

0346
1975
13

N° d'ordre : 505

50376
1975
13

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

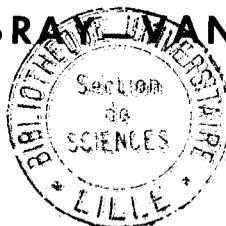
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Renée DEBRAY-MANDERSYPPE



RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Isolement et détermination de la structure complète de
deux glycopeptides obtenus par hydrolyse
trypsique et chymotrypsique

Présenté le 15 février 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	M. J. MONTREUIL	Président
	Mlle G. SPIK	Rapporteur
	M. B. FOURNET	Examineur
	M. K.K. HAN	Examineur

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués (Professeur J. MONTREUIL), sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK, Maître de Conférences.

DOYENS HONORAIRES DE L'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS,
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,
KOGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-
LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART,
WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT HONORAIRE DE L'UNIVERSITE DES
SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

R. DEFRETIN

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES
SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléontologie
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie

.../...

M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VAILLANT Jean	Analyse
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Melle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAÎTRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire

M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie

.../...

M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WERNIER Georges
M. WATERLOT Michel
M. YVON Jean-Pierre
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Chimie Minérale
Mécanique
Informatique
Géologie Générale
Analyse Numérique
Algèbre

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
I - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE</u>	5
II - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	5
A - FIXATION REVERSIBLE DU FER	5
B - PROPRIETES PHYSIQUES	6
C - PROPRIETES CHIMIQUES	6
1°) Composition en glucides	6
2°) Composition en acides aminés	6
III - <u>STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	
A - STRUCTURE DE LA PROTEINE	6
1°) Nature des acides aminés N-terminaux	6
2°) Nature des acides aminés C-terminaux	6
3°) Action des protéinases	10
B - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE	11
C - MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE	11
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	12
TRAVAUX PERSONNELS	13
MATERIEL ET METHODES	15

	Pages
ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES	16
I - <u>MATERIEL</u>	16
A - LA LACTOTRANSFERRINE	16
B - PREPARATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE	16
C - DENATURATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE : REDUCTION ET ALKYLATION	16
1°) Première étape	16
a - Réduction	16
b - Blocage des groupements SH libres par l'iodacétamide	16
2°) Deuxième étape	17
II - <u>HYDROLYSE PROTEINASIQUE</u>	17
A - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE	17
B - HYDROLYSE TRYPSIQUE	18
III - <u>FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS</u>	18
A - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION	18
B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE : APPAREIL ELPHOR VAP	18
C - CONTROLE ELECTROPHORETIQUE DU FRACTIONNEMENT	19
1°) Révélation des peptides par la ninhydrine	19
2°) Révélation des glycannes par le réactif à l'acide periodique- benzidine	19
IV - <u>SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	20
A - ACTION DE LA NEURAMINIDASE	20
B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR PAPIER	20
COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES	20

	Pages
I - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	20
A - HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE	20
B - DETERMINATION DU TRYPTOPHANNE	21
1°) Préparation du 3 (2-amino éthyl) indole	21
2°) Hydrolyse	21
3°) Identification du tryptophanne	21
II - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	21
A - COMPOSITION CENTESIMALE	21
B - COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES	22
DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES CHAINES PEPTIDIQUES	22
I - <u>ACTION DE LA SOUDE</u>	22
A - PRINCIPE	22
B - MODE OPERATOIRE	23
II - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX</u>	23
A - METHODE D'HYDRAZINOLYSE	23
1°) Principe	23
2°) Mode opératoire	23
B - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES	24
1°) Hydrolyse des glycopeptides tryptiques	24
2°) Hydrolyse des glycopeptides chymotrypsiques	25
III - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX</u>	25
A - DANSYLATION DES GLYCOPEPTIDES	25
B - CHROMATOGRAPHIE DES DANSYL-AMINO-ACIDES	25

	Pages
IV - <u>DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN</u>	26
A - METHODE D'EDMAN COUPLEE A L'IDENTIFICATION DES DANSYL-AMINO- ACIDES	26
B - METHODE D'EDMAN COUPLEE A L'IDENTIFICATION DES PTH AMINO- ACIDES	27
1°) Réactifs	27
2°) Etape de couplage	27
3°) Etape de clivage	28
4°) Etape de conversion	28
5°) Identification des PTH-amino-acides	28
V - <u>ACTION DE LA THERMOLYSINE</u>	29
ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES	29
I - <u>HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE</u>	29
A - HYDROLYSE PAR LES ACIDES DILUES	31
B - HYDROLYSE PAR LES RESINES POLYSTYRENE-SULFONEES	31
II - <u>HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION</u>	31
A - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION	31
B - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES	32
C - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES	32
D - DOSAGE DES OLIGOSACCHARIDES ET ANHYDROHEXOSES	33
III - <u>METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	34
A - REACTION DE METHYLATION	34
B - HYDROLYSE DES GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES	34
C - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES	35

	Pages
D - IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES	35
1°) Identification des éthers méthyliques des monosaccharides neutres	35
2°) Identification des méthyl-osamines	35
IV - <u>HYDROLYSES ENZYMATIQUES</u>	36
A - ACTION DE LA FUCOSIDASE	36
B - ACTION DE LA GALACTOSIDASE	36
RESULTATS	37
ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES	38
I - <u>ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES</u>	38
A - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES	38
1°) Chromatographie de gel filtration	38
2°) Electrophorèse en veine liquide	38
B - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES	41
1°) Action de la neuraminidase	41
2°) Electrophorèse préparative sur papier	41
II - <u>ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES</u>	41
COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES	44
DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES	44
I - <u>SEQUENCE PEPTIDIQUE AU VOISINAGE DU GLYCANNE I</u>	47

	Pages
A - GLYCOPEPTIDE CHYMOTRYPSIQUE I _c	47
1°) Action de la soude	47
2°) Acide aminé N-terminal	47
3°) Séquence C-terminale	47
4°) Action de la thermolysine	50
5°) Dégradation d'Edman	50
6°) Conclusions	50
B - GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE I _t	52
II - <u>SEQUENCE PEPTIDIQUE AU VOISINAGE DU GLYCANNE II</u>	52
A - GLYCOPEPTIDE CHYMOTRYPSIQUE II _c	52
1°) Action de la soude	52
2°) Acide aminé N-terminal	55
3°) Séquence C-terminale	55
4°) Dégradation récurrente d'Edman	55
B - GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE II _t	55
C - CONCLUSION	55
ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES	
I - <u>COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES</u>	56
II - <u>HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE</u>	56
A - HYDROLYSE PAR H ₂ SO ₄ 0,01 N	56
B - HYDROLYSE PAR H ₂ SO ₄ 1 N	56
III - <u>HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION</u>	58
A - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE	58
1°) Etude qualitative	58

	Pages
2°) Etude quantitative	58
B - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DES ASIALO-GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSI- QUES I _c ET II _c	62
IV - <u>PERMETHYLATION</u>	62
A - RESULTATS	62
B - DISCUSSION	62
V - <u>HYDROLYSES ENZYMATIQUES</u>	66
A - ACTION DE LA FUCOSIDASE	66
B - ACTION DE LA GALACTOSIDASE	66
VI - <u>CONCLUSIONS</u>	66
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px 10px;">CONCLUSIONS GENERALES</div>	68

INTRODUCTION

Le travail dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre des recherches effectuées au Laboratoire sur la structure des glycoprotéines.

Le problème de l'étude de la structure de la fraction glycanique des glycoprotéines se pose du fait de la présence sur la chaîne protéique de plusieurs groupements glucidiques dont la composition en monosaccharides et la structure peuvent être différentes.

L'isolement de glycopeptides porteurs chacun d'un groupement glycanique permet d'aborder l'étude de la structure des glycannes ainsi que des chaînes peptidiques propre à chacun d'eux. Il devient donc possible de préciser les relations qui existent entre la séquence des acides aminés au voisinage du point d'attache et la structure du groupement glycanique correspondant. C'est ainsi qu'il a déjà été démontré que la chaîne peptidique codait la fixation du premier monosaccharide, étape initiale de la biosynthèse du groupement glycanique : séquence Asn-X-Thr (ou Ser) dans le cas de la N-acétylglucosamine transférée sur le résidu d'asparagine (HUNT et DAYHOFF (1)) ; séquence Gly-X-Hylys-Gly-X-Arg dans le cas du galactose transféré sur le résidu d'hydroxy-lysine (ISEMURA (2)). Le problème subsiste néanmoins de savoir si d'autres segments peptidiques ne dirigeraient pas le transfert de résidus de monosaccharides plus internes dans la molécule de glycanne.

Notre travail a concerné la lactotransferrine humaine, glycoprotéine étudiée au Laboratoire depuis sa découverte par MONTREUIL et al. (3, 4).

Il a porté sur l'isolement et sur l'étude de la structure de glycopeptide obtenus par hydrolyse chymotrypsique et trypsique de cette glycoprotéine. Il fait suite à celui de SPIK et al. (5, 6) qui a isolé trois glycopeptides, après hydrolyse pronasique de la lactotransferrine humaine. L'étude préliminaire réalisée par ces auteurs a montré que deux des chaînes glucidiques étaient conjuguées à la protéine par une liaison de type "asparaginyl-glucosamine" et qu'un troisième groupement était conjugué par une liaison O-thréonyl-glycosidique.

Nous avons hydrolysé la chaîne protéique par la chymotrypsine et la trypsine de manière à obtenir des glycopeptides possédant des chaînes peptidiques plus longues afin d'augmenter les chances de séparation de ces glycopeptides et de démontrer qu'ils proviennent bien de sites différents de la molécule de lactotransferrine.

Dans un premier chapitre de généralités, nous présenterons succinctement l'état actuel des connaissances sur la lactotransferrine humaine. Nous décrirons ensuite les procédés que nous avons employés pour isoler les deux glycopeptides et pour déterminer leur structure.

Jusqu'à présent, nos travaux ont fait l'objet des communications et des publications suivantes :

Communications

G. SPIK, R. VANDERSYPPE, B. FOURNET, J. MONTREUIL, K.K. HAN, D. TETAERT
Structure de 2 glycopeptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique de la lactotransferrine humaine. XIe Journées Biochimiques Latines, Salamanque 24-27 avril 1973.

Publications

G. SPIK, R. VANDERSYPPE, J. MONTREUIL, K.K. HAN, D. TETAERT
Amino-acid sequences of two glycopeptides isolated from tryptic and chymotryptic hydrolysates of human lactotransferrin, Febs Letters, 1974, 38, 213-216.

G. SPIK, R. VANDERSYPPE, B. FOURNET, B. BAYARD, P. CHARET, S. BOUQUELET, G. STRECKER, J. MONTREUIL.
Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S Ed., Paris, 1974, 483-500.

G. SPIK, B. FOURNET, B. BAYARD, R. VANDERSYPPE, G. STRECKER, S. BOUQUELET, P. CHARET, J. MONTREUIL.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 1974, 82, 29.

GENERALITES

La lactotransferrine humaine a été isolée à partir du lait de Femme, en 1960, simultanément par MONTREUIL et al. (7,8) et par JOHANSSON (9). Elle a été considérée comme une protéine spécifique du lait jusqu'à ce que BISERTE, HAVEZ et CUVELIER (10) aient démontré par immunoélectrophorèse qu'elle était présente dans les expectorations bronchiques, résultat confirmé par MASSON et coll. (11) qui ont, en outre, mis en évidence son existence dans de nombreux liquides biologiques d'excrétion comme la salive, les sécrétions nasales, les larmes, la bile, le suc pancréatique, les sécrétions génitales, l'urine.

Puis LOISILLIER, GOT, BURTIN et GRABAR (12) ont démontré la présence de lactotransferrine dans les tissus sains d'origine gastrique et colique et trouvé, en outre, une augmentation de la teneur en lactotransferrine des tissus cancéreux correspondants (13). Dans une autre série d'expériences, MASSON, HEREMANS, SCHONNE et CRABBE (14) ont caractérisé la lactotransferrine dans les cellules du rein, de la rate et du tractus génital de la Femme. Ils concluent que la lactotransferrine était, certes, un constituant constant des muqueuses et des sécrétions externes mais qu'elle pouvait aussi être synthétisée par d'autres types de tissus comme le rein et la rate.

Enfin, MASSON et coll. (15) ont identifié la lactotransferrine dans les leucocytes neutrophiles de l'Homme et du Cobaye.

Dans les cellules épithéliales, la lactotransferrine semble localisée dans les grains de sécrétion. Dans les leucocytes hétérophiles de Lapin, elle a été exclusivement trouvée associée avec les granules secondaires (BAGGIOLINI et coll. (16)).

La large répartition de la lactotransferrine pose la question du rôle biologique des lactotransferrines. Deux types de fonctions peuvent être considérées : transport du fer et protection de l'organisme contre les ions métalliques et les bactéries.

Une comparaison effectuée par MASSON et HEREMANS (17) entre la concentration de lactotransferrine et celle du fer dans des laits de différents mammifères montre qu'il n'existe que peu de relations entre elles. Cependant, ces auteurs admettent que l'absence de lactotransferrine dans le lait n'exclut pas son existence éventuelle à l'intérieur des cellules glandulaires où elle pourrait être

impliquée dans le transport du fer de la transferrine sérique à la ferritine.

La lactotransferrine pourrait avoir selon MASSON (18) un rôle protecteur contre la toxicité des ions métalliques grâce à son pouvoir chélateur.

D'autre part, d'après les travaux de ORAM et REITER (19) la lactotransferrine inhibe la croissance de bactéries et est ainsi un facteur de protection.

Les propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine humaine sont encore assez mal définies et nous les exposerons brièvement :

I - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Depuis 1960, plusieurs procédés de préparation de la lactotransferrine à partir du lait de Femme ont été publiés. On peut citer la méthode de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (20), les deux procédés décrits par JOHANSSON (21) (22), ceux de BLANC et ISLIKER (23), de GOT (24), de MASSON et HEREMANS (25), de HAUPT et BAUDNER (26). La lactotransferrine peut être cristallisée en appliquant un mode opératoire dérivé de celui de JOHANSSON (27). Elle cristallise alors en longues aiguilles.

Au Laboratoire, la lactotransferrine humaine est préparée selon la méthode de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (28) modifiée par DESCAMPS, SPIK, BRAZIER et MONTREUIL (29). Elle est également isolée du lait de Femme suivant un procédé mis au point par CHERON (30) à propos de la lactotransferrine du lait de Vache, procédé fondé sur la fixation de la lactotransferrine sur SP Sephadex.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A - FIXATION REVERSIBLE DU FER

La lactotransferrine humaine possède la propriété de fixer réversiblement le fer. A saturation, elle renferme deux atomes de fer par molécule. Le complexe fer-lactotransferrine est stable entre pH 4 et pH 10. La liaison est nettement plus stable que celle de la transferrine sérique humaine, puisque le pH de dissociation totale est de 1,75 à 2 au lieu de 4-4,5.

B - PROPRIETES PHYSIQUES

Les propriétés physiques de la lactotransferrine ont été définies par MONTREUIL et coll. (31), par JOHANSSON (32), BLANC et ISLIKER (33), SPIK (34), QUÉRINJEAN, MASSON et HEREMANS (35).

L'examen du tableau^I(p. 7) montre que les résultats concernant la valeur de la masse moléculaire de la lactotransferrine sont très dispersés. Les valeurs récentes sont cependant de l'ordre de 75.000 à 77.000.

C - PROPRIETES CHIMIQUES

La nature glycoprotéinique de la lactotransferrine a été démontrée en 1960 par MONTREUIL et MULLET (36) puis confirmée, en 1961, par BLANC et ISLIKER (37). Par la suite, MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (38) et SPIK (39) ont précisé la composition en oses et en acides aminés de ce protéide.

1° Composition en glucides

La composition centésimale et molaire en glucides obtenue par plusieurs auteurs est précisée dans le tableau II(p. 8).

2° Composition en acides aminés

Nous avons fait figurer dans le tableau III(p. 9) les résultats de BLANC, BUJARD et MAURON (40), de SPIK (41), de QUÉRINJEAN, MASSON et HEREMANS (42).

III - STRUCTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les renseignements concernant la structure primaire, secondaire et tertiaire de la lactotransferrine humaine sont encore très fragmentaires.

A - STRUCTURE DE LA PROTEINE

1° Nature des acides aminés N-terminaux

MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (43) et SPIK et MONTREUIL (44) n'ont caractérisé aucun acide aminé en position NH_2 -terminale. Cette protéine aurait donc, en position N-terminale, un ou plusieurs acides aminés à fonction amine bloquée.

2° Nature des acides aminés C-terminaux

SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (45) ont identifié le glycolle

Tableau I

MASSE MOLECULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Méthodes	a	b	c	d
Teneur en fer	100.000	75.980	-	
Constante de sédimentation et diffusion (méthode de SVEDBERG)	95.000	-	75.100	
Chromatographie de filtration sur gel		76.000		
Viscosité intrinsèque				77.000

a - MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (46)

b - SPIK (47)

c - QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS(48)

d - LEGER, SPIK, VERBERT, DUPIRE, MONTREUIL et LOUCHEUX.(49)



Tableau II

Composition centésimale et molaire en glucides
de la lactotransferrine humaine

	a	b	c	d	e	f
<u>Composition centésimale</u>						
Oses neutres	3,90	4,10	3,70	3,11	3,24	3,30
Osamines	2,40	2,30	2,00	2,43	2,47	2,07
Acides sialiques	0,87	0,80	0,90	1,22	1,15	1,22
<u>Composition molaire</u>						
D-galactose	10 (g-h)			5 (i)	10	5 (i)
D-mannose	7			5	11	6
L-fucose	5			4	7	3
N-acétyl-D-glucosamine	13			10		9
Acide N-acétyl-D-neuraminique	3 (j)			3		3

(a) MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (50)

(b) BLANC et ISLIKER (51)

(c) GOT, GOUSSAULT et FONT (52)

(d) SPIK (53)

(e) BRAZIER (54)

(f) Lactotransferrine préparée selon le procédé
de CHERON (55)

(g) MONTREUIL, BISERTE, MULLET, SPIK et LEROY (56)

(h) pour une masse moléculaire de 90.000

(i) pour une masse moléculaire de 76.000

(j) Ces auteurs avaient, en outre, identifié du xylose.
SPIK (57) a pu démontrer qu'il s'agissait d'une
contamination apportée par les membranes de cello-
phane utilisées au cours des dialyses.



Tableau III

Composition en acides aminés de la lactotransferrine humaine
(exprimée en nombre de résidus d'acides aminés pour 10.000 g de glycoprotéide).

	(a)	(b)	(c)
Asp	9,2	8	8,5
Glu	10	7,5	9
Arg	6,0	4,9	5
His	1,4	1,1	1,3
Lys	6,4	5,2	5
Ala	8,2	6,2	7,3
Cystine/2	3,6	3	3,4
Gly	7,5	6,4	6,4
Ileu	2,3	1,8	2,1
Leu	7,5	6,3	7
Met	0,68	0,39	0,65
Phe	4,2	3,2	3,7
Pro	4,8	3,8	4,3
Ser	5,9	5,0 (e)	6 (e)
Thr	4,0	3,8 (e)	4,3 (e)
Try	0,11	0,75 (f)	1,4 (g)
Tyr	3,2	2,3	2,6
Val	5,7	4,4	5,6
SH libres		0 (d)	

(a) BLANC, BUJARD et MAURON (58)

(b) SPIK (59)

(c) QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (60)

(d) GHEERBRANDT (Communication personnelle)

(e) Valeurs extrapolées au temps zéro de l'hydrolyse

(f) Déterminé colorimétriquement par la méthode de SPIES et CHAMBERS (61)

(g) Déterminé spectrophotométriquement par la méthode d'EDELHOCH (62).



et la sérine comme acides aminés en position C-terminale. Ces résultats étaient en faveur de l'existence de deux chaînes polypeptidiques au moins dans la lactotransferrine humaine. Cette hypothèse semble être confirmée par les résultats obtenus par GOT, GOUSSAULT et FONT (63), par ultracentrifugation dans l'urée 8 M de la lactotransferrine qui se dissocie en deux constituants de constante de sédimentation de 3,6 S et 1,7 S.

QUERINJEAN, MASSON et HEREMANS (64) affirment, de leur côté, que la lactotransferrine est composée d'une seule chaîne polypeptidique sur la base des résultats expérimentaux suivants : aucune diminution de masse moléculaire n'est observée quand la protéine réduite et carboxyméthylée ou aminoéthylée est soumise à l'urée 6 M. La masse moléculaire de 76.800 est déterminée par électrophorèse en gel d'agarose acrylamide contenant 0,1 p. 100 de dodecyl-sulfate de sodium.

Les travaux récents effectués au Laboratoire par LEGER, SPIK, VERBERT, DUPIRE, MONTREUIL et LOUCHEUX (65) concernant la mesure de la viscosité intrinsèque de la lactotransferrine humaine réduite et S-carboxyméthylée dans du chlorhydrate de guanidine 7 M, conduisent à une détermination de la masse moléculaire de la partie protéique égale à 70.500, ce qui, compte tenu de la masse moléculaire des glycanes, fournit une valeur très proche de celle de la masse moléculaire de la lactotransferrine native et tend à prouver que la lactotransferrine humaine possède une structure monocaténaire.

3°) Action des protéinases

Quelques informations concernant la structure de la fraction protéique de la lactotransferrine humaine ont été apportées par l'étude de l'action de quelques protéinases. Les résultats de GOT (66), SPIK et MONTREUIL (67) et de BLANC (68) montrent que la trypsine et la chymotrypsine possèdent une activité protéolytique faible, contrairement à la pepsine, à la papaïne et surtout la pronase. SPIK et MONTREUIL (69) ont montré que la présence du fer inhibait à peu près complètement l'hydrolyse par la trypsine et par 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. En utilisant de l'apolactotransferrine, ces auteurs ont obtenu des hydrolysats tryptiques comportant une quarantaine de peptides.

B - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

Les recherches préliminaires sur la lactotransferrine humaine réalisées par MONTREUIL et SPIK (70) ont amené à penser que ce glycoprotéide possédait trois groupements glycaniques.

Les glycanes de la lactotransferrine humaine possèdent le schéma général de structure des glycoprotéides proposé en 1962 par MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (71) : l'acide sialique et le fucose sont en position externe, la N-acétyllactosamine est en situation subterminale, un "noyau" oligomannosidique et une partie de la N-acétylglucosamine constituent la fraction la plus interne de la molécule.

C - MODALITES DE L'ATTACHE GLYCANE-PROTIDE

D'après les travaux de SPIK (72) ; SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (73) ; SPIK et MONTREUIL (74), il existe, dans la lactotransferrine humaine, trois 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-acétylglucosylaminique, résultats qui s'éloignent de ceux de GOT, GOUSSAULT et FONT (75) pour qui les liaisons glycanne-protides sont uniquement de type O-thréonyl-N-acétylglucosaminique.

D'autre part, ces mêmes auteurs ont démontré au Laboratoire que la séquence peptidique au voisinage du point d'attache des deux glycopeptides pronasiques à liaison "asparaginy-N-acétylglucosamine" était la suivante : (glycanne)-Asn-Glu-Thr et qu'elle était commune aux deux glycopeptides.

Actuellement, au Laboratoire, l'existence du troisième glycanne lié par une liaison O-thréonyl-N-acétylglucosaminidique est remise en cause. En effet, elle n'est plus retrouvée dans les nouveaux échantillons de lactotransferrine. D'autre part, comme le montre le tableau II (p. 8), les préparations actuelles de lactotransferrine possèdent un taux de glucides moins élevé que celui des anciennes préparations sans doute moins pures, et ceci pourrait être en accord avec l'hypothèse de l'existence de deux groupements glycaniques seulement dans la lactotransferrine humaine.

Des travaux sont actuellement réalisés au Laboratoire afin de confirmer ou d'infirmer cette nouvelle hypothèse.

IV - CONCLUSIONS

Compte tenu des résultats précédemment obtenus, le but de notre travail a été, dans un premier temps, d'isoler les glycannes de la lactotransferrine sous forme de glycopeptides. D'autre part, l'isolement des deux glycannes liés à des chaînes peptidiques plus longues que les chaînons "Asn-Glu-Thr" obtenus par hydrolyse pronasique, présente un intérêt capital : en effet, si les compositions en acides aminés de ces glycopeptides sont différentes, nous pourrions affirmer que ces deux glycannes proviennent de deux sites différents de la molécule de lactotransferrine et par là-même confirmer l'existence de deux glycannes à liaison "asparaginy-N-acétylglucosamine".

Ultérieurement, une étude comparée de la structure des deux glycannes isolés pourra être réalisée et contribuer à fournir des renseignements concernant la biosynthèse des groupements glycaniques des glycoprotéines.

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons cherché à isoler les groupements glycaniques de la lactotransferrine humaine, sous forme de glycopeptides en tirant parti des variations de séquence des acides aminés au voisinage du point d'attache ose-acide aminé, et pour cela, nous avons procédé à la rupture de la chaîne protéique à l'aide d'enzymes protéolytiques.

Afin de ne pas risquer d'obtenir des glycopeptides dérivant les uns des autres à cause de ruptures secondaires, notre choix s'est porté sur la trypsine et la chymotrypsine qui sont les enzymes protéolytiques les plus spécifiques. La trypsine coupe exclusivement et totalement les liaisons arginyl et lysil. La spécificité de la chymotrypsine est plus large puisqu'elle hydrolyse les liaisons phenylalanyl, tyrosyl et tryptophyl. Elle peut également hydrolyser les liaisons leucyl. Une étude préalable, effectuée au Laboratoire (76), a montré qu'il était nécessaire de dénaturer la molécule de lactotransferrine, pour obtenir au cours de l'hydrolyse des rendements satisfaisants. En effet, celle-ci est très résistante à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine. Aussi, l'hydrolyse par ces enzymes a été réalisée sur l'apolactotransferrine réduite et alkylée, cette méthode de dénaturation semblant être la plus sûre pour obtenir des résultats reproductibles.

Nous avons ensuite fractionné les hydrolysats par différents procédés. Ceci nous a permis d'isoler deux types de glycopeptides comportant une liaison asparaginy-N-acétylglucosamine décrite par SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (77). Nous nous sommes attachée, en déterminant la séquence peptidique des glycopeptides isolés, à démontrer qu'ils provenaient de sites différents de la chaîne peptidique de la molécule de lactotransferrine.

Nous avons ensuite ébauché l'étude comparée de la structure des deux glycannes.

MATERIEL ET METHODES

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

I - MATERIEL

A - LA LACTOTRANSFERRINE

Les préparations de lactotransferrine que nous avons utilisées donnent une seule bande en électrophorèse sur acétate de cellulose et un arc unique de précipitation en immuno-électrophorèse.

B - PREPARATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

L'apolactotransferrine est préparée dans les conditions décrites par SPIK (78).

Une solution de 1 g de lactotransferrine pour 100 ml d'eau distillée est amenée à pH 1,5 par addition d'acide chlorhydrique concentré. Elle est ensuite dialysée pendant 48 heures à 0°C, contre 500 ml d'une solution d'EDTA (sel disodique) à 1 g p. 100 ml. Elle est enfin débarrassée de l'EDTA par une nouvelle dialyse de 48 heures, effectuée contre 500 ml d'eau distillée renouvelée 2 fois.

C - DENATURATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE : REDUCTION ET ALKYLATION

1°) Première étape

a - Réduction

La réduction des ponts disulfures est effectuée selon le procédé de FLEISHMAN (79).

3 g d'apolactotransferrine sont dissous dans 150 ml de tampon Tris 0,55 M de pH 8,2. Après agitation et dégazage de la solution sous vide, 3 ml de mécapto-éthanol sont ajoutés. La réaction est abandonnée, sous azote, une heure à la température du laboratoire, puis 4 heures à 0°C.

b - Blocage des groupements SH libres par l'iodacétamide

L'iodacétamide utilisée est recristallisée selon le protocole suivant : 5 g sont dissous dans 10 ml d'eau tiède, la solution est refroidie à + 4°C pendant une heure, le surnageant jaune est éliminé ; cette opé-

ration est répétée deux ou trois fois jusqu'à obtention de beaux cristaux blancs qui sont desséchés dans un exsiccateur, en présence d'anhydride phosphorique et à l'abri de la lumière.

Le blocage des groupements -SH est effectué par addition de 8 g d'iodacétamide dans le milieu réactionnel.

Le pH du mélange est maintenu par addition d'une solution aqueuse de triéthylamine à 10 p. 100. La réaction se fait à l'abri de la lumière et sous azote. Elle est terminée quand l'essai suivant au nitroprussiate est négatif : à une aliquote d'une solution de nitroprussiate de sodium à 1 g p. 100 ml d'ammoniac 2N, une goutte de mélange réactionnel ne doit plus donner de coloration rouge.

Après élimination des réactifs par dialyse contre de l'eau distillée pendant trois jours, l'adialysable est lyophilisé.

2°) Deuxième étape

La lactotransferrine ainsi traitée est redissoute dans 50 ml de chlorhydrate de guanidine 6M. Le volume est amené à 150 ml avec une solution de Tris de manière à obtenir la concentration finale 0,55 M et la solution est ajustée à pH 8,2. Elle est ensuite soumise à un second cycle de réduction et alkylation dans les conditions décrites ci-dessus.

La lactotransferrine ne renferme alors plus de résidus de cystine.

II - HYDROLYSE PROTEINASIQUE

A - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

La chymotrypsine (EC 3.4.4.5) utilisée est fournie par la firme SERAVAC.

Le procédé que nous avons appliqué dérive de la méthode de HIRS et al (80).

3 g de lactotransferrine réduite et alkylée sont remis en suspension dans 150 ml de tampon Tris 0,55 M de pH 8,2. L'hydrolyse est effectuée à 37°C pendant 8 heures au pH-stat. Le mélange est maintenu à pH 8,2 par de la soude 0,1 N. On ajoute 2 fois à 4 heures d'intervalle, 60 mg de chymotrypsine (rapport enzyme-substrat : 1/50). La quantité nécessaire de chymotrypsine est

auparavant activée par dissolution dans une solution d'acétate de calcium 0,01 M et repos pendant une demi-heure à la température du laboratoire.

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide acétique glacial jusqu'à pH 5. La solution est ensuite concentrée pour être chromatographiée sur gel.

B - HYDROLYSE TRYPSIQUE

La trypsine (EC 3.4.4.4) est fournie par la firme SERAVAC. L'hydrolyse trypsique est réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'hydrolyse chymotrypsique décrites ci-dessus.

III - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

A - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

L'hydrolysate protéasique de lactotransferrine réduite et alkylée est purifié par chromatographie sur une colonne de Biogel P30 de 4 x 130 cm. Une telle colonne permet de chromatographier 1,5 à 2 g d'hydrolysate. Le gel est élué par de l'eau distillée dégazée (débit 40 ml/heure). Des fractions de 12 ml sont recueillies au collecteur de fractions.

L'enregistrement en ultra-violet à 278 nm est fait automatiquement pendant la chromatographie. Le repérage des glycopeptides dans l'effluent est effectué par la méthode au phénol-sulfurique de DUBOIS et coll. (81) qui est spécifique des glucides. Les fractions qui donnent une réaction positive sont rassemblées, concentrées à quelques millilitres et additionnées de 10 volumes d'éthanol absolu. Le précipité de glycopeptides est recueilli par centrifugation, redissous dans une faible quantité d'eau distillée et lyophilisé. Cette fraction est appelée fraction glycopeptidique totale (FGT)

B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE : APPAREIL ELPHOR VAP

Une solution de FGT à 30 mg/ml dans l'acide acétique N/2 (pH 2,5) est injectée en continu, du côté anodique de la cuve, avec un débit de 2 ml/heure, grâce à une pompe doseuse, une deuxième pompe préréglée règle le débit du film de tampon pH 2,5 à 120 ml/heure. Une différence de potentiel de 1.700 volts est appliquée aux bornes des électrodes dès le moment de l'injection. Après la fin de l'injection, la chambre est rincée pendant une heure.

Sur chacune des cinquante fractions collectées au bas de la cuve, est effectué un repérage des glucides par la méthode de DUBOIS et coll. (82). Chaque fraction positive est lyophilisée et soumise à un contrôle électrophorétique à pH 2,4.

C - CONTRÔLE ELECTROPHORETIQUE DU FRACTIONNEMENT

1°) Révélation des peptides par la ninhydrine

L'électrophorogramme est imbibé par trempage du réactif à la ninhydrine-cadmium réalisé par le mélange des 2 solutions dont les compositions sont les suivantes :

Solution 1	ninhydrine	5 g
	acétone	500 ml
	acétate de cadmium	0,5 g
Solution 2	acide acétique	25 ml
	eau distillée	50 ml

L'emplacement des peptides est marqué par l'apparition de tâches rouge-violacé après séchage du papier à 100°C pendant quelques minutes.

2°) Révélation des glycannes par le réactif à l'acide periodique-benzidine

Les fractions glycaniques sont révélées selon le procédé de MONTGOMERY et WU (83).

Le papier est trempé rapidement dans une solution acétonique d'acide periodique 0,1 M fraîchement préparée :

Solution aqueuse	acide periodique	0,1 M	1 volume
	acétone		19 volumes
	acide acétique		1 goutte

Après 5 minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée extemporanément de benzidine dans l'acétone :

benzidine	150 mg
acétone	100 ml
acide acétique	1 ml.

L'emplacement des glycanes est révélé par l'apparition de tâches blanches sur un fond uniformément bleu.

IV - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES

A - ACTION DE LA NEURAMINIDASE

La neuraminidase de Clostridium perfringens (EC 3.2.1.18) utilisée est fournie par la firme WORTHINGTON. L'hydrolyse est effectuée à pH 5,6 dans du tampon acétate de sodium (0,05 M), renfermant du chlorure de sodium (0,06 M) et du chlorure de calcium (0,004 M). Elle se poursuit pendant 24 heures à 37°C. Le rapport enzyme-glycopeptide est de 1/140.

Lorsque la réaction est terminée, la solution est directement soumise à l'électrophorèse.

B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR PAPIER

Une électrophorèse préparative sur papier Whatman 3 MM est effectuée sous une tension de 400 volts (7 volts/cm) pendant 16 heures dans le tampon pyridine-eau-acide acétique (90 : 1400 : 3) de pH 6,5.

Après séchage de l'électrophorégramme et repérage des glycopeptides par révélation de bandes latérales par le réactif à la ninhydrine-cadmium, les bandes de papier renfermant des glycopeptides sont éluées par de l'eau distillée.

COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

I - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

A - HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

La composition en acides aminés des glycopeptides, à l'exclusion du tryptophane, est déterminée après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé, sous vide, à 105°C pendant 24 heures. Les hydrolysats sont dosés à l'auto-analyseur BECKMAN Multichrom suivant le principe général de SPACKMAN, STEIN et MOORE (84) adapté par CHARET (85) à l'analyse des constituants des glycoprotides et, en particulier, des osamines.

B - DETERMINATION DU TRYPTOPHANNE

Le tryptophanne a été identifié après hydrolyse des glycopeptides par l'acide p. toluène sulfonique en présence d'un dérivé indolique, le 3(2-aminoéthyl) indole qui joue un rôle de protecteur vis-à-vis du tryptophanne au cours de l'hydrolyse. Le procédé appliqué est celui de LIU et CHANG (86)

1°) Préparation du 3(2-aminoéthyl) indole

393 mg de chlorhydrate de 3(2-aminoéthyl) indole sont dissous dans 4,8 ml d'eau distillée et refroidis dans la glace. 10 ml de chloroforme puis 1 ml de soude 2 N sont ajoutés. Après agitation, la phase chloroformique est lavée 2 fois avec 2 ml d'eau, puis séchée sur du sulfate de calcium. Les cristaux de 3(2-aminoéthyl) indole sont récupérés après évaporation du chloroforme.

2°) Hydrolyse

Dans un tube à hydrolyse sont introduits 3 mg de glycopeptide 2,4 % de 3(2-aminoéthyl) indole et 1 ml d'acide p. toluène sulfonique 3 N exempt d'HCl. Le tube est scellé sous vide et porté à 105°C pendant 24 heures.

3°) Identification du tryptophanne

Le tryptophanne peut être repéré à l'auto-analyseur Multichrom-BECKMAN. Il forme un pic situé sur le diagramme avant l'arginine.

Il a également été mis en évidence par révélation spécifique par le p. diméthylaminobenzaldéhyde effectuée sur des électrochromatogrammes réalisés avec les hydrolysats.

On pulvérise sur le papier le réactif suivant :

p. diméthylaminobenzaldéhyde	1 g
acétone	90 ml
acide chlorhydrique concentré	10 ml

II - COMPOSITION EN GLUCIDES

A - COMPOSITION CENTESIMALE

La composition centésimale en oses neutres et en osamines

a été déterminée à l'aide des techniques décrites dans la revue générale de MONTREUIL et SPIK (87).

B - COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES*

Les rapports molaires en monosaccharides des glycopeptides ont été déterminés après méthanolyse selon la méthode de ZANETTA et al (88) modifiée par FOURNET (89) 500 μg de glycopeptide préalablement desséchés sur P_2O_5 sont additionnés de 500 μl de méthanol-chlorhydrique 1,5 N et portés à 80°C pendant 24 à 48 heures. Après dessiccation sous azote, le résidu est traité par 100 μl de dichlorométhane et 100 μl d'anhydride trifluoroacétique à 150°C durant 2 périodes de 5 minutes. Les dérivés trifluoroacétylés des monosaccharides methylglycosylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne (3 x 0,3 cm, en verre) de Varaport 30 à 5 p. 100 de Silicone OV-210, à la température programmée de 110°C à 230°C (1°C par minute), avec un débit de gaz vecteur (N_2) 7,5 ml/min.

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES CHAINES PEPTIDIQUES

I - ACTION DE LA SOUDE

A - PRINCIPE

L'action de la soude permet de mettre en évidence les liaisons glycanne-protide du type O-glycosidiques. La liaison O-thréonyl-glycosidique est très labile en milieu alcalin et la rupture de la liaison s'accompagne de la libération du glycanne et de la transformation de la thréonine en acide 2-amino-2-buténoïque réductible en acide α -amino-butyrique. Le mécanisme

* Nous remercions vivement M. Bernard FOURNET qui a réalisé ce travail, avec la collaboration technique de M. Yves LEROY

de β -élimination ne peut avoir lieu que si la fonction $-\text{COOH}$ de la thréonine est bloquée ou engagée dans une liaison peptidique, ce qui est réalisé dans le cas des glycopeptides tryptiques ou chymotryptiques. La disparition d'un résidu de thréonine après l'action de la soude indique que la liaison entre le glycanne et le peptide est de type O-thréonyl-glycosidique.

B - MODE OPERATOIRE

5 mg de glycopeptide sont traités par 1 ml de solution aqueuse de soude 0,5 N, en présence de borohydrure de sodium (concentration finale 0,3 M) à 20°C pendant 48 heures, selon le procédé de TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN (90).

La solution est acidifiée par de l'acide acétique glacial ajouté jusqu'à la fin du dégazement gazeux. Elle est ensuite évaporée à siccité sous pression réduite. Le résidu est débarrassé de l'acide borique en le reprenant plusieurs fois par un mélange de méthanol et d'acide acétique glacial (4 : 1) (v : v) et en évaporant la suspension obtenue par distillation sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris par de l'HCl 5,6 N et soumis à l'hydrolyse et au dosage des acides aminés à l'auto-analyseur.

II - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Les acides aminés situés en position C-terminale peuvent être identifiés soit par la méthode d'hydrazinolyse, soit par l'action des carboxypeptidases A et B.

A - METHODE D'HYDRAZINOLYSE

1°) Principe

Nous avons utilisé la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI et al. (91) dont le principe général est le suivant : l'hydrazine coupe les liaisons peptidiques en transformant les acides aminés en hydrazides, sauf l'acide aminé C-terminal qui reste intact. Cet acide aminé peut être identifié après purification.

2°) Mode opératoire

Une micromole de glycopeptide convenablement desséchée est dissoute dans 1 ml d'hydrazine anhydre obtenue suivant le procédé de KUSAMA (92)

puis maintenue en tube scellé 8 heures à 105°C.

Le mélange réactionnel est ensuite séché une nuit en exsiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique.

Le résidu est purifié sur résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite IRC-50 "mesh" 150-200, suivant le protocole décrit par DE LA LLOSA et coll. (93).

Le résidu repris par 2 ml d'eau distillée est introduit sur la colonne de résine (0,9 x 2 cm).

L'élution est réalisée :

a - par 40 ml d'eau distillée : élution des acides aminés neutres et acides et de l'asparthydrazide 4 et du glutamhydrazide 5, dans le cas où un résidu d'asparagine ou de glutamine se trouve en position C-terminale.

b - par 15 ml d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7 : élution des acides aminés basiques et de l'asparthydrazide 1 et du glutamhydrazide 1.

Les éluats sont concentrés à sec et les acides aminés identifiés à l'auto-analyseur.

B - HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

Nous utilisons les préparations enzymatiques fournies par la firme WORTHINGTON.

La carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1) libère les acides aminés situés en position C-terminale d'une chaîne peptidique à l'exception de la proline, de la lysine et de l'arginine. La carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2) libère la lysine et l'arginine C-terminales.

1°) Hydrolyse des glycopeptides tryptiques

A 1 micromole de glycopeptide dissoute dans 2 ml de tampon bicarbonate 0,1 M de pH 8,5, on ajoute 0,5 micromole de norleucine et 5 μ l de solution enzymatique de carboxypeptidase B. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 5 μ l de solution de carboxypeptidase A sont ajoutés. On réalise une cinétique en effectuant des prélèvements de 200 μ l qui sont immédiatement acidifiés par de

l'acide acétique et congelés.

Les acides aminés libérés sont identifiés et dosés à l'auto-analyseur d'acides-amino.

2°) Hydrolyse des glycopeptides chymotrypsiques

Les glycopeptides chymotrypsiques ne renfermant pas d'acides-amino basiques, il n'est pas nécessaire d'utiliser la carboxypeptidase B. Le protocole expérimental employé est identique à celui décrit ci-dessus, mais la carboxypeptidase A est ajoutée immédiatement.

III - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Nous utilisons la méthode des dansyl amino-acides de GRAY et HARTLEY (94).

A - DANSYLATION DES GLYCOPEPTIDES

5 nanomoles de glycopeptide sont placées dans un petit tube de verre spécial. On ajoute 10 μ moles de solution de bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,2. On évapore à siccité et le résidu est repris par 10 μ l d'eau bidistillée auxquels on ajoute 10 μ l d'une solution acétonique à 2,5 mg/ml de chlorure de l'acide diméthylamino-5-naphtalène sulfonique (DNSCl). Le tube est bouché avec une feuille de papier paraffiné et laissé à 37°C, pendant 1 heure, à l'obscurité.

Il est ensuite placé dans un dessiccateur et son contenu évaporé à sec. On introduit ensuite dans le tube 50 μ l d'acide chlorhydrique 5,6 N et on hydrolyse à 105°C pendant 16 heures. L'hydrolysate est séché dans un dessiccateur, et les dansyls amino-acides sont extraits par 2 fois 25 μ l d'acétate d'éthyle saturé en eau, séchés et repris par 10 μ l d'acétate d'éthyle en vue de la chromatographie.

B - CHROMATOGRAPHIE DES DANSYL-AMINO-ACIDES

Les dansyl-amino-acides sont séparés grâce à la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince réalisée sur des feuilles de polyamide (5 x 5 cm). La première migration est effectuée dans de l'acide formique 1,5 p. 100 (v/v). Après séchage soigneux de la plaque, la seconde migration est réalisée dans le mélange benzène-acide acétique (9 : 1, v : v). Une troisième migration, dans la même direction que la seconde, peut être réalisée dans le mélange acétate

d'éthyle-méthanol-acide acétique (20 : 1 : 1, v : v), afin de lever les ambiguïtés pouvant exister notamment entre l'acide aspartique et l'acide glutamique, la sérine et la thréonine.

Les dansyl-amino-acides fluorescents en lumière ultraviolette sont facilement mis en évidence, et, identifiés par rapport à une carte témoin et à l'aide de témoins internes.

IV - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

La méthode d'Edman présente l'avantage d'être récurrente et de permettre l'identification des acides aminés constituant successivement l'enchaînement peptidique à partir de l'extrémité N-terminale. A chaque étape il est possible d'identifier, soit :

- le nouvel acide aminé N-terminal du peptide,
- le PTH amino-acide libéré.

Le nombre de cycles qu'il est possible d'effectuer dépend du rendement de la réaction.

A - METHODE D'EDMAN COUPLEE A L'IDENTIFICATION DES DANSYL-AMINO-ACIDES

C'est un protocole proche de celui décrit par HARTLEY (95) qui a été appliqué. On prépare autant de tubes que l'on veut effectuer de cycles.

On introduit dans les tubes et on sèche 10 μ l d'une solution renfermant 1 mg de glycopeptide dans 250 μ l d'eau. Un tube est conservé pour déterminer l'acide aminé N-terminal. Dans les autres tubes on ajoute 50 μ l d'une solution de 30 μ l de phenylisothiocyanate dans 1 ml de mélange pyridine-eau (3 : 2, v : v). Le tube, sous atmosphère d'azote, est placé 45 minutes à 50°C, puis séché sous vide à 70°C.

Le clivage est alors effectué par addition de 50 μ l d'acide trifluoracétique et chauffage 10 minutes à 50°C. L'acide trifluoracétique est éliminé sous vide.

Les cycles sont effectués à la suite. A chaque fin de cycle un tube est conservé pour déterminer le nouvel acide aminé N-terminal apparu après chaque étape.

Avant d'effectuer la dansylation, il est nécessaire d'extraire le peptide. Le résidu est repris par 40 μ l d'eau et lavé par 3 fois 200 μ l d'acétate d'éthyle saturé en eau. La phase aqueuse est alors séchée et soumise à la dansylation (voir p. 25).

B - METHODE D'EDMAN COUPLEE A L'IDENTIFICATION DES PTH AMINO-ACIDES

Le protocole utilisé est celui mis au point par HAN et al.* (96) qui est rapide et qui fournit de bons rendements permettant de dégrader profondément le glycopeptide.

L'acide aminé sur lequel est fixé le groupement glycanique ne peut être décelé, l'acide aminé suivant est parfois lui aussi difficilement identifiable. L'identification des PTH amino-acides devient de nouveau possible à partir de l'acide aminé placé en β de la liaison glycosidique.

1°) Réactifs

Les réactifs utilisés de pureté "Sequanal Grade" sont fournis par la firme PIERCE CHEMICAL SOCIETY.

L'éther éthylique distillé sans peroxyde, renferme 0,1 p. 100 de dithioerythritol.

2°) Etape de couplage

1 μ mole de peptide (2 μ moles de glycopeptide) placé dans un tube conique rôdé est dissous dans 100 à 300 μ l de tampon nPropanol/eau/NallylNN'diméthylamine (15 : 10 : 1,2) (v : v) de pH 9,5 ajusté par de l'acide trifluoracétique à 10 p. 100.

10 μ l de phenylisothiocyanate sont ajoutés.

La réaction est effectuée sous atmosphère d'azote, à 50°C, pendant 40 minutes, avec agitation toutes les 5 minutes. On contrôle ensuite si la réaction a été réalisée en présence d'un excès de phenylisothiocyanate, en refroidissant le tube sous un courant d'eau froide. Le phenylisothiocyanate précipite. En cas contraire, la réaction de couplage doit être recommencée pendant 20 minutes, en ajoutant 5 μ l de phenylisothiocyanate.

* Nous adressons nos plus vifs remerciements à Messieurs K.K. HAN et D. TETAERT qui ont effectué la dégradation du glycopeptide I et qui nous ont accueillie dans leur Laboratoire pour nous enseigner cette technique.

Les phenylthiourées sont alors éliminées en extrayant par 7 fois 1 ml de benzène. La phase de couplage est ensuite séchée par un courant d'azote. Pour parfaire le séchage, quelques gouttes d'acétate d'éthyle sont ajoutées puis évaporées sous azote. Enfin, le tube réaction est placé dans un dessiccateur sur P_2O_5 , à 60°C, sous vide, pendant 30 minutes, afin que le tube soit rigoureusement sec pour effectuer la réaction de clivage.

3°) Etape de clivage

150 μ l d'acide trifluoroacétique anhydre sont ajoutés. Après agitation, la réaction de clivage est effectuée, sous atmosphère d'azote, à 50°C, pendant 7 minutes. L'acide trifluoroacétique est éliminé par un courant d'azote. Il se forme un précipité rosé collant aux parois.

La thiazolinone est extraite par 3 fois 2 ml d'éther.

Le peptide résiduel est séché sur KOH pendant 30 minutes avant de commencer un nouveau cycle de dégradation.

4°) Etape de conversion

L'extrait étheré renfermant la thiazolinone est séché. 200 μ l d'acide chlorhydrique N sont ajoutés et la réaction de conversion est effectuée, sous atmosphère d'azote, à 80°C, pendant 10 minutes.

Le PTH amino-acide formé est extrait par 2 fois 1 ml d'acétate d'éthyle, séché sous azote et repris par 20 μ l d'acétate d'éthyle en vue de la chromatographie.

5°) Identification des PTH-amino-acides

La chromatographie en couche mince sur gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,25 mm d'épaisseur est utilisée. Les chromatoplaques sont fournies par la firme MERCK. Sur ces plaques, des couloirs de 1 cm de large sont tracés à la pointe sèche. Les PTH-amino-acides à identifier sont déposés en alternance avec des mélanges de témoins judicieusement composés.

L'identification des PTH-amino-acides détachés des glycopeptides étudiés a pu être résolue grâce à l'utilisation des deux systèmes solvants préparés de la manière suivante :

Système E modifié,	Acétate de butyle	97 ml
HAN et coll. (97)	Eau	3 ml.

Après agitation et repos pendant une nuit, la phase supérieure est reprise et on y ajoute 4 ml de formamide et 3 ml d'acide propionique.

La cuve en verre est saturée après que le mélange ait été équilibré pendant 2 heures .

Système H ₁ , EDMAN (98)	Chlorure d'éthylène	60 ml
	Acide acétique	14 ml

La figure 1 (p. 30) illustre l'emplacement des PTH-amino-acides après migration dans chacun de ces solvants.

V - ACTION DE LA THERMOLYSINE

La thermolysine coupe préférentiellement les liaisons valine, phenylalanine, leucine et isoleucine (MATSUBARA et coll.) (99).

Nous avons utilisé la thermolysine fournie par la firme MERCK

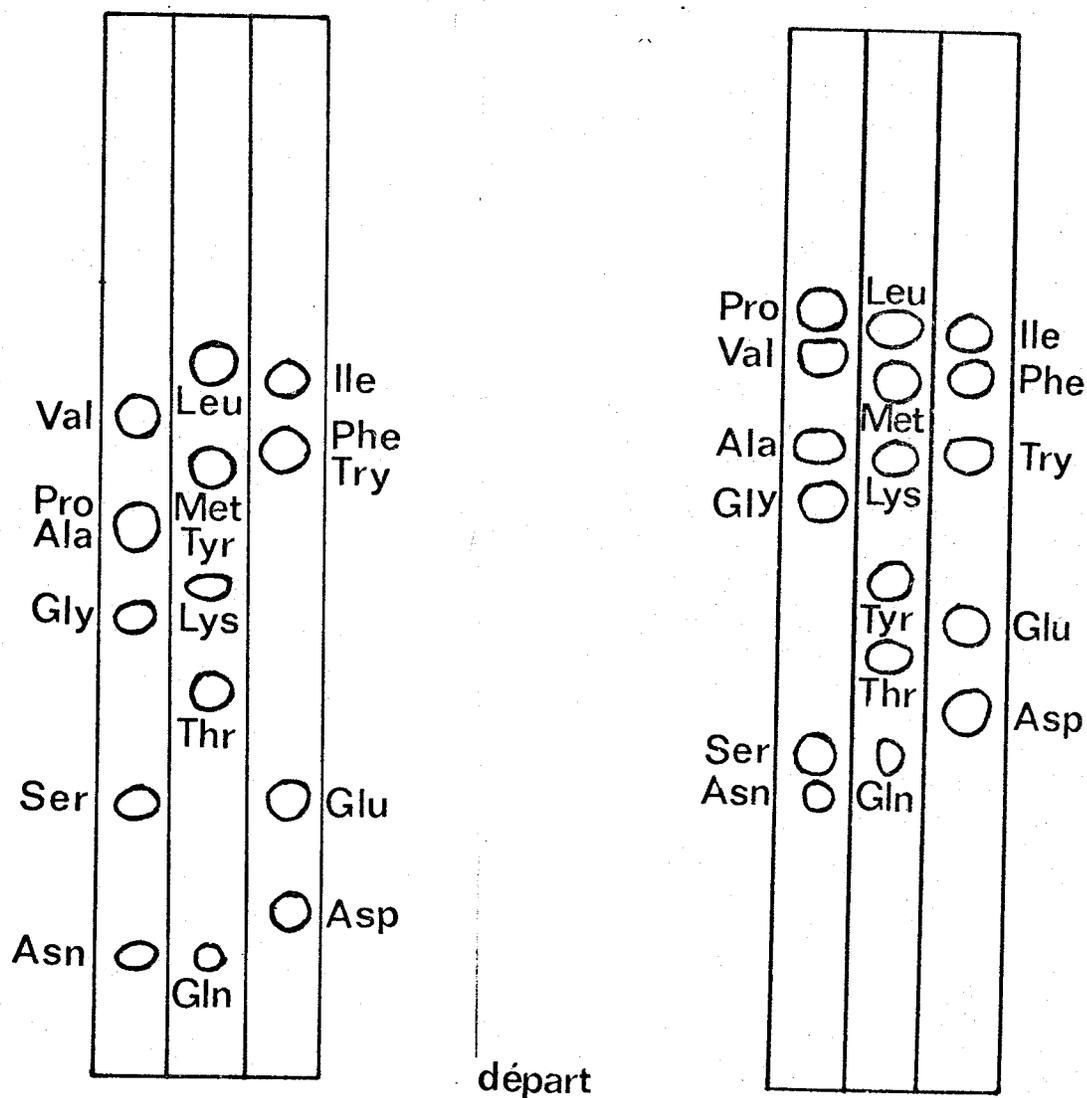
Le protocole expérimental est le suivant : à une solution à 2 p. 100 du glycopeptide dans l'acétate d'ammonium 0,0 l M ajusté à pH 8,5, on ajoute la thermolysine en quantité suffisante pour obtenir un rapport enzyme-substrat de 1/50. La thermolysine a été au préalable activée par incubation d'une demi-heure à la température ambiante dans une solution 0,001 M en acétate de calcium. L'hydrolyse est menée pendant 24 heures à 37°C. La réaction est arrêtée par acidification par de l'acide acétique.

Le glycopeptide résultant est isolé par électrophorèse préparative à pH 2,4.

ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES

I - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE

L'hydrolyse acide ménagée des glycopeptides a été effectuée dans les conditions décrites par SPIK (I00) et MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (I00 bis).



Migration dans le
système-solvant E (voir p. 29)

Migration dans le
système-solvant H₁ (voir p. 29)

Figure 1

Identification des PTH amino-acides par
chromatographie en couche mince sur gel de silice

A - HYDROLYSE PAR LES ACIDES DILUES

Des solutions de 1 g de lactotransferrine dissoute dans 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N, ou sulfurique 0,5 N, sont maintenues à 100°C pendant des temps variant de 5 minutes à 8 heures. Après refroidissement, 10 ml des hydrolysats sont dialysés à 4°C pendant 4 jours, contre de l'eau distillée renouvelée chaque jour. Les fractions dialysables sont purifiées par un passage successif sur des échangeurs de cations (Dowex 50 x 8, "mesh" 25-50, forme acide, 25 ml de résine p. 100 mg de protides) et d'anions (Duolite A 102 D, "mesh" 25-50, forme formiate, 2,5 ml de résine p. ml d'acide 1 N). Le liquide neutre effluent est soumis, après concentration, à la chromatographie sur papier dans différents systèmes-solvants.

B - HYDROLYSE PAR LES RESINES POLYSTYRENE-SULFONEES

La lactotransferrine a été hydrolysée par une résine insoluble polystyrène sulfonée (Dowex 50 x 8, "mesh" 25-50, forme acide). Le mode opératoire est le suivant : 0,5 g de lactotransferrine en solution dans 150 ml d'eau sont maintenues à 100°C sous agitation constante en présence de 5 ml de résine humide. Après 45 minutes à 100°C, les hydrolysats, préalablement concentrés, sont directement soumis à l'analyse chromatographique.

II - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION*

Le procédé d'hydrazinolyse-diazotation des oligosaccharides libres et conjugués a été mis au point au Laboratoire par BAYARD (101) et par BAYARD et MONTREUIL (102). Elle fournit des coupures spécifiques et quantitatives des liaisons N-acétyl-hexosaminidiques. Ce procédé appliqué à des glycopeptides fournit des oligosaccharides possédant un résidu de 2,5-anhydro-D-mannose en position terminale réductrice.

A - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION

100 mg de glycopeptide, rigoureusement anhydre, en solution dans 1 ml d'hydrazine anhydre, sont portés à 100°C pendant 30 heures. Séché à siccité sous courant d'azote, l'hydrazinolysat est ensuite redissous dans 0,5 ml de méthanol auquel on ajoute 7 ml d'une solution d'acide acétique à 15 p. 100

*BAYARD (communication personnelle).

La solution est ensuite chromatographiée sur une colonne de Sephadex G-50 de manière à isoler le glycanne N-désacétylé à l'état pur et éliminer les contaminants tels que l'hydrazine et les hydrazides amino-acides.

La désamination nitreuse du glycanne N-désacétylé est ensuite réalisée dans les conditions suivantes : 100 mg de glycanne sont dissous dans 6 ml d'eau distillée contenant 166,8 mg de nitrite de sodium et 0,90 μ l d'acide acétique glacial. La solution, maintenue à 4°C pendant 20 heures sous agitation magnétique est ensuite désalée par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex G-10.

B - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES

L'isolement des glucides est réalisé en chromatographie préparative sur papier dans le système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Les oligosaccharides ayant un résidu de 2,5-anhydro-D-mannose en position terminale réductrice sont révélés, soit avec le réactif à l'urée chlorhydrique, soit avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

C - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES

Les rapports molaires en monosaccharides ont été déterminés de la façon suivante : les oligosaccharides réduits sont méthanolysés selon le procédé de CLAMP (103). Les méthylglycosides et les polyols sont ensuite triméthylsilylés, puis analysés en chromatographie en phase gazeuse. L'analyse des triméthylsilyl glycosides est conduite en utilisant une colonne d'OV 17 à 3 p. 100 chauffée à 110° pendant 15 minutes puis de 110° à 180° à raison de 1°C par minute. L'azote est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 35 ml/mn.

Les oligosaccharides réducteurs de plus haut poids moléculaire sont, en outre, soumis à une hydrolyse acide ménagée dans les conditions opératoires suivantes : 2 mg de glucides sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 0,1 N, à 80°C pendant 1 heure. La solution est refroidie et l'acide est éliminé par passage sur une colonne (1 x 10 cm) de Duolite A 102 D (25-50 "mesh", HCO_2^-). L'hydrolysats est ensuite analysé en chromatographie sur papier.

Les oligosaccharides réduits sont perméthylés selon le procédé décrit p. 34, et les éthers méthyliques sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse.

D - DOSAGE DES OLIGOSACCHARIDES ET ANHYDROHEXOSES

Le dosage de faibles quantités d'oligosaccharides est rendu possible par l'utilisation d'isotopes radioactifs. La réduction des osides et anhydrohexoses par le borohydrure de sodium tritié permet, après séparation chromatographique des oligosaccharides réduits, de mesurer la quantité de chacun d'entre eux et de déterminer leurs rapports par comptage de la radioactivité.

A une quantité de 0,3 à 0,5 mg de glucides totaux, on ajoute 0,1 mCi de borohydrure de sodium tritié (activité spécifique 10 Ci/mM). Après une heure de réaction, une quantité de borohydrure de sodium froid 10 fois en excès est ajoutée et la réaction est poursuivie pendant 4 heures. Puis elle est arrêtée en acidifiant par addition d'acide acétique dilué.

Le réactif en excès est éliminé par électrophorèse préparative dans le tampon : pyridine/acide acétique/eau (15 : 50 : 1935) de pH 3,9. La bande de papier contenant les glucides réduits est éluée par de l'eau. Les oligosaccharides réduits et le 2,5-anhydro-D-mannitol sont alors séparés par chromatographie sur papier Whatman 1 dans le système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). La migration chromatographique est arrêtée au bout de 8 heures. Le chromatogramme séché est découpé en bandes de papier de 1 cm qui sont placées dans 10 ml de mélange scintillant toluène-PPO-POPOP et mesurées au compteur de radioactivité.

On détermine ainsi le nombre de cpm fournis par chaque sucre réduit. Ce nombre est proportionnel à la quantité présente sur le chromatogramme. On peut donc en déduire les rapports molaires existant entre les oligosaccharides et le 2,5-anhydro-D-mannose.

III - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES

Nous avons appliqué la méthode de HAKOMORI (104) modifiée par FOURNET (105) et FOURNET et al. (105 bis).

Les fonctions hydroxyliques des oses du glycanne impliquées dans des liaisons glycosidiques ne sont pas méthylées. Après hydrolyse du glycopeptide perméthylé, l'identification des dérivés méthylés libérés fournit des renseignements sur le mode d'enchaînement des monosaccharides.

A - REACTION DE METHYLATION

80 mg d'une dispersion d'hydrure de sodium à 50 p. 100 sont ajoutés à 5 ml de diméthylsulfoxyde et l'on agite 15 minutes à la température ordinaire en faisant passer un lent courant d'azote.

16 mg de glycopeptide préalablement séché sous vide à 40°C pendant 24 h, sont dissous dans 1 ml de diméthylsulfoxyde et sont ensuite versés dans la solution du méthylsulfinyl carbanion. Après 6 heures d'agitation sous courant d'azote, on ajoute 0,5 ml d'iodure de méthyl et la réaction d'éthérification est poursuivie durant 15 heures. 10 ml d'eau sont alors ajoutés à la solution d'où l'on extrait le glycopeptide méthylé par 5 fois 5 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques rassemblées sont lavées par 3 fois 10 ml d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 1 p. 100 puis séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées sous courant d'air.

Le résidu est repris par 1 ml de diméthylsulfoxyde et soumis à un deuxième puis un troisième cycle de méthylation dans les mêmes conditions.

A la fin du troisième cycle, le glycopeptide méthylé est purifié par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20. Le résidu sec est repris par 1 ml du mélange éthanol/chloroforme (1 : 1) et chromatographié sur une colonne (2 x 50 cm) de Sephadex LH 20. Le glycopeptide méthylé est élué par le mélange éthanol/chloroforme (1 : 1). Les fractions de l'effluent qui donnent une coloration à la réaction au phenol-sulfurique de DUBOIS et al. (106) sont rassemblées et séchées sous vide.

B - HYDROLYSE DES GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES

Le glycopeptide perméthylé repris par quelques gouttes de méthanol est hydrolysé à 100°C par 2 ml d'acide chlorhydrique pendant 4 heures.

L'acide chlorhydrique est éliminé par codistillation avec de l'éthanol, puis le résidu est placé en dessiccateur, en présence de soude et d'anhydride phosphorique pendant une nuit.

C - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES

L'hydrolysate du glycopeptide perméthylé est fractionné par électrophorèse préparative sur papier réalisée dans les conditions expérimentales suivantes : papier Whatman n° 3 MM ; tampon de MICHL(107) de pH 3,9 (pyridine/acide acétique/eau, 30 : 100 : 3870) ; 7 V/cm pendant 4 heures. La révélation des bandes latérales par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (108) et par le réactif à la ninhydrine permet de localiser la bande "basique" des O-méthyl-glucosamines et la bande "neutre" des monosaccharides neutres-O-méthylés. Ces deux fractions sont éluées par de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique et les éluats sont évaporés à siccité dans un évaporateur rotatif, puis en dessiccateur.

D - IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES

1°) Identification des éthers méthyliques des monosaccharides neutres.

Les monosaccharides neutres-O-méthylés sont méthylglycosilés par 1 ml de méthanol chlorhydrique (1 N en HCl), à 100°C, pendant 8 heures en tube scellé. La solution est évaporée à siccité sous courant d'azote, et, le résidu est repris par 50 μ l de méthanol. Les éthers méthyliques chromatographiés en phase gazeuse sur une colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AM HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000. La température de la colonne est de 180°C, le débit d'azote, gaz vecteur, est de 20 ml/mn.

2°) Identification des méthyl-osamines

Les osamines méthylées sont triméthylsilylées selon le procédé de SWEELEY et al. (109) Elles sont dissoutes dans 100 μ l de pyridine anhydre que l'on additionne de 50 μ l d'hexaméthylidisilazane et de 50 μ l de triméthylchlorosilane. Le mélange est agité très énergiquement pendant 15 minutes, puis séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 50 μ l d'heptane et soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : colonne de verre de 0,3 x 180 cm ; Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 de silicone OV 17 ; température du four 120°C ; débit du gaz vecteur (azote) 20 ml/minute.

IV - HYDROLYSES ENZYMATIQUES

A - ACTION DE LA FUCOSIDASE (E.C. 3.2.I.)

Nous avons utilisé la fucosidase du Rein de Boeuf fournie par la firme Boehringer.

A 10 mg de glycopeptide dissous dans 500 μ l de tampon de pH 4,6 sont ajoutés 100 μ l de solution enzymatique à 1 mg/0,5 ml. Le mélange est porté à 37°C pendant 24 heures.

L'hydrolyse enzymatique a été répétée 3 fois de suite sur le même glycopeptide qui a ensuite été précipité par l'éthanol.

B - ACTION DE LA GALACTOSIDASE (E.C. 3.2.I.23) (YAMADA et al. (109 bis))

La galactosidase de Turbo cornutus a été utilisée. La solution enzymatique avait une activité de 1 U/ml.

A 10 mg de glycopeptide dissous dans 500 μ l de tampon de pH 2,9 ont été ajoutés 20 μ l de solution enzymatique.

Après 3 hydrolyses successives à 37°C pendant 24 heures, le glycopeptide a été précipité par l'éthanol.

RESULTATS

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

Pour purifier les glycopeptides des hydrolysats chymotrypsiques ou trypsiques de la lactotransferrine réduite et alkylée, nous avons effectué d'abord une chromatographie de tamisage moléculaire qui, du fait de la différence de masse moléculaire entre les peptides et les glycopeptides, permet d'éliminer une grande partie des peptides. L'électrophorèse préparative en veine liquide permet ensuite d'obtenir une fraction glycopeptidique totalement exempte de peptides.

2 glycopeptides de séquences peptidiques différentes n'ont pu être séparés qu'après désialylation par la neuraminidase, chacun des glycanes étant vraisemblablement hétérogène au point de vue du nombre de résidus d'acides sialiques dans la molécule.

I - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES

A - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES

1°) Chromatographie de gel filtration

Le diagramme d'élution de la colonne de Biogel P₃₀ est donné dans la figure 2 (p. 39). La fraction glycopeptidique totale (FGT) est éluee en tête tandis qu'une quantité importante de peptides sont retardés dans le gel. Le rendement est de l'ordre de 150 à 200 mg de fraction glycopeptidique totale pour un hydrolysat de 1 g de lactotransferrine.

2°) Electrophorèse en veine liquide

Chaque fraction renfermant des glucides est soumise, après lyophilisation à un contrôle électrophorétique à pH 2,4. La révélation des électrophorégrammes par les réactifs à la ninhydrine et au periodate benzidine montre que les fractions 12 et 16 (voir figure 3, p. 40) sont exemptes de peptides.

Ces fractions seront retenues pour la séparation ultérieure des glycopeptides. Les rendements sont de 30 à 45 mg de glycopeptides pour 1 g d'hydrolysat de lactotransferrine.

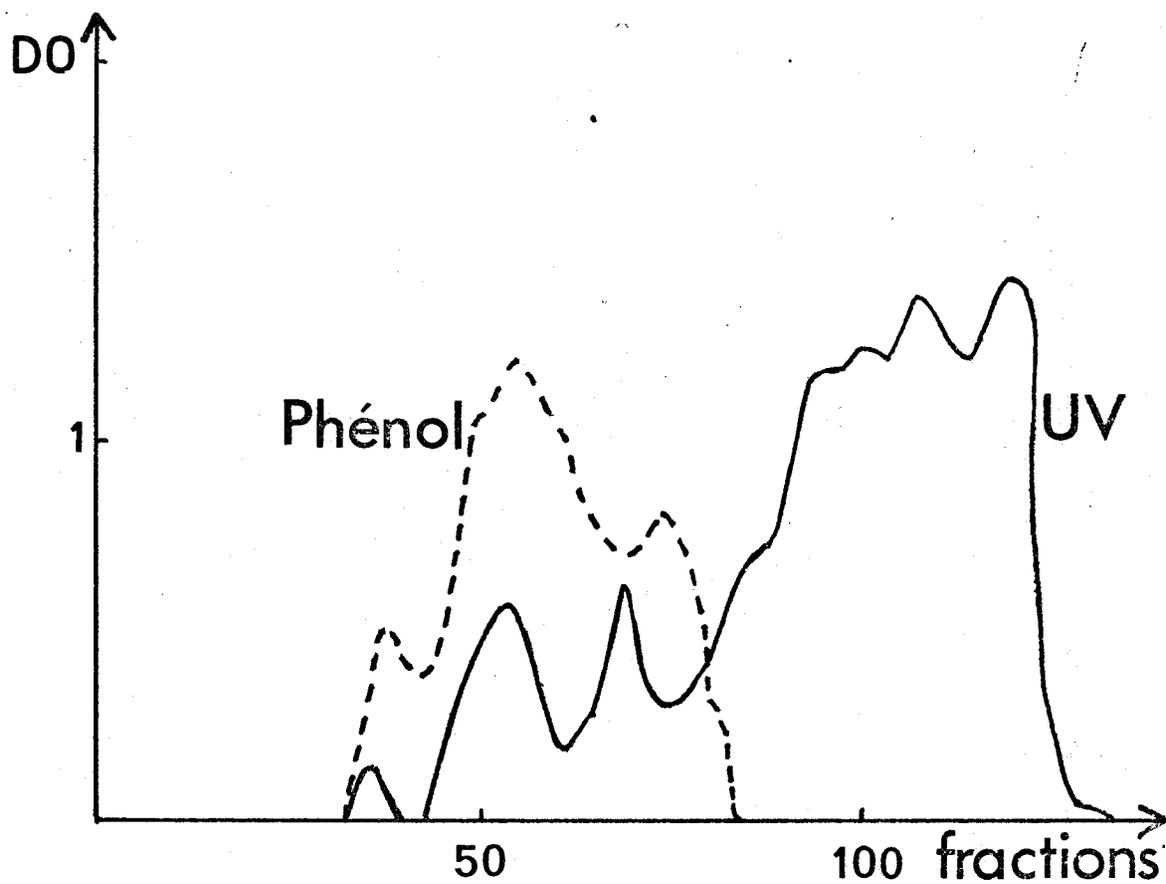


Figure 2

Fractionnement des hydrolysats chymotrypsiques
de l'apolactotransferrine réduite et alkylée

Chromatographie sur colonne de Biogel P₃₀ de 4 x 130 cm
Elution par l'eau. Débit : 40 ml/heure

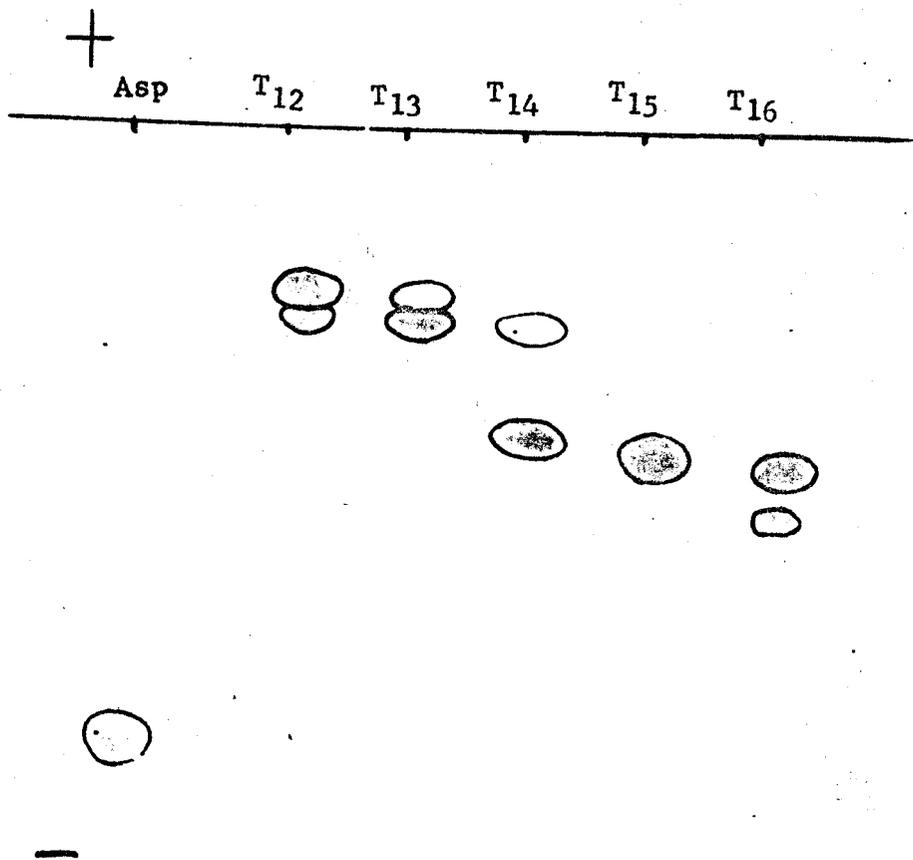


Figure 3

Séparation des glycopeptides chymotrypsiques de la CM-LTF
en électrophorèse en veine liquide à pH 2,4

A l'issue du fractionnement "Elphor Vap" nous obtenons des fractions glycopeptidiques qui ne sont plus souillées de peptides.

Cependant, nous révélons 4 taches de glycopeptides et dans chaque fraction les glycopeptides sont en mélange.

B - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1°) Action de la neuraminidase

Nous avons pensé que l'hétérogénéité des glycopeptides pouvait provenir de la composition en acides sialiques de la lactotransferrine ainsi que l'ont montré WOLFSON et ROBBINS (110). Aussi, afin de la diminuer, avons nous désialylé totalement les molécules de glycopeptides en faisant agir la neuraminidase. Comme le montre la figure 4 (p. 42), les glycopeptides, moins acides, ont une migration plus rapide à pH 2,4. De plus, les électrophorogrammes sont simplifiés, puisque toutes les fractions donnent seulement 2 taches ayant la même migration dans tous les cas.

2°) Electrophorèse préparative sur papier

Une bonne séparation des asialo-glycopeptides a été obtenue en effectuant une électrophorèse à pH 6,5, comme le montre la figure 5 (p. 43). Des électrophorèses préparatives ont été réalisées et ont permis d'isoler les deux glycopeptides chymotrypsiques I_C et II_C. Les rendements sont respectivement de 7 et 6 mg pour 1 g de lactotransferrine.

II - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES

Le schéma de fractionnement décrit ci-dessus a été appliqué aux hydrolysats tryptiques. La fraction glycopeptidique totale issue de la chromatographie des hydrolysats sur Biogel P₃₀ a été soumise à l'électrophorèse en veine liquide. Les fractions 14 à 20 exemptes de peptides ont été désialylées par la neuraminidase. Les glycopeptides I_T et II_T ont été isolés par électrophorèse préparative à pH 6,5 avec des rendements respectifs de 12 à 9 mg pour 1 g de lactotransferrine.

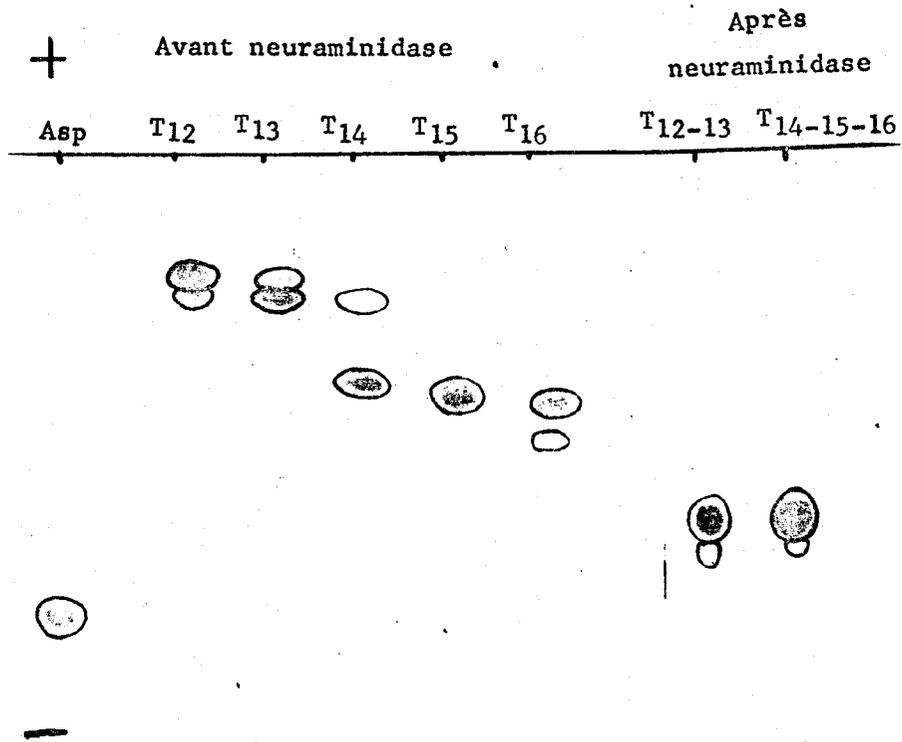


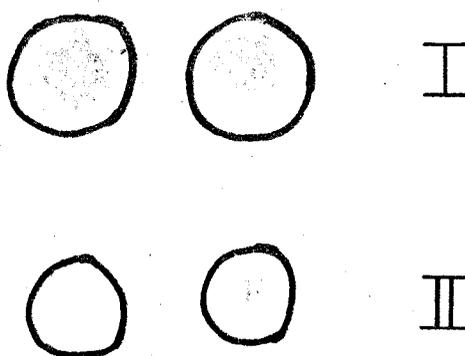
Figure 4

Action de la neuraminidase sur
les glycopeptides chymotrypsiques de la CM-LTF

Electrophorèse pH 2,4



+ T₁₂₋₁₃ T₁₄₋₁₅₋₁₆



Electrophorèse pH 6,5

Pyridine - Acide acétique - Eau

— 90 3 1400

Figure 5

Séparation des asialo-glycopeptides chymotrypsiques de la CM-LTF

COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

La composition en acides aminés des glycopeptides isolés est donnée dans le tableau IV (p. 45).

Le nombre de résidus d'acides aminés se trouvent entre eux dans des rapports simples, notamment les glycopeptides I_C et II_T qui se sont avérés être dans un état de pureté satisfaisant.

On remarque que le glycopeptide chymotrypsique II_C renferme à la fois de la phenylalanine et du tryptophane alors que les liaisons de ces deux amino-acides sont susceptibles d'être hydrolysées par la chymotrypsine.

Les glycopeptides trypsiques respectivement 17 et 11 résidus d'acides aminés ont une séquence peptidique plus longue que les glycopeptides chymotrypsiques (14 et 10 résidus). Le premier renferme 1 résidu d'arginine et le second 1 résidu de lysine.

Les compositions en amino-acides au voisinage du point d'attache des glycannes sont nettement différentes puisque, au contraire du second, le premier glycopeptide renferme de la proline, de l'alanine, de la valine et de l'isoleucine. De plus, il ne comporte pas de sérine, ni de carboxyméthylcystéine alors que le second glycopeptide en contient 1 résidu.

Le tableau V (p. 46) montre que la composition glucidique des 2 types de glycopeptides est analogue.

DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES

Le fractionnement des hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques de la lactotransferrine réduite et alkylée a permis d'isoler 4 glycopeptides correspondant à 2 glycannes placés à des endroits différents de la chaîne protéique de la lactotransferrine humaine. Les différences importantes dans les compositions en acides aminés des 2 types de glycopeptides permettent de l'affirmer. Leur état de pureté permet d'envisager l'étude de leur structure qui

Tableau IV
Composition en acides aminés
des glycopeptides désialylés

	Glycopeptides tryptiques		Glycopeptides chymotryptiques	
	I _T	II _T	I _C	II _C
CysCM	-	0,4	-	0,4
Asp	1,2	0,9	0,9	1,0
Thr	0,8	0,8	0,9	0,8
Ser	0,4	0,9	-	0,8
Glu	1,6	0,8	1,8	1,1
Pro	3,6	-	2,7	-
Gly	1,0	1,1	0,9	0,8
Ala	1,9	0,1	1,9	0,2
Val	0,6	-	0,6	-
Ile	0,6	-	0,6	-
Leu	1,0	1,0	1,0	1,0
Phe	0,8	0,9	-	0,6
Lys	0,2	0,8	-	-
Arg	0,6	-	-	-
Try	+	+	+	+

Tableau V

Composition en glucides des asialo-glycopeptides
de la lactotransferrine humaine

	Glycopeptides tryptiques		Glycopeptides chymotryptiques	
	I _T	II _T	I _C	II _C
<u>Composition centésimale</u>				
Monosaccharides neutres	27,0	32,7	28,4	37,0
N-acétylhexosamines	19,7	23,5	23,0	28,8
<u>Composition molaire</u>				
Galactose			2	2
Mannose			2,8	2,9
Fucose			1,18	1,2
N-acétylglucosamine			3,4	3,6



pourrait apporter des renseignements intéressants pour confirmer ou infirmer les hypothèses concernant le problème du codage par la chaîne peptidique, de la conjugaison du glycanne sur l'asparagine. En effet, nous possédons 2 glycannes de composition identique dont les compositions en amino-acides au voisinage du point d'attache sont très différentes.

I - SEQUENCE PEPTIDIQUE AU VOISINAGE DU GLYCANNE I

L'ensemble des opérations qui nous ont permis de déterminer la séquence des glycopeptides I_C et I_T est résumé dans la figure 6 (p. 48).

A - GLYCOPEPTIDE CHYMOTRYPSIQUE I_C

1°) Action de la soude

Les résultats de l'action de la soude sur le glycopeptide I_C sont donnés dans le tableau VI (p. 49). On n'observe pas de diminution du taux de thréonine. Il ne semble donc pas que le glycanne I soit fixé par une liaison O-thréonyl-glucosaminidique sur la chaîne peptidique, mais que ce glycopeptide comporte l'un des deux glycannes liés par une liaison asparaginy-glucosamine dont SPIK (111)_a a démontré l'existence dans les hydrolysats pronasiques de la lactotransferrine humaine.

2°) Acide aminé N-terminal

L'acide aminé N-terminal identifié après dansylation est la leucine.

3°) Séquence C-terminale

Pour 1 μ mole de glycopeptide la carboxypeptidase A libère en 1 h 30 1,32 μ mole d'alanine, 0,63 μ mole de valine ainsi que du tryptophane.

Du fait de la spécificité de la chymotrypsine, on peut considérer que le tryptophane est situé en position C-terminale de la chaîne peptidique.

Les 2 résidus d'alanine sont situés dans la séquence C-terminale de la molécule.

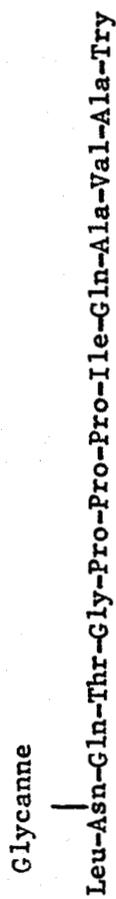
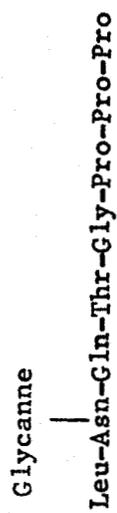
Glycopeptide I_CGlycopeptide I_{Ct}Glycopeptide I_T

Figure 6

Schéma de structure des glycopeptides I_C et I_T

Tableau VI

Action de la soude sur le glycopeptide I_C

	Glycopeptide natif	Glycopeptide après action de la soude
Asp	0,9	0,9
Thr	0,9	0,8
Glu	1,8	1,9
Pro	2,7	2,8
Gly	0,9	0,8
Ala	1,9	2,2
Val	0,6	0,8
Ile	0,6	0,8
Leu	1,0	1,0
Try	+	



4°) Action de la thermolysine

Du fait de la présence dans la chaîne peptidique des résidus de valine et d'isoleucine, nous avons hydrolysé le glycopeptide I_C par la thermolysine de manière à obtenir un glycopeptide I_{Ct} plus court, de composition plus simple, notamment afin d'essayer de situer les résidus de proline entrant dans la composition de la molécule. Les compositions comparées des glycopeptides I_C et I_{Ct} sont données dans le tableau VII (p. 51).

Le glycopeptide I_{Ct} renferme les 3 résidus de proline. L'acide aminé N-terminal du glycopeptide I_{Ct} est la leucine, son acide aminé C-terminal identifié après hydrazinolyse est la proline, ce qui empêche la détermination de la séquence C-terminale par action de la carboxypeptidase A.

Le glycopeptide thermolysique I_{Ct} correspond donc, puisqu'il possède le même acide aminé N-terminal, à la partie N-terminale de la chaîne peptidique du glycopeptide I_C . On peut admettre que la thermolysine a rompu la liaison Pro-Ile puisque l'action de la carboxypeptidase A a montré que le résidu de valine se trouve plus près de l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique.

5°) Dégradation d'EDMAN

Après chaque cycle de dégradation récurrente d'Edman, on a pu successivement identifier les PTH-amino-acides suivants : Leu, X-glycane, Gln, Thr, Gly, Pro, Pro, Pro, Ile, Gln, Ala, Val.

Ces résultats permettent notamment de situer dans la chaîne peptidique les 3 résidus de proline dont la position n'avait pu être déterminée dans le glycopeptide thermolysique. D'autre part, la dégradation récurrente ayant pu se poursuivre assez profondément, elle permet de préciser la séquence C-terminale du glycopeptide.

6°) Conclusions

L'ensemble de ces résultats, associés à ceux de SPIK (112) permettent d'établir la séquence peptidique du glycopeptide I_C dont le schéma de structure est présenté à la figure 6 (p. 48). La position du second résidu d'alanine est déterminée par différence.

Tableau VII
Composition molaire en acides aminés des
glycopeptides I_C et I_{Ct}

	I _C	I _{Ct}
Asp	0,9	0,9
Thr	0,9	1,0
Glu	1,8	0,9
Pro	2,7	2,9
Gly	0,9	1,0
Ala	1,9	-
Val	0,6	-
Ile	0,6	-
Leu	1,0	1,0
Try	+	-

B - GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE I_T

La composition en amino-acides du glycopeptide I_T montre qu'il possède en plus des acides aminés composant le glycopeptide I_C, un résidu d'arginine, un résidu de proline et un résidu de phénylalanine.

Du fait de la spécificité de la trypsine on peut situer le résidu d'arginine en position C-terminale, comme le démontre l'action de la carboxypeptidase B.

L'acide aminé N-terminal déterminé après dansylation est la proline.

La dégradation récurrente d'Edman a été effectuée. L'identification des PTH-amino-acides détachés et des dansyls-amino-acides apparus a montré l'existence de l'enchaînement Pro-Phe-Leu.

En conséquence, la séquence peptidique du glycopeptide I_T est établie et correspond au schéma de structure présenté à la figure 6 (p. 48). Pour fournir un glycopeptide possédant un résidu de proline en position N-terminale, il faut admettre que la trypsine a hydrolysé une liaison Arg-Pro, la liaison Lys-Pro n'étant jamais coupée par cette enzyme.

II - SEQUENCE PEPTIDIQUE AU VOISINAGE DU GLYCANNE II

L'ensemble des opérations qui ont permis la détermination de la séquence des glycopeptides II_C et II_T est résumé dans la figure 7 (p. 53).

A - GLYCOPEPTIDE CHYMOTRYPSIQUE II_C

1°) Action de la soude

Les résultats de l'action de la soude sur le glycopeptide II_C sont donnés dans le tableau VIII (p. 54).

Le taux des hydroxy-amino-acides ne diminue pas après action de la soude. Le glycanne de ce glycopeptide n'est donc pas lié O-glycosidiquement, mais semble être le second glycanne lié par une liaison asparaginyl-glucosamine mis en évidence par SPIK (113).

Glycopeptide II_C

Glycane

Leu-Phe-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-CysCM-Try

Glycopeptide II_T

Glycane

Leu-Phe-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-CysCM-Try-Lys

Figure 7

Schéma de structure des glycopeptides II_C et II_T

Tableau VIII

Action de la soude sur le glycopeptide II_C

	Glycopeptide natif	Glycopeptide après action de la soude
CysCM	0,4	0,4
Asp.	1,0	1,0
Thr	0,8	0,9
Ser	0,9	1,0
Glu	1,0	1,1
Gly	0,9	1,0
Leu	1,0	1,0
Phe	0,5	0,6
Try	+	



2°) Acide aminé N-terminal

L'acide aminé N-terminal identifié après dansylation est la leucine.

3°) Séquence C-terminale

La carboxypeptidase A libère du tryptophane et de la carboxyméthylcystéine. Le glycopeptide étant un glycopeptide chymotrypsique, on peut situer le tryptophane en position C-terminale, la carboxyméthylcystéine prenant l'avant-dernière position dans la chaîne peptidique.

4°) Dégradation récurrente d'Edman

La dégradation récurrente d'Edman effectuée sur le glycopeptide II_C n'a pas donné de résultats suffisamment interprétables, vraisemblablement du fait du degré de pureté insuffisant des préparations

B - GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE II_T

Le glycopeptide trypsique II_T a la même composition en amino-acides que le glycopeptide II_C, mais possède en plus un résidu de lysine situé en position C-terminale du fait de la spécificité d'action de la trypsine. Ce résidu est libéré par la carboxypeptidase B. La séquence N-terminale de ce glycopeptide est donc la même que celle du glycopeptide chymotrypsique correspondant II_C.

L'acide aminé N-terminal identifié après dansylation est la leucine.

L'état de pureté des préparations de glycopeptide II_T supérieur à celui des préparations de glycopeptide II_C a rendu possible la dégradation récurrente d'Edman. Les PTH-amino-acides successivement identifiés sont ceux de la leucine, le phényl-alanine, X-glycane, la glutamine, la thréonine et le glycolle.

C - CONCLUSION

Le schéma de structure des glycopeptides II_C et II_T est présenté dans la figure 7 (p. 53).

La position du résidu de sérine a été déterminée par différence.

Le résidu de phényl-alanine est lié au résidu d'asparagine portant le glycane. Cette position particulière est peut-être la cause de la résistance de la liaison à l'action de la chymotrypsine.

ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES

Ainsi que nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, nous sommes parvenue à isoler, conjugués à des chaînes peptidiques, les 2 glycanes de la lactotransferrine humaine attachés à la protéine par des liaisons asparaginy-N-acétylglucosamine. L'étude de la structure de ces glycanes a été entreprise dans le cadre d'un travail d'équipe et les procédés suivants ont été mis en oeuvre : hydrolyse acide partielle par G. SPIK, hydrazinolyse-diazotation par nous-même et par B. BAYARD, perméthylation et hydrolyse enzymatique par nous-même aidée, respectivement, par B. FOURNET (*) et par G. SPIK (**).

Les résultats qui ont été rassemblés, associés à des résultats acquis antérieurement par MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (II4) et par MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK, (115) nous amènent à la conclusion que les deux glycanes de la lactotransferrine possèdent la même structure qui est précisée dans la figure 8 (p.57) et qui a été déterminée sur la base des expérimentations suivantes.

I - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides des glycopeptides I_c et II_c sont données dans le tableau V (p. 46).

II - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE (SPIK (116)).

A - HYDROLYSE PAR H₂SO₄ 0,01 N

L'hydrolyse ménagée par H₂SO₄ 0,01 N à 100°C pendant 45 min. libère quantitativement l'acide N-acétylneuraminique

B - HYDROLYSE PAR H₂SO₄ 1 N

L'étude de la cinétique de libération des glucides par SO₄H₂ 1 N à 100°C montre :

1 - que le fucose et le galactose sont libérés dès le

(*) Avec la collaboration technique de M. Y. LEROY

(***) Avec la collaboration technique de M. J.P. DECOTTIGNIES

début de l'hydrolyse, ainsi que de la N-acétyl-lactosamine

2 - En outre, deux mannobioses isomères et un manno-triose ont été caractérisés dans les hydrolysats partiels réalisés par H_2SO_4 1 N

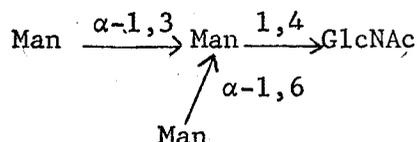
III - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION

A - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

1°) Etude qualitative (BAYARD) (117)

La figure 9 (p. 59) montre que la réaction d'hydrazinolyse suivie de diazotation de la lactotransferrine native fournit du 2,5-anhydro-D-mannose (composé III) et les composés I et II. Les structures des composés I et II ont été déterminées et sont précisées dans la figure 9 (p. 59).

BAYARD confirme ainsi la présence dans les glycannes de la lactotransferrine de résidus de N-acétyl-lactosamine et démontre en outre l'existence du chaînon suivant :



Le 2,5-anhydro-D-mannose libéré proviendrait de la N-acétyl-glucosamine liée à l'asparagine d'une part, et au pénultième résidu de N-acétyl-glucosamine, d'autre part.

Le fucose n'a été retrouvé dans aucune des fractions chromatographiques isolées.

2°) Etude quantitative

La réduction des oligosaccharides par le borohydrure tritié, et la mesure de la radioactivité après séparation chromatographique fournit le diagramme de la figure 10 (p. 60).

Les différents composés ont été isolés, et analysés après méthanolyse.

Le tableau IX (p.61) indique leur composition et leurs rapports de quantité déterminés d'après la mesure de radioactivité.

Le premier pic, qui renferme outre du galactose et du

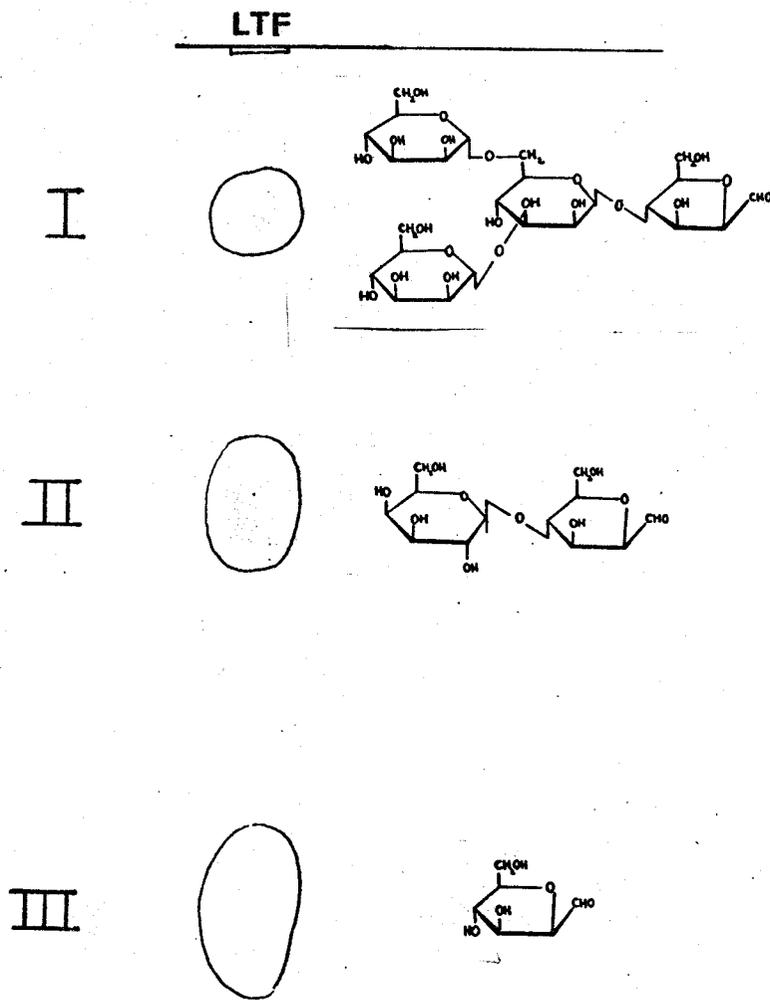


Figure 9

Chromatographie des oligosaccharides isolés après hydrazinolyse et diazotation de la lactotransferrine. Solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3). (d'après BAYARD) (II7 bis).

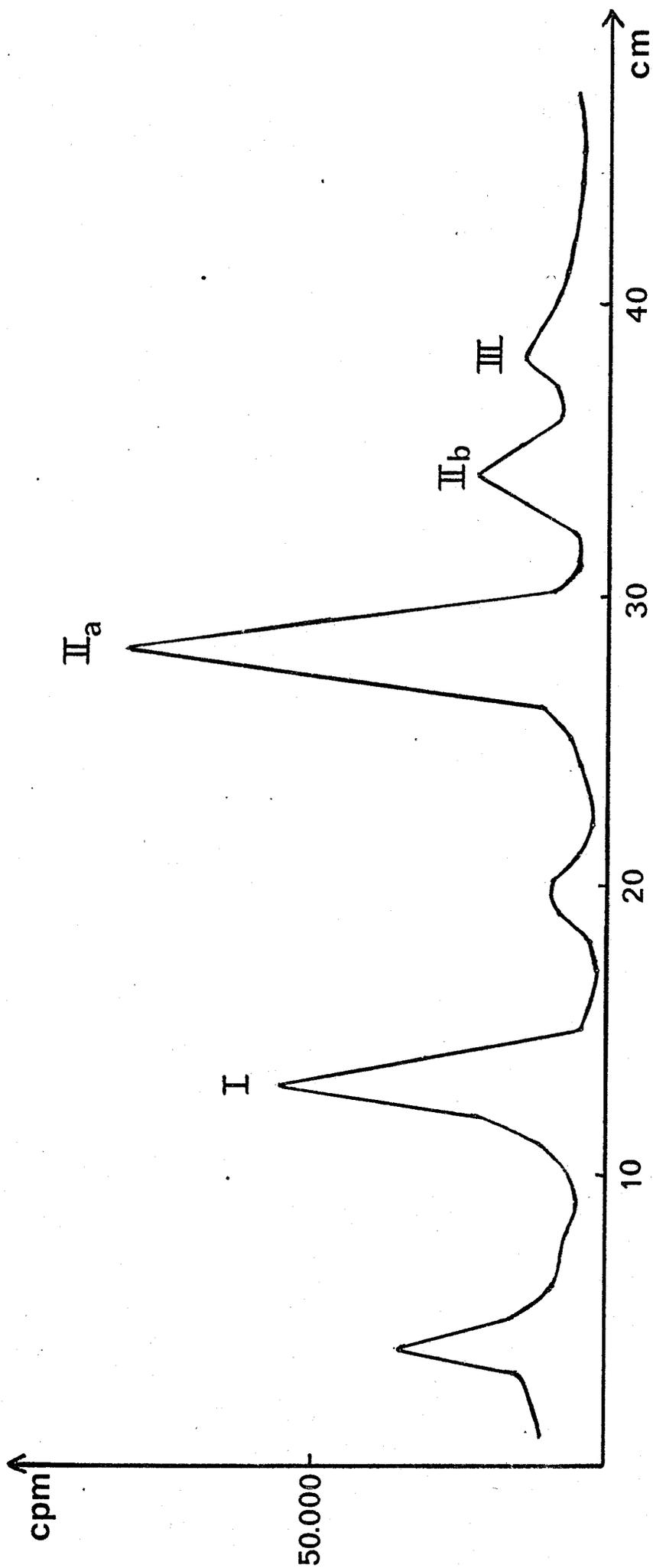


Figure 10

Diagramme de la mesure de la radioactivité des oligosaccharides réduits d'un hydrazinolysat d'apolac-totransferrine.

Séparation chromatographique dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau 5:5:1:3



TABLEAU IX

HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

	Composition	Rapport
Composé I	Mannose ; 2,5-anhydromannose	1
Composé II _a	Galactose ; 2,5-anhydromannose	1,54
Composé II _b	Galactose ; 2,5-anhydromannose	0,50
Composé III	2,5-anhydromannose (traces de galactose et de mannose)	0,33



mannose, de la N-acétyl-glucosamine, provient probablement d'une réaction incomplète d'hydrazinolyse.

Contrairement, à ce qui est observé dans le cas de la transferrine, le composé II apparaît en deux pics distincts, ce qui pourrait être expliqué par l'existence de deux types différents de liaisons du galactose sur la N-acétyl-glucosamine.

B - HYDRAZINOLYSE-DIAZOTATION DES ASIALO-GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES

I_c ET II_c

La réaction d'hydrazinolyse-diazotation a été effectuée sur chacun des glycopeptides chymotrypsiques I_c et II_c. Les résultats obtenus sont semblables. La figure 11 (p.63) montre que dans les deux cas, sont mis en évidence les oligosaccharides I et II et le 2,5-anhydro-D-mannose.

IV - PERMETHYLATION

A - RESULTATS

Les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques obtenus après perméthylation des glycopeptides I_c et II_c sont rassemblés dans les figures 12 et 13 (p. 64 et 65).

Les diagrammes des 2 glycopeptides présentent de grandes similitudes et sont analogues tout au moins du point de vue qualitatif. Ils permettent l'identification de méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-fucoside, 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside, 3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside et 2,4-di-O-méthyl-mannoside ainsi que de la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine et de la 3-mono-O-méthyl-glucosamine.

B - DISCUSSION

Le pic de perméthyl fucose fourni par le glycopeptide I_c semble plus important que celui donné par le glycopeptide II_c, mais il n'est pas possible de tirer de conclusions définitives de cette observation, la récupération quantitative des dérivés perméthylés étant incertaine et le dosage des dérivés méthylés n'est pas encore applicable.

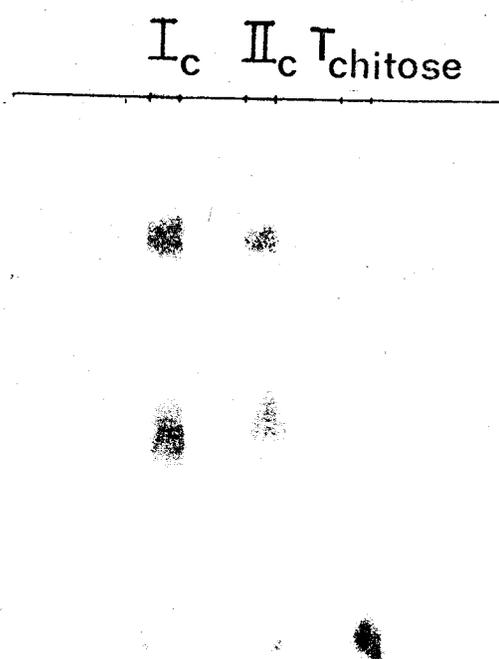


Figure 11

Chromatographie des oligosaccharides isolés après hydrazinolyse et diazotation des glycopeptides chymotrypsiques I_c et II_c de la lactotransferrine.
Solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3).

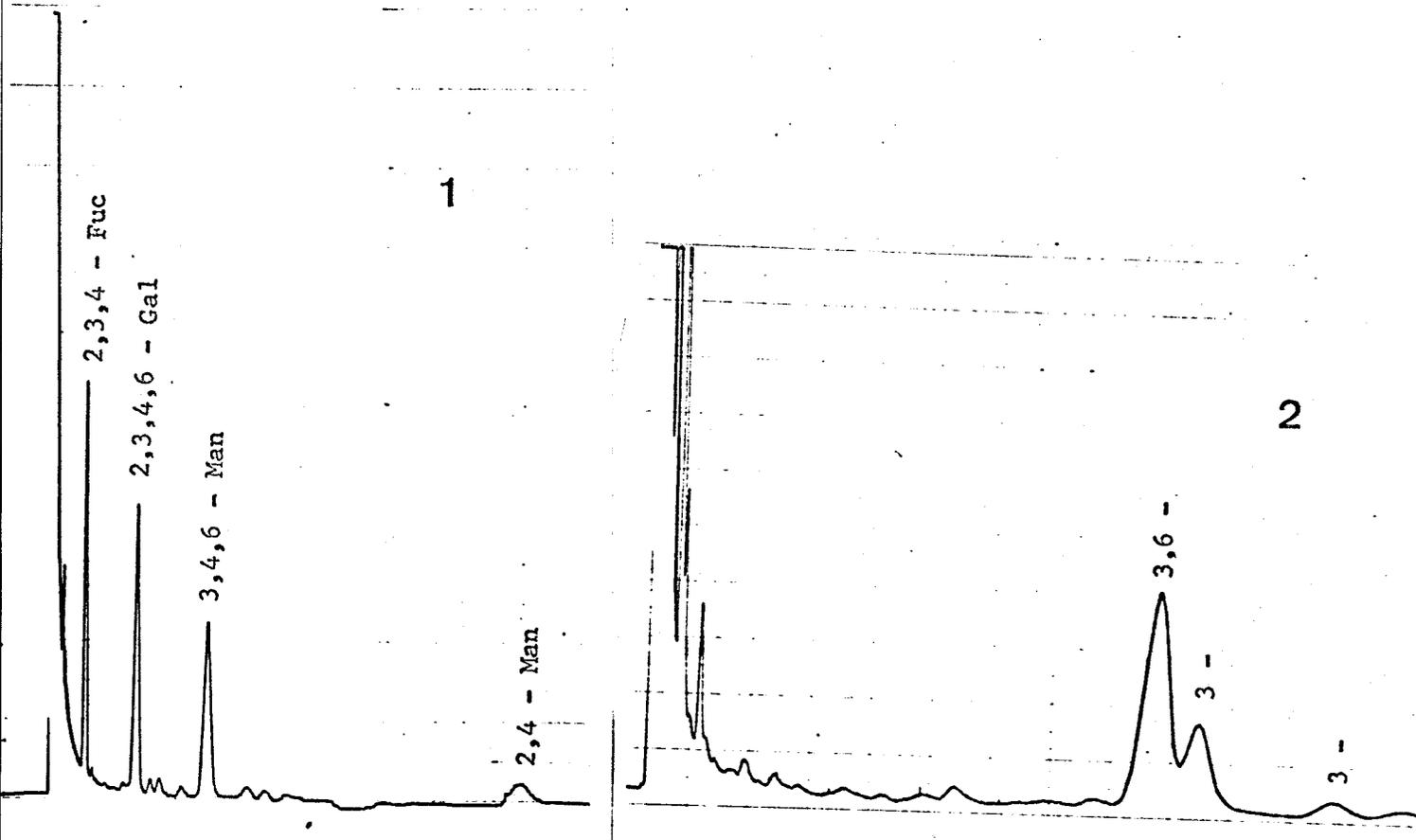


Figure 12

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques neutres (1) et des méthyl-osamines (2) libérés par hydrolyse chlorhydrique de l'asialo-glycopeptide I_c de la lactotransferrine humaine.



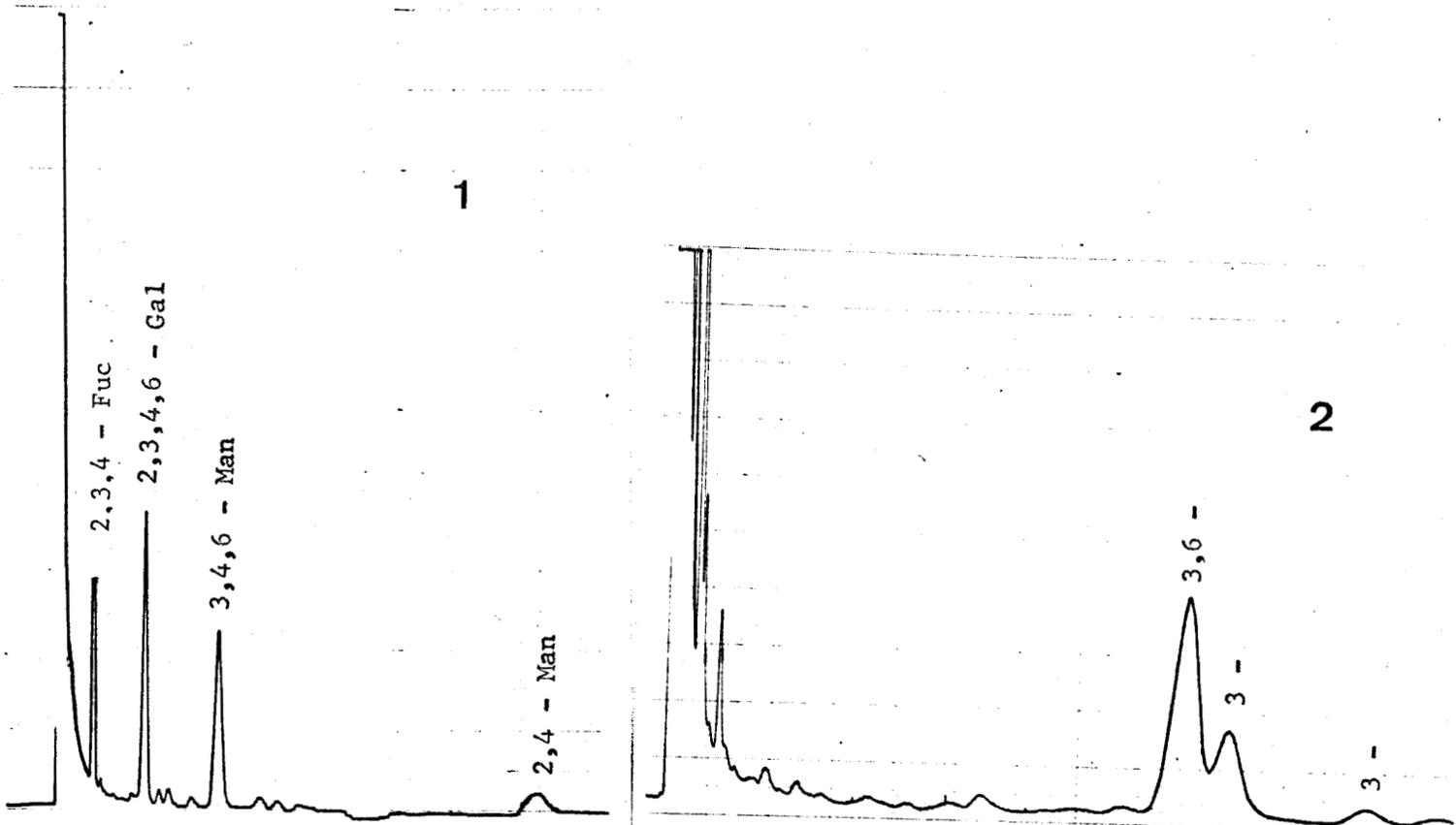


Figure 13

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques neutres (1) et des méthyl-osamines (2) libérés par hydrolyse chlorhydrique de l'asialo-glycopeptide II_c de la lactotransferrine humaine.

V - HYDROLYSES ENZYMATIQUES

A - ACTION DE LA FUCOSIDASE

Le glycopeptide défucosylé a été perméthylé. Après hydrolyse, l'analyse des dérivés méthylés montre la disparition du 3-mono-O-méthyl-glucosamine, ce qui prouve que le fucose est branché sur un résidu de N-acétyl-glucosamine.

B - ACTION DE LA GALACTOSIDASE

La galactosidase du Rein de Boeuf hydrolyse difficilement et incomplètement le galactose des asialo glycopeptides de la lactotransferrine, alors que, dans les mêmes conditions, elle libère le galactose des asialo glycopeptides de la transferrine humaine. Ce fait, nous incite à penser que le fucose serait branché sur le même résidu de N-acétyl-glucosamine que le galactose, causant un encombrement stérique qui gênerait l'action de la galactosidase.

VI - CONCLUSIONS

L'examen des valeurs des rapports molaires en monosaccharides ainsi que les résultats des réactions d'hydrazinolyse-diazotation et de perméthylation effectuées comparativement sur chacun des glycopeptides I_c et II_c, semblent indiquer que les deux glycannes isolés sont identiques. Le schéma de structure de la figure 8 (p. 57) se trouve en accord avec l'ensemble des résultats.

La méthode de perméthylation a montré que d'une part les asialo-glycopeptides de la lactotransferrine humaine possèdent tout le fucose et le galactose en position externe, et d'autre part que les chaînes glycaniques possèdent deux points de ramification comme l'indique la présence d'un dérivé diméthylé, le 2,4-di-O-méthyl-mannose et d'un dérivé mono-méthylé de la glucosamine la 3-mono-O-méthyl-glucosamine.

Ceci implique le branchement du fucose sur un résidu de glucosamine et a été confirmé par l'action de la fucosidase. Une telle liaison a été mise en évidence par DAWSON et CLAMP (118) dans les unités oligosaccharidiques d'une globuline A de Myelome et par BAENZIGER, KORNFIELD et KOCHWA (119) dans celles d'une immuno-globuline IgE.

Dans les glycannes natifs, les résidus d'acide N-acétylneuraminique viendraient se brancher sur les résidus de galactose. Les résultats de l'hydrolyse partielle et de l'hydrazinolyse-diazotation prouvent

l'existence du chaînon trimannosidique. De plus, l'apparition d'un résidu de 2,5-anhydro-D-mannose démontre l'existence de deux résidus de N-acétyl-D-glucosamine au point d'attache du glycanne sur la chaîne peptidique.

Une seule inconnue subsiste : la position exacte du fucose dont nous savons qu'il est conjugué par une liaison α -1,6 à un résidu de N-acétylglucosamine qui reste à déterminer.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur la lactotransferrine humaine sont les suivantes :

1 - L'hydrolyse chymotrypsique et l'hydrolyse trypsique de la lactotransferrine humaine ont permis d'isoler deux types de glycopeptides. Leur séquence peptidique a été déterminée et montre que ces glycopeptides proviennent de deux portions différentes de la chaîne protéique.

2 - Ces deux types de glycopeptides renferment une liaison glycanne-protide de type "asparaginy-l-glucosamine" et correspondent aux deux glycopeptides pronasiques possédant une telle liaison, mis en évidence par SPIK et al. (120).

3 - Ils présentent une séquence peptidique commune au voisinage du point d'attache : Asn, Gln, Thr, Gly, ce qui vient de nouveau confirmer l'hypothèse du codage par la chaîne protéique de la biosynthèse du groupement glycannique.

4 - L'exploration de la structure des groupements glycanniques a pu être envisagée, et grâce à l'application de différentes techniques, un schéma de structure est proposé. Il se trouve en accord avec le schéma général de structure des glycanes des glycoprotéines sériques.

Cette étude a montré que les deux glycanes isolés étaient identiques. Les séquences peptidiques des glycopeptides I et II de la lactotransferrine étant très différentes, ceci semble montrer que hormis le petit chaînon commun qui est déterminant, le reste de l'enchaînement d'acides aminés au voisinage du point d'attache influe peu sur la biosynthèse des groupements glycanniques. Cependant des acides aminés situés plus loin sur la chaîne peptidique peuvent se trouver rapprochés du glycanne par un repliement de la chaîne et, de ce fait, jouer un rôle.

5 - Aucun glycopeptide possédant une liaison O-thréonyl-glycosidique n'a pu être mis en évidence, et son existence ne peut encore être confirmée ni infirmée définitivement.

BIBLIOGRAPHIE

- AKABORI S., OHNO K. et NARITA K., Bull. Chem. Soc. Japan, 1952, 25, 214, (91).
- BAENZIGER J., KORNFELD S. et KOCHWA S., J. Biol. Chem., 1974, 249, 1897-1903, (119).
- BAGGIOLINI M., DE DUVE C., MASSON P.L. et HEREMANS J.F., J. Exp. Med., 1970, 559, (16).
- BAYARD B., Thèse Doct. Etat, Lille, 1974, (101, 117, 117 bis).
- BAYARD B. et MONTREUIL J., Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, C.N.R.S Ed., Paris, 1974, 209-218, (102).
- BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R., Exp. Ann. Biochim. Med., 1963, 25, 85, (10).
- BLANC B., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier éd., Amsterdam, 1966, 14, 125, (68).
- BLANC B., BUJARD E. et MAURON J., Experientia, 1963, 19, 299, (40, 58).
- BLANC B. et ISLIKER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 929, (23, 33, 37, 51).
- BRAZIER J., Dipl. Et. Approf, Lille, 1970, (54).
- CHARET P., TETAERT D., HAN K.K. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1973, 276D, 1629, (85).
- CHERON A., Communication personnelle, (30, 55).
- CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 148, 342, (103).
- DAWSON G. et CLAMP J.R., Biochem J., 1968, 107, 341, (118).
- DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M., Experientia, 1964, 20, 204, (93).

- DESCAMPS J., SPIK G., BRAZIER J. et MONTREUIL J., dans Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, p. A 91 (29).
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., Anal. Chem., 1956, 28, 350, (81, 82, 106).
- EDELHOCH H., Biochemistry, 1967, 6, 1948, (62).
- EDMAN P. et BEGG G., Eur. J. Biochem., 1967, 1, 80, (98).
- FLEISHMAN J.B., PAIN R.H. et PORTER R.R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, Suppl.1, 174, (79).
- FOURNET B., Thèse Doct. ès Sci., Lille, 1973, (89, 105).
- FOURNET B., LEROY Y. et MONTREUIL J., Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, Ed. C.N.R.S, Paris, 1974, 111-130, (105 bis).
- GOT R., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier éd., Amsterdam, 1964, 12, 385, (66).
- GOT R., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 432, (24).
- GOT R., GOUSSAULT Y., et FONT, J., Carbohydrate Res., 1966, 3, 157, (52, 63, 75).
- GRAY W.R. et HARTLEY B.S., Biochem. J., 1963, 89, 59 et 379, (94).
- HAKOMORI S.I., J. Biochem. (Tokyo) 1964, 55, 205, (104).
- HAN K.K., Communication personnelle, (97).
- HAN K.K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M. et BISERTE G., Ann. Pharmaceutiques Fr., 1973, 31, 539-550, (96).
- HARTLEY B.S., Biochem. J., 1970, 119, 805, (95).
- HAUPT H. et BAUDNER S., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1973, 354, 944, (26).

- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H., J. Biol. Chem., 1956, 221, 151, (80).
- HUNT L.T. et DAYHOFF M.O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 39, 757, (1).
- ISEMURA M., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., J. Biochem., 1973, 74, 11-21, (2).
- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 510, (9, 21, 32).
- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1969, 23, 683, (22, 27).
- KUSAMA K., J. Biochem., 1957, 44, 375, (92).
- LECOQ DEMORY B., Dipl. Et. Approf. Lille, 1971, (76).
- LEGER D., SPIK G., VERBERT A., DUPIRE C., MONTREUIL J. et LOUCHEUX M.H., XI Journées Biochimiques Latines Salamanque, 24-27 Avril 1973, (49, 65).
- LIU T.Y. et CHANG Y.H., J. Biol. Chem., 1971, 246, 2842, (86).
- LOISILLIER F., GOT R., BURTIN P. et GRABAR P., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier ed., Amsterdam 1968, 16, 647, (12).
- LOISILLIER F., POZZUOLI R. et BURTIN P., Path. Biol., 1971, 19, 167, (13).
- MASSON P., dans "la lactoferrine" 1970, Editions ARSCIA Bruxelles, (18).
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier ed., Amsterdam, 1966, 14, 115, (25).
- MASSON P.L. et HEREMANS J.F., Comp. Biochem. Physiol., 1971, 39B, 119, (17).
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et PRIGNOT J., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 111, 466, (11).

MASSON P.L., HEREMANS J.F. et SCHONNE E., J. Exp. Med., 1969, 130, 643, (15).

MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E. et CRABBE P.A., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, Elsevier ed., Amsterdam, 1968, 16, 633, (14).

MATSUBARA H. et SASAKI R.M., J. Biol. Chem., 1968, 243, 1732, (99).

MICHL H., Monatsh. Chem., 1951, 82, 489, (107).

MONTGOMERY R. et WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547, (83).

MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G., Bull. Soc. Chem. Biol., 1965, 47, 1867, (100 bis, 115).

MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G. et LEROY N., C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 4065, (31, 38, 43, 56).

MONTREUIL J. et MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1959, 153, 1364, (3, 7).

MONTREUIL J. et MULLET S., C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376, (4, 8, 36).

MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosage des glucides, Fasc. 1, Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux, Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci. Lille, ed., 1963, (87).

MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493, (71, 114).

MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413, (20, 28, 46, 50).

ORAM J.D. et REITER B., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 170, 351, (19).

PARTRIDGE S.M., Biochem J., 1948, 42, 238, (108).

- QUERINJEAN P., MASSON P.L. et HEREMANS J.F., Eur. J. Biochem., 1971, 20, 420, (35, 42, 48, 60, 64).
- SPACKMAN D.H., STEIN W.A. et MOORE S., Anal. Chem., 1958, 30, 1190, (84).
- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C., Anal. Chem., 1948, 20, 30, (61).
- SPIK G., Thèse Doct. ès Sci., Lille, 1968, (34, 39, 41, 47, 53, 57, 59, 72, 78, 100, 111, 112, 113, 116).
- SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P. et MONTREUIL J., Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1974, 82, 29.
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 263D, 893, (5, 45, 73, 77).
- SPIK G. et MONTREUIL J., C.R..Soc. Biol., 1966, 160, 94, (67, 69).
- SPIK G. et MONTREUIL J., International Symposium IV, Chromatographie Electrophorèse, Bruxelles, 1966, Presses Acad. Européennes éd., Bruxelles, 1968, 386, (6, 70, 74, 120).
- SPIK G. et MONTREUIL J., dans Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, p. A 102, (44).
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G. et MONTREUIL J., Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Ed. C.N.R.S, Paris, 1974, 483-500.
- SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D. et HAN K.K., Febs Letters, 1974, 38, 213-216.
- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W., J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2497, (109).
- TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 16, 404, (90).
- WOLFSON D.R. et ROBBINS J.B., Pediat. Res., 1971, 5, 514, (110).
- YAMADA M., IKEDA K. et EGAMI F., J. Biochem, 1973, 73, 69-76, (109 bis).
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G., J. Chromatog., 1972, 69, 291-304, (88).