abord dans la salive de malades agammaglobuliniques chez lesquels les IgA sont totalement absentes, (SOUTH et al. (177)), puis dans le colostrum de Femme, à côté des IgA typiques (NEWCOMB et al. (178)). Van MUNSTER et al. (179) puis BRANDTZAEG (180), (181), (182), (183)

montrèrent que le déterminant le plus antigénique de la chaîne de sécrétion est masqué quand celle-ci se présente sous forme liée, démontrant par là la structure compacte de l'ensemble.

L'étude physico-chimique de la chaîne de sécrétion liée, effectuée par TOMASI et CZERWINSKI (184) a été prolongée par les travaux de KOBAYASHI qui a récemment montré que les deux formes de chaîne de sécrétion, libre et liée ont un coefficient de sédimentation, une masse moléculaire et une composition en amino-acides, identiques (Tableau VII, p. 22) (Tableau VIII, p. 23). KOBAYASHI (185) a également établi la composition glucidique de la chaîne de sécrétion libre (Tableau VIII, p. 23).

Après les chaînes H et L classiques et la chaîne spécifique SC, un quatrième type de chaîne fut découvert par HALPERN (186) dans les polymères d'IgA (IgA colostrales de Femme et de Lapine et IgA de myélome). Les auteurs émirent l'hypothèse que cette chaîne, d'une masse moléculaire de 23.000, contribuait à l'édification de la forme polymère des IgA, ils l'appelèrent J("joining"). Cette chaîne fut également mise en évidence dans les IgM par MESTECKY et al. (187) qui en étudièrent la composition en acides aminés et démontrèrent qu'elle était totalement différente des chaînes légères et de la chaîne de sécrétion. Les mêmes auteurs tirèrent argument de la forte teneur en cystéine de la chaîne J pour lui attribuer une hypothétique contribution dans le maintien de la structure tertiaire des polymères d'IgA et d'IgM.

Très récemment, la nature glycoprotéidique de la chaîne J fut démontrée par NIEDERMAIER et al. (188) qui donnèrent sa composition en glucides (Tableau IX, p. 24).

Nous pensons avoir retracé les principales étapes des recherches sur les IgA de sécrétion. De nombreux travaux concernant plus particulièrement la préparation et les propriétés physico-chimiques des IgA du lait de Femme et de la chaîne de sécrétion furent publiés après ceux de MONTREUIL : BLANC (1964)(189) ; TOMASI et al. (1965)(190) ; AXELSSON et al. (1966)(191) ; MUH (1966)(192) ; HAVEZ et al. (1967)(193) ; TOMASI et al. (1968)(194) ; NEWCOMB et al. (1968)(195) ; KOBAYASHI (1971)(196).

Nous les évoquerons particulièrement dans la discussion de nos travaux personnels.

T A B L E A U VII

Composition en amino-acides^(*) de la chaîne de sécrétion libre et liée

Amino-acides	Chaîne liée		Chaîne libre
	a	b	c
Acide aspartique	7,6	10,7	10,5
Thréonine	8,0	5,6	5,4
Sérine	9,2	7,4	7,2
Acide glutamique	8,3	10,7	10,6
Proline	6,6	5,0	5,0
Glycocolle	15,2	9,9	9,8
Alanine	5,7	5,7	5,6
Cystine/2	2,4	2,7	3,2
Valine	6,9	8,2	8,3
Méthionine	1,4	0	0
Isoleucine	2,1	3,4	3,4
Leucine	8,3	9,5	9,7
Tyrosine	4,0	4,3	4,2
Phénylalanine	4,7	3,2	3,3
Tryptophane	-	2,2	2,0
Lysine	4,0	5,7	5,7
Histidine	1,4	0,9	1,0
Arginine	4,0	4,9	5,0

(*) en moles pour 100 moles

(a) TOMASI et BIENENSTOCK (197)

(b) (c) KOBAYASHI (198)



T A B L E A U VIII

Propriétés de la chaîne de sécrétion selon KOBAYASHI (199)

Coefficient de sédimentation	5,0
Coefficient de diffusion ^(*)	$5,96 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$
Volume spécifique partiel	0,730
Masse moléculaire ^(*)	75.500
<u>Composition glucidique (en p.100)^(*)</u>	
Galactose	3,12
Mannose	3,95
Fucose	2,26
Hexosamine	4,36
Acide sialique	1,9
Azote (en p.100) ^(*)	13,13
Soufre (en p.100)	0,69
Coefficient d'extinction ($E \frac{1 \text{ p.100}}{280 \text{ nm}}$) ^(*)	12,66

(*) Déterminé uniquement sur la chaîne de sécrétion libre.

T A B L E A U IX

Composition glucidique de la chaîne J provenant des IgA
humaines sérique et de sécrétion, d'après NIERDERMEIER et al. (200)

	IgA de sécrétion (⊗)		IgA sérique (⊗⊗)	
	p.100	Moles/Mole	p.100	Moles/Mole
Fucose	0,38	0,6 (0,5-0,8)	0,34	0,6 (0,5-0,6)
Mannose	2,27	3,3 (2,9-3,6)	2,13	3,1 (2,9-3,6)
Galactose	1,61	2,3 (1,8-2,6)	1,27	1,9 (1,6-2,3)
Glucosamine	1,93	2,8 (2,6-2,9)	2,72	3,9 (3,3-4,2)
Acide sialique	1,42	1,2 (1,0-1,3)	1,11	1,0 (0,9-1,0)
Total	7,61	10,2	7,57	10,5

La composition molaire est établie sur la base d'une masse moléculaire de 26.000.

- (⊗) Les résultats exprimés sont la moyenne et les valeurs extrêmes (entre parenthèses) de 6 analyses effectuées sur 2 préparations de chaîne "J".
- (⊗⊗) Les résultats exprimés sont la moyenne et les valeurs extrêmes (entre parenthèses) de 9 analyses effectuées sur 3 préparations de chaîne "J".



B - LA LACTOTRANSFERRINE

1° - Mise en évidence du fer conjugué dans le lait de Femme

Le lait de Femme contient de 0,5 à 1 mg de fer p.litre et on sait à présent que le métal est conjugué sous une forme réversible comme dans le plasma.

La nature protéidique de la combinaison du fer dans le lait de Femme a été démontrée par les observations suivantes:

a - L'analyse par électrophorèse sur papier des protéides totaux du lait additionné de fer radioactif révèle que ce dernier est lié à un protéide dont le comportement est identique à celui de la transferrine plasmatique (SCHAFFER (201) ; SCHAFFER et coll. (202)).

b - L'addition de sels de fer à du petit lait humain, provoque, comme dans le cas du sérum, l'apparition d'une coloration rose-saumon (SCHAFFER (203) ; JOHANSSON (204)).

c - Au cours de la préparation de la lactalbumine humaine par chromatographie sur des colonnes de phosphate de calcium, JOHANSSON (205), en 1958, obtient une fraction protéique hétérogène, de coloration rose-saumon, contenant une petite quantité de fer et présentant un maximum d'absorption de la lumière à 460-470 nm.

2° - Procédés de préparation de la lactotransferrine

Deux procédés d'isolement de la lactotransferrine humaine ont été décrits simultanément par MONTREUIL et al. (206) et par JOHANSSON (207). Ultérieurement d'autres méthodes de préparation ont été proposées par GRUTTNER, SCHAFFER et SCHROTER (208), BLANC et ISLIKER (209), GOT (210), MASSON et HEREMANS (211), JOHANSSON (212).

Nous décrirons, dans le chapitre réservé à nos travaux personnels, le procédé d'isolement de la lactotransferrine inventé par MONTREUIL et MULLET(212a) et par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (212b) car nous l'avons appliqué et nous avons, en outre, été amené à tenter de le perfectionner.

Les autres procédés sont décrits dans la revue générale de SPIK (212c).

3° - Fixation du fer sur la lactotransferrine

Les études concernant la fixation du fer sur la lactotransferrine sont encore fragmentaires et nous pouvons résumer les résultats actuellement acquis de la manière suivante.:

a - Comme la transferrine, la lactotransferrine fixe réversiblement le fer, le zinc et le cuivre (MONTREUIL et MULLET, 1960 (212d); MONTREUIL TONNELAT et MULLET, 1960 (213); BLANC et ISLIKER, 1961 (214)).

b - La liaison fer-lactotransferrine est nettement plus stable que celle de la transferrine. En effet, le pH de dissociation totale est de 1,75 à 2 (MONTREUIL et MULLET (215); MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (216); JOHANSSON (217); BLANC et ISLIKER (218)) au lieu de 4 - 4,5.

La dissociation est réversible puisque le retour à un pH neutre par l'addition de soude à des solutions de lactotransferrine préalablement décolorées par l'addition d'acide chlorhydrique fait réapparaître la coloration rose avec son intensité initiale. Il s'agit donc d'une transferrine spécifique.

c - Selon MONTREUIL et coll. (219), la lactotransferrine à saturation renfermait 3,5 p.1000 de fer, soit 6 atomes de ce métal, tandis que JOHANSSON (220), BLANC et ISLIKER (221), GRUTTNER et coll. (222) fixait ce nombre à deux pour une teneur en fer de 1,1 à 1,5 p.1000. Cette dernière valeur a été confirmée par les travaux de SPIK (223) et par ceux de MASSON et HEREMANS (224). SPIK (225) démontra que la lactotransferrine humaine est susceptible de fixer jusqu'à 20 atomes de fer supplémentaires, sur des sites non spécifiques, en l'absence de chélateurs et en présence d'un excès de sels de fer. Ce fait peut expliquer, selon SPIK (226), les résultats trouvés par MONTREUIL et coll. (227).

d - Comme dans le cas de la transferrine, les bicarbonates sont nécessaires pour assurer la fixation du fer (BLANC et ISLIKER (228). Ces résultats ont été confirmés par MASSON et HEREMANS (229), qui ont montré qu'une mole de CO_2 se dégagait par atome de fer ou de cuivre libéré de la protéine.

e - Les modalités de la fixation du fer sur la lactotransferrine et la nature

ferreuse ou ferrique du métal conjugué ne sont pas encore bien définies. Toutefois, par analogie avec les transferrines et avec la conalbumine, SPIK (230) a posé en hypothèse que la fixation de fer sur la transferrine ferait intervenir trois résidus de tyrosine et deux résidus d'histiadine.

f - La fixation du fer modifie profondément les propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine. La manifestation la plus évidente concerne les propriétés optiques, puisque la fixation du fer s'accompagne du développement d'une coloration rose-saumon proportionnelle à la quantité de métal conjugué. Le complexe fer-lactotransferrine est aussi plus résistant vis-à-vis des enzymes protéolytiques (SPIK et MONTREUIL) (231) (SPIK) (232).

4° - Propriétés physiques et chimiques de la lactotransferrine

Les propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine humaine ont été définies par MONTREUIL et MULLET (233), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (234) et pour quelques unes d'entre elles, par JOHANSSON (235) et par BLANC et ISLIKER (236). Puis l'étude en a été reprise par SPIK (237) et par QUERINJEAN et al. (238) ; ces derniers se sont limités aux mesures de masse moléculaire et à la composition en amino-acides.

Ces propriétés physico-chimiques sont différentes, comme l'ont souligné, les premiers, MONTREUIL et coll., de celles de la transferrine sérique et d'autres lactoprotéides comme la lactoperoxydase de THEORELL et AKESON (239) et de POLIS et SHMUKLER (240) et comme les ferri-lactines de BLOCK et ZWEIG (240a) et ZWEIG et BLOCK (240b) qui sont des combinaisons ferriques réversibles de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline.

Nous avons rassemblé les connaissances actuelles sur les propriétés physiques dans le tableau X (p. 28) sur la composition glucidique dans le tableau XI (p. 29) et sur la composition en acides aminés dans le tableau XII (p. 30).

5° - Données sur la structure de la lactotransferrine humaine

Les travaux concernant la structure primaire, secondaire et

T A B L E A U X

Propriétés physiques de la lactotransferrine humaine

	a	b	c	d	e
Mobilité électrophorétique (f)					
ferriprotéide	- 1,75 (g)	- 3,50	- 1,75	-	
apoprotéide	-	-	-	-	
Point isoélectrique			5,50		
λ max ferriprotéide	452,5	455	455	460 - 470	
apoprotéide	-	280	280	280	
E 1 p.100 ferriprotéide	-	-	-	14,3	
280 nm apoprotéide	-	-	-	11	
E 1 p.100 ferriprotéide	0,50	0,50	0,57	-	
460 nm					
[α] 20 ferriprotéide	-	-	- 58,5°	-	
[α] D apoprotéide	-	-	-	-	
Constante de sédimentation (h)					
S ₂₀	4,8 - 5,1	4,5	-	-	
S _{20w}	-	-	5,55	5,25	4,93
Constante de diffusion	4,6	-	-	-	5,6.10 ⁻⁷
Volume spécifique partiel					
- calculé	-	-	0,735	-	
- mesuré	-	-	0,732	-	0,716
Masse moléculaire					
Constante de sédimentation et diffusion	95.000				75.100
Chromatographie de filtration sur gel			76.000		
Electrophorèse en gel de polyacrylamide					76.800 ± 1600
Teneur en fer	100.000		75.980		77.000 à 80.000

(a) MONTREUIL et al. (241)

(b) BLANC et ISLIKER (242)

(c) SPIK (243)

(d) JOHANSSON (244)

(e) QUERINJEAN et al.
(245).

(f) La mobilité électrophorétique ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) a été déterminée dans les conditions suivantes : (a) et (c) électrophorèse libre en tampon véronal de Γ 0,1 et de pH 8,6 ; (b) électrophorèse en gélose avec tampon véronal de Γ 0,025 ; pH 8,2.

(g) Une valeur de 3,50 avait été donnée par les auteurs (245a). Elle était due à une erreur de calcul.

(h) Les ultracentrifugations ont été réalisées dans les solutions tamponnées suivantes : (a) tampon phosphate 0,15 M, pH 7,35 ; (d) tampon phosphate de pH 7.

T A B L E A U X I

Composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine humaine

	(a)	(b)	(c)	(d)
<u>Composition centésimale</u>				
Osés neutres	3,90	4,10	3,70	3,11
Osamines	2,40	2,30	2,00	2,43
Acides sialiques	0,87	0,80	0,90	1,22
<u>Composition molaire</u>				
D-galactose	10(e,f)	-	-	5(g)
D-mannose	7	-	-	5
L-fucose	5	-	-	4
N-acétyl-D-glucosamine	13	-	-	10
Acide-N-acétyl-D-neuraminique	3	-	-	3

(a) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (246)

(b) BLANC et ISLIKER (247)

(c) GOT, GOUSSAULT et FONT (248)

(d) SPIK (249)

(e) MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (250)

(f) pour une masse moléculaire de 100.000

(g) pour une masse moléculaire de 76.000



T A B L E A U X I I

Composition en acides aminés de la lactotransferrine humaine
exprimée en g de résidus d'acides aminés pour 100g de protéide.

Acides aminés	a	b	c
Acide aspartique	9,2	8,5	9,54 ⁺ 0,29 ₋
Thréonine	3,90	3,18	4,23 ⁺ 0,21 ₋
Sérine	4,36	4,09	5,13 ⁺ 0,18 ₋
Acide glutamique	9,81	10,23	11,3 ⁺ 0,28 ₋
Proline	3,67	3,67	3,94 ⁺ 0,24 ₋
Glycocolle	3,74	3,38	3,57 ⁺ 0,11 ₋
Alanine	4,51	4,64	5,08 ⁺ 0,32 ₋
Cystine/2	3,34	3,27	3,37 ⁺ 0,19 ₋
Valine	4,48	4,49	5,40 ⁺ 0,14 ₋
Méthionine	0,50	0,76	0,80 ⁺ 0,08 ₋
Isoleucine	2,01	2,07	2,35 ⁺ 0,07 ₋
Leucine	7,16	6,81	7,78 ⁺ 0,09 ₋
Tyrosine	3,92	4,19	4,16 ⁺ 0,02 ₋
Phénylalanine	4,78	4,92	5,19 ⁺ 0,19 ₋
Tryptophane	1,34 à 1,77	0,20	2,51 ⁺ 0,15 ₋
Lysine	6,82	6,49	6,41 ⁺ 0,52 ₋
Histidine	1,59	1,50	1,73 ⁺ 0,08 ₋
Arginine	7,58	7,52	7,53 ⁺ 0,44 ₋

(a) SPIK (251)

(b) BLANC, BUJARD et MAURON (252)

(c) QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (253)



tertiaire de la lactotransferrine humaine sont très fragmentaires.

a - Structure du glycanne

SPIK et MONTREUIL (254) ont montré que ce glycoprotéide possède 3 groupements glycaniques. En outre, ces auteurs ont fourni les renseignements suivants :

1) L'acide N-acétylneuraminique se trouve en position externe car il est libéré en totalité par action de la neuraminidase.

2) L'étude cinétique de la libération des oses par les acides a montré que l'acide N-acétylneuraminique et le fucose apparaissent les premiers, suivis par une fraction de la N-acétylglucosamine, tandis que le mannose est libéré plus tardivement ainsi qu'une autre fraction de la N-acétylglucosamine.

3) L'hydrolyse par les résines polystyrène-sulfonées libère de nombreux oligosaccharides parmi lesquels la N-acétyllactosamine qui est détachée dès le début de l'hydrolyse, deux mannobioses isomères et un mannotriose.

b - Structure de la chaîne peptidique

Si aucun acide aminé N-terminal n'a été mis en évidence (MONTREUIL et al.)(254a). (SPIK et MONTREUIL)(255), deux acides-aminés C-terminaux ont été identifiés au glycofolle et à la sérine. Ces résultats sont en faveur de l'existence de deux chaînes polypeptidiques dans la lactotransferrine humaine. Les résultats obtenus par GOT et al. (256), par ultracentrifugation de la lactotransferrine dans l'urée 8M, confirment cette hypothèse. En effet, dans ce milieu, la lactotransferrine se dissocie en deux constituants de constante de sédimentation 3,6 S et 1,7 S.

De même SPIK (257), en collaboration avec BRAZIER et DEMORY, a obtenu une dissociation de la lactotransferrine traitée par l'urée 8M, en 3 constituants au moins qui ont été mis en évidence par électrophorèse en gel d'amidon et sur acétate de cellulose.

Enfin, l'action des protéinases sur la lactotransferrine apporte des informations d'une grande importance physiologique. GOT (258),

SPIK et MONTREUIL (259) et BLANC (260) ont montré que la trypsine et la chymotrypsine possèdent une activité protéolytique faible sur ce substrat, contrairement à la pepsine, à la papaïne et surtout à la pronase. En outre, SPIK et MONTREUIL (261) ont montré que la présence du fer inhibe à peu près complètement l'hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse de l'intervention du fer dans l'élaboration des structures secondaire et tertiaire de la lactotransferrine.

Du point de vue physiologique, la résistance du complexe fer-lactotransferrine aux enzymes protéolytiques est très intéressante et à rapprocher du comportement des IgA de sécrétion qui présentent la même propriété.

c - Nature et nombre des liaisons glycanes-protéide dans la lactotransferrine humaine.

D'après SPIK et al. (262)(263), il existe dans la lactotransferrine humaine 3 groupements glycaniques conjugués à la fraction protéique l'un par une liaison O-thréonyl-N-acétylglucosaminidique et les deux autres par une liaison β -aspartyl-N-acétylglucosaminylaminique. La séquence commune au voisinage du point d'attache de ces deux glycanes est la suivante (Glycane)-Asn-Glu-Thr.

Par contre, GOT, GOUSSAULT et FONT (264) n'ont caractérisé que des liaisons O-glycosidiques.

6° - Propriétés biologiques de la lactotransferrine.

La lactotransferrine humaine est largement répandue dans les différentes sécrétions de l'organisme humain, aussi son rôle biologique semble ne pas se limiter au problème nutritionnel de l'apport du fer au nouveau-né et une activité bactériostatique a déjà été démontrée.

L'hypothèse de l'activité bactériostatique de la lactotransferrine émise par MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (265), puis par BLANC et ISLIKER (266) a été confirmée par des expériences réalisées in vitro.

La lactotransferrine humaine inhibe la croissance de Staphylococcus aureus (BLANC)(267), de Staphylococcus albus et de Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS)(268). L'activité bactériostatique des

transferrine et lactotransferrine serait due à leur action ferriprive sur le milieu, le fer étant un élément indispensable aux micro-organismes. Toutefois, pour que le même rôle soit joué *in vivo*, il est nécessaire que la lactotransferrine parvienne non dégradée jusque dans l'intestin du nouveau-né. Ceci est concevable puisque, nous l'avons vu, la lactotransferrine possède une certaine résistance aux enzymes protéolytiques.

SPIK (269) a, d'autre part, formulé l'hypothèse d'une activité antitoxique des lactotransferrines.

L'activité antitoxique des composés renfermant du fer a été en effet démontrée vis-à-vis d'exotoxines par HEILMEYER, KEI DEFLING et WÖHLER (270) et d'endotoxines bactériennes par JANOFF et ZWEIFACH (271).

C - LES CASEINES

La caséine qui est apparue d'emblée comme la principale protéine du lait et la plus caractéristique de cette sécrétion, puisqu'elle lui donne son aspect "laiteux", se présente sous forme de complexe phosphocalcique colloïdal.

Le lait étant unique et irremplaçable pour l'alimentation du nouveau-né, il n'est pas étonnant que la caséine, principale protéine du lait, occupe au sein des protéines une position singulière. La caséine peut être chauffée en solution à 100°C, traitée par des solvants organiques ou des agents dénaturants tel que l'urée sans que ses propriétés ne se modifient. La caséine est plus facilement digérée par les enzymes *in vitro* que des protéines globulaires typiques comme l'albumine d'oeuf. La caséine est donc difficilement dénaturable et il s'avère qu'elle a une structure en pelote statistique caractéristique d'une protéine dénaturée (HALWER (272) et KRESHECK (273)). Elle sera donc digérée facilement par le nouveau-né.

Toutes les études fondamentales sur la caséine ont été effectuées sur la caséine de Vache.

Les définitions et les principes que nous donnerons pour commencer porteront donc sur celle-ci^(*).

Nous ferons ensuite le point des connaissances actuelles sur la caséine humaine.

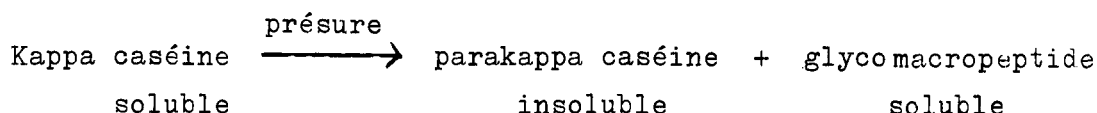
(*) Voir aussi les revues générales de WAUGH (274), THOMPSON (275), MACKINLAY et WAKE (276).

1° - Les caséines bovines

Découverte en 1830 par BRACONNOT et considérée pendant plus d'un demi-siècle comme une protéine pure, la caséine dont la composition chimique est donnée dans le tableau XIII (p. 35), se présente sous forme de 4 types de constituants appelés α_s , β , δ et κ suivant une nomenclature dérivée de celle de MELLANDER (277).

Tous ces constituants possèdent deux points communs : ils renferment du phosphore estérifiant la sérine et la thréonine, ils donnent naissance à des variants. Ces deux points mis à part, voici comment chacun se caractérise :

- a - La caséine δ est peu abondante et renferme peu de phosphore : 0,1 p.100.
- b - La caséine α_s possède 9 atomes de phosphore par molécule d'une masse moyenne de 27.300 daltons.
- c - La caséine β a 4 à 5 atomes de phosphore par molécule de 24.100 daltons; les caséines α_s et β ne renferment ni glucides ni cystéine et sont sensibles au calcium.
- d - La caséine κ est de structure plus complexe. Elle est constituée de plusieurs unités de masse moléculaire variable, 17.000 à 20.000 daltons qui donnent des polymères qui se forment au hasard par liaisons pont-disulfure. Le degré de polymérisation varie largement. La caséine κ renferme 5 p.100 de glucides représentés par du galactose, de la galactosamine et de l'acide N-acétylneuraminique à répartition équimolaire (JOLLES et al.)(278)(279). Elle n'est pas sensible au calcium et constitue le substrat de la présure qui donne la réaction suivante :



La présure agit comme une enzyme protéolytique et fait apparaître un nouvel acide aminé N-terminal : la méthionine.

T A B L E A U XIII

Composition chimique des caséines (en g/100 g).

(Les écarts entre les valeurs sont dus aux méthodes de préparation différentes)

	Azote	Phosphore	Hexoses	Hexosamines	ANAN
(x) Caséine bovine	15,2 à 15,5	0,78 à 0,84	0,23 à 0,30	0,25 à 0,31	0,45 à 0,50
Caséine humaine	14,8	0,45	1,98 à 2,55	1,32 à 2,21	0,37 à 0,80

(x) d'après GRAHAM et al. (280)



La caséine χ possède la propriété de maintenir en solution les caséines α_s et β en présence de calcium. L'ensemble forme une suspension stable d'aggrégats colloïdaux ou micelles.

Les différents travaux sur les points d'attache et la structure des glycanes de la caséine χ ont montré que la galactosamine est liée directement sur la chaîne peptidique au moyen de liaisons O-glycosidiques impliquant la thréonine (MALPRESS et SEID AKHAVAN)(281), la thréonine et la sérine (FIAT et al.)(282).

Récemment TRAN et BAKER (283) ont établi que ces glycanes sont formés de trisaccharides dont la structure est la suivante :

α -N-acétylneuraminyl(2 \rightarrow 6)- β -galactosyl-(1 \rightarrow 3 ou 6)-N-acétylgalactosamine.

Cette structure confirme la représentation équimolaire des 3 monosaccharides constituant la caséine donnée par JOLLES et al. (283). D'autres travaux ont, au contraire, montré que l'acide N-acétylneuraminique, le galactose et la galactosamine pouvaient se trouver dans les rapports de 1-2-1 : (KUWATA et al.)(284), 2-2-1 (Mac CABE)(285), 2-2-1 et 3-5-2 (SINKINSON et WHEELLOCK)(286). Ces derniers auteurs ont également démontré la présence de mannose.

Il y aurait donc, non pas un, mais plusieurs types de glycanes dans la caséine bovine, et cette hétérogénéité glycanique pourrait être un des principaux facteurs de l'hétérogénéité de la caséine χ .

Les différents constituants de la caséine bovine sont organisés de l'échelon macromoléculaire à l'échelon micromoléculaire en fonction d'une structure spécifique : la micelle. L'organisation des caséines humaines qui s'articule également selon une structure micellaire est beaucoup moins connue.

2° - Les caséines humaines

Le lait de Femme est beaucoup plus pauvre en protéines que le lait de Vache et le déficit se porte sur les caséines, car le taux de protéines solubles est identique dans les deux sécrétions (voir tableau XIV, p. 37).

T A B L E A U X I V

Composition en caséine et en protéines solubles des laits de
Femme et de Vache.

(d'après JENNESS et SLOAN)(286a)

	Caséine (p.100)	Protéines du lactosérum (p.100)
Lait de Femme	0,4	0,6
Lait de Vache	2,8	0,6



La composition chimique de la caséine humaine est donnée dans le tableau XIII (p. 35).

La caséine humaine comme la caséine bovine est constituée de plusieurs protéines qui interagissent pour former les micelles trouvées dans le lait. Cette hétérogénéité fut détectée pour la première fois par MELLANDER (287), 1945, en électrophorèse libre et confirmée en 1962 par ALAIS et JOLLES (288) qui mirent en évidence une dizaine de constituants dont 4 principaux, par électrophorèse en acétate de cellulose. Contrairement à l'aspect typique de la caséine de Vache, montrant en gel d'amidon 2 zones principales appelées α et β , la caséine humaine donne dans les mêmes conditions 6 bandes situées en β et δ (MALPRESS et HYTTEN, 1964 (289)). Il est donc difficile de lier les caséines humaines et bovines par une terminologie commune.

Deux fractions ressemblant aux caséines bovines α_s et χ ont été isolées en 1966 par MALPRESS et SEID-AKHAVAN (290). La fraction dite α_s est hétérogène en électrophorèse en gel d'amidon, ne renferme pas de glucides, est insensible à l'action de la présure mais sensible au calcium. La fraction dite χ , également hétérogène en électrophorèse en gel d'amidon, est au contraire insensible à la présure et présente un pouvoir stabilisant vis-à-vis de la fraction α_s . La composition en acides aminés du glycopeptide libéré par action de la présure sur la caséine χ humaine est identique à celle du glycopeptide obtenu dans les mêmes conditions à partir de la caséine humaine totale. Ceci confirme les travaux antérieurs de ALAIS et JOLLES (291) concernant l'action de la présure sur la caséine humaine totale d'où les mêmes auteurs ont isolé en 1969 (292) deux fractions hétérogènes ayant les propriétés de la caséine χ .

Les travaux de NAGASAWA, RYOKI, KIYOSAWA et KUWAHARA (293), puis de NAGASAWA, KIYOSAWA, KUWAHARA (294) vinrent préciser ceux de MALPRESS et SEID-AKHAVAN (295). La caséine humaine est composée de deux fractions principales apparentées aux caséines β et χ bovines. La fraction χ est ainsi appelée car elle donne une zone diffuse en électrophorèse sur polyacrylamide, renferme de la cystéine, est riche en glucides, stabilise la caséine β bovine de même que la fraction majeure de la caséine humaine. Cette dernière fraction donne un électrophorégramme à 6 bandes appelées β A-F qui sont typiques de la caséine humaine. Elle

renferme beaucoup de proline et de leucine et des traces de glucides et de cystéine. Elle s'apparente donc à la fraction α_s de MALPRESS et al. (296) mais NAGASAWA et al. (297) l'ont rapprochée de la caséine β bovine à cause de sa teneur en phosphore et des variations de solubilité en fonction de la température qu'elle montre en présence de calcium. En effet, 80 p.100 de cette fraction précipitent à une température comprise entre 20°C et 40°C mais demeurent soluble entre 0 et 10°C en présence de 20 mM de CaCl_2 . Ce comportement est très voisin de celui de la caséine β bovine qui, en présence de calcium, est complètement soluble à basse température et précipite à température normale. Enfin NAGASAWA et al. (298) ont montré que la sensibilité au calcium des caséines β_{A-B-C} ayant un taux de phosphore élevé est plus importante que celle des caséines β_{D-E-F} qui sont moins riches en phosphore.

Les travaux qui suivent concernent plus particulièrement l'isolement et les propriétés physico-chimiques des entités de la caséine humaine. NISHIKAWA et SAITO (299) et NISHIKAWA, MURATA, YOSHIDA et SAITO (300), ont isolé 6 fractions homogènes en électrophorèse réalisée en polyacrylamide dans l'urée et montré que leur composition en acides aminés sont identiques.

Ces 6 constituants portent de 0 à 5 atomes de phosphore et possèdent une mobilité électrophorétique en milieu alcalin qui croît avec le nombre d'atomes de phosphore liés (GROVES et GORDON)(301). Leur masse moléculaire est égale à 25.000 daltons (GROVES et TOWNEND)(302), valeur similaire à celle de la masse moléculaire des caséines β et γ bovines.

Les connaissances sur la partie glycanique de la caséine humaine sont encore très fragmentaires.

Les caséino-glycopeptides ont été isolés de la caséine entière par ALAIS et JOLLES (303) et par MALPRESS et SEID-AKHAVAN (304) qui les ont également obtenus à partir d'une fraction enrichie en caséine α (fraction B). Les compositions centésimales et molaires de ces fractions sont données dans le tableau XV (p. 40).

Selon MALPRESS et SEID-AKHAVAN (305) les glycannes sont attachés par des liaisons O-glycosidiques avec la thréonine et peut-être avec la sérine .

Les résultats de ces auteurs s'éloignent de ceux de ALAIS et JOLLES, en particulier par la teneur plus élevée en glucides et par la

T A B L E A U X V

Composition centésimale et rapports molaires en acides aminés et en glucides des caséino-glycopeptides obtenus par action de la présure sur la caséine humaine totale et sur une fraction enrichie en caséine **X** (fraction B).

	ALAIS et JOLLES (306)		MALPRESS et SEID-AKHAVAN (307)			
	p.100	rapports molaires	Glycopeptides provenant de :			
			Fraction B		Caséine totale	
			p.100	Rapports molaires	p.100	rapports molaires
Ac. aspartique		3		2		2
Thréonine		6		9 - 10		10
Sérine		4		3		3
Ac. glutamique		5		4		4
Proline		5		8 - 9		9
Glycocolle		3		0		0
Alanine		5		4 - 5		5
Valine		3		+		4
Méthionine		0		0		0
Isoleucine		3 - 4		6		5 - 6
Leucine		1		0		0
Phénylalanine		0		0		0 - 1
Lysine		3		2		2
Galactose	8,37		6,2		25,6	
Fucose			1,5		5,8	
Glucosamine			} 3,9	+	} 19,3	12
Galactosamine	6,36			+		
ANAN	1,26		0,8		4,5	

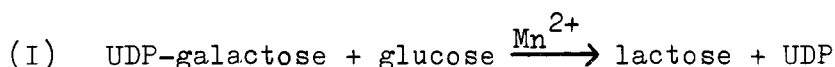
mise en évidence de glucosamine et de fucose dans les caséino-glycopeptides humains. Si les résultats de MALPRESS étaient confirmés on pourrait établir une relation chimique entre la caséine humaine et certains des glycopeptides et des glucides libres qui ne contiennent pas de mannose.

D - LA LACTALBUMINE

JOHANSSON (308) isola pour la première fois, en 1958, une protéine de coefficient de sédimentation 1,73 S, identique à celui de la lactalbumine bovine, par chromatographie du lactosérum humain sur colonnes d'hydroxy-apatite. MAENO et KIYOSAWA (309) proposèrent, en 1962, une autre méthode de préparation par acidification du lactosérum à pH 4,8 et reprecipitation. Ils obtinrent une α -lactalbumine ayant un coefficient de sédimentation de 1,7 S et une masse moléculaire de 23.000 daltons. D'autres procédés furent ensuite décrits qui mettaient en oeuvre le Sephadex G-200 (GOT)(310), le Biogel P-30 (BRODBECK et al.)(311) et le DEAE-Sephadex couplé au Sephadex G-100 (PHILLIPS et JENNESS)(312).

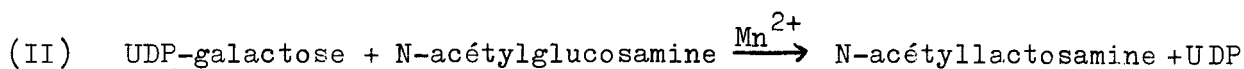
L' α -lactalbumine qui est la protéine majeure du lactosérum humain apparaît comme l'homologue de l' α -lactalbumine bovine, en se fondant sur des critères uniquement physico-chimiques.

Toutefois, contrairement à cette dernière qui se présente sous forme de deux variants, l' α -lactalbumine humaine n'est pas polymorphe. De plus, il n'y a pas de réaction immunologique croisée entre les α -lactalbumines humaines et bovines. La véritable parenté entre ces deux protéines est une parenté de fonction. Celle-ci est apparue lorsqu'a été découverte l'appartenance de l' α -lactalbumine au système enzymatique lactose synthétase qui permet la biosynthèse du lactose dans la glande mammaire (réaction I)



Ce système a été résolu en 2 composants appelés Protéine A et Protéine B (BRODBECK et EBNER)(313). La Protéine B est identique à l' α lactalbumine (EBNER et al.)(314). En l'absence de Protéine B, la Protéine A se comporte comme une galactosyltransférase qui catalyse la liaison β 1-4 entre du galactose provenant de l'UDP-galactose et de la

N-acétylglucosamine libre ou liée à une protéine (réaction II).



Dans ces conditions, le glucose est un mauvais accepteur, car le K_m de l'enzyme A vis-à-vis du glucose est très élevé. Ce K_m diminue environ 1000 fois en présence d' α -lactalbumine qui, seule, permet à l'enzyme A de catalyser la réaction I dans des conditions physiologiques c'est-à-dire avec des concentrations en glucose relativement faibles (MORISSON et EBNER)(315)(316)(317). Ces auteurs ont montré qu'il se forme un complexe enzyme A-Mn²⁺-UDP galactose-accepteur de groupement galactosyl, complexe qui peut ensuite réagir avec l' α -lactalbumine.

Les taux de synthèse relatifs des glycoprotéides et du lactose dépendent des concentrations en glucose et en précurseurs glycoprotéidiques en relation avec leurs K_m respectifs, de la concentration en α -lactalbumine et de l'influence de celle-ci sur les vitesses des différentes réactions. On ne peut considérer la N-acétylglucosamine comme l'analogue d'un glycoprotéide en voie de synthèse. Les travaux récents de SCHANBACHER et EBNER (318) ont montré que l' α -lactalbumine est un faible inhibiteur de la réaction II quand l'ovalbumine ou des glycoprotéides en voie de synthèse sont utilisés comme accepteurs du groupement galactosyl de l'UDP-galactose. Selon ces auteurs, on peut concevoir que dans ce cas, la taille importante des molécules combinées à l'enzyme A empêche la fixation de l' α -lactalbumine. Celle-ci, dans les conditions de concentrations physiologiques aurait donc un faible effet d'inhibition directe sur la synthèse des glycoprotéides. Elle en provoquerait la réduction presque exclusivement en détournant le potentiel catalytique de l'enzyme vers la synthèse du lactose.

LEY et JENNESS (319) ont étudié l'affinité des α -lactalbumines de 6 espèces : Rat, Chèvre, Vache, Cervidés, Porc et Homme, vis-à-vis de la Protéine A bovine. Ils ont montré que cette activité varie beaucoup selon les espèces et qu'il existe une corrélation entre le taux de lactose et d' α -lactalbumine chez ces différentes espèces.

Le mécanisme de la biosynthèse du lactose semble assez général puisqu'il a été mis en évidence dans les laits humains, de Chien, de Brebis et de Vache (BRODBECK et al.)(320) et qu'il a été reproduit en

mélangeant les Protéines A et B de différentes espèces.

Les travaux de purification des Protéines A et B ont conduit à la mise en évidence dans le lait de Vache de glyco- α -lactalbumine présente en faible proportion. La copule glucidique de ces glyco- α -lactalbumines comporte de 1 résidu de glucosamine (GORDON et al.)(321) à 11 résidus de monosaccharides représentés par du mannose, du galactose, du fucose, de la glucosamine et de la galactosamine (BARMAN)(322).

Des observations identiques ont été faites par HINDLE et WHEELLOCK (323), HOPPER et Mc KENZIE (324). Il est frappant que la copule polysaccharidique de la glyco- α -lactalbumine qui représente jusqu'à 15 p.100 de la molécule soit sans influence sur l'activité lactose synthétase (BARMAN)(325).

D'autre part, la "protéine A" a été purifiée principalement à partir du lait de Femme dont l'activité lactose synthétase est 10 fois plus élevée que celle du lait de Vache (ANDREWS)(326). La Protéine A est de nature glycoprotéidique (24,1 p.100 d'hexoses, 22,1 p.100 d'hexosamines et 9,1 p.100 d'acide sialique)(NAGASAWA et al.)(327).

Nous avons déjà vu, avec les IgA et la lactotransferrine que les constituants du lait maternel n'avaient pas seulement une fonction nutritive. L' α -lactalbumine témoin d'une action enzymatique exercée avant la sécrétion, représente un autre exemple où cette fonction apparaît biologiquement secondaire. Toutefois, la valeur nutritive de l' α -lactalbumine est certaine, surtout à cause de son taux élevé en tryptophane.

E - ENZYMES

1° - Lysosyme

La découverte du rôle de l' α -lactalbumine comme sous-unité de la lactose synthétase par EBNER et coll.(327a) incita de nombreux auteurs à étudier sa structure chimique. BREW et al. (327b) en ont déterminé la séquence peptidique complète et ont attiré l'attention sur les similitudes que présente sa structure primaire avec celle du lysozyme de blanc d'oeuf de Poule. La comparaison point par point des deux séquences, montre que 49 résidus de l' α -lactalbumine sont identiques aux

résidus correspondants du lysozyme de blanc d'oeuf et révèle aussi de nombreux points communs avec le lysozyme humain. Selon BREW et al. (328) à l'analogie de structure correspondrait une parenté de fonction, l'une des protéines étant impliquée dans la synthèse et l'autre dans la coupure des liaisons $\beta 1 \rightarrow 4$ glyco-pyranosidique.

Le lysozyme est très répandu dans la nature. On le rencontre dans les organes ou sécrétions de l'homme et des mammifères, mais encore chez de nombreux vertébrés et invertébrés, dans le règne végétal et chez les Bactéries.

Les lysozymes provenant d'animaux différents sont différents (FROMAGEOT et JOLLES)(329) et il en est de même pour les lysozymes provenant d'organes différents chez le même animal. Cependant, tous ces lysozymes présentent qualitativement la même activité biologique et un ensemble spécifique de propriétés communes.

Ce sont des protéines basiques qui ont une masse moléculaire voisine de 15.000 daltons. Labiles en milieu alcalin, elles sont par contre très stables en milieu acide. Elles ont surtout la propriété biologique de lyser un nombre restreint de bactéries (Micrococcus lysodeckticus par exemple) en catalysant la rupture de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine des mucopolysaccharides de parois bactériennes.

C'est le blanc d'oeuf de Poule qui est la source la plus abondante de lysozyme, mais le lait de Femme, d'où il a été isolé par JOLLES (330), en contient en moyenne 400 mg par litre soit, environ 3000 fois plus que le lait de Vache (CHANDAN et al.)(331)(332).

L'activité spécifique du lysozyme de lait humain est 3,5 fois celle du lysozyme du blanc d'oeuf de Poule. Sa structure primaire présente certaines analogies avec ce dernier, bien que 52 des 129 résidus d'acides aminés soient différents (JOLLES et JOLLES)(333), et qu'ils ne donnent pas de réactions immunologiques croisées (FAURE et JOLLES)(334).

Dans toutes les sécrétions où les anticorps sont représentés en majeure partie par les IgA, comme les larmes, la salive, le colostrum, il y a toujours beaucoup de lysozyme (GLYNN)(335). L'action complémentaire de ces deux constituants sur la lyse des colibacilles démontrée in vitro,

(GLYNN)(336) doit contribuer à la défense du tractus gastro-intestinal de l'enfant (VAKIL et al.)(337). En effet, les IgA résistent aux enzymes protéolytiques et le lysozyme est retrouvé dans les matières fécales du nouveau-né (HAENEL et al.)(338), (PRICKETT et al.)(339).

2° - Autres enzymes du lait maternel

L' α - lactalbumine et le lysozyme nous ont amenés à pénétrer dans le domaine des enzymes du lait. Une autre enzyme, la ribonucléase est génétiquement apparentée à l' α -lactalbumine et au lysozyme (MANWELL) (340). Il est curieux que ces trois substances enzymatiques ou apparentées soient parmi les mieux représentées dans le lait maternel, où de nombreuses autres activités enzymatiques ont été décelées, mais la plupart des enzymes correspondantes ne s'y trouvent qu'à l'état de traces et ne sont décelables que par leurs activités catalytiques. Rares sont celles qui sont en concentration suffisante pour qu'elles puissent être isolées ou purifiées. Leur description nous ferait sortir du schéma que nous avons défini au départ. Nous nous bornerons à remarquer pour terminer que le taux de lactoperoxydase est beaucoup plus faible dans le lait de Femme que dans le lait de Vache. Cet hémoprotéide est en fait un glycohémoprotéide qui renferme 1,5 p.100 d'oses neutres, 16 résidus de glucosamine et 10 résidus de galactosamine par molécule selon ROMBAUTS (341), 5,37 p.100 d'oses neutres, 14 résidus de glucosamine et 4 résidus de galactosamine selon CARLSTROM (342). Il n'y aurait pas d'acide N-acétylneuraminique.

Tous les travaux de purification de la lactoperoxydase à partir du lait de Vache, montre que celle-ci est toujours étroitement associée à la "red protein". Ces deux protéides n'ont aucune parenté immunologique mais ils auraient en commun une fonction anti-microbienne. Cette propriété a été évoquée plus haut au sujet de la lactotransferrine et JAGO et MORRISSON (343) ont montré que la lactopéroxydase pouvait inhiber certaines bactéries en milieu anaérobie.

En admettant que le rôle principal de ces deux protéines soit anti-microbien, on pourrait expliquer par un raisonnement finaliste leur répartition inverse dans les laits de Femme et de Vache.

F - LA β -LACTOGLOBULINE

La β -lactoglobuline qui représente plus de la moitié des

protéides du lactosérum de Vache paraît totalement absente du lactosérum humain (GOT)(344, 345). Elle se présente sous forme de nombreux variants et ne renferme pas de glucides sauf le variant "DROUGHTMASTER" qui possède une copule glucidique dont la composition est la suivante :

- 1 résidu d'acide N-acétylneuraminique,
- 4,3 résidus d'hexosamines (Glc N/Gal N = 4),
- 1,9 résidus de mannose et
- 0,8 résidu de galactose,

pour une masse moléculaire de 20.000 (monomère)(BELL et al. (346)).

La β -lactoglobuline est particulièrement abondante dans le lait des Ruminants ; les laits des autres Mammifères en sont pratiquement dépourvus. Quant à la raison d'être de la β -lactoglobuline, elle est totalement inconnue. Mis à part un rôle nutritionnel, on peut supposer comme JENNESS (347) que la β -lactoglobuline a une importance particulière pour le jeune ruminant, ou qu'elle joue un rôle enzymatique dans la biosynthèse du lait comme l' α -lactalbumine, mais, à ce jour, aucun fait ne confirme l'une ou l'autre de ces hypothèses.

G - LES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides sont très abondants dans le lait de Femme et ils ont été étudiés très tôt par les auteurs recherchant l'origine métabolique des nombreux oligosaccharides du lait de Femme.

En associant le fractionnement par l'éthanol et par le sulfate d'ammonium, MONTREUIL et HOLLEMAN (348) ont isolé du lait de Femme un glycoprotéide dont les caractéristiques sont précisées dans le tableau XVI (p. 47).

L'utilisation après fractionnement éthanolique de la chromatographie sur DEAE-cellulose a permis à GOT et al. de préparer plusieurs fractions glycopeptidiques riches en glucides, de masse moléculaire comprise entre 3.500 et 4.000 et constituées en proportions variables de galactose, glucose, fucose, glucosamine, galactosamine et acide N-acétylneuraminique.

A partir d'une de ces fractions, GOT, FONT et BOURRILLON (349)

T A B L E A U X V I

Composition centésimale du Gynolactofucoïde I du lait de Femme
(MONTREUIL et HOLLEMAN)(350)

Composition en glucides

Galactose	10,8
Fucose	8,7
Osamines	10
Acide N-acétylneuraminique	12

Composition en acides aminés

Acide aspartique	12,5
Acide glutamique	11,8
Arginine	4,5
Histidine	2,3
Lysine	5,5
Alanine	8,6
Cystine/2	2,14
Glycocolle	6,8
Leucine	10,7
Méthionine	2
Phénylalanine	3,5
Proline	6
Sérine	7,2
Thréonine	7
Tyrosine	4,6
Valine	6,5

ont isolé, par électrophorèse préparative sur papier, trois glycopeptides dont les compositions et constantes de sédimentation sont précisées dans le tableau XVII (p. 49). Les principales propriétés physico-chimiques du glycopeptide 1 ont été ensuite déterminées par GOT, FONT et MARNAY (351) (Tableau XVIII, p. 50).

HIRANO, HAYASHI, MASUDA et ONODERA (352) ont également isolé des glycopeptides du colostrum humain en utilisant la méthode de GOT et al. (353) et ils ont montré que la quantité totale de glycopeptides passe de 3 g/litre de colostrum un jour après l'accouchement, à 1,5 g par litre onze jours après l'accouchement. Le tableau XIX (p. 51) illustre les propriétés physico-chimiques des fractions glycopeptidiques obtenues qui présentent toutes des activités de groupe sanguin (voir la revue générale de GRIMMONPREZ (354)).

Nous avons repris, au laboratoire, l'étude de ces glycopeptides en collaboration avec GRIMMONPREZ. Notre contribution sera exposée dans le chapitre de nos travaux personnels.

T A B L E A U XVII

Composition et constante de sédimentation de trois glycopeptides du colostrum humain
(d'après GOT, FONT et BOURRILLON)(355).

Glycopeptides	Hexoses (a) p.100	Acide sialique p.100	Hexosamines (b) p.100	6-desoxyhexoses (c) p.100	Amino-acides (d) (μ mole)	S ₂₀ (e)
1	29	9	20	6	0,2	2,15
2	33	18	24	10	0,1	2,48
3	33	6	28	3,5	0,1	2,50

- (a) galactose
- (b) glucosamine + galactosamine
- (c) fucose
- (d) aspartique, glutamique, thréonine, proline, alanine, valine, leucine et sérine
- (e) C = 0,2 g p.100.



T A B L E A U XVIII

Composition centésimale du gynolactofucoïde de GOT, FONT et MARNAY (356).

Composition en glucides

Galactose	29
Fucose	7
Hexosamines (glucosamine + galactosamine)	22
Acide N-acétylneuraminique	9

Composition en acides aminés

Acide aspartique	1,7
Acide glutamique	3,2
Alanine	1,6
Glycocolle	0,5
Isoleucine	2,9
Leucine	0,5
Proline	2,1
Sérine	2
Thréonine	5
Valine	2,2

T A B L E A U XIX

Composition des fractions glycopeptidiques isolées du colostrum de Femme (d'après HIFANO et al.)(357)

Fraction glycopeptidique	Hexoses (a)	Hexosamines (b)	6-deoxyhexose (c)	ANAN (d)	Acides aminés (e)	$[\alpha]_{D, eau}^{18}$	S _{20,w}	Masse moléculaire
Fraction A	52,1	16,6	5,8	1,83	11,0	- 4,6	0,75	7.400
Fraction B	53,5	19,3	8,1	9,33	15,0	- 3,5	1,2	9.600
Fraction C	30,5	17,2	4,9	8,31	31,6	- 40	1,4	16.000
Fraction D	33,2	23,1	7,0	5,51	31,0	- 25	1,7	18.000
Fraction E	34,1	16,9	8,2	3,20	21,7	+ 15	1,7	19.000



(a) Galactose et un peu de glucose

(b) Glucosamine et galactosamine

(c) Fucose

(d) Dosé par la méthode au résorcinol

(e) Présence de 16 acides aminés dont principalement : aspartique, glutamique, glycocolle, alanine, sérine, thréonine, valine, leucine, proline.

CONCLUSIONS

En conclusion, nous pouvons constater que la composition glucidique des glycoprotéides du lait maternel est encore très mal connue au moment où nous commençons nos travaux et qu'il est difficile d'établir un lien métabolique entre les oligosaccharides et les glycoprotéides. On peut déjà exclure les glycoprotéides sériques et la lactotransferrine qui renferment du mannose, les premiers étant en outre très faiblement représentés. Par contre, une similitude de structure apparaît entre les oligosaccharides et : d'une part, la caséine, bien que celle-ci ne renferme pas de glucose (MALPRESS et al. (358)), d'autre part, certaines fractions glycopeptidiques où GOT et al. (359) ont trouvé du glucose.

Une recherche systématique des glycoprotéides s'impose donc.

Dans ce but, nous avons commencé par effectuer un fractionnement du lait de Femme par relargage au sulfate d'ammonium, puis nous avons effectué l'analyse physico-chimique de chacune des fractions obtenues.

L'exposé de ce travail constitue le premier chapitre de nos travaux personnels.

TRAVAUX PERSONNELS

FRACTIONNEMENT DU LAIT MATEFREL PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM

1. - GENERALITESI - INTRODUCTION

JENNESS (360) a récemment posé en ces termes le problème du fractionnement du lait :

"Il est important de réaliser que non seulement le lait est constitué d'un mélange complexe de protéides qui serait considéré de prime abord comme difficile à fractionner, mais que la tâche est rendue encore plus difficile du fait de la forte tendance qu'ont les protéides du lait à s'associer entre espèces de même nature ou de nature différente. De tels complexes peuvent impliquer des forces physiques aussi bien que chimiques".

Les méthodes mises en oeuvre pour fractionner le lait sont celles qui sont utilisées en général pour les mélanges de protéides solubles.

Elles tirent parti de toutes les propriétés physico-chimiques des protéides : solubilité, taille, charge électrique, labilité, densité, activité biologique et aptitude à donner des réactions spécifiques avec différentes substances.

Il n'existe pas de méthodes permettant d'isoler sélectivement les glycoprotéides d'un mélange de protéides sauf lorsque leur teneur en glucides est très élevée comme l'ovomucoïde qui est difficilement dénaturable par la chaleur et les solvants organiques. Dans ce cas, la dénaturation sélective sacrifie évidemment les autres protéides y compris les glycoprotéides moins riches en glucides. Elle a été utilisée pour l'isolement des glycopeptides du lait maternel par MONTREUIL et HOLLEMAN (361).

Notre travail étant de rechercher, isoler et étudier la

structure des glycoprotéides du lactosérum, nous avons choisi un procédé respectant tous les glycoprotéides et permettant de les obtenir en quantités importantes. Notre choix s'est porté sur le relargage par les sels neutres, car cette méthode fondée sur les variations de solubilité des protéides est à la fois simple et facilement utilisable à grande échelle.

En outre, cette technique est douce puisqu'elle ne provoque pas de modifications irréversibles de conformation et, bien que peu sélective, elle fournit des fractions enrichies qui le plus souvent conduisent à des protéides purs au moyen d'une seule étape supplémentaire.

II - LE RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Le relargage des protéides par les sels neutres est une des plus anciennes méthodes de préparation de ces composés.

La solubilité des protéides varie en fonction de la force ionique du solvant. Aux très faibles concentrations salines, la solubilité des protéides croît avec la force ionique par "effet dissolvant" ou "salting in effect". Cependant, lorsque la force ionique continue à croître, la solubilité passe par un maximum puis décroît d'une manière continue c'est l'effet de relargage ou "salting out effect".

Les différents ions n'ont pas le même effet de relargage. Les sels formés à partir d'anions multivalents (phosphates, sulfates, citrates) sont les agents de relargage les plus efficaces. Le sulfate de sodium est un meilleur agent de précipitation que le sulfate d'ammonium, mais la plus grande solubilité de ce dernier, rend son utilisation plus commode.

La concentration et la température de la solution protéique à fractionner doivent être fixées pour que les résultats soient reproductibles. En outre, les solutions protéiques doivent être amenées très progressivement dans les conditions de précipitation pour faciliter la cristallisation et réduire les coprécipitations. Enfin, le pH est un facteur de première importance : à force ionique et température constantes la solubilité d'un protéide passe par un minimum, pour des valeurs de pH voisines de son point isoélectrique.

2. - DIFFERENTS PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DU LAIT PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

I - METHODE DE MONTREUIL et coll.

Ces principes ont conduit MONTREUIL et collaborateurs (362) à mettre au point un procédé de fractionnement du lait humain associant un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH suivant le schéma de la figure 1 (p. 57).

Ce fractionnement de base a permis l'isolement d'IgA à partir du précipité P₄ (MONTREUIL et al.)(363) et de lactotransferrine à partir du précipité P₇ (MONTREUIL et al.)(364).

II - MODIFICATIONS DU PROCEDE DE MONTREUIL

A - NATURE DES MODIFICATIONS

Nous avons introduit trois modifications au procédé original de MONTREUIL :

1°) Elimination des substances dialysables dans le but :

- a - de se débarrasser au maximum des oligosaccharides dont on recherche la trace dans la structure des glycoprotéides.
- b - de faciliter la précipitation de la caséine qui est irrégulière lorsqu'on opère directement sur le lait délipidé (ALAIS et JOLLES)(365).
- c - de régulariser la précipitation des protéides du lactosérum.

2°) Elimination de la caséine avant de commencer le relargage afin d'éviter une précipitation massive dans les premières étapes et les phénomènes d'entraînement qui en sont la conséquence.

3°) Modification dans les dernières étapes du relargage afin d'améliorer le procédé d'isolement de la lactotransferrine et le fractionnement des glycoprotéides qui ne précipitent qu'à des concentrations élevées en sulfate d'ammonium.

Lait délipidé : 1/3 de saturation en
sulfate d'ammonium : pH 7

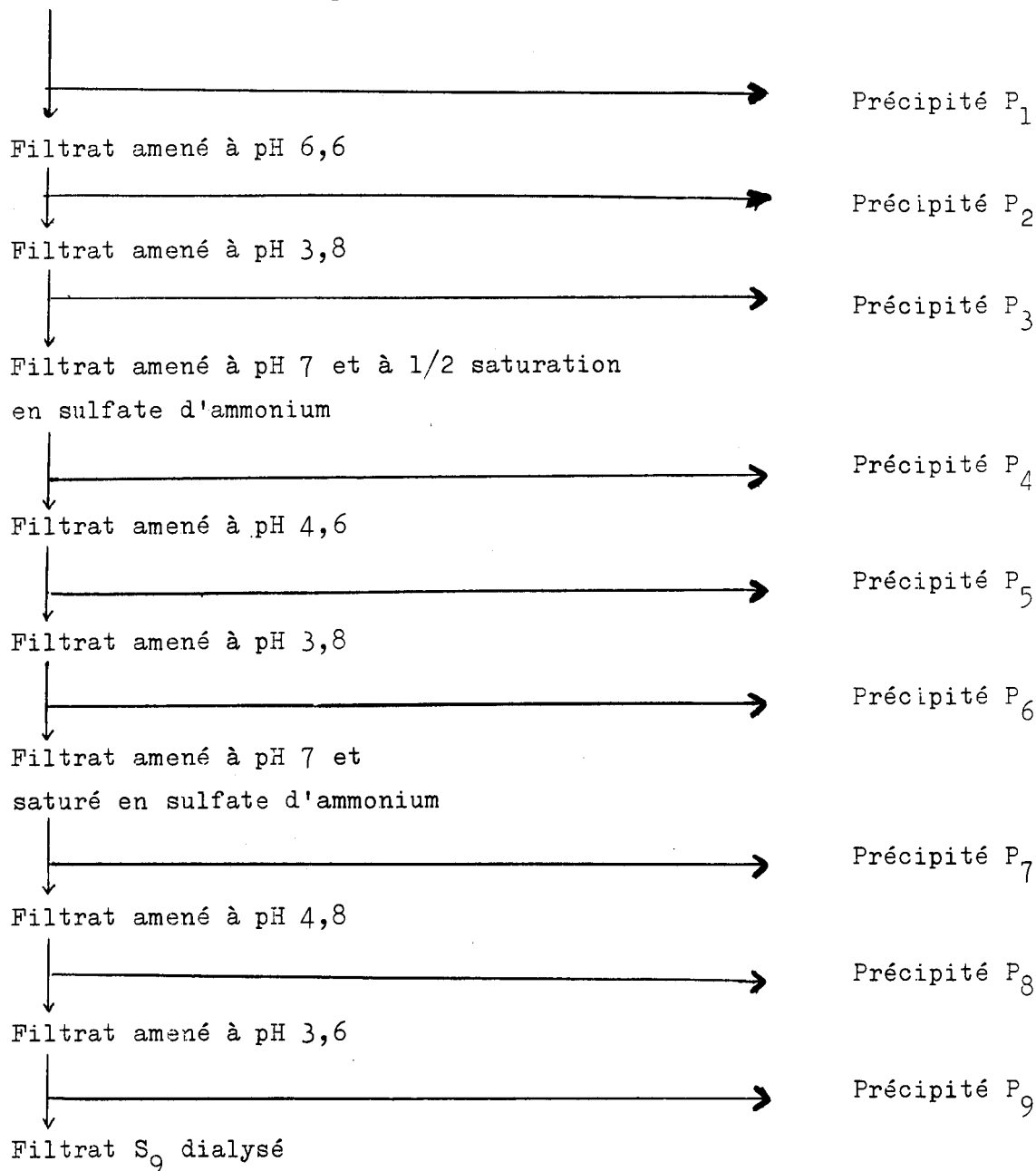


Figure 1

Schéma du fractionnement des protéides du lait de Femme par le sulfate d'ammonium selon MONTREUIL, CHOSSON, HAVAZ et MULLET (366).



Pour cela, nous avons opéré de la manière suivante : Partant du lactosérum à pH 7, nous ajoutons une solution saturée de sulfate d'ammonium jusqu'à ce qu'il y ait précipitation et le précipité est recueilli par centrifugation ; ensuite, le pH de la solution surnageante est abaissé jusqu'à obtenir un nouveau précipité et le processus est poursuivi à concentration constante en sulfate d'ammonium sans descendre en dessous de pH 3,8. Puis, après avoir ramené la solution à neutralité, la concentration en sulfate d'ammonium est à nouveau augmentée jusqu'à formation d'un précipité et le fractionnement est poursuivi comme précédemment. Nous avons retrouvé les mêmes étapes que MONTREUIL et coll. pour le début du fractionnement. Seuls les derniers stades ont été modifiés (figure 2, p.59).

B - CONDUITE DU FRACTIONNEMENT

Le lait^(*) que nous utilisons est le produit du rassemblement d'échantillons provenant de différentes mères à des stades de lactation difficilement contrôlables.

4 litres de ce lait sont délipidés par centrifugation à 15.000 tours par minute pendant 30 minutes, à 4°C, dans le rotor "Batch" d'une centrifugeuse SPINCO modèle L, puis soumis à une dialyse de 3 jours contre de l'eau distillée à 4°C. L'adialysable est réchauffé à 20°C puis amené à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Après une nuit de repos, il est centrifugé à 20°C pendant 30 mn à 3000 g.

Les paliers de saturation 33 p.100 et 50 p.100 en sulfate d'ammonium sont obtenus par addition lente, sous agitation magnétique, d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 7. Puis nous passons à 62 p.100, à 74 p.100 et à 100 p.100 de saturation, par agitation de la solution en présence de sulfate d'ammonium cristallisé.

Nous utilisons la formule suivante pour calculer la masse de sel, en grammes, à ajouter à 100 ml de solution de saturation S_1 , pour obtenir une saturation S_2 .

$$X = \frac{0,1 \text{ G } (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG}{1000} S_2}$$

(*) Provenant du lactarium de l'Institut PASTEUR que nous remercions vivement.

Lait délipidé et décaséiné amené à 33 p.100
de saturation en sulfate d'ammonium.

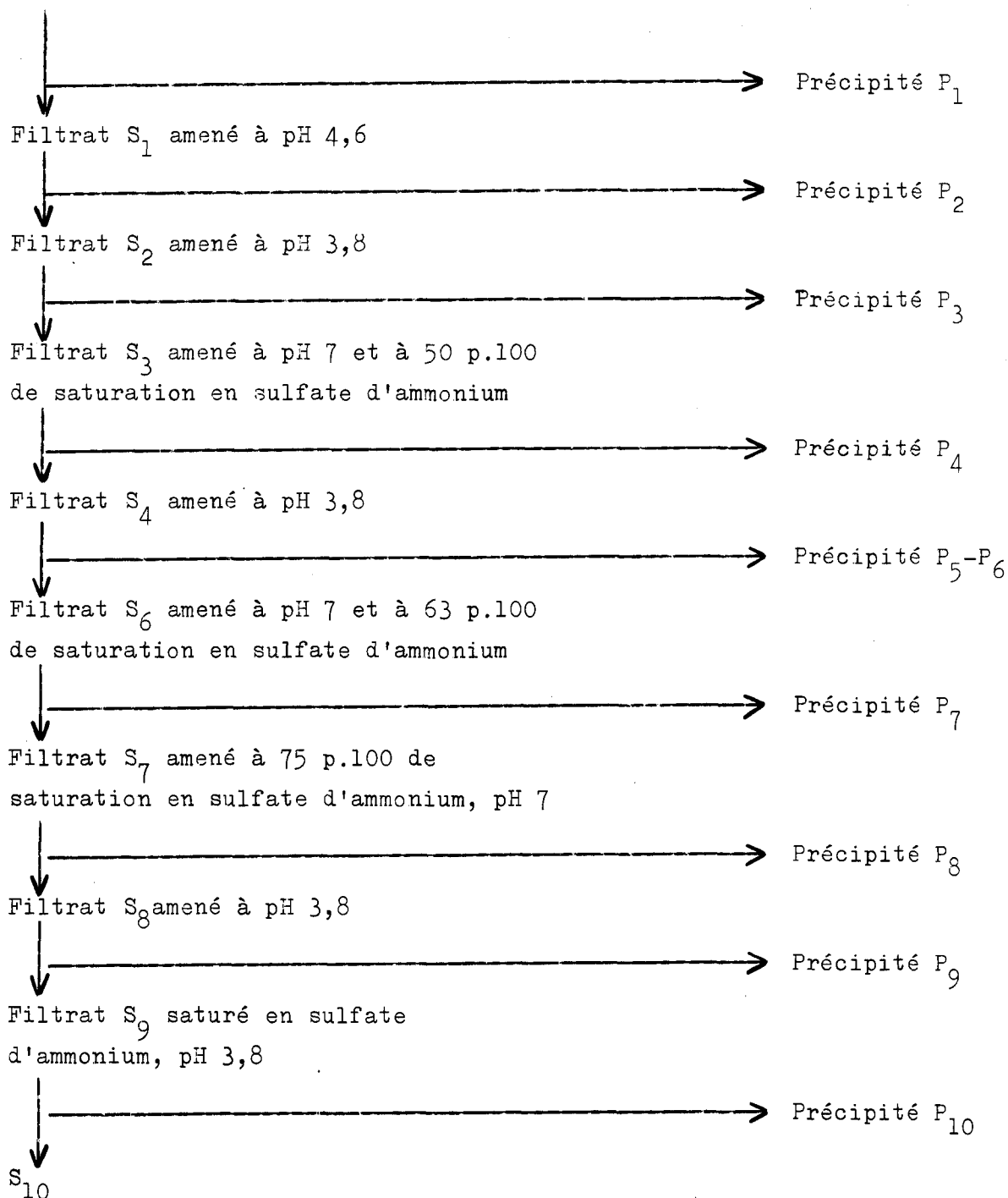


Figure 2

Modifications personnelles au schéma de fractionnement de MONTREUIL et coll. (367).



	0°C	10°C	20°C
G : en grammes de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dans 1000 ml de solution saturée	514,72	525,05	536,34
V : volume apparent spécifique de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en solution saturée	0,5262	0,5357	0,5414

Les pH sont ajustés lentement au moyen d'un titrateur automatique RADIOMETER TTT 1C avec des solutions d'acide chlorhydrique et d'ammoniaque 3 N.

Un repos d'une nuit à 4°C est observé avant de recueillir chacun des précipités par centrifugation de 30 à 45 mn à 15.000 tours par minute dans un rotor Batch de centrifugeuse SPINCO, Modèle L. Seul le précipité P_{10} est isolé par filtration sur papier Whatmann n° 1.

Les précipités sont dissous dans le minimum d'eau distillée, et le pH est éventuellement ramené à neutralité. Les solutions obtenues sont centrifugées, puis dialysées à 4°C contre de l'eau distillée dans des tubes de cellophane NOJAX, préalablement lavés pendant 2 jours à l'eau courante. La fraction adialysable est enfin lyophilisée et pesée. La solution finale S_{10} est dialysée contre de l'eau distillée pendant 3 à 4 jours à + 4°C puis lyophilisée.

III - AUTRES METHODES

A - METHODE DE GOT (368)

La caséine est éliminée par précipitation éthanolique puis le lactosérum est fractionné selon le schéma de la figure 3 (p.61).

B - METHODE DE MUH (369)

Cette méthode qui dérive de celle de MONTREUIL et al. (370) est surtout adaptée à la préparation des IgA (Figure 4; p.62). Après un premier stade à 33 p.100 de saturation, pH 7, le précipité obtenu à 50 p.100 de saturation, pH 7, est refractionné selon le schéma de MONTREUIL.

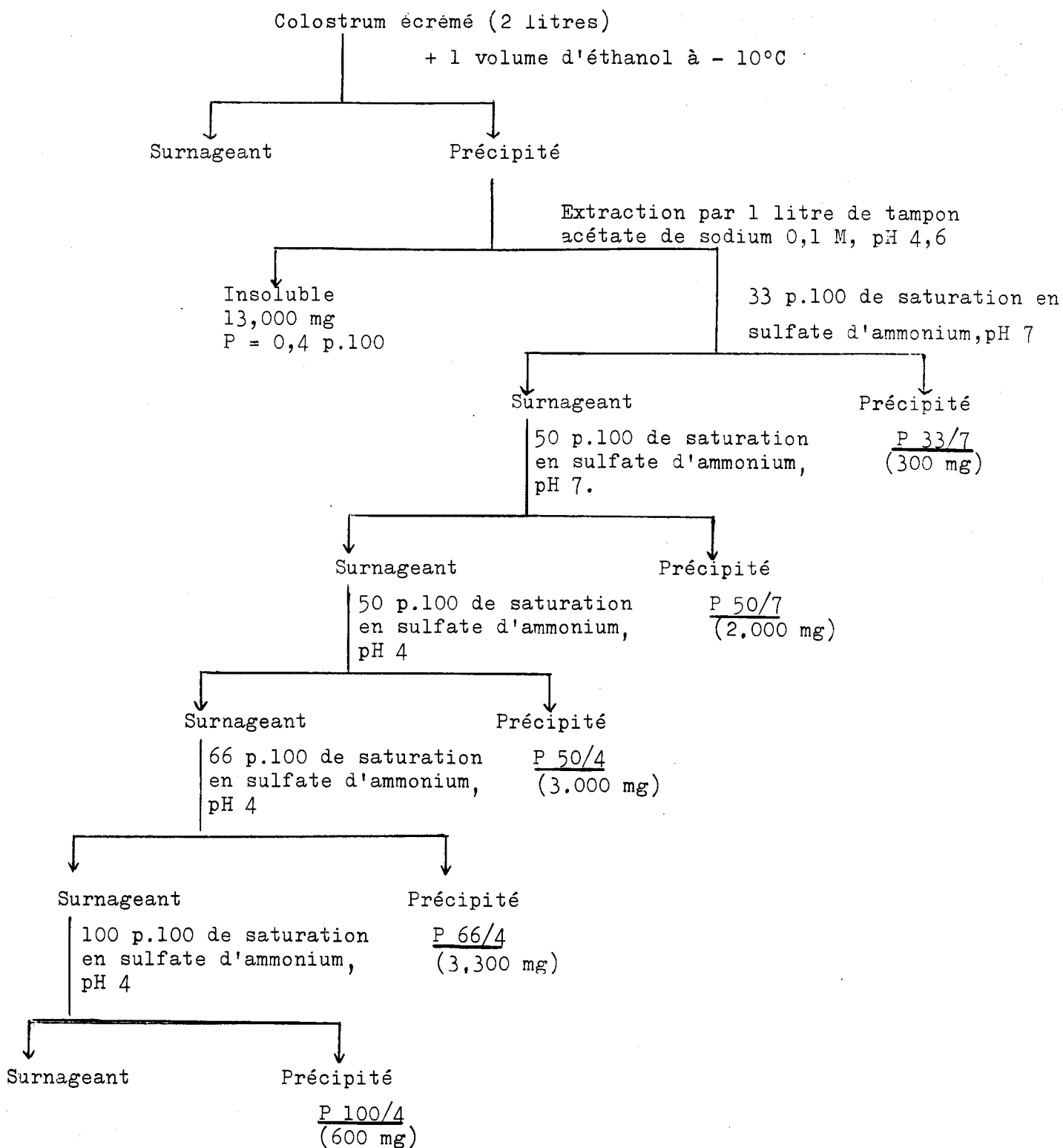


Figure 3

Schéma de préparation du lactosérum et de son fractionnement par le sulfate d'ammonium (GOT)(371)



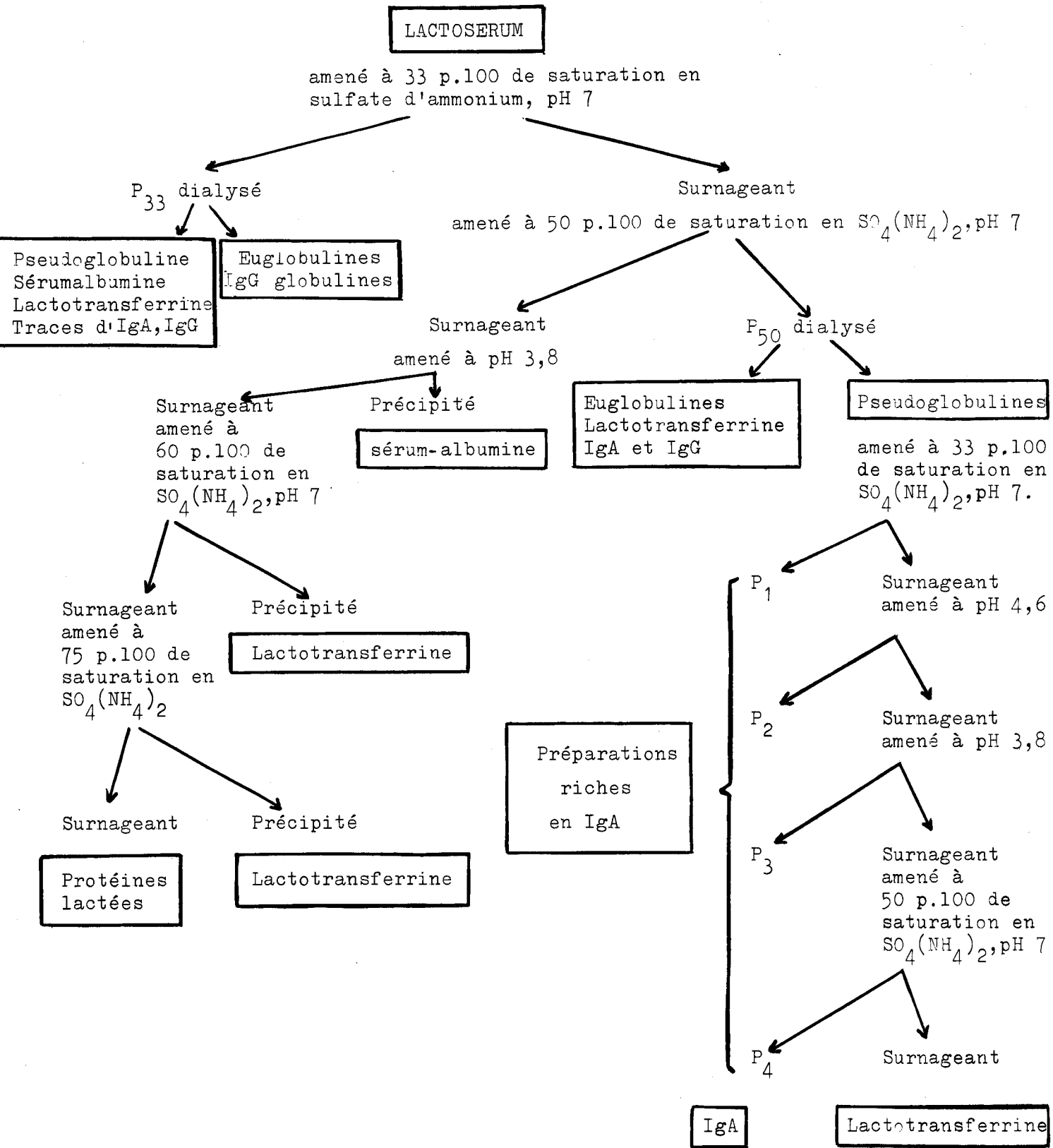


Figure 4

Schéma de fractionnement du lactosérum selon MUH (372)



Les précipités obtenus à 60 et à 75 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium renferment essentiellement de la lactotransferrine.

3. - METHODES D'ANALYSE DES PRECIPITES

Nous avons effectué l'étude physico-chimique et immunologique des fractions obtenues. L'étude chimique a consisté essentiellement à réaliser l'identification et le dosage des glucides, à doser l'azote et le phosphore de chacune des fractions. Celles-ci ont également été étudiées en électrophorèse de zone sur différents supports, en immuno électrophorèse en gélose et en filtration sur gel de Sephadex comme nous le verrons au chapitre suivant.

I - ANALYSE CHIMIQUE

A - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES GLUCIDES

Nous nous bornerons à préciser les méthodes que nous avons choisies, car elles ont été décrites d'une manière détaillée dans les revues générales de MONTREUIL et SPIK (373)(374).

Nota : Les précipités P₇, P₈, P₉ renfermant de la lactotransferrine ont été préalablement débarrassés du fer qu'ils contenaient par acidification à pH 2 et dialyse entre le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique.

1° - Composition centésimale en glucides

Les oses neutres ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (375) modifiée par REMINGTON (376) en utilisant des témoins possédant la composition glucidique des différents précipités.

Les osamines ont été dosées, après une hydrolyse de 4 h à 100°C, en tubes scellés sous vide par l'acide chlorhydrique 4N, redistillé : la glucosamine par la méthode de BELCHER et col. (377), la glucosamine et la galactosamine par la méthode de LUDOWIEG et BENMAMAN (378). L'acide N-acétylneuraminique a été dosé par la méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (379). L'acide uronique a été recherché à l'aide du réactif de DISCHE (380) au carbazole sulfurique en introduisant des témoins internes d'oses neutres car ces derniers interfèrent dans la réaction (SPIK)(381) ; (SPIK et MONTREUIL)(382).

2° - Composition molaire en glucides

La composition molaire en oses neutres a été déterminée après hydrolyse des précipités par l'acide chlorhydrique 2N pendant 2 h et purification des hydrolysats par passage sur échangeurs de cations (Iowex 50x8, forme acide) et d'anions (Duolite A-102 D forme acétate), par le procédé de DATE modifié (383), après séparation chromatographique des oses sur papier et par chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilyls. Les osamines ont été identifiées et dosées à l'Auto-analyseur TECHNICON suivant le mode opératoire décrit par MONSIGNY et al. (384).

B - DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

L'azote total a été dosé par la microméthode de KJEHLDAL (voir MATHIEU (385)). On effectue le dosage par rapport à un témoin de sérum-albumine bovine contenant 15 p.100 d'azote.

C - DOSAGE DU PHOSPHORE

Le phosphore a été dosé par la méthode d'ALLEN (386).

II - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

Réalisée uniquement par électrophorèse de zone, différents supports ont été utilisés : la gélose, le gel d'amidon, l'acétate de cellulose et le gel de polyacrylamide.

A - NATURE DES SUPPORTS, DES SYSTEMES TAMPON ET CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

1° - Electrophorèse sur papier

Les électrophorèses ont été effectuées sur bande de papier SCHLEICHER et SCHULL 2043, avec un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,05, pendant 18 h sous une tension de 5 V/cm .

2° - Electrophèse en gélose

L'électrophorèse en gélose est pratiquée selon la microméthode de GORDON et al. (387) que nous avons adaptée à des plaques de grandes dimensions. On utilise de la gélose DIFCO à 1,5 p.100 avec un tampon Véronal-NaCl de pH 8,2 dont la force ionique est de 0,1 dans les bacs à électrode et de 0,06 environ dans le gel. Une tension de 4V/6cm est

appliquée pendant 2 heures.

3°- Electrophorèse en gel d'amidon

L'électrophorèse en gel d'amidon est effectuée horizontalement avec le système tampon discontinu de POULIK (388). Le gel se compose de 10 g d'amidon hydrolysé CONNAUGHT pour 100 ml de tampon. La migration électrophorétique dure 3 heures sous une différence de potentiel de 8 V/cm.

4°- Electrophorèse sur acétate de cellulose

L'acétate de cellulose de marque CELLOGEL est utilisé en bandes de 2,5 cm de largeur. L'électrophorèse est effectuée avec un tampon véronal de pH 8,6 ayant la composition suivante :

Véronal sodé	25,52 g
Véronal	3,32 g
Eau distillée q.s.p.	2000 ml

pendant 1,5 heures sous une différence de potentiel de 11 V/cm.

5°- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été effectuée horizontalement sur plaques de microscope selon une technique mise au point au Laboratoire par CANER (389). Le gel est composé de 5 p.100 d'acrylamide dans un tampon dont la composition est la suivante :

- Tris	21,55 g
- EDTA disodique	1,85 g
- Acide borique	11 g
- Eau distillée q.s.p.	2000 ml

Le pH est ajusté à 8,45. La migration électrophorétique s'effectue sous une différence de potentiel de 3 V/cm pendant 2 heures.

B - REVELATIONS DES ELECTROPHOREGRAMMES

Tous les électrophorégrammes ont été révélés par l'Amidoschwarz qui est spécifique des protéides. En outre, nous avons utilisé

divers types de révélations spécifiques pour les :

1° - Glycoprotéides :

Les électrophorogrammes obtenus en gélose et en acétate de cellulose ont été révélés par la technique de l'acide periodique-réactif de SCHIFF (Procédé de KOIW et GRONWALL)(390) qui est spécifique des glycoprotéides.

2° - Lipoprotéides :

Les lipoprotéides ont été recherchés dans les électrophorogrammes réalisés en gélose à l'aide du réactif "Oil Red O" (DURRUM etal.) (391).

3° - Mucopolysaccharides acides :

Le réactif au Bleu Alcian, spécifique des mucopolysaccharides acides, a été utilisé sur les électrophorogrammes réalisés sur papier.

III - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

A - IMMUNOELECTROPHORESE (⊗)

Nous avons utilisé la microméthode de SCHEIDEGGER (392).

Nous avons choisi l'immunoélectrophorèse en gélose dont le pouvoir de résolution est très élevé puisqu'il discrimine les protéides suivant leur charge, leur taille moléculaire et leur activité immunologique. Cependant, le résultat final dépend étroitement de la qualité de l'immunsérum qui doit être polyvalent.

B - PREPARATION DES IMMUNSERUMS

Du lait total délipidé et lyophilisé est utilisé comme antigène. Un volume de la solution d'antigène dans du sérum physiologique est mélangé à un volume égal d'adjuvant de FREUND. 5 à 10 mg sont injectés par piqûre intramusculaire dans les pattes arrières d'un lapin. Le volume injecté est de 2 ml. Un cycle d'injection consiste en une injection par semaine pendant un mois. Le lapin est saigné une semaine

(⊗) Dans toutes les figures présentées les immunsérums anti-protéides lactés et sériques seront désignés respectivement par les abréviations AL et AS.

après la dernière injection. On peut soumettre l'animal à un nouveau cycle après avoir observé un repos d'un mois. Plusieurs cycles sont le plus souvent nécessaires pour obtenir un immunosérum polyvalent. L'immunosérum anti-protéides sériques est un immunosérum équin (**).

4. - RESULTATS DU FRACTIONNEMENT

I - RENDEMENT

Pour apprécier quelles sont les pertes au cours des nombreuses étapes du relargage par le sulfate d'ammonium, nous avons lyophilisé une partie aliquote de la fraction adialysable du lactosérum utilisé pour le fractionnement et comparé la masse pondérée de matière sèche obtenue à la somme des masses des différents précipités.

Il en résulte que le rendement global du fractionnement est de l'ordre de 80 à 85 p.100.

Le tableau XIX (p. 68) rapporte les masses de chacun des précipités obtenus à l'aide de notre procédé de relargage (voir p.59). Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes, elles montrent que les précipités P_2 , P_4 et P_8 sont pondéralement les plus importants.

II - IMPORTANCE DE LA SATURATION EN FER

L'addition d'un sel de fer (alun de fer ou chlorure ferrique) au lactosérum est commode car elle permet de réaliser un "marquage" de la lactotransferrine qui peut ensuite être suivie au cours du fractionnement grâce à sa couleur rouge. Il est également possible que la saturation préalable en fer de la lactotransferrine puisse jouer un rôle important dans le comportement de celle-ci au cours du fractionnement.

Pour vérifier ce dernier point, nous avons effectué trois fractionnements comparatifs sur des échantillons de lait provenant du même mélange. Aux deux premiers, nous avons ajouté, pour l'un sous forme d'alun de fer, pour l'autre sous forme de chlorure ferrique, une quantité de fer suffisante pour réaliser la saturation de la

(**) Provenant de l'Institut PASTEUR de PARIS.

T A B L E A U X I X

Masse des différents précipités obtenus par relargage au sulfate d'ammonium

Précipités	Concentration en sulfate d'ammonium Exprimée en p.100 de saturation.	pH	Masse de précipités en g/litre de lactosérum
P ₁	33	7	0,8
P ₂	33	4,6	3,8
P ₃	33	3,8	0,7
P ₄	50	7	1
P ₆	50	3,8	0,9
P ₇	63	7	0,6
P ₈	75	7	2
P ₉	75	3,8	0,5
P ₁₀	100	3,8	0,35
S ₁₀	100	3,8	0,4
Masse de précipité récupérée par litre de lactosérum			11,05
Masse de matière sèche adialysable dans un litre de lactosérum			13,9



lactotransferrine en tablant sur la présence de 1 gramme de lactotransferrine saturée au tiers par litre de lait. Au troisième nous n'avons rien ajouté.

L'étude pondérale des précipités obtenus avec les trois fractionnements, montre que la saturation en fer n'affecte pas les rendements en précipité P_8 renfermant la lactotransferrine, mais que dans ces conditions on recueille beaucoup plus de précipité P_1 .

Ce résultat montre qu'une partie du fer, même s'il n'est pas en excès, peut se fixer de manière non sélective sur divers protéides qui acquièrent une couleur jaune et dont les caractères de précipitabilité se modifient.

Nous avons donc abandonné la saturation préalable en fer du lactosérum. Par contre, nous saturons en fer les fractions enrichies en lactotransferrine avant d'en réaliser la purification, comme nous le verrons plus loin.

III - COMPOSITION DES PRECIPITES

A - COMPOSITION CHIMIQUE

Les résultats sont rapportés dans le tableau XX (p. 70). Les glucides constituant les groupements glycaniques de ces différents mélanges de glycoprotéides sont représentés par du galactose, du mannose, du fucose, de la N-acétylglucosamine, de la N-acétylgalactosamine et de l'acide N-acétylneuraminique. Aucun des précipités ne renferme de glucose qui n'est représenté que dans la solution S_{10} .

La teneur en glucides a tendance à augmenter de P_1 à P_{10} à quelques exceptions près. Le rapport hexoses + fucose / ANAN est d'abord constant et égal à environ 2,5 jusqu'à P_6 puis il augmente de P_7 à P_{10} pour lequel il atteint 4,6. Le rapport hexoses + fucose / hexosamines est remarquablement constant pour les glycoprotéides, sa valeur est tout à fait différente pour les polysaccharides du S_{10} . Le rapport GlcNAc/GalNAc subit quelques variations et présente un maximum pour le précipité P_8 .

La composition molaire des différents précipités est assez homogène. On constate néanmoins de P_1 à P_9 et abstraction faite de P_4 ,

Composition des différents précipités du fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium
(Composition centésimale donnée en p.100 de matières sèches et rapports molaires des oses neutres exprimés sur la base de 10 résidus de galactose).

Précipités	Hexoses + Fucose	ANAN	N-acétyl Hexosa- mines	GlcNac	GalNac	Glucides totaux	$\frac{\text{GlcNac}}{\text{GalNac}}$	Oses neutres		P	N	Gal	Glc	Man	Fuc
								ANAN	Ossamines						
P ₁	3,6	1,4	3,4	2,8	0,6	8,4	4,7	2,56	1,06	0,04	14,55	10	0	7,2	3,2
P ₂	2	0,75	1,9	1,6	0,3	4,65	5,3	2,66	1,05	0,04	15,32	10	0	7,5	3,3
P ₃	2,1	0,85	1,9	1,55	0,35	4,85	4,4	2,47	1,1	0,06	14,35	10	0	5	3
P ₄	5,7	2,3	5	4,25	0,75	13	5,7	2,48	1,14	0,02	14,5	10	0	9,6	4,6
P ₆	4,9	1,85	3,7	3,2	0,5	10,45	6,4	2,64	1,32	0,3	14,2	10	0	4,9	4,7
P ₇	7	2,25	6	5,15	0,85	15,25	6,1	3,1	1,17	0,045	13,45	10	0	4,2	5,4
P ₈	3,9	1,4	3,3	2,95	0,35	8,6	8,4	2,78	1,18	0,1	14,4	10	0	5,1	6,1
P ₉	7,3	2,35	5,95	5,2	0,75	15,60	6,9	3,1	1,23	1,5	13,65	10	0	3,5	4,6
P ₁₀	26	5,75	23	18,7	4,3	54,75	4,35	4,5	1,13	0,65	8,6	10	0	0	4,2
S ₁₀	40 à 45	15,2 à 19,6	18,7 à 21,2	18,7 à 21,2	0	-	-	2,29	2,12	-	-	10	4	0	8



une diminution de la teneur en mannose qui disparaît dans le P₁₀.

Les modifications de composition protidique évidentes qui se manifestent au cours du fractionnement et que nous démontrerons plus loin se traduisent donc sur le plan glucidique, davantage par des variations quantitatives, que par des variations qualitatives. Ceci témoignerait d'une relative constance dans la structure des différents groupements glycaniques des glycoprotéides. On peut figurer comme suit cette composition glycanique moyenne : 10 molécules d'oses neutres prises comme base, 7 molécules d'hexosamines, 2 molécules d'acide N-acétylneuraminique.

De par sa composition glucidique, le précipité P₁₀ se singularise complètement des autres précipités ; sa teneur en glucides est supérieure à 50 p.100, il ne renferme pas de mannose et son rapport galactose+fucose / ANAN est le plus élevé.

On remarque enfin que les précipités P₆, P₉ et P₁₀ renferment des quantités appréciables et parfois élevées de phosphore, en particulier, le précipité P₉ qui contient 1,5 p.100 de cet élément soit deux fois plus que la caséine. Nous verrons plus loin que le phosphore est essentiellement associé à une fraction peptidique.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE

Les études électrophorétiques et immunoélectrophorétiques rapportées dans les figures 5, 6, 7 et 8 (p.73, 74, 75 et 76) nous ont permis d'identifier un certain nombre de protéides dont la répartition dans les différents précipités est résumée dans le tableau XXI (p. 72).

La révélation des électrophorégrammes par la méthode à l'acide periodique- réactif de Schiff nous montre que des glycoprotéides sont présents dans toutes les fractions. Ils sont représentés essentiellement par les IgA dans les précipités P₁ à P₆, par la lactotransferrine dans les précipités P₇ à P₉, par des glycopeptides dans le précipité P₁₀.

L'étude électrophorétique et immunoélectrophorétique montre également que si certains précipités sont relativement simples

Composition en protéides des fractions obtenues à partir du lactosérum de Femme par la méthode du relargage au sulfate d'ammonium

Fractions	Protéides identifiés dans les fractions
P ₁	Galactothermine- IGA- Lactalbumine - Peptides - Chaîne de sécrétion
P ₂	Lactalbumine - IGA - Séralbumine - α_1 - Antitrypsine (traces) - Lactotransferrine (traces) - Chaîne de sécrétion (traces).
P ₃	Séralbumine - Lactalbumine - Lactotransferrine (traces)
P ₄	IGA - IgG (traces) - Séralbumine (traces) - Lactotransferrine (traces)
P ₆	Séralbumine - Lactotransferrine - Lactalbumine - IGA
P ₇	Lactotransferrine - Lysozyme - Chaîne de sécrétion - Séralbumine (traces)
P ₈	Lactotransferrine - Lysozyme - α_1 -antitrypsine (traces) - Séralbumine (traces)
P ₉	Peptides - Lactotransferrine - α_1 -antitrypsine
P ₁₀	Glycopeptides - Peptides - α_1 -antitrypsine
S ₁₀	Pas de révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S. - Pas de réaction immunologique



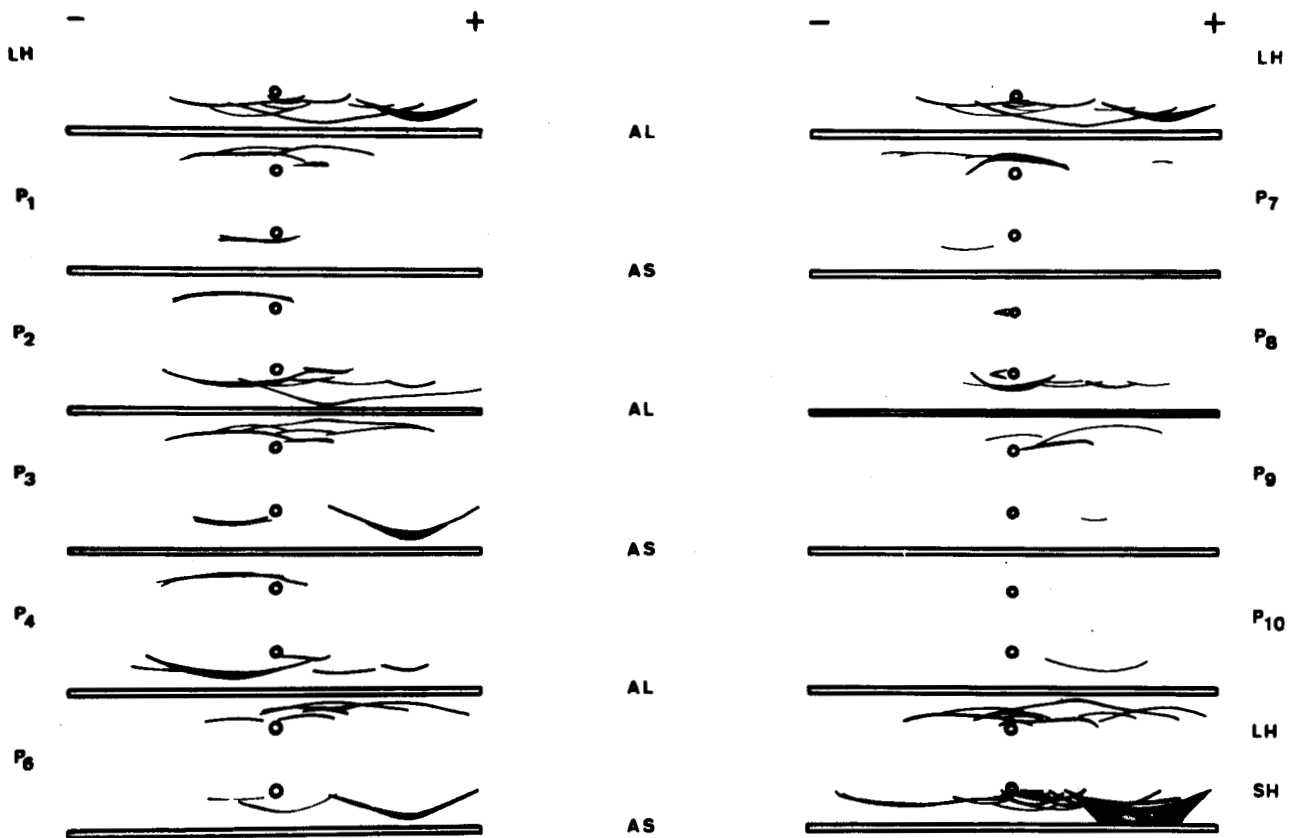


Figure 5 : Immunoélectrophorèse des différents précipités obtenus par relargage au sulfate d'ammonium du lactosérum humain.

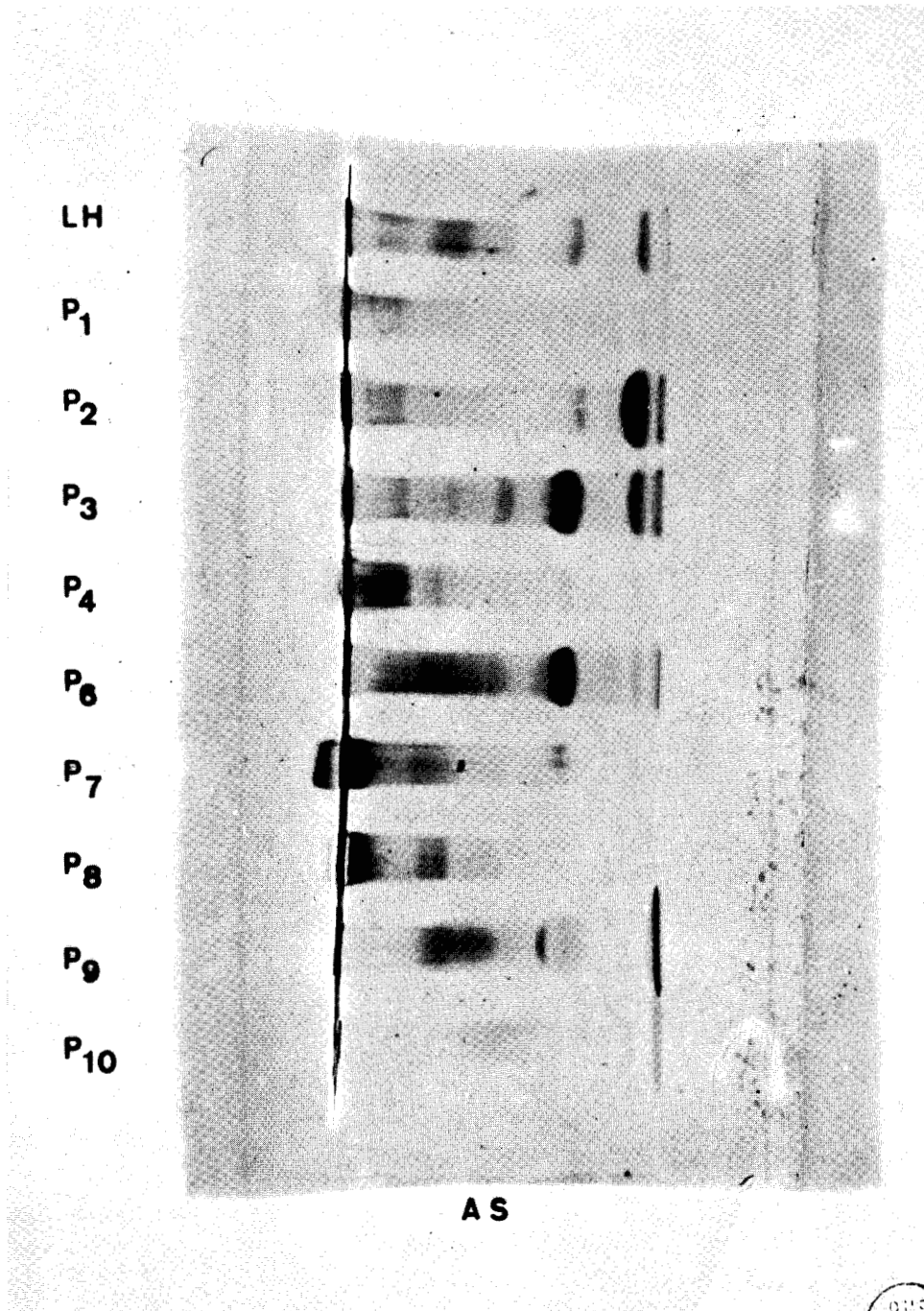


Figure 6 : Electrophorèse en gel d'amidon des différents précipités obtenus par relargage au sulfate d'ammonium du lactosérum humain (révélation par l'Amidoschwarz).

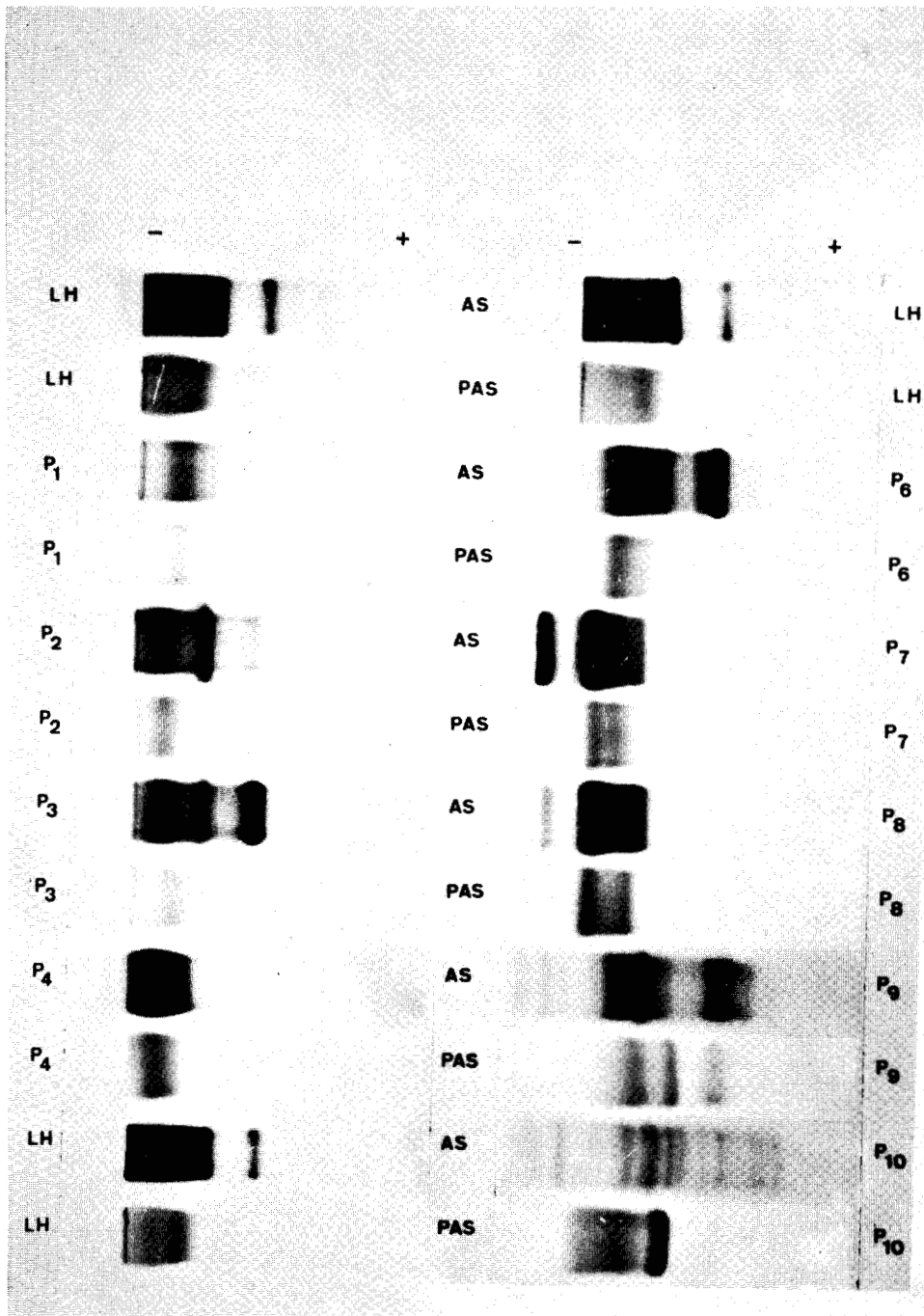


Figure 7 : Electrophorèse sur acétate de cellulose des différents précipités obtenus par relargage par le sulfate d'ammonium du lactosérum humain. (Révélation par l'Amidoschwarz (AS) et par l'acide periodique - réactif de Schiff (PAS)).

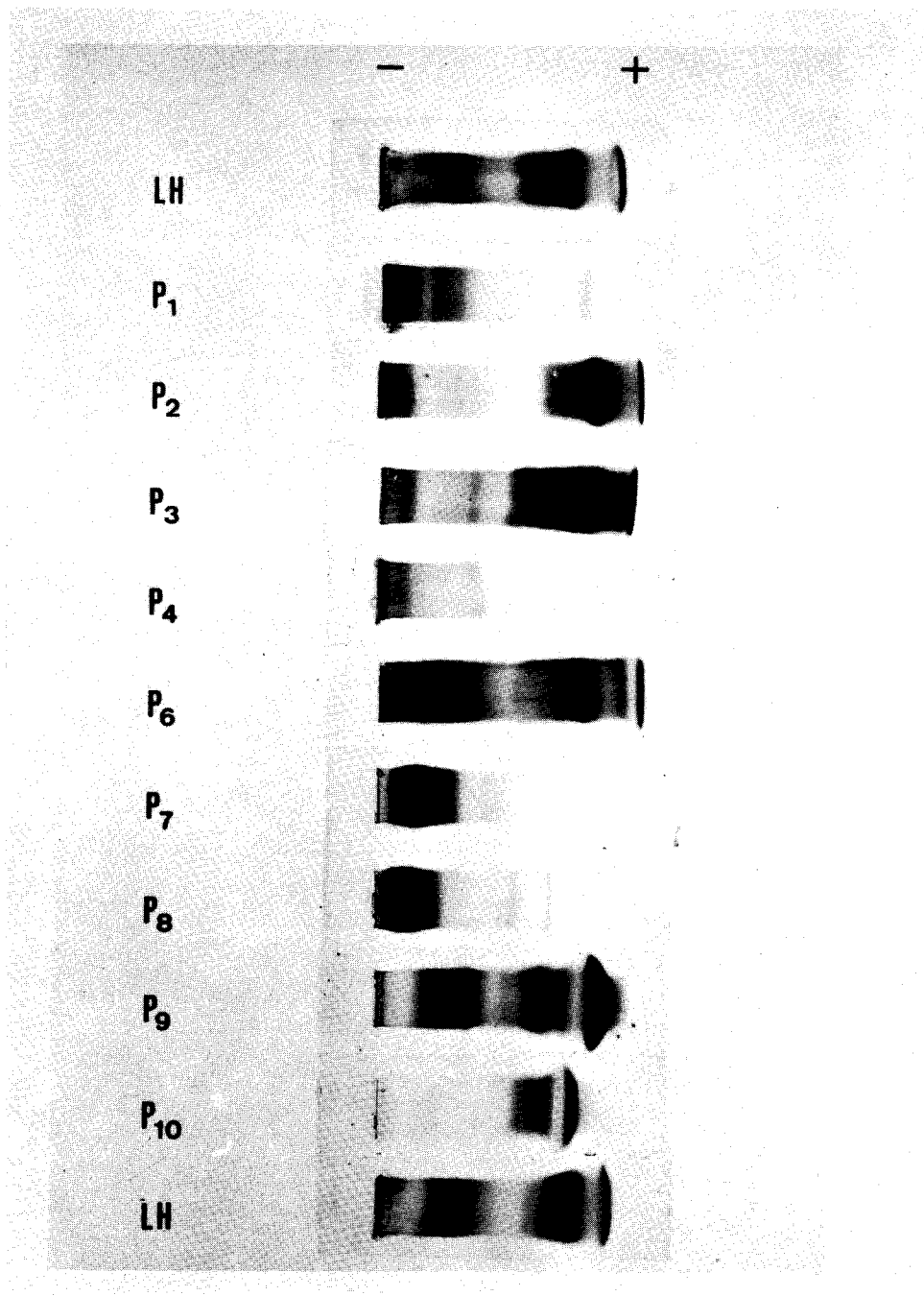


Figure 8 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des différents précipités obtenus par relargage par le sulfate d'ammonium du lactosérum humain (Révélation par l'Amidoschwarz).

comme les précipités P₁ et P₄ constitués essentiellement par des IgA et le précipité P₈ qui renferme 80 à 90 p.100 de lactotransferrine, par contre les précipités P₃, P₆, P₉ et P₁₀ en particulier apparaissent très complexes bien qu'ils constituent des stades d'enrichissement en certains protéides. Les précipités P₃ et P₆ sont enrichis en sérum-albumine, le précipité P₁₀ renferme la majeure partie des peptides et glycopeptides.

IV - CONCLUSIONS

L'étude de la composition glucidique des différentes fractions de lactosérum humain que nous avons isolées, démontre qu'il n'y a pas de relation structurale ou métabolique entre les oligosaccharides du "gynolactose" et les glycanes des glycoprotéides. En effet, les fractions glycoprotéidiques isolées ne contiennent jamais de glucose, mais possèdent au contraire le plus souvent du mannose et parfois de la N-acétylgalactosamine.

Les groupements glycaniques auraient, au premier abord, une certaine unité structurale comme en témoigne la constance relative des rapports hexoses + fucose / ANAN, hexoses + fucose / hexosamines dans les différents précipités qui, malgré leur hétérogénéité, représentent parfois des enrichissements à 80 p.100 en divers protéides et glycoprotéides. Seule l'étude des glycanes préparés à partir de glycoprotéides purifiés permettra de préciser ce point.

Le fractionnement par le sulfate d'ammonium que nous avons d'abord exploité à des fins analytiques, se révèle donc être un bon moyen pour réaliser un premier "découpage" des protéides et fournit en particulier des préparations hautement enrichies en IgA et en lactotransferrine. C'est dans le but de valoriser ces qualités préparatives que nous avons cherché à améliorer encore la méthode en la rendant plus rapide.

5. - METHODES DE FRACTIONNEMENT RAPIDE

Nous avons cherché à adapter le fractionnement de manière à obtenir rapidement et avec de bons rendements, des préparations d'IgA

et de lactotransferrine qui sont les glycoprotéides majeurs du lait maternel.

I - FRACTIONNEMENT DE TYPE I

La composition très voisine des précipités P₇ et P₈ nous a incité à les rassembler en amenant directement le lactosérum de 50 p.100 de saturation (pH 3,8) à 74 p.100 de saturation (pH 7). Le nouveau précipité ainsi obtenu est appelé P₇₋₈, il renferme la quasi-totalité de la lactotransferrine.

II - FRACTIONNEMENT DE TYPE II (Voir figure 9, p. 79)

Les IgA précipitent surtout entre 30 et 50 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium à pH 7, la lactotransferrine entre 63 et 75 p.100 de saturation également à pH 7. Par contre, la sérum-albumine et surtout l' α -lactalbumine qui sont des holoprotéides très abondants dans le lait maternel, précipitent entre 30 et 50 p.100 de saturation et à pH acide compris entre 4,6 et 3,8. Il nous a donc paru intéressant d'amener directement le lactosérum à 50 p.100 de saturation pour précipiter l'ensemble des IgA, puis de recueillir en bloc la sérum-albumine et l' α -lactalbumine en acidifiant à pH 3,8. Nous avons cependant conservé le stade 33 p.100 de saturation - pH 7, afin d'éliminer les traces de caséine qui subsistent parfois dans le lactosérum, ainsi que la galactothermine qui ne précipite pas toujours à température ambiante et qui perturbe les purifications chromatographiques ultérieures.

La lactotransferrine est extraite comme précédemment en amenant le lactosérum à 74 p.100 de saturation - pH 7. Quant aux stades suivants, ils sont identiques à ceux du fractionnement de base.

III - FRACTIONNEMENT DE TYPE III (Voir figure 10, p. 80)

Pour le cas où seule la lactotransferrine est recherchée, nous avons tenté d'éliminer le plus rapidement possible les autres protéides avant d'arriver aux conditions de précipitation de la lactotransferrine. Nous avons pensé atteindre cet objectif en amenant directement le lactosérum à 50 p.100 de saturation et à pH 3,8, la lacto-

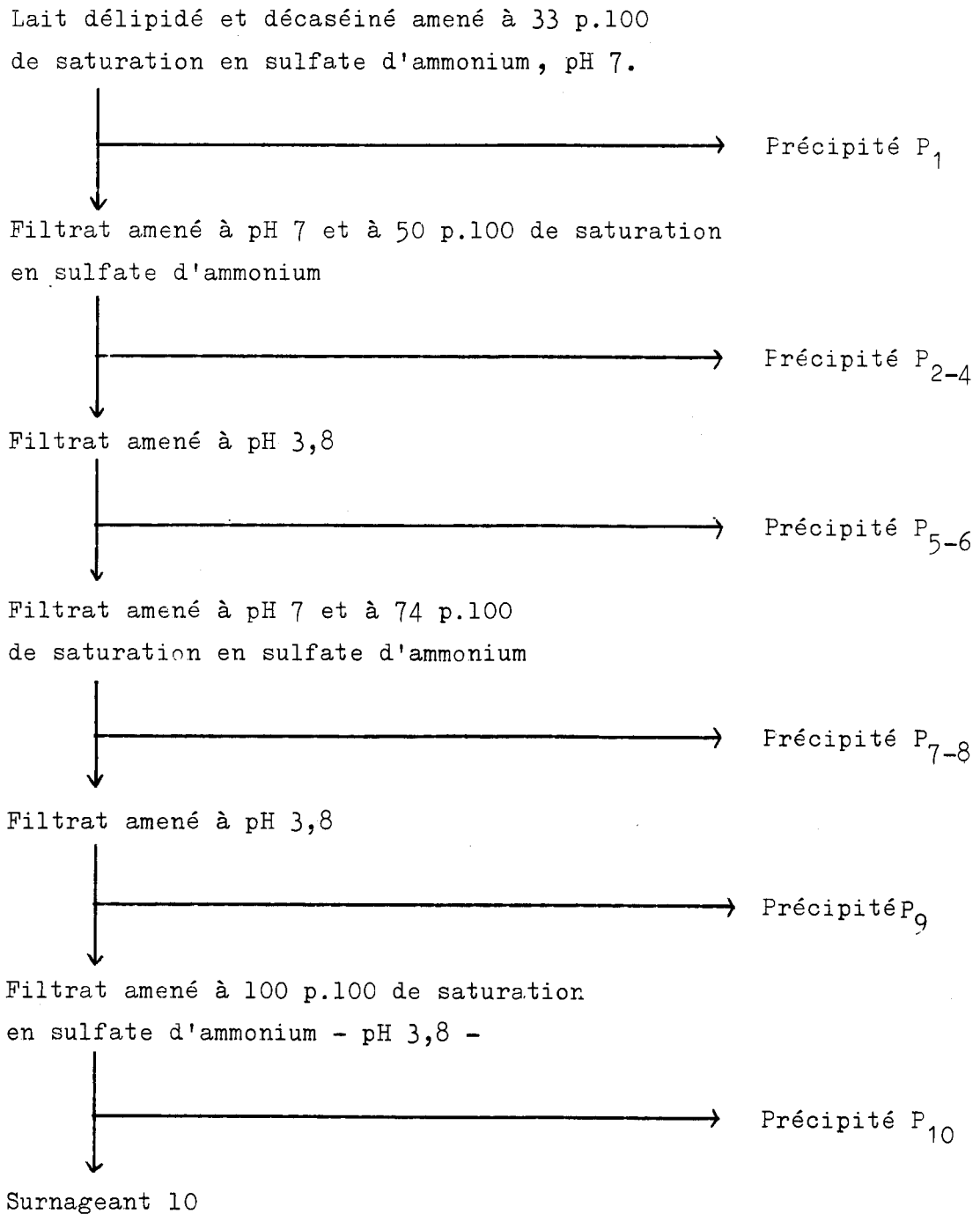
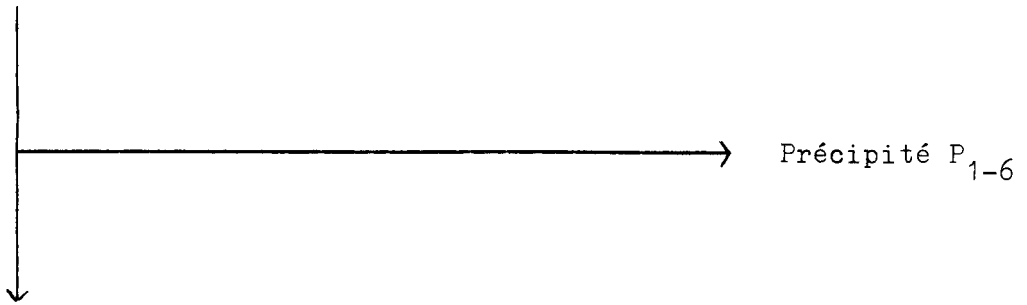


Figure 9 Schéma de fractionnement rapide de type II
du lait de Femme par le sulfate d'ammonium.

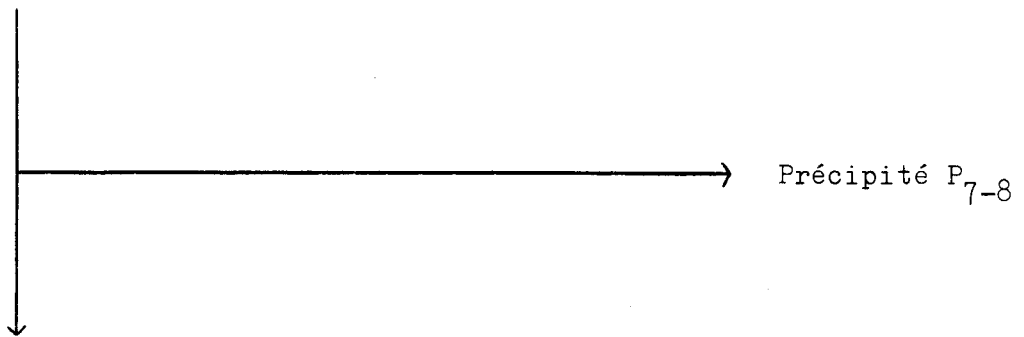
Lait délipidé et décaséiné amené à 50 p.100

de saturation en sulfate d'ammonium (pH 3,8)



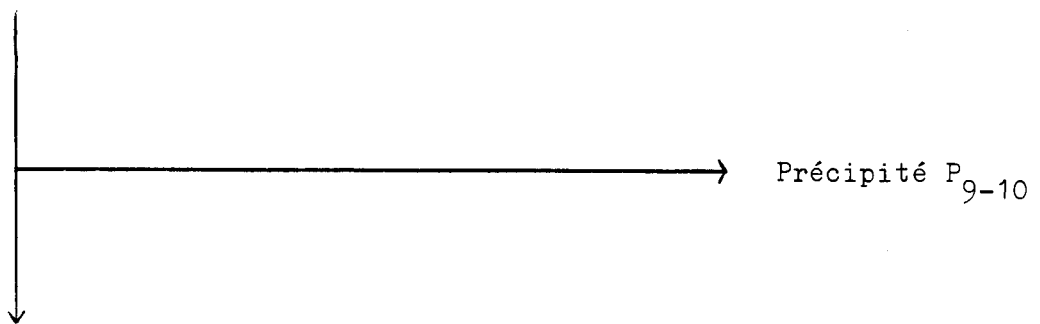
Filtrat amené à pH 7 et à 74 p.100 de

saturation en sulfate d'ammonium



Filtrat amené à pH 3,8 et à 100 p.100 de

saturation en sulfate d'ammonium



Surnageant 10

Figure 10 : Schéma de fractionnement rapide de type III des protéides du lait de Femme par le sulfate d'ammonium.

transferrine étant précipitée comme dans le fractionnement de type I à 74 p.100 de saturation et à pH 7. Le fractionnement est terminé en saturant le lactosérum amené à pH 3,8.

IV - RESULTATS

Les masses des différentes fractions obtenues au moyen des trois méthodes sont rapportées dans le tableau XXII (p. 82). On constate que :

1° - Les rendements globaux en protéides fournis par les trois fractionnements sont sensiblement identiques.

2° - Le nouveau précipité P_4 (appelé P_{2-4}) donné par le fractionnement II est beaucoup plus important que celui du fractionnement de type I.

3° - Le précipité P_{7-8} subit une faible diminution (moins de 10 p.100) quand on passe du type I au type II, mais la baisse de rendement est beaucoup plus accusée pour le fractionnement de type III puisqu'elle dépasse 30 p.100.

Les différents précipités ont été soumis à une analyse comparative en immuno-électrophorèse (Figure 11; p. 83) et en électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 12; p. 84) (Le fractionnement du type I très voisin du fractionnement de base sert de référence).

V - CONCLUSIONS

En conclusion, il apparaît que :

1) le fractionnement de type II procure un intéressant regroupement de la majeure partie des IgA dans le précipité P_{2-4} dont la qualité est cependant sensiblement moins bonne que celle du précipité P_4 du fractionnement de base. La valeur du précipité P_{2-4} en tant que matière première d'IgA sera discutée ultérieurement. Le précipité P_{5-6} renferme la quasi-totalité de la sérum-albumine et de l' α -lactalbumine et peu d'IgA. Nous noterons en particulier qu'il y a beaucoup moins d'IgA dans le P_{5-6}

T A B L E A U XXII

Masse des différents précipités obtenus par les méthodes de fractionnement rapide I, II et III.

Précipités	p.100 de saturation en sulfate d'ammonium	pH	Poids des précipités en g/l de lait		
			Type I	Type II	Type III
P ₁	33	7	0,7	0,9	}
P ₂	33	4,6	3,9		
P ₃	33	3,8	0,35		}
P ₄	50	7	0,8	2,3	
P ₅₋₆	50	3,8	1,1	3,5	
P ₇₋₈	74	7	2,4	2,2	1,6
P ₉	74	3,8	0,35	0,35	}
P ₁₀	100	3,8	0,30	0,30	
Masse de précipité par litre de lait			9,9	9,55	9,70



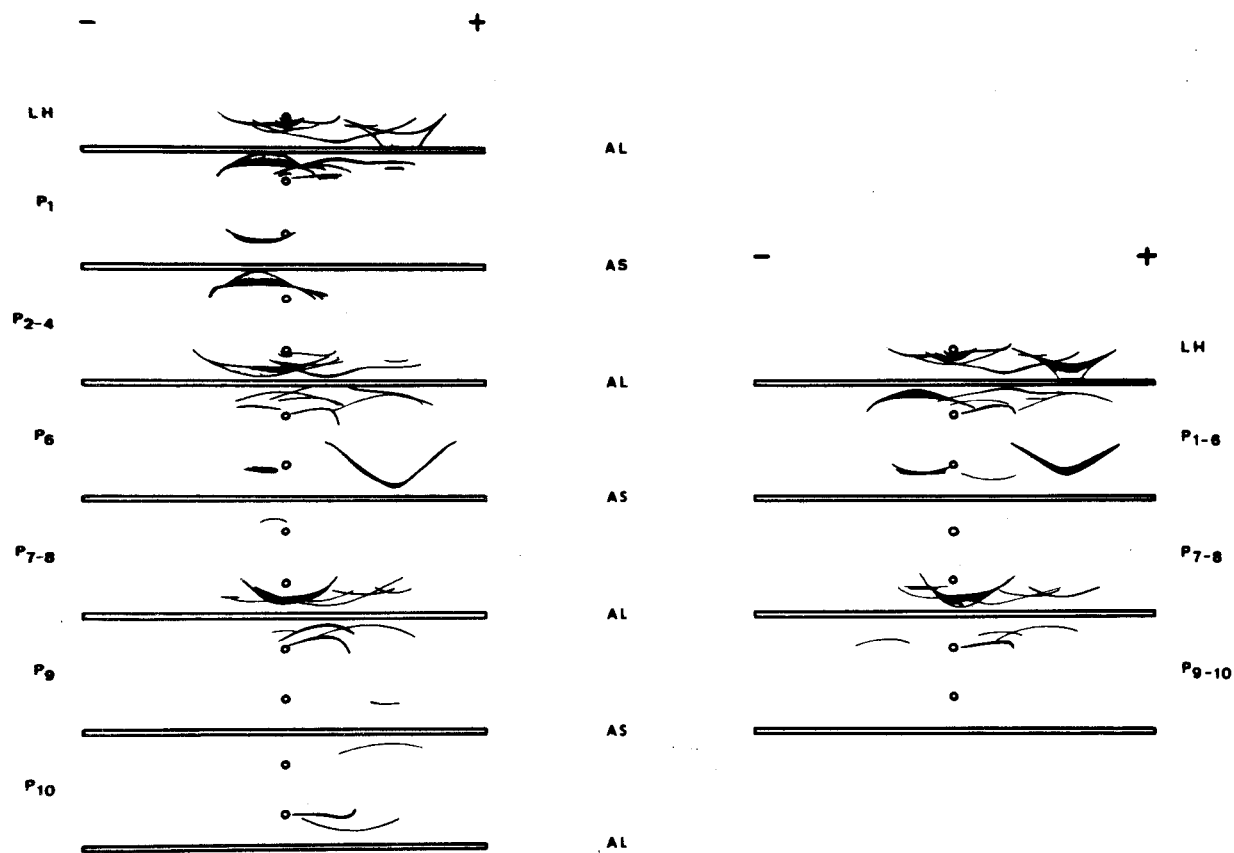


Figure 11 : Immunoélectrophorèse des précipités obtenus en fractionnant le lactosérum humain au moyen des fractionnements II et III.



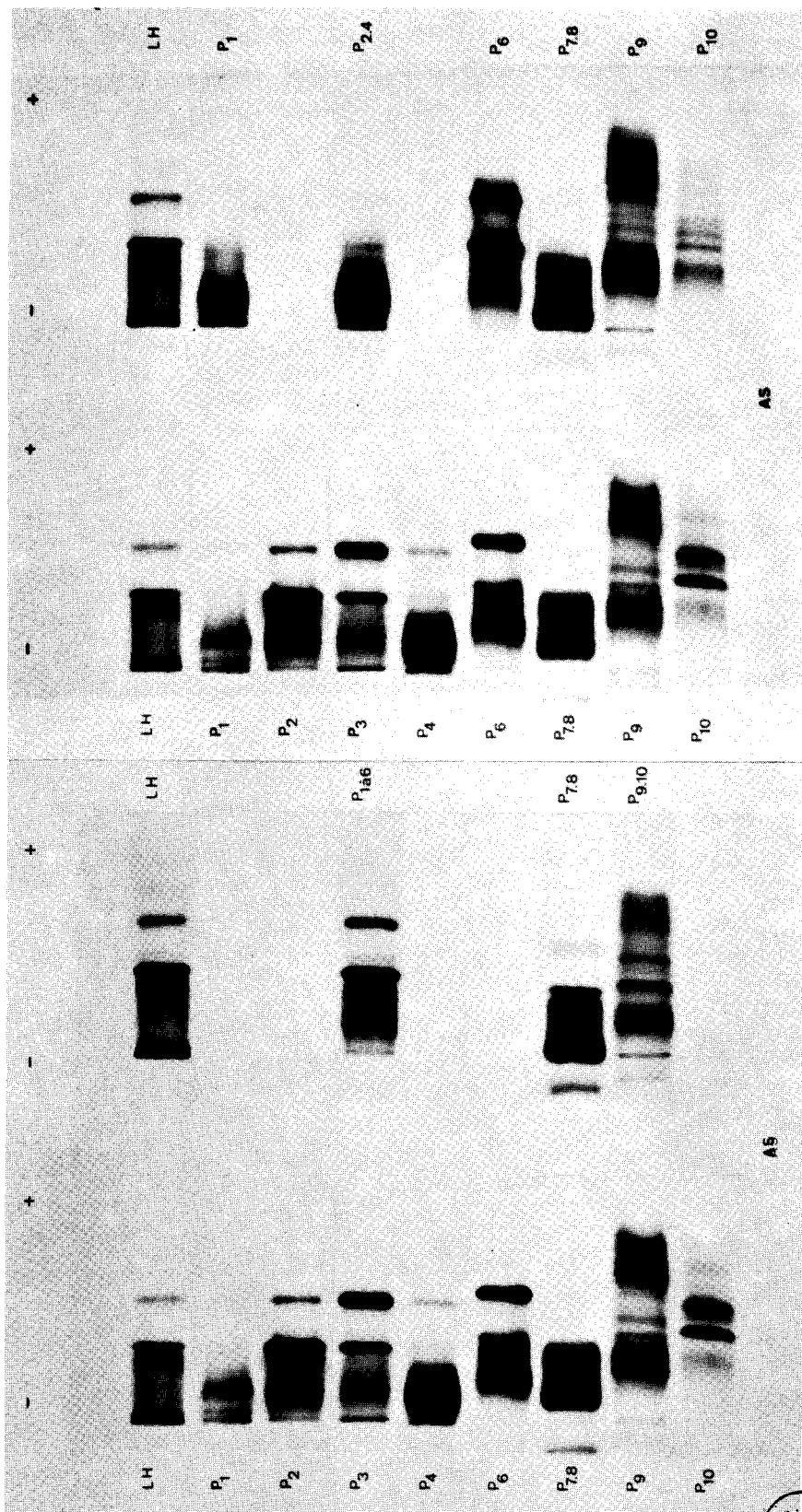


Figure 12 : Comparaison des fractionnements de type I, II et III par électrophorèse de zone sur acétate de cellulose (Révélation par l'Amidoschwarz).

du fractionnement II que dans le P₂ et le P₃ du fractionnement I (les IgA qui se trouvent dans ces derniers précipités sont vraisemblablement entraînés par la précipitation de la sérum-albumine et de l' α -lactalbumine les autres précipités sont identiques à leurs homologues du fractionnement I.

2) Par contre, la méthode III ne présente pas un grand intérêt. Axée uniquement sur la préparation de la lactotransferrine, elle donne une masse de P₇₋₈ qui n'est que les 67 p.100 de celle fournie par la méthode I. En outre, ce précipité P₇₋₈ est moins homogène puisqu'il renferme encore une quantité appréciable d' α -lactalbumine. Le fractionnement par le sulfate d'ammonium est mal adapté à la préparation sélective de la lactotransferrine du fait que celle-ci précipite tardivement.

En conséquence, l'élimination massive des constituants plus facilement précipitables provoque un entraînement considérable des constituants les moins précipitables conformément aux principes que nous avons énoncés plus haut.

D'autres méthodes sont mieux adaptées à la préparation sélective d'un protéide : la lactotransferrine en particulier peut être isolée directement du lait humain par chromatographie d'échanges d'ions comme nous le verrons plus loin.

6. - CONCLUSIONS GENERALES

La composition glucidique des différents précipités montre que ceux-ci renferment des quantités variables de N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, acide N-acétylneuraminique, galactose, fucose et mannose ce dernier étant absent du précipité P₁₀. On note que tous les précipités renferment du fucose qui n'est donc pas l'apanage des glycopeptides appelés autrefois "gynolacofucoïdes". Par contre, le glucose n'est présent dans aucun des précipités de nos fractionnements, contrairement à certains résultats obtenus sans élimination préalable des substances dialysables et de la caséine. L'hypothèse d'une relation métabolique entre les glycoprotéides et les oligosaccharides du "gynolactose" est donc à rejeter.

L'analyse des précipités du fractionnement par électrophorèse

et immuno-électrophorèse confirme la complexité du système protéique du lactosérum humain. Cette complexité avait déjà été mise en évidence par diverses méthodes de fractionnement ou d'analyse : électrophorèse en veine liquide (DEUTSCH)(393), (BISERTE et MASSÉ)(394), ultracentrifugation (SVEDBERG et PEDERSEN)(395), électrophorèse sur papier (BISERTE et al.)(396), immuno électrophorèse (HANSON)(397) et plus tard par GOT (398) et MUH (399) qui ont utilisé le fractionnement par le sulfate d'ammonium et la filtration sur gel de Sephadex.

Aucune fraction protéique pure ne peut être obtenue directement par relargage au sulfate d'ammonium. Cette méthode de fractionnement n'est vraiment efficace que pour des protéides ayant des caractères de solubilité très différents et, même dans ce cas, on ne peut éviter totalement le phénomène d'entraînement et la souillure d'un précipité par les autres constituants contenus dans ses eaux mères. En outre, du fait qu'une protéine précipite dans une zone étendue de concentration il est nécessaire, pour obtenir son insolubilisation totale, de se placer dans des conditions de concentration élevée susceptible de provoquer la précipitation d'autres constituants.

Nous obtenons néanmoins des préparations enrichies à 80 p.100 en IgA et en lactotransferrine, respectivement dans les précipités P₄ et P₈ du fractionnement de base. La méthode rapide II conduit plus rapidement à ces deux composés, mais le précipité P₄ est alors moins homogène. Cette méthode est très voisine de celle de GOT (400), elle en diffère par le procédé d'élimination de la caséine. Nous avons préféré opérer par dialyse et acidification à pH 4,6, plutôt que par précipitation alcoolique car celle-ci est plus traumatisante pour les protéides et risque de provoquer la précipitation de protéides du lactosérum. La méthode de MUH (401) fournit des préparations très enrichies en IgA qui sont ensuite purifiées en chromatographie de filtration sur gel de Sephadex. Les précipités formés au delà de 50 p.100 de saturation, pH 7, n'ont pas été étudiés par l'auteur.

D'autres méthodes ont été utilisées pour fractionner le lait. La méthode au rivanol (lactate de 2-éthoxy-6,9 diamino-acridine), préconisée par HOREJSI et SMETANA (402) pour le fractionnement du sérum, a été adaptée au colostrum humain par MAENO et KIYOSAWA (403) et par

REJNEK (404). Le rivanol a la propriété de précipiter toutes les protéines sériques exceptées les immunoglobulines et la transferrine. Appliqué au colostrum humain, il précipite toutes les protéines du lactosérum sauf la lactotransferrine et les IgA. Le rivanol est donc surtout utilisé pour préparer les IgA (REJNEK)(405) et la lactotransferrine (BLANC et ISLIKER)(406). On ne peut le considérer comme un agent de fractionnement du lactosérum car les protéines précipitées sont plus ou moins dénaturées.

L'électrophorèse préparative sur colonne a également été utilisée par AXELSSON et al. (407) pour fractionner le colostrum humain en vue de préparer des IgA. Cette méthode fournit 3 fractions constituées - la première de sérum-albumine, - la seconde de lactalbumine et de lactotransferrine, - la dernière de globulines immunes. Le découpage est donc intéressant, mais la mise en oeuvre de ce procédé est délicate et il ne permet pas de traiter des quantités très importantes. Le même reproche s'adresse à la filtration sur gel de Sephadex G-150 ou G-200 du lactosérum complet que nous avons utilisée et qui fournit d'emblée une séparation en 3 groupes de protéides : IgA, lactotransferrine + sérum albumine, lactalbumine comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

En conclusion, le relargage par le sulfate d'ammonium est très intéressant pour réaliser un "découpage" des protéides du lactosérum humain. Cette méthode permet d'obtenir des préparations très enrichies en IgA, lactotransferrine, lactalbumine, sérum-albumine, glycopeptides, tout en préservant l'intégrité physico-chimique de ces protéides. L'association d'un ou de plusieurs procédés supplémentaires est cependant nécessaire pour obtenir ces protéides à l'état pur.

SOUS-FRACTIONNEMENT DES PRECIPITES OBTENUS
PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM

1. - INTRODUCTION

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, le fractionnement par le sulfate d'ammonium n'est pas suffisamment sélectif pour permettre d'isoler des protéides purs. Néanmoins, certaines fractions sont déjà très simplifiées et il était raisonnable de penser que dans certains cas une seule étape supplémentaire serait suffisante pour parvenir à la préparation de protéides homogènes. La première sélection ayant été faite selon des critères de solubilité nous avons choisi d'en effectuer une seconde en fonction des tailles moléculaires, car cette technique est complémentaire de la première, elle est d'un emploi aisé et elle est susceptible de fournir des renseignements analytiques intéressants. Il est cependant préférable d'utiliser la chromatographie d'échange d'ions lorsqu'on désire réaliser des préparations à grande échelle. Nous avons appliqué aux précipités de nos fractionnements la filtration sur gel de différentes réticulations suivant la composition des mélanges.

2. - MATERIELS ET METHODES

I - PREPARATION DES COLONNES

Nous avons utilisé des gels de dextran (sephadex G-150, G-100 et G-50 ; forme "perle"), selon la technique de FLODIN et KILLANDER (408), équilibrés dans un tampon TRIS (tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane) 0,1M et 1M en chlorure de sodium, tampon de force ionique élevée afin de limiter les associations protéines-protéines. 300 à 400 g de Sephadex G-100 ou G-150 sont mis à gonfler dans 4 litres de tampon pendant 72 heures à la température du laboratoire, la suspension est agitée périodiquement puis le gel obtenu est dégazé sous agitation. La filtration

est effectuée en colonnes de 5 cm de diamètre et de 100 cm de longueur (colonnes PHARMACIA K 50/100). Deux colonnes sont montées en série et permettent un recyclage éventuel de l'effluent. Pour le montage, les colonnes sont bouchées à leur extrémité inférieure et elles sont remplies lentement de tampon dégazé. Un entonnoir est adapté à leur extrémité supérieure puis rempli d'une quantité suffisante de gel pour assurer leur chargement complet. La suspension peut alors être brassée en continu dans l'entonnoir pour éviter la formation dans la colonne d'un gradient granulométrique mais cette méthode provoque malheureusement un tassage inégal dû aux remous provoqués par le brassage. Nous préférons laisser simplement sédimenter la suspension.

Quelle que soit la méthode employée, lorsque 5 cm de gel se sont déposés dans le fond de la colonne, on laisse couler le tampon à travers la colonne, à un débit double de celui qui sera utilisé pour la chromatographie. Lorsque les colonnes sont remplies, on continue à les laver à un débit élevé pendant au moins 24 heures afin d'assurer un bon tassage. Le Sephadex G-50 gonfle dans le tampon en quelques heures, la suspension dégazée est versée lentement dans une colonne de chromatographie de 4 cm x 120 cm.

II - CHROMATOGRAPHIE DES PRECIPITES

Les produits du fractionnement par le sulfate d'ammonium sont dissous dans du tampon TRIS 0,1 M - NaCl 1 M, de pH 8, de manière à ce que la concentration en protéides soit de 5 p.100 (P/V). La solution est dialysée une nuit contre le tampon d'éluion et centrifugée.

La quantité de précipité injectée varie en fonction de la composition du mélange. Si celui-ci est constitué de protéides dont les masses moléculaires sont voisines, la quantité injectée sera moins élevée que si les masses moléculaires sont très différentes. C'est ainsi que pour une chromatographie sur deux colonnes K 50/100 remplies de Sephadex G-100 ou G-150, la quantité de protéides injectés varie de 700 mg pour le précipité P₄ à 2 g pour le précipité P₂.

Le débit de la colonne est maintenu constant à l'aide d'une pompe péristaltique : 2 ml/cm²/heure pour les sephadex G-100 et G-150 ; 5 ml/cm²/heure pour le Sephadex G-50. La filtration est effectuée à l'aide d'un flux descendant de tampon. L'effluent est analysé en continu

à l'aide d'un absorptiomètre UV LKB UVICORD à 253 nm pour les analyses de routine et fractionné au moyen d'un collecteur de fractions commandé par une minuterie. L'absorbance de chaque fraction a, en outre, été mesurée à 280 nm avec un spectrophotomètre.

III - METHODES D'ANALYSE

Les méthodes d'analyse utilisées ont été décrites précédemment (voir p. 63). Ce sont : l'électrophorèse de zone en différents supports et l'immunoélectrophorèse pour laquelle en plus des immunosérums polyvalents antiprotéides lactés et anti-protéides sériques nous avons été amené à utiliser des immunosérums spécifiques anti IgA, anti-lactotransferrine, anti-chaîne de sécrétion et anti- α_1 -antitrypsine sérique (*).

3. - ETUDE DES PRECIPITES

Nous avons étudié les 9 précipités du fractionnement de base et quelques précipités des fractionnements rapides.

I - PRECIPIITE P₁

A - ISOLEMENT D'UN PROTEIDE PRECIPITANT A TEMPERATURE AMBIANTE

Le précipité P₁ se décompose immédiatement en deux fractions de solubilités différentes à la température de 20°C. On constate, en effet, que, si l'ensemble du précipité P₁ est soluble à + 4°C, un trouble apparaît quand on réchauffe la solution, puis un précipité se forme qui peut être éliminé par centrifugation. Le phénomène est réversible; le trouble disparaît, le précipité se redissout dès que la température s'abaisse en dessous de + 20°C. Ce composé peut donc être aisément purifié par simple répétition des opérations de précipitation à chaud et solubilisation à froid. Il est de nature protidique, possède une mobilité électrophorétique cathodique en électrophorèse de zone réalisée en gélose à + 4°C avec un tampon véronal de pH 8,2.

(*) Anti α_1 -antitrypsine sérique de Behringwerke

Il se révèle par simple réchauffement du gel d'agar et disparaît par refroidissement. Le phénomène est indéfiniment réversible. La zone apparue par réchauffement de la plaque de gélose se colore par l'Amidoschwarz.

Nous n'avons pu obtenir d'arc de précipitation avec notre immunosérum anti-protéides lactés. Ce composé ne renferme ni glucides, ni phosphore.

B - ETUDE DE LA FRACTION SOLUBLE A TEMPERATURE AMBIANTE

La partie soluble à 20°C du précipité P_1 (P_{1S}) a été soumise à une chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-100. Elle est constituée essentiellement d'IgA qui sont exclues du gel et qui représentent environ 20 p.100 de mélange. Ces IgA sont scueillées par la chaîne de sécrétion libre dont la mobilité β_1 est plus rapide que celle de la forme purifiée. Le pic 2 qui est très retardé renferme essentiellement de l' α -lactalbumine. Les constituants des pics 3 et 4 élués très tardivement sont des peptides. On retrouve dans le pic 3 un arc cathodique non identifié présent dans le pic 2 (Figure 12; p.92).

II - PRECIPITE P_2

L'analyse préalable de ce précipité très abondant, nous a montré qu'il était constitué essentiellement d' α -lactalbumine et d'IgA. Ces deux protéides ayant des caractères de solubilité très différents, nous avons tenté d'exploiter cette propriété pour les séparer avant d'effectuer la filtration sur gel.

A - PRECIPITATION DE L' α -LACTALBUMINE A SON POINT ISOELECTRIQUE

L' α -lactalbumine précipite facilement par acidification à pH 4,8. Cette propriété a été utilisée par MAENO et KIYOSAWA (409) pour en réaliser la purification à partir d'une fraction obtenue par relargage au sulfate d'ammonium.

Le précipité P_2 est redissous dans de l'eau distillée, de manière à avoir une solution à 2 p.100 de protéides (P/V), puis le pH est amené à 4,8 par addition d'acide chlorhydrique 0,1N. Il se forme un précipité abondant que l'on recueille, après un repos d'une nuit, par centrifugation.

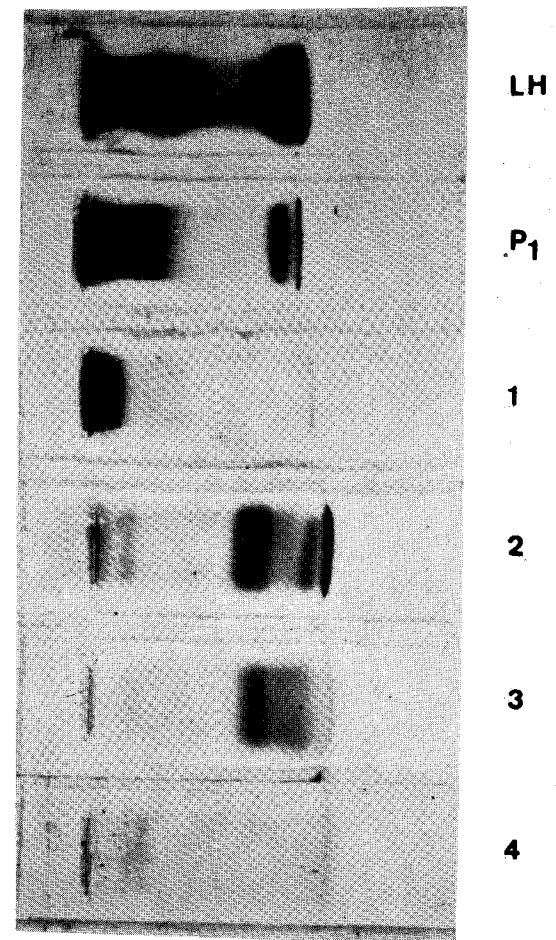
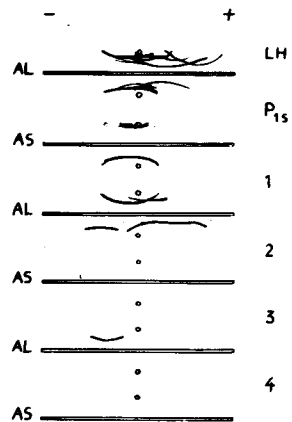
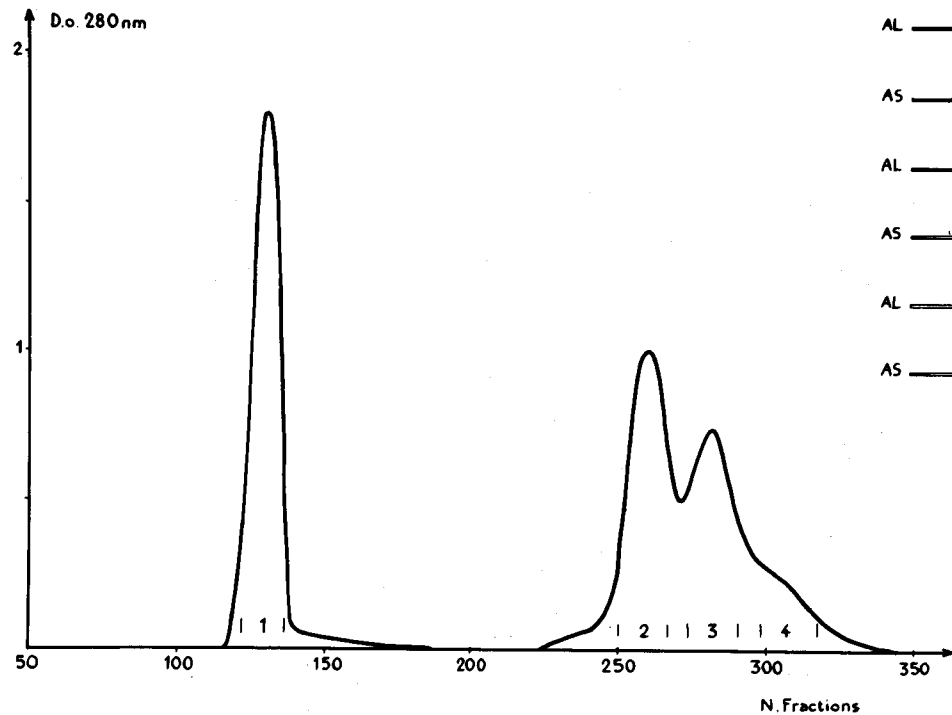


Figure 12 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-100 des protéides solubles à 20°C du précipité P₁ (P_{1s}) et électrophorèse sur gel de polyacrylamide des sous-fractions obtenues (révélation à l'Amidoschwarz).



L'électrophorèse de zone sur acétate de cellulose démontre (fig. 13; p. 94) que le précipité P_{2p} est constitué essentiellement d' α -lactalbumine qui subsiste néanmoins dans la solution surnageante (P_{2s}) considérablement enrichie en IgA. En opérant plusieurs cycles de précipitation on améliore la purification mais le rendement diminue sans que l'on atteigne le degré de pureté que donne la filtration sur gel.

B - FILTRATION SUR GEL

Lorsqu'il n'est pas nécessaire d'obtenir des quantités très élevées de protéides, la filtration sur gel s'impose face à la méthode précédente, d'autant plus que les colonnes de chromatographie peuvent être fortement chargées du fait de la grande différence de masse moléculaire entre les IgA (400.000) et l' α -lactalbumine (20.000).

La filtration sur gel de Sephadex G-100 donne 5 pics (fig. 13, p. 94). Le premier, qui est exclu du gel et représente 30 à 35 p.100 du matériel élué, est constitué par des IgA souillées par la chaîne de sécrétion libre de mobilité β_1 . Le second, peu important renferme essentiellement de la sérum-albumine, de la lactotransferrine, de l' α -lactalbumine et des traces d'IgA, d' α_1 -antitrypsine et de chaîne de sécrétion. Le pic 3 précède de peu le pic 4 qui représente 55 à 60 p.100 de l'ensemble. Tous deux sont constitués d' α -lactalbumine qui montre sur les électrophorégrammes réalisés sur acétate de cellulose (fig.13; p. 94) et sur polyacrylamide (fig. 14;p. 95) un certain polymorphisme. Celui-ci se manifeste par la présence de 3 zones dans le pic 3 et de 2 dans le pic 4. Le pic 5, peu abondant, renferme du matériel qui peut être apparenté immunologiquement à l' α -lactalbumine.

III - PRECIPITE P_3

Le précipité P_3 , très hétérogène, se compose essentiellement de sérum-albumine et d' α -lactalbumine. Le Sephadex G-150 a été choisi pour le fractionner car le Sephadex G-100 sépare mal les IgA de la sérum-albumine.

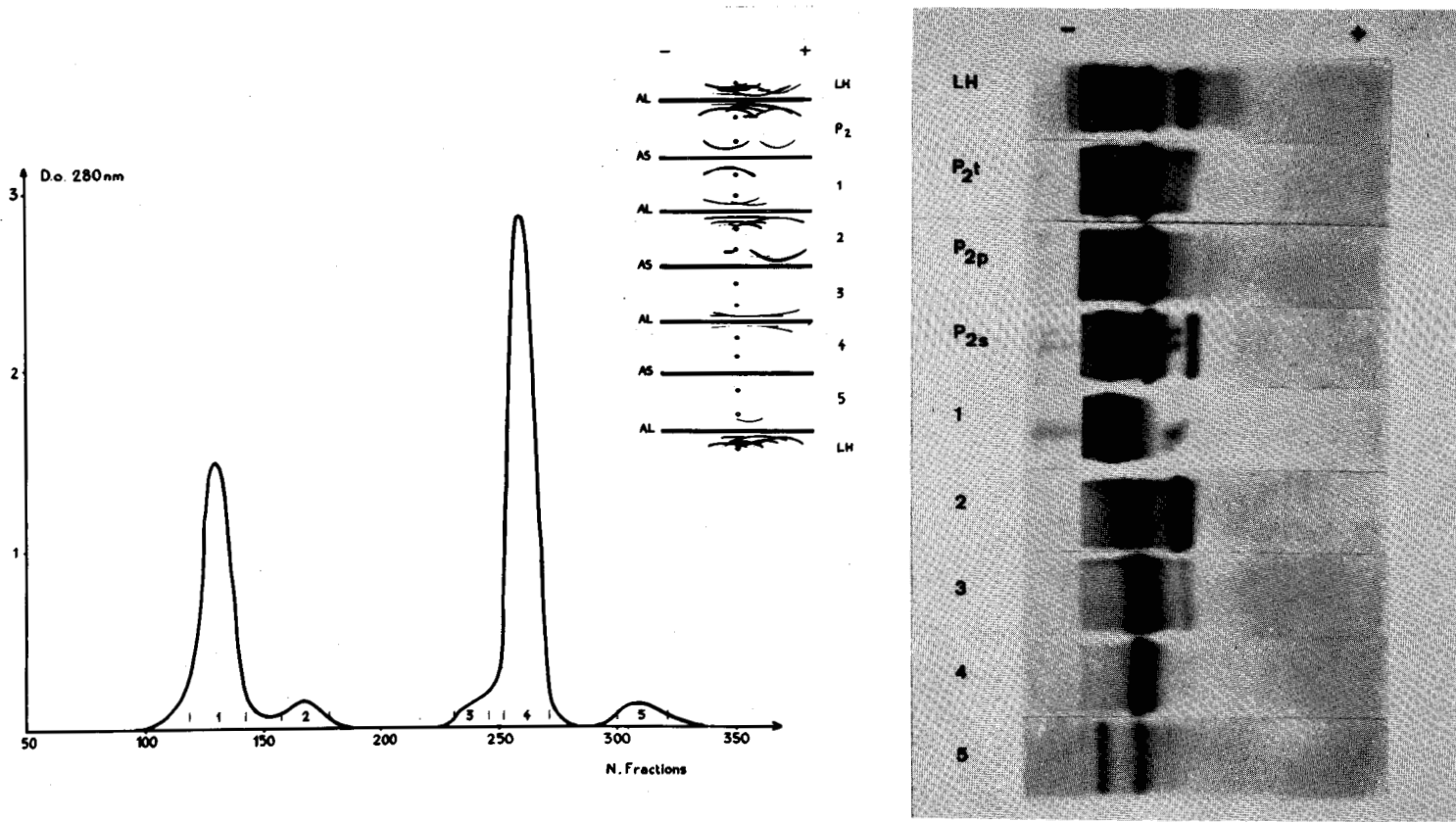


Figure 13 : Chromatographie de gel filtration sur Sephadex G-100 du précipité P_2 .
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des sous-fractions
 (révélation Amidoschwarz).

Légende : P_{2t} = P_2 total ; P_{2p} = protéides précipités par acidification
 à pH 4,8 ; P_{2s} = protéides solubles à pH 4,8.



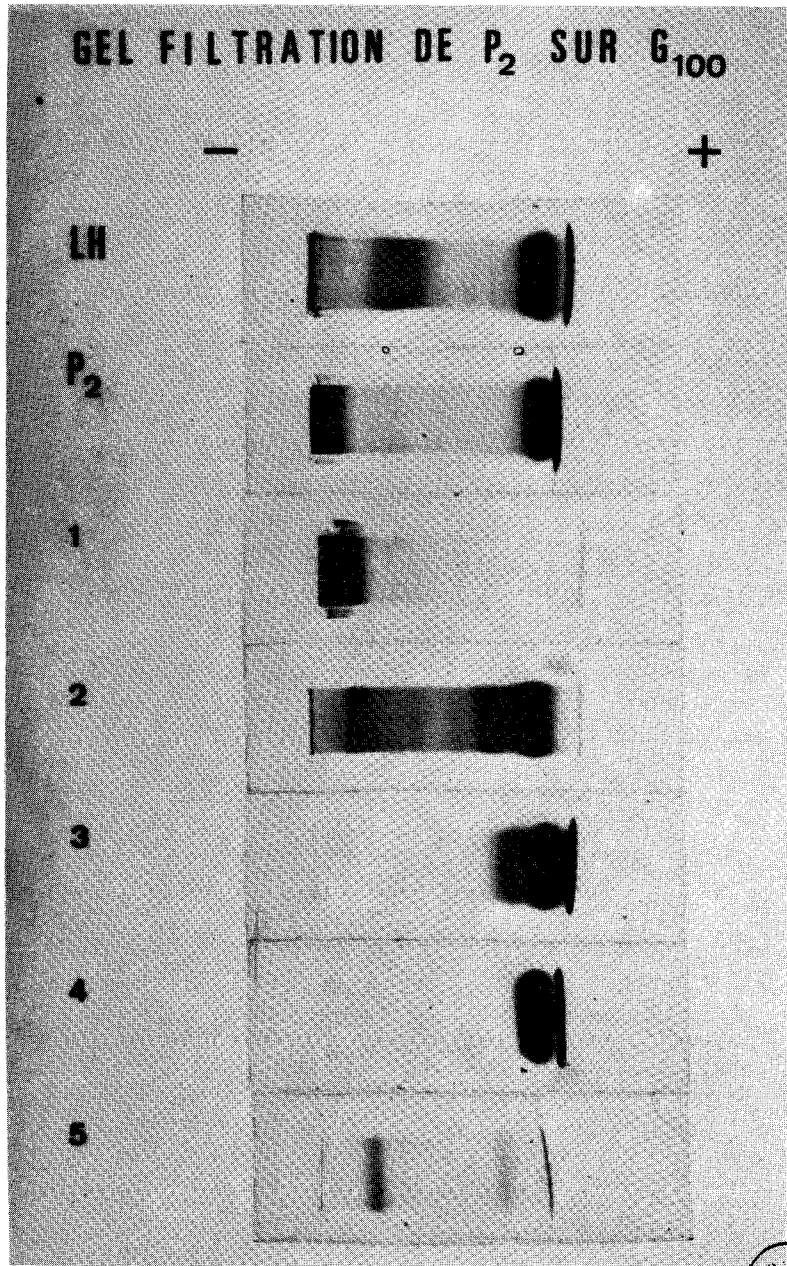


Figure 14 : Electrophorèse de zone sur gel de polyacrylamide des sous-fractions obtenues à partir du précipité P_2 par filtration sur gel de Sephadex G-100 (révélation Amidoschwarz).

Le pic 1 (Figure 15; p. 97) qui passe au volume d'exclusion est dissymétrique et hétérogène. Coupé arbitrairement en deux parties la première est constituée uniquement par des IgA, que l'on retrouve contaminées dans la seconde par des traces de sérum-albumine comme le montre l'immunoélectrophorèse et l'électrophorèse sur acétate de cellulose (fig. 15; p. 97).

Le pic 3 est représenté par quelques traces de sérum-albumine qui semblent donner une réaction d'identité partielle avec un arc de mobilité α_2 . L'arc de sérum-albumine donné par l'immunsérum anti-protéides sériques est d'ailleurs fortement déformé par un prolongement cathodique.

Le pic 4, beaucoup plus important, est composé en quasi-totalité de sérum-albumine associée à des traces du protéide α_2 précèdent et de lactotransferrine.

Les pics 5 et 6 sont les homologues des pics 3 et 4 du P_2 . Ils montrent le même polymorphisme de l' α -lactalbumine.

IV - PRECIPITE P_4

Nous distinguerons deux précipités P_4 ; celui du fractionnement de base et celui du fractionnement rapide.

A - PRECIPITE P_4 DU FRACTIONNEMENT DE BASE

Ce précipité est remarquablement simple puisqu'il est constitué à 90 p.100 par des IgA. La présence d'une certaine quantité d'IgG nous a fait préférer au Sephadex G-200, le Sephadex G-150 qui sépare aussi bien IgA et IgG et qui a l'avantage de donner des colonnes de chromatographie plus durables.

La quasi totalité du matériel injecté se retrouve dans le pic 1 (Figure 16; p. 98). Nous avons coupé arbitrairement ce pic en 3 parties qui toutes donnent uniquement l'arc des IgA. Cependant des traces de sérum-albumine sont mises en évidence dans la troisième partie du pic par électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 16; p. 98).

Le pic 4 peu important est assez complexe.

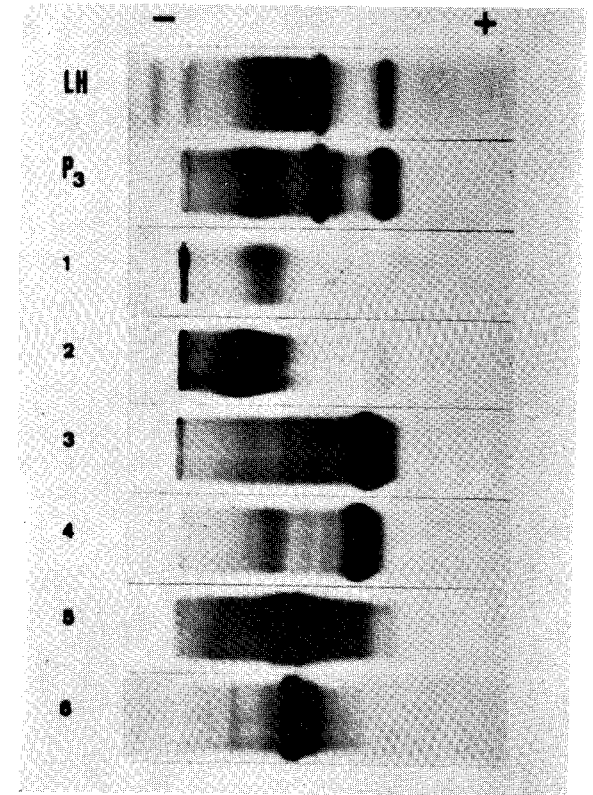
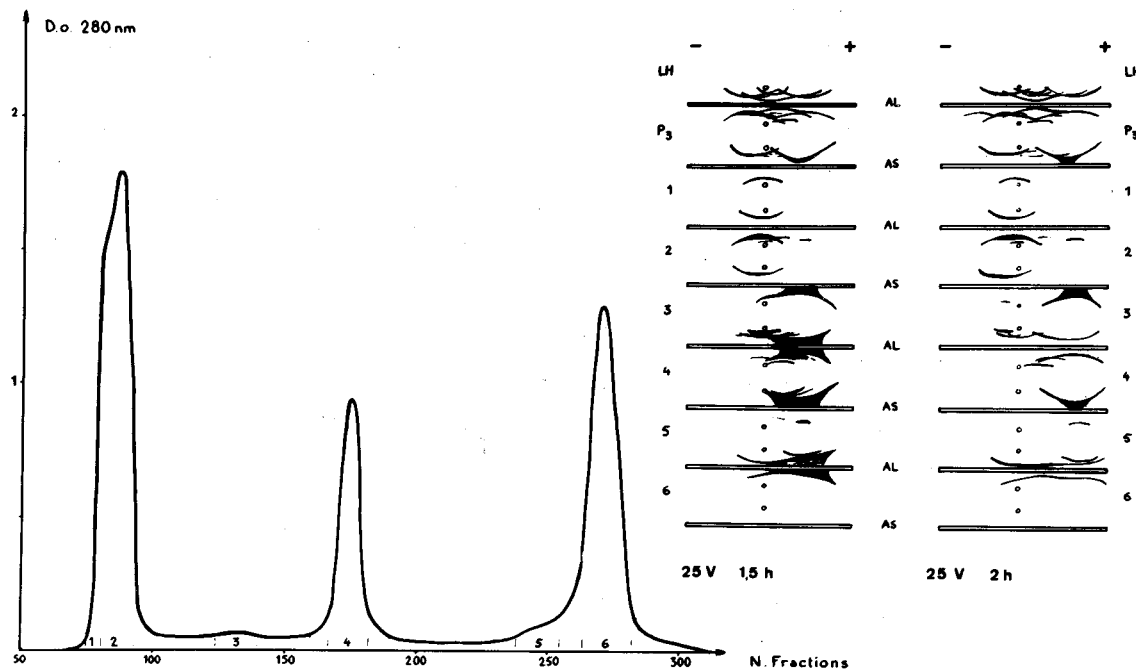


Figure 15 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-150 du précipité P_3 .
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des sous-
 fractions obtenues (révélation Amidoschwarz).



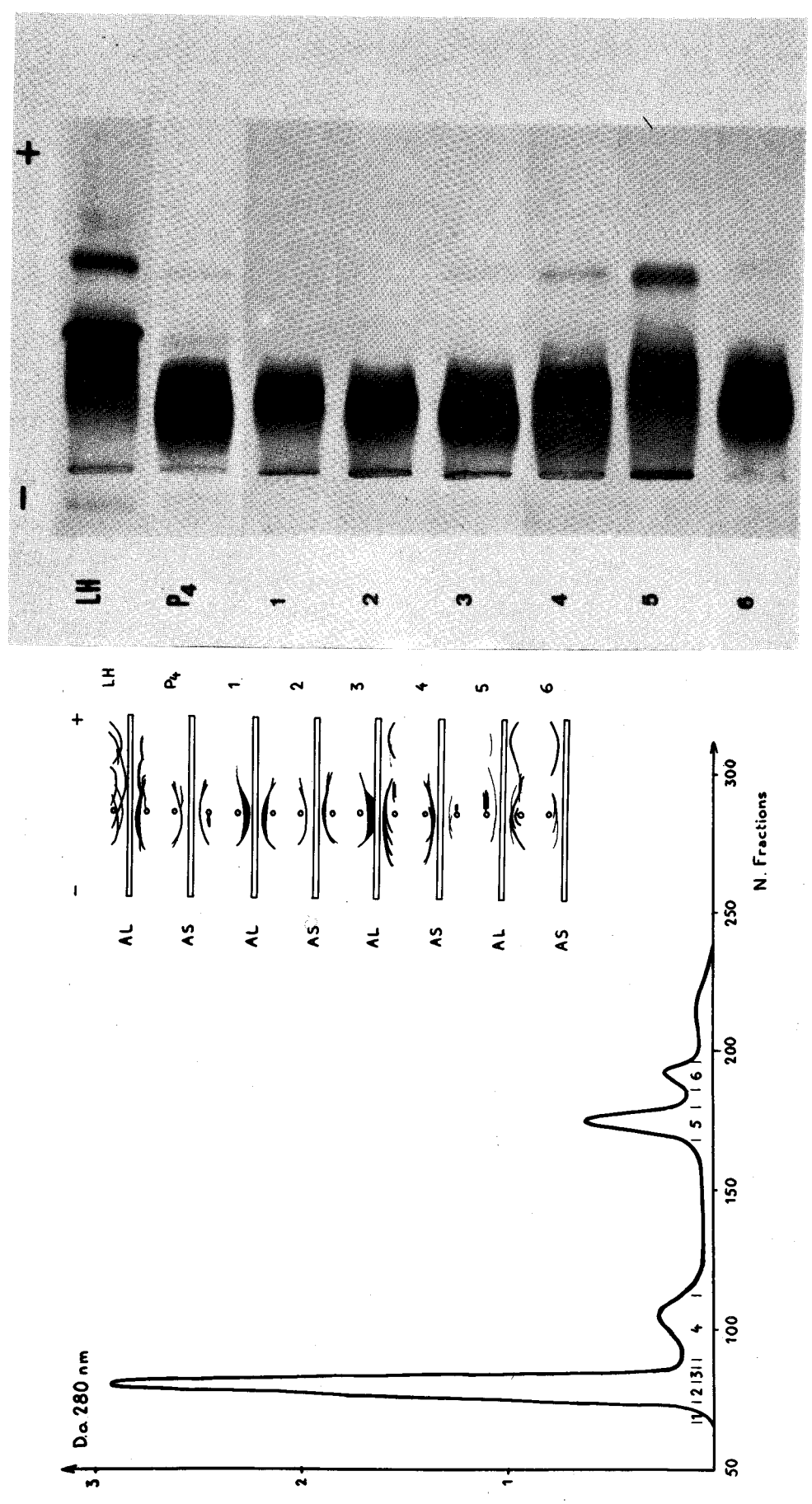


Figure 16 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-150 du précipité P₄.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des sous-
 fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz).



L'immunsérum anti-lait y révèle de la sérum-albumine et une série d'arcs coalescents dans la région χ tandis que l'immunsérum anti-protéides sériques montre la présence d'IgG. L'immuno-électrophorégramme des pics 5 et 6 est plus difficile à interpréter. Ils renferment de la sérum-albumine dont l'arc fourni par l'anti-lait semble donner une réaction d'identité partielle avec un arc α_2 lui-même partiellement confondu avec un arc β_1 . Nous retrouverons ces mêmes réactions d'identité à propos du précipité P_6 .

B - PRECIPITE P_4 DU FRACTIONNEMENT RAPIDE II

Ce fractionnement est intéressant puisqu'il rassemble dans le précipité appelé P_{2-4} la majeure partie des IgA. Lorsque ce précipité est soumis à une filtration sur gel de Sephadex G-150, il donne un profil d'éluion très voisin de celui du précipité P_4 que nous venons de voir avec, toutefois, la présence d'un petit pic d' α -lactalbumine. Il faut également noter que les IgA obtenues de cette manière ne sont plus immunologiquement pures puisqu'elles renferment une certaine quantité de chaîne de sécrétion libre donnant un arc de mobilité rapide. Cette hétérogénéité se traduit également par des modifications de composition glucidique comme nous le verrons dans le chapitre sur la préparation des IgA.



V - PRECIPITE P_6

Le précipité P_6 est très complexe, on y retrouve tous les constituants du lait, mais on note un enrichissement en sérum-albumine. Le Sephadex G-150 donne la meilleure résolution en 6 pics bien séparés dont aucun ne fournit un protéide à l'état pur.

Le pic 1 (Figure 17; p. 100) qui est élué au volume d'exclusion, renferme des IgA qui sont accompagnées de sérum-albumine présente sous deux formes de mobilité normale et α_2 . Ces deux formes réapparaissent dans les pics 2 et 3 tandis que dans le pic 4, constitué à parts égales de lactotransferrine et de sérum-albumine, le côté anodique de l'arc de celle-ci (donné par l'immunsérum anti-protéides sériques) se déforme et donne une réaction d'identité partielle avec un arc β_2 . Cette figure a déjà été rencontrée à propos du précipité P_4 .

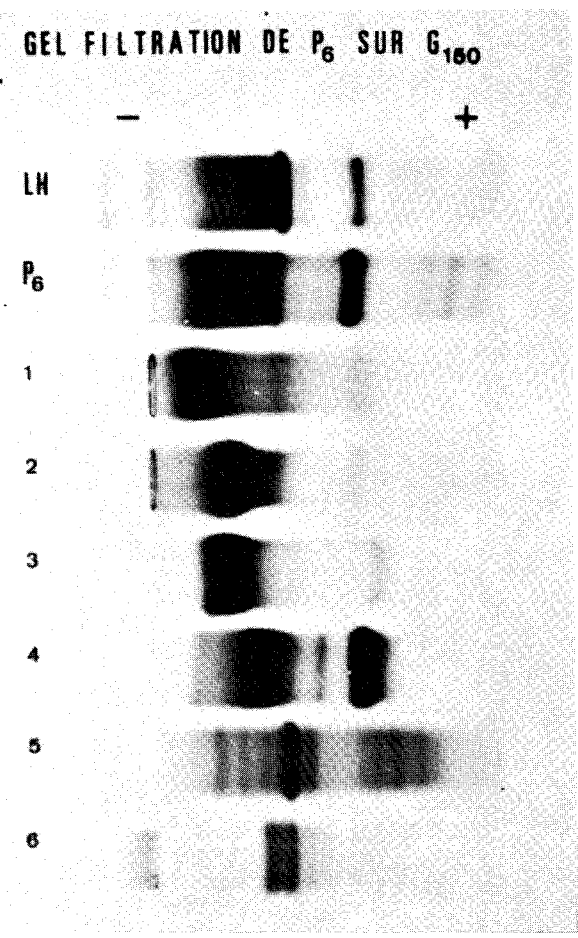
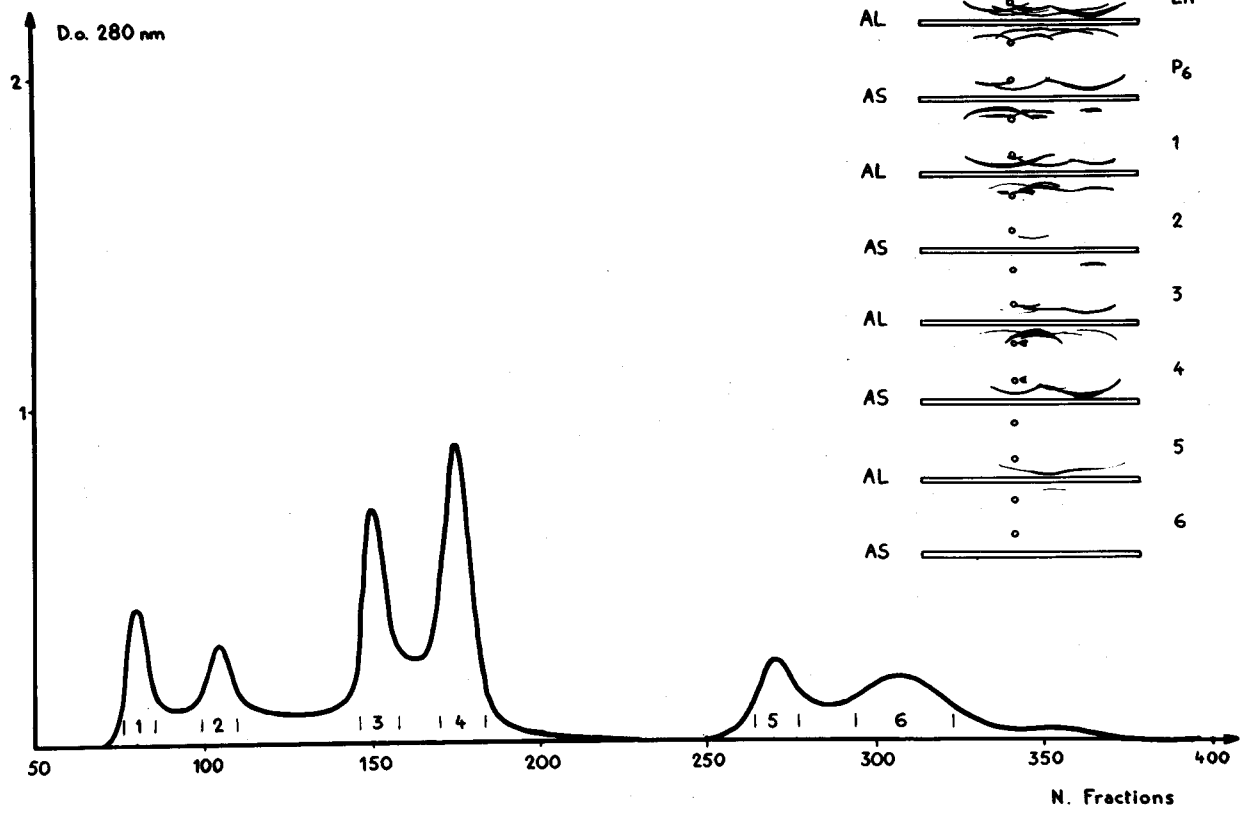


Figure 17 : Chromatographie sur gel de Sephadex du précipité P₆.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des
 sous-fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz).



Les électrophorégrammes réalisés sur acétate de cellulose (Figure 17; p. 100) et en gel de polyacrylamide montrent que la majeure partie de la sérum-albumine de mobilité électrophorétique normale, se trouve dans le pic 4 tandis que les formes lentes se trouvent dans les pics 2 et 3. Les pics 5 et 6 sont constitués d' α -lactalbumine associée à des peptides qui donnent de nombreuses zones visibles sur l'électrophorégramme réalisé sur acétate de cellulose.

VI - PRECIPITE P₇

Le précipité P₇ est formé essentiellement de 70 p.100 de lactotransferrine et de 20 p.100 de lysozyme. C'est aussi dans ce précipité que nous trouvons le plus de chaîne de sécrétion libre. La filtration sur gel de Sephadex G-100 nous a fourni 5 pics (Figure 18; p. 102). Les deux premiers renferment de la lactotransferrine et de la chaîne de sécrétion libre, ces deux composés étant vraisemblablement associés, ce qui explique leur élution rapide de la colonne. Ils donnent deux bandes mal individualisées et PAS positives en électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 18; p. 102). Le pic 3 contient l'essentiel du matériel élué de la colonne. Il est composé de lactotransferrine - donnant deux zones révélées par l'Amidoschwarz et le P.A.S. sur les électrophorégrammes obtenus sur acétate de cellulose - et de chaîne de sécrétion. Le pic 4 et son prolongement le pic 5 sont formés essentiellement de lysozyme qui se manifeste par une bande cathodique en électrophorèse sur acétate de cellulose.

VII - PRECIPITE P₈

Le précipité P₈ a une composition voisine de celle du précipité P₇. Il renferme 90 p.100 de lactotransferrine. Le diagramme d'élution de ce précipité chromatographié sur Sephadex G-100 a été subdivisé en 4 fractions (Figure 19; p. 103). La première est constituée de lactotransferrine immunologiquement pure dont l'arc de précipitation donné par l'immunsérum anti-protéides lactés diffuse peu et dont la zone très étalée sur les électrophorégrammes réalisés sur acétate de cellulose (Figure 19; p. 103) réagit fortement au P.A.S. Ceci laisse penser que cette fraction est plus ou moins polymérisée et dénaturée.

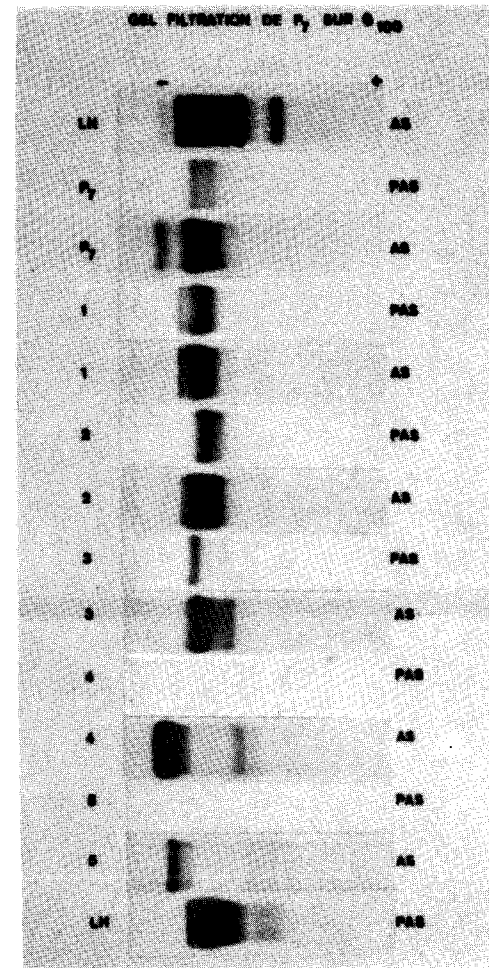
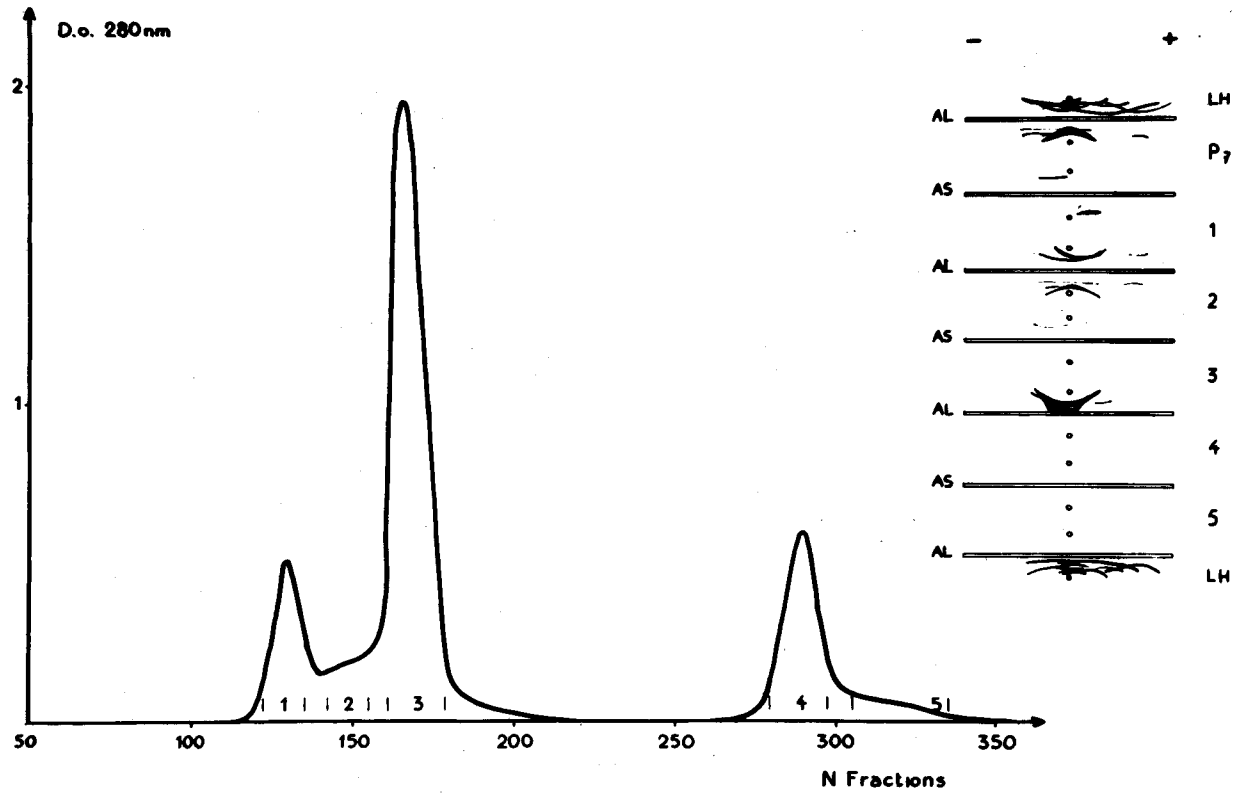


Figure 18 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-100 du précipité P₇.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse sur acétate de cellulose des sous-fractions
 obtenues (révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S.).

1975
 102

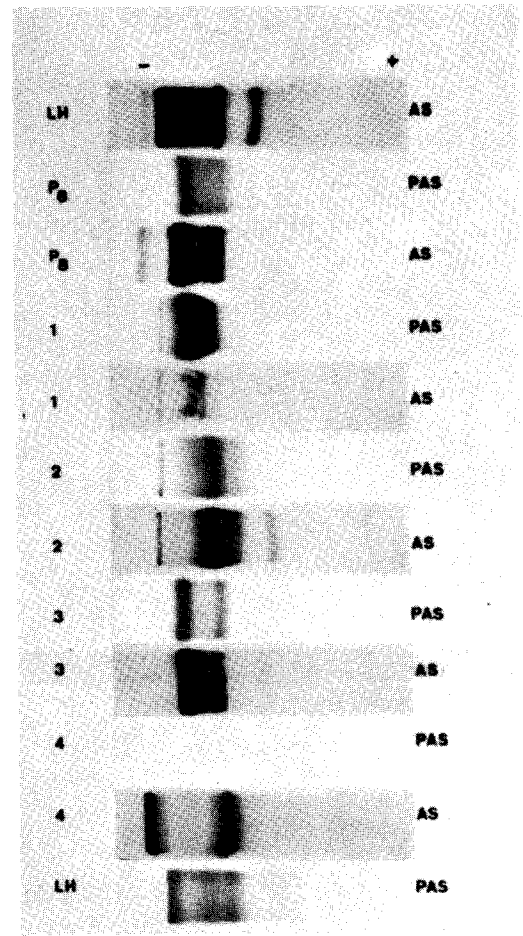
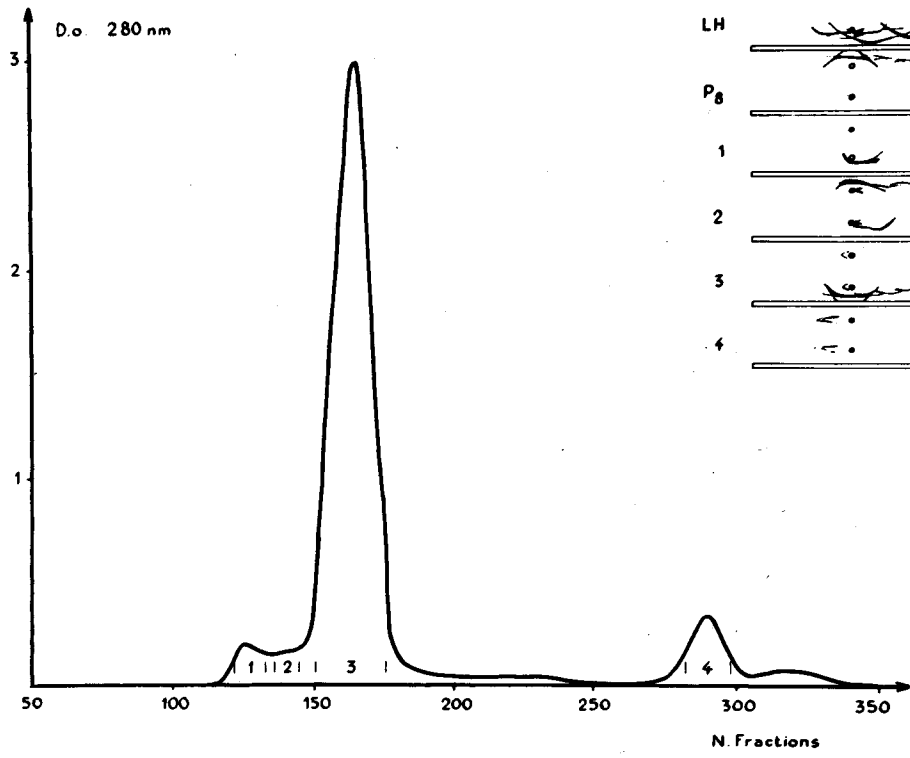


Figure 19 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-100 du précipité P₈.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des sous-fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S.).



La fraction 2, très peu importante, comme la précédente, est composée également de lactotransferrine associée à un protéide d'origine sérique que nous n'avons pas identifié. On y trouve également des traces de sérum-albumine.

Le pic 3 qui constitue la majeure partie du mélange est formé de lactotransferrine, de traces d' α_1 -antitrypsine sérique, et de sérum-albumine. L'arc immunoélectrophorétique que donne la lactotransferrine de cette fraction avec l'immunsérum anti-protéides lactés est dissymétrique et cela correspond aux deux zones qui apparaissent sur les électrophorogrammes obtenus sur acétate de cellulose.

Le pic 4 est constitué de lysozyme associé à des peptides.

VIII - PRECIPITE P₉

Le précipité P₉ marque une transition entre les précipités P₇ et P₈ formés de lactotransferrine et le précipité P₁₀ formé de glycopeptides et de peptides. Il renferme donc encore un peu de lactotransferrine associée à des glycopeptides, comme en témoigne sa haute teneur en glucides (voir tableau XX; p. 70).

La filtration sur Sephadex G-100 donne 3 pics (Figure 20; p. 105).

Le premier représente des traces d'un composé antigénique d'origine sérique non identifié.

Le second pic est formé essentiellement de lactotransferrine qui en électrophorèse sur acétate de cellulose ne donne qu'une zone correspondant à la zone la plus rapide obtenue avec la lactotransferrine des précipités P₇ et P₈ (Figure 20; p. 105). La lactotransferrine de ce pic est associée à de l' α_1 -antitrypsine sérique.

Le pic 3 est constitué de peptides qui ne sont pas antigéniques et qui donnent de nombreuses zones en électrophorèse sur acétate de cellulose. La teneur en phosphore de cette fraction est très élevée puisqu'elle atteint 1,9 p.100 soit environ 4 fois plus que celle de la caséine humaine totale (voir tableau XXIII; p. 106).

IX - PRECIPITE P₁₀

Ce précipité renferme des peptides et des glycopeptides de

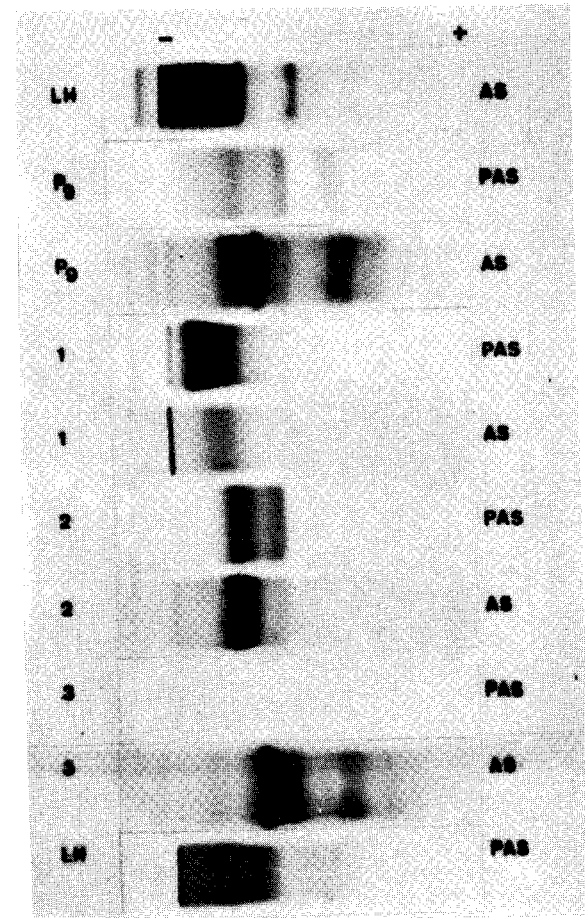
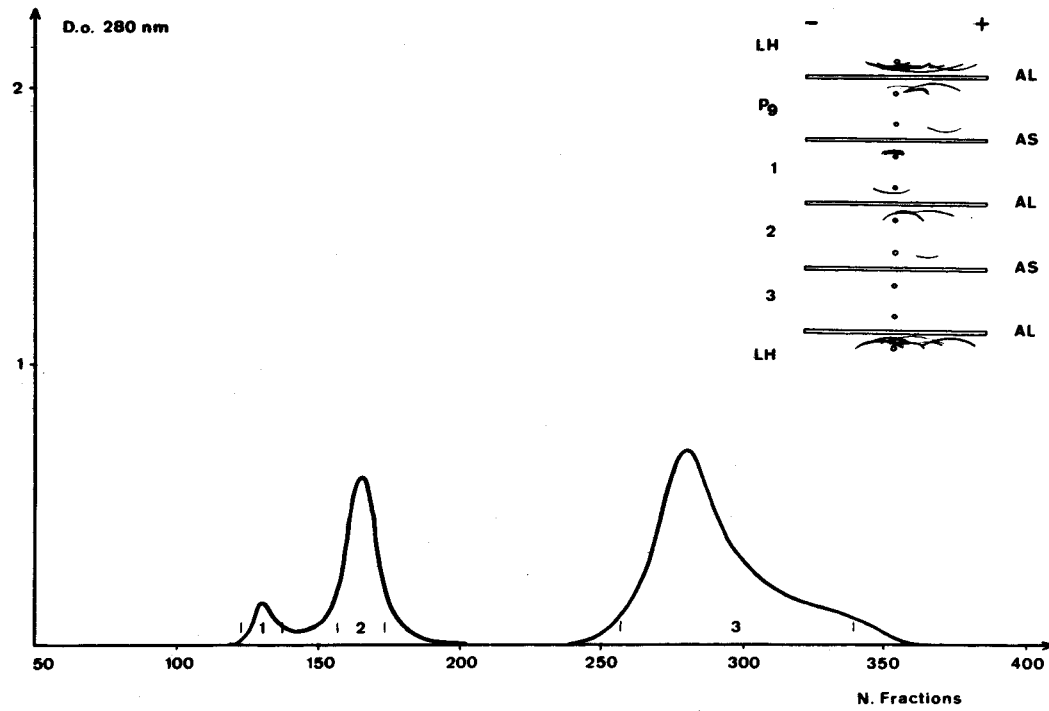


Figure 20 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-100 du précipité P₉.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des sous-
 fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S.).



Composition centésimale en glucides et en phosphore des différentes fractions issues des précipités P₉ et P₁₀.

Précipité d'origine	Désignation de la fraction	Osés neutres	GlcNAC	GalNAC	ANAN	P
P ₉	Pic 3	Traces	Traces	Traces	Traces	1,9
P ₁₀	Pic 1	32,4	17,2	5,75	8,9	0,2
P ₁₀	Pics 2+3	Traces	Traces	Traces	Traces	1



faibles masses moléculaires et de l' α_1 -antitrypsine sérique. Ce dernier protéide ne peut être isolé par filtration sur Sephadex G-100 ou G-75. Nous avons donc utilisé du Sephadex G-50 et obtenu, d'une part, les glycopeptides et l' α_1 -antitrypsine (pic 1)(Figure 21;p.108), d'autre part les peptides (pic 2). Les deux premiers composés seront séparés par chromatographie sur échangeur d'ions comme nous le verrons dans le chapitre suivant. L'électrophorèse de zone sur bandes d'acétate de cellulose montre que pour le pic 1, la bande rapide correspondant à l' α_1 -antitrypsine sérique est révélée faiblement par le réactif à l'Amidoschwarz et très fortement par le P.A.S. Ce protéide pourrait donc être, lui-aussi, associé à des glycopeptides.

Le second pic coupé arbitrairement en 2 parties est composé uniquement de peptides qui donnent de nombreuses zones en électrophorèse sur acétate de cellulose. La composition en glucides et en phosphore de ces fractions est rapportée dans le tableau XXIII (p. 106).

Le pic 1 renferme beaucoup de glucides et on remarque en particulier la teneur élevée en galactosamine. Par contre, on ne décèle pratiquement pas de glucides dans les pics 2 et 3 qui comportent un taux important de phosphore : 5 fois plus que dans le pic 1 et 2 fois plus que dans la caséine humaine totale.

4. - FILTRATION DIRECTE SUR GEL DE SEPHADEX G-150 DU LACTOSERUM CONCENTRE

Nous avons effectué une filtration sur gel de Sephadex du lactosérum humain concentré par dialyse contre du polyéthylène glycol 20.000 afin d'éviter la lyophilisation. Nous avons ainsi tenté de saisir les formes "naturelles" des protéides du lait maternel. Nous avons choisi le Sephadex G-150 qui donne la meilleure résolution et obtenu 3 pics principaux, l'un d'IgA, l'autre de lactotransferrine et de sérum-albumine non séparées et le dernier de lactalbumine. Toutefois, nous avons fractionné l'effluent en 9 parties (Figure 22; p.109) que nous avons étudiées en immunoélectrophorèse (Figure 22; p.109) et en électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 23 ; p. 110).

Nous avons fait les observations suivantes :

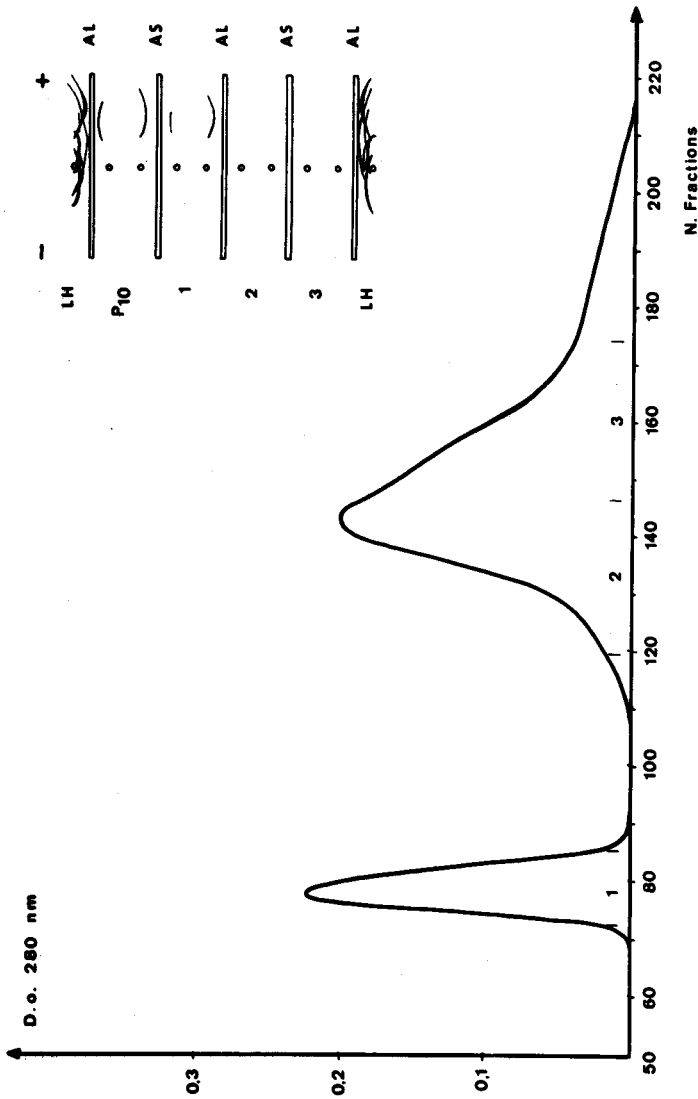
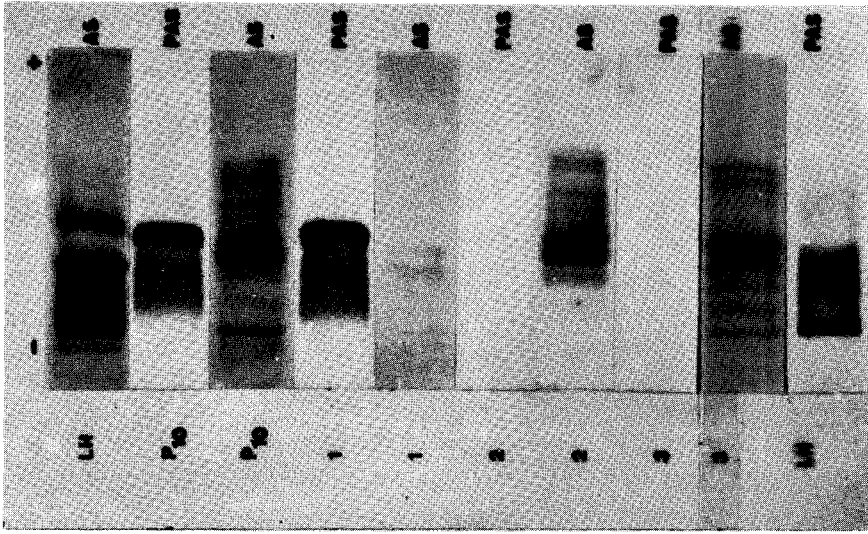


Figure 21 : Chromatographie sur Sephadex G-50 du précipité P₁₀.
 Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des
 sous-fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz et le P A S.).



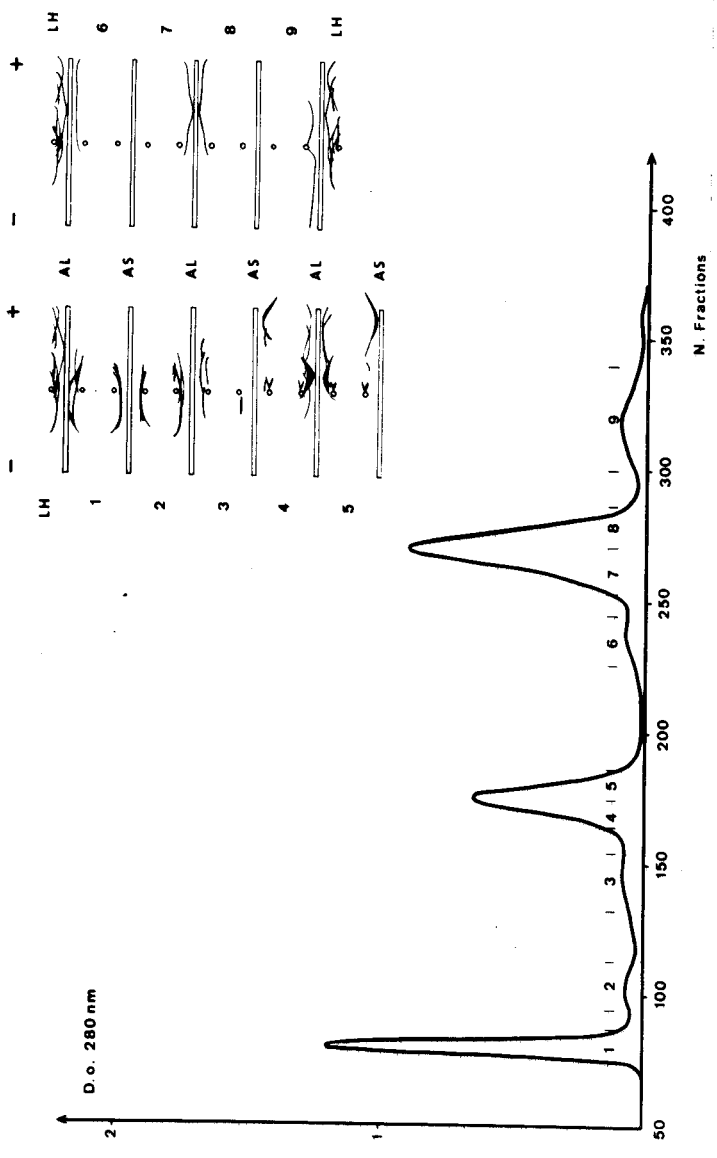
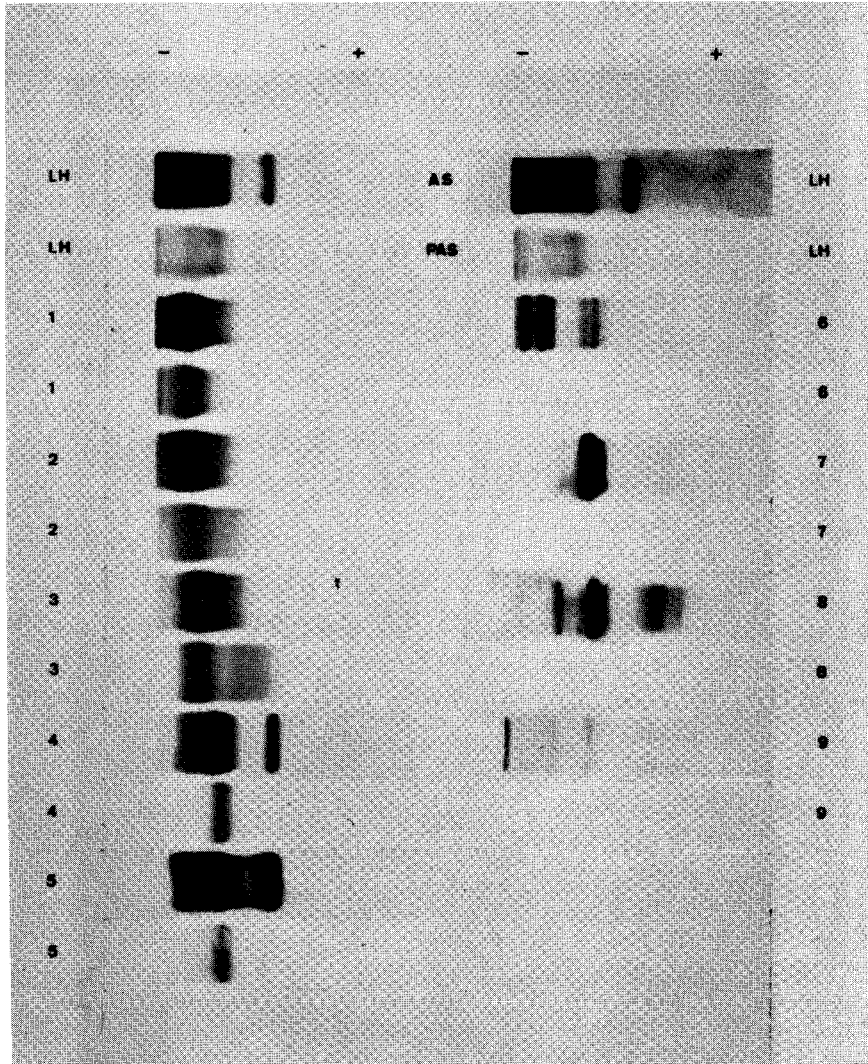


Figure 22 : Chromatographie de gel filtration du lactosérum humain sur Sephadex G-150 et immunoelectrophorèse des fractions obtenues.





BUS
LILLE

Figure 23 : Electrophorèse sur acétate de cellulose du fractionnement direct sur Sephadex G-150 du lactosérum humain (révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S.).

- 1) Les IgA sont associées à la chaîne de sécrétion libre qui est éluée partiellement sous forme α_2 dans les pics 1 et 2. La composition en glucides de ces IgA sera étudiée dans le chapitre suivant.
- 2) L'immuno électrophorèse révèle des arcs α_2 et β_1 qui semblent antigéniquement apparentés à la sérum-albumine ; ceci est confirmé par le fait suivant : la zone la plus lente - Amidoschwarz positive et P.A.S. négative - que donne le pic 5 en électrophorèse sur acétate de cellulose, a une mobilité qui correspond à celle du protéide α_2 présent dans la sous-fraction 3 du précipité P_6 lui-même apparenté antigéniquement à la sérum-albumine, comme nous l'avons remarqué plus haut (voir p. 99).
- 3) L'arc de la lactotransferrine est beaucoup plus "rapide" que celui de la lactotransferrine du P_7 et du P_8 . Cette lactotransferrine "native" ne donne qu'une bande "rapide" en électrophorèse sur acétate de cellulose. Nous verrons dans le chapitre suivant que cette forme de lactotransferrine est associée à des glycopeptides.
- 4) On ne caractérise plus de glycopeptides dans les dernières fractions de l'effluent.

5. - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1) L'étude du précipité P_1 nous a permis de mettre en évidence un protéide qui possède la propriété de s'agglutiner puis de précipiter à chaud d'une manière réversible. Nous avons pensé qu'il s'agissait d'un constituant proche de la β -caséine qui représente la majeure partie de la caséine humaine et dont la solubilité en présence de calcium est influencée par la température (NAGASAWA et al.)(410).

Ce lien de parenté ne pouvait cependant être retenu pour ce protéide puisqu'il ne renferme pas de phosphore. La recherche de glucides est également restée négative. Ces observations ont été confirmées par SCHADE et REINHART (411) qui ont également isolé ce composé à partir de lait maternel et l'ont appelé galactothermine. Leur étude physico-chimique plus poussée a montré que la galactothermine possède une masse moléculaire comprise entre 11.400 d'après l'ultra-centrifugation et 14.000 d'après l'analyse des acides aminés qui révèle la richesse en proline et en espèces non polaires. D'autre part,

les mêmes auteurs ont montré que la précipitation réversible est favorisée par une augmentation : de la concentration en protéines, de la force ionique du milieu, de la température, du temps ainsi que par la proximité du point isoélectrique qui est de 7,27.

2) Les IgA sont obtenues à l'état pur, à partir du précipité F_4 du fractionnement de base. Toutefois, elles apparaissent le plus souvent accompagnées de chaîne de sécrétion libre. Celle-ci peut être adsorbée sur la molécule d'IgA, les forces d'adsorption étant suffisantes pour provoquer la "coprécipitation" puis la "cofiltration" des deux entités qui se dissocieraient au cours de l'immunoélectrophorèse, permettant ainsi la mise en évidence de deux arcs distincts. La masse moléculaire de la chaîne de sécrétion, déduite des volumes d'élution sur Sephadex G-200, serait de 120.000 selon van MUNSTER et al. qui évoquent la possibilité de formation d'un dimère. Cela n'a pas été confirmé.

Nos observations nous conduisent à penser qu'il existe deux formes de chaîne de sécrétion libre :

- a) une forme "rapide" de mobilité α_2 qui contamine les préparations d'IgA (issues de F_1, P_2, P_{2-4} et du lactosérum) et qui est toujours associée à la présence de glycopeptides comme nous le verrons dans le chapitre suivant.
- b) Une forme "lente" de mobilité β_2 , élue du Sephadex G-150 avec la lactotransferrine et identique à la chaîne de sécrétion décrite par van MUNSTER et al. (412). Elle est associée à la lactotransferrine - dans les précipités P_7 et P_8 du fractionnement par le sulfate d'ammonium - avec laquelle elle semble former un complexe dont nous avons isolé des traces. Ces différentes formes de chaîne de sécrétion : liée aux IgA, libre "lente", et libre "rapide", sont visibles sur l'immunoélectrophorégramme (Figure 24 ; p. 113) réalisé au moyen d'immunsérum anti-protéides lactés et anti-chaîne de sécrétion ^(*) ainsi que sur le schéma (Figure 25 ; p.114) qui en est la synthèse et que nous interpréterons de la manière suivante :

(*) L'immunsérum anti-chaîne de sécrétion (ASC), provenant de lapins hyperimmunisés contre une préparation d'IgA purifiée, est épuisé par du sérum humain et de la lactotransferrine pure, pour le cas où la préparation d'antigène contiendrait encore des traces de lactotransferrine.

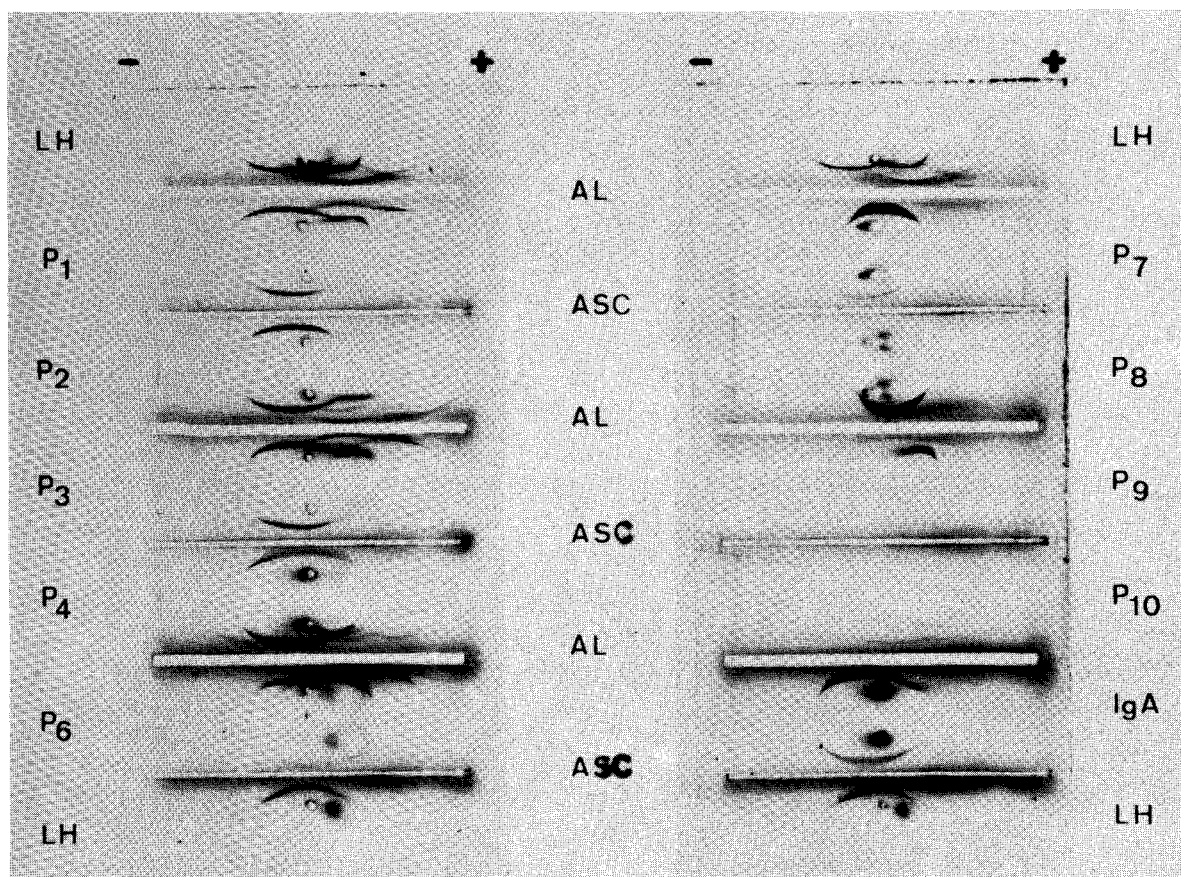


Figure 24 : Immunoelectrophorèse des différents précipités du fractionnement par le sulfate d'ammonium, réalisée avec des immunosérums anti-protéides lactés (AL) et anti-chaîne de sécrétion (ASC).



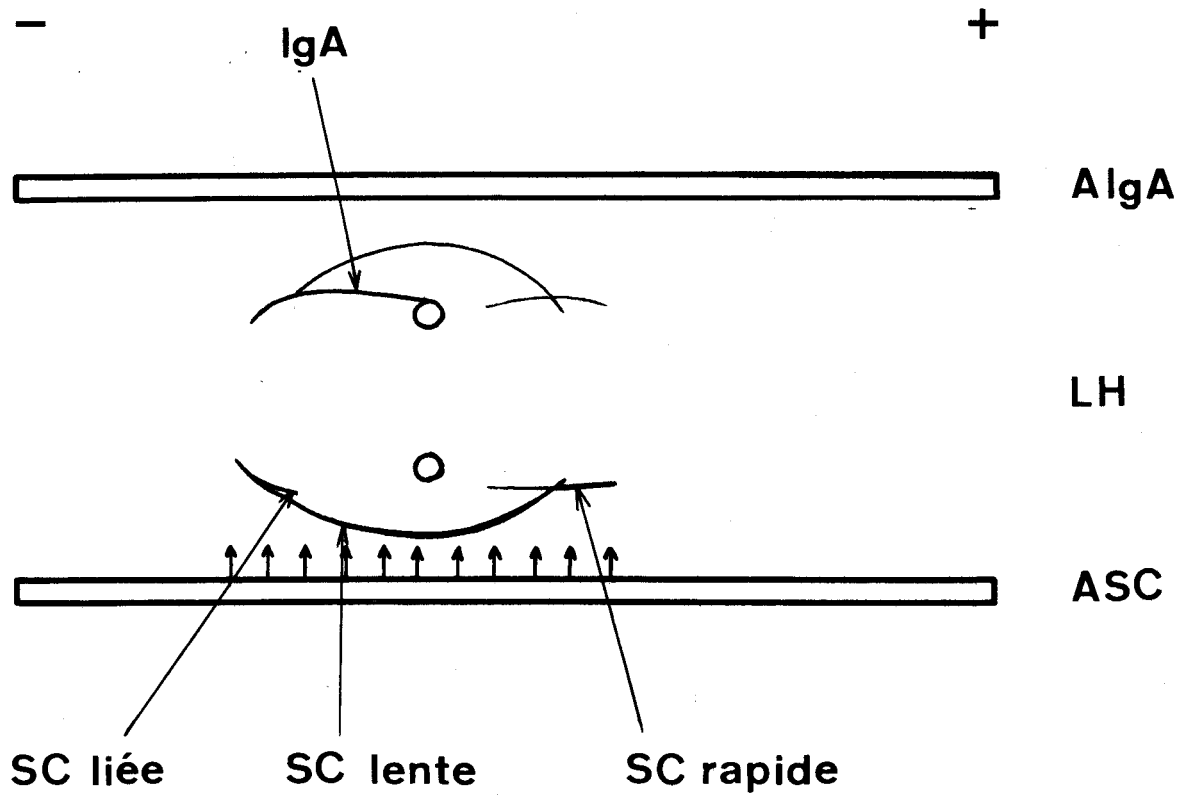


Figure 25 : Schéma des différentes formes de chaîne de sécrétion (SC).

- ↑ : Anti-déterminants SC
- AIgA : Immunsérum anti IgA de sécrétion
- LH : Lait humain
- ASC : Immunsérum anti-chaîne de sécrétion



Les anti-déterminants chaîne de sécrétion (ASC) qui diffusent de la gouttière à immunsérum en suivant le trajet figuré par les flèches rencontrent d'abord la zone de la chaîne de sécrétion libre "lente" et la plupart précipitent. Les anti-déterminants (ASC) qui diffusent au-delà de ce premier précipité réagissent d'une part, avec la chaîne de sécrétion liée aux IgA et marquent, côté cathodique, l'amorce de l'arc d'IgA ; ils réagissent d'autre part, avec la chaîne de sécrétion "rapide" pour donner un arc parfois très faible qui se prolonge côté anodique, en dehors de l'aire de diffusion de la chaîne de sécrétion lente, sous forme d'un tracé beaucoup plus net puisque tous les anti-déterminants chaîne de sécrétion sont alors disponibles.

3) L' α -lactalbumine peut être obtenue à l'état pur principalement à partir du précipité P_2 . Contrairement aux résultats de PHILLIPS et JENNESS (413) nous avons mis en évidence un polymorphisme de l' α -lactalbumine qui se présente sous forme de 3 zones contigues en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sur acétate de cellulose et sur gel d'agar. La présence d'une cassure de chaque côté, anodique et cathodique, de l'arc immunoélectrophorétique de l' α -lactalbumine confirme cette observation. Ce polymorphisme peut être expliqué par l'existence de variants génétiques ou de glyco- α -lactalbumine. Nous avons vu, en effet, que l' α -lactalbumine bovine pouvait renfermer des quantités variables de glucides [1 à 12 résidus de monosaccharides par molécule : (GORDON et al.)(414) (HINDLE et WHEELLOCK)(415) (BARMAN)(416)] greffés sur une α -lactalbumine plus rapide en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Notons qu'aucune des trois zones électrophorétiques que nous avons mise en évidence ne donne de réaction positive avec le P.A.S. et que nous n'avons pas encore isolé de quantités suffisantes des zones rapides et lentes pour pouvoir y rechercher la présence de glucides.

4) L'albumine sérique du lait humain montre des réactions d'identité partielle avec du matériel antigéniquement apparenté, d'une masse moléculaire plus élevée et d'une mobilité électrophorétique α_2 et β_2 . La sérum-albumine se complexe à de nombreux protéides : IgA (MANNIK) (417) ainsi qu'à la lactotransferrine comme l'ont montré les travaux récents de HEKMAN (417a). Les protéides α_2 et β_2 apparentés à la sérum-albumine pourraient donc être un complexe de ce genre.

5) La lactotransferrine possède une vitesse électrophorétique qui varie :

a - d'une manière continue en fonction de la concentration.

b - discontinue. A une concentration donnée, elle présente deux états : lent et rapide qui ne peuvent être mis en évidence à notre connaissance qu'en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose dans les conditions expérimentales que nous avons précisées plus haut.

6) Nous confirmons la présence dans le lait maternel d' α_1 -antitrypsine sérique qu'HANSON (418) avait caractérisée en 1959. Ce protéide se trouve concentré dans les précipités P_9 et P_{10} et nous verrons dans le chapitre suivant qu'il ne figure dans le lait qu'à l'état de traces.

7) Les précipités P_9 et P_{10} sont constitués en majeure partie de peptides et de glycopeptides, ces derniers étant apparentés à la caséine par leur richesse en phosphore et leur structure glycanique (voir chapitre suivant, p. 159). Notons que la teneur en phosphore des glycopeptides est beaucoup moins élevée que celle des peptides qui renferment jusqu'à quatre fois plus de phosphore que la caséine totale.

8) Les glycopeptides, présents dans les précipités P_9 et P_{10} , n'apparaissent pas libres lorsqu'on effectue directement une filtration du lactosérum sur gel de Sephadex. Nous verrons dans le chapitre suivant (p. 141) que ces glycopeptides sont "naturellement" associés aux protéides dans le lait. Ils s'en trouvent dissociés au cours du relargage par le sulfate d'ammonium.

GOT (419) a effectué une étude voisine de la nôtre en associant un fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium à la chromatographie de gel filtration sur Sephadex G-200. Nos résultats prolongent ceux de cet auteur car ils apportent de nombreuses précisions sur la caractérisation et le comportement des protéides du lactosérum humain.

ISOLEMENT ET COMPOSITION GLYCANNIQUE DES
PRINCIPAUX GLYCOPROTEIDES DU LAIT MATERNEL

1 . INTRODUCTION

Parallèlement à l'étude générale du fractionnement du lait, nous avons poursuivi les travaux de MONTREUIL et coll. qui avaient abouti à l'isolement de la lactotransferrine (420), des IgA (421) et du "gynolactomucoïde I" (422). Dans le but d'améliorer les rendements des méthodes de préparation de ces composés, nous avons été amené à leur apporter quelques modifications. L'étude de celles-ci fera l'objet de ce chapitre où nous aborderons dans l'ordre chronologique de nos travaux les méthodes de préparation de la lactotransferrine du "gynolactomucoïde I", des IgA.

2. ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Dans cette étude nous avons travaillé en collaboration avec SPIK dont les travaux ont porté plus particulièrement sur l'étude comparée des structures de la lactotransferrine et de la transferrine humaine (423).

I - PREPARATION

A - APPLICATION DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET

1- Principe

Le lait délipidé est soumis à un fractionnement préalable par le sulfate d'ammonium selon le protocole de MONTREUIL, CHCSON, HAVÉZ et MULLET (424) (voir p. 57). La fraction obtenue par précipitation à saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7 est soumise à la chromatographie sur Amberlite XE-64.

2- Mode opératoire

Une solution de 2 à 3 g de précipité P₇ est passée sur une colonne d'Amberlite XE-64 (⊗) (3,5 x 60 cm ; "mesh" 200-400 ; forme citrate).

(⊗) Résine carboxylique fournie par ROHM et HAAS Company, Philadelphia, Pa. 19.105.

a - Préparation de la résine :

La résine "neuve" est traitée suivant le protocole de HIRS (425) : 1,5 k de résine sont agités mécaniquement dans 3,5 litres d'eau distillée pendant 20 minutes. Après un repos de 2 h, le liquide surnageant est éliminé et l'opération est répétée 4 à 5 fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair. La résine est ensuite séchée à l'air. Le lavage à l'eau distillée est suivi d'un lavage avec 4 litres d'acétone. La résine filtrée sur Büchner est lavée par l'acétone jusqu'à ce que le filtrat obtenu soit limpide. La résine, séchée à l'air, est lavée avec 20 litres environ d'eau distillée sur filtre Büchner. La résine est ensuite mise sous forme "citrate" par l'application du procédé de SCHMID et coll. (426).

b - Passage à la forme "citrate" de la résine

La résine en suspension dans 5 litres d'eau distillée, est traitée sous agitation continue par 1,5 l de soude 10 N pendant 4 h. Elle est ensuite lavée deux fois sous agitation avec de l'eau distillée pendant 1 heure. Elle est enfin transférée sur un filtre Büchner et lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH de l'effluent atteigne 10. La résine est alors amenée sous la forme "acide".

c - Passage à la forme "acide" de la résine

La forme "acide" de la résine est obtenue par le passage lent (4 heures environ) de 10 litres d'acide chlorhydrique 3N, suivi d'un lavage avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH des eaux de lavage voisin de 5. La résine peut être conservée sous cette forme à 0°C, en présence de chloroforme.

d - Préparation des colonnes de chromatographie

La résine est d'abord "équilibrée" avec le tampon d'élution (citrate de sodium 0,05 M de pH 5,2) en agitant 1 k de résine dans 5 litres du tampon, pendant une nuit, en maintenant le pH à 5,2 au pH stat. La résine est ensuite lavée sur filtre Büchner par le tampon d'élution (environ 30 litres) et est introduite dans les colonnes. Celles-ci sont ensuite "stabilisées" par le passage du tampon d'élution pendant 24 à 48 heures.

Nota : Conservation de la résine

La résine, sortie de la colonne, est lavée par décantation avec de l'eau distillée, traitée par 5 litres d'acide chlorhydrique 3N p. k de résine, lavée de nouveau avec de l'eau distillée par décantation, puis sur filtre Büchner jusqu'à neutralité de l'effluent. La résine est ensuite mise sous la forme "citrate" (voir plus haut).

e - Technique chromatographique

Sur une colonne (3,5 x 60 cm), réfrigérée à + 4°C, d'Amberlite XE-64, on introduit 2 à 2,5 g de précipité P₇ en solution dans 20 ml de citrate 0,05 M de pH 5,2. L'élution de la colonne par le même tampon (0,5 ml p. mn ; fractions de 10 ml) fournit un premier pic ("Pic I") (fig. 26; p. 120). Le passage d'un tampon citrate 0,50 M de pH 6,2 donne un second pic, très important et coloré, en rose. Ce pic est asymétrique et est flanqué, généralement, de deux autres pics mineurs incolores.

Tous les tubes colorés en rose-saumon, et qui correspondent à la partie centrale du pic majeur, sont rassemblés et représentent la fraction "Pic 2". La lactotransferrine est précipitée, en la saturant en sulfate d'ammonium à pH 3,8. Après un repos de 48 h, à + 4°C, le précipité est recueilli par centrifugation, dialysé jusqu'à réaction négative avec le réactif de NESSLER et lyophilisé. Ce mode opératoire est rendu indispensable par les difficultés que l'on rencontre à éliminer par dialyse le citrate de sodium.

Le rendement est de l'ordre de 80 à 85 p.100 (500 mg de lactotransferrine p. litre de lait).

3. Résultats

L'application du procédé original de MONTRÉUIL et coll. nous a donné des résultats analogues à ceux de ces auteurs :

a - Le fractionnement du lait de Femme par le sulfate d'ammonium fournit un précipité P₇ (1 à 1,5 g. p. litre de lait) hétérogène en électrophorèse et en immuno-électrophorèse qui révèlent la présence, d'une façon constante - outre de la lactotransferrine -, de lactalbumine et de 3 préalbumines, et, de manière inconstante, de globulines IgA. Sa teneur en glucides est la suivante :

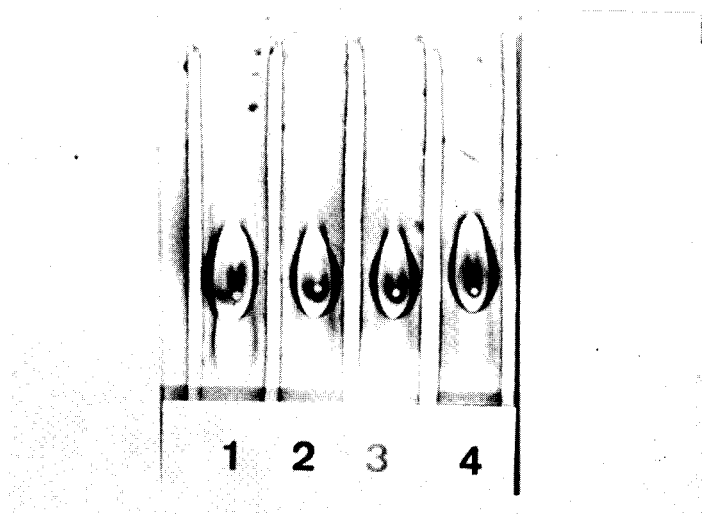
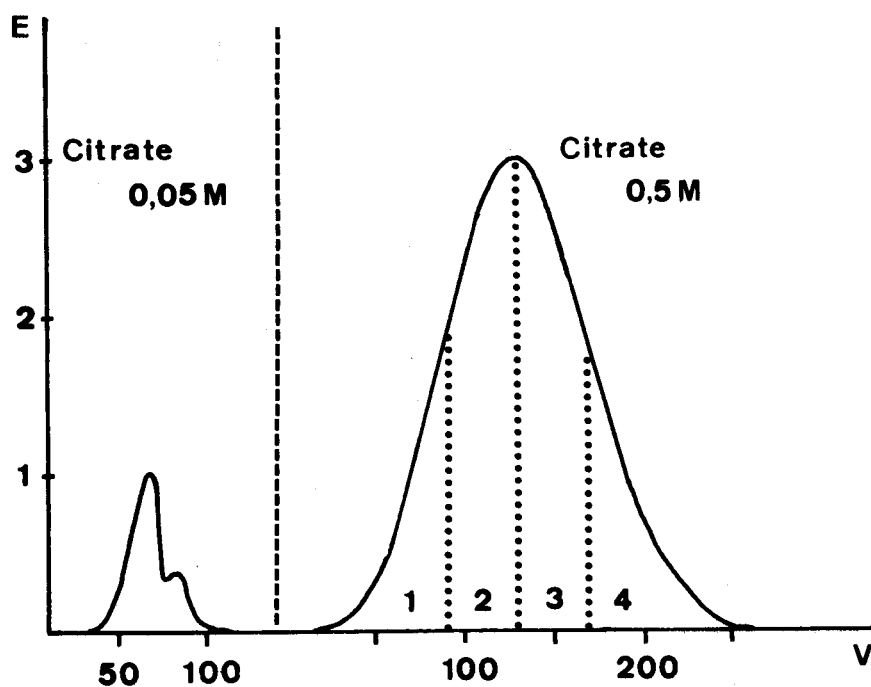


Figure 26 : Chromatographie sur Amberlite XE-64 (3,5 x 60 cm ; forme "citrate" des protéides (2g) du précipité P₇ (Figure 1 ; p. 57).

En abscisses : nombre de fractions de 10 ml recueillies.

En ordonnées : absorbances mesurées à 278 nm en cuve de 1 cm d'épaisseur.

Oses "neutres"	17,2 à 18,2	p.100
Osamines	6,25	p.100
Acide sialique	4,15 à 5	p.100

L'ultracentrifugation révèle la présence de 4 constituants dont les constantes de sédimentation, déterminées pour les 3 constituants les plus "légers" et à la seule concentration de 10 mg. p. ml sont les suivantes : 1,75, 4,55 et 6,85. Ces pics correspondent vraisemblablement aux constituants du "pic 1" (voir ci-dessous), à la lactotransferrine et aux globulines IgA.

b - La chromatographie sur Amberlite XE-64 fournit les pics 1 et 2 (fig. 26; p. 120) dont les propriétés sont très différentes :

1 - Le pic 1 (0,3 g pour 2 g de précipité P_7 ; soit 0,15 à 0,20 g p. litre de lait) ne possède pas de constituants antigéniques et contient une proportion élevée en glucides. Nous l'étudierons plus loin (chapitre 3; p. 147).

2 - Le pic 2 (1 g p. 2 g de précipité P_7 ; soit 0,75 g p. litre de lait) présente les caractéristiques suivantes :

- Il possède une coloration rose-saumon

- Il est homogène en électrophorèse en gélose mais hétérogène en électrophorèse sur acétate de cellulose (2 bandes) et en immunoelectrophorèse qui révèle la présence, outre de la lactotransferrine, de globulines IgA.

- Sa composition centésimale est la suivante :

Oses "neutres"	2,94 à 4	p.100
Osamines	2,53 à 2,79	p.100
Acide sialique	1,3 à 1,41	p.100

- Il renferme du galactose, du mannose, du fucose, de la glucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique.

3 - L'immuno-électrophorèse, appliquée à différentes fractions du pic 2 (fig. 26; p. 120), montre que la fraction de tête (Fraction 1 ; 0,15 g environ) est hétérogène et renferme, outre la lactotransferrine, deux composants de comportement β_1 et α_2 et un constituant de comportement

cathodique $\gamma^{(\ast)}$.

La fraction 4 (0,08 g environ) est, elle aussi, hétérogène et possède un constituant de comportement A_1 qui donne un arc de précipitation "interne" par rapport à celui de la lactotransferrine.

Les fractions "centrales" du pic (fractions 2 et 3) (0,15 g environ) renferment seulement de la lactotransferrine homogène en électrophorèse, en immuno-électrophorèse et à l'ultracentrifugation. Rassemblées, elles représentent les préparations de "lactotransferrine XE- 64".

4 - Conclusions

a - L'application du procédé de MONTREUIL et coll. nous a fourni, comme à ces auteurs, des préparations pures de lactotransferrine à raison de 0,5 g par litre de lait, avec un rendement de 85 p.100. Le lait de Femme, **contiendrait, en effet, d'après nos travaux effectués** d'une manière très quantitative, de 700 à 900 mg de lactotransferrine par litre. Cette valeur est intermédiaire entre celles de BLANC (0,6 g) et de MONTREUIL (1 à 1,5 g).

b - Les préparations que nous avons obtenues par ce procédé ont été utilisées pour nos études physico-chimiques et structurales.

c - Nous avons tenté d'améliorer le rendement en appliquant, au pic 2, la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ou de CM-cellulose, afin d'éliminer les impuretés en évitant le "découpage" du pic 2 et la perte des fractions de tête et de queue (Fractions 1 et 4).

B - MODIFICATIONS DE LA METHODE DE MONTREUIL, TONNELAT et MULLET

1° - Chromatographie sur DEAE-cellulose du pic 2 obtenu sur XE-64

a - Principe

Notre choix s'est d'abord porté sur un échangeur d'ions ne fixant pas la lactotransferrine et retenant les impuretés afin d'éviter la dénaturation. Nous avons appliqué la méthode chromatographique sur

(*) L'arc donné par ce constituant se raccorde à celui de la lactotransferrine et fournit une image identique à celle que BLANC et nous-mêmes obtenons avec une lactotransferrine dégradée par des protéases.

DEAE-cellulose décrite par GROVES (427), à propos de la lactotransferrine du lait de Vache. L'élution des protéides est obtenue avec un gradient discontinu de concentration en phosphate de sodium et de pH.

b - Mode opératoire

Les protéides totaux du pic 2 (voir p.119) (7 g en solution dans 100 ml de tampon phosphate 0,005 M de pH 8) sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (4 x 50 cm) de DEAE-cellulose stabilisée avec un tampon phosphate 0,005 M de pH 8. Le déplacement des constituants est effectué par le passage successif des tampons suivants :

- phosphate 0,005 M - pH 8
- phosphate 0,05 M - pH 7
- phosphate 0,1 M + NaCl 0,5 M - pH 4

Les solutions effluentes sont dialysées et lyophilisées. Les protéides sont ensuite soumis à l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique. Enfin, leur composition en glucides est déterminée.

c - Résultats

1°) La figure 27 (p. 124) illustre le résultat du fractionnement chromatographique du pic 2 sur DEAE-cellulose. On voit que nous avons caractérisé 5 fractions dont nous avons précisé dans le tableau XXIV (p. 125) : la masse, la composition en glucides et le degré d'hétérogénéité révélé par immuno-électrophorèse (fig. 28; p. 126).

2°) La fraction I est pondéralement la plus importante et représente 70 à 80 p.100 des protéides totaux soumis à la chromatographie. Ses caractéristiques sont les suivantes :

α- Elle renferme de la lactotransferrine, mais celle-ci est partiellement dénaturée comme le démontre la morphologie de l'arc de précipitation qui présente une bifidité cathodique se raccordant exactement sur l'arc de la lactotransferrine native.

β- La bifidité cathodique fixe le fer comme le montre les autoradiographies réalisées après fixation de ⁵⁹Fe.

γ- La bifidité ne disparaît pas après saturation en fer.

δ- L'ultracentrifugation qui révèle la présence de deux constituants de S_{20w}^0 4,55 et 6,70 est également en faveur de la dénaturation.

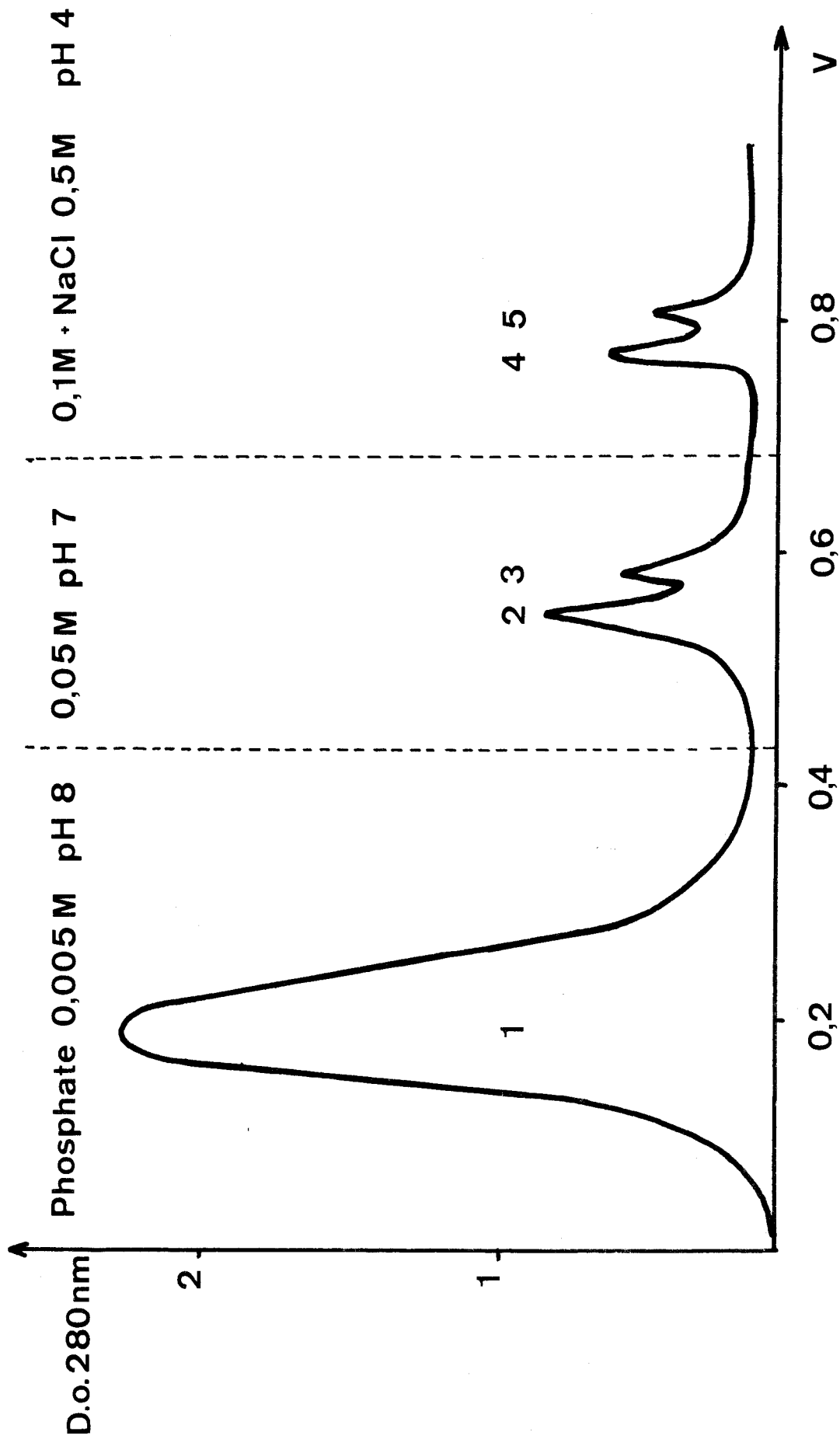


Figure 27 : Chromatographie du pic 2 (voir p. 119) sur DEAE-cellulose.



Caractéristiques des fractions obtenues par chromatographie du pic 2 sur DEAE-cellulose.

Désignation des fractions (a)	Masses obtenues en g (b)	Oses "neutres" p.100	Osamines p.100	Acide sialique p.100	Composition des fractions
1	5 à 6	3,37	1,85	1,04	1 arc bifide de lactotransferrine
2	0,36	4,45	1,67	1,52	4 constituants dont la lactotransferrine
3	0,07	6,66	2,36	2,11	7 constituants
4	0,15	4,41	1,06	2,35	5 constituants dont la lactotransferrine
5	0,05	-	-	-	8 constituants dont la lactotransferrine

(a) Voir la figure 27 (p.124)

(b) Pour 7 g de protéides totaux du pic 2 soumis à la chromatographie sur DEAE-cellulose.



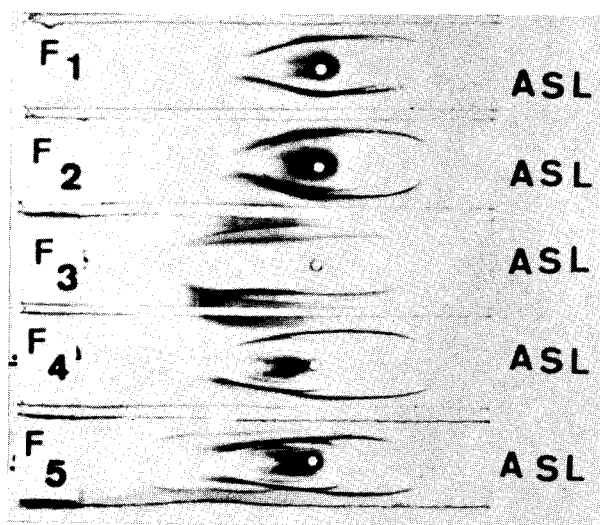


Figure 28 : Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose du pic 2.



E - Elle donne deux bandes distinctes en électrophorèse sur acétate de cellulose.

3°) Les autres fractions sont obtenues en proportion moindre. Elles sont toutes très hétérogènes et renferment des taux de glucides plus élevés que la lactotransferrine (tableau XXIV; p. 125).

4°) La fraction 2 est colorée en rose-saumon et renferme essentiellement de la lactotransferrine dont l'arc de précipitation présente une bifidité cathodique plus développée que pour le pic 1 (fig. 28; p. 126). La rechromatographie de ce pic 2 sur DEAE-cellulose dans les mêmes conditions expérimentales redonne un pic 1 et un pic 2 ce qui confirme l'hypothèse de la dénaturation de la lactotransferrine par la DEAE-cellulose.

d - Modifications de la méthode de GROVES

Les résultats décevants donnés par la méthode de GROVES - mise au point pour la purification de la lactotransferrine bovine -, nous ont incité à tenter de modifier les conditions chromatographiques. Nous avons poursuivi deux objectifs : supprimer la dénaturation, éviter la dispersion de la lactotransferrine en de nombreux pics.

Nous avons opéré de la manière suivante (sur des préparations de lactotransferrine préalablement saturées en fer) :

1°) Augmentation de la force ionique du tampon d'élution (phosphate de sodium pH 8).

Les résultats furent négatifs : quand on augmente la force ionique du tampon d'élution, la lactotransferrine - toujours dénaturée - est très rapidement souillée par une impureté révélée en immuno-électrophorèse par un arc sous le trou de départ.

2°) Diminution du pH du tampon phosphate de sodium 0,005 M. De pH 8 à pH 7,5 le rendement en lactotransferrine augmente sensiblement, puis des impuretés apparaissent. La dénaturation subsiste.

3°) Utilisation d'un tampon bicarbonate d'ammonium de pH 8,2 (les ions bicarbonates participant à la liaison fer-lactotransferrine). Nous avons observé la même dénaturation.

4°) Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant le système tampon préconisé par GROVES, avec la quantité minimale de DEAE-cellulose pour une quantité donnée de lactotransferrine à purifier

(5 ml de DEAE-cellulose pour 300 mg de pic II obtenu sur XE-64).

2° - Chromatographie directe du précipité P₇ sur DEAE-cellulose

Nous avons effectué la même recherche des meilleures conditions chromatographiques en utilisant directement le P₇ car, à l'avantage évident de supprimer une étape, pouvait s'ajouter la possibilité d'une résistance accrue de la lactotransferrine à la dénaturation. Nous avons obtenu de cette manière un rendement légèrement supérieur en lactotransferrine qui présentait la même dénaturation.

3° - Conclusions

a - La chromatographie du pic 2 sur DEAE-cellulose fournit, avec un rendement de 70 à 80 p.100, identique à celui que donne la méthode de MONTREUIL et coll., une lactotransferrine pure mais dénaturée.

b - La dénaturation de la lactotransferrine est provoquée par la DEAE-cellulose. Elle se manifeste par des anomalies de l'arc de précipitation obtenu en immuno-électrophorèse, par une diminution de l'acide sialique due à une activité "sialidasique" de la DEAE-cellulose souvent observée au Laboratoire avec différents glycoprotéides, par une hétérogénéité en électrophorèse et à l'ultracentrifugation. La chromatographie sur DEAE-cellulose doit donc être, en règle générale, utilisée avec prudence. Elle est à rejeter dans le cas de la lactotransferrine.

C - METHODE ORIGINALE DE PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Devant les difficultés rencontrées pour purifier le précipité P₇ sur DEAE-cellulose, nous avons décidé d'essayer de simplifier le matériel de départ, c'est-à-dire le précipité obtenu par relargage au sulfate d'ammonium, avant d'expérimenter d'autres échangeurs d'ions pour la purification finale. La modification de la méthode de fractionnement a consisté en une précipitation plus sélective de la lactotransferrine, nous l'avons exposée dans le chapitre I. Les précipités P₈ du fractionnement de base et P₇₋₈ du fractionnement rapide de type I, beaucoup plus riches en lactotransferrine, car la majeure partie des glycopeptides ont été enlevés, nous ont servi de matière première.

1°- Chromatographie sur CM-cellulose

a - Principe

Les précipités P₈ ou P₇₋₈ sont soumis à une chromatographie sur CM-cellulose, d'abord avec un tampon acétate de sodium de faible force ionique qui élimine les impuretés, puis de force ionique élevée qui déplace la lactotransferrine.

b - Mode opératoire

1°) Préparation de la CM-cellulose :

100 g de CM-cellulose 32 Whatman sont agités dans 15 fois leur volume de soude 0,5 N pendant environ 30 mn. Après décantation du liquide surnageant, la CM-cellulose est lavée à l'eau distillée sur un filtre Büchner, jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 8, puis elle est agitée dans 15 volumes d'acide chlorhydrique 0,5 N pendant 30 mn. Après décantation, la CM-cellulose est de nouveau lavée à l'eau distillée jusqu'à un pH voisin de la neutralité.

2°) Préparation des colonnes :

La CM-cellulose est agitée dans le tampon d'élution (acétate 0,04 M de pH 5,5) pendant 20 à 30 mn. Le surnageant est éliminé par décantation. Ce traitement est répété 6 à 8 fois jusqu'à ce que le pH du tampon ne varie plus.

La CM-cellulose est alors introduite dans une colonne de 2 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur, non réfrigérée. Elle est "stabilisée" par le passage du tampon acétate de sodium 0,04 M, de pH 5,5, pendant 24 heures.

3°) Chromatographie:

3 g de précipité P₈ ou P₇₋₈, dissous dans 20 ml de tampon acétate de sodium 0,04 M, sont injectés au sommet de la colonne de CM-cellulose. L'élution est réalisée par le passage successif des tampons suivants :

- acétate de sodium 0,04 M pH 5,5
- acétate de sodium 0,2 M pH 5,5
- acétate de sodium 0,6 M pH 5,5

Le débit de la colonne est de 60 ml/heure. La densité optique de l'effluent est mesurée à 273 nm. Les fractions obtenues par le passage des différents tampons sont dialysées et lyophilisées. Chaque

fraction est soumise à l'électrophorèse de zone sur différents supports et à l'immuno-électrophorèse.

c - Résultats

La figure 29 (p. 131) illustre le résultat du fractionnement chromatographique du précipité P_{7-8} sur CM-cellulose.

Nous obtenons 6 fractions dont les masses sont indiquées dans le tableau XXV; p. 132) :

- La première F_1 éluée par le tampon acétate 0,05 M de pH 5,5 est constituée par la majeure partie des impuretés.

- La fraction F_5 éluée par le tampon acétate 0,6 M de pH 5,5 est la fraction majeure de couleur rose-saumon.

- Les autres fractions sont peu importantes. Les études immuno-électrophorétiques et électrophorétiques sur acétate de cellulose (fig. 29; p. 131) nous ont permis de préciser la composition de ces fractions (tableau XXV; p. 132).

La lactotransferrine de la fraction F_5 est homogène en immuno-électrophorèse et en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose, gel d'amidon et gel de polyacrylamide.

Elle est obtenue avec un rendement de 60 à 65 p.100 par rapport à la masse de précipité P_{7-8} chromatographié. Toutefois, malgré l'homogénéité électrophorétique et immuno-électrophorétique, cette préparation n'est pas absolument pure, en effet, l'ultracentrifugation révèle la présence de 5 à 10 p.100 d'impuretés. Nous avons eu recours à un ultime stade de purification : la filtration sur gel de Sephadex G-100.

2° - Chromatographie de tamisage moléculaire

a - Principe

Les impuretés présentes dans la préparation de lactotransferrine obtenue sur CM-cellulose pouvaient être un reliquat du complexe lactotransferrine-chaîne de sécrétion- complexe dont nous avons soupçonné l'existence dans le précipité F_7 (chapitre 2; p. 101) ou de la lactotransferrine polymérisée. Dans cette hypothèse, ces impuretés ayant une masse moléculaire élevée, nous avons soumis la fraction F_5 obtenue par chromatographie sur CM-cellulose à une chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-100.

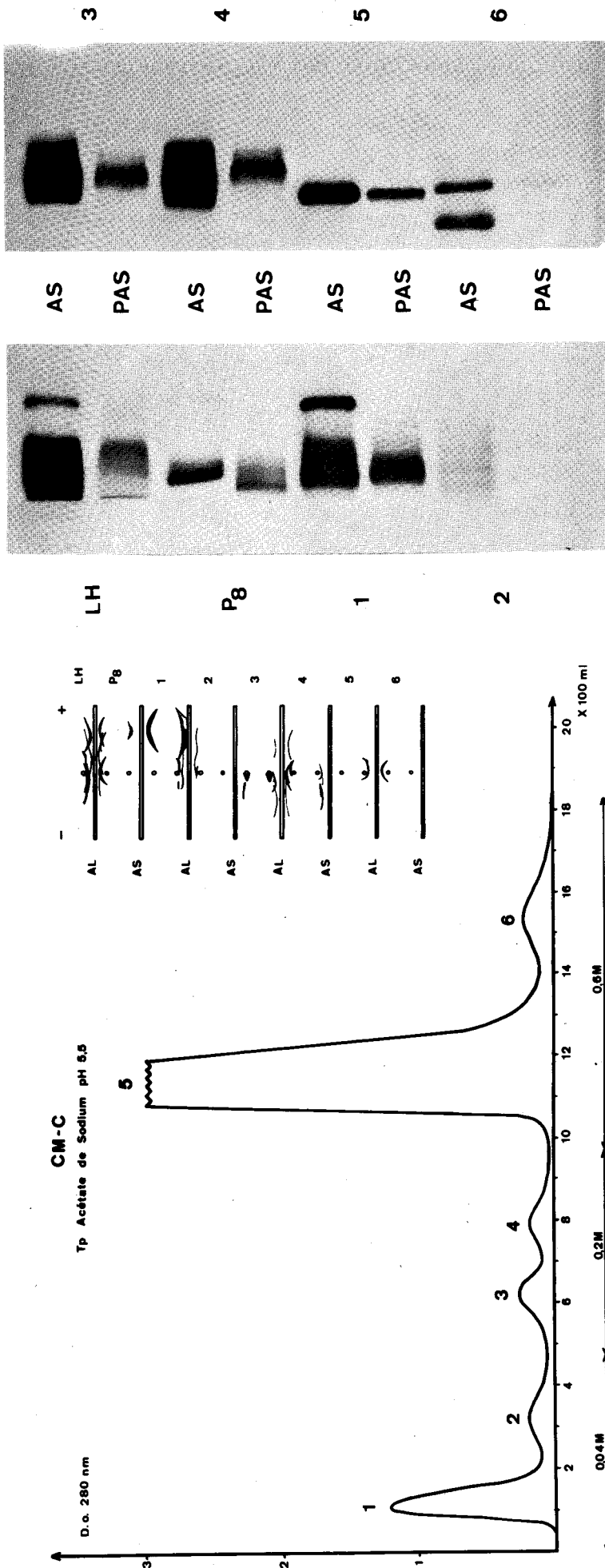


Figure 29 : Diagramme d'éluion du précipité P₈ sur CM-cellulose. Immuno-électrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des fractions obtenues (révélation par l'Amidoschwarz et par le P.A.S.).



T A B L E A U XXV

Composition en protéides des différentes fractions obtenues par chromatographie sur CM-cellulose de 1 g de précipité P₇₋₈.

Fractions	Masses en mg	Composition
F ₁	150	Glycopeptides - Sérum-albumine Lactotransferrine - Traces d' α_1 - antitrypsine et de chaîne de sé- crétion.
F ₂	20	Difficilement interprétable
F ₃	15	Lactotransferrine - Chaîne de sé- crétion - Globulines immunes.
F ₄	10	Lactotransferrine - Chaîne de sé- crétion - Globulines immunes.
F ₅	620	Lactotransferrine
F ₆	30	Lactotransferrine - Lysozyme



b - Matériel et méthodes

Nous avons employé deux colonnes Pharmacia X 50/100 chargées de Sephadex G-100 équilibré dans du tampon TRIS (Tris -(hydroxyméthyl)-aminométhane) 0,1 M, NaCl 1 M, de pH 8, suivant la technique décrite au chapitre 2 (p. 88). Ce tampon sert à l'élution réalisée à + 4°C avec un débit de 40 ml/heure. 700 mg de la "Fraction F₅" obtenue par chromatographie sur CM-cellulose sont dissous dans 10 ml de tampon d'élution et injectés sur les colonnes.

c - Résultats

1°) Chromatographie :

La courbe d'élution représentée sur la figure 30 (p. 134) montre que nous obtenons deux fractions : la première F'₁ est exclue du gel, la seconde F'₂ éluée plus tardivement est de couleur rose-saumon. Les produits lyophilisés correspondants sont tous deux roses et représentent 15 mg pour F'₁ et 550 mg pour F'₂. Le rendement de la chromatographie est supérieur à 80 p.100. Le rendement en lactotransferrine est de 78 p.100.

2°) Identification :

Après immuno-électrophorèse (fig. 30; p. 134) et électrophorèse réalisée sur acétate de cellulose, nous avons pu démontrer que :

- la fraction F'₁ est constituée du complexe lactotransferrine - chaîne de sécrétion.
- la fraction F'₂ est formée de lactotransferrine homogène.

3°) Critères de pureté :

α - Electrophorèse de zone : en plus de l'acétate de cellulose, nous avons également utilisé la gélose, le gel d'amidon - en pH acide et alcalin - et le gel de polyacrylamide (Figure 31; p.135) en suivant les techniques décrites dans le chapitre I. Nous avons constaté que notre préparation était homogène en électrophorèse sur ces différents supports puisqu'elle ne donne qu'une seule zone de mobilité faible. Cette mobilité varie avec la nature du support (la plus grande vitesse de migration est obtenue sur acétate de cellulose) et avec la concentration de l'échantillon : presque nulle à la concentration de 5 p.100 la mobilité électrophorétique augmente pour être perceptible à la concentration de 1 p.100.

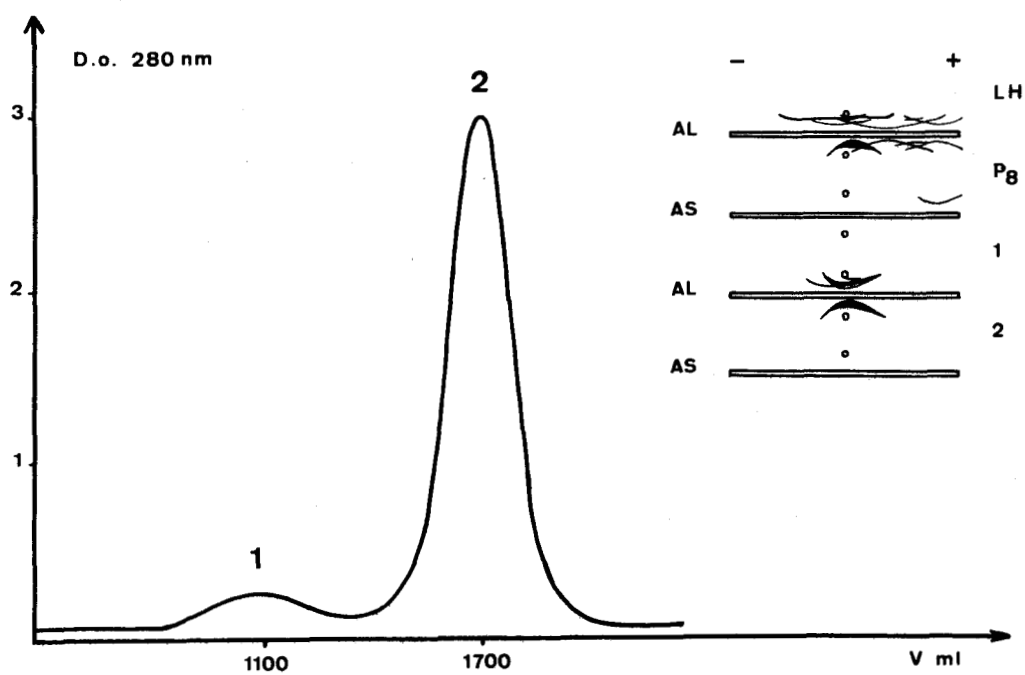


Figure 30 : Chromatographie sur Sephadex G-100 de la lactotransferrine purifiée sur CM-cellulose. Immunoélectrophorèse des fractions obtenues.

GEL DE POLYACRYLAMIDE

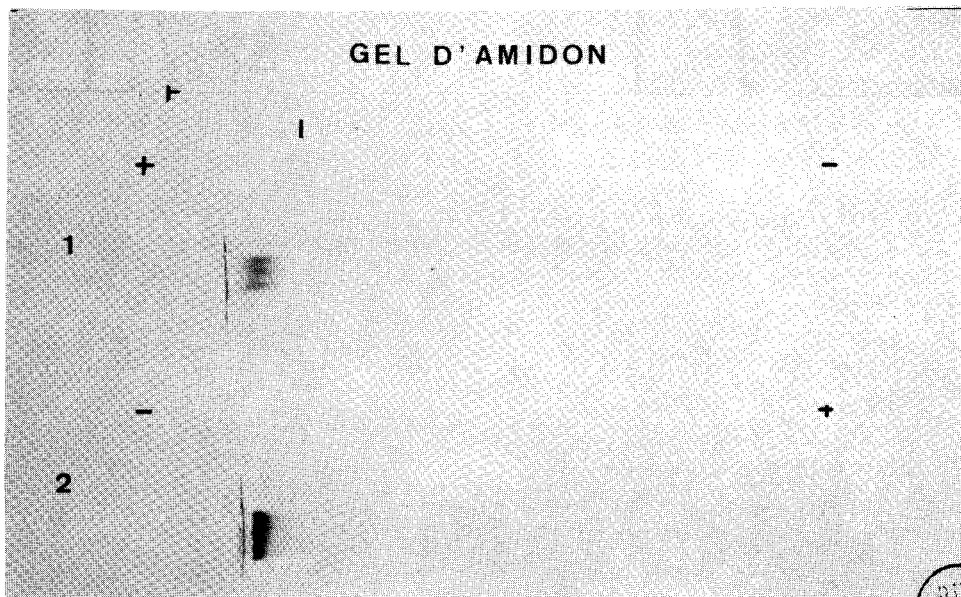
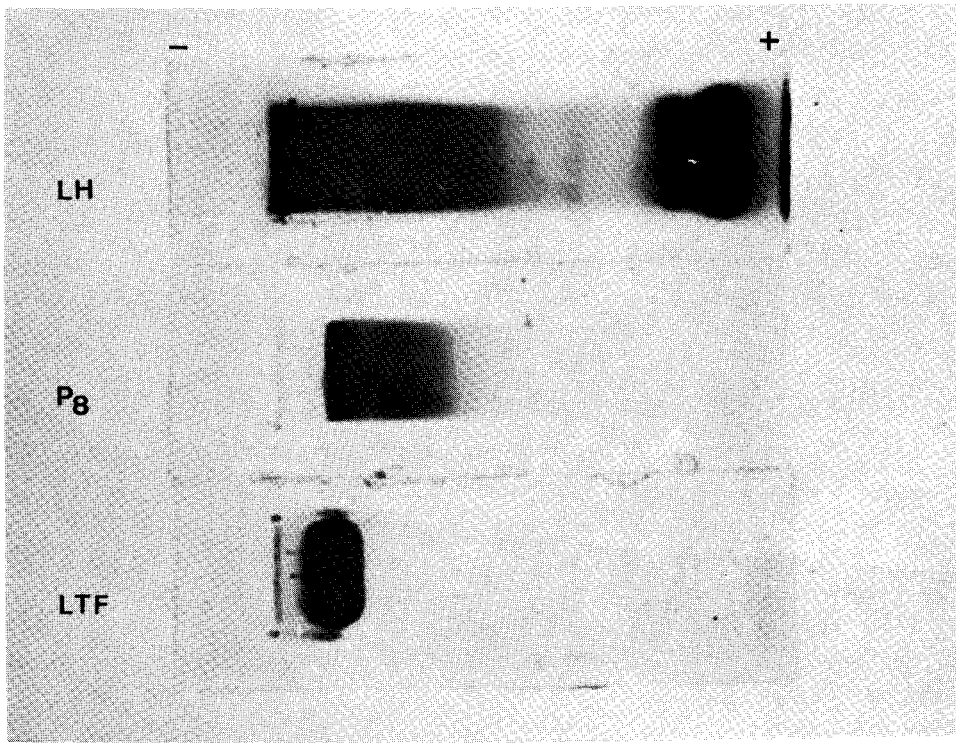


Figure 31 : Electrophorégrammes de la lactotransferrine purifiée sur CM-cellulose et sur Sephadex G-100

- gel de polyacrylamide

- gel d'amidon (1) en tampon formiate de pH 3 ;

(2) en tampon tris-citrate de pH 8,6.

(Le précipité P₈ du fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium est utilisé comme témoin).

β - Ultracentrifugation (⊛) : l'ultracentrifugation a été réalisée sur des préparations dissoutes dans différents tampons et ayant subi différents traitements :

. Lactotransferrine dissoute dans le tampon d'élution du Sephadex G-100 : TRIS 0,1 M - NaCl 1 M, pH 8.

. Lactotransferrine après dialyse de 72 heures contre du tampon phosphate 0,1 M, de pH 7 (renouvelé toutes les 24 heures).

. Lactotransferrine après dialyse contre de l'eau distillée et lyophilisation.

Dans tous les cas, les diagrammes d'ultracentrifugation (Figure 32 ; p. 137) montrent la présence d'un seul pic symétrique sans aucune trace de souillures, ce qui confirme l'homogénéité de la lactotransferrine obtenue par chromatographie sur CM-cellulose puis sur Sephadex G-100. En outre, l'ultracentrifugation nous révèle que notre protéide ne subit pas de dégradation au cours de la dialyse et de la lyophilisation.

γ - Cristallisation : Cette préparation a permis à BRAZIER (428) d'obtenir de la lactotransferrine cristallisée en utilisant une méthode voisine de celle qui fut décrite par JOHANSSON (429). Cet auteur obtient des cristaux à partir de la gomme visqueuse de lactotransferrine qui se dépose dans les sacs de dialyse d'une solution de lactotransferrine contre du tampon phosphate de sodium de pH 7. Le procédé utilisé par BRAZIER est un peu différent : une solution à 1 p.100 de lactotransferrine dans l'eau est dialysée contre une solution saturée de polyéthylène glycol 20.000 à + 4°C. Au bout de quelques heures, la protéine donne une gomme dans le fond du tube de cellophane. Une gomme semblable se forme parfois au cours du désalage de solutions de lactotransferrine plus ou moins purifiée. Une goutte de cette gomme est prélevée avec un peu de la solution surnageante, déposée dans un cristallisateur et abandonnée à + 4°C. Au bout de 3 à 4 semaines, on observe la formation de cristaux (Figure 33 ; p. 138). Ces cristaux sont identiques à ceux obtenus par JOHANSSON (430). La seule différence est que la formation a lieu ici en l'absence d'ions minéraux et que l'on obtient un composé cristallisé absolument pur.

(⊛) Avec la collaboration d'A. VERBERT, J. BRAZIER et C. DUPIRE.

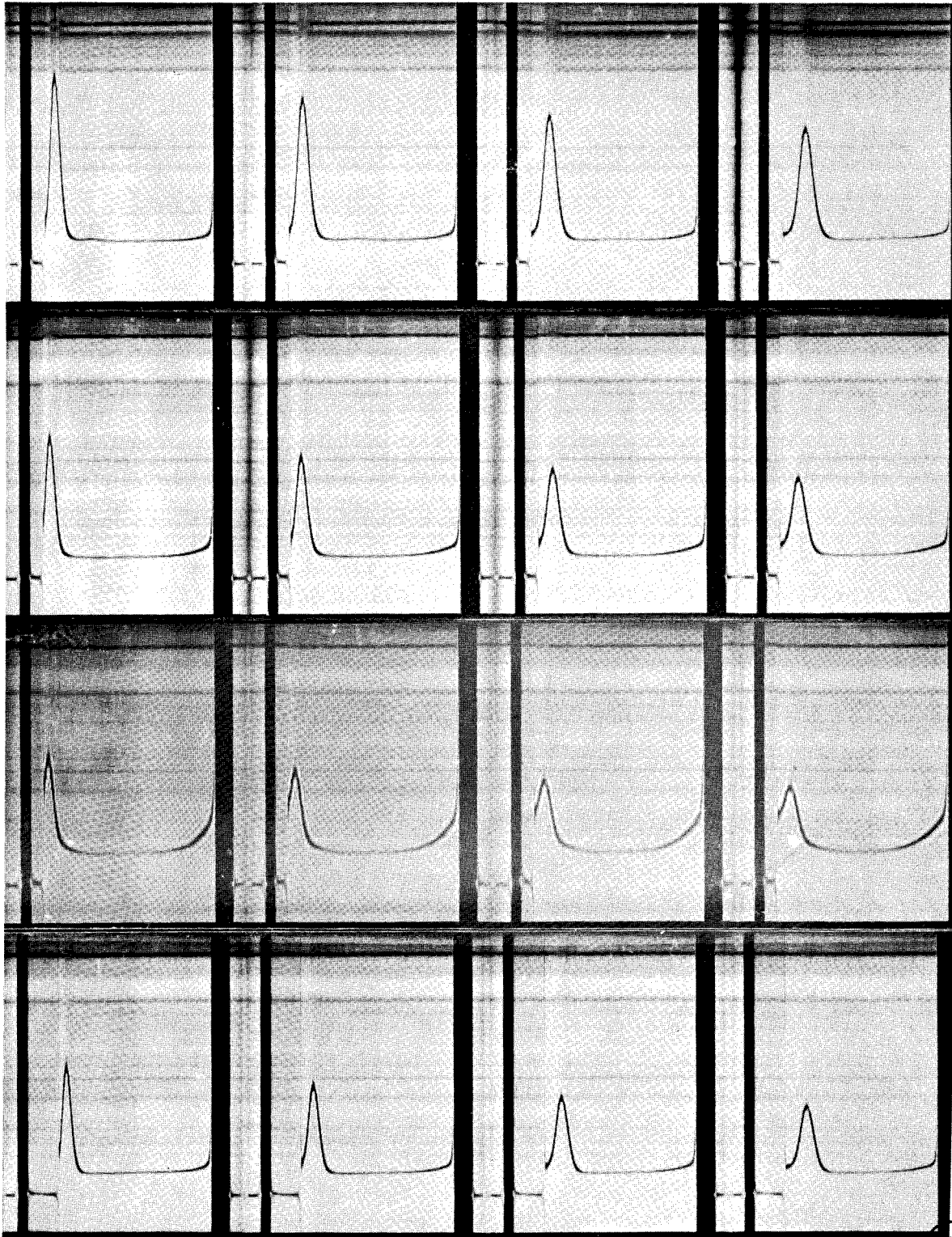


Figure 32 : Diagramme d'ultracentrifugation

Concentration : 15 mg/ml - Tampon phosphate 0,1 M de pH 7 à 20°C.

- 1 - Lactotransferrine "pure" lyophilisée depuis plus d'un mois.
- 2 - Lactotransferrine "à la sortie de colonne" après élution du Sephadex G-100 par le tampon TRIS 0,1 M, NaCl 1 M de pH 8.
- 3 - Lactotransferrine après dialyse de 72 heures contre du tampon phosphate 0,1 M de pH 7.
- 4 - Lactotransferrine après dialyse contre de l'eau distillée et lyophilisation.

305
LILLE

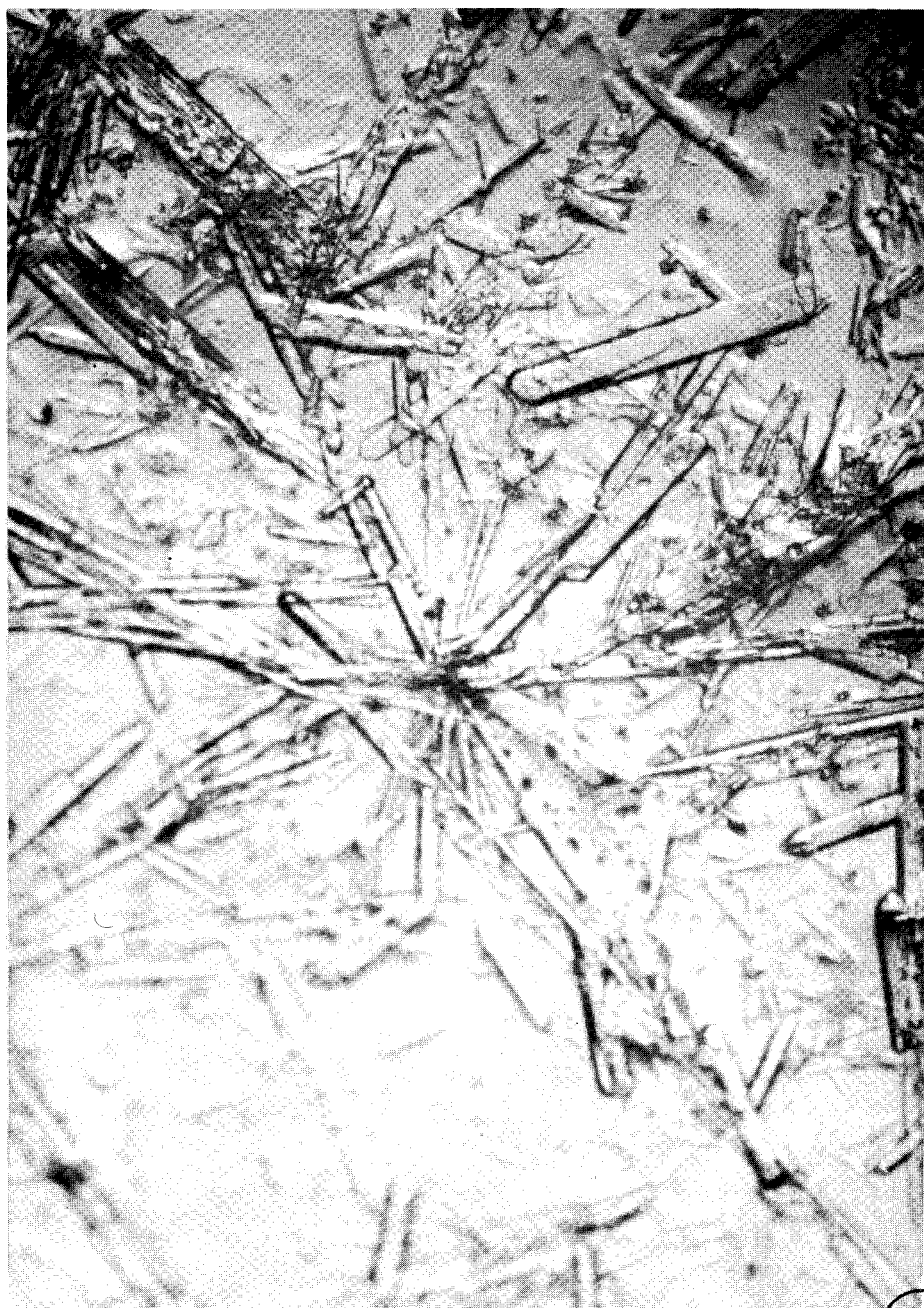
BNS
LILLE

Figure 33 : Cristaux de lactotransferrine observés au microscope optique.

d - Conclusions

Le procédé de chromatographie sur CM-cellulose puis sur Sephadex G-100 des précipités P₈ ou P₇₋₈ (obtenus tous deux à 74 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium pH 7), fournit de la lactotransferrine homogène en électrophorèse de zone sur différents supports, en immuno-électrophorèse et en ultracentrifugation. En outre la lactotransferrine ainsi préparée est cristallisable. Quant au rendement, il peut être considéré comme excellent car nous obtenons entre 1,1 g et 1,25 g de lactotransferrine pure par litre de lait total. Ces valeurs sont supérieures à celles de BLANC et al. (431), 0,6g et sont en accord avec celle de MONTREUIL et coll. (432) qui fixaient la teneur en lactotransferrine entre 1 et 1,5 g par litre de lait maternel.

II - ETUDE DE LA COMPOSITION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

L'étude de la composition chimique et de la structure de la lactotransferrine a été déterminée par SPIK (433) ^(*). Notre contribution s'est bornée à l'étude de la composition glycanique de notre préparation afin de la comparer à celle obtenue par MONTREUIL et al. (434). Les techniques utilisées ont été décrites dans le chapitre 1 (p.63). Toutes les expériences ont été effectuées sur de la lactotransferrine préalablement débarrassée de son fer car celui-ci catalyse de nombreuses destructions de glucides. Nous avons opéré de la manière suivante : une solution à 1 p.100 de lactotransferrine dans l'eau est amenée à un pH légèrement inférieur à 2, de manière à obtenir la décoloration complète de la solution. Celle-ci est alors dialysée sous agitation pendant une nuit à + 4°C - dans un tube de cellophane préalablement lavé à l'eau courante pendant 24 à 48 heures - contre une solution de sel disodique d'EDTA à 1 p.100. Le sel est ensuite éliminé par dialyse contre de l'eau distillée pendant 2 jours. La solution obtenue est lyophilisée.

Nos résultats sont comparés à ceux de MONTREUIL et al. (435) ainsi qu'à ceux de SPIK (436) et de BRAZIER (437) (Tableau XXVI; p.140). Le taux d'oses neutres de notre préparation est nettement inférieur à celui qui a été donné par MONTREUIL et légèrement inférieur à ceux des

(*) En collaboration avec J. BRAZIER et B. DEMORY.

Composition centésimale et molaire (a) en glucides de la lactotransferrine humaine

	Résultats personnels	MONTEJUIL et al. (438)	SPIK (439)	BRAZIER (440)
<u>Composition centésimale</u>				
Oses neutres (b)	3	3,9	3,34	3,24
N-acétyl-D-glucosamine (c)	2,2	2,4	2,43	2,47
Acide N-acétyl-D-neuraminique (d)	1,15	0,87	1,27	1,15
<u>Composition molaire</u>				
D-galactose	5	8	5	-
D-mannose	6	6	5	-
L-fucose	4	4	4	-
N-acétyl-D-glucosamine	8	11	10	-
Acide N-acétyl-D-neuraminique	3	2,5	3	-

(a) Pour une masse moléculaire de 76.000 (b) Méthode à l'orcinol sulfurique
(c) Méthode d'Elson-Morgan modifiée (d) Méthode à la diphenylamine



préparations de SPIK et BRAZIER qui ont été obtenues par la même méthode. Les taux de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique sont sensiblement égaux, ce dernier étant pourtant plus faible dans la préparation de MONTREUIL. La composition centésimale en glucides est donnée pour une masse moléculaire de 76.000. Nos résultats concordent approximativement avec ceux de SPIK et de BRAZIER qui donne pour les oses neutres, la composition molaire suivante : 10 mannose et 7 fucose pour 10 galactose.

III - VARIATIONS DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE ET FORMATION DE COMPLEXES

Différentes observations nous ont conduit à supposer que la lactotransferrine humaine devait former des complexes avec certains constituants du lait maternel.

Les variations de mobilité électrophorétique de la lactotransferrine sont bien connues et se manifestent de manière continue en électrophorèse de zone sur différents supports quand on fait varier la concentration de l'échantillon. La mobilité électrophorétique en milieu alcalin sur gélose, acétate de cellulose et gel d'amidon est inversement proportionnelle à la concentration.

Nous avons remarqué de plus qu'à une concentration donnée, la mobilité électrophorétique semblait quantifiée et pouvait prendre deux valeurs correspondant sans doute à deux états de la lactotransferrine (exemple : P₈ de la figure 19; p.103). Ces deux zones représentent la lactotransferrine car elles sont toutes deux colorées en rose. Elles n'expriment pas de différences de saturation en fer et nous avons pensé qu'elles pouvaient correspondre à des variants génétiques. Cette hypothèse fut infirmée, car la purification des échantillons polymorphes sur CM-cellulose rassemble la quasi-totalité de la lactotransferrine dans un seul pic (pic 5 , fig. 29; p.131), dont le contenu possède une seule zone lente en électrophorèse sur acétate de cellulose. Nous avons donc supposé que la zone rapide correspondait au complexe lactotransferrine-glycopeptides.

La confirmation de cette hypothèse a été apportée par l'expérience inverse qui a consisté à ajouter à un échantillon de lactotransferrine pure et donnant une seule zone lente en

électrophorèse sur acétate de cellulose, des quantités croissantes de glycopeptides obtenus à partir du précipité P_{10} du fractionnement par le sulfate d'ammonium. Nous avons obtenu immédiatement deux zones avec une concentration en glycopeptides de 1 p.100 dans le mélange, puis une intensification progressive de la zone rapide à mesure que la concentration en glycopeptides augmentait. Avec 30 p.100 de glycopeptides dans le mélange toute la lactotransferrine se trouve sous forme de mobilité rapide et identique à celle d'un échantillon de lactotransferrine préparée par chromatographie de gel-filtration directe du lactosérum sur Sephadex G-150 (Figure 34 ; p.143). Elle correspond également à la zone de lactotransferrine sur l'électrophorégramme du lactosérum humain. Cette zone rapide a été isolée à partir du précipité P_9 du fractionnement de base, par filtration sur gel de Sephadex G-100 et purification par électrophorèse préparative sur papier. La composition centésimale et molaire en glucides de cette fraction montre qu'elle correspond approximativement à un mélange théorique de 47 p.100 de lactotransferrine pure et de 53 p.100 de glycopeptides (Tableau XXVII; p. 144). Ce mélange contient plus de glycopeptides que ce qui est nécessaire pour faire passer toute la lactotransferrine purifiée sous forme "rapide" et la lactotransferrine qu'il contient serait donc sursaturée en glycopeptides.

Les solvants de force ionique élevée ne provoquent pas de dissociation sensible du complexe, en particulier la filtration sur gel de Sephadex G-100 en présence de tampon TRIS 0,1 M - NaCl 1 M ne produit pas de dissociation. Par contre, la **fixation** de la lactotransferrine sur la CM-cellulose semble se faire au dépens des liaisons lactotransferrine-glycopeptides puisque cette fixation provoque la libération des glycopeptides, non retenus sur cet échangeur d'ions, ainsi d'ailleurs qu'une très faible partie du complexe non dissocié. Il semble donc que les forces mises en jeu soient de nature électrostatique.

En conclusion, il apparaît que la lactotransferrine se trouve dans le lait maternel sous forme complexée à des glycopeptides, ce qui explique que la mobilité électrophorétique de la forme native soit différente de celle de la forme pure.

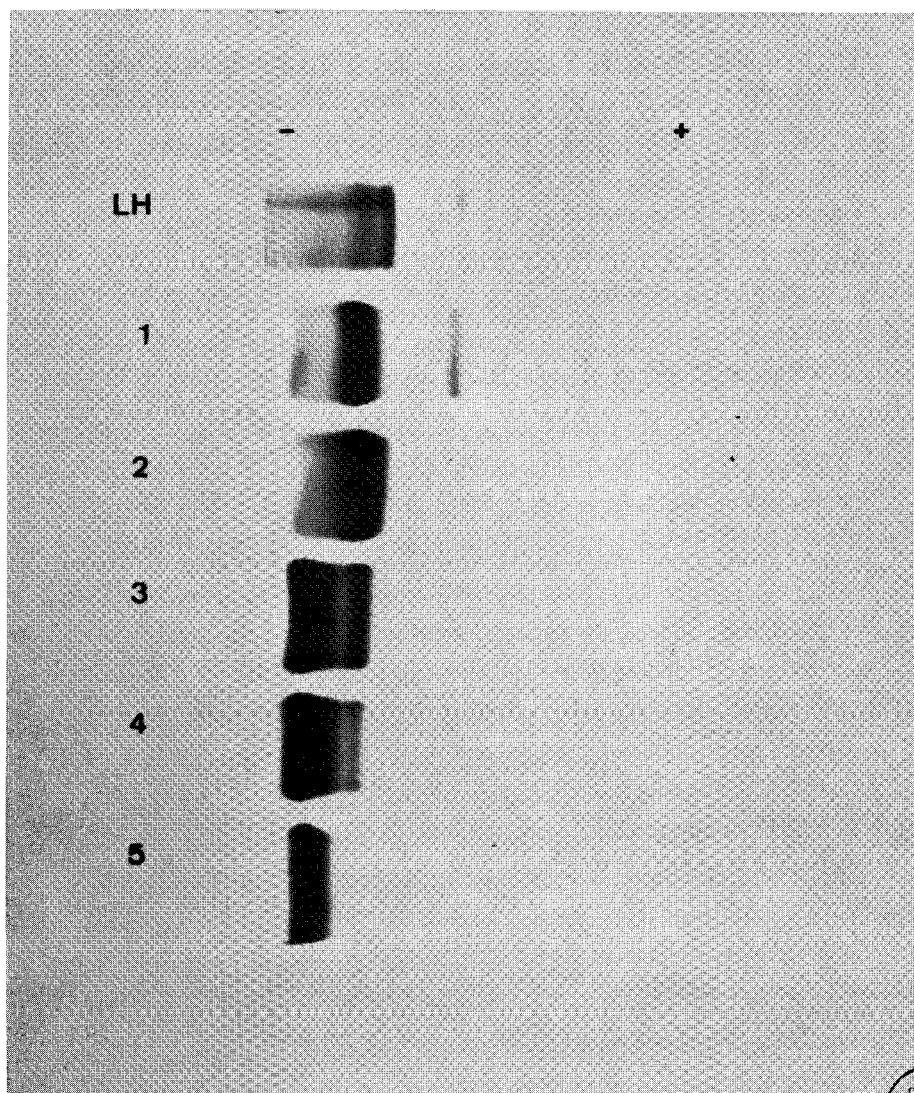


Figure 34 : Différents comportements électrophorétiques de la lactotransferrine.

- 1 - Lactotransferrine isolée par gel-filtration directe du lactosérum.
- 2 - Lactotransferrine pure et 30 p.100 de glycoprotéides du P₁₀.
- 3 - Lactotransferrine pure et 20 p.100 de glycoprotéides du P₁₀.
- 4 - Lactotransferrine pure et 1 p.100 de glycoprotéides du P₁₀.
- 5 - Lactotransferrine pure.

Composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine pure, des glycopeptides, de la lactotransferrine rapide et du mélange théorique lactotransferrine-glycopeptides ayant le même taux d'oses neutres que la lactotransferrine rapide.

	Proportion du mélange	Oses neutres	ANAN	GlcNac	GalNac	$\frac{\text{GlcNac}}{\text{GalNac}}$	Rapports molaires		
							Gal	Man	Fuc
Lactotransferrine pure		3	1,15	2,2	0	-	10	12	8
Lactotransferrine "zone rapide"		19,8	5,7	11,3	3,74	3	10	0,6	5
Lactotransferrine "mélange théorique"	48p.100 LTF 52p.100 glycopeptides	19,8	5,5	10,55	3,4	3,1	10	0,4	3
Glycopeptides		35,6	9,5	18,3	6,55	2,8	10	0	2,8



IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

De nombreuses méthodes de préparation de la lactotransferrine humaine à partir du lait maternel ont été proposées.

Les premiers procédés de MONTREUIL et al. (441) et de JOHANSSON (442), comme plus tard celui de MASSON et HEREMANS (443), utilisaient comme premier stade d'enrichissement un fractionnement du lait par le sulfate d'ammonium. Le stade suivant de chromatographie sur échangeurs d'ions mettait en jeu une résine carboxylique pour le premier, la DEAE-cellulose et l'hydroxy-apatite pour le second, la DEAE-cellulose seule pour le troisième. Nous avons prouvé que la DEAE-cellulose avait un rôle dénaturant sur la lactotransferrine. C'est pourtant le même échangeur d'ions qu'utilisèrent BLANC et ISLIKER (444) pour purifier un précipité enrichi en lactotransferrine et obtenu par le rivanol. Notre procédé s'apparente à celui de GOT (445).

Après un premier découpage commun par le sulfate d'ammonium, GOT purifie incomplètement le précipité obtenu à 66 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium, pH 4, par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G-200. Nous avons préféré chromatographier le précipité homologue, obtenu dans des conditions voisines (74 p.100 de saturation, pH 7) sur CM-cellulose qui décomplexe la lactotransferrine des glycopeptides, permet de traiter des quantités très importantes avec un rendement excellent et fournit des préparations très pures qui peuvent le plus souvent être utilisées directement. Une ultime purification sur Sephadex G-100 est cependant parfois nécessaire.

La méthode de préparation de JOHANSSON (446), séduisante par sa rapidité, ne semble pas donner les mêmes qualités de pureté ; la lactotransferrine qu'elle fournit est, en effet, souillée de lysozyme.

Nous avons également apporté quelques précisions sur les variations de mobilité électrophorétique de la lactotransferrine du lait maternel, et montré, qu'à une concentration donnée, elle pouvait se présenter sous deux formes de mobilités différentes, dont la plus rapide correspond à celle de la lactotransferrine "native". Il semble que la forme "rapide" représente le protéide combiné à des glycopeptides, puisque l'addition de ceux-ci à la lactotransferrine pure l'amène progressivement sous cette forme, qui, isolée par ailleurs du précipité P₉, est effectivement très riche en glucides. Ce poly-

morphisme a également été signalé par différents auteurs. SCHADE et al. (447) ont montré que la lactotransferrine se présente sous forme associée, tandis que MASSON (448) remarquait la différence de mobilité entre les lactotransferrines purifiées et natives et suggérait que cette dernière pouvait être un complexe avec la caséine. Plus récemment, MALMQUIST et JOHANSSON (449) mirent en évidence les interactions entre la lactotransferrine et des composés solubles de l'agarose ainsi qu'avec le bleu trypan. D'autre part, HEKMAN et al. (450) montraient des différences de mobilité électrophorétique entre des lactotransferrines humaines de différentes origines, ainsi que l'augmentation de la vitesse électrophorétique de la lactotransferrine du lait maternel en présence de caséine, d' α -lactalbumine et de sérum-albumine, cette dernière formant un complexe avec la lactotransferrine. Puisqu'il s'avère que la lactotransferrine n'est pas liée à l'albumine dans le lait humain, si ce n'est dans d'infimes proportions, comme nous l'avons montré dans le précipité P₆ (chapitre 2), nous pensons avoir apporté quelques preuves en faveur de la nature glycopeptidique des composés associés. Ces complexes pourraient jouer un rôle physiologique en augmentant la résistance de la lactotransferrine aux enzymes protéolytiques de l'intestin de l'enfant. Une telle résistance est importante puisqu'il semble maintenant acquis que le rôle de la lactotransferrine du lait ne consiste pas à apporter du fer à la sécrétion et à l'enfant, mais plutôt à protéger l'intestin en association avec les anticorps.

Nous verrons plus loin que les IgA forment également des complexes avec les glycopeptides.

3. - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ET ISOLEMENT DE L' α ₁-ANTITRYPSINE SERIQUE

Les recherches que nous avons effectuées sur les glycopeptides du lait maternel sont le prolongement des travaux de MONTREUIL et HOLLEMAN (451) qui isolèrent, en associant les fractionnements par l'éthanol et par le sulfate d'ammonium, une fraction glycoprotéidique dont la copule glucidique dépourvue de mannose s'apparente au "gynolactose" de POLONOVSKI et LESPAGNOL. Cette fraction fut "retrouvée"

par MONTREUIL et coll., au cours des travaux de purification de la lactotransferrine et nous en avons entrepris l'étude. Elle peut être également obtenue, à partir du précipité P₁₀ du fractionnement par le sulfate d'ammonium, par un procédé qui permet de l'isoler d'une fraction peptidique et de l' α_1 -antitrypsine sérique.

Nous envisagerons successivement : l'étude des composés glycopeptidiques, puis l'isolement et la caractérisation de l' α_1 -antitrypsine sérique.

I - ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE

A - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE PREALABLE

La purification du précipité P₇ du fractionnement original de MONTREUIL et coll. par chromatographie sur Amberlite XE-64 fournit 1 pic I avec le tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,2 (Figure 26 ; p. 120). Les constituants de ce pic I furent appelés par MONTREUIL et coll. : gynolactomucoïde I, le gynolactomucoïde II étant la lactotransferrine. Ils possèdent les caractéristiques suivantes :

- 1) Ils ne sont pas antigéniques.
- 2) Ils contiennent une proportion élevée de glucides

- Oses "neutres"	25 à 30 p.100
- Osamines	20 à 22 p.100
- Acide N-acétylneuraminique	6 à 10 p.100
- 3) Ils sont riches en fucose et ne contiennent pas de mannose. La composition molaire globale est en effet la suivante :

- Galactose	4
- Fucose	2
- Galactosamine	1
- Glucosamine	3
- Acide N-acétylneuraminique	1
- 4) Ils sont homogènes à l'ultracentrifugation^(*). En effet, pour trois dilutions différentes un seul pic apparaît. Les valeurs de

(*) Les déterminations des constantes de sédimentation ont été effectuées par M. le Professeur TONNELAT, M. M. MONSIGNY et par Mlle A. BARNEOUD. Nous leur adressons nos vifs remerciements.

S_{20w} sont les suivantes : (en tampon phosphate de pH 6,9 et de force ionique 0,1)

- 3,3 mg /ml	S_{20w} : 2,04
- 6,6 mg /ml	S_{20w} : 1,98
- 10 mg /ml	S_{20w} : 1,73

Le calcul de S_{20w} par extrapolation à une dilution infinie donne une valeur de $2,3S \pm 0,2$.

5) Cette homogénéité n'est qu'apparente car le "pic I" est hétérogène en électrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose et en gélose : dans les trois cas, il fournit trois bandes (Figure 35 ; p. 149). L'une, majeure, en position de β_2 , est Amidoschwarz négative et P.A.S. positive ; la seconde, en position d' α_1 -globuline et la troisième en position de préalbumine, sont Amidoschwarz et P.A.S. positives.

B - FRACTIONNEMENT DU "PIC I"

1 - Fractionnement chromatographique

Nous avons tenté de fractionner les constituants du "pic 1" par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex et par chromatographie sur échangeurs d'ions.

a - Chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex

Nous avons réalisé des filtrations sur colonnes de gels de Sephadex G-25, G-50 et G-75, sans parvenir à aucune séparation satisfaisante. Ce résultat confirme les données de l'ultracentrifugation qui révèle l'existence d'un seul pic. Les constituants glycopeptidiques du "pic 1" possèdent donc des masses moléculaires très voisines ; cette homogénéité contraste avec l'hétérogénéité chimique que nous verrons plus loin.

b - Chromatographie sur celluloses modifiées

La DEAE-cellulose fixe très énergiquement les glycopeptides qui sont ensuite difficilement élués. On obtient une dizaine de pics

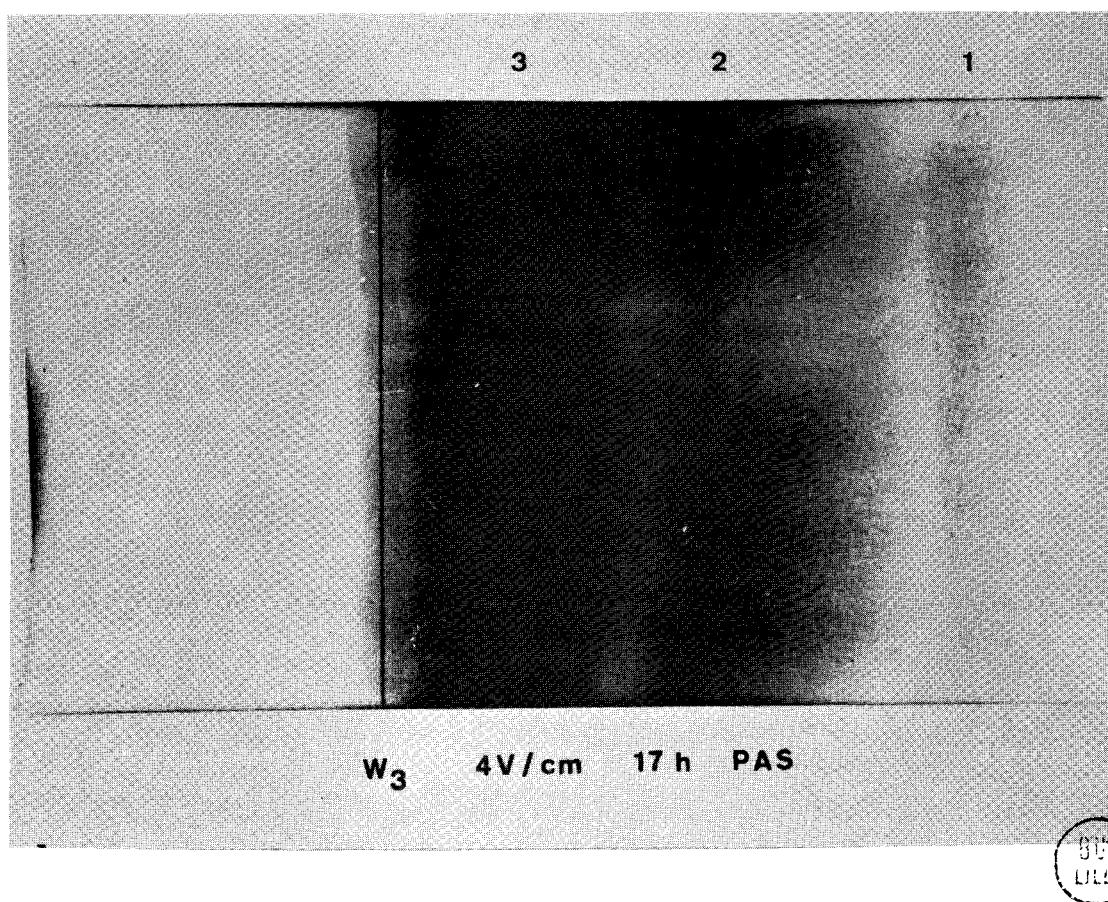


Figure 35 : Electrophorèse préparative sur papier des glycopeptides du "pic 1".

suivant les gradients d'éluion et la rechromatographie de ces pics, dans les mêmes conditions, provoque un nouveau découpage, ce qui prouve que l'on n'isole pas d'entités bien définies par cette méthode.

La chromatographie sur SE-cellulose avec différents gradients d'éluion ne nous a fourni qu'une ébauche de séparation en 2 fractions.

2 - Fractionnement par électrophorèse sur papier

Nous avons dans un second temps utilisé à des fins préparatives, l'électrophorèse sur papier qui nous avait donné, rappelons le, une ébauche de séparation.

a - Mode opératoire

20 mg de protéides sont déposés sur une bande de papier Arches 304 de 12 cm de largeur et soumis à l'électrophorèse horizontale, en tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,1, pendant 17 heures, à 4 V/cm.

Après révélation de bandes latérales par la méthode à l'acide périodique-Schiff, les glycoprotéides sont élués par de l'eau. Les éluats sont lyophilisés, puis désalés sur colonne de Sephadex G-25 dont l'effluent est analysé en U.V. et par le réactif au phénol sulfurique. Le véronal qui absorbe l'U.V. à 280 nm et les glycopeptides sont ainsi repérés.

b - Résultats

La composition centésimale en glucides des fractions électrophorétiques est précisée dans le tableau XXVIII (p. 151). Les résultats de cette analyse confirment le comportement électrophorétique qui semble lié à la teneur en acide sialique des fractions. On constate, en effet, que le rapport oses neutres/acide N-acétyl neuraminique augmente régulièrement de la fraction 1 à la fraction 3, c'est-à-dire, de la fraction la plus anodique à la fraction la plus cathodique. La fraction 1 contient nettement moins de glucides que les fractions 2 et 3 dont les compositions glucidiques sont très voisines.

3 - Fractionnement par électrophorèse préparative en veine liquide (⊛)

(⊛) Ce travail a été effectué en collaboration avec L. GRIMMONPREZ (452) qui a repris nos travaux et poussé plus loin l'étude de la composition en glucides des fractions. Nous lui empruntons cette étude.

T A B L E A U XXVIII

Composition centésimale des fractions obtenues par électrophorèse préparative sur papier des glycopeptides du "pic 1".

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Oses neutres totaux	17,1	27,3	27,7
N-acétylosamines totales	12,5	27,6	30
Acide N-acétylneuraminique	7,1	9,2	7,9
<u> Oses neutres</u>	2,4	3	3,5
Acide N-acétyl neuraminique			
<u> Oses neutres</u>	1,37	0,99	0,92
N-acétylosamines			



Nous avons tenté d'améliorer le fractionnement des constituants du "pic 1" en utilisant l'électrophorèse préparative dans l'appareil ELPHOR VAP (⊗).

a - Mode opératoire

300 mg de protéides totaux sont soumis à l'électrophorèse préparative en tampon TRIS-citrate de pH 8,63 sous une tension de 2.400 volts. La solution de protéides à 2 p.100 (F/V) est injectée avec un débit de 1,8 ml/heure. La densité optique à 280 nm et la teneur en oses totaux (dosage par l'orcinol sulfurique) ont été déterminés pour chacune des 48 fractions. Sept fractions ont été arbitrairement constituées suivant le découpage représenté sur la figure 36; p. 153. Ces fractions ont été lyophilisées et le résidu sec obtenu a été repris par l'eau puis précipité par 10 volumes d'alcool. L'opération a été renouvelée deux fois afin d'éliminer complètement les sels du tampon.

b - Résultats

Les résultats de l'électrophorèse préparative sont illustrés par la figure 36 (p. 153). On obtient deux pics, l'un, régulier, est orcinol et U.V. positif ; l'autre, est seulement orcinol positif et présente des irrégularités de tracé qui révèlent son hétérogénéité. La composition centésimale et molaire en glucides des sept fractions a été effectuée et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIX (p. 154). Nous les résumerons de la manière suivante :

1) Toutes les fractions obtenues ont comme point commun de posséder une teneur élevée en glucides (de 37 à 57 p.100) et d'être constituées de galactose, de fucose, de glucosamine, de galactosamine et d'acide N-acétyl neuraminique.

2) Les proportions relatives des oses sont différentes suivant les fractions. On observe, d'ailleurs, une variation "continue" de la composition en oses, en étroite relation avec le comportement électrophorétique des fractions : les proportions de fucose et d'acide sialique décroissent régulièrement, par rapport au galactose, au fur et à mesure que l'on s'éloigne, vers la cathode, de la fraction la plus anodique.

(⊗) Les séparations électrophorétiques en veine liquide ont été réalisées par M. MOSCHETTO (Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de médecine de LILLE) à qui nous adressons nos vifs remerciements.

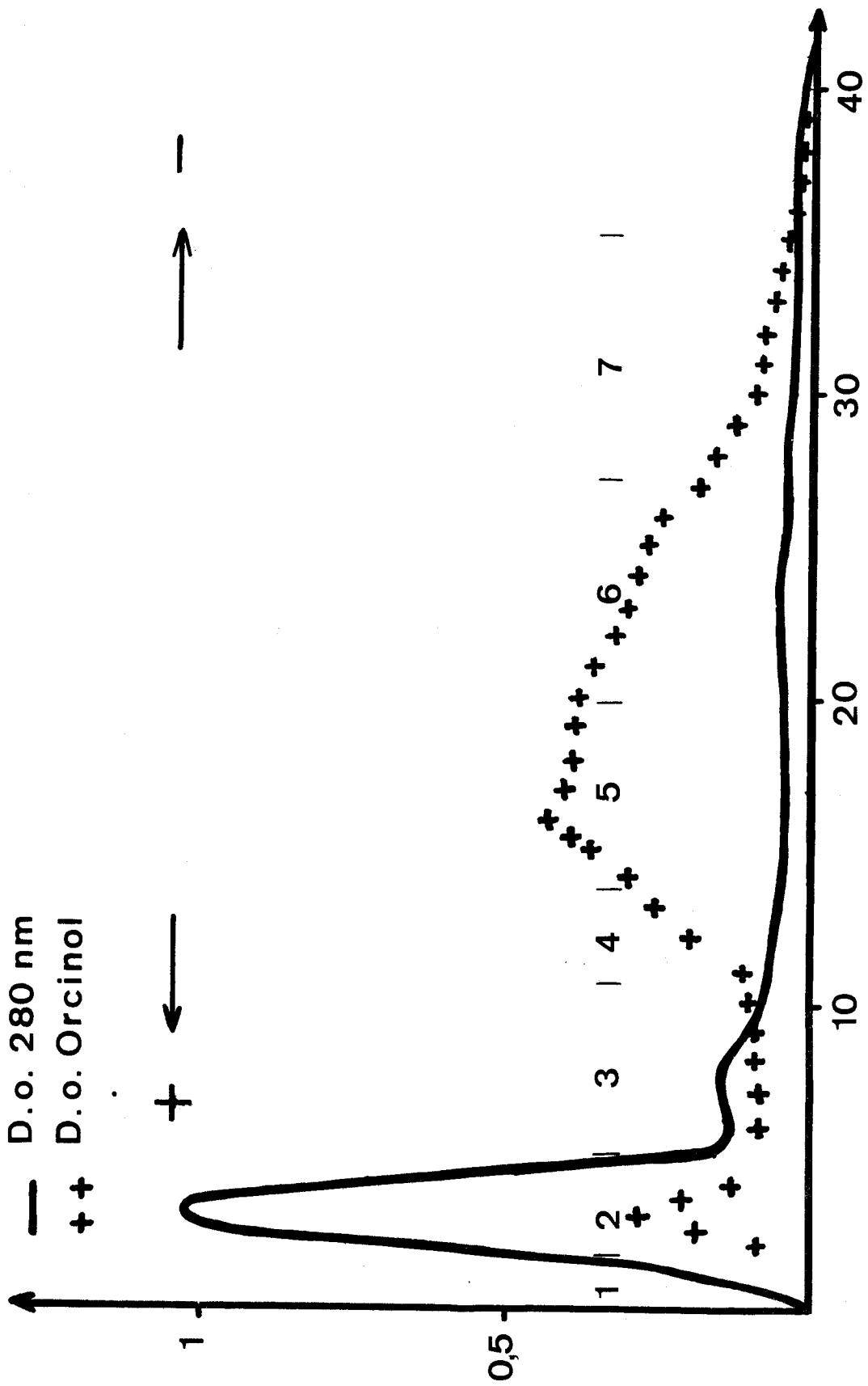


Figure 36 ; Electrophorèse préparative en veine liquide des glycopeptides du "pic 1".



T A B L E A U XXIX

Composition en glucides des fractions de lacto-fucoïdes isolées par électrophorèse préparative à partir du "pic 1" obtenu par chromatographie sur Amberlite XE-64 du précipité P₇^(*) (d'après L. GRIMMONPREZ) (453)

	SCUS-FRACTIONS					
	2	3	4	5	6	7
RENDEMENTS (p.100)	6	12	15	33	12	3
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>						
Oses (galactose+ fucose)p.100	17,2	-	26,5	25,3	24,3	27
Galactose	12	-	21,7	22,5	21,8	-
Fucose	5,2	-	4,8	2,8	2,5	-
Osamines (p.100)	12,6	-	20,3	21,9	-	-
soit N-acétylosamines p.100	15,4	-	24,8	26,7	-	-
Acide N-acétyl neuraminique (ANAN) p.100	4,08	-	6,13	5,16	4	4
Oses/ANAN	4	-	4,4	4,6	6	6,75
Oses/Osamines	1,37	-	1,3	1,15	-	-
Oses + N-acétylosamines/ANAN	8	-	8	10	-	-
<u>RAPPORTS MOLAIRES</u>						
1 - <u>Des oses</u>						
Galactose	2	2,5	4	5	7	-
Fucose	1	1	1	1	1	-
2 - <u>Des osamines</u>						
Glucosamine	4	2	2	2	2	-
Galactosamine	1	1	1	1	1	-



(*) Voir la figure 1 (p. 57).

3) Ces résultats révèlent la grande complexité du "pic 1". Il s'agit, en réalité, d'une famille groupant de nombreuses entités de composition chimique voisine. Le comportement de ces composés en électrophorèse en veine liquide nous permet déjà de distinguer deux groupes :

α - Le premier, correspondant au pic anodique, est caractérisé : par une teneur relativement faible en glucides (37 p.100), par un taux important d'acide sialique et par une proportion élevée de fucose, par rapport au galactose, et de glucosamine, par rapport à la galactosamine.

β - Le second groupe, le plus important, correspond au pic cathodique et aux fractions 4 à 7 (Figure 36 ; p.153). Il est caractérisé par sa richesse en glucides, par une proportion faible de fucose et d'acide sialique par rapport au galactose et par une teneur plus élevée en galactosamine.

La composition en acides aminés (Tableau XXX; p. 156) montre que ce groupe de glycopeptides est caractérisé par sa richesse en hydroxy-aminoacides, en acides aminés dicarboxyliques, ainsi qu'en proline. Par contre, ils ne renferment que peu d'acides aminés basiques et aromatiques ce qui explique qu'ils n'absorbent pas la lumière ultraviolette à 280 nm.

C - ACTION DE LA SOUDE SUR LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE MAJEURE

La richesse de cette fraction en hydroxy-aminoacides et en galactosamine laissait présager la présence de liaisons C-glycosidiques entre les copules glycaniques et protidiques des glycopeptides qui la constitue. L'action de la soude diluée permet de détecter ce type de liaison (TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN (454)). Nous avons fait agir la soude en présence de borohydrure de sodium sur les glycopeptides dans les conditions identiques à celles qui ont été employées pour les glycopeptides pronasiques provenant des IgA (chapitre IV; p. 195). Le tableau XXXI, (p. 157) montre la composition en acides aminés et en osamines avant et après action de la soude. Les résultats sont exprimés en micromoles d'acides aminés par milligramme de glycopeptides car nous avons opéré sur un mélange de glycopeptides de masses moléculaires non déterminées.

T A B L E A U X X X

Composition en acides aminés de la fraction glycopeptidique majeure
isolée par électrophorèse préparative.

Acides aminés	g p.100 g de la copule peptidique	résidus p.100 résidus d'acides aminés
Aspartique	14,7	13,5
Glutamique	14,9	12,2
Alanine	5,1	7,7
Glycocolle	0,8	1,8
Isoleucine	6	5,4
Leucine	2,1	2,2
Sérine	7,7	9
Thréonine	14	14,9
Valine	7,5	7,7
Cystéine	1,6	0,8
Proline	14,2	15,4
Phénylalanine	2,5	2,1
Tyrosine	1	0,8
Arginine	3,3	2,7
Histidine	2,5	2,1
Lysine	2,1	1,7

T A B L E A U XXXI

Action de la soude sur les glycopeptides^(*)

Acides aminés	Avant action de la soude	Après action de la soude
Ac. aspartique	0,30	0,32
Ac. glutamique	0,28	0,30
Alanine	0,18	0,25
Glycocolle	0,04	0,04
Isoleucine	0,12	0,12
Leucine	0,05	0,04
<u>Sérine</u>	0,21	0,15
<u>Thréonine</u>	0,34	0,28
Valine	0,17	0,18
Cystéine	0,02	0,02
Proline	0,34	0,35
Phénylalanine	0,05	0,05
Tyrosine	0,02	0,02
Arginine	0,06	0,05
Histidine	0,05	0,05
Lysine	0,04	0,03
Glucosamine	0,90	0,92
<u>Galactosamine</u>	0,32	0,22

(*) Résultats exprimés en micromoles par mg de glycopeptides.



On constate que 0,06 micromoles de sérine et de thréonine 0,10 micromoles de galactosamine disparaissent et que parallèlement apparaissent 0,07 micromoles d'alanine provenant de la réduction de la déhydro-sérine. Nous avons également caractérisé de l'acide α -amino-butérique, issu de la réduction de la déhydrothréonine et du galactosaminitol, ayant pour origine la galactosamine impliquée dans la liaison.

Environ 25 p.100 du matériel glycanique présent dans les glycopeptides se trouvent libérés par la soude qui ne coupe pas de manière quantitative les liaisons O-glycosidiques surtout lorsque la copule protidique est importante. Cependant, il n'est pas exclu que certains glycopeptides possèdent également un autre type de liaison glycane-protide.

D - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces résultats témoignent de la grande hétérogénéité des glycopeptides du lait de Femme. Cette hétérogénéité était déjà apparue à GOT, FONT, BOURRILLON et CORNILLOT (455) qui ont obtenu plusieurs fractions glycopeptidiques, riches en glucides et constituées dans des proportions variables de galactose, glucose, fucose, glucosamine, galactosamine et acide N-acétylneuraminique.

En dépit de ces difficultés, MONTREUIL et HOLLEMAN (456), puis GOT, FONT et MARNAY (457) isolèrent des entités dont ils décrivent les principales propriétés chimiques et physiques.

De même plus récemment, HIRANO, HAYASHI, MASUDA et ONCERA (458) isolèrent des glycopeptides dont ils donnèrent quelques propriétés physico-chimiques (HIRANO et al.)(459) que nous avons rappelées page 51. Bien que n'ayant jamais trouvé de glucose dans nos glycopeptides, ceux-ci s'apparentent étroitement aux substances caractérisées par GOT et coll. et HIRANO et coll. Les compositions glucidiques données par ces auteurs et celles des fractions obtenues par électrophorèse libre montrent que l'on se trouve vraisemblablement devant une famille de composés dont les caractéristiques sont fuyantes mais qui possèdent un certain nombre de points communs : riches en glucides - 60 à 90 p.100 - ils ne renferment pas de mannose et ont une teneur élevée en galactosamine. Si ces substances n'ont pas de relation avec

les polysaccharides libres, comme on l'avait cru tout d'abord, elles peuvent, au contraire, être rapprochées de la caséine et en particulier du caséinoglycomacropeptide provenant de l'hydrolyse par la présure de la κ -caséine. La comparaison des compositions glucidiques d'un mélange de glycopeptides du lait et du caséinoglycomacropeptide isolé de la caséine totale par MALPRESS et al. (Tableau XXXII; p.160)(460) montre qu'une parenté semble exister entre ces substances. Les taux d'acide N-acétylneuraminique sont divergents mais les méthodes de dosage utilisées ne sont pas les mêmes. En outre, les glycopeptides du lait renferment environ 0,2 p.100 de phosphore, soit la moitié de ce que contient la caséine totale.

Une relation identique a été mise en évidence dans le lait de Vache par BEZKOROVAINY et al. (461) entre le glycoprotéide M_1 et la caséine qui possèdent tous deux des groupements glycaniques semblables liés O-glycosidiquement. Il n'a pas été démontré que le composé de la caséine apparenté au glycoprotéide M_1 faisait partie intégrante du complexe caséine et qu'il n'était pas du glycoprotéide M_1 adsorbé sur la caséine. Il existe néanmoins une parenté évidente entre les glycanes du glycoprotéide M_1 et ceux de la caséine κ de Vache.

Enfin, à la notion purement formelle d'une parenté métabolique entre les glycopeptides et la caséine, nous pouvons ajouter une parenté d'essence fonctionnelle entre ces glycopeptides et la lactotransferrine, d'une part, les IgA d'autre part. Les glycopeptides forment en effet des complexes avec différents glycoprotéides et bien que cela n'ait pas été démontré, on peut supposer que de telles associations aient une influence sur les substances biologiquement actives que sont les IgA et la lactotransferrine.

II - ISOLEMENT DE L' α_1 -ANTITRYPSINE SÉRIQUE

La filtration sur gel de Sephadex G-50 du précipité P_{10} , (Figure 2; p.59) nous a fourni une fraction glycopeptidique dont la composition est très voisine de celle qui fut obtenue par MONTREUIL et al. (462) sur Amberlite XE-64 et qui est contaminée par un glycoprotéide de mobilité α_1 révélé à la fois par les immunosérums anti-protéides sériques et lactés. Nous avons pu identifier ce glycoprotéide

T A B L E A U XXXII

Composition centésimale en glucides des glycopeptides et du caséino-glycomacropéptide selon MALPRESS et al. (463).

	Glycopeptides du lait	Caséino-glyco- macropéptide
Galactose	28,5	25,6
Fucose	7,1	5,8
<u>Galactose</u> Fucose	3,6	4,4
GlcNAc	18,3	16,2
GalNAc	6,55	8,1
<u>GlcNAc</u> <u>GalNAc</u>	2,8	2
ANAN	9,4	4,5
<u>Ose neutres</u> ANAN	3,74	7

à l' α_1 -antitrypsine sérique, à l'aide d'un immunosérum spécifique et nous avons tenté de l'isoler.

A - MATERIEL ET METHODES

Pour cela nous avons utilisé la chromatographie sur SE-Sephadex du pic 1 obtenu par passage du précipité P₁₀ sur G-50. Le SE-Sephadex, équilibré dans un tampon acétate de sodium 0,01 M de pH 3,6 est déposé dans une colonne de 2 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur. 500 mg du pic 1 sont chromatographiés. L'élution est réalisée par un gradient discontinu en tampon acétate de sodium de concentration croissante : 0,01 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M et 0,6 M et de pH constant : 3,6, puis finalement par un tampon acétate de sodium 0,6 M de pH 8,5. Un autre système d'élution a été utilisé : après le passage des tampons acétate de sodium 0,1 M et 0,6 M de pH 3,6, on réalise un gradient continu (mélangeur : une éprouvette de 500 ml contenant 400 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 3,6 ; réservoir : un Erlenmeyer d'un litre rempli de tampon acétate de sodium 1 M, pH 8,5).

B - RESULTATS

Tout le matériel chromatographié se retrouve dans quatre pics. Le premier élué par le premier tampon représente 90 p.100 de l'ensemble et est constitué du mélange des glycopeptides que nous avons étudié dans le paragraphe précédent. L'utilisation au départ d'un tampon de force ionique inférieure ne nous a pas permis d'obtenir un fractionnement de ces glycopeptides. Le second, très peu important, renferme également des glycopeptides. Les tampons de molarité 0,1 à 0,6 M en acétate de sodium, pH 3,6 n'éluent aucun protide.

L' α_1 -antitrypsine sérique est éluee par le tampon acétate de sodium 0,6 M de pH 8,5 en un pic (Pic 3) flanqué d'un autre pic un peu plus important (Pic 4). Une séparation complète de ces deux derniers pics est réalisée par le gradient continu (Figure 37; p. 162).

L' α_1 -antitrypsine obtenue, qui est révélée par l'immunosérum

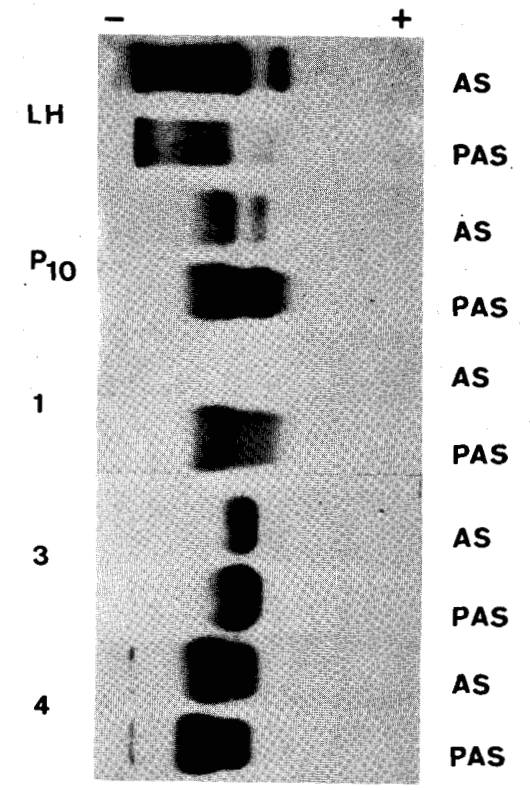
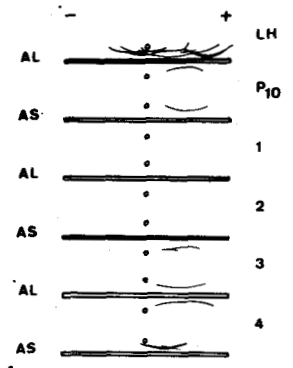
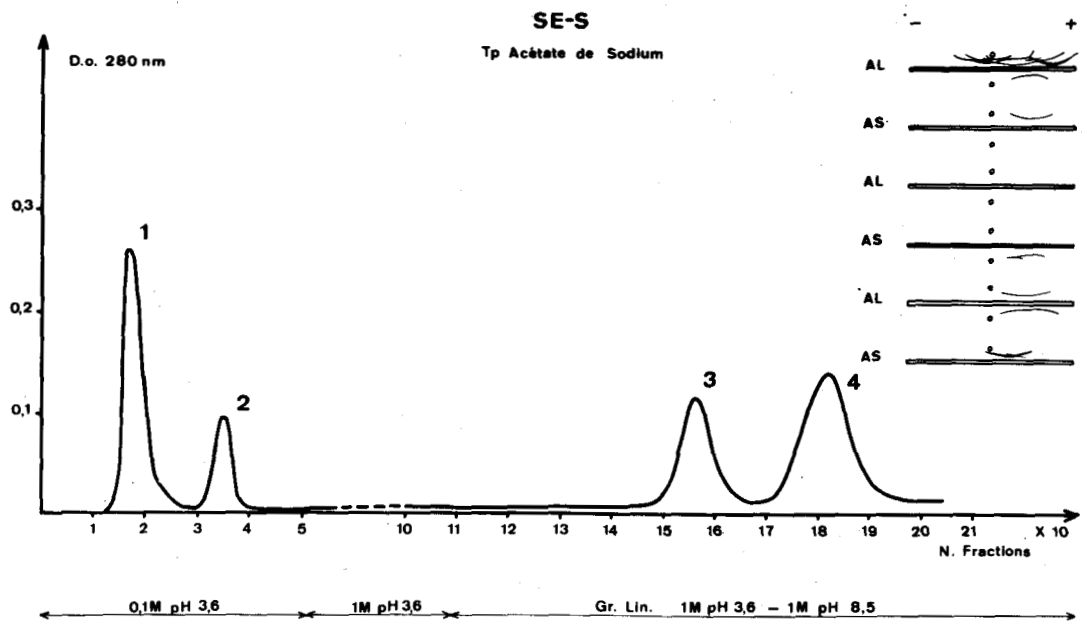


Figure 37 : Fractionnement du mélange glycopeptides- α_1 -antitrypsine sérique - composé sérique X sur SE-Sephadex. Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone sur acétate de cellulose des fractions obtenues, (Révélation par l'Amidoschwarz et le P.A.S.).



spécifique de ce glycoprotéide (Figure 38 ; p.164) n'est cependant pas absolument pure comme en témoigne l'immuno-électrophorèse réalisée avec l'antisérum antiprotéides sériques (Figure 37 ; p.162). Le constituant sérique α_2 , fortement P.A.S. positif (Figure 37 ; p.162) qui contamine l' α_1 -antitrypsine éluée dans le pic 3 est aussi le constituant majeur du pic 4 ; il n'a pas été identifié. De par ces différentes caractéristiques : précipitabilité par le sulfate d'ammonium, mobilité électrophorétique, haute teneur en glucides, ce glycoprotéide pourrait être l'hémopexine.

C - CONCLUSIONS

La présence d' α_1 -antitrypsine sérique dans le lait maternel a été montrée pour la première fois par HANSON (464). Nous avons réussi à l'isoler à partir du précipité P_{10} , mais le précipité P_9 en renferme une quantité égale. On peut évaluer le taux d' α_1 -antitrypsine du lait à 30 à 50 mg par litre ce qui est infime par rapport au taux de ce protéide dans le sérum (200 à 500 mg pour 100 ml).

De ce fait, il paraît douteux que l' α_1 -antitrypsine sérique puisse jouer un rôle important dans le lait de Femme où sa présence semble être le résultat d'une simple transudation au niveau de la glande mammaire.

4. - ETUDE DES IgA

Nos travaux prolongent ceux de MONTREUIL et coll (465) qui ont isolé pour la première fois les IgA du lait maternel, par relargage au sulfate d'ammonium et chromatographie sur échangeur d'ions. Nous avons conservé le principe d'une préparation en deux étapes et la première n'a été que légèrement modifiée. Nos efforts ont porté sur la recherche d'une amélioration de la seconde.

Nous nous sommes d'abord intéressé à la chromatographie d'échange d'ions qui, comme le relargage par le sulfate d'ammonium, permet le traitement rapide de quantités élevées.

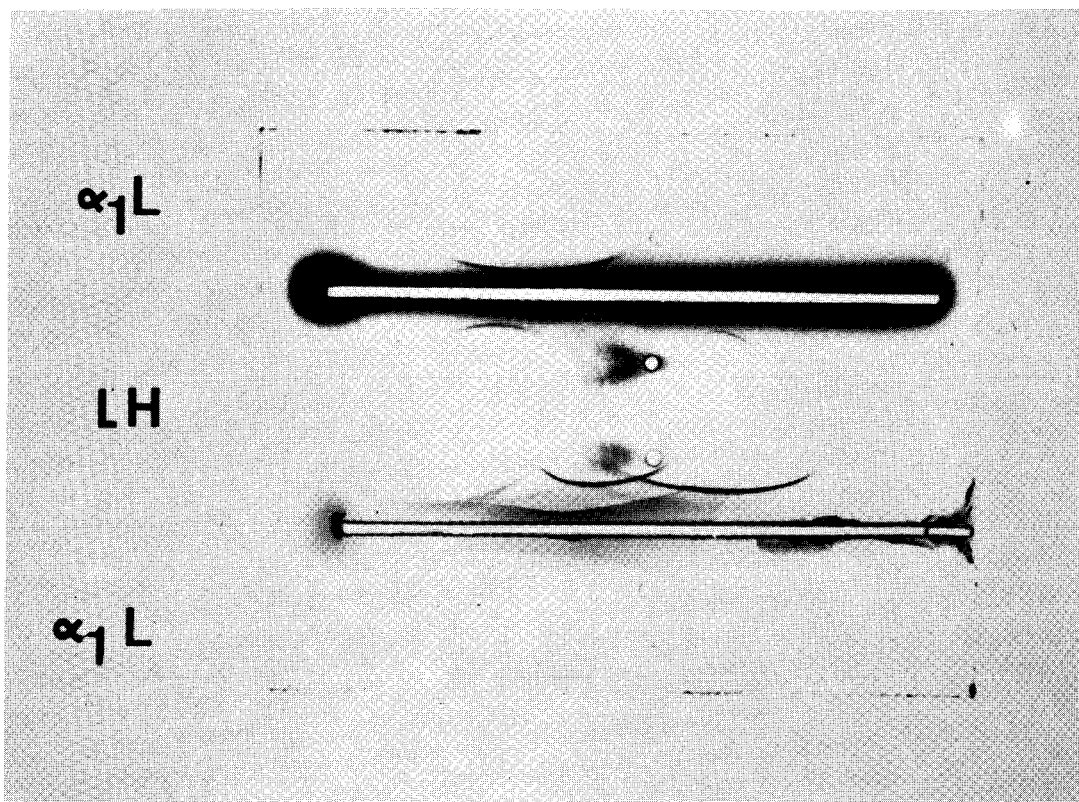


Figure 38 : Immuno-électrophorèse du lait humain (LH) et de l' α_1 -antitrypsine sérique isolée du lait (α_1L) réalisée avec des immunosérums anti- α_1 -antitrypsine ($A\alpha_1$) et antiprotéides lactés (AL).



I - PURIFICATION DES IGA

A - PURIFICATION SUR ECHANGEURS D'IONS

1- Application de la méthode de MONTREUIL, CHOSSON, HAVAZ et MULLET (466)

a - Principe

Après fractionnement du lait de Femme par relargage par le sulfate d'ammonium, les précipités les plus riches en IgA ne pouvant être purifiés par reprécipitation, MONTREUIL et coll. ont utilisé la chromatographie sur AMBERLITE XE-64.

b - Matériel et méthodes

Les précipités P₄ et P₆ (Figure 1; p. 57) dont la composition paraissait la plus simple et dont la teneur en IgA était la plus élevée, furent utilisés. 500 mg de protéides en solution dans 20 ml d'une solution de citrate de sodium 0,01 M à pH 3,6 sont chromatographiés sur une colonne d'AMBERLITE XE-64 de 3 cm x 64 cm, forme citrate. L'élution des protéides est réalisée par le passage de solutions de citrate de sodium dont la concentration varie de façon discontinue de 0,01 M à 0,5 M.

Le précipité P₄ fournit 4 pics, les deux premiers dépourvus d'IgA avec un tampon citrate 0,01 M de pH 3,6 ; les deux derniers renfermant des IgA, avec des tampons citrate respectivement 0,25 M (pH 6) et 0,5 M (pH 6,1).

Le précipité P₆ fournit 3 pics : les deux premiers dépourvus d'IgA, par le passage d'une solution de citrate de sodium 0,01 M ; le troisième contenant des IgA, par le passage d'une solution de citrate de sodium 0,25 M. Les différents éluats sont saturés en sulfate d'ammonium. Les précipités obtenus, redissous dans l'eau distillée, dialysés puis lyophilisés ont été étudiés par électrophorèse en gélose et en gel d'amidon et par immuno-électrophorèse. La composition glucidique de chacun d'eux a été déterminée.

c - Résultats

L'immuno-électrophorèse ne permet pas de déceler dans les fractions protéiques éluées par les tampons citrates 0,25 et

0,5 M d'autres constituants que les IgA qui semblent identiques aux IgA sériques. D'autre part, l'électrophorèse en gel d'amidon révèle que ces différentes fractions ont un comportement électrophorétique lié au comportement chromatographique sur XE-64.

Ces deux comportements sont eux-mêmes en relation avec la composition chimique des différentes fractions : ils dépendent essentiellement de la teneur en acide sialique.

En effet, comme le montrent les résultats de l'analyse chimique (Tableau XXXIII; p. 167), les fractions les plus riches en acide sialique sont éluées les premières et ont une mobilité électrophorétique plus élevée.

d - Conclusions

L'étude électrophorétique et immuno-électrophorétique montre que les IgA du lait de Femme qui semblent identiques aux IgA sériques présentent une grande hétérogénéité physico-chimique.

En recherchant d'autres méthodes d'isolement de ces IgA nous avons voulu vérifier que cette hétérogénéité n'était pas due au mode de préparation.

2) Chromatographie sur CM-Sephadex

a - Principe

Nous avons choisi un échangeur d'ions carboxylique dont le support de Dextran était susceptible de provoquer moins de dénaturation que celui de l'Amberlite XE-64.

b - Matériel et méthodes

300 mg de précipité P₄ sont chromatographiés sur une colonne de 2 x 20 cm, chargé de CM-Sephadex C-25 équilibré dans un tampon acétate de sodium 0,04 M de pH 5,5. Le développement des protéides est effectué par le passage d'un tampon acétate de sodium 0,04 M, pH 5,5, puis par un gradient continu linéaire de pH constant : 5,5 obtenu en mélangeant 400 ml de tampon acétate de sodium 0,04 M avec 400 ml de tampon acétate de sodium 0,8 M.

Composition de différentes fractions IgA isolées du lait de Femme par MONTREUIL et coll. (467).

Nature du précipité	Concentration en citrate de la solution d'élution	Osés (p.100)	Osamines (p.100)	Acide sialique (p.100)	Osés	
						Acide sialique
P ₄	0,25 M	4	-	0,81		4,94
	0,5 M { début de l'élution fin de l'élution	4,02	-	0,63		6,38
		2,68	-	0,32		8,38
P ₆	0,25 M (Expérience 1)	5,25	2,5	1,325		3,96
	0,25 M (Expérience 2) début de l'élution fin de l'élution	5,5	-	1,55		3,6
		5,4	-	1,26		4,3



c - Résultats

La courbe d'absorption de l'effluent à 280 nm est représentée sur la figure 39 (p. 169) avec l'immunoélectrophorègramme des fractions obtenues. On constate que la majeure partie des IgA (75 p.100 du matériel élué) n'est pas retenue sur le support et que la seconde moitié du premier pic est déjà contaminée par de la sérum-albumine.

Des IgA subsistent dans le mélange des protéides déplacés par le gradient continu, elles coexistent avec des IgG et de la lactotransferrine qui est libérée par le tampon acétate de sodium 0,8 M.

d - Conclusions

La quasi-totalité des IgA se trouve rassemblée dans le pic 1 et le reste, environ 10 p.100, de mobilité électrophorétique plus cathodique, est élué plus tard avec des IgG et d'autres impuretés. Malheureusement le précipité P_4 , utilisé comme matière première, renferme souvent de la sérum-albumine ce qui limite considérablement l'efficacité de cette méthode.

Nous nous sommes donc tourné vers les échangeurs d'anions.

3 - Chromatographie sur DEAE-cellulose et DEAE-Sephadex

a - DEAE-cellulose

1) Principe

De nombreux auteurs ont utilisé la DEAE-cellulose pour la purification et le fractionnement des globulines immunes d'origine sérique : IgG (HAVEZ et al.)(468) ; (BISERTE et al.)(469) et IgA (SAUTIERE)(470). Nous avons tenté d'utiliser cette cellulose modifiée pour purifier le précipité P_4 .

2) Matériel et méthodes

Les protéides du précipité P_4 (2 g en solution dans 15 ml de tampon phosphate 0,005 M de pH 8) sont soumis à la chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose (4 x 40 cm), stabilisée dans un tampon phosphate 0,005 M de pH 8. Le déplacement des protéides est

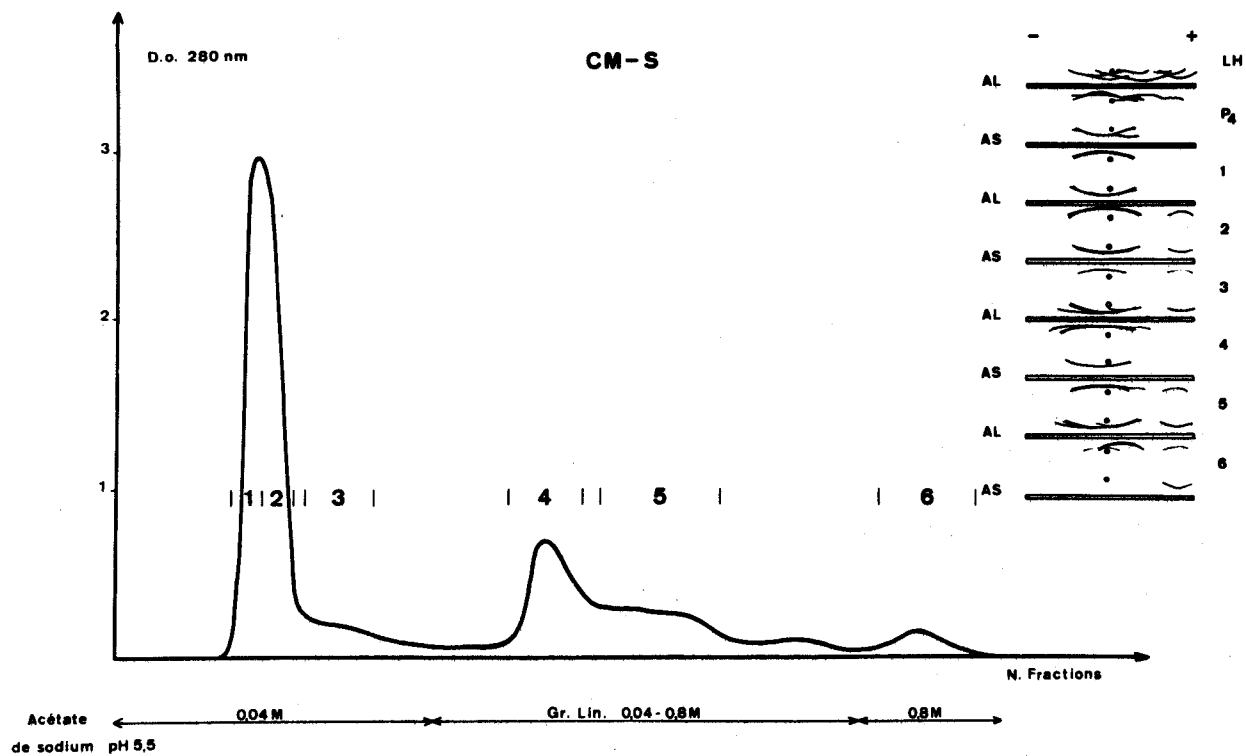


Figure 39 : Purification du précipité P_4 sur CM-Sephadex et immunoélectrophorèse des fractions obtenues.

assuré par le passage succesif de 7 tampons réalisant un gradient discontinu de concentration en phosphate de sodium, au pH constant de 8. Les différentes concentrations en phosphate de sodium du gradient, la densité optique de l'effluent à 280 nm, la masse des différents pics et leur analyse en immunoélectrophorèse sont représentés sur la figure 40 (p. 171).

3) Résultats

Le précipité P₄ renfermant 80 p.100 de protéides immunologiquement apparentés aux IgA, on pouvait s'attendre à obtenir un pic majeur correspondant aux IgA et un ou plusieurs pics mineurs d'impuretés.

La chromatographie sur DEAE-cellulose réalisée au contraire un "découpage" du matériel de départ en autant de fractions que de tampons d'élution, chacune de ces fractions ayant approximativement la même masse. L'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique révèle que chaque fraction renferme en majorité des IgA de mobilité électrophorétique variable, contaminées par différents protéides : lactotransferrine (présente dans chaque pic), IgG (pics 4 et 6), sérum-albumine (pic 6). Ce procédé chromatographique ne fournit donc aucune purification et provoque un "découpage" des IgA qui paraît arbitraire puisqu'il semble dépendre uniquement du gradient d'élution choisi.

Comme pour la chromatographie sur XE-64, on constate une corrélation entre les comportements chromatographiques et électrophorétiques mais dans le cas de la DEAE-cellulose ce sont évidemment les fractions les plus lentes et aussi les moins riches en acide sialique qui sont éluées les premières.

b - DEAE-Sephacex

1) Principe

Le DEAE-Sephacex est apparu plus récemment pour la purification de protéides sériques (GELOTTE et al.)(471). Nous l'avons également appliqué à la purification des IgA car le comportement de cet échangeurs d'ions est sensiblement différent de celui de la DEAE-cellulose.

2) Matériel et méthodes

Nous avons utilisé une colonne de chromatographie de 2x25 cm

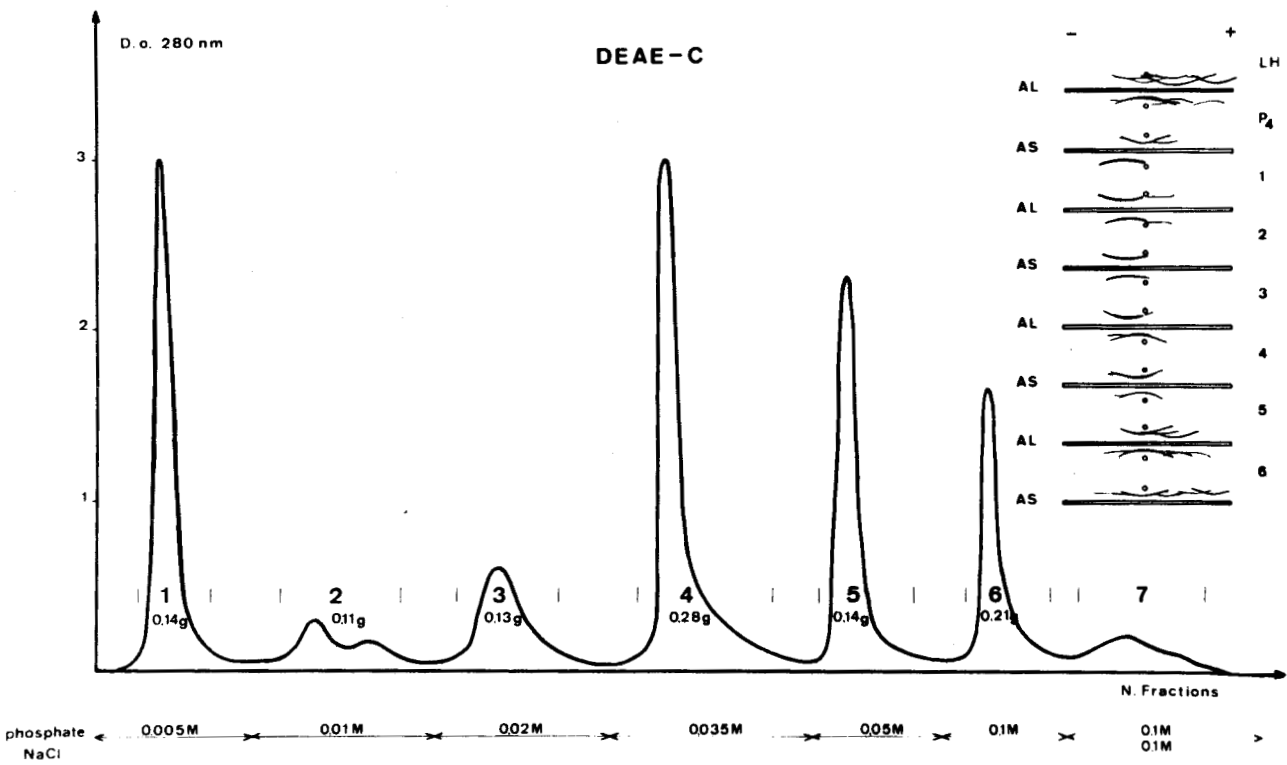


Figure 40 : Purification de 1 gramme de précipité P₄ sur DEAE-cellulose et immunoelectrophorèse des fractions obtenues.



chargée de DEAF-Sephadex équilibré dans du tampon phosphate 0,01 M, de pH 6,5 dans lequel 200 mg de précipité P_4 sont dissous, puis déposés sur la colonne. L'éluion des protéides est réalisée par le passage successif de tampon phosphate 0,01 M et 0,025 M de pH 6,5 puis par un gradient continu linéaire, obtenu en mélangeant 500 ml de tampon phosphate 0,025 M de pH 6,5, à 500 ml de tampon phosphate 0,6 M de pH 6,5.

3) Résultats

Les deux premiers tampons ne déplacent aucun protéide. On se trouve donc au départ dans de meilleures conditions pour contrôler l'éluion des constituants du mélange. Le déplacement de ceux-ci est réalisé par le gradient continu. La courbe de densité optique de l'effluent est représentée sur la figure 41 (p. 173) avec les résultats de l'immunoélectrophorèse. On constate malheureusement qu'aucune des fractions n'est homogène. La première est contaminée par des traces de chaîne de sécrétion libre et de lactotransferrine, la seconde par de l' α -lactalbumine et de la lactotransferrine. La fraction 3 est constituée essentiellement d' α -lactalbumine et la fraction 4 de sérum-albumine.

4) Conclusions

La chromatographie d'échange d'ions sur supports anioniques ou cationiques fournit rarement des préparations d'IgA immunologiquement homogènes et provoque toujours, spécialement dans le cas de la DEAE-cellulose, un fractionnement artificiel. De ce fait pour effectuer l'étude physico-chimique des IgA on est contraint d'opérer un choix parmi différentes fractions en fonction de leur homogénéité. Pour tenter d'éviter cela nous avons utilisé la filtration sur différents gels de Sephadex.

B - PURIFICATION PAR FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX

1. Matériel et méthodes

Les précipités P_1, P_2, P_4 du fractionnement de base, le précipité P_{2-4} du fractionnement rapide 1 et le lactosérum concentré sur polyéthylène glycol 20.000 ont été soumis à la filtration sur gel

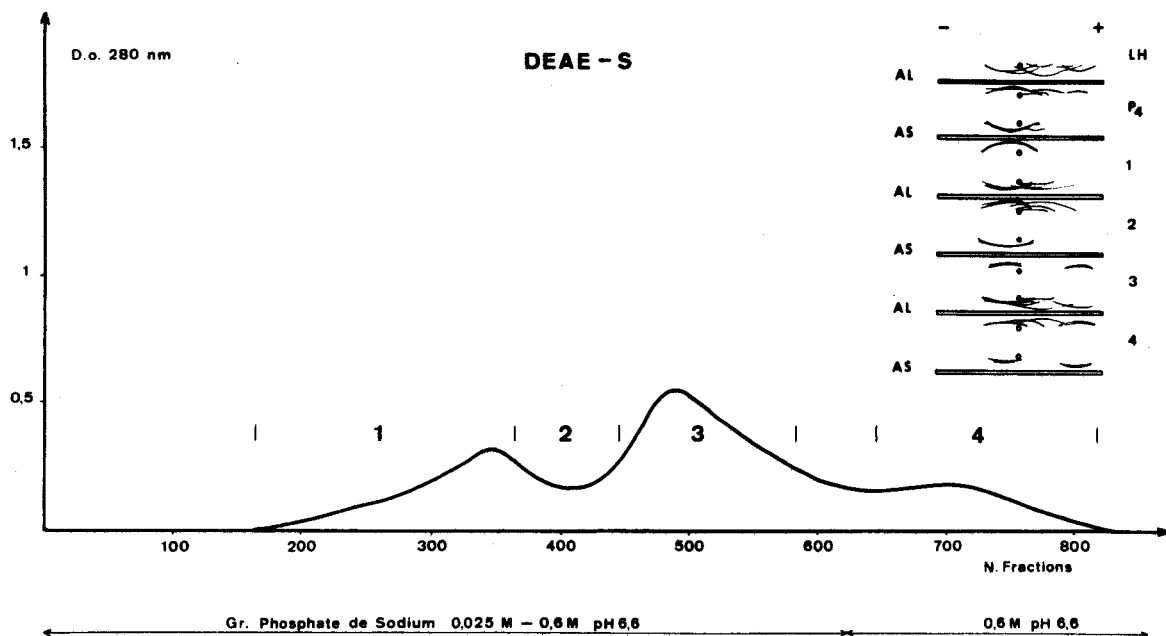


Figure 41 : Purification du précipité P₄ sur DEAE-Sephadex et immunoelectrophorèse des fractions obtenues.

de Sephadex selon la méthode décrite dans le chapitre 2.

Les courbes de densité optique des effluents les études électrophorétiques et immunoélectrophorétiques ont été rapportées dans le chapitre 2 (p. 98). Une étude de la composition centésimale en glucides de chaque préparation d'IgA a été effectuée en appliquant les techniques citées dans le chapitre 1 (voir p. 63).

Les ponts disulfure de la préparation d'IgA provenant du précipité P_4 ont été réduits et alkylés en milieu Urée 8M, puis, la préparation a de nouveau été soumise à une filtration sur Biogel P-100.

La méthode appliquée a été la suivante :

500 mg d'IgA sont dissous dans 50 ml de tampon (urée 8 M, TRIS 1,5 M, E.D.T.A. 0,003 M) dégazé et placé sous atmosphère d'azote. On ajoute progressivement 0,5 ml de β -mercapto-éthanol et on laisse au repos pendant 24 heures. L'alkylation est ensuite réalisée par 2,5 ml d'éthylène-imine ajoutée en plusieurs fois à la solution réfrigérée, dont le pH est maintenu à 8,3. On vérifie que l'alkylation est totale à l'aide du réactif au nitroprussiate. La solution est dialysée et lyophilisée. 200 mg de la préparation réduite et alkylée sont dissous dans 5 ml d'acide acétique 1 N et déposés sur une colonne de 100 x 2 cm, remplie de Biogel P-100 équilibré dans l'acide acétique normal. L'analyse de la composition glucidique est effectuée avant et après réduction-alkylation-filtration sur gel.

2- Résultats

Toutes ces préparations d'IgA présentent approximativement la même mobilité électrophorétique. La comparaison des masses d'IgA obtenues à partir des différents précipités (Tableau XXXIV; p. 175) montre que ce sont les précipités P_2 , P_4 et P_{2-4} qui sont les mieux adaptés pour servir de matière première d'IgA.

Malheureusement seules les préparations provenant du précipité P_4 sont constamment immunologiquement pures. Celles qui sont issues du précipité P_2 sont souvent contaminées par la chaîne de sécrétion libre tandis que celles qui sont obtenues à partir des précipités P_1 et P_{2-4} sont toujours souillées par ce même glycoprotéide.

L'étude de la composition glucidique de ces préparations confirme les résultats fournis par l'immunoélectrophorèse (Tableau XXXV; p. 176). La composition glucidique des IgA issues de P_4 est

Résultats de la préparation des IgA par filtration sur gel de Sephadex de différents précipités des fractionnements par le sulfate d'ammonium (Figure 2; p.59 et Figure 9; p.79) et du lactosérum.

Matériel de départ	Masse de matériel de départ (en g./litre de lait)	Nature du Sephadex	Masse d'IgA obtenue (en g./l de lait)	Etat de pureté
Précipité P ₁	0,8	G 100	0,2	présence de SC libre
Précipité P ₂	3,8	G 100	1,2	présence éventuelle de SC libre
Précipité P ₄	1	G 150	0,8	pure
Précipité P ₂₋₄	2,3	G 150	1,8	présence de SC libre
Lactosérum	13,9	G 150	1,2	présence de SC libre et de glycopeptides.



Composition centésimale en glucides de différentes préparations d'IgA globulines.

Matériel de départ	Oses neutres	Acide N-acétylneuraminique	N-acétylhexosamines	N-acétylglucosamine	N-acétylgalactosamine	N-acétylglucosamine N-acétylgalactosamine	Oses neutres A.N.A.N.
P ₁	6,4	2	5,66	4,9	0,76	6,5	3,2
P ₁ (a)	5,7	1,8	4,9	4,3	0,61	7,1	3,16
P ₂ (b)	7,1	2,05	7,3	6,2	1,1	5,65	3,45
P ₂ (c)	5,65	1,75	5,1	4,45	0,65	6,85	3,2
P ₄	5,6	1,8	5	4,4	0,63	7	3,1
P ₂₋₄	6,5	1,9	5,95	5,1	0,85	6	3,4
Lactosérum	10,7	2,9	8,7	6,9	1,8	3,83	3,7

(a) Reprécipitée 3 fois à 33 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium après filtration sur gel de Sephadex G-100.

(b) Avec chaîne de sécrétion libre

(c) Sans chaîne de sécrétion libre.

rigoureusement constante, tandis que celle des autres préparations montre des teneurs en glucides variables et généralement plus élevées. Il est toutefois remarquable que les préparations issues de P_2 et dépourvues de chaîne de sécrétion libre aient la même composition glucidique que les précédentes et également la même que celle des IgA issues de P_1 et reprecipitées 3 fois par le sulfate d'ammonium.

La seule présence de la chaîne de sécrétion libre dans les préparations d'IgA surchargées en glucides ne peut expliquer leur taux élevé en glucides car celui-ci est à peu de chose près le même dans la chaîne de sécrétion et dans les IgA (KOBAYASHI) (472). L'explication de cette anomalie nous a été fournie par l'étude de la fraction IgA préparée à partir du lactosérum concentré sur polyéthylène glycol. Dans cette préparation où l'on trouve également de la chaîne de sécrétion libre, le taux de glucides est presque double.

Comme précédemment, cette préparation a été précipitée à 33 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium à pH 7 et l'opération a été répétée 2 fois. Ces précipitations successives font tomber le taux de glucides à des valeurs proches de celles des échantillons préparés à partir du précipité P_4 . En outre, si l'on poursuit le relargage par le sulfate d'ammonium sur les eaux mères du premier précipité obtenu à 33 p.100 de saturation, on finit par obtenir un produit qui ne renferme plus d'IgA et dont la composition chimique s'apparente étroitement à celle des glycopeptides du précipité P_{10} .

La présence de glycopeptides adsorbés sur les IgA est confirmée par le calcul comme dans le cas de la lactotransferrine : la composition centésimale en glucides et les rapports molaires en oses neutres des IgA issus du lactosérum sont approximativement les mêmes que ceux du mélange théorique de 83 p.100 d'IgA type P_4 et de 17 p.100 de glycopeptides préparés à partir du précipité P_{10} , tableau XXXVI, p.178.

Pour terminer, nous avons vérifié que la copule glucidique "minimum" des IgA préparées à partir du précipité P_4 provenait bien totalement des IgA. Dans ce but, les IgA ont été réduites et alkylées en milieu urée et soumises à une filtration sur Biogel P-100 en milieu acide acétique. Dans ces conditions, la molécule d'IgA ayant été complètement dénaturée et les différentes chaînes séparées les unes des autres, les glycopeptides éventuellement adsorbés

Comparaison des compositions centésimales et des rapports molaires des IgA pures (I), des glycopeptides (II), des IgA obtenues par filtration du lactosérum sur gel de Sephadex G-150 et d'une composition théorique obtenue en mélangeant I et II dans le rapport 83/17 pour avoir 10,7 p. 100 d'oses neutres.

	Oses neutres	ANAN	GlcNac	GalNac	$\frac{\text{GlcNac}}{\text{GalNac}}$	Gal	Man	Fuc
I : IgA pures	5,6	1,8	4,4	0,63	7	10	12	5
II : Glycopeptides	35,6	9,5	18,3	6,55	2,8	10	0	2,8
IgA obtenues par filtration sur gel du lactosérum	10,7	2,9	6,9	1,8	3,83	10	4	4
IgA (83 p.100 de I) (17 p.100 de II)	10,7	3,1	6,8	1,63	4,15	10	5	4



auraient été eux-mêmes libérés. La filtration sur Biogel P-100 ne fournit qu'une ébauche de séparation entre les différentes chaînes mais aucune trace de glycopeptides n'est décelée dans l'effluent. L'analyse glucidique du matériel libéré dans le pic unique ne révèle aucune modification par rapport à la composition du matériel de départ.

3- Conclusions

Contrairement aux autres procédés chromatographiques, la filtration sur gel de Sephadex G-150 du précipité P₄ fournit un échantillon tout-à-fait représentatif de la famille des IgA du lait maternel. Ces IgA sont immunologiquement pures et ne renferment plus de glycopeptides adsorbés. Pour les autres précipités obtenus par les différents fractionnements, la filtration sur gel de Sephadex ne conduit malheureusement pas à des préparations homogènes et il est alors nécessaire d'avoir recours à une troisième étape de purification.

II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES IGA LACTEES HUMAINES

A - PRINCIPE

Avant d'entreprendre des recherches sur la structure des IgA de la sécrétion lactée humaine nous avons étudié les principales propriétés physico-chimiques de notre préparation.

B - MATERIEL ET METHODES

L'étude physico-chimique a été réalisée sur une préparation d'IgA provenant de la purification par filtration sur gel de Sephadex G-150 du précipité P₄ ou fractionnement par le sulfate d'ammonium.

1 - Electrophorèse de zone et immuno-électrophorèse

Les techniques utilisées ont été décrites dans le chapitre 1 (p. 64).

2 - Ultracentrifugation

Une étude préliminaire a été effectuée sur une ultracentrifugeuse SPINCO modèle E à 56.000 t/mn avec une concentration protéique de 20 mg/ml et un solvant chlorure de sodium 0,14 M.

3 - Analyse des glucides

Les techniques utilisées ont été citées dans le chapitre 1 (p.63). Nous avons en outre employé la méthode à l'anthrone sulfurique de DREYWOOD (473) modifié par SHIELDS et BURNETT (474) pour le dosage des oses neutres, la méthode d'AMINOFF (475), pour le dosage des acides sialiques après hydrolyse des liaisons et la méthode de GARDELL et coll. (476) pour la détermination des rapports molaires des osamines. 25 mg d'IgA sont hydrolysés pendant 4 h par de l'acide chlorhydrique 4 N. L'hydrolysate désséché sur soude est repris par de l'acide chlorhydrique 0,3 N et chromatographié sur une colonne de Dowex 50 x 8, 200-400 "mesh", de 70 x 0,7 cm. L'élution est réalisée par l'acide chlorhydrique 0,3 N.

4 - Analyse des acides aminés

Les acides aminés et les osamines ont été dosés à l'Auto-analyseur TECHNICON suivant le mode opératoire décrit par MONSIGNY (477).

5 - Identification des acides aminés N-terminaux

Les acides aminés en position N-terminale ont été identifiés par la méthode de dinitrophénylation de SANGER (478).

C - RESULTATS

1- Immuno-électrophorèse

L'immuno-électrophorèse réalisée en gélose avec des immun-sérums polyvalents antiprotéides lactés et sériques montre que notre préparation est homogène (Figure 42; p. 182). Elle donne toutefois, pour des concentrations faibles de l'antigène (inférieures à 0,5 p. 100) plusieurs arcs concentriques qui correspondent tous aux IgA. Ce comportement est classique.

2- Electrophorèse de zone

La préparation d'IgA est homogène en électrophorèse de zone réalisée en acétate de cellulose, gel d'agar et d'agarose, gel de polyacrylamide et gel d'amidon (Figure 43; p. 183).

3- Ultracentrifugation

L'étude préliminaire (sur une solution d'IgA à 20 mg/ml) a montré que notre préparation d'IgA renferme 95 p.100 d'un composé ayant un $S_{20, w}$ de 10,5 accompagné de traces de composés plus "lourds" : $S_{20, w}$ de 13 à 18 S. La constante de sédimentation du constituant majeur extrapolée à une dilution infinie devrait donc avoisiner la valeur de 11 S.

4- Composition en glucides

La composition en glucides des IgA du lait maternel est donnée dans le tableau XXXVII (p. 184). Le dosage des oses neutres par la méthode à l'antrone donne des valeurs nettement inférieures à celles qui sont obtenues par la méthode à l'orcinol. Nous pensons que ces dernières sont plus justes, car, si on renouvelle les dosages sur des glycopeptides pronasiques, les deux mé-

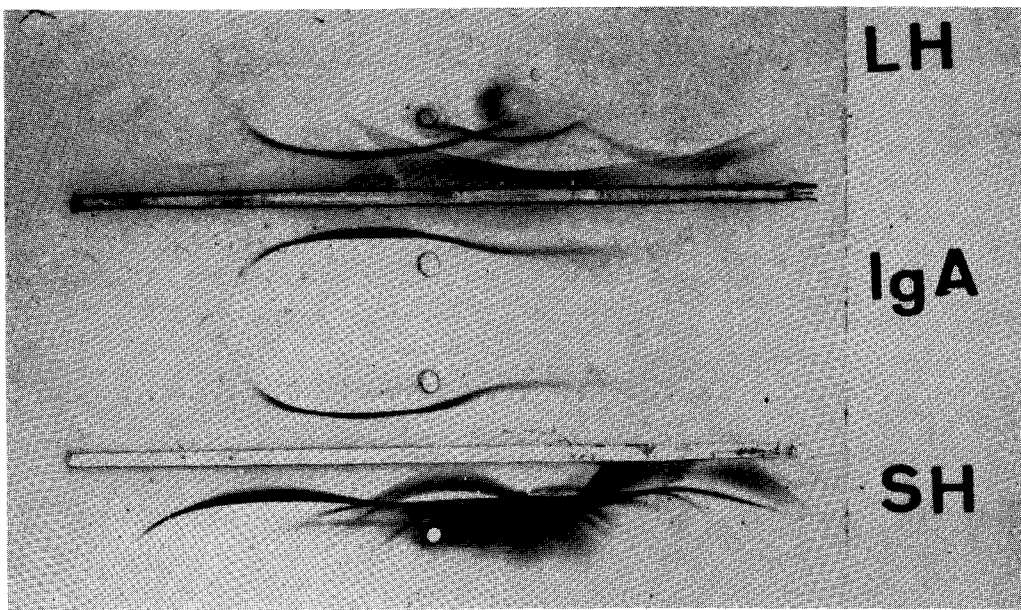
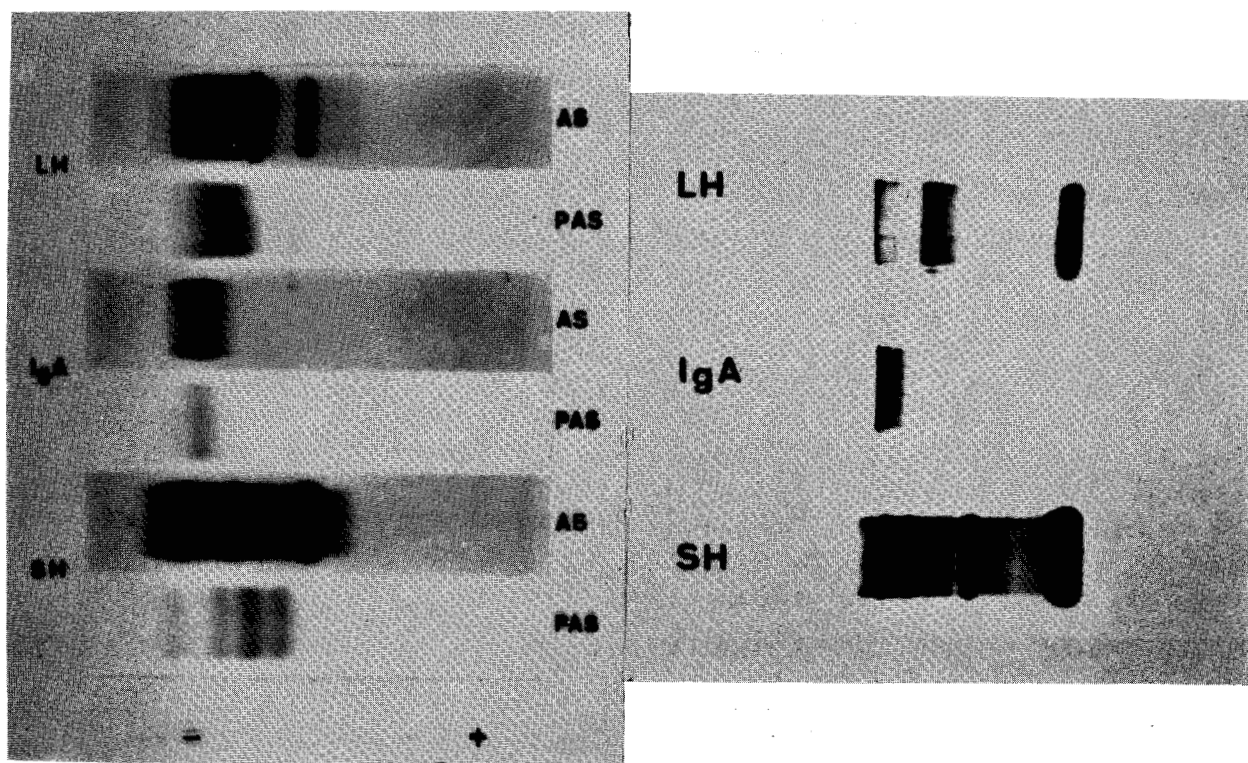


Figure 42 : Immuno-électrophorèse des IgA pures réalisée avec des immunosérums antiprotéides lactés (AL) et antiprotéides sériques (AS).



(1)

(2)

Figure 43 : Electrophorèse de zone des IgA pures

(1) Sur acétate de cellulose (révélation Amidoschwarz (AS) et P.A.S.).

(2) Sur gel de polyacrylamide (révélation Amidoschwarz).



T A B L E A U XXXVII

Composition centésimale et molaire en glucides des IgA.

Composition centésimale

Oses neutres	} Méthode à l'orcinol	5,6
Hexoses		4,65
Fucose		0,95
Oses neutres	Méthode à l'anthrone	4,7
N-acétylhexosamine	Méthode d'Elson-Organ (**)	5,3
N-acétylglucosamine	Méthode de LUDOWIEG et BENMAMAN	4,5
	Autoanalyseur TECHNICON	4,4
N-acétylgalactosamine	Méthode de LUDOWIEG et BENMAMAN	0,7
	Autoanalyseur TECHNICON	0,63
Acide N-acétylneuraminique	Méthode à la diphenylamine	1,8
	Méthode d'AMINOFF	1,2

Composition molaire (**)

D-(+) galactose	50
D-(+) mannose	60
L-(-) fucose	25
N-acétyl-D-(+) glucosamine	84
N-acétyl-D-(+) galactosamine	12
Acide N-acétyl-D-(+) neuraminique	24

(*) Avec témoin $\frac{\text{glucosamine}}{\text{galactosamine}} = 7$ (**) Pour une masse moléculaire de 385.000



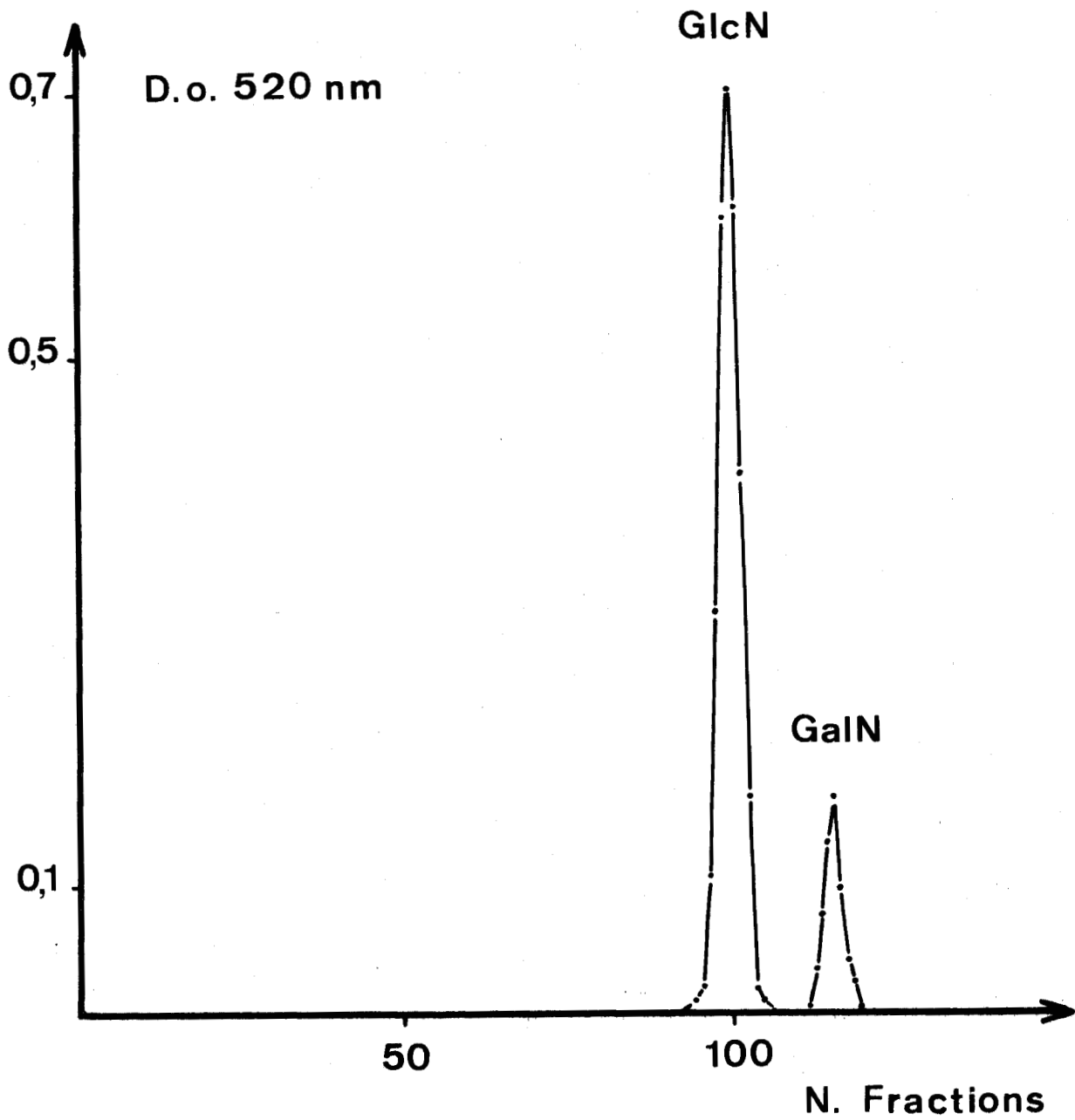


Figure 44 : Dosage des hexosamines des IgA par la méthode de GARDELL.

thodes convergent et le rapport oses/osamines obtenu avec les glycopeptides est identique au rapport oses (orcinol)/osamines de la protéine "native".

Le taux d'osamines et le rapport oses/osamines obtenus par les différentes méthodes citées sont à peu près identiques. Le dosage des osamines par la méthode de LUDOWIEG et BENMAMAN donne un rapport GlcN / GalN de 6,5. Ce rapport passe à 7 quand le dosage est effectué à l'Autoanalyseur TECHNICON et à 7,8 avec la méthode de GARDELL (fig. 44; p. 185). Il faut toutefois remarquer que la galactosamine n'est pas dosée avec une grande précision du fait du rapport élevé GlcN/GalN.

Nous noterons enfin la grande différence entre les taux d'acide N-acétylneuraminique donnés par la méthode à la diphénylamine et par la méthode d'AMINOFF après hydrolyse. Il est difficile de libérer totalement l'acide N-acétylneuraminique par hydrolyse chimique, mais la cinétique d'hydrolyse par l'acide sulfurique 0,1 N à 80°C nous a montré qu'il n'y a plus de libération d'acide sialique après 30 mn d'hydrolyse. Par action de la neuraminidase on obtient le même pourcentage d'hydrolyse. S'il reste de l'acide N-acétylneuraminique non hydrolysé après ces deux types de traitement, comme semble l'indiquer le dosage par la diphénylamine, celui-ci paraît être totalement inaccessible aux agents d'hydrolyse.

Nous donnons des valeurs uniques pour les taux des différents glucides car nous avons constaté, en faisant des dosages systématiques sur des préparations présentant les critères de pureté énoncés plus haut, que les résultats obtenus étaient absolument constants. Mis à part le taux de galactosamine qui n'a jamais été publié à notre connaissance, la composition glucidique que nous présentons est comparable à celles qui ont été obtenues par différents auteurs (Tableau XXXVIII; p. 187).

5. Composition en acides aminés et identification des acides aminés N-terminaux

La composition en acides aminés est rapportée dans le tableau XXXIX (p. 188). Afin de pouvoir effectuer des comparaisons avec les travaux des auteurs, nous avons exprimé nos résultats: en moles p.100 moles,

Comparaison des compositions centésimales en glucides des IgA colostrales humaines.

	Résultats personnels	(a)	(b)	(c)
Oses neutres	5,6	2,7 à 5,5	-	-
Hexoses	4,65	-	4,4 à 5,9	6,2
Fucose	0,95	-	0,8 à 1,03	0,73 ^(d)
Hexosamines	4,05	2,5	2,9 à 5,2	4,1 ^(d)
Glucosamine	3,53	-	-	-
Galactosamine	0,52	-	-	-
Acide N-acétylneuraminique				
- Méthode de DISCHE	1,8	0,3 à 1,55	-	-
- Méthode de WARREN	1,2	-	0,79 à 1,27	0,65

(a) MONTREUIL et al. (479)

(c) TOMASI et BIENENSTOCK (481)

(b) MUH (480)

(d) HANSON et JOHANSSON (482)



Composition en acides aminés des IgA colostrales et sériques

Acides aminés	IgA de sécrétion							IgA sériques	
	Résultats personnels	Résultats de TOMASI <u>et al.</u> (483)	AXELSSON <u>et al.</u> (484)	Résultats personnels		Résultats de MUH (485)		HEIMBURGER (486)	
	Moles p.100	Moles p.100	g.p.100g	g.p.100g	Résidus p. 170.000	g.p.100g	Résidus p. 170.000	g.p.100g	mole d'A.A. par mole
Acide aspartique	8,8	7,9	6,94	7,75	114	7,8	115	6,15	86
Acide glutamique	10,8	10,1	9,79	10,5	140	11,2	145	10,52	130
Arginine	3,8	4,2	4,71	4,5	49	3,8	39	4,55	47
Histidine	1,6	1,7	1,78	1,6	20	1,6	19	1,93	23
Lysine	4,1	4,7	4,55	4	53	3,9	50	4,57	57
Alanine	6,8	6,9	3,79	3,7	88	4,6	110	3,87	87
1/2 cystine	2,4	2,7	2,74	4,4	61	2,8	50	2,10	33
Glycocolle	6,7	7,5	3,29	3,15	87	3,5	105	3,22	90
Isoleucine	2	2,2	2,18	1,7	25	1,4	21	1,74	25
Leucine	8	9,2	7,66	6,9	104	6,7	100	7,76	110
Méthionine	0,6	0,6	0,57	0,6	8	0,35	4	0,80	10
Phénylalanine	3,2	3,1	3,71	3,6	41	3,3	37	3,66	40
Proline	9,9	8,4	5,96	7,3	125	6,3	110	6,26	104
Sérine	11,9	10,8	7,34	7,9	155	8	155	7,93	146
Thréonine	9,7	9,2	6,99	7,5	126	7,3	120	7,65	121
Tyrosine	3	3,2	4,77	3,7	39	4	41	4,38	43
Valine	6,6	7,6	6,39	4,95	85	5,2	95	6	97
Tryptophane	-	-	-	non dosé		non dosé		3,30	28
				83,75 p.100	1320	82,1 p.100	1316	88,4 p.100	1271



en g. de résidus p.100 g de matière sèche et en résidus p. 170.000 ce qui est une valeur purement arbitraire puisque la masse moléculaire de la molécule d'IgA de sécrétion est maintenant bien établie à 385.000 (KOBAYASHI)(487). Nos résultats sont comparables à ceux qui ont été obtenus par TOMASI et al.(488) , MUH (489) et AXELSSON et al. (490). Ils montrent de nombreuses analogies de composition entre les IgA sériques et lactées. Les plus grosses différences portent sur le taux d'acides aminés dicarboxyliques et sur le taux de cystéine qui sont beaucoup plus élevés dans les IgA lactées. Celles-ci sont également plus riches en proline et sérine, par contre les taux de thréonine sont voisins. Trois acides aminés N-terminaux ont été caractérisés : l'acide aspartique, l'acide glutamique et la lysine. Ces résultats confirment ceux de AXELSSON et al. (491) d'une part, et de HAVEZ et al. (492) d'autre part.

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'isolement de la molécule d'IgA de sécrétion, molécule très complexe, demande des conditions expérimentales propres à ne pas provoquer de dénaturation. Pour cela, il importe de choisir judicieusement les méthodes et de réduire au maximum le nombre des étapes.

Le premier procédé décrit qui fut celui de MONTREUIL et al. (493) comportait deux étapes : un fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium et une chromatographie sur AMBERLITE XE-64. De nombreuses autres méthodes ont été proposées depuis. Elles comportent toutes au moins deux ou trois temps. Les premiers sont très divers : électrophorèse préparative (AXELSSON et al.)(494) qui peut être suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose (TOMASI et al.)(495)- celle-ci étant parfois utilisée directement pour le fractionnement du lactosérum sans étape préalable (HANSON et al.)(496) (NEWCOMB et al.)(497), (KOBAYASHI) (498). Le relargage par le sulfate d'ammonium est également employé comme stade de concentration (HAVEZ et al.)(499), mais la purification finale est toujours effectuée par filtration sur gel de Sephadex G-200. Seule la méthode de BLANC (500) est sensiblement différente : par action précipitante de l'acétate de zinc sur le lactosérum celui-ci est enrichi en IgA qui sont purifiées sur DEAE-cellulose.

Nous avons gardé le stade d'enrichissement en IgA conçu par

MONTREUIL et al. (501), le relargage par le sulfate d'ammonium offre en effet l'avantage de permettre le traitement de quantités importantes de protéides sur lesquels il n'a aucune action dénaturante. Nous avons ensuite montré qu'il est difficile de réaliser la purification de ces fractions enrichies par chromatographie sur échangeurs d'ions car ceux-ci présentent pour la plupart l'inconvénient majeur d'opérer un fractionnement arbitraire. Cherchant avant tout à obtenir un échantillon d'IgA pleinement représentatif de cette entité du point de vue de la copule glucidique, afin d'en étudier par la suite la structure, nous avons vérifié qu'il n'existait pas de différences appréciables dans la composition glucidique des 3 précipités les plus riches en IgA, P₁, P₂ et P₄ et nous avons choisi le précipité P₄ qui était le plus facile à purifier. Celui-ci a été soumis à la filtration sur gel de Sephadex G-150 qui donne des résultats excellents. La préparation obtenue s'est révélée homogène selon tous les critères physiques que nous lui avons appliqués et les principaux traits de sa composition chimique ont été déterminés.

Nous avons, en particulier, contrôlé la parfaite constance de sa composition glucidique par des analyses systématiques.

Nous avons, en outre, remarqué au cours de la purification l'association IgA-chaîne de sécrétion libre, cette dernière ayant une mobilité électrophorétique plus élevée à pH 8,2 que la forme classique β_2 que nous avons également mise en évidence (Chapitre 2; p.101).

Cette association forme un véritable complexe ternaire avec des glycopeptides dont la présence a été caractérisée surtout dans une préparation d'IgA isolée directement à partir du lactosérum concentré.

ETUDE STRUCTURALE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DES IgA
--

1. - INTRODUCTION

Les glycoprotéides du lactosérum sont représentés dans leur quasi totalité par les IgA, la chaîne de sécrétion libre, la lactotransferrine et les glycopeptides apparentés à la caséine.

L'étude structurale des glycopeptides est toujours très fragmentaire étant donné le caractère apparemment fuyant de leur composition glucidique d'où ne ressortent que des liens de parenté incontestables avec la kappa caséine. Ces liens sont corroborés par la présence dans les glycopeptides, de liaisons glycanne-protide de nature O-glycosidique qui peuvent cependant coexister avec un autre type de liaison.

La copule glucidique de la lactotransferrine a fait l'objet de nombreuses études en particulier celle de SPIK (502) qui a démontré la présence de 3 groupements glycaniques, 2 d'une masse moléculaire de 2100 environ sont conjugués à la protéine par des liaisons asparaginyglucosamine et un troisième glycanne d'une masse moléculaire de 1000 est attaché à la protéine par une liaison O-thréonyl glucosidique. Ces glycannes sont composés de chaînes courtes peu ramifiées.

Notre étude sur la copule glucidique des IgA a porté essentiellement sur les modalités de l'attache glycanne-protide, sur la recherche du nombre d'unités glycaniques et sur les principaux traits de leur structure. La copule glucidique de la chaîne de sécrétion libre n'a pas été étudiée.

2. - DESCRIPTION DES METHODESI - HYDROLYSE PRONASIQUE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDESA - HYDROLYSE PRONASIQUE

1- Principe

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes, le procédé de YAMASHINA et MAKINO (503) modifié selon MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (504).

2- Mode opératoire

A une solution de 5 g d'IgA dans 500 ml d'acétate de calcium 0,1 M, on ajoute 50 mg de pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 40°C sous agitation, pendant 48 heures, en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N contrôlée par un titrateur automatique (pH stat TTT 1C RADIOMETER) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial, puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu pendant 2 heures à la température du laboratoire, puis à 2°C pendant 18 heures. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,1 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les mêmes conditions. On opère au total 4 cycles d'hydrolyse. Le dernier précipité est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous. Ce précipité représente la fraction glycopeptidique totale.

B - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1- Principe

Les glycopeptides sont débarrassés des sels minéraux et d'une partie des peptides par un passage sur échangeurs de cations et d'anions. Ils sont ensuite purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex pour éliminer le reste des peptides.

2- Mode opératoire

a - Purification sur échangeurs d'ions

La fraction glycopeptidique totale ou fraction glycopeptidique I, est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue

est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g p.100 ml. Le précipité formé est éliminé par centrifugation après un repos de 18 heures à + 2°C. La solution surnageante est purifiée par passage successif sur des colonnes (2 x 35 cm), d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25 x 50 ; forme acide), puis d'anions (Duolite A-102 D ; forme formiate ; "mesh" 25-50). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (1 litre) est concentré à 20 ml dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu.

Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique II".

b - Purification par chromatographie sur Sephadex

La fraction glycopeptidique II est débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus par les échangeurs d'ions, par une chromatographie sur colonne (2 x 35 cm) de gel de Sephadex G-25. La quantité de précipité chromatographié est de l'ordre de 400 mg et l'élution est effectuée avec de l'eau bidistillée. Le repérage des constituants présents dans l'effluent est réalisé en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (505) et les protides par le procédé à la ninhydrine de MOORE et STEIN (506). On obtient de cette manière, une fraction enrichie en glycopeptides.

Il s'agit de la "fraction glycopeptidique III".

II - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLLAIRE DES GLYCOPEPTIDES

Les méthodes utilisées ont été citées au chapitre I (p. 63).

III - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPEPTIDES ET DES GLYCANNES

A - PROCEDE CHIMIQUE

1- Principe

Les groupements N-terminaux des amino-acides sont dosés selon la technique au fluorodinitro benzène de GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (507).

Les dosages sont effectués par rapport à des témoins constitués par les acides aminés dont la position N-terminale a été préalablement déterminée. On élimine de cette manière, la cause d'erreur due aux différences d'absorbance molaire des DNF-aminoacides.

2- Mode opératoire

A 0,2 ml de solution contenant 0,01 à 0,05 micromoles de composés aminés, on ajoute 0,4 ml d'une solution de tétraborate de sodium à 1 p.100, puis, après agitation, 0,05 ml d'une solution composée de 0,65 ml de fluorodinitrobenzène dans 50 ml d'éthanol absolu. La réaction est complétée par un séjour de 30 mn du mélange au bain-marie à 60°C.

La solution refroidie sous eau courante est acidifiée par 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N pour éliminer l'interférence du dinitrophénol libéré par hydrolyse du réactif. L'absorbance est mesurée à 420 nm. La masse moléculaire est calculée en appliquant la formule :

$$M = \frac{P.1000}{\mu M}$$

où P : poids de substance en mg.

μM : nombre de micromoles d'acide N-terminal pour le poids P.

B - FILTRATION SUR BIOGEL

Les masses moléculaires des glycopeptides et des glycanes ont été déterminées par la méthode de JOHN, TRENEL et DELLWEG (508).

1- Principe

La filtration sur gel permet de déterminer la masse moléculaire d'une substance car le volume d'élution de celle-ci est inversement proportionnel au logarithme de sa masse moléculaire. Il faut toutefois veiller à procéder à un étalonnage préalable au moyen d'une série régulière de substances de nature identique à celles dont on veut mesurer la masse moléculaire.

2- Mode opératoire

Nous avons utilisé une colonne de BIOGEL P6 de 130 cm x 1,2cm. L'élution est réalisée par le passage d'une solution de chlorure de sodium 0,14 M. L'étalonnage est effectué à l'aide de glycopeptides d'IgG bovine et de polysaccharides de lait maternel ^(*). Pour chacune des mesures V_e et V_o sont à nouveau déterminés : en effet tout échantillon est chromatographié conjointement avec du glucose et du dextran bleu de masse moléculaire 1.000.000. Le repérage des constituants présents dans l'effluent est réalisé en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (509). Les courbes du logarithme des masses moléculaires en fonction du volume d'élution (V_e/V_o) sont tracées pour les glycanes et les glycopeptides.

IV - DETERMINATION DE L'ATTACHE GLUCIDE-PROTIDE

A - IDENTIFICATION DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

1- Amidation des glycopeptides

La rupture des liaisons O-glycosidiques par β -élimination ne peut s'effectuer sous l'action des alcalis si le β -hydroxy-amino-acide lié au glycanne possède son groupement carboxylique libre (MON-TREUIL et coll.)(510). Nous effectuons une amidation systématique des glycopeptides pour éviter cette cause d'erreur.

a - Principe

Dans un premier temps les glycopeptides sont estérifiés par le méthanol anhydre en présence de chlorure de thionyle, selon le procédé général de SOKOLOVSKI, SADEH et PATCHORNIK (511).

L'amidation est réalisée dans un second temps par action sur les esters de la butylamine.

b - Mode opératoire

1) Estérification

100 mg de glycopeptides sont dissous dans 50 ml de méthanol

(*) Ces substances nous ont été aimablement fournies par MM. A. CHERON et L. GRIMMONPREZ que nous remercions vivement.

anhydre. A la solution refroidie à -5°C , on ajoute, goutte à goutte, 1,5 ml de chlorure de thionyle préalablement refroidi à -20°C . Le mélange est maintenu à la température ambiante pendant 4 heures sous agitation constante. Il est ensuite concentré sous vide à la température du laboratoire, à l'abri de toute trace d'eau.

2) Amidation

Le résidu sec est traité par 0,2 à 2 ml de N butylamine et la solution obtenue est évaporée à siccité, après 24 heures d'action à 20°C .

2- Action de la soude et réduction par le borohydrure de sodium

a - Principe

On sait, depuis les travaux d'ANDERSON et coll. (512) que les liaisons O-séryl et O-thréonylglycosidiques sont très labiles en milieu alcalin et que la rupture de la liaison glycosidique s'accompagne de la libération du glycanne et d'une modification structurale du β -hydroxy-amino acide conjugué, par un mécanisme dit de " β -élimination": la sérine est transformée en déhydro-alanine (acide 2-amino-2-propénoïque) et la thréonine en acide 2-amino-2-buténoïque (fig. 46; p. 197). Au cours de l'hydrolyse acide de la chaîne peptidique, les "déhydro-aminoacides" sont détruits et on peut donc déterminer le nombre de résidus de β -hydroxy-aminoacides disparus après l'action de la soude. On en déduit le nombre de résidus glycaniques conjugués O-glycosidiquement au peptide ou à la protéine.

En faisant agir la soude en milieu réducteur, on obtient un double effet :

1) - Les "déhydro-aminoacides" sont réduits : la déhydro-alanine est transformée en alanine - qui s'ajoute éventuellement à l'alanine préexistante - et l'acide 2-amino-2-buténoïque en acide α -aminobutyrique qui apparaît sur les chromatogrammes.

2) - Dans le glycanne détaché par la soude, la fonction réductrice du monosaccharide engagé dans la liaison est réduite et il peut être identifié sous la forme d'un polyol.

b - Mode opératoire

250 mg de glycopeptides amidés sont maintenus pendant 4 jours

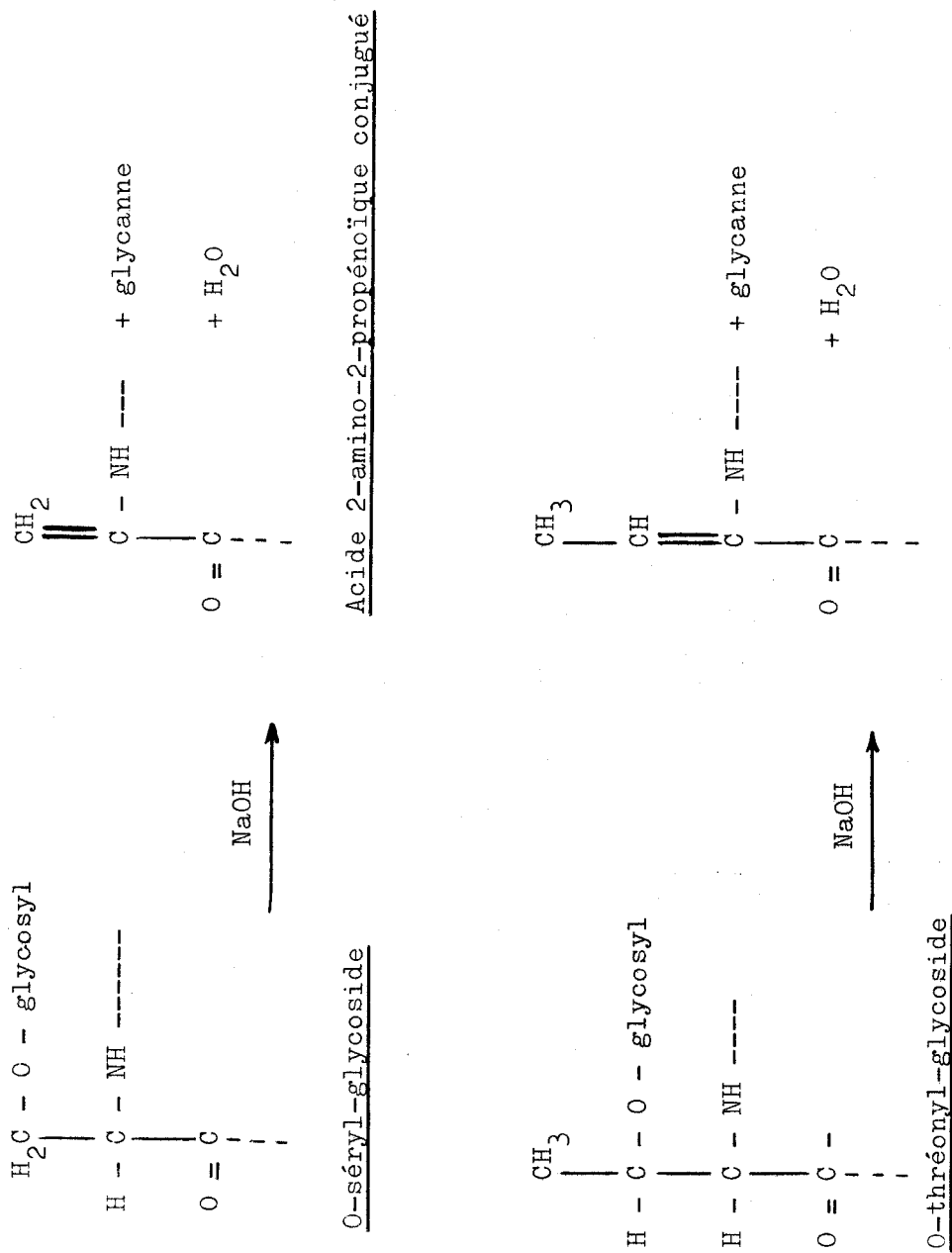


Figure 46 : Rupture par "β-élimination" des liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidique d'un glycoprotide.

à 20°C dans 50 ml d'une solution 0,1 N en soude et 0,3 M en borohydrure de sodium (TANAKA et al.)(513). La solution est neutralisée par de l'acide acétique dilué et évaporée à sec. Le résidu est débarrassé de l'acide borique en le reprenant par un mélange de méthanol et d'acide acétique glacial (4:1) v/v, et en évaporant la suspension par distillation sous pression réduite. Le mode opératoire est répété 4 fois. La préparation obtenue est analysée à l'Autoanalyseur TECHNICON.

3- Action de la soude et réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide

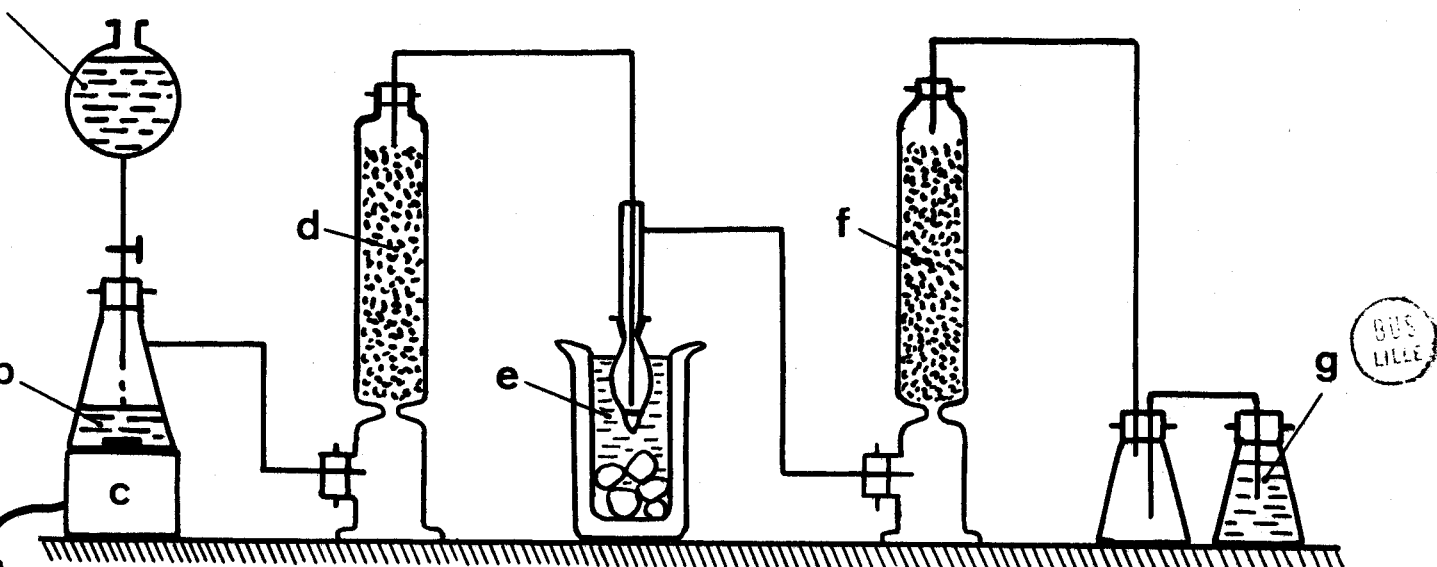
a - Principe

La réduction des "déhydro-aminoacides" par le borohydrure de sodium n'est pas quantitative. Nous avons utilisé également le procédé de réduction des nitriles en amines de RESSLER et KASHELIKAR (514) préconisé par MONSIGNY (515) pour la réduction des produits de la " β -élimination."

b - Mode opératoire

50 mg de glycopeptides amidés sont traités par 10 ml de soude 0,1 N contenant 4 à 5 mg de borohydrure de sodium pendant 4 jours à 20°C. La solution est neutralisée par de l'acide acétique 0,1 N et lyophilisée. Le résidu est desséché pendant 24 heures à 50°C en présence d'anhydride phosphorique puis mis en suspension dans 0,2 ml de méthanol anhydre. Dans le tube maintenu dans un mélange de neige carbonique et de méthyl-cellusolve, on fait passer un courant d'ammoniac anhydre qui est préparé par addition lente de lessive de soude à du sulfate d'ammonium cristallisé très pur. L'ammoniac qui se dégage est déshydraté par passages successifs sur une colonne de chaux sodée et sur une colonne de sulfate de calcium (fig. 47; p. 199). Quand 3 ml environ d'ammoniac sont condensés, le tube est agité et réchauffé à - 33°C. Le sodium est introduit à l'aide d'un tube de 4 mm de diamètre que l'on plonge plusieurs fois dans l'ammoniac. La réduction est terminée quand, après l'introduction du tube de sodium dans l'ammoniac, la coloration bleue donnée par le sodium dissous persiste pendant 30 secondes. L'ammoniac est éliminé en gardant le tube pendant quelques minutes à la température du laboratoire. L'amidure de sodium formé est détruit par addition de méthanol. Le borate est éliminé comme précédemment.

Réduction par le Sodium dans l'ammoniac liquide



- a - Lessive de soude
- b - Sulfate d'ammonium
- c - Agitateur magnétique
- d - Sulfate de calcium et chaux sodée
- e - Méthyl-cellosolve + carboglace
- f - Sulfate de calcium
- g - Acide acétique dilué

Figure 47

4. Fractionnement des composés libérés par l'action de la soude

Les produits de dégradation sodique des glycopeptides sont fractionnés selon le schéma décrit par SFIK et al. (516). Le passage du mélange sur une colonne d'échangeur de cations DOWEX 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide) fournit deux solutions. L'une, qui est l'effluent auquel on joint les eaux de lavage de la colonne, est constituée par les glycanes libérés par la " β -élimination" et par les glycopeptides respectés par l'action de la soude. L'autre, qui est obtenue par passage sur la colonne d'une solution d'ammoniaque 0,5 N, contient les peptides détachés au cours de la β -élimination. Deux témoins internes sont introduits avant le fractionnement : la norleucine qui se retrouve dans la fraction basique et l'acide cystéique qui est élué avec la fraction acido-neutre. Ces témoins internes permettent de mesurer comment le matériel de départ se répartit dans les fractions subséquentes. Enfin, les glycopeptides sont séparés des glycanes par électrophorèse préparative à pH 1,5.

5. Dosage des substances réduites

a - Galactosaminitol

La présence des osaminitols dans les hydrolysats chlorhydriques des glycopeptides traités par la soude en milieu réducteur, introduit une cause d'erreur dans le dosage des osamines à l'Auto-analyseur TECHNICON, car ces composés possèdent le comportement chromatographique de la galactosamine. Nous éliminons cette interférence de deux manières:

1) En dosant la glucosamine et la galactosamine par la méthode colorimétrique de LUDOWIEG et BENMAMAN (517).

2) En détruisant par la soude (soude 0,1 N à 100°C pendant 5 minutes) les osamines préalablement N-réacétylées par la méthode de LEVY et Mc ALLAN (518). Cette action est suivie d'une nouvelle hydrolyse acide (HCl 2N, à 100°C pendant 2 heures) destinée à N-désacétyler les osaminitols qui sont ensuite dosés à l'Autoanalyseur TECHNICON.

b - "Déhydro-aminoacides"

1) Les "déhydro-aminoacides" présents dans la fraction pep-

tidique ont été caractérisés sous la forme de quinoxalinols après hydrolyse acide et condensation avec l'O-phénylène diamine selon le mode opératoire décrit par HARBON et coll. (519).

2) De même les "déhydro-aminoacides" peuvent être mis en évidence après réduction. La déhydro-alanine est réduite à 80 p.100 par le borohydrure de sodium et à 100p.100 par le sodium dans l'ammoniac liquide. L'acide 2-amino-2-buténoïque est réduit en acide α -aminobutyrique avec un rendement de 75 à 80 p.100 par le sodium dans l'ammoniac liquide. Ces acides aminés néoformés sont dosés à l'Auto-analyseur TECHNICON -(MONSIGNY)(520).

B - IDENTIFICATION DES LIAISONS DE LA N-(β -ASPARTYL)-GLUCOSAMINYLAMINE

Les modes opératoires utilisés ont été décrits à propos de l'ovomucoïde (MONSIGNY et al.)(521) et de la transferrine (SPIK et al.)(522) .

Les glycopeptides respectés par l'action de la soude sont soumis à une hydrolyse acide ménagée (100 mg dans 20 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N - 100°C, pendant 1,5 heure).

La N-(β -aspartyl) glucosaminyllamine est isolée par électrophorèse préparative sur papier Arches 304 à pH 3,9 et identifiée en utilisant les méthodes employées par les auteurs cités ci-dessus.

De plus les glycopeptides, alcali-stables ont été soumis à plusieurs cycles de dégradation d'EDMAN qui ont conduit aux PTH-aspartyl-glycannes qui ont été étudiés.

3 . - RESULTATS

I - ISOLEMENT ET ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE

L'hydrolyse pronasique de 5 g d'IgA fournit 520 à 560 mg de glycopeptides après purification sur échangeurs d'ions et filtration sur gel de Sephadex G-25.

La composition de cette fraction appelée GLYCOPEPTIDE II est donnée dans le tableau XL (p. 202). Les rapports molaires des oses neutres sont identiques à ceux de la protéine native. Il en est de même, à peu de choses près, pour les rapports glucosamine/galactosamine,

T A B L E A U XL

Composition de la fraction glycopeptidique totale

	GLYCOPEPTIDE II			IgA natives
	mM p.g de gly- copeptide I	g. p. 100 g de glycopeptide I	mole p.mole d'IgA(⊠)	mole p.mole(⊠)
Ac. aspartique	0,37	4,3	23,6	
Thréonine	0,22	2,2	14,1	
Sérine	0,225	2	14,4	
Ac. glutamique	0,21	2,7	13,4	
Proline	0,27	2,6	17,3	
Glycocolle	0,12	0,7	7,7	
Alanine	0,11	0,8	7	
Valine	0,06	0,6	3,9	
Ac. α-amino-butyrrique	0	0	0	
N-acétyl-glucosamine	1,31	26,6	84	84
N-acétyl-galactosamine	0,19	4,1	12	12
Galactosaminitol	0	0	0	0
Oses neutres		34,8		
Galactose	0,81	13,1	51,8	50
Mannose	0,97	15,7	62,1	60
Fucose	0,4	5,9	25,6	25
Acide N-acétyl-neu- raminique	0,37	10,7	23,7	24
T O T A L		92,9		

(⊠) Pour une masse moléculaire de 385.000.



oses neutres/acide N-acétylneuraminique et oses neutres/hexosamines. La composition en amino-acides des glycopeptides paraît complexe quand on la compare à celle des glycopeptides obtenus dans les mêmes conditions à partir des IgG (DUQUESNE et al.)(523), ou de la transferrine (SPIK et al.)(524). Certains glycopeptides obtenus par ces auteurs ne renferment que l'acide aspartique et la sérine.

L'électrophorèse sur papier en tampon pH 2,4 montre que cette fraction est composée de nombreux glycopeptides.

Une hydrolyse par la pronase sur une préparation d'IgA obtenue à partir du précipité P₂ nous a fourni une fraction glycopeptidique totale de composition sensiblement identique à celle que nous venons de décrire. Nous avons fait agir la soude sur ces deux préparations de glycopeptides.

II - ACTION DE LA SOUDE SUR LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE ET MISE EN EVIDENCE DE LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

Les glycopeptides préalablement amidés sont soumis à l'action de la soude en présence de borohydrure puis à une seconde réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide.

Les résultats rapportés dans le tableau XLI (p. 204) montrent que pour les deux préparations d'IgA, 4 résidus de thréonine et 4 résidus de sérine ainsi que 8 résidus de galactosamine ont disparu. Il est apparu simultanément 7 résidus de galactosaminitol, 4 résidus d'alanine (provenant de la réduction totale de la déhydroalanine) et 3 résidus d'acide α -amino-butérique (provenant de la réduction partielle de l'acide α -aminobuténoïque).

III - FRACTIONNEMENT ET ETUDE DES PRODUITS DE L'ACTION DE LA SOUDE

Chacune des fractions est d'abord soumise à une analyse d'acides aminés et de glucides dont les résultats sont rapportés dans le tableau XLII (p. 205).

Ensuite la valeur des rendements de chaque fraction permet de déduire des résultats précédents la répartition molaire du matériel glycopeptidique de départ dans chacune des fractions comme le montre le tableau XLIII (p. 206). En outre, la connaissance des masses moléculaires des glycopeptides alcali-stables et des glycanes permet, pour

T A B L E A U XLI

Résultats[⊗] de l'action de la soude sur les fractions glycopeptidiques totales provenant de 2 préparations différentes d'IgA issues des précipités P₂ et P₄ (fig. 2 ; p.59).

	Glycopeptides d'IgA provenant du précipité P ₂		Glycopeptides d'IgA provenant du précipité P ₄	
	A v a n t action de la soude	A p r è s action de la soude	A v a n t action de la soude	A p r è s action de la soude
Acide aspartique	23	21	23,6	21,8
Thréonine	14,4	10	14,1	9,6
Sérine	12,5	8,4	14,4	10,2
Acide glutamique	4,4	4,4	13,4	13,4
Proline	22	21,2	17,3	18
Glycocolle	7,5	8,1	7,7	7
Alanine	7,5	11,6	7	10,9
Valine	3,75	4,4	3,9	3,8
Acide α-amino-butérique	0	+	0	3,2
N-acétylglucosamine	84	85,2	84	84
N-acétylgalactosamine	12,4	4,6	12	3,2
Galactosaminitol	0	6,3	0	7

(⊗) Exprimés en moles par mole d'IgA.



T A B L E A U X L I I

Composition centésimale en acides aminés et en glucides des différentes fractions obtenues après action de la soude comparées à la fraction glycopeptidique de départ (glycopeptides II).

	Glycopeptides I	Peptides	Glycopeptides Alkali-stables	Glycannes libérés
Acide aspartique	4,3	11,5	4,8	traces
Thréonine	2,2	7	1,6	-
Sérine	2	7	1,4	-
Acide glutamique	2,7	12,9	2,7	-
Proline	2,6	33	1,4	-
Glycocolle	0,7	3,5	0,6	-
Alanine	0,8	14,2	0,8	-
Valine	0,6	4	0,4	-
Acide α -aminobutyrique	0	8,5	0	0
N-acétylglucosamine	26,6	0	33,6	15,3
N-acétylgalactosamine	4,1	0	2	traces
Galactosaminitol	0	0	0	8,8
Galactose	13,1	0	6,7	35
Mannose	15,7	0	22,3	0
Fucose	5,9	0	4,9	9
Acide N-acétylneuraminique	10,7	0	7,4	22
T O T A L	92,9	101,6	90,7	90,1



T A B L E A U X L I I I

Composition molaire en acides aminés et en glucides des différentes fractions obtenues après action de la soude par rapport à la fraction glycopeptidique de départ (glycopeptide II)(pour une masse moléculaire de 385.000).

	1	2	3	4	5
	Glycopeptides I	Glycopeptides traités par la soude et réduits.	Fraction peptidique	Glycopeptides alcali- stables	Glycannes
			5p.100 de 1	70p.100 de 1	
acide aspartique	23,6	21,8	3,2	18,5	traces
thréonine	14,1	9,6	2,2	7	-
sérine	14,4	10,2	2,6	7	-
acide glutamique	13,4	13,4	3,2	9,6	-
proline	17,3	18	11	6,4	-
glycocolle	7,7	7	1,9	4,5	-
alanine	7	10,9	6,4 ^(*)	5,1	-
valine	3,9	3,8	1,3	1,9	-
acide α -amino butyrique	0	3,2	3,2 ^(**)	0	0
-acétylglucosamine	84	84	0	73	12
-acétylgalactosamine	12	3,2	0	3,8	0
galactosaminitol	0	7	0	0	7
galactose	51,8	-	0	18,5	34,6
mannose	62,1	-	0	61	0
glucose	25,6	-	0	15,4	9,6
acide N-acétylneuraminique	23,7	-	0	11,5	12,2

(*) Sans réduction : 1,9

(**) Sans réduction : 0



les premiers d'estimer, pour les seconds de vérifier le nombre de glycanes alcali-stables et alcali-labiles dans la molécule d'IgA. On peut enfin établir une composition molaire moyenne de ces différents glycanes. Nous allons considérer successivement les résultats obtenus pour les peptides, les glycopeptides alcali-stables et les glycanes libérés par la soude.

A - ETUDE DES PEPTIDES

Les peptides libérés par la soude qui ont été retenus sur l'échangeur de cations puis élués par la solution d'ammoniaque 0,5 N représentent 5 p.100 de la fraction glycopeptidique totale. Ils renferment la totalité de l'acide α -amino-butyrrique et de l'alanine néoformés. Pour évaluer cette dernière nous avons fait agir la soude sans borohydrure sur les glycopeptides, puis divisé les produits en deux parties, l'une a été fractionnée directement, l'autre l'a été après avoir subi une réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide. L'alanine néoformée a donc été dosée par différence. Nous avons représenté ceci schématiquement sur la figure 48 (p.208).

Les déhydro-aminoacides présents sur les déhydroprotides libérés par la soude en milieu non réducteur ont également été caractérisés dans cette fraction sous forme de quinoxalinols par hydrolyse de cette dernière en présence d'O-phénylènediamine. On note enfin que les protides libérés comportent un taux élevé de proline.

B - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES

La fraction glycopeptidique alcali-stable est cationique en électrophorèse sur papier à pH 1,5 et elle représente 70 p.100 de la fraction glycopeptidique totale. Sa composition centésimale est donnée dans le tableau XLII (p. 205) tandis que la composition molaire rapportée à une mole d'IgA est indiquée dans le tableau XLIII (p.206). On remarque que l'acide aminé le plus abondant est l'acide aspartique et qu'il reste de la proline.

Dans la fraction glucidique, on note l'importance de la glucosamine et du mannose et la présence d'un peu de galactosamine. La masse moléculaire moyenne de ces glycopeptides est de 3.300, par dosage des N-terminaux et de 3.200 par filtration sur gel.

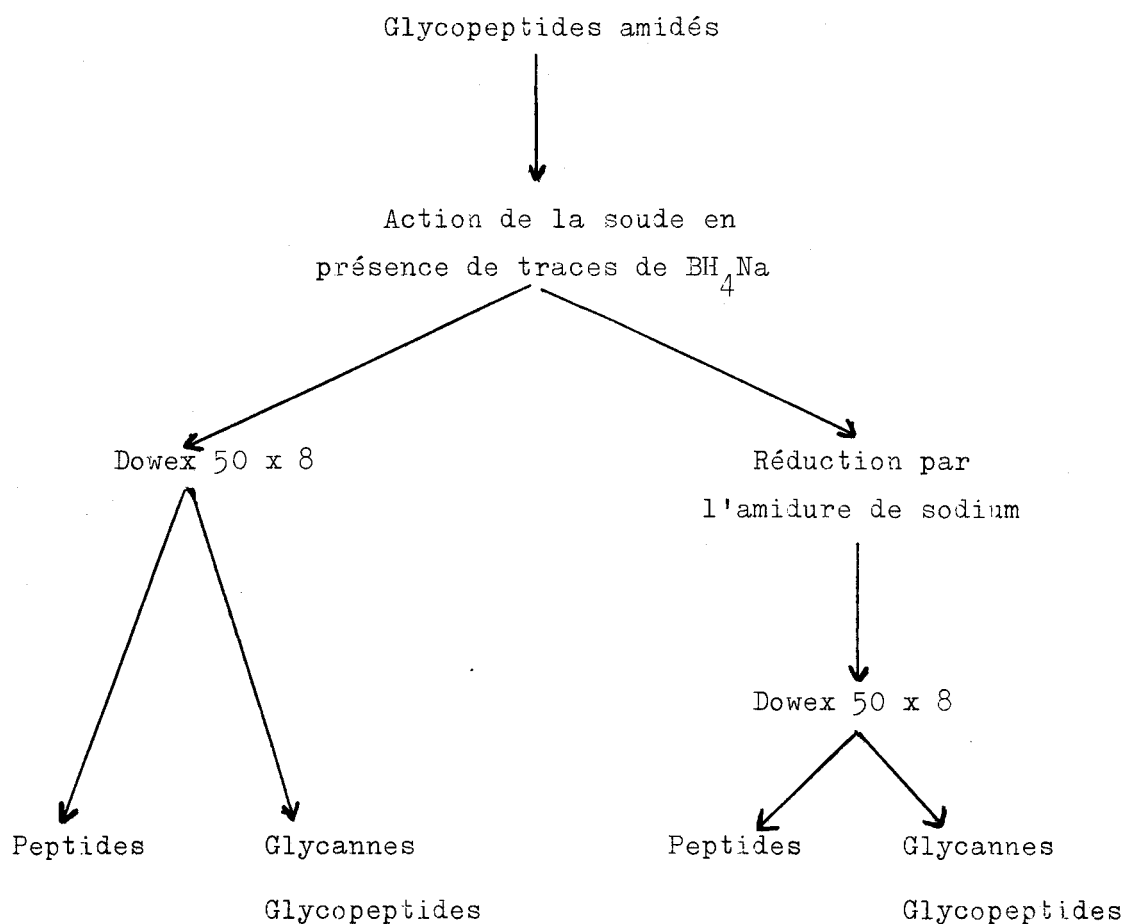


Figure 48 : Schéma de fractionnement utilisé pour la recherche de l'alanine formée au cours de la β -élimination, dans les produits de l'action de la soude sur les glycopeptides.



La masse des glycopeptides totaux calculée à partir du pourcentage de glucides des IgA et du pourcentage d'acides aminés présents dans cette fraction est de 58.600 pour une masse moléculaire des IgA de 385.000. Les glycopeptides alcali-stables en représentent 70 p.100 soit 41.000. Il y aurait donc $- 41.000/3.250$ - environ 12 glycopeptides alcali-stables par molécule d'IgA.

C - ETUDE DES GLYCANNES LIBERES PAR LA SOUDE

La fraction correspondante obtenue par électrophorèse préparative représente 25 p.100 des glycopeptides totaux.

La masse moléculaire moyenne mesurée par filtration sur gel est de 2.000.

La masse moléculaire calculée à partir du rendement de l'électrophorèse préparative et du nombre de résidus de thréonine, sérine et N-acétylgalactosamine détruits est de 1.830.

La composition molaire des glycanes liés O-glycosidiquement (Tableau XLIII, p.206) montre qu'ils ne renferment qu'une molécule de galactosamine impliquée dans la liaison O-glycosidique, et, qu'à la différence des glycanes à liaisons alcali-stables, ils ne renferment pas de mannose et sont plus riches en acide sialique.

IV - COMPARAISON DES GLYCANNES A LIAISONS ALCALI-STABLES ET ALCALI-LABILES.

La composition molaire globale des fractions glycopeptidiques alcali-stables et de la fraction glycanique libérée par la soude - établie sur la base d'une masse moléculaire de 385.000 - d'une part, les masses moléculaires mesurées d'autre part, permettent de déduire une composition moyenne des deux types de glycanes. Cette composition rapportée dans le tableau XLIV (p.210) montre que chacun des glycanes liés O-glycosidiquement est composé essentiellement de galactose et possède vraisemblablement 1 ou 2 résidus d'acide N-acétylneuraminique. Les glycanes à liaison alcali-stables sont plus complexes comme en témoigne la richesse en mannose et en glucosamine. Par contre, leur teneur moyenne en acide N-acétylneuraminique est plus faible.

T A B L E A U X L I V

Compositions molaires moyennes des glycannes à liaisons
alcali-stables et alcali-labiles.

	Glycannes à liaisons	
	Alcali-stables	Alcali-labiles
N-acétylglucosamine	6	1 - 2
N-acétylgalactosamine	0	1
Galactose	1 - 2	4
Mannose	5	0
Fucose	1	1
Acide N-acétylneuraminique	1	1 - 2
Masse moléculaire	3.000	1.800



V - MISE EN EVIDENCE DES LIAISONS DE TYPE N-(β -ASPARYL)-GLUCOSA-MINYLAMINE

La composition des glycopeptides alcali-stables laisse à penser que la liaison glycanne-protide s'effectue par le type classique de liaison entre l'asparagine et la glucosamine. Pour le démontrer, nous avons isolé le chaînon formé de l'ose et de l'acide aminé par hydrolyse partielle des glycopeptides et effectué de nombreux cycles de dégradation d'EDMAN, chaque cycle étant suivi d'une purification sur Sephadex G-25.

L'hydrolyse acide partielle nous a fourni après purification un composé que nous avons caractérisé de la manière suivante :

- 1 - sa mobilité électrophorétique et la coloration gris-bleu qu'il donne avec la ninhydrine sont ceux de la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine.
- 2 - Après hydrolyse du composé par HCl 5,6 N à 100°C, la composition molaire déterminée à l'Autoanalyseur TECHNICON montre la présence d'acide aspartique, de glucosamine et d'ammoniaque en proportions équimolaires.
- 3 - Le composé ne renferme pas d'oses neutres, comme l'a montré la chromatographie sur papier, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2 N pendant 1,5 heures.
- 4 - L'application de la méthode de PARK et JOHNSON (525) montre que le composé n'est pas réducteur. C'est donc la fonction réductrice de la glucosamine qui est conjuguée à l'acide aspartique.
- 5 - Le composé est stable vis-à-vis de la soude. La conjugaison de la fonction semi-acétalique de la glucosamine ne s'effectue pas avec le groupement carboxylique de l'acide aspartique.
- 6 - Plusieurs cycles de dégradation récurrente d'EDMAN conduisent à un PTH-glyco-aminoacide dont l'hydrolyse acide nous a fourni le PTH dérivé de l'acide aspartique sans libérer d'acide aspartique. Ce résultat prouve que c'est la fonction amide de l'asparagine

qui est conjuguée à la glucosamine et non la fonction α -aminoacide qui est impliquée dans la formation du PTH dérivé.

VI - COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES A LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

Nous avons isolé à partir d'hydrolysats pronasiques par filtration sur gel de Sephadex G-50, une fraction glycopeptidique dont la composition, ramenée à un résidu de galactosamine est rapportée dans le tableau XLV (p. 213).

On voit que la composition glucidique de ces glycopeptides est très voisine de la composition globale des glycannes libérés par la soude à partir de la fraction glycopeptidique totale à la différence près que l'on trouve moins d'acide sialique dans les glycopeptides que dans les glycannes.

On note également la présence de thréonine et de sérine, en quantité équimolaire et de deux résidus de proline. Comme il n'y a qu'un résidu de galactosamine par glycannes lié O-glycosidiquement cette composition révèle les amino-acides qui sont présents au voisinage du point d'attache glycanne-protide et l'on remarque que deux résidus de proline se trouvent situés très près de celui-ci.

L'action de la soude et du borohydrure de sodium sur ces glycopeptides réalisée dans les mêmes conditions que précédemment fait disparaître 75 p.100 de la galactosamine et une quantité égale d'hydroxy-aminoacides représentés pour moitié par la sérine et pour l'autre moitié par la thréonine.

4 . - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans la molécule d'IgA du lait de Femme existent deux types de liaisons glycanne-protide :

- les unes, au moins huit, sont alcali-labiles et de type O-séryl et O-thréonyl galactosaminidiques,

- les autres, au nombre de douze environ, sont alcali-stables et de type N-(β -aspartyl)-glucosaminylaminiques.

Ces résultats ont été acquis sur de nombreuses préparations d'IgA provenant à la fois des précipités P₂ (33 p.100 de saturation,

T A B L E A U XLV

Composition molaire d'une fraction glycopeptidique à liaisons O-glycosidiques (rapportée à 1 résidu de N-acétylgalactosamine).

Acide aspartique	0,51
Thréonine	1,1
Sérine	1,12
Acide glutamique	0,35
Proline	1,9
Glycocolle	0,68
Alanine	0,58
N-acétylglucosamine	1,45
N-acétylgalactosamine	1
Galactose	3,7
Fucose	1,02
Acide N-acétylneuraminique	1,07

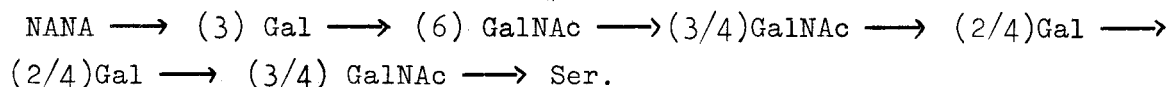


pH 4,6) et P_4 (50 p.100 de saturation, pH 7) , du fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium. Ils ont donc une valeur statistique.

Au type de liaison alcali-labile correspondent des glycanes d'une masse moléculaire de l'ordre de 1.800, qui sont formés d'un résidu de galactosamine impliqué dans l'attache glycanne-protide, de glucosamine, de galactose, de fucose et d'acide N-acétylneuraminique. Ils ne renferment pas de mannose.

Au second type de liaisons, correspondent des glycanes d'une masse moléculaire plus élevée de l'ordre de 3.000, dont la composition globale montre qu'ils sont surtout constitués de glucosamine et de mannose et en proportion moins élevée de fucose, d'acide N-acétylneuraminique et de galactosamine. La présence de cette dernière peut s'expliquer par une β -élimination non quantitative malgré l'amidation des glycopeptides. L'utilisation de soude 0,2 N, borohydrure 0,3 M n'a pas modifié les résultats. La galactosamine peut également provenir de glycanes à liaisons alcali-stables et ce point reste à préciser.

La composition des glycanes liés O-glycosidiquement dans les IgA colostrales humaines et celle des glycanes des IgA humaines sériques de myélome K sont tout-à-fait différentes. DAWSON et CLAMP (526) proposent pour ces derniers la structure linéaire suivante :



On voit que ces glycanes renferment autant de galactosamine que de galactose et qu'ils n'ont pas de fucose.

Des liaisons entre la thréonine et la galactosamine ont également été mises en évidence dans les IgG de lapin par SMYTH et UTSUMI (527). Le groupement glycanique lié de cette manière comprend un résidu de galactosamine, un de galactose et deux d'acide sialique (FANGER et SMYTH) (528). Comme ces auteurs, nous confirmons la présence au voisinage du point d'attache O-glycosidique d'un ou de deux résidus de proline.

Les différents groupements glycaniques n'ont pas été

localisés sur les chaînes d'IgA en particulier sur la chaîne de sécrétion (SC). Néanmoins, d'après les résultats de KOBAYASHI (529) pour une masse moléculaire de 75.000, la masse glycanique liée à la chaîne de sécrétion serait de 11.700 alors que la masse glycanique liée O-glycosidiquement serait d'après nos résultats de 14.600. Il semble donc que toutes les liaisons O-glycosidiques, s'il en existe sur la chaîne de sécrétion, ne soient pas localisées exclusivement sur cette chaîne, d'autant plus que selon KOBAYASHI (530), la chaîne de sécrétion libre renferme 3,95 p.100 de mannose et que les glycannes que nous avons isolé par β -élimination n'en renferment pas.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° - Le fractionnement du lactosérum humain par le sulfate d'ammonium nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- a - Il est impossible de préparer des composés à l'état pur au moyen de cette seule étape qui a néanmoins l'avantage de permettre l'enrichissement simultané en plusieurs protéides dont elle préserve l'intégrité : IgA, lactotransferrine, glycopeptides, lactalbumine, sérum-albumine, contrairement à d'autres procédés qui sont axés particulièrement sur la préparation d'un composant : par exemple, la méthode au rivanol pour les globulines immunes.
- b - La composition glucidique des différents précipités montre que ceux-ci renferment des quantités variables de galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine, N-acétyl-galactosamine, acide N-acétylneuraminique. Seul le précipité P₁₀ ne renferme pas de mannose. Par contre, le fucose se trouve dans tous les précipités. Cela laissait augurer que ce monosaccharide devait être présent dans la plupart des glycoprotéides et non pas seulement dans les glycopeptides appelés "gynolactofucoïdes", comme on le pensait autrefois.
- On remarque une certaine constance dans la composition glucidique des précipités comme en témoignent les rapports oses neutres/hexosamines, oses neutres/acide sialique.
- On note enfin qu'aucun groupement glycanique de glycoprotéide ne renferme de glucose. L'hypothèse d'une relation métabolique entre les glycoprotéides et les oligosaccharides du "gynolactose" est donc à rejeter.
- c - L'analyse des précipités par électrophorèse de zone sur différents supports et par immunoelectrophorèse confirme la complexité du système protéique du lactosérum humain. La révélation des électrophorégrammes au moyen du réactif P.A.S. montre que les glycoprotéides

sont représentés essentiellement par les IgA, la lactotransferrine, les glycopeptides, la chaîne de sécrétion libre. Il s'avère donc, qu'à l'exception de la lactalbumine, tous les protéides majeurs du lactosérum humain sont des glycoprotéides.

d - Le protéide le plus facilement purifiable est un composé soluble dans l'eau, à froid, qui précipite à température ambiante, et que nous avons isolé par précipitations successives à partir du précipité P_1 . Il ne renferme ni glucides, ni phosphore et a été isolé également par SCHADE et REINHART (531) à partir du lactosérum entier ; il a été baptisé galactothermine par ces auteurs qui ont en outre établi ses principales caractéristiques physico-chimiques.

2° - La purification des différents précipités par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G-150, G-100 et G-50 nous a donné d'excellents résultats.

a - L'utilisation du Sephadex G-150 pour le précipité P_4 nous a procuré en particulier une préparation d'IgA pure. Les autres précipités riches en IgA : P_1 et P_2 , purifiés dans les mêmes conditions fournissent des préparations d'IgA contaminées par la chaîne de sécrétion libre et par des glycopeptides.

b - L' α -lactalbumine a été obtenue à l'état pur à partir du précipité P_2 sous forme de préparations dont l'arc immunoélectrophorétique présente une cassure côté cathodique et anodique. Ces irrégularités semblent correspondre à la présence de zones cathodiques et anodiques flanquant la zone principale en électrophorèse sur acétate de cellulose, gélose et gel de polyacrylamide. Le lait maternel semble donc renfermer des composés mineurs antigéniquement apparentés à la lactalbumine. Ces composés n'ont pas été isolés, aussi nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse de l'existence d'un polymorphisme de la lactalbumine, polymorphisme qui n'a jamais été signalé par d'autres auteurs.

c - La sérum-albumine a été purifiée également. Des traces de composés antigéniquement apparentés à la sérum-albumine ont été mis en évidence. Il pourrait s'agir de complexes sérum-albumine-lactotransferrine.

- d - La lactotransferrine ne peut être efficacement purifiée par filtration sur gel même en présence de tampon de force ionique élevée. Elle reste en effet associée à des glycopeptides et à la chaîne de sécrétion libre.
- e - Les glycopeptides ne peuvent pas non plus être dissociés de l' α_1 -antitrypsine par simple filtration sur gel. Cette technique est de plus impuissante à réaliser un fractionnement de ces composés. Les glycopeptides ne peuvent être isolés lorsqu'on effectue directement une filtration du lactosérum concentré sur Sephadex G-150.
- f - Le lactosérum renferme une certaine quantité de peptides riches en phosphore.

3° - Si l'association relargage par le sulfate d'ammonium-filtration sur gel du lactosérum permet la préparation de la plupart des protéides dans un état de pureté acceptable, l'utilisation des échangeurs d'ions demeure importante d'une part, pour ôter les dernières traces d'impureté, d'autre part, pour effectuer des préparations à grande échelle. Les moyens utilisés pour purifier les principaux glycoprotéides ont été les suivants :

- a - L'application du procédé original de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET pour la préparation de la lactotransferrine humaine (relargage par le sulfate d'ammonium et chromatographie sur une résine carboxylique, l'Amberlite XE-64, fournit des échantillons de lactotransferrine pure avec un rendement de 70 à 85 p.100. Une tentative d'amélioration de la méthode, qui consistait à substituer à l'Amberlite XE-64, la DEAE-cellulose, a échoué, car celle-ci dénature le protéide. Il s'agit d'ailleurs d'un phénomène général et il nous semble que la plus grande prudence doive être observée dans les applications de la DEAE-cellulose à la chromatographie des protéides. Au contraire, l'emploi de la CM-cellulose nous a permis d'obtenir des préparations de lactotransferrine pure, avec un rendement qui atteint 90 à 95 p.100. Des fractionnements réalisés d'une manière quantitative nous conduisent à fixer entre 1,1 et 1,25 g p.litre la concentration de la lactotransferrine du lait de femme.

Ces valeurs sont supérieures à celles de BLANC (0,6 g) et sont en accord avec celles de MONTREUIL et al. qui fixaient la teneur en lactotransferrine entre 1 et 1,5 g par litre de lait total de Femme.

- b - L'utilisation de la chromatographie d'échange d'ions pour la préparation des IgA ne nous a pas satisfait car cette méthode provoque le plus souvent un "découpage" difficilement contrôlable de la famille des IgA. Ce fait est évident en ce qui concerne le DEAE-Sephadex et la DEAE-cellulose. La CM-cellulose ne produit pas de fragmentation et donne une bonne séparation lactotransferrine-IgA mais ces dernières demeurent contaminées par des glycopeptides. La purification du précipité P₄ sur Sephadex G-150 nous semble donc être une méthode de choix pour préparer des IgA pures. Nous avons montré que la composition glucidique de ces préparations était, d'une part, parfaitement reproductible, d'autre part, tout à fait comparable à celle des préparations obtenues à partir de P₁ et P₂ par filtration sur gel et reprecipitation par relargage au sulfate d'ammonium pour éliminer les dernières traces de glycopeptides.
- c - Les glycopeptides souillés d' α_1 -antitrypsine sont débarassés de celle-ci par chromatographie sur SE-SEPHADEX. Le fractionnement de ces glycopeptides par électrophorèse préparative en veine liquide nous a montré que l'on se trouvait en présence d'une série continue de composés de composition glucidique variable. Il est toujours possible d'extraire de cette famille un élément dont la composition ne sera qu'un reflet d'une palette très étendue.
- d - Nous ne sommes pas parvenus à obtenir la chaîne de sécrétion libre dans un état de pureté satisfaisant à l'issue des trois stades de purification suivants : relargage par le sulfate d'ammonium, filtration sur gel, chromatographie sur échangeurs d'ions.
- e - L' α_1 -antitrypsine sérique a été isolée à partir du précipité P₁₀ par filtration sur gel de Sephadex G-50 et chromatographie sur SE-Sephadex. Ce protéide n'existe dans le lait humain qu'à l'état de traces, il est donc peu probable qu'il y joue un rôle important.

4° - Les IgA, la lactotransferrine et vraisemblablement la chaîne de sécrétion ont la propriété de se complexer avec les glycopeptides que nous avons caractérisés dans les derniers précipités du fractionnement par le sulfate d'ammonium.

a - Ceci a été démontré pour les IgA qui, isolées directement du lactosérum par simple filtration sur gel de Sephadex G-150 ont une composition glucidique identique à celle d'un mélange composé de 83 p.100 d'IgA et 17 p.100 de glycopeptides. En outre, la reprécipitation de cette préparation d'IgA par le sulfate d'ammonium fait apparaître des glycopeptides. Ces IgA contiennent également de la chaîne de sécrétion libre.

b - La formation de complexes avec les glycopeptides a été démontrée d'une autre manière pour la lactotransferrine. En ajoutant des glycopeptides à de la lactotransferrine purifiée on rend à celle-ci la mobilité électrophorétique qu'elle possédait à l'état "naturel". Cette mobilité électrophorétique ne varie d'ailleurs pas progressivement mais possède 2 valeurs bien définies qui correspondent aux lactotransferrines combinées et non combinées. Inversement, la composition glucidique de la lactotransferrine "naturelle" isolée à partir du précipité_{P₉} témoigne que cette dernière est combinée à des glycopeptides. La chaîne de sécrétion s'associe également à la lactotransferrine et nous avons pu isoler des traces de complexe au cours de la purification de celle-ci sur Sephadex G-100.

c - Nous avons démontré que la chaîne de sécrétion se présente également sous deux formes de mobilités électrophorétique différentes dont la plus rapide pourrait être un complexe de ce glycoprotéide avec des glycopeptides.

5° - Nous avons contribué à établir les compositions centésimales et molaires en glucides des principaux glycoprotéides du lactosérum :

a - La lactotransferrine en collaboration avec SPIK (532) et BRAZIER (533).

b - Les IgA pour lesquelles nous avons proposé une composition glucidique "statistique" et montré la présence de galactosamine qui a été

dosée par différentes méthodes.

- c - Les glycopeptides dont l'étude réalisée en collaboration avec GRIMMONPREZ (534) a révélé la grande diversité de composition glucidique cela malgré deux points communs : l'absence de mannose et la richesse en galactosamine.

La composition en glucides de la chaîne de sécrétion a été établie d'une manière précise par KOBAYASHI (535) qui n'a malheureusement pas donné la composition en hexosamines.

- 6° - Notre contribution à l'étude des groupements glycaniques des glycoprotéides du lait de Femme nous permet de proposer une classification de ces glycannes :

- a - Glycannes à mannose et à liaison asparaginyglucosamine alcali stable qui se trouvent dans la lactotransferrine (2)(SPIK)(536) et dans les IgA (12), leur masse moléculaire serait assez élevée : 3000 dans le cas des IgA.
- b - Glycannes sans mannose et à liaison O-séryl et O-thréonyl galactosaminidique : ils seraient au nombre de 8 dans les IgA (4 O-séryl et 4 O-thréonyl) et en nombre encore indéterminé dans les glycopeptides et la caséine kappa. On note une certaine parenté de composition entre ces glycannes (Tableau XLVI, p. 222) dont la masse moléculaire serait plus faible - 1.800 pour les IgA -. La séquence au voisinage du point d'attache n'a pas été établie mais nous avons remarqué la présence de deux résidus de proline à proximité de ce point d'attache dans les IgA.

Nous soulignerons pour terminer qu'au rôle nutritionnel évident du lait s'ajoute un rôle "dynamique" peut être plus important pour lequel la sécrétion lactée est spécifiquement adaptée. Si la protection de la paroi intestinale du mammifère nouveau-né est toujours un problème important, chez le nourrisson ce problème ne se complique pas comme chez le Veau ou le Porcelet par la nécessité de constituer rapidement un potentiel immunitaire sérique. Le lait maternel est donc

T A B L E A U XLVI

Composition centésimale en glucides des glycannes à liaisons O-glycosidiques isolés des IgA, de la caséine et des glycopeptides.

	Glycannes d'IgA	Glycopeptides	(*) Caséino- glycopeptides
Galactose	35	28,5	25,6
Fucose	9	7,1	5,8
Galactose/Fucose	3,6	3,6	4,4
N-acétylglucosamine	15,3	18,3	16,2
N-acétylgalactosamine	10	6,55	8,1
N-acétylglucosamine/ N-acétylgalactosamine	1,5	2,8	2
Acide N-acétylneuraminique	22	9,5	4,5
Oses neutres/acide N-acétyl- neuraminique	2	3,74	7

(*) d'après MALPRESS et SEID-AKHAVAN (537).



constitué essentiellement de substances capables d'assurer la défense de la muqueuse intestinale contre des agents microbiens et, parmi celles-ci, les IgA jouent un rôle très important, puisque ces anticorps sont considérés par TOMASI (538) comme la première ligne de défense de toutes les interfaces milieu interne - milieu externe.

Les IgA synthétisées sous forme 11 S (BIENENSTOCK et STRAUSS) (539), vraisemblablement sur place, comme cela a été démontré pour d'autres sécrétions humaines (TOURVILLE)(540) et pour la sécrétion lactée de la lapine (LAWTON et al.) (541), sont dotées des qualités nécessaires pour opérer dans l'intestin : résistance à la protéolyse (SOUTH (542), CEDERBLAD et al. (543), KENNY et al. (544), TOMASI et CZERWINSKI (545), WILSON et al. (546), COUNITCHANSKY et al. (547), BROWN et al. (548)) et aptitude à se passer du complément (SOUTH)(549). Ces qualités leur seraient apportées par la chaîne de sécrétion (TOMASI et CZERWINSKI)(550). La chaîne de sécrétion libre qui s'associe également à la lactotransferrine pourrait conférer les mêmes propriétés de résistance à ce glycoprotéide dont le pouvoir bactéricide a également été démontré.

On remarque que ces substances "dynamiques" sont des glycoprotéides dont le caractère glycoprotéidique se trouve encore renforcé par l'adsorption de glycopeptides qui pourraient jouer un rôle d'adjuvant pour la protection et pour le fonctionnement des dites molécules. Celles-ci pourvues de nombreux groupements glycaniques seraient mieux solvatées et par conséquent mieux adsorbées sur la surface des muqueuses à protéger.

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

- ABELLI G., *Panminerva Med.*, 1962, 4, 181 (52).
- ABRAHAM G., *Jb. Kinderheilk.*, 1929, 125, 160 (103).
- ADAMS J.M., KINBALL A.C. et ADAMS F.H., *Amer. J. Dis. Child.*, 1947, 74, 10 (97).
- ADINOLFI M., GLYNN A.A., LINDSAY H. et MILNE C.M., *Immunology*, 1966, 10, 517 (110).
- ALAIS C. et JOLLES P., *Nature*, 1962, 196, 1098 (291, 303, 306, 365).
- ALAIS C. et JOLLES P., *C.R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 2309 (288).
- ALAIS C. et JOLLES P., *J. Chromatog.*, 1969, 44, 573 (292).
- ALLEN F.W., *Biochem. J.*, 1940, 34, 858 (386).
- AMINOFF D., *Biochem. J.*, 1961, 81, 384 (475)
- AMMANN A.J. et STIEHM E.R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, 122, 1098 (149, 152).
- ANDERSON B., SENO N., SAMPSON P., RILEY J.G., HOFFMAN P. et MEYER K., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, PC 2716 (512)
- ANDREWS P., *Biochem. J.*, 1969, 111, 14 P (326)
- ARNON H., SALZBERGER M. et OLITZKI A.L., *Pediatrics*, 1959, 23, 86 (91, 107).
- AXELSSON H., JOHANSSON B.G. et RYMO L., *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20, 2339 (191, 407, 484, 490, 491, 494).
- BAILLEUX R.E. et IMHOF J.W. in "H. PEETERS Ed., *Protides of the Biological Fluids*, Proceedings of the 9th Colloquium, Bruges, 1961, Elsevier Amsterdam, 1962, p. 266 (72).
- BARMAN T.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 214, 242 (322, 325, 416).
- BAUER J., *Z. Exp. Pathol. Therap.*, 1910, 7, 417 (32).
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., *Analyst.*, 1954, 79, 201 (377).
- BELL K., Mc KENZIE H.A., MURPHY W.H. et SHAW D.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 214, 427 (346).
- BERKOROVAINY A., GROHLICH D. et PINTER J.K., *J. Agr. Food Chem.*, 1970, 18, 624 (461).

- BIENENSTOCK J. et STRAUSS H., *J. Immunol.*, 1970, 105, 262 (539).
- BISERTE G., BRETON A. et FONTAINE G., *Semaine Hôp. Paris*, 1955, 31, 393 (396).
- BISERTE G., HAVEZ R., DAUTREVAUX M., LEROY N. et VALDIGUIE P., *Ann. Biol. Clin.*, 1962, 20, 855 (469).
- BISERTE G. et MASSE L., *C.R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 664 (394).
- BLANC B., 1964, Thèse Université de Lausanne. Editions Médecine et Hygiène. Genève (189, 500).
- BLANC B., in "PEETERS H., *Protides of the Biological Fluids*", Elsevier éd., Amsterdam, 1966, 14, 125 (260, 267).
- BLANC B., BUJARD E. et MAURON J., *Experientia*, 1963, 19, 299 (252).
- BLANC B. et ISLIKER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 929 (209, 214, 218, 221, 228, 236, 242, 247, 266, 406, 431, 444).
- BLOCK R.J. et ZWEIG G., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 48, 386 (240a).
- BRANDTZAEG, *Nature*, 1968, 220, 292 (174, 180).
- BRANDTZAEG, *Immunochemistry*, 1970, 7, 127 (181).
- BRANDTZAEG P., *Acta path. microbiol. Scand., Section B*, 1971, 79, 165 (183).
- BRANDTZAEG P., FJELLANGER I. et GJERULDSEN S.T., *Scand., J. Haemat.*, 1970, Suppl. 12, 83 (182).
- BRAZIER J., *Diplôme Etudes Approfondies*, Lille, 1970, (428, 437, 440, 533)
- BREW K. et CAMPBELL P.N., *Biochem. J.*, 1967, 102, 258 et 265 (327b).
- BREW K. et HILL R.L., *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4559, (328).
- BREW K., CASTELLINO F.J., VANAMAN T.C. et HILL R.L., *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4570 (328).
- BRODBECK U., DENTON W.L., TANAHASHI N. et EBNER K.E., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1391 (311, 320).
- BRODBECK U. et EBNER K.E., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 762 (313).
- BROWN W.R., NEWCOMB R.W. et ISHIZAKA K., *J. Clin. Invest.*, 1970, 49, 1374 (548).
- CANER F., *Communication personnelle* (389).

- CANTARUTTI F., *Acta Paed. Lat.*, 1954, 7, 198 (23).
- CARLSTROM A., *Acta Chem. Scand.*, 1969, 23, 185 (342).
- CASTAIGNE M., *Sem. Med.*, 1897, 17, 429, (100).
- CEDERBLAD G., JOHANSSON B.G., *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20, 2349 (169,543).
- CHANDAN R.C., PARRY R.M. et SHAHANI K.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 110, 389 (331).
- CHANDAN R.C., SHAHANI K.M. et HOLLY R.G., *Nature*, 1964, 204, 76 (332).
- CHERON A., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, 135 (81).
- CHODIRKER W.B. et TOMASI T.B. Jr., *Science*, 1963, 142, 1080, (157).
- COUNITCHANSKY Y., BERTHILLIER G. et GOT R., *Clin. Chim. Acta*, 1970, 30, 83 (547).
- CUTRONEO A. et MACCHIA A., *Clin. Pediat., Bologna*, 1956, 38, 553 (24).
- CUTRONEO A., PUSTORINO D. et LIOTTA J., *Aggiom. Pediat.*, 1956, 7, 233 (25).
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 149 et 444 (383).
- DAVIES W.L., *The Chemistry of Milk*, CHAPMAN et HALL éd., Londres, 1939 (1)
- DAWSON G. et CLAMP J.R., *Biochem. J.*, 1968, 107, 341 (526).
- DEBRE R., RAMON G., LEVY-SOLAL E. et THIROLOIX P.L., *Nourrisson*, 1930, 18, 235 (84).
- DEUTSCH H.F., *J. Biol. Chem.*, 1947, 169, 437 (393).
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 189, (380).
- DOBIAS G., BALLO T. et KEMENYVARI J., *Z. Immun. Forsch.*, 1957, 114, 105 (96).
- DREYWOOD R., *Ind. Eng. Chem. Anal. (Ed.)*, 1946, 18, 499 (473).
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMYTH F., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350 (505, 509).
- DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., *C.R. Acad. Sci.*, 1965, 261, 1430 (523).
- DURRUM E.L., PAUL M.H. et SMITH E.R.B., *Science*, 1952, 116, 428 (391).
- EBNER K.E., DENTON W.L. et BRODBECK U., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 24, 232 (314).

- EBNER K.E., TANAHASHI N. et BRODBECK U., Fed. Proc., 1967, 26, 558 (327a)
- FANGER M.W. et SMYTH D.G., Biochem. J., 1972, 127, 757 (528).
- FAURE A. et JOLLES P., F.E.B.S. Letters, 1970, 10, 237 (334)
- FERRANTE L., Acta Paed. Lat., 1953, 6, 80 (22).
- FERRI R.G. et TUTIYA T., Hospital (Rio de Janeiro), 1959, 55, 265 (37,125)
- FIAT A.M., ALAIS C. et JOLLES P., Chimia, 1968, 22, 137 (282).
- FILIPE da SILVA J.A. et MONTEIRO C.C., Bull. Soc. Chim. Biol., (1959-1960) 41, 1707 (44, 123, 124).
- FLODIN P. et KILLANDER J., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 403 (408).
- FROMAGEOT C. et JOLLES P., *Experientia*, 1955, Suppl. II, 182 (329)
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 970 (476).
- GELOTTE B., FLODIN P. et KILLANDER J., Arch. Biochem. Biophys., 1962, Suppl. 1, 319 (471).
- GENDERSEN J.H. Von, Z. Immun. Forsch., 1934, 83, 54 (88).
- GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H. et STROMINGER J.L., Biochemistry, 1965, 4, 2245 (507).
- GLYNN A.A., 1966, dans Exposés annuels de Biochimie Médicale (publiés sous la direction de P. BOULANGER, M.F. JAYLE, J. ROCHE) 27ème série, pp. 111-128, Masson, Paris (335, 336).
- GONZAGA A.J., WARREN R.J., et ROBBINS F.C., Pediatrics, 1963, 32, 1039 (114).
- GORDON W.G., ASCHAFFENBURG R., SEN A. et GHOSH S.K., J. Dairy Sci., 1968, 51, 947 (321, 414).
- GORDON A., KEIL B. et SEBESTA K., Nature, 1949, 164, 498 (387).
- GOT R., in "PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier Ed., Amsterdam, 1964, 12, 385 (258).
- GOT R., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 432 (210, 310, 345, 368, 371, 398, 400, 419, 445).
- GOT R., FONT J. et BOURRILLON R., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 367 (349, 355).

- GOT R., FONT J., BOURRILLON R. et CORNILLOT P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 74, 247 (353, 359, 455).
- GOT R., FONT J. et MARNAY A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 417 (351, 356, 457).
- GOT R., GOUSSAULT Y. et FONT J., *Carbohydrate Res.*, 1966, 3, 157, (248, 256, 264).
- GOT R., GOUSSAULT Y. et MARNAY A., *Clin. Chim. Acta*, 1965, 11, 383 (344).
- GRAHAM E.R.B., Mc KENZIE H.A., MURPHY W.H. et SYMONS L., 1970, en pré-
paration (280).
- GRIMMONPREZ L., Diplôme d'Etudes Approfondies, Lille, 1966 (452, 453, 534).
- GRIMMONPREZ L., *C. R. Acad. Sci.*, 1966, 263 D, 1269 (14).
- GRIMMONPREZ L., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, 39 (9, 20, 354).
- GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., *Eur. J. Biochem.*, 1970, 13, 484 (18).
- GRIMMONPREZ L. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 843 (15)
- GRIMMONPREZ L. et MONTREUIL J., *International Symposium IV, Chromatographie Electrophorèse*, Presses Acad. Europ. éd., Bruxelles, 1968, 372 (16).
- GRIMMONPREZ L., TAKERKART G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., *C. R. Acad. Sci.*, 1967, 265 D, 2124 (17).
- GROVES M.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3345 (427).
- GROVES M.L. et GORDON W.G., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 140, 47 (301).
- GROVES M.L. et TOWNEND R.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 139, 406 (302)
- GRÜTTNER R., SCHÄFER K.H. et SCHRÖTER W., *Klin. Wochschr.*, 1960, 38, 1162 (208, 222).
- GUGLER E., BOKELMANN G., DATWYLER A. et Von MURALT G., *Schweiz. Med. Wochschr.*, 1958, 88, 1264 (34, 121, 144).
- GUGLER E. et von MURALT G., *Schweiz. Med. Wochschr.*, 1959, 89, 925 (38, 69, 126, 151).
- HAENEL H., GOLDBACH W., GRUTTE F.K., *Ernährungsforsch*, 1963, 8, 282 (338).
- HALPERN M.S. et KOSHLAND M.E., *Nature*, 1970, 228, 1276 (186).
- HALWER M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 51, 70 (272).

- HANSON L. Å., *Experientia*, 1959, 15, 471 (57).
- HANSON L. Å., *Experientia*, 1959, 15, 473 (39, 127, 145, 418, 464).
- HANSON L. Å., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1959, 15, 245 (128).
- HANSON L. Å., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1960, 17, 45 (40, 46, 59, 60, 63, 68, 133, 148).
- HANSON L. Å., *Med. Thesis, University of Göteborg*, 1961, Göteborg (50, 61, 137).
- HANSON L. Å., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1961, 18, 241 (49, 55, 136, 142, 397).
- HANSON L. Å. et BERGGÅRD I., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 828 (139).
- HANSON L. Å. et JOHANSSON B.G., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1959, 15, 257 (41, 129).
- HANSON L. Å. et JOHANSSON B.G., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1962, 20, 65 (53, 140, 496).
- HANSON L. Å. et JOHANSSON B.G., in "Gammaglobulins, Structure and Control of Biosynthesis" Nobel Symposium 3, 1967, p. 241, Almquist et Wiksell, Uppsala, Suède (165, 482).
- HANSON L. Å. et JOHANSSON B.G., in "Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology (Mc KENZIE H.A. Ed.), 1970, Vol. 1, p. 45 - 123, Academic Press, New York and London (155).
- HARBON S., HERMAN G. et CLAUSER H., *Communication personnelle ; S. HARBON, Thèse Doct. Sci., Paris*, 1967 (519).
- HAVEZ R., BISERTE G., LEROY N., LATURAZE J. et BONIFACE L., *Path. Biol.*, 1961, 9, 1689 (468).
- HAVEZ R., MUH J.P., BONTE M. et BISERTE G., *Clin. Chim. Acta*, 1967, 15, 7 (162, 164, 193, 492, 499).
- HEILMEYER L., KEIDERLING W. et WOHLER F., *Klin. Wschr.*, 1957, 35, 690 (270).
- HEIMBURGER N., HEILE K., HAUPT H. et SCHULTZE H.E., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 10, 293 (486).
- HEKMAN A.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 251, 380, (417a, 450).
- HEYNDRIKX G.V. et de VLEESCHAUER A., *Biochim. Biophys. Acta* 1951, 6, 487 (75).

- HINDLE E.J. et WHEELCOCK J.V., *Biochem. J.*, 1970, 119, 14 P (323, 415).
- HIRANO S., HAYASHI H., MASUDA F. et ONODERA K., *Agr. Biol. Chem.*, 1966, 30, 212 (352, 458).
- HIRANO S., HAYASHI H., TERABAYASHI T., ONODERA K., ISEKI S., KOCHIBE N., NAGAI Y., YAGI N., NAKAGAKI T. et IMAGAWA T., *J. Biochem.*, 1968, 64, 563 (357, 459).
- HIRS C.H.W., in "*Meth. Enzymol.*" COLOWICK S.P., et KAPLAN N.O., 1955, 1, 113 (425).
- HODES H., *Antibiot. News*, 1964, 1, 1 (108, 118).
- HODES H.L., *J. Pediat.*, 1964, 65, 319, (116).
- HODES H.L., BERGER R. et HEVIZY M., *Amer. J. Dis. Child.*, 1962, 104, 457 (115).
- HONG R., POLLARA B. et GOOD R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1966, 56, 602 (163).
- HOPPER K.E. et Mc KENZIE H.A., in "*Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology* (Mc KENZIE H.A. Edit.) Vol. II, p. 469-482, Academic Press, New York and London, 1971 (324).
- HOREJSI J. et SMETANA R., *Chem. Listy*, 1954, 48, 758, (402).
- HOWE P.E., *J. Biol. Chem.*, 1921, 49, 115; 1922, 52, 51 ; 1922, 53, 479 ; *J. Exp. Med.*, 1924, 39, 313 (79).
- HUMMELER K., *Science*, 1953, 118, 781 (111, 119).
- HYTTEN F.E., REITHEL F.G., FLETCHER E. et MALPRESS F.M., *Biochem. J.*, 1954, 58, XXII (10).
- JAGO G.R. et MORRISSON M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 111, 585, (343).
- JANOFF A. et ZWEIFACH B.W., *J. Exp. Med.*, 1960, 112, 23 (271).
- JENNESS R., in "*Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology*". Mc KENZIE H.A. Ed., Vol. I, p. 17-43, Academic Press, New York and London, 1970,(347, 360).
- JENNESS R. et SLOAN R.E., *Dairy Sci., Abstr.*, 1970, 32, 599 (286a).
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 1108, (204).
- JOHANSSON B.G., *Nature*, 1958, 181, 996 (35, 67, 205, 308).

- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 510, (207, 217, 220, 235, 244, 442).
- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1969, 23, 683 (212, 429, 430, 446).
- JOHN M., TRENEL G. et DELLWEG H., J. Chromatog., 1969, 42, 476, (508).
- JOLLES P., ALAIS C., ADAM A., DELFOUR A. et JOLLES J., Chimia, 1964, 18, 357 (279).
- JOLLES P., ALAIS C. et JOLLES J., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 56 (278, 283).
- JOLLES P. et JOLLES J., Nature, 1961, 192, 1187 (330).
- JOLLES J. et JOLLES P., Helv. Chim. Acta, 1969, 52, 2671 (333).
- KARTE H., Monatsschr. Kinderheilk., 1959, 107, 265 (42, 70, 130).
- KEIMOWITZ R.I., J. Lab. Clin. Med., 1964, 63, 54 (158).
- KENNY J.F., BOESMAN M.I. et MICHAELS R.H., Pediatrics, 1967, 39, 202, (170, 544).
- KOBAYASHI K., Immunochemistry, 1971, 8, 785 (176, 185, 196, 198, 199, 472, 487, 498, 529, 530, 535).
- KOÏW E. et GRÖNWALL A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, 4, 244 (390).
- KRESHECK G.C., Acta Chem. Scand., 1965, 19, 375 (273).
- KUHN R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 (6).
- KUWATA T., NIKI R. et ARIMA S., J. Agric. Chem. Soc. Japan, (1969), 43, 183 (284).
- LAWTON A.R., ASOFSKY R. et MAGE R.G., J. Immunol., 1970, 104, 397 (541).
- LECLAINCHE X., Thèse Paris, 1927 (98).
- LEMETAYER E., NICOL L., GRASSET J., GAUTHIER R. et PIALOUX J., Bull. Acad. Nat. Med. (Paris), 1950, 134, 22 (85, 86).
- LEMETAYER E., NICOL L., JACOB L., GIRARD O. et CORVAZIE R., C. R. Soc. Biol., Paris, 1948, 142, 726 (86).
- LEVY G.A. et Mc ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127 (518).
- LEY J.M. et JENNESS R., Arch. Biochem. Biophys., 1970, 138, 464 (319).
- LIEBLING J. et SCHMITZ H., J. Pediat., 1943, 22, 189 (87).
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., Anal. Biochem., 1967, 19, 80 (378, 517).

- LUNSFORD J. et DEUTSCH H.F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 96, 742, (66, 82).
- Mc CABE E.M., Ph. D. Thesis, Michigan State University, 1967, (285).
- Mc KINLAY A.G. et WAKE R.G., in "Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology (Mc KENZIE H.A., Ed.,) Vol. II, p. 175-215, Academic Press, 1971, New York and London, (276).
- MAENO M. et KIYOSAWA I., Biochem. J., 1962, 83, 271 (309, 409).
- MAENO M. et KIYOSAWA I., Nippon Nogei Kagaku Kaishi , 1962, 36, 957 (403)
- MALMNAS C., LOFGREN S. et ADAMSON C.A., Svenska Lak. Tidn., 1951, 48, 1737 (92, 106).
- MALMQUIST J. et JOHANSSON B.G., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 236, 38 (449)
- MALPRESS F.H. et HYTTEN F.E., Nature, 1957, 180, 1201 (11).
- MALPRESS F.H. et HYTTEN F.E., Biochem. J., 1958, 68, 708 (12).
- MALPRESS F.H. et HYTTEN F.E., Biochem. J., 1964, 91, 130 (289).
- MALPRESS F.H. et MORRISSON A.B., Nature, 1952, 169, 1103 (13).
- MALPRESS F.H. et SEID-AKHAVAN M., Biochem. J., 1966, 101, 764 (281,290, 295, 296, 304, 305, 307, 358, 460, 463, 537).
- MANNIK M., J. Immunol., 1967, 99, 899 (73, 417).
- MANWELL C., Comp. Biochem. Physiol., 1967, 23, 383 (340).
- MASSON P.L., La Lactotransferrine - Protéine des Sécrétions Externes et des Leucocytes Neutrophiles, Arscia, Bruxelles, 1970 (448).
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., in "PEETERS H., Protides of the Biological Fluids" Elsevier Ed., Amsterdam, 1966, 14, 115 (211, 268, 443).
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., European J. Biochem., 1968, 6, 579 (224,229).
- MATHIEU H., in "Manuel d'Analyse Chimique Volumétrique", MASSON et Cie, p. 153 (385).
- MELLANDER O., Biochem. Z., 1939, 300, 240 (277).
- MELLANDER O., Nature, 1945, 155, 604 (287).
- MESTECKY J., ZIKAN J. et BUTLER W.T., Science, 1971, 171, 1163 (187).
- MICHAELS R.H., J. Immunol., 1965, 94, 262 (117).
- MONSIGNY M., C.R. Symposium, Technicon, Paris, 1965 (384, 477).

- MONSIGNY M., Thèse Doct. Sci., Lille, 1968 (515, 520).
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 857 (504, 521).
- MONTREUIL J., 3ème Coll. Hop. St Jean Brugges, 1955, 209, (23a).
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1399, (3, 7).
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G. et LEROY N., C. R. Acad. Sci, 1961, 252, 4065 (250, 254a).
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 732 (134, 153, 362, 363, 366, 367, 370, 421, 424, 465, 466, 467, 479, 493, 501).
- MONTREUIL J. et HOLLEMAN J., C.R. Acad. Sci., 1956, 243, 1069 (2, 21, 348, 350, 361, 422, 451, 456).
- MONTREUIL J. et MULLET S., C. R. Soc. Biol., 1959, 153, 1364 (4).
- MONTREUIL J. et MULLET S., C. R. Acad. Sci., 1960, 250, 1736 (212a, 212d, 215, 233).
- MONTREUIL J. et MULLET S., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 365 (26, 27, 28).
- MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosage des glucides, Fasc. 1 : Méthodes Colorimétriques des glucides totaux. Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci. éd., Lille, 1963 (373).
- MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T., C. R. Acad. Sci., 1967, 264D, 2068 (510).
- MONTREUIL J., SPIK G. et KONARSKA A., Methodes Chromatographiques de dosage des oses "Neutres". Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille, 1967 (374).
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (206, 212b, 213, 216, 219, 227, 234, 241, 246, 265, 364, 420, 432, 434, 435, 438, 441, 462).
- MOORE S. et STEIN W., J. Biol. Chem., 1954, 211, 893 (506).
- MORO E., Wien. Klin. Wochschr., 1901, 14, 1073 (30).
- MORRISSON J.F. et EBNER K.E., J. Biol. Chem., 1971, 246, 3977 (315).
- MORRISSON J.F. et EBNER K.E., J. Biol. Chem., 1971, 246, 3985 (316).
- MORRISSON J.F. et EBNER K.E., J. Biol. Chem., 1971, 246, 3992 (317).

- MUH J.P., Thèse Méd. Lille, 1966 (192, 369, 372, 399, 401, 480, 485, 489).
- van MUNSTER P.J.J., STOELINGA G.B.A. et POELS-ZANDERS S., *Immunology*, 1969, 17, 165 (175, 179, 412).
- Von MURALT G., *Helv. Med. Acta*, 1962, 29, Suppl. 42, 1 (54, 56, 62, 141).
- Von MURALT G., GUGLER E. et ROULET D.L.A., in "Protides of the Biological Fluids ; Proceedings of the 8th Colloquium, Brugge, 1960", (H. PEETERS, ed., 1961, p. 166, Elsevier, Amsterdam (51, 138)).
- NAGASAWA T., KIYOSAWA I. et KUWAHARA K., *J. Dairy Sci.*, 1970, 53, 136, (294, 297, 298, 410).
- NAGASAWA T., KIYOSAWA I. et TANAHASHI N., *Proc. Int. Dairy Congr.*, 18th, 1970, 1E, 63 (327).
- NAGASAWA T., RYOKI T., KIYOSAWA T. et KUWAHARA K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 121, 502 (293).
- NEWCOMB R.W., NORMANSELL D. et STANWORTH D.R., *J. Immunol.*, 1968, 101, 905, (173, 178, 195, 497).
- NICOLAÏ H.V. et ZILLIKEN F., *Z. Physiol. Chem.*, 1969, 350, 10 (19).
- NIEDERMAIER W., TOMANA M. et MESTECKY J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 257, 527 (188, 200).
- NISHIKAWA T., MURATA N., YOSHIDA H. et SAITO K., *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 1969, 43, 50 (300).
- NISHIKAWA T. et SAITO K., *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 1969, 43, 45 (299).
- NORDBRING F., *Acta paediat. (Uppsala)*, 1957, 46, 481 (93, 95).
- NORDBRING F., *Acta Soc. Med. Upsalien.*, 1957, 62, 135 (74, 150).
- du PAN M.R., SCHEIDEGGER J.J., PONGRATZ E. et ROULET H., *Arch. Franc. Pediat.*, 1955, 12, 243 (33).
- PARK J.T. et JOHNSON H.J., *J. Biol. Chem.*, 1949, 181, 149 (525).
- PAUPE J. et MEYER B., *Path. Biol.*, 1969, 17, 87 et 191 (80, 83).
- PHILLIPS N.I. et JENNESS R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 229, 407 (312, 413).
- PINTER M., *Acta Med. Acad. Sci. Hung.*, 1953, 4, 105 (113).
- POLIS B.D. et SCHMUKLER H.W., *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 475 (240).
- POLONOVSKI M. et LESPAGNOL A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 320 (5).
- PORTER P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 181, 381 (76).
- POULIK M.D., *Nature*, 1957, 180, 1477 (388).

- PRICKETT P.S., MILLER N.J. et Mc DONALD F.G., *J. Bact.*, 1953, 25, 61 (339)
- QUERINJEAN P., MASSON P.L. et HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1971, 20, 420 (238, 245, 253).
- RATNER B., JACKSON H.C. et GRUEHL H.L., *J. Immunol.*, 1927, 14, 275 (78).
- REJNEK J., *Folia Microbiol.*, 1964, 9, 299 (404, 405).
- REJNEK I., ŠKVARIL F. et DOLEŽAL A., *Cesk. Pediat.*, 1960, 15, 97 (47,135).
- REMINGTON C., *Biochem. J.*, 1931, 25, 1062 ; 1940, 34, 931 (376).
- REMINGTON J.S., VOSTI K.L., LIETZE A. et ZIMMERMAN A.L., *J. Clin. Invest.*, 1964, 43, 1613 (159).
- RESSLER C. et KASHELIKAR D.V., *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 2025 (514).
- ROMBAUTS W.A., SCHROEDER W.A. et MORRISSON M., *Biochemistry*, 1967, 6, 2965 (341).
- SABIN A.B., *Amer. J. Dis. Child.*, 1950, 80, 866 (112).
- SANGER F., *Biochem. J.*, 1945, 39, 507 (478).
- SAUTIERE M., Thèse Méd., Lille, 1962 (470).
- SCHADE A.L., PALLAVICINI C. et WIESMANN U., in "H. PEETERS, *Protides in Biological Fluids*, Vol. 16, Pergamon Press, Oxford, 1969, 619 (447).
- SCHADE A.L. et REINHART R.W., *Biochem. J.*, 1970, 118, 181 (411, 531).
- SCHÄFER K.H., *Mschr. Kinderheilk.*, 1951, 99, 69 (201).
- SCHAFER K.H., V. Kongress des Europäischen Gesellschaft für Hämatologie" Freiburg, 1956, p. 154 (203).
- SCHÄFER K.H., BREYER A.M., HORST W., KARTE H. et LENZ W., *Klin. Wochschr.*, 1956, 34, 300 (202).
- SCHANBACHER F.L. et EBNER K.E., *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 5057 (318).
- SCHEIDEGGER J.J., *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1955, 7, 103 (392)
- SCHMID K., Mac NAIR M.B. et BÜRGI A.F., *J. Biol. Chem.*, 1959, 230, 853 (426)
- SCHNEIDER L. et PAPP G., *Arch. Kinderheilk.*, 1938, 114, 91, (105).
- SCHNEIDER L. et SZATHMARY J., *Z. Immun. Forsch.*, 1938, 94, 438 (77).
- SCHUBERT J. et GRUNBERG A., *Schweiz Med. Wschr.*, 1949, 79, 1007 (101).
- SCHWICK G., ESSER H.O. et KOCH F., *Behringwerk-Mitt.*, 1959, 37, 11 (43, 71, 131, 143).
- SEGARD E., Diplôme d'Etudes Supérieures, 1961 (8).

- SHIELDS R. et BURNETT W., Anal. Chem., 1960, 32, 885 (474).
- SHORTBRIDGE F., Clin. Chim. Acta, 1970, 29, 233 (65).
- SINKINSON G. et WHEELLOCK J.V., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 215, 517 (286)
- ŠKVARIL F. et REJNEK I., Cesk. Pediat., 1958, 13, 793 (36, 122).
- SMYTH D.G. et UTSUMI S., Nature, 1967, 216, 332 (527).
- SOKOLOVSKI M., SADEH T. et PATCHORNIK A., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1212, (511).
- SØRENSEN M. et SØRENSEN S.P.L., Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim., 1939, 23, 55 (29).
- SOUTH M.A., COOPER M.D. et WOLLHEIM F.A., HONG R. et GOOD R.A., J. Exp. Med., 1966, 123, 615 (161, 177, 542, 549).
- SPIK G., Dipl. Et. Sup. Lille, 1963 (381).
- SPIK G., Thèse Doct. Sci., Lille, 1968, (223, 237, 243, 249, 251, 423, 433, 436, 439, 502, 532, 536).
- SPIK G., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 81 (212c, 225, 226, 230, 232, 257, 269)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C. R. Acad. Sci., 1966, 263D, 893, (262, 516).
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 739 (382).
- SPIK G. et MONTREUIL J., C. R. Acad. Sci., 1966, 160, 94 (231, 259, 261).
- SPIK G. et MONTREUIL J., Chromatography Symposium IV, Arscia éd., Bruxelles 1968, 361 (263).
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim; Biol., 1969, 51, 1271 (522, 524).
- SPIK G. et MONTREUIL J., Résultats non publiés (254, 255).
- SUGG J.Y., Amer. J. Hyg., 1935, 22, 227 (89).
- SUSSMAN S., Pediatrics, 1961, 27, 308 (109).
- SVEDBERG T. et PEDERSEN K.O., The Ultracentrifuge, Oxford University Press, London, 1940 (395).
- SVEHAG S.E. et BLOTH B., Science, 1970, 168, 847 (168).
- TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 16, 404 (454, 513).
- TECH-HUJDOBRO G., Med. Thesis, Freiburg University, Freiburg, Germany, 1959, (45, 132, 146).
- THEORELL H. et AKESON A., Arkiv. Kemi Mineral. Geol., 1943, 17B, 1, (239).

- THOMPSON M.P., in "Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology" (Mc KENZIE H.A. Ed.), Vol. II, p. 117-173, Academic Press New York and London, 1971 (275).
- THOMSEN O., Zeitschr. Immunitätsforsch, 1909, 3, 539 (31).
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (375).
- TIMMERMAN W.A., Z. Immun. Forsch., 1931, 70, 388 (99).
- TOMASI T.B., Hosp. Pract., 1967, 2, 26 (538).
- TOMASI T.B. Jr., et BIENENSTOCK J., Advan. Immunol., 1968, 9, 1 (154, 194, 197, 481, 483, 488).
- TOMASI T.B. Jr. et CZERWINSKY D.S., in "Immunologic Deficiency Diseases in Man" Third Developmental Immunology Workshop, Florida, 1967, Birth Defect Original Article Series, 1968, Vol. 4, n° 1, 270 (166, 167, 171, 172, 184, 545, 550).
- TOMASI T.B. Jr., TAN E.M., SOLOMON A. et PRENDERGAST R.A., J. Exp. Med., 1965, 121, 101 (160, 190, 495).
- TOMASI T.B. Jr. et ZIGELBAUM S., J. Clin. Invest., 1963, 42, 1552 (156).
- TOOMEY J.A., Amer. J. Dis. Child., 1934, 47, 521 (104).
- TOURVILLE D.R., ADLER R.H., BIENENSTOCK J. et TOMASI T.B. Jr., J. Exptl. Med., 1969, 129, 411, (540).
- TRAN V.D. et BAKER B.E., J. Dairy Sci., 1970, 53, 1009, (283).
- VAKIL J.R., CHANDAN R.C., PARRY R.M. et SHAHANI K.M., J. Dairy Sci., 1969, 52, 1192 (337).
- VIGNES H., RICHOU R. et RAMON P., Rev. Immunol., 1948, 12, 1 (90, 94).
- VIVELL O., Bibliotheca Microbiol., 1960, 1, 54 (48, 147).
- WADSWORTH C. et HANSON L.Å., Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1960, 17, 165 (58, 64).
- WAUGH D.F., in "Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology (Mc KENZIE H.A. Edit.), 1971, Vol. II, p. 3-85, Academic Press, New York and London (274).
- WEISS F., Ann. paediat. (Basel), 1939, 152, 193 (120).
- WERNER I. et ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (379).
- WILSON I.D. et WILLIAMS Jr. R.C., J. Clin. Invest., 1969, 48, 2409 (546).

WONG D.H. et WONG A.I.H., Nat. M. J. Clinic., 1930, 16, 673 (102).

YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem., 1962, 51, 359 (503).

ZWEIG G. et BLOCK R.J., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 51, 200 (240b).

